MARCELO VIZONÁ LIBERATO

Ácidos graxos de cadeia média como ligantes da proteína PPAR γ

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

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

São Carlos
2009

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 IFSC/USP

Liberato, Marcelo Vizoná

Ácidos graxos de cadeia média como ligantes da proteína PPAR γ . / Marcelo Vizoná Liberato; orientador Igor Polikarpov. -- São Carlos, 2009.

92 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada – opção: Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Receptor nuclear. 2. PPAR γ . 3. Ácidos graxos de cadeia média. 4. Interação ligante receptor. I. Título.

IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400
13566-590 - São Carlos, SP

Fone/Fax: (16) 3373. 9777
www.ifsc.usp.br
syposgrad@ifsc.usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Vizoná Liberato

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada – Opção:
Física Biomolecular.

Aprovado em: 06/02/2009

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Igor Polikarpov

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Jorge Iulek

Instituição: UEPG

Assinatura

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Instituição: UnB

Assinatura

aos meus pais, Célia e Hélio, e meu irmão, Bruno,
pela confiança, apoio incondicional e amor,
e à Cinthia, minha grande companheira, pelo
carinho, força e principalmente paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Igor Polikarpov, pela oportunidade, discussões, apoio, cobranças, desde a iniciação científica;

Aos meus pais, meus eternos professores;

À toda minha família, que apesar de não entender nada do que eu falava, acreditam mesmo assim;

À Cinthia, pelo companheirismo tanto nos momentos bons quanto nos difíceis, pela compreensão e broncas;

Ao Alessandro, Paulinha, Carol Guzzi, Ana Puhl e Maria, pela ajuda, paciência, amizade e conhecimentos trocados;

Ao André Ambrósio, que deu os primeiros passos nos estudos de PPAR;

Aos professores Francisco Neves e Marie Togashi e à aluna de doutorado Angélica Amato, por me receberem tão bem em Brasília e me ensinarem o ensaio celular;

Aos professor Mário Palma e seu aluno Daniel Saidemberg, pelas conversas e ajuda na identificação dos ácidos graxos;

Ao Dr. Paul Webb, pelas discussões, conhecimento sobre receptores e pela ajuda com os ensaios celulares;

Aos companheiros de laboratório, por terem me aturado todo esse tempo;

Aos funcionários e técnicos do IFSC, Fernando Falvo, José Augusto Lopes da Rocha, José Geraldo Catarino, Luciana Lavezzo, Norma Bianca Saes e Susana Andrea Sculaccio. Sem eles a pesquisa não andaria;

Aos meus companheiros e ex-companheiros de república, Toshi, André, Maurício e Wilson, que me acompanharam de perto durante o mestrado, pela amizade, conversas, churrascos e cerveja;

Aos meus amigos, tanto de São Carlos quanto de Bebedouro, simplesmente pela amizade e companheirismo;

Finalmente à CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Receptores ativados da proliferação de peroxissomos (PPAR) são receptores nucleares que regulam o metabolismo de gordura e glicose, adipogênese e polarização de macrófagos, e são os mediadores da ação de uma grande classe de fármacos usada no tratamento de diabetes tipo 2, as tiazolidinadionas (TZD). Enquanto as TZDs reduzem a glicose do sangue e aumentam efetivamente a sensibilidade à insulina, elas podem também apresentar efeitos colaterais como aumento do risco de complicações cardiovasculares, ganho de peso, retenção de fluido e toxicidade hepática. Por causa disso, novos fármacos que possuem respostas mais favoráveis devem ser desenvolvidos, e o mecanismo de ativação do PPAR γ por ligantes vem sendo intensamente examinado. Para entender a relação entre a ligação de agonistas ao PPAR γ e a ativação transcricional, pretendíamos primeiramente obter cristais de PPAR γ -LBD (domínio de ligação ao ligante) humano na forma apo. Porém, surpreendentemente, a análise do sítio de ligação ao ligante revelou a presença de três pequenas moléculas, identificadas como ácidos nonanoicos e octanoicos. Este trabalho reporta a análise da estrutura cristalográfica do PPAR γ LBD complexado simultaneamente com três ácidos graxos de cadeia média (AGCM), provindos de bactérias (organismo de expressão), localizados no sítio de ligação ao ligante. A análise estrutural e funcional sugere que os AGCM são agonistas parciais que estabilizam a conformação do LBD do PPAR γ por mecanismo independente da hélice 12.

Palavras-chave: Receptor nuclear. PPAR γ . Ácidos graxos de cadeia média. Interação receptor-ligante.

ABSTRACT

PPARs (peroxisome proliferator activated receptors) are nuclear receptors that regulate glucose and fat metabolism, adipogenesis and macrophage polarization and mediate actions of a major class of drugs that are used to treat type 2 diabetes, the thiazolidinediones. While TZDs reduce blood glucose and improve insulin sensitivity effectively, they can also exhibit deleterious side effects such as increased cardiovascular risk, weight gain, fluid retention and liver toxicity. Because it is desirable to develop new PPAR γ drugs with more favorable spectrums of response, mechanisms of PPAR γ ligand activation have come under intense scrutiny. To understand relationships between PPAR γ ligand binding and transcriptional activation, we sought to obtain apo human PPAR γ -LBD (ligand binding domain) crystals that diffract to high resolution. More surprisingly, close analysis of the ligand binding pocket revealed the presence of three small molecules, identified as nonanoic acid and octanoic acid. Here, we report the X-ray structural analysis of the PPAR γ LBD complexed with three bacterial (expression organism) medium chain fatty acids (MCFAs) that simultaneously occupy the buried ligand binding pocket (LBP). Structural and functional analysis suggests that MCFAs are partial agonists that stabilize PPAR γ LBD conformation, through a helix 12 independent mechanism.

Keywords: Nuclear receptor. PPAR γ . Medium chain fatty acids. Receptor-ligand interaction.

LISTA DE ABREVIACÕES

AF-1	Função de transativação 1
AF-2	Função de transativação 2
AGCM	Ácido graxo de cadeia média
AN	Ácido nonanoico
COPR	Comodulador de PPAR e RXR
CTE	Extensão C-terminal
CREB	Elemento responsivo de ligação ao cAMP
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DR	Repetição direta
ER	Receptor de estrógeno
FABP	Proteína de ligação à ácidos graxos
HAT	Acetiltransferase de histonas
HDAC	Desacetilase de histonas
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LBP	Bolso de ligação ao ligante
LCoR	Correpressor de receptores nucleares dependente de ligante
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LXR	Liver X receptor
IMAC	Cromatografia de afinidade com íon metálico imobilizado
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NCoR	Correpressor de receptores nucleares
NGFI	Fator induzido de crescimento nervoso
PDB	Banco de dados de proteínas

PPAR	Receptores ativados da proliferação de peroxissomos
PPRE	Elemento responsive de receptores ativados da proliferação de peroxissomos
PR	Receptor de progesterona
RAR	Receptor de ácido retinoico
RIP140	Proteína de interação com receptores nucleares 140
RN	Receptor nuclear
ROR	Receptor órfão relacionado a retinoide
RXR	Receptor de retinoide X
SDS-PAGE	Gel de poliarilamida para eletroforese - Dodecil sulfato de sódio
SMRT	Mediador de silenciamento para receptores de retinoide e hormônio tireoidiano
TCEP	tris-[2-carboxietil]-fosfina
TR	Receptor de hormônio tireoidiano
TZD	Tiazolidinadiona
VDR	Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Receptores Nucleares	16
2.2 Estrutura dos receptores nucleares	17
2.2.1 Região amino-terminal	18
2.2.2 DBD	19
2.2.3 Hinge	21
2.2.4 LBD	22
2.2.5 A importância da mobilidade da hélice 12	23
2.2.6 Dimerização dos LBDs	24
2.2.7 O bolso de ligação (LBP-ligand binding pocket)	25
2.3 Ação dos receptores nucleares	26
2.4 Potencial farmacológico dos receptores nucleares	28
2.5 O receptor nuclear PPAR	29
2.5.1 Isoformas	29
2.5.2 Heterodimerização com RXR e elementos responsivos do PPAR (PPRE)	31
2.5.3 Ativação e transativação do PPAR	33
2.5.4 Ligantes de PPAR	37
2.5.5 Regulação do Metabolismo por PPAR	41
3 OBJETIVOS	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Expressão em larga escala	45
4.2 Purificação por afinidade – IMAC - Resina Talon Superflow (Clontech)	46
4.3 Remoção da cauda de histidinas	47
4.4 Ensaio de cristalização	47
4.5 Coleta de Dados e Processamento	48
4.6 Ensaio de transativação celular revelado por gene repórter	49
4.6.1 Reagentes e plasmídeos	49
4.6.2 Os Ensaio Celulares	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Da expressão à cristalização	52
5.2 Coleta de dados e determinação das estruturas de hPPAR γ -LBD complexados a ligantes	54
5.2.1 hPPAR γ -LBD complexado ao ácido nonanóico	56
5.2.2 hPPAR γ -LBD complexado com rosiglitazona	67
5.3 Novos ligantes encontrados – Ácidos octanóico e nonanóico	70
5.4 Capacidade de transativação do PPAR γ de camundongo	73
5.5 Confirmação da capacidade de transativação dos ácidos graxos de cadeia média em PPAR γ humano	76
6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Entre células a comunicação ocorre por meio de diferentes tipos de moléculas sinalizadoras que inclui proteínas, pequenos peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos graxos e gases como óxido nítrico e monóxido de carbono. As células alvo respondem independentemente da natureza desses sinais, por intermédio de proteínas específicas denominadas receptores. A ligação entre as moléculas sinalizadoras e seus receptores desencadeia uma resposta específica pelas células-alvo. Os receptores podem ser classificados como transmembranares, localizados na superfície celular, ou solúveis, localizados no citosol ou núcleo das células. Os receptores transmembranares ao se ligar a uma molécula sinalizadora extracelular (ligantes hidrofílicos), tornam-se ativados e geram uma cascata de sinais intracelulares alterando o comportamento da célula alvo. No caso dos receptores solúveis a sinalização ocorre após a penetração dos ligantes na célula, portanto estas últimas moléculas devem ser suficientemente pequenas e hidrofóbicas para se difundirem através da membrana plasmática.

A maioria dos receptores que se localizam e agem no núcleo das células são membros da superfamília de receptores nucleares. Esta superfamília é formada pelos receptores para hormônios lipofílicos (esteroides, retinoides, vitamina D e tireoidianos), para metabólitos endógenos (ácidos biliares, oxiesterol e eicosanoides) e para alguns receptores de xenobióticos (que induzem a produção de citocromo P450, facilitando processos de desintoxicação). Os receptores nucleares são geralmente proteínas de 50-100 kDa e estão envolvidos em praticamente todas as funções fisiológicas do organismo, pois são potentes reguladores do desenvolvimento, divisão e diferenciação celular, metabolismo e homeostase. Eles são responsáveis pela regulação da transcrição de genes-alvo, mediando os efeitos pleiotrópicos dos hormônios lipofílicos nas células. Estes receptores estão intimamente

relacionados a diversas doenças, principalmente a variados tipos de cânceres e por isso têm sido considerados “alvos” para novas tentativas de terapias. Os grupos de agonistas e antagonistas que atuam nestes receptores constituem hoje a classe de fármacos mais procurada para a prática terapêutica, sendo, portanto, um dos mais importantes alvos para o desenvolvimento de medicamentos.

Estudos de ligantes, naturais e sintéticos, vem aumentando muito o conhecimento sobre a regulação da expressão gênica pelos receptores nucleares. Adicionalmente, a resolução de estruturas cristalográficas dos domínios de ligação dos receptores nucleares tem auxiliado na definição das bases estruturais para o conhecimento das funções destes receptores. Com a resolução das estruturas básicas dessas proteínas na presença e ausência de compostos específicos (coativadores, correpressores, agonistas e antagonistas), tornou-se possível entender melhor como ocorre a ligação ligante-receptor e saber quais são e onde estão localizados os aminoácidos mais importantes para que este processo ocorra. Porém, as informações obtidas até hoje não são suficientes para se entender claramente como esses processos se desenvolvem. Assim, torna-se imprescindível buscar mais informações sobre a estrutura, o funcionamento e quais seriam as moléculas que poderiam atuar como antagonistas e agonistas destes receptores.

Entre estes receptores nucleares, merece destaque o PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), pois tem papel fundamental na diferenciação de adipócitos, controle inflamatório, metabolismo de ácidos graxos, controle do ciclo celular e desenvolvimento de arteriosclerose (DESVERGNE; WAHLI, 1999; SCHOONJANS; STAEELS; AUWERX, 1996; WILLSON; LAMBERT; KLIEWER, 2001). Três isoformas do PPAR foram identificadas em vertebrados. Elas receberam os nomes PPAR α , PPAR β e PPAR γ quando o grupo foi originalmente encontrado em *Xenopus* (DREYER *et al.*, 1992), logo depois da caracterização

do primeiro PPAR em camundongo (ISSEMAN; GREEN, 1990). Os ácidos graxos, juntamente com seus derivados, são os ligantes naturais do grupo PPAR.

O Receptor ativado da proliferação de peroxissomos γ , a isoforma do PPAR mais amplamente investigada, é expressa predominantemente em tecido adiposo e em menor escala no coração, cólon, fígado, baço, intestino, músculo esquelético, rins e macrófagos (ESCHER *et al.*, 2001). O PPAR γ é reconhecido como o principal fator de transcrição na regulação de genes envolvidos na diferenciação de adipócitos, sendo que tal regulação envolve uma complexa cascata de sinalização coordenada com outras famílias de fatores de transcrição (SPIEGELMAN; FLIER, 1996). Além disso, PPAR γ vem mostrando ser um importante regulador de genes alvos envolvidos no metabolismo de glicose e lipídeos. O PPAR γ é também o alvo molecular da classe de agentes antidiabéticos tiazolidinadiona (TZD), sendo que dois de seus representantes, rosiglitazona (Avandia) e pioglitazona (Actos), são fármacos comercializados para o tratamento de diabetes tipo 2. As TZD aumentam a sensibilidade à insulina em tecidos alvos e diminuem o nível de glicose e ácidos graxos em pacientes com diabetes. Porém, o tratamento desta doença com TZDs tem como efeitos colaterais o ganho de peso, acumulação de líquido e edemas que aumentam a chance de complicações cardíacas.

Considerando toda a importância do PPAR γ , relativa tanto à sua função na regulação do metabolismo energético quanto ao tratamento de doenças como a diabetes, a compreensão do funcionamento desse receptor, relacionado principalmente à sua interação com as moléculas reguladoras vem a ser de grande valia para o conhecimento científico, para a medicina e até de valor econômico, levando-se em conta a indústria farmacêutica. Na avidez de entender completamente o mecanismo de interação PPAR γ -ligante, além do interesse na patente de novos fármacos, a busca por novos ligantes vem rendendo várias publicações, reportando a síntese de novos compostos, bem como o estudo de ativação e estrutural.

Porém, ainda pouco se sabe sobre seus ligantes naturais. Entre eles, o mais conhecido é a 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2, que possui alta afinidade pelo receptor (FORMAN *et al.*, 1995). Além dela, vários ácidos graxos foram reportados como ligantes possivelmente naturais de PPAR γ , todos eles insaturados e possuindo cadeia longa (KLIEWER *et al.*, 1997; KREY *et al.*, 1997). Das mais de 40 estruturas de PPAR γ depositadas no banco de dados de proteínas PDB, apenas 7 estruturas (ITOH *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008) se apresentam com ligantes naturais, sendo que 6 delas estão descritas na mesma publicação (LI *et al.*, 2008).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Receptores Nucleares

A super família dos receptores nucleares é constituída por: receptores de hormônios esteroides, receptores do hormônio tireoidiano, vitamina D, retinoides, ácidos graxos, prostaglandinas, além de um número crescente de “receptores órfãos”, assim denominados uma vez que seus ligantes não foram ainda identificados (ARANDA; PASCUAL, 2001; ROBINSON-RECHAVI; ESCRIVA GARCIA; LAUDET, 2003).

