



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

NATHALIA DE CARVALHO INDOLFO

**INTERAÇÕES ENTRE O RECEPTOR ATIVADOR DA
PROLIFERAÇÃO DE PEROXISSOMOS GAMA (PPAR γ) E OUTRAS
PROTEÍNAS CELULARES**

CAMPINAS

2016

NATHALIA DE CARVALHO INDOLFO

**INTERAÇÕES ENTRE O RECEPTOR ATIVADOR DA
PROLIFERAÇÃO DE PEROXISSOMOS GAMA (PPAR γ) E OUTRAS
PROTEÍNAS CELULARES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Ciências na Área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA NATHALIA DE CARVALHO INDOLFO E ORIENTADA PELA DRA. ANA CAROLINA MIGLIORINI FIGUEIRA.

Orientadora: Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

In279i Indolfo, Nathalia de Carvalho, 1990-
Interações entre o receptor ativador da proliferação de peroxissomos gama (PPARg) e outras proteínas celulares / Nathalia de Carvalho Indolfo. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Ana Carolina Migliorini Figueira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Receptor nuclear. 2. PPAR. 3. Interactoma. I. Figueira, Ana Carolina Migliorini. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Interactions between the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARg) and other cellular proteins

Palavras-chave em inglês:

Nuclear receptor

PPAR

Interactome

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Ana Carolina Migliorini Figueira [Orientador]

Leonardo dos Reis Silveira

Amanda Bernardes

Data de defesa: 04-11-2016

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 4 de novembro de 2016.

Comissão Examinadora

Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira (Orientadora)

Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Dra. Amanda Bernardes Muniz

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedicatória:

À minha família, por todo o amor e apoio.
Pai, mãe e mana: nada disso seria possível sem ter
vocês sempre ao meu lado.

“Eu sou forte, poderosa e feliz!”

Vó Malú

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Ana Carolina Figueira, pela oportunidade, ensinamentos e por me apresentar aos receptores nucleares.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Jörg Kobarg, Dr. Leonardo dos Reis Silveira e Dra. Amanda Bernardes, por aceitarem o meu convite e pela contribuição na correção deste trabalho.

Às LECas que dividiram comigo todos os dias deste trabalho de mestrado. Muito obrigada por toda a ajuda e amizade sempre! Nunca me esquecerei de vocês: Jessie, Ju, Tablits, Nat, Linita, Mi, Bia, Scarlet e Helder (que aceitou ser uma leca).

Um agradecimento especial à Jéssica: muito obrigada por me ensinar e inspirar tanto, como cientista e como pessoa. Com você aprendi desde como cultivar células de mamíferos até como levar a vida de uma forma leve, apesar dos problemas que possam aparecer no caminho. Você nem imagina o quanto me ensinou nesses dois anos! Sou muito grata por ter sua amizade.

Agradecimento especial também à Tábata e a Natália, pela amizade e pelas consultorias astrológicas, capilares e de RH.

Aos colegas e amigos do LNBio que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste projeto. Em especial, às alunas do grupo PMT Krishina, Luciana, Larissa e Carolzinha, por toda a ajuda com a cultura de células de câncer de mama; e ao grupo MAS, pela ajuda com espectrometria de massas e *western blots*.

À CAPES pelo financiamento do projeto de mestrado e ao CNPEM e ao LNBio pelas instalações.

À minha família, por sempre me apoiar e incentivar a seguir em frente. Pai, mãe e Bia, obrigada por possibilitarem tudo isso e por serem a minha motivação para dar o meu melhor sempre. Sou eternamente grata por dividir a vida com vocês e amo vocês mais que tudo.

À família Carvalho e à família Indolfo por todo o amor.

Em especial, à memória dos meus avós paternos Mário e Ruth, que sempre me incentivaram a estudar tanto: sempre penso em vocês como parte fundamental das minhas conquistas e espero poder dar muito orgulho aos dois. Saudades.

À minha avó Malú, por todo o amor, carinho e conversas maravilhosas. Obrigada pelas minhas melhores lembranças da infância e por estar sempre ao meu lado.

À Tina, minha segunda mãe, um dos maiores exemplos de pessoa e caráter para mim.

Às minhas amigas Osmenina de Rio Preto por serem as irmãs que eu escolhi nessa vida, por todo o amor, amizade e cumplicidade, independente do tempo ou da distância.

Às minhas amigas Monize, Denise e Roberta, grandes amigas que a biotec me apresentou e que eu levo comigo de São Carlos para a vida.

Ao meu amor Victor, por todo o amor, carinho, amizade e incentivo. Obrigada por me mostrar que a vida ao seu lado é melhor ainda.

RESUMO

O receptor ativador da proliferação de peroxissomos gama (PPAR γ) é um membro da superfamília dos receptores nucleares, cuja atividade é regulada pela ligação direta de metabólitos lipídicos, xenobióticos, entre outros ligantes. Este receptor nuclear exerce múltiplas funções no metabolismo celular. Trata-se do maior regulador da adipogênese, estando também envolvido na sensibilização à insulina, o que o torna alvo para o tratamento de diabetes do tipo 2. O PPAR γ possui efeitos anti-inflamatórios e, além disso, está envolvido em processos biológicos intimamente relacionados ao câncer. Um melhor entendimento sobre alvos cuja regulação da transcrição é feita por este receptor e sobre suas ações não-genômicas tem sido uma necessidade para o mapeamento de vias que podem resultar em novos alvos para a regulação de diversas patologias. Para isso, neste trabalho foi realizada imunoprecipitação (IP) do PPAR γ , seguida de espectrometria de massas (LC-MS/MS) visando identificar parceiros de interação deste receptor e buscando diferenças nas condições tratada e não tratada com ligante. Foram montadas redes de interação nas quais foram evidenciados processos biológicos em que os parceiros identificados participam, sendo alguns deles ainda não muito estudados para o receptor. Além disso, observou-se que os parceiros de PPAR γ estão localizados em compartimentos celulares nunca antes descritos para este receptor nuclear. Foram analisadas as principais doenças nas quais os parceiros de PPAR γ estão envolvidos e as principais vias se mostraram relacionadas ao câncer de mama. Neste tipo de câncer, o receptor nuclear tem atividade controversa, atuando como supressor de tumor em determinadas condições e favorecendo o desenvolvimento tumoral em outras. Desta forma é necessário elucidar os mecanismos de ação do PPAR γ neste tipo de câncer, a fim de esclarecer suas funções no desenvolvimento e combate/progressão dessa patologia, o que pode resultar em novas estratégias de tratamento desta doença, além de identificar e caracterizar possíveis agonistas que sejam efetivos e seguros. Para isso, estudos de imunoprecipitação e proteômica também foram realizados em linhagens de câncer de mama, a fim de desvendar quais parceiros interagem com o PPAR γ nestas células, de quais vias eles participam e como os moduladores deste receptor podem afetar a regulação destas vias.