Os receptores nucleares têm suas funções ativadas via ligação de uma molécula sinalizadora lipofílica (figura 1). Através da ligação desta molécula sinalizadora é exercido o controle dos processos e respostas transcricionais (ARANDA; PASCUAL, 2001; ROBINSON-RECHAVI; ESCRIVA GARCIA; LAUDET, 2003; TANEJA, 2005). Os receptores atuam em conjunto com parceiros em complexos, que são denominados como: complexos coativadores, quando em presença de seu ligante natural, participando da ativação da transcrição, e correpressores quando participam da repressão da transcrição na ausência de ligante (ROBINSON-RECHAVI; ESCRIVA GARCIA; LAUDET, 2003). O mecanismo de ação da transcrição de um modo geral se inicia quando um agonista se liga ao sítio ativo do receptor que está complexado ao repressor; após a ligação do agonista ao sítio ativo do receptor uma alteração conformacional é desencadeada provocando a liberação do receptor do complexo correpressor. Em seguida, o receptor se associa ao complexo ativador seguindo-se da ligação ao DNA, desencadeando o início da transcrição (BOURDONCLE *et al.*, 2005).

A superfamília dos receptores nucleares humanos possui 48 proteínas que regulam a transcrição dos seus respectivos genes alvos (GRONEMEYER; GUSTAFSSON; LAUDET, 2004). Esta superfamília evoluiu a partir de um receptor ancestral comum (ARANDA;

PASCUAL, 2001), o que confere a ela uma organização estrutural bem característica que será discutida posteriormente.

A pesquisa envolvendo receptores nucleares hoje em dia é grande, principalmente com relação ao desenvolvimento de novos fármacos, devido ao fato de os receptores estarem diretamente relacionados com os mecanismos envolvidos em diversas doenças humanas como: alguns tipos de câncer, obesidade, osteoporose, diabetes, doenças endócrinas, doenças metabólicas, psoríase, acne, hipercolesteremia, arteriosclerose e desordem lipídica (ARANDA; PASCUAL, 2001).

Figura 1. Ativação da transcrição pelos receptores nucleares via ligação do hormônio (ligante). Em alguns casos o ligante sofre algumas alterações até se tornar o hormônio definitivo.

2.2 Estrutura dos receptores nucleares

Os RN (receptores nucleares) são constituídos de uma única cadeia, que se organiza estruturalmente em módulos ou domínios com funções específicas (figura 2). Estes domínios são evolutivamente conservados, a saber: região amino-terminal, DBD (domínio de ligação ao

DNA), *hinge* (dobradiça), LBD (domínio de ligação ao ligante) e região carboxi-terminal (GRONEMEYER; GUSTAFSSON; LAUDET, 2004).

Figura 2. Representação esquemática em uma e três dimensões da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares que foram conservadas evolutivamente. Região amino-terminal (A/B) em marrom (tracejado), altamente variável entre os membros da família, onde se encontra o domínio de transativação independente de ligante AF-1, em azul (C) encontra-se o domínio de ligação ao DNA (DBD), extremamente conservado, em verde (D) conectando o DBD ao LBD encontra-se a região dobradiça (Hinge), que não é conservado, em vermelho (E) encontra-se o domínio de ligação ao ligante (LBD), conservado entre os membros da família dos RN, que possui na sua região C-terminal o domínio de transativação dependente do ligante AF-2. Em seguida, em roxo (tracejado) a região (F) que está presente em alguns receptores. A região-F é muito variável e ainda não tem sua função bem conhecida. Em magenta (semitransparente) está representado o RXR. O PDBID da estrutura representada é 3DZY (CHANDRA *et al.*, 2008)

2.2.1 Região amino-terminal

Também conhecida como região A/B que contém o domínio de transativação AF-1 (função de ativação 1) de tamanho e sequência variados entre os membros das famílias, ela é responsável pelo reconhecimento de co-ativadores e outros fatores de transcrição. Esta região

mostra atividade celular-específica sugerindo que esta parte da proteína contribui para a especificidade de ação entre isoformas de um receptor. O domínio modulatório, também é alvo de fosforilação realizada por diferentes caminhos de sinalização. Tais modificações via fosforilação podem afetar significativamente a atividade transcricional (LEE *et al.*, 1999).

2.2.2 Domínio de ligação ao DNA

O DBD é o domínio de ligação ao DNA, sendo o módulo mais conservado entre a superfamília dos receptores nucleares. Ele é composto por dois dedos de zinco e possui normalmente de 60 a 70 aminoácidos. Na sua região C-terminal existem as conhecidas caixas P e D (figura 3).

O DBD é responsável pelo reconhecimento de seqüências específicas (elementos responsivos) e ativação dos genes, possuindo um motivo de nove cisteínas conservadas ao longo da família dos RN que é responsável pela alta afinidade do DBD pelo DNA. Em cada dedo de zinco existe um arranjo tetraédrico de cada zinco coordenado por quatro cisteínas. Cada íon zinco promove a formação de uma estrutura compacta e interdependente com as cisteínas coordenantes. Alguns aminoácidos específicos estão situados na região próxima aos dedos de zinco e estes são responsáveis pelo reconhecimento de seqüências específicas de DNA ou motivos. Na base do primeiro dedo de zinco, este agrupamento específico de aminoácidos é conhecido como Caixa P ou “P Box” enquanto que na região próxima ao segundo dedo de zinco temos a caixa D ou “D Box” que está envolvida no processo de dimerização (SHAO; LAZAR, 1999).

O DBD possui um enovelamento característico de duas α -hélices sendo que a primeira hélice começa na terceira cisteína conservada (hélice de reconhecimento) que se liga à cavidade principal do DNA fazendo contatos com bases específicas. A segunda hélice,

próxima ao C-terminal do segundo dedo de zinco forma um ângulo reto com a primeira hélice (SHAO; LAZAR, 1999).

Os RN se ligam via DBD aos elementos responsivos (sequência específica de DNA), derivados do motivo AGGTCA. A forma como estes receptores se ligam está vinculada ao seu estado de oligomerização. Normalmente a ligação pode ocorrer de três maneiras:

- Monômero, quando se liga a um sítio simples. Ex: alguns receptores órfãos como NGFI-B;
- Homodímero, quando se liga a sítio duplicado com palíndromo invertido, ex: receptores de esteróides;
- Heterodímero, quando se liga a sítio duplicado com repetição direta. Ex: heterodímeros com RXR.

Tal fenômeno ocorre porque em cada receptor existe, na primeira hélice, uma região que é responsável pelo reconhecimento; resíduos expostos que fazem a discriminação entre os diferentes sítios de ligação, modulando desta forma o padrão de ligação do receptor nuclear ao respectivo gene para desencadear sua atividade biológica (BOURGUET; GERMAIN; GRONEMEYER, 2000).

Figura 3. Esquema do domínio de ligação ao DNA dos receptores nucleares, com seus dois característicos dedos de zinco e a extensão de sua região C-terminal (CTE). Nos dedos de zinco observam-se quatro cisteínas conservadas, coordenantes para cada dedo de zinco. A hélice 1 contém os resíduos da caixa P, que estão envolvidos na discriminação dos elementos responsivos. Os resíduos no segundo dedo de zinco que constituem a caixa D formam a interface de dimerização. A região C-terminal (CTE) contém as caixas P e D que são responsáveis pela ligação da proteína ao DNA em estado monomérico. Como mostrado acima, observa-se o cruzamento das hélices 1 e 2 num ângulo reto, formando a região de reconhecimento do meio-sítio do elemento responsivo.

2.2.3 Hinge

A região Hinge (dobradiça) ou domínio D é a porção conectora entre os domínios DBD e LBD, permitindo assim a movimentação de um módulo sobre o outro. O domínio D não é conservado entre a superfamília dos RNs sendo, em muitos casos, relacionado à sinalização. Esta região também está envolvida em interações com co-reguladores dos RN, pois alterações nela interferem nas interações entre receptores e corre reguladores, podendo até cessá-las. No caso dos TRs e outros essa interação se dá pelo motivo LXXLL, também presente nos corre reguladores, com o sítio de ligação no domínio LBD da proteína (ARANDA; PASCUAL, 2001; GRONEMEYER; GUSTAFSSON; LAUDET, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2006).

2.2.4 Domínio de ligação ao ligante

O domínio de ligação ao ligante (LBD) é um domínio com múltiplas funções; além de atuar como domínio desencadeador do mecanismo de ação dos RN, ser responsável pela localização nuclear, homo-hetero dimerização, associação com correpressores e coativadores, proteínas de choque térmico, ele também possui a chamada região de transativação AF-2 ou função de ativação ligante-dependente.

O enovelamento do LBD ao longo da família dos RN é bem característico, sendo compartilhado pela maioria dos membros da família. Este enovelamento é basicamente constituído de 12 Hélices- α numeradas de 1-12 e uma folha β (entre as hélices 5 e 6) organizadas em um “sanduíche α -helical” antiparalelo organizado estruturalmente em três camadas como pode ser visto na figura 4 (MORAS; GRONEMEYER, 1998; WURTZ *et al.*, 1996). No centro de mais duas camadas, três hélices se organizam de tal maneira que um “core”, constituído de resíduos em sua maioria hidrofóbicos, é formado na região central do domínio. Este core hidrofóbico formado é o sítio ativo do LBD, sendo este o alvo dos ligantes. O tamanho da cavidade hidrofóbica formada varia entre os membros da família dos RNs e entre os estados onde o receptor se encontra ligado ao ligante (holo) e na ausência do ligante (apo). As estruturas dos receptores no estado holo são mais compactas o que evidencia claramente uma alteração estrutural significativa. A modificação da estrutura num estado mais compacto (holo) também confere uma maior estabilidade a proteína.

Figura 4. Representação *cartoon* do domínio de ligação ao ligante (LBD) holo em receptores nucleares. Coloração arco-íris com região amino-terminal (H1) em azul e região carboxi-terminal (H12) em vermelho. Nomenclatura padrão utilizada para receptores nucleares (WURTZ *et al.*, 1996). A) RAR γ (KLAHOLZ; MITSCHLER; MORAS, 2000), b) TR β (KOEHLER *et al.*, 2006), c) RXR α (NAHOUM *et al.*, 2007), d) PPAR γ (LI *et al.*, 2005).

2.2.5 A importância da mobilidade da hélice 12

Para os RNs que seguem a regra geral de ligação e composição estrutural do seu LBD, a hélice 12 é um componente estrutural de vital importância no mecanismo da ativação da transcrição, pois é a hélice 12 que é induzida por ligante. Após a ligação do ligante ocorre uma alteração conformacional da proteína provendo um novo padrão de ligações que proporcionam uma superfície adequada para a ligação dos co-ativadores, em seguida a região AF-2 promove o início da transcrição. Por meio de estudos mutacionais, foi demonstrada a

importância da região C-terminal conservada em muitos LBDs dos RNs que contém a região AF-2, antes da resolução estrutural dos LBDs, e foi demonstrado que esta porção corresponde a hélice 12 anfipática. Como o movimento da hélice 12 é ligante-induzido tal fato sugere que ela é crucial para controlar as propriedades agonistas e antagonistas dos RNs devido às suas interações com o ligante e com os correguladores, bem como com os resíduos que interagem com eles (BOURGUET *et al.*, 1995; WURTZ *et al.*, 1996). Esse mecanismo de abertura e fechamento da hélice 12 para entrada e acomodação do ligante é conhecido como “mecanismo ratoeira”, por lembrar o funcionamento de ratoeira (CHAMBON, 1996; RENAUD *et al.*, 1995).

2.2.6 Dimerização dos LBDs

Os resultados de pesquisas mostram que o LBD possui uma habilidade natural para a dimerização, como se observa nas estruturas dos receptores ER, RXR, RAR, PR e PPAR γ , que foram cristalizadas como dímeros (BOURGUET; GERMAIN; GRONEMEYER, 2000).

Dados coletados para a dimerização dos LBDs de TR, RXR, RAR e VDR foram obtidos através de estudos de mutações pontuais e deleções. Tais estudos revelaram que existe uma área comum de 40 aminoácidos situados nas hélices 10 e 11 que são responsáveis pela homodimerização de RXR e TR e heterodimerização entre: RAR-RXR, TR-RXR, e VDR-RXR (RIBEIRO *et al.*, 2001). Entretanto mutações e deleções podem provocar a perda de enovelamento e interferir na análise dos resultados. Estudos posteriores sugerem que a região de dimerização com parceiros diferentes variam porque as regiões de interação entre diferentes receptores não são sempre as mesmas, o que produz variações na maneira com que os LBDs interagem e dos resíduos envolvidos no processo (RIBEIRO *et al.*, 2001).

Existe uma possibilidade de que quando o ligante se encontra no sítio de ligação, um rearranjo conformacional seja provocado pela presença do ligante, produzindo um rompimento das ligações que preservam o dímero do LBD. Este fenômeno produzido pelo ligante pode provocar um bloqueio na ativação da transcrição (BOURGUET; GERMAIN; GRONEMEYER, 2000).

2.2.7 O bolso de ligação (LBP-ligand binding pocket)

O LBP é constituído pelos elementos de estrutura secundária hélices 3,5,11 e 12, loops L6,7,11 e 12 e os *hairpins* tipo β S1 e S2 (WEATHERMAN; FLETTERICK; SCANLAN, 1999). Na maioria das estruturas cristalográficas disponíveis em estado holo, o ligante se encontra enterrado no interior do LBP, sem uma clara indicação de entrada ou saída de acesso ao LBP, exceto no caso do PPAR γ onde se observa um espaço de acesso entre a hélice H3 e a volta- β , que pode ter tamanho suficiente para entrada de pequenos ligantes sem a necessidade de grandes adaptações. Para os outros receptores, alterações conformacionais que seguem o modelo da ratoeira previamente descrito são necessárias para permitir o acesso do ligante ao LBP, pois a movimentação da hélice 12 abre um canal que promove a remoção da “tampa”, que sela o LBP (TOGASHI *et al.*, 2005).

O LBP é basicamente composto de resíduos hidrofóbicos com alguns resíduos carregados na região interna perto da volta- β , que serve como pontos de ancoragem para a parte polar dos ligantes - fato este relacionado à seletividade dos ligantes. A maioria dos RN possui uma arginina conservada na hélice 5. Alguns resíduos polares são claramente conservados nas subfamílias dos RNs de acordo com os requerimentos dos ligantes das subformas de LBP característico de uma dada sub-família.

Outro aspecto interessante do LBP é a capacidade de adaptação ao ligante que o bolso possui. Esta capacidade de reorganização para a acepção de mais de um tipo de ligante é possível principalmente por conta da flexibilidade das hélices 3, 11,12 e do loop entre as hélices 11 e 12, que permite uma reorganização dos resíduos para a acepção dos ligantes (TOGASHI *et al.*, 2005).

2.3 Ação dos receptores nucleares

Na ausência de ligantes, os receptores nucleares se encontram em geral ligados a um grupo de correpressores transcricionais, como o correpressor de receptor nuclear 1 (NCoR1) ou o silenciador e mediador para retinoide e receptor de hormônio tireoidiano (SMRT), também conhecido como NCoR2. Tais proteínas recrutam complexos transcricionais que contém desacetilases de histonas (HDACs). Estas desacetilases produzem uma condensação da estrutura da cromatina exatamente sobre os promotores alvos, impedindo assim que os receptores responsáveis pela ativação da transcrição possam encaixar nos elementos responsivos do DNA produzindo desta maneira então, a repressão do mecanismo de transcrição (ROCHETTE-EGLY, 2005). Vide figura 5.

Os correpressores têm afinidade por uma região denominada caixa correpressora do receptor nuclear “corepressor nuclear-receptor Box” (CoRNR Box), interagindo com a região hidrofóbica formada pelas hélices 3, 4 e 12 que são parte integrante do LBP (ligand binding pocket). Quando um ligante se liga ao sítio este provoca uma alteração conformacional da hélice 12, produzindo assim uma nova conformação que desestrutura a cavidade hidrofóbica (CoRNR Box) ocasionando a dissociação do complexo co-repressor. Essa nova conformação da hélice 12 (holo) permite a interação desta com motivos co-ativadores com a sequência básica LxxLL, onde L é leucina e x qualquer aminoácido. O motivo LxxLL está presente na

maioria dos co-ativadores envolvidos em interações via LBD. Peptídeos ou proteínas que contêm o motivo LxxLL possuem a capacidade de serem reconhecidos pelo sítio formado pelas hélices 3,4 e 12. Esta região é partilhada em interações com co-repressores, além de também ser reconhecida por co-repressores, que possuem um motivo similar, mas não idêntico, aos motivos dos co-ativadores. O agonista induz a mudança conformacional do LBD que é a manifestação estrutural da função de transativação (AF-1) do receptor nuclear. Observa-se que efeitos alostéricos ligante-induzidos sobre o LBD podem controlar a atividade da região AF-1, o que se vê no caso de *crosstalk* entre as regiões C e N-terminal (GRONEMEYER; GUSTAFSSON; LAUDET, 2004).