ABSTRACT

The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is a member of the nuclear receptors superfamily, which activity is regulated by direct ligation of lipid metabolites, xenobiotics and other ligands. This nuclear receptor plays many roles in the cellular metabolism. It is the main regulator of adipogenesis and is also involved in insulin sensitization, which makes it a target to treat type 2 diabetes. PPAR γ has anti-inflammatory effects, besides being involved in biological processes closely related to cancer. A better understanding about targets which regulation of transcription is done by this receptor and about its “non-genomic” actions has been a need to map pathways that can result in new targets to regulate much pathologies. Thus, in this project PPAR γ 's immunoprecipitation (IP) was performed, followed by mass spectrometry (LC-MS/MS) aiming to identify interaction partners of this receptor and looking for variations in the conditions treated or non-treated with ligand. Interaction networks were built and the biological processes of which the identified partners participate were evidenced, and some of them are not very studied for this receptor yet. Besides, it was observed that the partners of PPAR γ are localized in cell compartments never before described for this nuclear receptor. The main diseases in which the partners of PPAR γ are involved were analyzed and the main pathways are related to breast cancer. In this type of cancer, the nuclear receptor has controversial activity, acting as a tumor suppressor in some conditions and favoring tumor growth in others. So, it is necessary to elucidate the PPAR γ 's mechanisms of action in this kind of cancer in order to clarify its functions in the development and combat/progression of this pathology, which can result in new strategies of treatment for this disease, beyond identifying and characterizing possible effective and safety agonists. For this, immunoprecipitation and proteomics studies were also done in breast cancer cell lines intending to unveil which proteins interact with PPAR γ in these cells, of which pathways they participate and how the modulators of this receptor can affect the regulation of these pathways.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares.....	16
Figura 2. Esquema do funcionamento dos receptores nucleares representado pelo mecanismo de ação dos PPARs.....	21
Figura 3. Efeitos conhecidos da ativação de PPAR γ	23
Figura 4. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem 293T.....	58
Figura 5. Vetor lentiviral pLVIG.....	58
Figura 6. Comparação entre os níveis de expressão endógeno e após transfecção em 293T.	59
Figura 7. Três experimentos independentes de imunoprecipitação (IP) de FLAG-PPAR γ usando a resina anti-FLAG	61
Figura 8. Géis SDS-PAGE das eluições da triplicata das IPs.....	62
Figura 9. Número de parceiros encontrados nas condições sem e com ligante.....	64
Figura 10. Rede de interações da IP de parceiros de PPAR γ que apareceram em 2 ou mais experimentos agrupados por processos biológicos	73
Figura 11 Rede de interações da IP de parceiros de PPAR γ que apareceram em apenas um experimento da triplicata agrupados por processos biológicos.	74
Figura 12. Rede de interações da IP de parceiros de PPAR γ que apareceram em 2 ou mais experimentos agrupados por compartimento celular.	77
Figura 13. Rede de interações da IP de parceiros de PPAR γ que apareceram em apenas um dos experimentos agrupados por compartimento celular	78
Figura 14. MetaCore Pathway Maps para parceiros que apareceram em 2 ou 3 experimentos.....	82
Figura 15. MetaCore <i>Pathway Maps</i> para parceiros que apareceram em um único experimentos.....	83
Figura 16. MetaCore <i>Pathway Maps</i> . Via de apoptose relacionada a cascatas de sinalização Fas.....	85
Figura 17. MetaCore <i>Pathway Maps</i> . Via de apoptose relacionada à sinalização por TNF α	86
Figura 18. MetaCore <i>Pathway Maps</i> . Via de apoptose relacionada ao papel das proteínas IAPs.....	87
Figura 19. MetaCore <i>Pathway Maps</i> . Via de apoptose relacionada à cascata de sinalização das caspases.....	88
Figura 20. MetaCore – ‘Disease Biomarker Networks’ – Análise das 20 vias mais enriquecidas para parceiros que apareceram em 2 ou mais experimentos.	89
Figura 21. MetaCore – ‘Disease Biomarker Networks’ – Análise das 20 vias mais enriquecidas para parceiros que apareceram em apenas um experimento.....	90
Figura 22. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MCF7	94
Figura 23. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MCF10A	95
Figura 24. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MDA-MB-231	96
Figura 25. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MDA-MB-436.....	96
Figura 26. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MDA-MB-468.....	97
Figura 27. Tentativa de imunoprecipitação endógena de PPAR γ nas linhagens MCF10A e MDA-MB-436.....	98

Figura 28. Comparação entre os níveis de expressão endógeno e após transfecção em MCF7	99
Figura 29. Vetores utilizados na subclonagem para produção do vetor retroviral PPAR γ -pBABEpuro	100
Figura 30. Amplificação do inserto FLAG-PPAR γ	101
Figura 31. Digestão do clone PPAR γ -pGEM-T e do vetor retroviral pBABEpuro	101
Figura 32. Análise de restrição	102
Figura 33. PCR para confirmar a orientação correta do clone	102
Figura 34. Expressão permanente de FLAG-PPAR γ nas linhagens MCCF10A e MCF7 após transdução	104
Figura 35. Três experimentos independentes de imunoprecipitação (IP) de FLAG-PPAR γ usando a resina anti-FLAG nas linhagens MCF7 e MCF10A	105