Figura 5. Ação dos RNs (GRONEMEYER; GUSTAFSSON; LAUDET, 2004). O ligante migra via membrana plasmática e interage com o respectivo receptor o que pode não ser diretamente no núcleo, pois há a possibilidade de interação no citoplasma, como por exemplo com kinases (a). Pode haver uma variação da média da localização dos diferentes receptores e que é afetada pela natureza dos ligantes. A interação dos ligantes controla uma diversidade de fatores. Na ausência do ligante, muitos receptores se encontram ligados a regiões reguladoras de genes alvo como correpressores ou complexos de histonas desacetilase (HDAC) (b). A desacetilação das histonas é responsável pela condensação da cromatina o que explica o efeito do silenciamento do gene nos receptores apo. A ligação do ligante libera o complexo HDAC (c) o que resulta no recrutamento da histona acetil transferase (HAT) e do complexo de remodelação da cromatina (CRM) que promoverá um estado adequado para a acepção do complexo ativador na região onde se encontra ligado o receptor (d). Para finalizar, a polimerase II aloenzima (enzima pol II, TAF-TATA-binding protein-associated factor) e complexos mediadores são recrutados e aumentam a frequência da iniciação da transcrição (e).

2.4 Potencial farmacológico dos receptores nucleares

Por conta dos RNs estarem envolvidos em vários processos relacionados aos organismos vivos como: crescimento, morfogênese, metabolismo, procriação, diferenciação celular, proliferação, apoptose e manutenção da homeostase (RENAUD; MORAS, 2000; ROBINSON-REHAVI; ESCRIVA GARCIA; LAUDET, 2003; TANEJA, 2005),

observando-se ainda que cada mecanismo citado acima está ligado à ativação por um determinado ligante que normalmente é lipofílico os RN caracterizam-se a serem alvos farmacológicos. Deve-se levar em conta ainda que cada um dos processos citados acima se encontra estreitamente entrelaçado uns com os outros, o que acarreta numa diversidade de papéis desempenhados pelos RNs como um todo (RENAUD; MORAS, 2000).

2.5 O receptor nuclear PPAR

2.5.1 Isoformas

Em vertebrados foram identificadas três isoformas de PPAR, incluindo *Xenopus*, camundongo e humanos (CHEN; LAW; O'MALLEY, 1993; ISSEMAN; GREEN, 1990; SCHMIDT *et al.*, 1992; SHER *et al.*, 1993; ZHU *et al.*, 1993). Eles foram denominados PPAR α (NR1C1), PPAR β (NR1C2), e PPAR γ (NR1C3) quando o grupo foi originalmente encontrado em *Xenopus laevis* (DREYER *et al.*, 1992), logo depois da caracterização do primeiro PPAR em camundongo (ISSEMAN; GREEN, 1990).

Estudos filogenéticos mostraram que PPARs formam uma subfamília dos receptores nucleares, juntamente com os receptores de hormônio tireoidiano (TR), ácido retinoico (AR), vitamina D, ecdisona e os receptores órfãos Ver-ErbA α (NR1D1) e E75 (NR1D3), sendo os dois últimos mais próximos aos PPARs (LAUDET *et al.*, 1992). O gene ancestral dessa subfamília teria surgido há mais de 500 milhões de anos (KNOLL, 1992).

A localização cromossômica dos genes de PPARs foi definida para humanos e camundongos. O PPAR α humano (h) foi mapeado no cromossomo 22 (SHER *et al.*, 1993). O gene do hPPAR γ localiza-se no cromossomo 3, próximo a RAR β e TR β (GREENE *et al.*, 1995). E, finalmente, o hPPAR β é encontrado no cromossomo 6 (YOSHIKAWA *et al.*,

1996). Em camundongos, o PPAR γ está localizado no cromossomo 6, enquanto PPAR α e PPAR β são encontrados no cromossomo 15 e 17, respectivamente (JONES *et al.*, 1995).

Os genes de PPAR de camundongos e humanos caracterizados até hoje revelam uma organização comum das regiões traduzidas em seis éxons com a seguinte distribuição: um éxon para o domínio A/B, dois éxons para o DBD, sendo um para cada dedo de zinco, um éxon para a região D (dobradiça), e dois éxons para o LBD. O gene de PPAR α de camundongo ocupa pelo menos 30 kb e possui um total de 8 éxons, sendo que dois deles correspondem a uma região 5' não traduzida e o último éxon do LBD compreende a região 3' não traduzida (GEARING; CRICKMORE; GUSTAFSSON, 1994). Para o gene de PPAR β , somente uma organização parcial em *Xenopus*, que corresponde aos seis éxons da região de tradução, foi reportada (KREY *et al.*, 1993). Os genes de PPAR γ , tanto humanos como de camundongos, se estendem por mais de 100 kb de DNA genômico e originam vários mRNAs, PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3, que diferem na porção 5' como consequência do uso diferencial de promotores e de *splicing* (figura 6). PPAR γ 1 é codificado por oito éxons, compreendendo dois éxons γ 1 específicos na região 5', A1 e A2, e os outros seis éxons que são comuns aos outros três mRNAs. PPAR γ 2 é codificado por sete éxons, sendo que o primeiro deles, éxon B, também está localizado na região 5' não traduzida adicionando aminoácidos γ 2 específicos na porção amino-terminal. No DNA genômico, este éxon γ 2 específico está localizado entre A2 e o primeiro éxon comum a todos os PPAR γ s (BEAMER *et al.*, 1997; FAJAS *et al.*, 1997; ZHU *et al.*, 1995). O terceiro mRNA, PPAR γ 3, codifica a mesma proteína PPAR γ 1, mas com o éxon A1 ausente, ele é controlado por um promotor alternativo localizado entre o éxon A1 e A2 (figura 6) (FAJAS; FRUCHART; AUWERX, 1998). Recentemente foram identificados em macrófagos de macacos dois novos éxons, chamados de C e D (ZHOU; WILSON; MEDH, 2002). Estes éxons combinam com os outros três (A1, A2 e B) formando assim quatro novas isoformas, PPAR γ 4, PPAR γ 5, PPAR γ 6 e

PPAR γ 7, onde apenas o PPAR γ 6 não foi identificado em humanos (CHEN; JIMENEZ; MEDH, 2006).

Figura 6. Organização genômica dos genes das isoformas do hPPAR γ . Três isoformas são produzidas pelo uso diferencial de três promotores e *splicing* alternativo dos cinco éxons da região 5' A1, A2, B, C e D. Os éxons 1-6 são comuns aos sete transcritos. À direita contém um esquema dos seis mRNAs transcritos, e o tamanho das proteínas traduzidas está indicado. Note que a tradução dos mRNAs γ 1, γ 3, γ 5 e γ 7 resulta na mesma proteína PPAR γ 1 de 477 aminoácidos. A tradução dos mRNAs γ 2, γ 4 resulta respectivamente nas outras duas isoformas, as proteínas PPAR γ 2 de 505 aminoácidos e PPAR γ 3 de 483 aminoácidos (CHEN; JIMENEZ; MEDH, 2006).

2.5.2 Heterodimerização com RXR e elementos responsivos do PPAR (PPRE)

Em contraste com os receptores de hormônios esteroides, que agem como homodímeros, PPARs ativam a transcrição de seus genes alvo como heterodímero com RXR (GEARING *et al.*, 1993; KELLER *et al.*, 1993). As três isoformas do RXR podem se dimerizar com PPARs, mas a associação específica com cada isoforma parece influenciar o reconhecimento de promotores de genes alvo (JUGE-AUBRY *et al.*, 1997). Há poucos anos

foi demonstrado que a associação de PPARs com RXR ocorre independentemente da interação com ligantes e que a heterodimerização não depende da ligação ao DNA (FEIGE *et al.*, 2005).

O fato de o ácido cis-9 e agonistas sintéticos de RXR poderem promover a transcrição de genes alvo do PPAR nos traz um modelo de ativação transcricional permissiva onde o heterodímero PPAR:RXR pode induzir a transcrição em resposta a ativação do PPAR ou do RXR (ISSEMANN *et al.*, 1993; KLIEWER *et al.*, 1992). Além disso, o tratamento concomitante com agonistas de PPAR e RXR potencializa o efeito observado com cada ligante sozinho (MUKHERJEE *et al.*, 1997).

Heterodímeros PPAR:RXR ativam a transcrição pela ligação a elementos responsivos específicos localizados na porção 5' de seus genes alvo. PPRE foi primeiramente caracterizado utilizando oligonucleotídeos sintéticos e foram definidos como repetições diretas de dois motivos de reconhecimento AGGTCA espaçados por um nucleotídeo, sendo assim conhecido como DR1 (KLIEWER *et al.*, 1992). Entretanto, comparação de seqüências de 19 PPRES nativos e análises subseqüentes de mutações definiram novos determinantes de PPRE. Além das definições de DR1, foram adicionadas mais três propriedades: uma extensão na porção 5' rica em adenina (A) e timina (T), uma seqüência DR1 imperfeita, e uma adenina como nucleotídeo espaçador entre os dois hexâmeros, resultando na seguinte seqüência: 5'-AACTAGGNCA A AGGTCA-3'. Essas particularidades contribuem para uma seletividade da ligação do PPAR:RXR com o DNA em relação a homo e heterodímeros de outros membros da superfamília, sendo que alguns deles também reconhecem os elementos DR1 (JUGE-AUBRY *et al.*, 1997; OSADA *et al.*, 1997; PALMER *et al.*, 1995).

A estrutura do PPRE como repetição direta impõe uma polaridade à ligação do heterodímero. O PPAR interage com o hexâmero anterior (5') do DR1, enquanto o RXR ocupa o hexâmero inferior (3') (JPENBERG *et al.*, 1997). Dessa forma a ligação PPAR:RXR

apresenta polaridade reversa quando comparado com VDR:RXR e TR:RXR ligados a DR3 e DR4, respectivamente, onde RXR ocupa o hexâmero anterior da repetição direta. Essa diferença na polaridade da ligação entre PPAR e VDR ou TR é, em parte, determinada pela extensão 5' do PPRE (DIRENZO *et al.*, 1997).

Os receptores que se ligam ao DNA como monômeros, como NGFI-B (NR4A1), ROR (NR1F) e RevErbA α , também necessitam de uma extensão 5' rica em AT (MANGELSDORF; EVANS, 1995). Considera-se que a interação desses receptores com essa extensão 5' se dá por uma região logo após (carboxiterminal) ao segundo dedo de zinco do DBD, denominada extensão carboxiterminal (CTE). Mesmo sendo o PPAR incapaz de se ligar ao DNA como monômero, foi demonstrado que sua região CTE, quando se dimeriza com RXR, é a responsável pelo reconhecimento da extensão 5' do DR1 em PPRE. A inabilidade do PPAR de se ligar ao DNA como monômero tem sido atribuída à região aminoterminal uma vez que a deleção do domínio A/B do PPAR α permitiu que o receptor incompleto se ligasse ao PPRE como monômero (HSU *et al.*, 1998).

2.5.3 Ativação e transativação do PPAR

PPARs são fatores de transcrição com ativação dependente de ligantes e promovem a transcrição de seus genes alvo, como discutido anteriormente, como heterodímeros com seu parceiro de ligação ao DNA, o RXR. Além da heterodimerização, proteínas adicionais, conhecidas como cofatores, são recrutadas ao complexo PPAR:RXR desempenhando uma importante função na determinação da resposta fisiológica aos ligantes de PPAR (figura 7). Cofatores podem tanto ativar (coativadores) como reprimir (correpressores) a atividade transcricional dos receptores nucleares (FEIGE *et al.*, 2006). Baseado na estrutura cristalográfica, acredita-se que a ligação do ligante estabiliza o complexo PPAR:RXR

(CRONET *et al.*, 2001). Após a ligação do ligante, a conformação do dímero se altera fazendo com que uma fenda de ligação se forme e ocorra o recrutamento de proteínas coativadoras (BERGER; MOLLER, 2002). Os cofatores influenciam a transcrição pelo poder de facilitar o recrutamento de proteínas que são necessárias para a transcrição ou para o remodelamento da estrutura da cromatina (FEIGE *et al.*, 2006). Os coativadores e correpressores ligam-se à sequência de aminoácidos dos PPARs, LXXLL e LXX(I/H)IXX(L/I), respectivamente (XU *et al.*, 2002). A ligação do coativador e do correpressor depende das diferenças nas mudanças conformacionais ocorridas no PPAR após a interação com agonista ou antagonista (XU *et al.*, 2002).

Figura 7. Modelo para a ativação transcricional promovida por PPAR. (1) Esquema do promotor responsivo do PPAR em formação linear com PPRE, dois sítios de ligação para fatores de transcrição (caixas brancas), a caixa TATA e o sítio de início de transcrição. Também está mostrada a mesma região organizada em uma estrutura de cromatina repressiva. Um hipotético complexo PPAR:RXR correpresor, que não está ligado ao DNA, é ativado por um ligante resultando na dissociação do correpresor. (2) O complexo PPAR:RXR ativado se liga ao PPRE produzindo uma mudança conformacional na cromatina indicado pela liberação da histona H1. Essa ligação facilita a interação do complexo coativador acetiltransferase com o promotor. (3) A cromatina do promotor no sítio de iniciação de transcrição é modificada pela acetilação da cauda das histonas (Ac), produzindo uma estrutura competente à transcrição. A acetilação das histonas é seletivamente gerada na região de iniciação de transcrição, envolvendo um dos dois nucleossomos. (4) Fatores adicionais de transcrição e a maquinaria basal de transcrição, incluindo o complexo de iniciação RNA Pol II, são recrutados ao promotor acessível e a transcrição é iniciada.

Entre os corepressores que interagem com PPAR, os mais comuns são: o co-repressor nuclear 1-2 (NCoR1-2) e o mediador de silenciamento para receptor de hormônio tireoidiano

e retinoide 1-2 (SMRT1-2) (FEIGE *et al.*, 2006). O efeito repressivo dessas proteínas é provavelmente intercedido pelo recrutamento de desacetilases de histonas ou pela interação direta com a maquinaria basal de transcrição. Outra classe de corepressores reprime a atividade nuclear dos PPARs competindo com coativadores ou agentes transcrpcionais (WHITE *et al.*, 2004). Como exemplos cito a proteína de interação com receptor 140 (RIP140) (LEONARDSSON *et al.*, 2004), o modulador de PPAR e RXR (COPR) (FLORES; LI; ANESKIEVICH, 2004) e o corepressor dependente de ligante (LCoR) (FERNANDES *et al.*, 2003).

Os coativadores podem intensificar a transcrição pelo remodelamento da estrutura da cromatina, modificação das caudas das histonas, ou por mudanças na localização do nucleossomo (HEBBAR; ARCHER, 2003). Como exemplos de coativadores estão: coativador de receptor de esteroide 1 e 2 (SRC1-2), *CREB-binding protein* 1 (CBP-1), proteínas p300 e coativador PPAR γ 1 α (FEIGE *et al.*, 2006).

Finalmente, a atividade dos PPARs é regulada pelo seu estado de fosforilação. A fosforilação pode resultar em mudança na afinidade por ligante, RXR, cofatores ou genes alvo (DIRADOURIAN; GIRARD; PEGORIER, 2005). Além disso, cofatores estão também sujeitos a fosforilação, através do qual pode controlar a atividade transcricional do PPAR que está ligado. Múltiplas vias quinases têm sido implicadas na fosforilação de PPARs, incluindo proteína quinase cAMP dependente (PKA) e MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (DIRADOURIAN; GIRARD; PEGORIER, 2005). Entretanto, a relevância fisiológica de vários métodos de fosforilação ainda não é bem compreendida.