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Receptores Nucleares	15
1.2. Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs)	19
1.3. PPAR γ	23
1.4. Câncer de mama	26
1.5. PPAR γ e câncer de mama	27
2. JUSTIFICATIVA	30
2.1. Interações entre o PPAR γ e outras proteínas celulares.....	31
2.2. Interações entre o PPAR γ e outras proteínas celulares em câncer de mama.....	31
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Cultura de células.....	35
4.1.1. Linhagem 293T (ATCC® CRL-3216™)	35
4.1.2. Linhagem MCF 10A (ATCC® CRL-10317™)	35
4.1.3. Linhagem MCF7 (ATCC® HTB-22™).....	36
4.1.4. Linhagem MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™).....	36
4.1.5. Linhagem MDA-MB-436 (ATCC® HTB-130™).....	36
4.1.6. Linhagem MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™).....	37
4.2. Verificação da expressão de PPAR γ endógeno em diferentes intervalos de tempo por <i>western blot</i>	37
4.3. Superexpressão de PPAR γ pelo método de transfecção	40
4.4. Subclonagem do gene do PPAR γ no vetor retroviral pBABE-puro.....	42
4.5. Transdução do vetor retroviral PPAR γ -pBABE nas linhagens celulares MCF7 e MCF10A e estabelecimento da linhagem permanente.....	44
4.6. Imunoprecipitação (IP)	45
4.7. Padronização de IP endógena em linhagens de câncer de mama.....	47
4.8. Espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	49
4.9. Análise dos dados de IP obtidos por LC-MS/MS	53
4.9.1. Plataforma IIS (Integrated Interactome System) – anotação dos dados e construção das redes..	53
4.9.2. Software Cytoscape – visualização e construção do interactoma.....	54

4.9.3. Software MetaCore – principais vias, processos biológicos e doenças ...	54
5. INTERAÇÕES ENTRE O PPAR γ E OUTRAS PROTEÍNAS CELULARES.....	55
5.1. Verificação da expressão endógena de PPAR γ em diferentes intervalos de tempo na linhagem 293T	57
5.2. Superexpressão de FLAG-PPAR γ em 293T	58
5.3. Imunoprecipitação (IP) de PPAR γ em 293T.....	60
5.4. Análise dos dados de IP em 293T	65
5.4.1. Descrição de alguns alvos encontrados	65
5.4.2. IIS e Cytoscape – Construção do interactoma.....	72
5.4.3. MetaCore (Thomson Reuters®).....	82
5.4.4. Análise de ‘ <i>Disease Biomarker Networks</i> ’ – MetaCore	88
6. INTERAÇÕES ENTRE PPAR E OUTRAS PROTEÍNAS CELULARES EM CÂNCER DE MAMA.....	93
6.1. Verificação da expressão endógena de PPAR γ em diferentes intervalos de tempo nas linhagens, MCF7, MCF10A, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MDA-MB-468 por <i>western blot</i> ...	94
6.2. Tentativa de imunoprecipitação endógena de PPAR γ em linhagens de câncer de mama.....	97
6.3. Superexpressão de PPAR γ por transfecção e verificação por <i>western blot</i>	99
6.4. Subclonagem do gene do PPAR γ no vetor retroviral pBABE-puro	100
6.5. Transdução do vetor retroviral PPAR γ -pBABE nas linhagens celulares MCF10A e MCF7 e estabelecimento de linhagens de expressão estável	103
6.6. Imunoprecipitação em MCF7 e MCF10A	104
7. Conclusão e Perspectivas	106
8. Referências Bibliográficas	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Receptores Nucleares

Para garantir o equilíbrio e a execução correta de diversas funções por diferentes células em um organismo multicelular é necessário um sistema de comunicação inter e intracelularmente organizado. Esse sistema é responsável pela organização de diversos processos como embriogênese e manutenção de propriedades e funções fisiológicas, constituindo uma complexa rede de sinalização celular existente nos metazoários. Os sinais, representados por diversas moléculas como proteínas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, retinóides, derivados de ácidos graxos e gases, ligam-se a macromoléculas específicas, conhecidas como receptores, as quais desencadeiam eventos de resposta. Essa sinalização abrange desde a detecção dos sinais enviados às moléculas receptoras até a conversão, processo também denominado transdução, destes sinais em respostas moleculares, uma propriedade universal das células vivas (LAUDET; GRONEMEYER, 2002).

Dentre estes receptores encontra-se a superfamília dos receptores nucleares (RNs), que são fatores de transcrição ativados por ligantes que regulam processos celulares importantes como desenvolvimento, diferenciação celular, reprodução e metabolismo de lipídios. Como sensores de hormônios lipofílicos, vitaminas, lipídios provenientes da dieta e outros sinais, os RNs atuam no núcleo para iniciar a resposta celular (SHERMAN et al., 2012). Os membros desta superfamília são alguns dos reguladores da expressão gênica mais abundantes em eucariotos e sua desregulação tem sido estudada em diferentes patologias, incluindo obesidade, diabetes, aterosclerose e câncer (LEHRKE; LAZAR, 2005). Estão descritos atualmente 65 receptores nucleares em todo o reino animal, desde os nematódeos até o homem, que constituem uma superfamília de fatores de transcrição com uma estrutura molecular em comum, composta de 5 a 6 domínios bem conservados e responsáveis por funções específicas (Figura 1) (RIGGINS et al., 2010)



Figura 1. Ilustração esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. As regiões mais bem conservadas, domínio de ligação ao DNA (DBD ou *DNA-Binding Domain*) e domínio de ligação ao ligante (LBD ou *Ligand-Binding Domain*), estão representadas pelos retângulos maiores, rosa e verde respectivamente. Já as regiões divergentes estão representadas pelos retângulos menores, região N-terminal em azul e região *hinge*, onde se encontra a sequência de localização nuclear (NLS), em roxo. AF 1 e 2 representam os domínios de ativação da transcrição (*Transcription Activation Function*, AF).