2.5.4 Ligantes de PPAR

Ácidos graxos são importantes componentes da dieta e participam da regulação da expressão gênica de acordo com mudanças nutricionais. Com isso, os ácidos graxos influenciam o transporte, mobilização, utilização e a disponibilidade de lipídeos e glicose. Muitos efeitos dos ácidos graxos são regulados via PPARs, sendo esses receptores fatores de transcrição sensíveis a lipídeos (GRIMALDI, 2007). Os ácidos graxos são apenas uma das classes de compostos que se conhece como ativadores de PPAR. PPARs também podem ser ativados por fármacos hipolipidêmicos (fibratos), plastificantes ([di-(2-etilexil) ftalato]), esteroides (DHEA) e tiazolidinadionas (rosiglitazona e pioglitazona) (DREYER *et al.*, 1992; ISSEMANN; GREEN, 1990; KELLER *et al.*, 1993).

Em geral, a maioria das moléculas que se ligam especificamente a PPARs, o faz com uma baixa afinidade comparada aos hormônios clássicos com seus receptores cognatos. Ademais, há uma proeminente sobreposição no reconhecimento de ligantes entre os isotipos de PPAR (KREY *et al.*, 1997).

Ácidos graxos e seus derivados como ligantes de PPAR

PPARs estão sendo propostos como sensores de ácidos graxos uma vez que vem sendo demonstrado que PPARs são ativados por esses ácidos graxos e seus derivados (DREYER *et al.*, 1993). A expressão forçada de PPARs em fibroblastos promove uma sensibilidade a ácidos graxos de vários genes implicados no metabolismo de lipídeos. Além disso, em vários modelos celulares de hepatócitos, adipócitos e miócitos, em abordagens como genética, farmacologia e antagonistas seletivos de PPAR, tem-se confirmado que ácidos graxos promovem a transativação mediada por PPAR (GRIMALDI, 2007). Neste processo, ácidos graxos de cadeia longa, tanto saturados como insaturados, apresentaram-se semelhantemente

ativos para os três isotipos, além do que não é necessário o metabolismo dos ácidos graxos, sendo que o 2-bromopalmitato, um ácido graxo não metabolizado, apresentou-se como potente agonista de PPAR em pré-adipócitos (GRIMALDI *et al.*, 1992).

Além dos ácidos graxos, vários de seus derivados, como ácidos graxos ramificados e eicosanóides, vem sendo reconhecidos como agonistas de PPAR. Estas moléculas apresentaram maior seletividade para as isoformas do que seus precursores. Por exemplo, 15-desoxi-delta-12,14-PGJ2 (15d-PGJ2), um derivado de prostaglandina D2, é um agonista seletivo de PPAR γ (FORMAN *et al.*, 1995), enquanto leucotrieno B4, ácido fitânico e oleiletanolamida ativa seletivamente o isotipo α (DEVCHAND *et al.*, 1996; FU *et al.*, 2003; ZOMER *et al.*, 2000) e prostaciclina é mais ativo em PPAR β do que para os outros (HERTZ *et al.*, 1996). Vários métodos *in vitro*, como ensaio de competição (FU *et al.*, 2003) e ensaio de ligação ao receptor dependente de co-ativador (KREY *et al.*, 1997), demonstraram que PPAR α e PPAR β interagem tanto com ácidos graxos longos de cadeia saturada quanto insaturada (valores de IC₅₀ entre 1 e 30 mM), enquanto o PPAR γ apresenta um perfil de interação com ácidos graxos mais restrito, interagindo apenas com ácidos graxos poliinsaturados, como ácido linolênico e araquidônico (valores de IC₅₀ entre 1 e 10mM).

Como não é possível estimar a concentração de ácidos graxos e seus derivados dentro do compartimento nuclear, as implicações fisiológicas dessas moléculas como ligantes endógenos de PPAR permanecem como questão aberta. Entretanto, tem sido proposto que a transferência de ácidos graxos para o núcleo pode ser facilitada por proteínas de ligação a ácidos graxos (WOLFRUM *et al.*, 2001). Além do mais, a síntese de alguns ativadores de PPAR pode ocorrer dentro do compartimento nuclear, como foi demonstrado que enzimas relacionadas no metabolismo de ácido araquidônico estão localizadas dentro do envelope nuclear (FUNK, 2001).

Ácidos graxos de cadeia média

Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos alifáticos, contidos em gordura, óleo ou cera animal ou vegetal, na forma esterificada. Ácidos graxos naturais geralmente possuem de 4 a 28 carbonos, podendo ser saturados ou insaturados (The nomenclature of lipids (Recommendations 1976) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978). Os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) são ácidos graxos saturados compostos de 6 a 12 carbonos (figura 8). Os AGCMs estão presentes geralmente na forma de triacilgliceróis em alimentos comuns, embora em baixas concentrações, como manteiga, leite de vaca, leite humano, óleos de coqueiro e de palmeira (TAKEUCHI *et al.*, 2008). AGCM em sua forma livre também foram encontrados em bebidas fermentadas como cerveja (HORAK *et al.*, 2008).

Até o presente trabalho, não havia sido reportada a capacidade de interação e ativação dos receptores nucleares PPARs pelos ácidos graxos de cadeia média.

FIGURA 8. Estrutura química dos ácidos graxos de cadeia média mais comuns. Entre parênteses está o nome comum dos compostos.

Ligantes sintéticos de PPARs

Devido ao grande potencial terapêutico para o tratamento de distúrbios metabólicos, muitos ligantes sintéticos de PPAR têm sido desenvolvidos. A primeira molécula reconhecida como ligante/ativador de PPAR α pertence à classe dos fibratos, os quais têm sido utilizados como compostos hipolipidêmicos por muitos anos (ISSEMAN *et al.*, 1993). Os fibratos são ativadores de PPAR α relativamente fracos, especialmente em humanos, e novos ligantes específicos e potentes têm sido descritos (BROWN *et al.*, 2001). Mais recentemente, compostos capazes de ativar especificamente PPAR β foram desenvolvidos (BERGER *et al.*, 1999; SZNAIDMAN *et al.*, 2003).

Tiazolidinadionas foram descritas como potentes e específicos ativadores de PPAR γ (LEHMANN *et al.*, 1995), que também são ativados por outras classes de moléculas (HENKE *et al.*, 1998). As tiazolidinadionas, como rosiglitazona e pioglitazona (figura 9), são essencialmente usadas para melhorar o metabolismo de glicose e a sensibilidade à insulina em pacientes com diabetes (KREY *et al.*, 1997). Entretanto publicações atuais reportaram que pacientes que utilizam rosiglitazona possuem um maior risco de adquirir problemas cardíacos como infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (HOME *et al.*, 2007; MCAFEE *et al.*, 2007; NISSEN; WOLSKI, 2007; PSATY; FURBERG, 2007). Ainda há debates em processo sobre a qualidade dessas informações e até onde os benefícios do tratamento com rosiglitazona pesam mais do que os riscos recentemente reportados.

Figura 9. Estrutura química dos ligantes sintéticos comerciais rosiglitazona e pioglitazona.

A procura por novos agonistas de PPAR é muito intensa, considerando que mais e mais ligantes sintéticos estão sendo descobertos ou desenvolvidos (KASUGA *et al.*, 2007; USUI *et al.*, 2007). Agonistas duais que ativam PPAR α e γ , como os glitazares (CHAKRABARTI *et al.*, 2003), também estão sob investigação, possuindo como alvo tanto o metabolismo de lipídeos quanto o de glicose (FAGERBERG *et al.*, 2007; ROSENSON, 2007). A necessidade de encontrar bons candidatos a fármacos para tratar síndromes metabólicas está se tornando cada vez mais importante uma vez que o número de pessoas que sofrem dessas síndromes deve aumentar na próxima década. Para possibilitar o desenvolvimento de fármacos melhores, é necessário entender como PPAR controlam o metabolismo.

2.5.5 Regulação do Metabolismo por PPAR

Metabolismo de lipídeos e lipoproteínas

Dislipidemia é uma síndrome metabólica caracterizada por níveis elevados de triglicerídeos e baixo nível de colesterol HDL associados com o alto nível de LDL (GRUNDY *et al.*, 2004; ROTH; MOBARHAN; CLOHISY, 2002). Além disso, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, e jejum estão associados a níveis elevados de ácidos graxos livres no plasma (DELARUE; MAGNAN, 2007; KERSTEN *et al.*, 1999; PILZ *et al.*, 2006). Portanto, uma vez que PPAR são os principais reguladores do metabolismo de lipídeos e ácidos graxos, controlando o transporte, oxidação, armazenamento e síntese desses compostos, eles são considerados como tendo função proeminente na prevenção da dislipidemia e manutenção da homeostase metabólica (KERSTEN; DESVERGNE; WAHLI, 2000).

O PPAR γ é expresso abundantemente no tecido adiposo e é um regulador chave na diferenciação de adipócitos e adipogênese. Uma das hipóteses para sua atuação é a “*lipid-*

steal-hypothesis” (em tradução literal para o português: hipótese do roubo de lipídeos) (YE *et al.*, 2004). Esta hipótese postula que a estimulação da diferenciação de adipócitos leva a formação de um grande número de pequenos adipócitos. Estes pequenos adipócitos são capazes de capturar ácidos graxos livres mais facilmente e conseqüentemente o fluxo de ácidos graxos livres no fígado e músculos diminui. Este fluxo reduzido se opõe a resistência à insulina do músculo, atuando então contra os efeitos da síndrome metabólica.

Da mesma forma que os agonistas de PPAR α , os agonistas de PPAR γ podem reduzir a concentração de ácidos graxos livres no plasma, principalmente pelo aumento da captura e armazenamento dos mesmos (FEIGE *et al.*, 2006). Geralmente, os níveis de HDL são aumentados através do tratamento com agonistas de PPAR γ , que pode ser um efeito indireto devido à redução da inflamação (ESTEVE; RICART; FERNANDEZ-REAL, 2005). Para os níveis de triglicerídeos e LDL foram observados diferentes efeitos, dependendo do tipo de agonista do PPAR γ utilizado (KIPNES *et al.*, 2001; LEOVITZ *et al.*, 2001; WOLFFENBUTTEL *et al.*, 2000). Rosiglitazona não modifica o nível de triglicerídeos, enquanto pioglitazona diminui significativamente o nível de triglicerídeos no plasma (VERGES, 2004). Na maioria dos estudos, o nível de LDL não é modificado por pioglitazona, enquanto pelo tratamento com rosiglitazona o nível é aumentado (VERGES, 2004). Além disso, os agonistas de PPAR γ aumentam o tamanho das partículas de LDL, diminuindo assim o número de partículas aterogênicas de baixa densidade (CAREY *et al.*, 2002). O aumento do armazenamento de lipídeos em tecido adiposo pela ativação de PPAR γ é parcialmente mediado pelo aumento na expressão do mRNA de CD36, um gene pertencente à classe B da superfamília de receptores scavenger, sendo uma de suas funções aumentar a captura de ácidos graxos de cadeia longa em vários tipos celulares (MARTIN *et al.*, 1997; MOTOJIMA *et al.*, 1998). Outros genes relacionados ao metabolismo de lipídeos que são ativados por

PPAR γ são proteína de ligação a ácido graxo (FABP) e LXR α (ESCHER *et al.*, 2001; EVANS; BARISH; WANG, 2004; ROSENSON, 2007).

Metabolismo de glicose

Como mencionado anteriormente, PPAR γ é expresso abundantemente em tecido adiposo e é capaz de estimular a formação de pequenos adipócitos. Esses pequenos adipócitos são mais sensíveis a insulina quando comparados a grandes adipócitos. Entretanto, estudos de *knockout* de PPAR γ tecido específico em camundongos, demonstraram que agonistas de PPAR γ exercem seus efeitos primeiramente influenciando o músculo esquelético (KERSTEN, 2002; ZIERATH *et al.*, 1998). A ativação do PPAR γ aumenta a absorção e síntese de glicose pelo músculo esquelético, e reduz a produção e liberação de glicose hepática pela redução da gliconeogênese (RAMAN; JUDD, 2000; ZIERATH *et al.*, 1998). Em geral, estudos de intervenção humana com agonistas de PPAR γ reportam concentrações reduzidas de insulina durante jejum, redução da concentração de glicose, e sensibilidade à insulina aumentada em todo corpo (CAREY *et al.*, 2002). As tiazolidinadionas não apenas aumentam o metabolismo de glicose em portadores de diabetes, como também em indivíduos obesos e indivíduos com baixa tolerância a glicose (MARTENS *et al.*, 2002). Elas também possuem efeitos aditivos no controle da glicemia quando ministrados em combinação com metformina, derivados de sulfoniluréia ou insulina (WOLFFENBUTTEL *et al.*, 2000; WOLFFENBUTTEL; SELS; HUIJBERTS, 2001).

3 OBJETIVOS

A princípio, o objetivo principal do projeto de mestrado era o estudo estrutural da interação do receptor nuclear PPAR γ humano, domínio LBD, com ligantes sintéticos candidatos a fármacos. Esses ligantes seriam enviados por colaboradores que trabalham com desenvolvimento de fármacos e síntese química.

Porém, com as descobertas feitas durante o mestrado, relatadas adiante, o estudo da interação do hPPAR γ -LBD com ligantes manteve-se como objetivo, mas os ligantes a ser estudados passaram a ser os ácidos graxos de cadeia média.

Então os objetivos específicos foram:

- Expressão e purificação do hPPAR γ domínio LBD;
- Identificação da molécula que já vinha ligada ao PPAR γ durante a expressão e purificação;
- Resolução da estrutura do hPPAR γ -LBD complexado ao ácido nonanóico e à rosiglitazona;
- Teste da capacidade de transativação do PPAR γ pelos ácidos graxos de cadeia média através do ensaio de transativação celular revelado por gene repórter.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Expressão em larga escala

Para o estudo estrutural do domínio LBD de PPAR γ humano (hPPAR γ -LBD), isoforma $\gamma 1$, é necessária uma grande quantidade da proteína com alto grau de pureza. Para tal fim foi utilizado o vetor pET28a(+), onde estava inserido o gene codificante da proteína em questão. O vetor foi gentilmente cedido por André Ambrósio que fez a sub-clonagem no Instituto de Física de São Carlos - USP durante seu doutoramento (AMBROSIO *et al.*, 2007). Bactérias da espécie *Escherichia coli* cepas DH5 α e BL21 (DE3) foram então transformadas com gene recombinante para propagação do clone e expressão da proteína, respectivamente.

A expressão da proteína foi feita inoculando-se meio Luria-Bertani (1,6 % triptona, 1 % extrato de levedura e 0,5 % NaCl) com 1 a 5 % de pré-cultura da bactéria transformada crescida por 16 horas a 37 °C. As bactérias são crescidas até a densidade ótica, a 600 nanômetros, de 1,2 (DO₆₀₀=1.2) a 19 °C. Depois de atingida a D.O., é feita a indução da expressão com IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) 0,5 mM, mantendo-se a temperatura de 19 °C por tempo adequado (4 a 5 horas). Após isso, sedimentam-se as bactérias por centrifugação (4,225g em rotor SLA-3000, por 15 minutos a 4 °C). O sedimento é então ressuspensionado e homogeneizado em tampão inicial para coluna de afinidade (20 ml de tampão/litro de cultura) contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, TCEP (tris-[2-carboxietil]-fosfina) 2 mM e Imidazol 5 mM (tampão 1). A lise das bactérias se dá pela adição de lisozima (10 mg por litro de cultura) ao homogeneizado, deixando-se a lisozima agir por trinta minutos, e o extrato é então sonificado. A fração solúvel é separada por centrifugação (24.000g em rotor SS-34, por 20 minutos a 4°C). O sobrenadante final é finalmente congelado

e reservado a -80°C ou usado imediatamente para purificação. Todos os passos são executados a baixas temperaturas mantendo-se as soluções em gelo.

4.2 Purificação por afinidade – IMAC - Resina Talon Superflow (Clontech)

A proteína expressa pelo vetor bacteriano apresenta em sua porção N-terminal uma cauda composta por 6 histidinas. Uma vez que estes aminoácidos têm a capacidade de formar interações com metais como o Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{3+} , a cromatografia de afinidade pode ser utilizada na purificação da proteína, onde uma resina contendo íons de metais, como aqueles acima citados, constitui a fase estacionária. Esta técnica também é conhecida como IMAC (*Immobilized metal ion affinity chromatography*).

O sobrenadante produzido no passo acima (expressão) é aplicado em uma resina Talon Superflow (Clontech) sendo a proteína, que contém a cauda de histidina, adsorvida na resina. Vários ciclos de lavagem da resina com tampão 1 são realizados com o intuito de eliminar as impurezas. A eluição da proteína é feita com 4 vezes o volume da resina do mesmo tampão 1, porém em concentrações cada vez maiores de Imidazol, possibilitando assim a recuperação da proteína com grau de pureza suficiente para os experimentos de cristalização. Todo o procedimento é realizado em baixas temperaturas para evitar alterações estruturais da proteína. As amostras obtidas são analisadas em SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio, gel de poliacrilamida para eletroforese). As bandas de proteínas são visualizadas através de coloração com *Coomassie Blue* (0,25 % de *Coomassie brilliant blue*, 90 % de etanol absoluto e 10 % de ácido acético glacial).

4.3 Remoção da cauda de histidinas

A cauda de histidinas é removida pela serino-protease trombina, de fonte bovina (Sigma-Aldrich), adicionada na razão de 10 unidades por miligrama de proteína pura, por 14 horas, a 18 °C, sem agitação.

4.4 Ensaios de cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados no laboratório de cristalização de proteínas do IFSC (Instituto de Física de São Carlos -USP- São Carlos, SP).

Logo após a clivagem da cauda de histidinas, a amostra é centrifugada (10000 g, por 10 minutos a 4 °C) para eliminação de compostos não dissolvidos. Posteriormente a proteína é concentrada até atingir 10 mg/mL, e então usada nos experimentos de cristalização pela técnica de difusão de vapor em gota suspensa (*hanging drop vapour diffusion*). A gota era formada por 3 µL da solução de proteína e 1,5 µL da solução de cristalização. A concentração da proteína era determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para obtenção do complexo de PPAR γ com ligantes (rosiglitazona), logo após a eliminação da cauda de histidina, a proteína é incubada com excesso de ligante (5 vezes a concentração de proteína) por 12 horas. Após a incubação a amostra é centrifugada e segue-se o protocolo de cristalização como descrito no parágrafo acima.

A princípio foram utilizados os kits de cristalização de domínios LBD de receptores nucleares (NR-LBD, Molecular Dimensions), *Crystal Screen I e II* (Hampton Research) e *The Classics* (Nextal Biotechnologies) na busca de condições ótimas para cristalização da proteína. Como pequenos cristais apareceram em uma condição do kit NR-LBD contendo citrato de sódio (Citrato de sódio 1,0 M e Tris-HCl 0,1 mM pH 7,0), refinamentos em torno

desta condição foram feitos, variando-se a concentração de citrato de sódio de 0,5 M até 1,5 M, a concentração de tris-HCl entre 25 mM e 500 mM, e o pH de 5,0 até 10,0. Todos os experimentos foram feitos sob temperatura controlada a 18 °C.

4.5 Coleta de Dados e Processamento

Cristais bem formados foram submetidos à difração de raios-X. Neste processo foram utilizados três equipamentos diferentes. O primeiro deles disponível em nosso laboratório, anodo rotatório modelo UltraX 18 (RIGAKU/MSK) com detector tipo placa de imagem modelo Mar345dtb (MAR Research). Cristais também foram testados nas linhas MX-1 e MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas – SP) (POLIKARPOV *et al.*, 1998). Todos os cristais foram testados em temperatura criogênica (100 K), crioprotetidos com adição de glicerol a 15 - 20% (V/V) da solução em que o cristal cresceu.

A integração das imagens foi feita utilizando-se o programa Denzo do pacote de programas HKL (OTWINOWSKI; MINOR, 1997) para as imagens coletadas no anodo rotatório e Denzo do pacote de programas HKL2000 (OTWINOWSKI; MINOR, 1997) para as imagens coletadas nas linhas de raios-X do LNLS. O escalonamento e redução dos dados foram feitos pelo programa Scalepack, também pertencente ao pacote de programas HKL e HKL2000. O número de moléculas na unidade assimétrica foi estimado pelo programa Matthews_coef (MATTHEWS, 1968) que faz parte do pacote de programas CCP4 (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994). As fases iniciais foram determinadas por substituição molecular pelo programa Phaser (MCCOY, 2007), também pertencente ao CCP4, utilizando como modelo uma estrutura da mesma porção do hPPAR γ -LBD, depositada no banco de dados PDB (BERMAN *et al.*, 2000) com código de acesso 1ZEO (SHI *et al.*, 2005). Após a substituição molecular, o modelo foi aperfeiçoado por ciclos

de refinamento com o programa Phenix (ADAMS *et al.*, 2002) intercalados com revisões e ajustes manuais usando o programa gráfico Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) até que as estatísticas indicassem um modelo confiável para os dados experimentais.

4.6 Ensaio de transativação celular revelado por gene repórter

O ensaio com gene repórter é um método utilizado na pesquisa e identificação de ligantes para receptores nucleares (FORMAN *et al.*, 1995) e também tem sido utilizado na indicação de ligantes presentes em extrato de plantas (MOORE *et al.*, 2000). Esse ensaio consiste na inserção, por meio de choque elétrico (eletroporação), de plasmídeos de expressão e repórter no interior do núcleo das células de interesse (transfecção), seguido de tratamento das células com os ligantes de estudo. Na presença de substâncias agonistas, o gene repórter (luciferase) terá sua produção aumentada e servirá de indicador da atividade transcricional de um determinado receptor.

4.6.1 Reagentes e plasmídeos

Os reagentes utilizados para o cultivo das células U937, como o meio RPMI 1640, soro fetal bovino, glutamina e estreptomicina/penicilina, foram obtidos comercialmente da GIBCO, a rosiglitazona e os ácidos octanóico e nonanóico foram obtidos comercialmente da Cayman Chemical e Sigma-Aldrich respectivamente, e a luciferina foi obtida comercialmente da Promega. Os ligantes sintéticos foram ressuspensos em Etanol:Dimetilsulfóxido, 1:1 (EtOH:DMSO 1:1) e os ácidos graxos em Etanol.

O plasmídeo de expressão utilizado nos ensaios de transfecção foi o CMV-cPPAR γ /GAL4. Esse plasmídeo contém a sequência de cDNA que codifica o domínio LBD

do PPAR γ de camundongo (*Mus musculus*) fusionado ao DBD de uma proteína de fungo GAL4 (LEHMANN *et al.*, 1995), sob o controle dos promotores do citomegalovírus (CMV). Já os plasmídeos-repórter utilizados nos ensaios de transfecção contêm o elemento responsivo para GAL4 clonado imediatamente acima do promotor mínimo (-32/+45) da timidina quinase (tk), ligado à sequência que codifica o gene repórter da luciferase, resultando na construção GAL4-tk-luc. O sistema de receptor quimérico anula possíveis erros provindos de níveis endógenos de PPAR γ ou de variações da especificidade do receptor na ligação ao DNA em diferentes PPRES. Todos os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

4.6.2 Os Ensaios Celulares

Em nossos ensaios, células U937 (linhagem pré-monocítica humana) foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 contendo soro fetal bovino 10 %, glutamina 2 mM, penicilina 50 U/mL e estreptomicina 50 μ g/mL, e mantidas em garrafas Corning[®] de 75 cm² em incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂. Para o ensaio de transfecção, as células foram coletadas por centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em solução PBS (phosphate buffer solution) contendo cálcio 100 mM e dextrose 0.1 %, na concentração de 1 x 10⁷ células/0,5 mL. Às células ressuspensas foram adicionados 1,0 μ g do vetor de expressão para PPAR γ /GAL4 e 3,0 μ g do plasmídeo repórter GAL4-tk-luc. As células foram transferidas para cubetas e eletroporadas usando um gerador de pulso Bio-Rad nas condições de 300 mV e 950 μ F. Após a eletroporação as células foram transferidas para o meio de cultura, distribuídas em placas Corning[®] de 12 poços e tratadas com veículo (EtOH:DMSO 1:1) como controle negativo, e com os compostos a serem testados em diferentes

concentrações. Após 24 horas, as células foram coletadas por centrifugação e lisadas em tampão de lise (Tris-HCl 0,25M, pH 7,6 contendo Triton X-100 0,1%). Para a quantificação da atividade da luciferase, foram adicionados 25 µL de luciferina a 25 µL de lisado celular. A luciferina é um substrato para a enzima luciferase. A emissão de luz gerada pela reação enzimática entre luciferina e luciferase foi quantificada pelo luminômetro Veritas Microplates (Turner Biosystems), o qual gera resultados em unidades relativas de luz. A taxa de ativação do receptor em questão (ou seja, quantas vezes o receptor foi ativado por um determinado ligante) foi calculada pela divisão dos valores obtidos pelas amostras tratadas com agonistas, pelos valores das amostras tratadas com veículo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad PRISM 5.0. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Da expressão à cristalização

Seguindo rigorosamente os métodos descritos, a proteína hPPAR γ -LBD era expressa em grande quantidade, sendo que ao final do processo de purificação obtinha-se de 20 a 30 miligramas de proteína por litro de meio de cultura utilizado na expressão.

A purificação feita por cromatografia de afinidade mostrou-se satisfatória para garantir que a proteína estivesse pura o suficiente para os experimentos de cristalização. A figura 10 apresenta uma eletroforese de amostras retiradas durante os passos de purificação. Através dela percebe-se claramente a presença da proteína no extrato bruto (figura 10 coluna 2), a retenção de praticamente toda proteína pela resina (figura 10 coluna 3), e principalmente a eluição da mesma em alto grau de pureza (figura 10 colunas 6 e 7).

Figura 10. Gel de poliacrilamida 15 % indicando a presença e pureza do hPPAR γ -LBD durante os passos de purificação. Poço 1: Marcador de peso molecular (66kDa, 45 kDa, 29 kDa, 20 kDa e 14 kDa); Poço 2: Extrato bruto; Poço 3: produto não ligado à matriz; Poços 4 a 7: eluição com 5 mM, 10 mM, 50 mM e 200 mM de imidazol, respectivamente.

Primeiramente foram feitos experimentos de cristalização com o hPPAR γ -LBD, sem ter sido incubado com ligante, buscando-se resolver a estrutura da proteína na forma apo. Logo nos primeiros testes, utilizando os kits de cristalização, formaram-se pequenos e numerosos cristais na condição do kit NR-LBD contendo citrato de sódio 1,0 M e Tris-HCl 0,1 mM pH 7,0 (figura 11a). Já com o refinamento das condições, cristais maiores surgiram, sendo que o cristal que proporcionou melhor conjunto de dados no experimento de difração por raios-X foi obtido na condição citrato de sódio 0,9 M, tris-HCl 0,1 M pH 8,0 (Figura 11b).

Cristais de hPPAR γ -LBD complexados com rosiglitazona foram crescidos sob as mesmas condições acima descritas. O cristal que resultou no conjunto de dados do complexo hPPAR γ -LBD/rosiglitazona cresceu em citrato de sódio 0,8 M, tris-HCl 0,1 M pH 7,5 (figura 11c).

Figura 11. Cristais da proteína hPPAR γ domínio LBD. A) Microcristais de hPPAR γ complexados com AN, obtido sob condição citrato de sódio 1,0 M e Tris-HCl 0,1 mM pH 7,0. B) Monocristal de hPPAR γ complexado com AN, obtido sob condição: citrato de sódio 0,9 M, tris-HCl 0,1 M pH 8,0. C) Monocristais de hPPAR γ complexados com rosiglitazona, obtidos sob condição: citrato de sódio 0,8 M, tris-HCl 0,1 M pH 7,5.

5.2 Coleta de dados e determinação das estruturas de hPPAR γ -LBD complexados a ligantes

Muitos cristais foram crescidos, sempre sob as mesmas condições de cristalização e, a partir de 5 dias, tempo necessário para crescimento visualmente total do cristal, eles eram testados imediatamente no equipamento de difração de raios-X do laboratório do IFSC. Os cristais que apresentavam padrão de difração promissor eram mantidos em nitrogênio líquido e levados para coleta de dados preferencialmente na linha MX-2 do LNLS, por possuir maior intensidade de feixe do que a MX-1 (GUIMARAES *et al.*, 2009).

Ambos cristais coletados, que levaram à determinação das estruturas descritas nesta dissertação, apresentaram grupo espacial C2 possuindo duas moléculas na unidade assimétrica. Até o presente trabalho, 26 das 41 estruturas de PPAR γ domínio LBD depositadas no PDB pertencem ao grupo espacial C2 e, dentre elas, 25 possuem duas moléculas na unidade assimétrica (tabela 2).

Tabela 1 – Grupo espacial e número de moléculas na unidade assimétrica das estruturas de PPAR γ , domínio LBD, depositadas no PDB.

PDBID	Grupo espacial	Nº de moléculas na unidade assimétrica	Referência
1i7i	C2	2	(CRONET <i>et al.</i> , 2001)
1knu	C2	2	(SAUERBERG <i>et al.</i> , 2002)
1nyx	C2	2	(EBDRUP <i>et al.</i> , 2003)
1prg	C2	2	(NOLTE <i>et al.</i> , 1998)
1zeo	C2	2	(SHI <i>et al.</i> , 2005)
2i4j	C2	2	(POCHETTI <i>et al.</i> , 2007)
2i4p	C2	2	(POCHETTI <i>et al.</i> , 2007)
2i4z	C2	2	(POCHETTI <i>et al.</i> , 2007)
2p4y	C2	2	(EINSTEIN <i>et al.</i> , 2008)
2pob	C2	2	(TRUMP <i>et al.</i> , 2007)
2q59	C2	2	(BRUNING <i>et al.</i> , 2007)
2q5p	C2	2	(BRUNING <i>et al.</i> , 2007)
2q5s	C2	2	(BRUNING <i>et al.</i> , 2007)
2q6l	C2	2	(BRUNING <i>et al.</i> , 2007)
2q6r	C2	2	(BRUNING <i>et al.</i> , 2007)
2q6s	C2	2	(BRUNING <i>et al.</i> , 2007)
2q8s	C2	2	(CASIMIRO-GARCIA <i>et al.</i> , 2008)
2vsr	C2	2	(ITOH <i>et al.</i> , 2008)
2vst	C2	2	(ITOH <i>et al.</i> , 2008)
2vv0	C2	2	(ITOH <i>et al.</i> , 2008)
2vv1	C2	2	(ITOH <i>et al.</i> , 2008)
2vv2	C2	2	(ITOH <i>et al.</i> , 2008)
2vv3	C2	2	(ITOH <i>et al.</i> , 2008)
2vv4	C2	2	(ITOH <i>et al.</i> , 2008)
3b3k	C2	2	(MONTANARI <i>et al.</i> , 2008)
3cs8	C2	1	(LI <i>et al.</i> , 2008)
2om9	P1	4	(AMBROSIO <i>et al.</i> , 2007)
2ath	P2 ₁	2	(MAHINDROO <i>et al.</i> , 2005)
2f4b	P2 ₁	2	(MAHINDROO <i>et al.</i> , 2006)
2g0g	P2 ₁	2	(LU <i>et al.</i> , 2006)

continua

continuação

PDBID	Grupo espacial	Nº de moléculas na unidade assimétrica	Referência
2g0h	P2 ₁	2	(LU <i>et al.</i> , 2006)
2hwq	P2 ₁	2	(MAHINDROO <i>et al.</i> , 2006)
2hwr	P2 ₁	2	(MAHINDROO <i>et al.</i> , 2006)
4prg	P2 ₁	4	(OBERFIELD <i>et al.</i> , 1999)
1wm0	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1	(OSTBERG <i>et al.</i> , 2004)
2fvj	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1	(BURGERMEISTER <i>et al.</i> , 2006)
2gtk	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1	(KUHN <i>et al.</i> , 2006)
2hfp	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1	(HOPKINS <i>et al.</i> , 2006)
2prg	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	2	(NOLTE <i>et al.</i> , 1998)
3cwd	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	2	(LI <i>et al.</i> , 2008)
3bc5	P432 ₁ 2	1	(YE <i>et al.</i> , 2008)

5.2.1 hPPAR γ -LBD complexado ao ácido nonanóico

Os dados da coleta, processamento e refinamento do cristal de hPPAR γ -LBD, o qual a princípio se acreditava estar na forma apo, que proporcionou melhores estatísticas nos experimentos de difração (figura 11b) estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados de difração dos cristais de hPPAR γ -LBD complexados com ácido nonanóico (AN) e com rosiglitazona.