Na região amino-terminal, o domínio AF1 (*Activation Function-1*), responsável pela ativação basal da transcrição, auxilia na regulação da atividade transcrricional independente de ligantes e é o domínio que possui maior divergência sequencial entre os RNs, apresentando diferenças até mesmo entre isoformas de um mesmo receptor (ARANDA et al., 2001; KUMAR; LITWACK, 2009). Este possui um dos sítios de ligação de corretores, que incluem proteínas coativadoras e corepressoras, e recebe importantes modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação e sumoilação (CHENG et al., 2007; GARZA et al., 2010; RIGGINS et al., 2010; TAMASI et al., 2009).

O domínio de ligação ao DNA ou DBD (*DNA Binding Domain*) tem como principal função o reconhecimento e interação com sequências específicas de DNA (ARANDA et al., 2001). Este domínio contém dois motivos *zinc fingers* (dedos de zinco) ricos em cisteína, que permitem a ligação do receptor ao DNA nestas sequências específicas. Esta região também é importante na mediação de homo e heterodimerização de receptores nucleares (HELSEN; CLAESSENS, 2014).

Após o DBD encontra-se a região *hinge* (dobradiça), uma região que une o DBD ao domínio de ligação ao ligante ou LBD (*Ligand Binding Domain*), permitindo uma maior mobilidade entre esses domínios (ARANDA et al., 2001). Além disso, esta região contém a sequência de localização nuclear (NLS), que direciona o

receptor para o núcleo da célula, e é também um sítio-chave para modificações pós-traducionais (ASCHRAFI et al., 2006; CARRIGAN et al., 2007; HWANG et al., 2009; RIGGINS et al., 2010).

O domínio de ligação ao ligante (LBD) apresenta diversas funções distintas que vão além da interação com os ligantes. As regiões de interação com corre reguladores e interfaces de dimerização estão contidas neste domínio (CHANDRA et al., 2009; RIGGINS et al., 2010). Embora não seja o domínio mais conservado entre as diversas proteínas da família dos RNs, o LBD possui uma estrutura básica formada por 12 hélices (numeradas de H1 a H12), sendo que no C-terminal da H12 está localizada a função de ativação 2 (AF-2), responsável pela transcrição de genes de forma dependente de ligante. Trata-se do domínio mais estudado por ser o alvo direto para a modulação de ligantes (LAUDET; GRONEMEYER, 2002).

Além de sua similaridade estrutural, os receptores nucleares também agem por um mecanismo de ação similar. Em seu mecanismo de ação clássico, estes receptores podem atuar como homodímeros ou heterodímeros com outros receptores nucleares e estes complexos interagem com o DNA em sequências específicas, conhecidas como elementos responsivos, localizadas em regiões não-codificantes de genes alvo. Os elementos responsivos são normalmente formados por repetições de dois meio-sítios que contém variações da sequência AGGTCA em diversas orientações, como palíndromos e repetições diretas. Além disso, o espaçamento e as regiões flanqueadoras podem variar assegurando a especificidade aos RNs (GLASS, 1994).

A atividade transcricional é regulada pela disponibilidade de ligantes e por interações com corre reguladores, que são recrutados aos complexos transcricionais e assim modulam a expressão gênica (CONZEN, 2008). Na ausência de ligantes, os receptores nucleares ligam-se aos elementos responsivos e se associam à correpressores que impedem a transcrição dos genes-alvo. Já quando o ligante alcança a célula alvo e se liga aos RNs no núcleo, ocorre uma alteração conformacional que libera estes correpressores do complexo e recruta coativadores, que por sua vez recrutam a maquinaria de transcrição promovendo a transcrição dos genes-alvo (AAGAARD et al., 2011; PERISSI et al., 2004).

Estudos indicam migração dos receptores nucleares entre núcleo e citoplasma e participação destes em processos em ambos os compartimentos, ilustrando as chamadas ações genômicas e não-genômicas, respectivamente (BOSSCHER, DE et al., 2006). Os RNs podem interagir com outros fatores de transcrição, bloqueando ou ativando a produção de diversas proteínas, atuando em diversas rotas de sinalização celular. Neste caso chamamos a regulação de indireta e os RNs agem nos mecanismos de transrepressão e transativação, quando reprimem ou ativam a expressão de genes regulados por outros fatores de transcrição. Isso pode ocorrer através da competição por correguladores ou pela ligação direta dos RNs com os outros fatores de transcrição (CUNARD et al., 2004; GERVOIS et al., 2001).

Exemplos de interação entre receptores e outras proteínas podem ser ilustrados pela interação entre o receptor de glicocorticoide (GR), o receptor de estrógeno (ER), o receptor de hormônios tireoidianos (TR) e a proteína ativadora 1 (AP-1) (BOSSCHER, DE et al., 2001; CAELLES et al., 1997; OGAWA et al., 2005; ZHOU et al., 1999), pela interação entre receptor de retinóides (RAR) e a proteína GATA-1 (TSUZUKI et al., 2004) e pela interação entre outros RNs e a proteína supressora de tumor p53 (MOLL et al., 2006).

Nestes casos, as ações dessas proteínas podem ir além de somente causar mudanças na expressão de genes de forma indireta, visto que muitas vezes não se vê nenhuma mudança na expressão gênica. Estes efeitos são chamados de não-genômicos e são caracterizados por abertura/fechamento de canais iônicos, função quinase, fosfatase ou outras funções enzimáticas em vias de sinalização em geral que podem, ou não, resultar na transcrição de genes (ORDÓÑEZ-MORÁN; MUÑOZ, 2009).

Qualquer via alterada nestes processos pode ser responsável pelo desenvolvimento de condições patológicas como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer. Estes mecanismos de transativação e transrepressão também têm sido altamente procurados para o desenvolvimento de fármacos, na busca por moléculas que possam ativar ou inativar receptores nucleares em regulações específicas. O melhor entendimento sobre esses complexos menos

comuns entre RNs e outras proteínas poderia levar a proposição de modelos novos e mais específicos no controle de diversas patologias (GRONEMEYER et al., 2004).