Dados de difração	PPAR γ /Ácido nonanóico	PPAR γ /Rosiglitazona
Fonte	Síncrotron	Síncrotron
Comprimento de onda /Å	1,459	1,459
Grupo espacial	C2	C2
Parâmetros de rede /Å	a = 92,73, b = 62,25, c = 118,65, e β = 101,94	a = 90,51, b = 61,96, c = 117,60, e β = 100,70
Resolução /Å	50-2,09 (2,17-2,09)	28,89-2,54 (2,66-2,54)
Completeza (%)	94,66 (59,9)	98,23 (91,7)
I / σ (I)	24,86 (2,23)	12,66 (2,42)
Redundância	5,6 (3,3)	5,5 (4,3)
R-fac linear/quadrado	0,05/0,04 (0,35/0,22)	0,06/0,06 (0,57/0,47)
Estatísticas de refinamento	PPARγ/Ácido nonanóico	PPARγ/Rosiglitazone
Resolução /Å	2,1	2,55
N° de reflexões	36859	20835
R (%)	20,0	17,7
Rfree (%)	25,3	22,4
N° de Átomos	4346	4095
Proteína	4021	3998
Ligante	55	25
Solvente	270	72
B fator /Å ²	56,69	60,77
Proteína	56,44	60,80
Ligante	72,42	71,23
Solvente	60,67	59,40
R.M.S. distância de ligação /Å	0,009	0,01
R.M.S. ângulos de ligação (°)	1	1,657
Gráfico de Ramachandran		
Região preferida (%)	96,27	92,42
Região permitida (%)	2,9	6,76
Região desfavorecida (%)	0,83	0,82

Os valores entre parênteses representam valores da faixa de maior resolução

Da mesma forma que no modelo utilizado para fazer a substituição molecular (PDBID – 1ZEO), foram encontradas duas moléculas na unidade assimétrica, previstas pelo programa Matthews_coef (probabilidade de 92 %, com cristal possuindo 54,5 % de solvente), e confirmadas na substituição molecular pelo programa Phaser.

Vários ciclos de refinamento manual no espaço real através do programa Coot, alternados com refinamento no espaço recíproco pelo programa Phenix, foram realizados até

chegar a um modelo em que, através do método de validação pela análise dos fatores R e Rfree (BRUNGER *et al.*, 1998), não pudesse ser mais melhorado.

O modelo refinado se mostrou muito parecido com outros modelos depositados no PDB (modelos onde o cristal apresentava mesmo grupo espacial e mesmo número de moléculas na unidade assimétrica), onde a principal diferença entre as duas moléculas da unidade assimétrica, a posição diferencial da hélice 12, se mantém (figura 12).

Figura 12. Sobreposição da estrutura hPPAR γ -LBD/NA e hPPAR γ -LBD/rosiglitazona determinadas neste trabalho com as 25 estruturas de PPAR γ presentes no PDB que possuem o grupo espacial C2 e 2 moléculas na unidade assimétrica.

O modelo final, determinado a 2,1 Å de resolução, contém 2 moléculas de hPPAR γ -LBD, 4 moléculas de ácido nonanóico e 1 molécula de TCEP na unidade assimétrica, além de 270 moléculas de água (figura 13). Todos os átomos presentes foram modelados dentro de densidades eletrônicas bem caracterizadas, com exceção de algumas poucas cadeias laterais de resíduos presentes na superfície dos monômeros e expostos ao solvente, cujas conformações não puderam ser modeladas. Não foi possível modelar a região de *loop*

compreendida entre os resíduos 260 e 275 das duas cadeias, pela desordem da densidade eletrônica.

Figura 13. Representação estereográfica do modelo cristalográfico do hPPAR γ -LBD complexado com ácidos nonanóicos. Conteúdo da unidade assimétrica. O modelo apresenta um homodímero (cadeia A em verde e cadeia B em azul), quatro moléculas de ácido nonanóico, três na molécula A e uma na molécula B, e 270 moléculas de água (cruzes vermelhas).

A região LDB do receptor nuclear humano PPAR γ aqui apresentada possui o enovelamento globular característico observado para a família, com dimensões aproximadas de $60 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$, constituído de 12 hélices- α e uma pequena folha de três fitas- β (figuras 4d e 13). Esses motivos de estrutura secundária são formados por aproximadamente 80 % de todos os resíduos que caracterizam a região. A cavidade interna, que forma o sítio de ligação a ligantes, é contornada por oito elementos de estrutura secundária: H2', H3, H6, H7, H11, H12, $\beta 2$ e $\beta 3$.

Como todas as outras estruturas de PPAR γ -LBD que apresentam grupo espacial C2 e 2 moléculas na unidade assimétrica (tabela 1), a hélice 12 adota uma posição ativa em um dos

monômeros (cadeia A), mas ocupa posição diferente resultando em uma conformação inativa no outro monômero (cadeia B). A posição da hélice 12 é parcialmente influenciada por efeito de empacotamento cristalino, a hélice 12 da cadeia B se encaixa na superfície de ligação ao co-ativador do PPAR γ na cadeia A pertencente à unidade assimétrica vizinha.

Interação do LBP com ácidos nonanóicos

De forma diferente dos outros receptores, em que o LBP é pequeno e bem delineado a agonistas cognatos, os PPARs contêm um LBP grande (1300 Å³) em forma de Y que interage com diferentes ligantes de diferentes formas (NOLTE *et al.*, 1998). As TZD ocupam apenas uma pequena parte do bolso, formando contato com resíduos dos dois braços do Y e grupos carbonilas do ligante interagem com a superfície interna da hélice 12 para estabilizar a conformação ativa. Entretanto, ligantes naturais de PPAR γ , incluindo ácidos graxos poliinsaturados, oxidados e ligados a nitratos, ocupam posições distintas e adotam diferentes conformações (FYFFE *et al.*, 2006; ITOH *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008). Além disso, ácidos graxos oxidados, que são potentes ligantes naturais, podem ligar-se covalentemente com a Cys285 no LBP, e há casos em que dois ligantes iguais ocupam o bolso simultaneamente (ITOH *et al.*, 2008).

A natureza versátil do modo de ligação ao PPAR γ se traduz em diferentes resultados funcionais. Compostos que estabilizam diretamente a hélice 12 atuam como agonistas completos, enquanto compostos que se ligam a resíduos polares na base no Y são agonistas parciais que possivelmente promovem a transcrição estabilizando o heterodímero através de interações com o DBD do RXR, de acordo com a primeira estrutura resolvida por cristalografia de raios-X do PPAR γ intacto (CHANDRA *et al.*, 2008).

Assim que o mapa de densidade eletrônica foi gerado e os primeiros ciclos de refinamento completados, um resultado até então inesperado chamou a atenção. No sítio de

ligação (LBP) tanto da molécula A quanto da molécula B (figuras 14 e 15) haviam densidades eletrônicas alongadas bem definidas. Por causa de seu formato essas densidades não poderiam estar relacionadas a algum composto presente nos tampões de purificação ou cristalização. Portanto, algum composto presente na bactéria *E. coli* (durante o processo de expressão) possui afinidade suficiente para manter-se ligado à proteína, mesmo passando pelo processo de purificação.

Para identificação das moléculas que estavam ligadas à proteína, foram feitos experimentos de espectrometria de massas (descritos a frente) pelo colaborador prof. Dr. Mário Palma. Seus resultados identificaram duas moléculas diferentes ligadas aos receptores, sendo elas o ácido nonanóico (AN) e o ácido octanóico (figura 8). Como o ácido nonanóico respondia por 80% da amostra extraída das proteínas (figura 23), ele foi utilizado no modelo estrutural, encaixando-se perfeitamente nas densidades eletrônicas (figuras 14 e 15).

Figura 14. Modelo estrutural do hPPAR γ -LBD, cadeia A, evidenciando as densidades eletrônicas encontradas nos sítios de ligação, onde posteriormente foram identificadas como pertencentes a ácidos nonanóicos.

Figura 15. Modelo estrutural do hPPAR γ -LBD, cadeia B, evidenciando as densidades eletrônicas encontradas nos sítios de ligação, onde posteriormente foram identificadas como pertencentes a ácidos nonanóicos. A densidade eletrônica mais abaixo na cadeia B foi modelada com uma molécula de TCEP.

Na cadeia A da estrutura final de hPPAR γ -LBD foram então encontrados três sítios de ligação distintos para interação com o ácido nonanóico. O primeiro deles, ocupado pelo ácido nonanóico (AN1), é o braço polar da cavidade, bem conhecido pela sua importância na interação com as TZD e outros vários ligantes sintéticos. Neste sítio o resíduo da hélice 12 Y473 (2,9 Å), mais os resíduos H323 (2,92 Å), H449 (2,75 Å) e S289 (3,05 Å), interagem diretamente com o grupo carboxilato do AN. A cauda hidrofóbica do AN se encaixa em uma superfície formada pelos resíduos I281, F282, L353, F363, M364 e L453. É interessante notar que a maneira que o AN se liga a este sítio assemelha-se a maneira que o grupo tiazol da rosiglitazona o reconhece (figura 16 e 21).

Figura 16. Modelo estrutural do hPPAR γ -LBD, evidenciando os contatos feitos entre o ácido nonanóico 1 e os aminoácidos do sítio 1 do LBP. A linha tracejada indica ligação de hidrogênio.

O segundo ácido nonanóico (AN2) ocupa o sítio localizado entre as hélices H1, H3 e H4/5 e foi modelado em duas conformações considerando uma flexibilidade estrutural na cauda apolar. No sítio 2, a C285 interage com o carboxilato do AN (2,75 Å e 3,02 Å para as conformações A e B, respectivamente) enquanto a cauda hidrofóbica está estendida até a superfície da hélice 4, estabilizada por A292, I296, M329 e L330 (figura 17).

Figura 17. Modelo estrutural do hPPAR γ -LBD, evidenciando os contatos feitos entre o ácido nonanóico 2 (apresentado em dupla conformação) e os aminoácidos do sítio 2 do LBP. A linha tracejada indica ligação de hidrogênio.

O terceiro e último ácido nonanóico (AN3) está localizado próximo à superfície do LBD, entre a hélice 3 e a folha β . Este AN está estabilizado por interações fracas com R288 (3,8 Å), enquanto a cauda hidrofóbica é estabilizada por interações de van der Waals com G284 e I281 da hélice 3, e I341 da folha β (figura 18).

Figura 18. Modelo estrutural do hPPAR γ -LBD, evidenciando os contatos feitos entre o ácido nonanóico 3 e os aminoácidos do sítio 3 do LBP. A linha tracejada indica ligação fraca (3,8 Å).

A segunda molécula de PPAR γ (cadeia B) possui duas densidades eletrônicas dentro do LBP. Uma delas, a densidade alongada, permitiu boa modelagem do ácido nonanóico. Este AN ocupa a mesma posição do segundo ácido nonanóico (AN2) na cadeia A, e interage com os mesmos resíduos correspondentes, C285, A292, I296, M329 e L330 (figura 19). A segunda densidade foi considerada como pertencente ao TCEP, um agente redutor presente na solução de purificação, que se modelou muito bem à densidade eletrônica. O TCEP está localizado na mesma posição do terceiro ácido nonanóico (AN3) na cadeia A, entre a hélice 3 e a folha β , porém faz algumas outras interações, como por exemplo, com H266 e C285 (figura 19).

Como a cadeia B apresenta-se na forma inativa, e o TCEP complexado provém do método de purificação, não será dada maior atenção a ela.

Figura 19. Sobreposição das cadeias A e B da estrutura de hPPAR γ -LBD complexada com ácido nonanóico. A cadeia A está em verde, a cadeia B em azul, os AN ligados à cadeia A em amarelo e o NA juntamente com o TCEP ligados à cadeia B estão em magenta. A sobreposição dos elementos de estrutura secundária é quase total, com exceção da hélice 12.

Todos os três sítios de ligação aos AGCM já haviam sido implicados na interação com ligantes. Para o AN1, as interações do braço polar do LBP com o grupo carboxilato do ligante mimetizam as interações dos grupos carbonilas e carboxilatos de outros ligantes de PPAR γ . Para o AN2, o grupo carboxilato fica próximo a C285, que forma ligação covalente com ácidos graxos oxidados como o 4-oxoDHA, e a cauda alifática ocupa um dos braços hidrofóbicos da cavidade do PPAR γ (ITOH *et al.*, 2008). O AN3 ocupa a região do LBP que interage com os ligantes naturais de PPAR γ , incluindo 13-HODE e 9-HODE, ácidos graxos ligados a nitratos e alquilglicerofosfatos, e ligantes artificiais com propriedades agonistas parciais (ITOH *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007). Enquanto já era conhecido que PPAR γ pode se ligar a dois ligantes, o presente trabalho

representa a primeira demonstração da capacidade do LBP de PPAR γ ser ocupado por três ligantes simultaneamente.

5.2.2 hPPAR γ -LBD complexado com rosiglitazona

Com o intuito de entender como os AGCMs afetam a estrutura em comparação com as TZD, foram obtidos cristais de hPPAR γ -LBD complexados com rosiglitazona e refinados a 2,54 Å de resolução. Os dados da coleta, processamento e refinamento do cristal de hPPAR γ -LBD complexado com rosiglitazona (figura 11c) que proporcionou melhores estatísticas nos experimentos de difração, estão apresentados na tabela 2.

O complexo hPPAR γ -LBD/rosi mostrou-se homodimérico, como a estrutura do hPPAR γ -LBD/ácido nonanóico, diferentemente de outras estruturas reportadas onde as duas cadeias apresentavam-se com a hélice 12 na forma ativa (NOLTE *et al.*, 1998). Nenhuma molécula exibiu evidência da ligação de AGCM. A cadeia A foi ocupada pela rosiglitazona, cuja densidade eletrônica foi perfeitamente modelada, apresentando a hélice 12 na forma ativa (figura 20), enquanto a cadeia B estava desocupada por ligantes e com a hélice 12 na forma inativa (figura 12). A cadeia A não apresentou densidade eletrônica ordenada apenas na região entre os resíduos 260 e 276 (da mesma forma como PPAR γ /NA), já a cadeia B não apresentou densidade eletrônica ordenada em três regiões da molécula, compreendidas entre os resíduos 239 e 243, 260 e 275, 455 e 462, todas elas regiões de *loop*.

Esta estrutura é importante, pois permite a comparação da conformação do PPAR γ na presença de AN e rosiglitazona sem possíveis confusões provindas de diferenças no arranjo do empacotamento cristalino.

Figura 20. Estrutura cristalográfica da região LBD do hPPAR γ em complexo com rosiglitazona (verde). Está representada apenas a cadeia A, onde a hélice 12 se apresenta na conformação ativa. Também está evidenciada a densidade eletrônica correspondente ao ligante.

A estrutura secundária da cadeia A na presença de rosiglitazona é idêntica à estrutura na presença de ANs. Apenas alguns rearranjos em cadeias laterais fizeram diferença entre os LBPs, sendo a mais notável o movimento do resíduo F363 na presença de NA, aumentando assim o volume do LBP para acomodação da cauda hidrofóbica do NA1 (figura 21).

Figura 21. Sobreposição das estruturas de PPAR γ complexadas a ácidos nonanóicos (proteína em verde e ácidos graxos em amarelo) e a rosiglitazona (proteína em ciano e ligante em magenta). A diferença mais notável nas estruturas da proteína é o movimento do resíduo Phe363, para acomodação do ácido graxo NA1.

De forma interessante, a análise do fator de deslocamento (B-fator cristalográfico) revela que a hélice 12 está rígida e bem estabilizada no complexo PPAR γ /rosi, mas relativamente desordenada na estrutura PPAR γ /NA (figura 22). Em contraste, o *loop* entre hélices 11 e 12 e a região entre hélice 3 e folha β estão significativamente mais estáveis na presença de NA. Com esses dados chegamos à conclusão de que rosiglitazona e NA estabilizam preferencialmente regiões diferentes do receptor. O fato de AGCMs estabilizar a região entre hélice 3 e folha β indica que eles promovem a ativação do PPAR γ semelhantemente a agonistas sintéticos parciais que também estabilizam essa região do receptor.