A classificação dos RNs é feita de acordo com a homologia encontrada entre os membros da família, isto é, pelos domínios mais conservados, DBD e LBD. Foi proposto que os RNs evoluíram de um receptor órfão ancestral sem ligante conhecido, por uma diversificação precoce, o qual adquiriu a ligação ao ligante posteriormente. Esse conceito é bem aceito juntamente com a hipótese de que alguns receptores órfãos funcionam exclusivamente como repressores constitutivos ou ativadores de transcrição (LAUDET; GRONEMEYER, 2002; RIGGINS et al., 2010). Dentre os membros da superfamília dos receptores nucleares estão as subfamílias dos receptores dos hormônios tireoidianos (TRs), dos receptores do ácido retinóico, (RARs), dos receptores de retinóide X (RXRs), dos receptores da vitamina D (VDRs), dos receptores de estrógeno (ERs), dos receptores de progesterona (PRs), dos receptores de andrógenos (ARs), dos receptores de ativação da proliferação de peroxissomos (PPARs), entre outros (CONZEN, 2008).

1.2. Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs)

Os PPARs são fatores de transcrição ativados por ligantes e membros da superfamília dos receptores nucleares (MANGELSDORF et al., 1995). Estas proteínas são conhecidas como sensores genéticos de lipídios. O primeiro subtipo, identificado nos anos 1990 por meio da clonagem de um receptor órfão murino, foi chamado de receptor ativador da proliferação de peroxissomos α por sua habilidade de ligação a compostos, como os fibratos, capazes de induzir a proliferação de peroxissomos em roedores (ISSEMAN; GREEN, 1990).

Foram identificados três isotipos de PPAR: PPAR α , PPAR β (também conhecido como PPAR δ) e PPAR γ , os quais possuem um alto grau de conservação em suas sequências, mas são codificados por genes diferentes (TONTONZO; SPIEGELMAN, 2008). O DBD dos três isotipos exibe um grau de identidade de 80%, enquanto seus LBDs são aproximadamente 65% idênticos. Devido a essa divergência em seus LBDs, diferentes isotipos de PPAR são ativados por diferentes

compostos, levando a atividades biológicas específicas inerentes a cada isotipo (WAHLI, 2014; WILLSON et al., 2000). Além de se ligarem a diferentes moléculas, os três isotipos de PPARs estão distribuídos em tecidos distintos e possuem diferenças intrínsecas em suas propriedades bioquímicas, o que também resulta em funções *in vivo* únicas para cada PPAR (BARISH et al., 2006; EVANS et al., 2004; POULSEN et al., 2012). A expressão dos PPARs em vários tecidos ocorre de maneira e tempo diferenciados em resposta à alimentação, ao exercício e ao frio, por exemplo (PETERS et al., 2012; TACHIBANA et al., 2008).

Em seu mecanismo de ação mais comum (Figura 2), os PPARs atuam como heterodímeros com o RXR e se ligam ao DNA de maneira sequência-específica. O elemento responsivo ao PPAR (PPRE) é uma repetição direta da sequência AGGTCA separado por um par de bases (DR-1) (BATISTA et al., 2012; EVANS et al 1992; ROSEN; SPIEGELMAN, 2001)

Na ausência de ligantes, o heterodímero recruta correpressores inibindo a transcrição dos genes-alvo. Alien, N-CoR e SMRT são exemplos de correpressores que contêm o motivo de ligação a RNs (LXXILXXLL, onde L é uma leucina e X um aminoácido qualquer) conservado, sendo responsável por ligar-se à região hidrofóbica formada pelas hélices 3, 4 e 5 destes receptores. Além disso, os correpressores apresentam-se complexados com histonas deacetilases (HDACs) que condensam a cromatina nas regiões próximas aos promotores onde se ligam os RNs, impedindo a maquinaria transcricional de ser ativada (FATTORI et al., 2015; SANTOS et al., 2011). Já na presença do ligante agonista, o complexo PPAR-RXR sofre mudanças conformacionais que induzem a dissociação dos correpressores e o recrutamento dos coativadores (AMATO et al., 2012). A principal mudança observada é o fechamento da hélice 12 (H12) sobre o cerne hidrofóbico de H3, H4 e H5, formando a região AF-2. A família p160 (GRIP-1, TRBP-1 e SRC-1) e PGC-1 são exemplos de coativadores (OBERKOFER et al., 2002; XU; LI, 2003). Os coativadores também formam complexos com outras proteínas como as histonas acetil-transferases (HATs), que através do relaxamento e modificação da cromatina próxima à região promotora, recrutam outras moléculas estabilizadoras para o local que, por sua vez, estabilizam a ligação da RNA polimerase II (SANTOS et al., 2011; WEBB et al., 2002). Os PPARs também são capazes de se ligarem ao DNA como

monômeros, cuja propriedade é atribuída à região N-terminal e, neste caso, são capazes de influenciar indiretamente e de forma negativa, a expressão gênica através da competição com outros fatores de transcrição (CUNARD et al., 2004; GERVOIS et al., 2001).

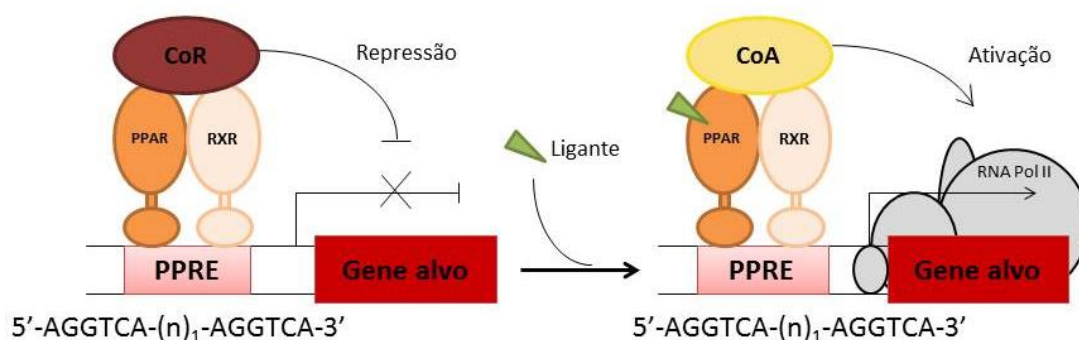


Figura 2. Esquema do funcionamento dos receptores nucleares representado pelo mecanismo de ação dos PPARs. Na ausência de ligantes o heterodímero complexado aos elementos responsivos recruta proteínas corressoras, as quais reprimem a transcrição (esquerda). A presença do ligante promove mudanças estruturais nos receptores que se desligam dos corressores e recrutam coativadores. Estes associados a um complexo protéico promovem a acetilação das histonas, ativando a maquinaria de transcrição com a chegada da RNA polimerase II (direita).

Dentre os principais ligantes dos PPARs estão diversos metabólitos lipídicos, incluindo prostaglandina J2 e fosfolípidios oxidados; derivados do metabolismo de ácidos graxos e outros compostos encontrados na dieta, como ácidos oleico e linoleico, fato coerente com sua forma de regulação, uma vez que podem afetar a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose e lipídeos. Por meio deste mecanismo, a homeostase celular é mantida durante períodos de alimentação e fome (AHMADIAN et al., 2013; ROLE et al., 2013). Drogas e outros xenobióticos também podem modular diferentemente as atividades regulatórias de PPARs. As regiões regulatórias (elementos responsivos) reconhecidas pelos PPARs no DNA (PPREs) são encontradas próximas a genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e regulação da energia, incluindo armazenamento lipídico ou catabolismo, transporte, captação e ligação intracelular de ácidos graxos. Além disso, estes RNs estão relacionados a processos inflamatórios, cicatrização, reprodução, desenvolvimento embrionário, diferenciação e proliferação celular (PETERS et al., 2012).

O PPAR α é expresso principalmente no fígado, onde ativa o catabolismo de ácidos graxos. Seus ativadores são utilizados no tratamento de dislipidemia, uma vez que são capazes de causar uma redução nos níveis de triglicerídeos no plasma e uma elevação no colesterol do tipo lipoproteína de alta densidade (HDL) (EVANS et al., 2004; FRUCHART, 2001; STAELS; DALLONGEVILLE; et al., 1998). Este isotipo também é expresso em outros tecidos metabolicamente ativos como rins, coração, intestino e músculo, sendo responsável por ativar o catabolismo de ácidos graxos e estando envolvido no controle da montagem de lipoproteínas (MANDARD et al., 2004). O PPAR α também está presente em monócitos (CHINETTI, G et al., 1998), células endoteliais (INOUE et al., 1998) e células musculares lisas (STAELS; KOENIG; et al., 1998) e trata-se de um importante sensor lipídico e regulador do metabolismo energético celular (BERGER; MOLLER, 2002). Quanto ao câncer, o PPAR α está envolvido no câncer de fígado por aumentar a proliferação hepatocelular e inibir apoptose (TACHIBANA et al., 2008).

Já o isotipo β/δ é expresso ubiquamente e em altos níveis em órgãos como cérebro, tecido adiposo e pele, estando envolvido na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de queratinócitos, cicatrização e resposta de macrófagos à lipoproteína de baixa densidade (BERGER; MOLLER, 2002; CHAWLA et al., 2003; DRESSEL et al., 2003; TANAKA et al., 2003). Devido à alta expressão no cérebro e no sistema nervoso central como um todo, o PPAR β está relacionado à diferenciação das células neste sistema (BRAISSANT; WAHLI, 1998), além de estar envolvido em funções emocionais, circadianas e autônomas (QUIGG et al., 1999). Embora menos criticamente, o PPAR β também está envolvido nos processos de dislipidemia e resistência à insulina (BARISH et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2006). Este isotipo tem ação controversa na oncogênese, atuando, por exemplo, no câncer de cólon, induzindo a proliferação de células do cólon por meio da inibição da apoptose e promoção da angiogênese, aumentando a expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Por outro lado, este receptor nuclear foi apontado como um indutor de diferenciação e inibidor de crescimento celular, fatores também estudados em câncer de fígado e mama (TACHIBANA et al., 2008).

O PPAR γ , proteína-alvo do presente trabalho, será descrito com maiores detalhes a seguir.

1.3. PPAR γ

O PPAR γ possui duas isoformas principais: PPAR γ 1 e PPAR γ 2, que contém 28 aminoácidos adicionais na região N-terminal. Existe ainda uma terceira isoforma, PPAR γ 3, que é uma variante de *splicing* da isoforma PPAR γ 1. (FAJAS et al., 1997, 1998; TONTONZOZ, PETER; HU; GRAVES; et al., 1994). O PPAR γ 2 é expresso no tecido adiposo e tem função importante na diferenciação de adipócitos, no armazenamento de lipídeos no tecido adiposo branco e na dissipação de energia no tecido adiposo marrom (TONTONZOZ, PETER; HU; SPIEGELMAN, 1994). Já o PPAR γ 1 é expresso no cólon, nas células do sistema imune, como monócitos e macrófagos, células do pâncreas, do músculo esquelético, do fígado, das mamas, da próstata, do rim, além de outros tecidos, participando de diversos processos de grande importância (Figura 3) (LEHRKE; LAZAR, 2005; TACHIBANA et al., 2008).