Figura 22. Representação das estruturas de hPPAR γ -LBD complexados com ANs (verde) e com rosiglitazona (ciano). Essa representação está relacionada ao fator de deslocamento (B-fator), onde a espessura da linha é proporcional ao grau de movimentação da região correspondente. Os círculos e setas em vermelho evidenciam regiões onde há diferença notável entre os dois complexos.

5.3 Novos ligantes encontrados – Ácidos octanóico e nonanóico

Em 2006, Stewart Fyffe e colaboradores, reportaram a estrutura cristalográfica da proteína hPPAR β domínio LBD complexada a ácidos graxos, sendo que esses ácidos graxos provinham da bactéria utilizada para a expressão da proteína. Os ácidos graxos não eram adicionados durante o processo de expressão ou purificação (FYFFE *et al.*, 2006).

Portanto, para identificar a molécula, detectada por cristalografia, que estava interagindo com o hPPAR γ , uma parte da massa de proteína que veio da purificação para a cristalização foi enviada para análise por espectrometria de massas ao grupo colaborador do Prof. Dr. Mario Sérgio Palma (Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP, Rio Claro – SP). Para a determinação, foi feita a análise da amostra e o uso de kits de padrões de ácidos graxos (C8:0-C12:0, C13:0-C17:1 e C18:0-C20:5, Sigma Aldrich) por GC-MS em um sistema Shimadzu, modelo QP5000 com detector seletivo de massas (MSD), sendo que para a

separação foi usada uma coluna capilar RTX-wax. Os compostos foram identificados primeiramente por comparação de seus tempos de retenção com os dos ácidos graxos padrões, com o primeiro composto localizando-se na mesma posição relativa do ácido octanóico e o segundo localizando-se na mesma posição relativa do ácido nonanóico (figura 23). A análise do espectro de massas dos picos encontrados na amostra confirmou então a identidade, já indicada acima, dos compostos que estavam interagindo com o hPPAR γ (figura 24).

Como alguns desses ácidos graxos são voláteis, antes das análises foi feita a derivatização dos mesmos, tanto da amostra como dos padrões, com solução de ácido sulfúrico 10% (V/V) em metanol, resultando em metil ésteres dos ácidos graxos (FAMES). Esta técnica também foi utilizada na determinação dos ácidos graxos ligados a hPPAR β por Fyffe (FYFFE *et al.*, 2006).

Figura 23. Espectrometria de massas dos ácidos graxos. (a) Análise GC-MS dos FAMEs padrões, o tamanho da cadeia e o estado de saturação estão indicados. (b) Análise GC-MS dos ácidos graxos extraídos do PPAR γ , os números indicam os ácidos graxos listados no item **a**.

Figura 24. Padrão de fragmentação no espectro de massas do (a) ácido metil éster octanóico e (b) ácido metil éster nonanóico.

5.4 Capacidade de transativação do PPAR γ de camundongo

Através da cristalografia e espectrometria de massas, foi mostrado que os ácidos nonanóico e octanóico podem se ligar PPAR γ . Então, com o intuito de verificar se esses ácidos graxos têm a capacidade de ativar o receptor, foi utilizado o ensaio de gene repórter em células humanas U937. A linhagem de células U937 foi escolhida para tal ensaio pela sua disponibilidade, facilidade no seu cultivo e por já terem sido reportadas por outros autores no

estudo da regulação transcricional mediada por PPAR γ (HORNUNG *et al.*, 2001; JIANG; TING; SEED, 1998).

Inicialmente, foi feita a curva dose resposta com o ligante rosiglitazona para confirmar se o sistema expressava receptores funcionais e respondia de maneira eficaz ao ligante (figura 25). O EC50 (concentração de ligante que produz 50% da ativação máxima para o mesmo ligante) determinado foi de 0,949 μ M. Esse valor se encontra próximo a valores determinados em outros artigos científicos (BURGERMEISTER *et al.*, 2006; FREDERIKSEN *et al.*, 2004; MITTRA *et al.*, 2007). A diferença entre o EC50 determinado neste trabalho e o EC50 de outros trabalhos, entre outros fatores, deve-se principalmente ao tipo celular utilizado. Cada tipo celular responde de maneira diferente em um mesmo experimento.

Após demonstrada a aptidão do ensaio em responder sobre a capacidade de ativação do cPPAR γ mediante a ligantes, foi feita a curva dose resposta dos ácidos graxos. As curvas apresentadas na figura 25 mostram que tanto o ácido nonanóico como o ácido octanóico promovem a transcrição gênica pela ativação do cPPAR γ através do tratamento com os compostos mesmo que em concentrações a partir de 0,1 mM. Concentrações abaixo de 0,1 mM não foram capazes de ativar o receptor e concentrações acima de 10 mM mostraram-se tóxicas às células, reduzindo a ativação. Não foi possível determinar o EC50 para os ácidos graxos uma vez que a atividade máxima não pode ser determinada.

Figura 25. Curva dose resposta dos agonistas rosiglitazona (rosi), ácido nonanóico (C9) e ácido octanóico (C8). Células U937 foram cotransfectadas com o plasmídeo repórter GAL4-tk-luc e o plasmídeo de expressão para cPPAR γ /GAL4. As células foram tratadas por 24 horas com concentrações crescentes dos agonistas. A atividade luciferase foi, então, mensurada. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão das triplicatas.

A ativação apresentada indica uma afinidade muito baixa dos ácidos graxos pelo cPPAR γ comparando-se com rosiglitazona, porém esse valor pode não representar a real afinidade desses compostos pelo receptor, uma vez que não sabemos a real concentração deles presente no núcleo das células disponível para interação com cPPAR γ . Apesar da incerteza na medida de afinidade entre receptor e ligante, a capacidade de ativação demonstrada, juntamente com os experimentos de cristalografia e espectrometria, coloca os ácidos nonanóico e octanóico como prováveis agonistas naturais de PPAR γ .

Para os ensaios, foi utilizado o plasmídeo contendo PPAR γ de camundongo, uma vez que o humano ainda não estava disponível. Embora sendo de camundongo, os resultados apresentados podem indicar respostas bem próximas ao PPAR γ humano, pois o LBD dos dois apresentam apenas 4 resíduos de diferença. O humano possui os aminoácidos Ser302, Ser355, Leu435 e Gln454, enquanto o PPAR γ de camundongo possui Asn, Asn, Val e His, respectivamente, nas mesmas posições.

5.5 Confirmação da capacidade de transativação dos ácidos graxos de cadeia média em PPAR γ humano

Sistemas de genes repórter são amplamente usados para estudar expressão gênica em eucariotos e fisiologia celular. Suas aplicações incluem o estudo da atividade de receptores, fatores de transcrição, sinalização intracelular, processamento de mRNA e enovelamento de proteínas. Em tais experimentos, repórteres duais geralmente são utilizados para aumentar a precisão dos resultados. O termo repórter dual refere-se à expressão e medida simultânea de duas enzimas repórteres individuais em um mesmo sistema, onde geralmente o repórter experimental está correlacionado com o efeito das condições específicas do experimento, enquanto a atividade repórter “controle” cotransfectado fornece um controle interno que serve como linha de base. Através da normalização da atividade do repórter experimental com a atividade do controle interno, a variabilidade experimental causada por diferenças na viabilidade celular ou eficiência da transfecção é minimizada. Outras fontes de variabilidade, como diferença nos volumes pipetados, eficiência da lise celular e eficiência do ensaio, podem ser efetivamente reduzidas (DYER *et al.*, 2000).

Para confirmar os resultados obtidos nos ensaios de transativação celular feitos no nosso laboratório, o colaborador Dr. Paul Webb (Centro de Pesquisa em Diabetes, Hospital Metodista, Houston, EUA), fez o mesmo experimento utilizando o método de normalização descrito acima. Além disso, foi utilizado o PPAR γ humano e linhagem celular diferente.

Os resultados de nosso colaborador mostram que a ativação promovida pelos ácidos graxos relativamente à rosiglitazona estão de acordo com os experimentos feitos com o cPPAR γ sem a normalização. Ambos alcançaram ativação pouco abaixo da rosiglitazona em concentração de 1mM (figura 26). O Dr. Paul Webb também relatou efeito tóxico em concentrações de ácidos graxos a partir de 10 mM.

A única diferença observada entre os experimentos foi o EC50 apresentado pela rosiglitazona. Pelo experimento de nosso colaborador, o EC50 calculado foi de aproximadamente 30 nM, valor bem mais baixo do que o determinado no experimento sem normalização. Essa diferença pode ter sido produzida não só pela técnica de normalização, mas também pela diferença nas linhagens celulares.

Figura 26. Curva dose resposta dos agonistas rosiglitazona (rosi), pioglitazona (pio), ácido hexanóico (C6), ácido octanóico (C8), ácido nonanóico (C9), ácido decanóico (C10), e ácido dodecanóico (12). Células foram cotransfectadas com o plasmídeo repórter GAL4-tk-luc e o plasmídeo de expressão para hPPAR γ /GAL4. As células foram tratadas por 24 horas com concentrações crescentes dos agonistas. A atividade luciferase foi, então, mensurada. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão das triplicatas.

Além dos ácidos octanóico e nonanóico, Dr. Paul Webb também testou outros ácidos graxos de cadeia média como o ácido hexanóico, ácido decanóico e ácido dodecanóico, e os resultados mostraram que, em geral, ácidos graxos de cadeia média ativam PPAR γ humano (figura 26). O ácido hexanóico apresenta ativação muito baixa, alcançando apenas 35% da atividade da rosiglitazona. O ácido decanóico, de maneira surpreendente, apresentou alta

ativação, superando inclusive os ligantes sintéticos. E o ácido dodecanóico apresentou ativação pouco abaixo dos ácidos graxos estudados neste trabalho.

6 CONCLUSÃO

Os resultados estruturais reportados nesta dissertação destacam a plasticidade funcional do PPAR γ . Estudos estruturais recentes têm mostrado que esse receptor é capaz de se ligar a ácidos graxos saturados e insaturados, oxidados e ligados a nitratos, além de poder ligar um ou dois ligantes simultaneamente. Esse trabalho mostrou que não apenas ácidos graxos de cadeia longa e eicosanoides podem ativar PPAR γ , os ácidos graxos de cadeia média também podem fazê-lo em alta concentração e ligando três moléculas simultaneamente ao sítio de ligação. Esta plasticidade funcional revelada pelos estudos estruturais podem ser explorados no desenvolvimento de novos alvos farmacêuticos possuindo maior ativação e maior especificidade.

Por fim, os estudos aqui presentes trazem à tona a questão do papel dos ácidos graxos de cadeia média no nosso organismo. Até onde os AGCM respondem por uma função fisiológica na ativação do PPAR γ ?

Pouco é conhecido sobre níveis de AGCMs nos tecidos humanos, além de estar conhecidamente presentes em poucos alimentos. A eficiência na ativação alcançada pelos ácidos octanóico, nonanóico e decanóico, supera a ativação dos ácidos graxos de cadeia longa, que não ocupam todos os três braços do sítio de ligação simultaneamente, entretanto a potência dos AGCMs mostrou-se baixa. Talvez esses ácidos graxos atuem como fortes ativadores fisiológicos de PPAR γ contando com mecanismos que possam concentrá-los em compartimentos celulares para ativação do receptor. De qualquer forma, é importante considerar que AGCMs podem representar novos moldes para o desenvolvimento de fármacos relacionados ao PPAR γ .

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D., *et al.* PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallographica D: Biological Crystallography*, v.58, n.Pt 11, p.1948-54, Nov. 2002.
- 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, Jun 22. 2007.
- ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews*, v.81, n.3, p.1269-304, Jul. 2001.
- BEAMER, B. A., *et al.* Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR gamma) gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.233, n.3, p.756-9, Apr 28. 1997.
- BERGER, J., *et al.* Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.10, p.6718-25, Mar 5. 1999.
- BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. *Annual Review of Medicine*, v.53, p.409-35. 2002.
- BERMAN, H. M., *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v.28, n.1, p.235-42, Jan 1. 2000.
- BOURDONCLE, A., *et al.* The nuclear receptor coactivator PGC-1alpha exhibits modes of interaction with the estrogen receptor distinct from those of SRC-1. *Journal of Molecular Biology*, v.347, n.5, p.921-34, Apr 15. 2005.
- BOURGUET, W.; GERMAIN, P.; GRONEMEYER, H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.21, n.10, p.381-8, Oct. 2000.
- BOURGUET, W., *et al.* Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*, v.375, n.6530, p.377-82, Jun 1. 1995.
- 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, May 7. 1976.
- BROWN, P. J., *et al.* Identification of a subtype selective human PPARalpha agonist through parallel-array synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.11, n.9, p.1225-7, May 7. 2001.

BRUNGER, A. T., *et al.* Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica D: Biological Crystallography*, v.54, n.Pt 5, p.905-21, Sep 1. 1998.

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

BURGERMEISTER, E., *et al.* A novel partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) recruits PPARgamma-coactivator-1alpha, prevents triglyceride accumulation, and potentiates insulin signaling in vitro. *Molecular Endocrinology*, v.20, n.4, p.809-30, Apr. 2006.

CAREY, D. G., *et al.* Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients [corrected]. *Obesity Research*, v.10, n.10, p.1008-15, Oct. 2002.

CASIMIRO-GARCIA, A., *et al.* Effects of modifications of the linker in a series of phenylpropanoic acid derivatives: Synthesis, evaluation as PPARalpha/gamma dual agonists, and X-ray crystallographic studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* v.16, n.9, p.4883-907, May 1. 2008.

The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica D: Biological Crystallography*, v.50, n.Pt 5, p.760-3, Sep 1. 1994.

CHAKRABARTI, R., *et al.* Ragaglitazar: a novel PPAR alpha PPAR gamma agonist with potent lipid-lowering and insulin-sensitizing efficacy in animal models. *British Journal of Pharmacology*, v.140, n.3, p.527-37, Oct. 2003.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB Journal*, v.10, n.9, p.940-54, Jul. 1996.

CHANDRA, V., *et al.* Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, p.350-356, Oct 29. 2008.

CHEN, F.; LAW, S. W.; O'MALLEY, B. W. Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.196, n.2, p.671-7, Oct 29. 1993.

CHEN, Y.; JIMENEZ, A. R.; MEDH, J. D. Identification and regulation of novel PPAR-gamma splice variants in human THP-1 macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1759, n.1-2, p.32-43, Jan-Feb. 2006.

CRONET, P., *et al.* Structure of the PPARalpha and -gamma ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family. *Structure*, v.9, n.8, p.699-706, Aug. 2001.

DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v.10, n.2, p.142-8, Mar. 2007.

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

DEVCHAND, P. R., *et al.* The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, v.384, n.6604, p.39-43, Nov 7. 1996.

DIRADOURIAN, C.; GIRARD, J.; PEGORIER, J. P. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie*, v.87, n.1, p.33-8, Jan. 2005.

DIRENZO, J., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Molecular and Cellular Biology*, v.17, n.4, p.2166-76, Apr. 1997.

DREYER, C., *et al.* Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biology of the Cell* v.77, n.1, p.67-76. 1993.

_____. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, v.68, n.5, p.879-87, Mar 6. 1992.

DYER, B. W., *et al.* A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Analytical Biochemistry*, v.282, n.1, p.158-61, Jun 15. 2000.

EBDRUP, S., *et al.* Synthesis and biological and structural characterization of the dual-acting peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma agonist ragaglitazar. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.46, n.8, p.1306-17, Apr 10. 2003.

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, Jan. 2008.

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

ESCHER, P., *et al.* Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*, v.142, n.10, p.4195-202, Oct. 2001.

ESTEVE, E.; RICART, W.; FERNANDEZ-REAL, J. M. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clinical Nutrition*, v.24, n.1, p.16-31, Feb. 2005.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine*, v.10, n.4, p.355-61, Apr. 2004.

FAGERBERG, B., *et al.* Improvement of postprandial lipid handling and glucose tolerance in a non-diabetic population by the dual PPARalpha/gamma agonist, tesaglitazar. *Diabetes & Vascular Disease Research*, v.4, n.3, p.174-80, Sep. 2007.

FAJAS, L., *et al.* The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.272, n.30, p.18779-89, Jul 25. 1997.

FAJAS, L.; FRUCHART, J. C.; AUWERX, J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters*, v.438, n.1-2, p.55-60, Oct 30. 1998.

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, Mar. 2006.

_____. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.18, p.17880-90, May 6. 2005.

FERNANDES, I., *et al.* Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Molecular Cell*, v.11, n.1, p.139-50, Jan. 2003.

FLORES, A. M.; LI, L.; ANESKIEVICH, B. J. Isolation and functional analysis of a keratinocyte-derived, ligand-regulated nuclear receptor comodulator. *Journal of Investigative Dermatology*, v.123, n.6, p.1092-101, Dec. 2004.

FORMAN, B. M., *et al.* 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, v.83, n.5, p.803-12, Dec 1. 1995.

FREDERIKSEN, K. S., *et al.* Prediction of PPAR-alpha ligand-mediated physiological changes using gene expression profiles. *Journal of Lipid Research*, v.45, n.3, p.592-601, Mar. 2004.

FU, J., *et al.* Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature*, v.425, n.6953, p.90-3, Sep 4. 2003.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, v.294, n.5548, p.1871-5, Nov 30. 2001.

FYFFE, S. A., *et al.* Recombinant human PPAR-beta/delta ligand-binding domain is locked in an activated conformation by endogenous fatty acids. *Journal of Molecular Biology*, v.356, n.4, p.1005-13, Mar 3. 2006.

GEARING, K. L.; CRICKMORE, A.; GUSTAFSSON, J. A. Structure of the mouse peroxisome proliferator activated receptor alpha gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.199, n.1, p.255-63, Feb 28. 1994.

GEARING, K. L., *et al.* Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.90, n.4, p.1440-4, Feb 15. 1993.

GREENE, M. E., *et al.* Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expression*, v.4, n.4-5, p.281-99. 1995.

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.2459-64, Oct. 2007.

GRIMALDI, P. A., *et al.* Induction of aP2 gene expression by nonmetabolized long-chain fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.89, n.22, p.10930-4, Nov 15. 1992.

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, Nov. 2004.

GRUNDY, S. M., *et al.* Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.24, n.2, p.e13-8, Feb. 2004.

GUIMARAES, 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, Jan. 2009.

HEBBAR, P. B.; ARCHER, T. K. Chromatin remodeling by nuclear receptors. *Chromosoma*, v.111, n.8, p.495-504, May. 2003.

HENKE, B. R., *et al.* N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.41, n.25, p.5020-36, Dec 3. 1998.

HERTZ, R., *et al.* Activation of gene transcription by prostacyclin analogues is mediated by the peroxisome-proliferators-activated receptor (PPAR). *European Journal of Biochemistry*, v.235, n.1-2, p.242-7, Jan 15. 1996.

HOME, P. D., *et al.* Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes--an interim analysis. *New England Journal of Medicine*, v.357, n.1, p.28-38, Jul 5. 2007.

HOPKINS, C. R., *et al.* Design and synthesis of novel N-sulfonyl-2-indole carboxamides as potent PPAR-gamma binding agents with potential application to the treatment of osteoporosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, n.21, p.5659-63, Nov 1. 2006.

HORAK, T., *et al.* Determination of free medium-chain fatty acids in beer by stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, v.1196-1197, p.96-9, Jul 4. 2008.

HORNUNG, D., *et al.* Nuclear peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma have opposing effects on monocyte chemotaxis in endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.86, n.7, p.3108-14, Jul. 2001.

HSU, M. H., *et al.* A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, n.43, p.27988-97, Oct 23. 1998.

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, Oct 18. 1990.

ISSEMAN, I., *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrates hypolipidaemic drugs. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.11, n.1, p.37-47, Aug. 1993.

ITOH, T., *et al.* Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. *Nature Structural & Molecular Biology*, Aug 17. 2008.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, v.391, n.6662, p.82-6, Jan 1. 1998.

JONES, P. S., *et al.* Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *European Journal of Biochemistry*, v.233, n.1, p.219-26, Oct 1. 1995.

JPENBERG, A. I., *et al.* Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, n.32, p.20108-17, Aug 8. 1997.

JUGE-AUBRY, C., *et al.* DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, n.40, p.25252-9, Oct 3. 1997.

KASUGA, J., *et al.* Design, synthesis, and evaluation of potent, structurally novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) delta-selective agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* v.15, n.15, p.5177-90, Aug 1. 2007.

KELLER, H., *et al.* Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.90, n.6, p.2160-4, Mar 15. 1993.

KERSTEN, S. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *European Journal of Pharmacology*, v.440, n.2-3, p.223-34, Apr 12. 2002.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in Health and Disease. *Nature*, v.405, n.6785, p.421-4, May 25. 2000.

KERSTEN, S., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *Journal of Clinical Investigation*, v.103, n.11, p.1489-98, Jun. 1999.

KIPNES, M. S., *et al.* Pioglitazone hydrochloride in combination with sulfonylurea therapy improves glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. *American Journal of Medicine*, v.111, n.1, p.10-7, Jul. 2001.

KLAHOLZ, B. P.; MITSCHLER, A.; MORAS, D. Structural basis for isotype selectivity of the human retinoic acid nuclear receptor. *Journal of Molecular Biology*, v.302, n.1, p.155-70, Sep 8. 2000.

KLIEWER, S. A., *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.94, n.9, p.4318-23, Apr 29. 1997.

_____. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, v.358, n.6389, p.771-4, Aug 27. 1992.

KNOLL, A. H. The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science*, v.256, n.5057, p.622-7, May 1. 1992.

KOEHLER, K., *et al.* Thyroid receptor ligands. 6. A high affinity "direct antagonist" selective for the thyroid hormone receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.49, n.23, p.6635-7, Nov 16. 2006.

KREY, G., *et al.* Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular Endocrinology*, v.11, n.6, p.779-91, Jun. 1997.

_____. Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.47, n.1-6, p.65-73, Dec. 1993.

KUHN, B., *et al.* Structure-based design of indole propionic acids as novel PPARalpha/gamma co-agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, n.15, p.4016-20, Aug 1. 2006.

LAUDET, V., *et al.* Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO Journal*, v.11, n.3, p.1003-13, Mar. 1992.

LEBOVITZ, H. E., *et al.* Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.86, n.1, p.280-8, Jan. 2001.

LEE, S. K., *et al.* Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. *Molecular Endocrinology*, v.13, n.11, p.1924-33, Nov. 1999.

LEHMANN, J. M., *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, Jun 2. 1995.

_____. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *Journal of LATES*, v.270, n.22, p.12953-6, Jun 2. 1995.

LEONARDSSON, G., *et al.* Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, n.22, p.8437-42, Jun 1. 2004.

LI, Y., *et al.* Structural and biochemical basis for selective repression of the orphan nuclear receptor liver receptor homolog 1 by small heterodimer partner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, n.27, p.9505-10, Jul 5. 2005.

_____. Structural and biochemical basis for the binding selectivity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma to PGC-1alpha. *Journal of Biological Chemistry*, v.283, n.27, p.19132-9, Jul 4. 2008.

_____. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma. *Nature Structural & Molecular Biology*, v.15, n.8, p.865-7, Aug. 2008.

LU, I. L., *et al.* Structure-based drug design of a novel family of PPARgamma partial agonists: virtual screening, X-ray crystallography, and in vitro/in vivo biological activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.49, n.9, p.2703-12, May 4. 2006.

MAHINDROO, N., *et al.* Novel indole-based peroxisome proliferator-activated receptor agonists: design, SAR, structural biology, and biological activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, n.26, p.8194-208, Dec 29. 2005.

_____. Structural basis for the structure-activity relationships of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.49, n.21, p.6421-4, Oct 19. 2006.

_____. 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.1212-6, Feb 9. 2006.

MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, v.83, n.6, p.841-50, Dec 15. 1995.

MARTENS, F. M., *et al.* Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs*, v.62, n.10, p.1463-80. 2002.

MARTIN, G., *et al.* Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, n.45, p.28210-7, Nov 7. 1997.

MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, v.33, n.2, p.491-7, Apr 28. 1968.

MCAFEE, A. T., *et al.* Coronary heart disease outcomes in patients receiving antidiabetic agents. *Pharmacoeconomics and Drug Safety*, v.16, n.7, p.711-25, Jul. 2007.

MCCOY, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallographica D: Biological Crystallography*, v.63, n.Pt 1, p.32-41, Jan. 2007.

MITTRA, S., *et al.* Increase in weight induced by muraglitazar, a dual PPARalpha/gamma agonist, in db/db mice: adipogenesis/or oedema? *British Journal of Pharmacology*, v.150, n.4, p.480-7, Feb. 2007.

MONTANARI, R., *et al.* Crystal structure of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) ligand binding domain complexed with a novel partial agonist: a new region of the hydrophobic pocket could be exploited for drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.51, n.24, p.7768-76, Dec 25. 2008.

MOORE, L. B., *et al.* St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, n.13, p.7500-2, Jun 20. 2000.

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, Jun. 1998.

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, Jul 3. 1998.

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, Mar 27. 1997.

NAHOUM, V., *et al.* Modulators of the structural dynamics of the retinoid X receptor to reveal receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, n.44, p.17323-8, Oct 30. 2007.

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.586-98, Jul 14. 2006.

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, Jun 14. 2007.

NOLTE, R. T., *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, v.395, n.6698, p.137-43, Sep 10. 1998.

The nomenclature of lipids (Recommendations 1976) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *The Biochemical Journal*, v.171, n.1, p.21-35, Apr 1. 1978.

OBERFIELD, J. L., *et al.* A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.96, n.11, p.6102-6, May 25. 1999.

OSADA, S., *et al.* Identification of an extended half-site motif required for the function of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Genes Cells*, v.2, n.5, p.315-27, May. 1997.

OSTBERG, T., *et al.* A new class of peroxisome proliferator-activated receptor agonists with a novel binding epitope shows antidiabetic effects. *Journal of Biological Chemistry*, v.279, n.39, p.41124-30, Sep 24. 2004.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode In: CARTER, C. W.; SWEET, R. M. *Methods in Enzimology*. New York: Academic Press, 1997. v.276. p.307-326.

PALMER, C. N., *et al.* Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, n.27, p.16114-21, Jul 7. 1995.

PILZ, S., *et al.* Free fatty acids are independently associated with all-cause and cardiovascular mortality in subjects with coronary artery disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.91, n.7, p.2542-7, Jul. 2006.

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, Jun 8. 2007.

POLIKARPOV, I., *et al.* Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. *Journal of Synchrotron Radiation*, v.5, n.Pt 2, p.72-6, Mar 1. 1998.

PSATY, B. M.; FURBERG, C. D. The record on rosiglitazone and the risk of myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, v.357, n.1, p.67-9, Jul 5. 2007.

RAMAN, P.; JUDD, R. L. Role of glucose and insulin in thiazolidinedione-induced alterations in hepatic gluconeogenesis. *European Journal of Pharmacology*, v.409, n.1, p.19-29, Dec 1. 2000.

RENAUD, J. P.; MORAS, D. Structural studies on nuclear receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.57, n.12, p.1748-69, Nov. 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.681-9, Dec 14. 1995.

RIBEIRO, R. C., *et al.* Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *Journal of Biological Chemistry*, v.276, n.18, p.14987-95, May 4. 2001.

ROBINSON-RECHAVI, M.; ESCRIVA GARCIA, H.; LAUDET, V. The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science*, v.116, n.Pt 4, p.585-6, Feb 15. 2003.

ROCHETTE-EGLY, C. Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.38, p.32565-8, Sep 23. 2005.

ROSENSON, R. S. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Cardiology*, v.99, n.4A, p.96B-104B, Feb 19. 2007.

ROTH, J. L.; MOBARHAN, S.; CLOHISY, M. The Metabolic Syndrome: where are we and where do we go? *Nutrition Reviews*, v.60, n.10 Pt 1, p.335-7, Oct. 2002.

SAUERBERG, P., *et al.* Novel tricyclic- α -alkyloxyphenylpropionic acids: dual PPAR α /gamma agonists with hypolipidemic and antidiabetic activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.45, n.4, p.789-804, Feb 14. 2002.

SCHMIDT, A., *et al.* Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Molecular Endocrinology*, v.6, n.10, p.1634-41, Oct. 1992.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. 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, Jul 26. 1996.

SHAO, D.; LAZAR, M. A. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *Journal of Clinical Investigation*, v.103, n.12, p.1617-8, Jun. 1999.

SHER, T., *et al.* cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*, v.32, n.21, p.5598-604, Jun 1. 1993.

SHI, G. Q., *et al.* Design and synthesis of α -aryloxyphenylacetic acid derivatives: a novel class of PPAR α /gamma dual agonists with potent antihyperglycemic and lipid modulating activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, n.13, p.4457-68, Jun 30. 2005.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*, v.87, n.3, p.377-89, Nov 1. 1996.

SZNAIDMAN, M. L., *et al.* Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ)--synthesis and biological activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.13, n.9, p.1517-21, May 5. 2003.

TAKEUCHI, H., *et al.* The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v.17 Suppl 1, p.320-3. 2008.

TANEJA, R. Teaching resources. Nuclear receptors. *Science's STKE* v.2005, n.286, p.tr17, May 31. 2005.

TOGASHI, M., *et al.* Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domains to agonists: potential for novel approaches to ligand design. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.93, n.2-5, p.127-37, Feb. 2005.

TRUMP, R. P., *et al.* Co-crystal structure guided array synthesis of PPAR γ inverse agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.17, n.14, p.3916-20, Jul 15. 2007.

USUI, S., *et al.* Synthesis and evaluation of 2-Nonylaminopyridine derivatives as PPAR ligands. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.55, n.7, p.1053-9, Jul. 2007.

VERGES, B. Clinical interest of PPARs ligands. *Diabetes & Metabolism*, v.30, n.1, p.7-12, Feb. 2004.

WEATHERMAN, R. V.; FLETTERICK, R. J.; SCANLAN, T. S. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. *Annual Review of Biochemistry*, v.68, p.559-81. 1999.

WHITE, J. H., *et al.* Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitamins and Hormones*, v.68, p.123-43. 2004.

WILLSON, T. M.; LAMBERT, M. H.; KLIEWER, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annual Review of Biochemistry*, v.70, p.341-67. 2001.

WOLFFENBUTTEL, B. H., *et al.* Addition of low-dose rosiglitazone to sulphonylurea therapy improves glycaemic control in Type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine*, v.17, n.1, p.40-7, Jan. 2000.

WOLFFENBUTTEL, B. H.; SELS, J. P.; HUIJBERTS, M. S. Rosiglitazone. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v.2, n.3, p.467-78, Mar. 2001.

WOLFRUM, C., *et al.* Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, n.5, p.2323-8, Feb 27. 2001.

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, Jan. 1996.

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, Feb 14. 2002.

YE, J. M., *et al.* Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia*, v.47, n.7, p.1306-13, Jul. 2004.

YE, X. Y., *et al.* Design, synthesis, and structure-activity relationships of piperidine and dehydropiperidine carboxylic acids as novel, potent dual PPARalpha/gamma agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, n.12, p.3545-50, Jun 15. 2008.

YOSHIKAWA, T., *et al.* Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*, v.35, n.3, p.637-8, Aug 1. 1996.

ZHOU, J.; WILSON, K. M.; MEDH, J. D. Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor-gamma splice variants in monkey macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.293, n.1, p.274-83, Apr 26. 2002.

ZHU, Y., *et al.* Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, v.268, n.36, p.26817-20, Dec 25. 1993.

_____. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.92, n.17, p.7921-5, Aug 15. 1995.

ZIERATH, J. R., *et al.* Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer (PPARgamma agonist) action. *Endocrinology*, v.139, n.12, p.5034-41, Dec. 1998.

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, Aug. 2007.

ZOMER, A. W., *et al.* Pristanic acid and phytanic acid: naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Journal of Lipid Research*, v.41, n.11, p.1801-7, Nov. 2000.