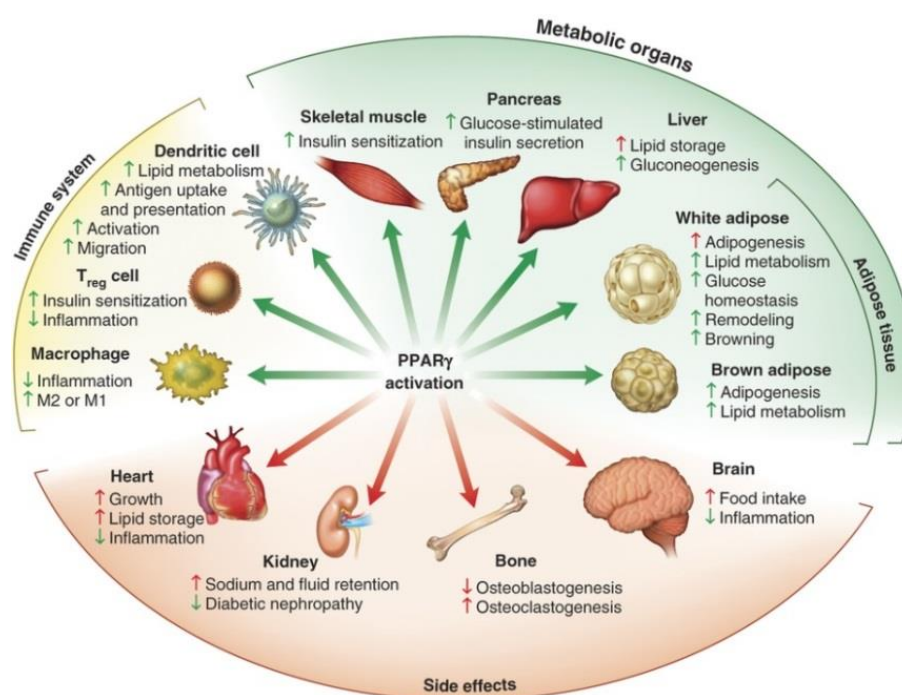


Figura 3. Efeitos conhecidos da ativação de PPAR γ . A ativação do receptor pode resultar em efeitos benéficos (setas verdes) e efeitos adversos (setas vermelhas) (AHMADIAN et al., 2013).

Dentre suas principais funções, o PPAR γ controla a expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo e na inflamação (DESVERGNE; WAHLI, 2011; HONG; TONTONZOZ, 2008). O PPAR γ participa do processo de inflamação,

regulando os processos de inibição e ativação da produção das citocinas inflamatórias interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral (TNF α) em monócitos e macrófagos. A ativação deste receptor nuclear inibe a ação do TNF α , indicando que agonistas do PPAR γ podem ter propriedades anti-inflamatórias. A própria diferenciação de monócitos em macrófagos é regulada por este receptor e, portanto, estas células estão relacionadas aos níveis de PPAR γ (CHINETTI, G. et al., 1998). A rosiglitazona é capaz de induzir apoptose de macrófagos *in vitro*, alterando a sinalização por NF κ B (CHINETTI, G et al., 1998) e bloqueando a síntese de citocinas inflamatórias inibindo a ativação da via de NF κ B (SU et al., 1999). Este receptor também atua na produção de lipoproteína de baixa densidade que está envolvida na formação de células espumosas (*foam cells*) pelos macrófagos, induzindo à resposta inflamatória (TACHIBANA et al., 2008).

Adicionalmente, este receptor está envolvido no metabolismo de glicose por meio do aumento da sensibilidade à insulina e no recrutamento de lipídeos para o interior celular, representando assim um alvo terapêutico para diabetes do tipo 2. O papel do PPAR γ na diferenciação de adipócitos é crucial, uma vez que a presença deste receptor é necessária e suficiente para execução deste processo. A primeira interação entre o PPAR γ e genes relacionados à diferenciação de adipócitos foi encontrada diretamente com o elemento *cis* que regula a expressão adipócito-específica da proteína ligante de ácidos graxos aP2 (TONTONOZ, P et al., 1994). *In vitro*, fibroblastos que expressam PPAR γ e são tratados com ligantes deste receptor se diferenciam em adipócitos e mutantes dominantes-negativos do PPAR γ expressos em células 3T3-L1 inibem a diferenciação destas células em adipócitos (MASUGI et al., 1999; ROSEN et al., 1999). Já em estudos *in vivo*, camundongos que não expressam PPAR γ mostraram uma redução na quantidade de tecido adiposo (BARAK et al., 1999; KUBOTA et al., 1999; ROSEN et al., 1999), além de exibirem lipodistrofia aumentada (BARAK et al., 1999). PPREs são encontrados em regiões regulatórias de diversos genes relacionados ao metabolismo de lipídios em adipócitos e o PPAR γ modula a expressão destes genes, incluindo aP2, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (TONTONOZ et al., 1995), acyl-CoA sintase (SCHOONJANS et al., 1995) e lipoproteína lipase (LPL) (SCHOONJANS et al., 1996). O PPAR γ também está envolvido na regulação da expressão de

proteínas relacionadas à absorção de lipídios por adipócitos, como proteína transportadora de ácidos graxos 1 (FATP-1) e CD36 (BERGER; MOLLER, 2002; LEHMANN et al., 1995; SFEIR et al., 1997).

Como mencionado, o PPAR γ participa do metabolismo de glicose aumentando a sensibilidade à insulina, sendo considerado um alvo terapêutico para diabetes tipo 2. De fato, as tiazolidinedionas (TZD) são ligantes de PPAR γ e drogas sensibilizadoras à insulina que foram disponibilizadas comercialmente. No entanto, algumas delas, como a rosiglitazona, vêm demonstrando alguns efeitos colaterais e foram retiradas do mercado, sendo receitadas apenas em determinados casos (CHOI et al., 2011; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010). Este receptor nuclear tem sido associado com genes que afetam a ação da insulina, como, por exemplo, o já descrito TNF α , uma citocina pró-inflamatória expressa em adipócitos que é associada à resistência à insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1993) e redução da via de transdução de sinal da insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1994).

Agonistas de PPAR γ são capazes de suprimir as ações do TNF α em adipócitos *in vitro* (PERALDI et al., 1997) e também no tecido adiposo de camundongos obesos, uma vez que suprimem a resistência à insulina causada por esta citocina (MILES et al., 1997). Em adipócitos, o PPAR γ aumenta a expressão de Cbl, um proto-oncogene que gera c-CBL, que, por sua vez, se trata de uma proteína ubiquitina ligase E3 (RIBON et al., 1998). Esta proteína parece desempenhar um papel positivo na sinalização por insulina e contém uma sequência PPRE na região regulatória 5' de seu gene (BAUMANN et al., 2000). Além disso, agonistas de PPAR γ também estão relacionados ao aumento da expressão de IRS-2, uma proteína envolvida na transdução de sinal da insulina em tecidos sensíveis a essa molécula quando adicionada ao tecido adiposo humano e adipócitos em cultura (BERGER; MOLLER, 2002; SMITH et al., 2001).

Camundongos diabéticos tratados com agonistas de PPAR γ mostraram níveis baixos de mRNA da proteína adiponectina (Acrp30), porém níveis plasmáticos aumentados da desta proteína (COMBS et al., 2002). A Acrp30 é uma proteína secretada adipócito-específica que tem efeitos *in vivo* como diminuição de glicose, triglicérides e ácidos graxos (BERG et al., 2001; FRUEBIS et al., 2001). Estudos que

compararam humanos normais com pacientes com diabetes tipo 2 mostraram que os últimos possuem níveis reduzidos de Acrp30 (HOTTA et al., 2000) e o tratamento deste pacientes com ligantes de PPAR γ levou ao aumento dos níveis plasmáticos desta proteína (COMBS et al., 2002), indicando que a modulação de Acrp30 por agonistas de PPAR γ pode ser um mecanismo importante para tratamento de síndrome metabólica.

Desta forma, o PPAR γ é alvo molecular para o desenvolvimento de drogas para tratar inflamação, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. No entanto, por também atuar na regulação do ciclo celular, possui função importante na regulação do crescimento de células em câncer. O PPAR γ atua em diversos tecidos neoplásicos, como em tumores de cólon, mama, esôfago, estômago, fígado, próstata, pâncreas, entre outros, e sua ativação pode levar à inibição da proliferação celular ou inibição de apoptose. Por outro lado, alguns estudos indicam que ligantes de PPAR γ , como a troglitazona e a rosiglitazona, aumentam a frequência e o tamanho dos tumores, fato que ocorre em câncer de cólon, por exemplo (TACHIBANA et al., 2008).

1.4. Câncer de mama

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo, contabilizando 13% das mortes em 2008, sendo os cinco principais tipos de câncer responsáveis por estas mortes os cânceres de pulmão, de estômago, de fígado, de cólon e de mama (WHO, 2014). O câncer de mama, particularmente, conta com 1.152.161 novos casos por ano e é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, sendo o mais frequente em mulheres e responsável por 411.093 mortes anualmente. Dados mostram ainda que aproximadamente uma em cada oito mulheres serão diagnosticadas com esta doença durante sua vida (KOEFFLER, 2003; SIEGEL et al., 2014). Dentre todos os bem estabelecidos fatores de risco reprodutivos, como menarca precoce, primeira gravidez em idade avançada, exposição a hormônios, baixa paridade e menopausa tardia, o principal é o envelhecimento. As taxas de câncer de mama feminino crescem rapidamente até 50 anos de idade e, depois desta idade, diminuem vagarosamente, principalmente devido à menopausa (KAMANGAR et al., 2006).

Dados moleculares sugerem dois tipos de câncer de mama tendo como determinantes a idade e a expressão do receptor de estrógeno (ER), um receptor nuclear. O primeiro tipo é o ER-negativo, que ocorre em mulheres antes da menopausa e o segundo, ER-positivo, ocorre em mulheres após a menopausa (PEROU et al., 2000). Nos subtipos morfológicos de câncer de mama a expressão de ER também varia. Por exemplo, em carcinomas de mama medulares é comum se encontrar células ER-negativas; enquanto em carcinomas tubulares e lobulares o ER é expresso normalmente (KAMANGAR et al., 2006; PUTTI et al., 2005).

Há outras classificações possíveis para tumores de mama e um dos subtipos encontrados dentre estas classificações é o câncer de mama triplo-negativo (TNBC), um tipo de câncer de mama muito estudado que é definido pela ausência de expressão dos receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) e da amplificação do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2/ERBB2). Assim, em comparação com os outros subtipos de câncer de mama, o TNBC não responde a terapias endócrinas ou anti-ERBB2. Nestes casos, a quimioterapia sistêmica é o principal tratamento para estes pacientes após metástase (LI et al., 2014).

1.5. PPAR γ e câncer de mama

A presença do PPAR γ em câncer de mama e como sua ativação por ligantes específicos poderiam ser utilizadas no tratamento desta condição foram descritas no final da década de 1990 (KILGORE et al., 1997). Foi demonstrado que a ativação do PPAR γ resulta em apoptose, parada do ciclo celular ou diferenciação para tipos celulares menos malignos (MUELLER et al., 1998; YIN et al., 2005). Mais tarde, outros estudos mostraram um *crossstalk* entre ER e PPAR γ em dois tipos de células de carcinoma mamário e como elas respondiam aos ligantes de PPAR γ quando ER estava presente ou não. Os resultados apontaram que a presença de ER diminui tanto a transcrição basal, como a ativação por ligante do PPAR γ em câncer de mama (WANG; KILGORE, 2002).

O PPAR γ é o isotipo de PPAR mais expresso neste tipo de câncer. Como citado acima, ele tem papel importante na regulação do crescimento celular, diferenciação e metabolismo de lipídeos (BOCCA et al., 2008). A obesidade, uma condição profundamente associada com metabolismo de lipídeos, está conectada ao

câncer de mama e o PPAR γ está envolvido nesta conexão (CARMICHAEL; BATES, 2004; PICHARD et al., 2008).

Uma das características mais importantes de células de câncer é o fato das mesmas serem autossuficientes em sinais de crescimento, o que as fazem proliferar sem necessidade de estímulo externo. Receptores destes sinais, como os ErbBs, iniciam a transdução de sinal de vias que promovem proliferação e suprimem apoptose. O PPAR γ inibe a atividade de ErbBs (HER2 e HER3) em células de câncer de mama quando ativado por um ligante natural (15-deoxi-delta12,14-prostaglandina J2 ou 5dPGJ2) por meio do bloqueio da fosforilação destes receptores e, conseqüentemente, de seus efeitos sobre proliferação, diferenciação e morte celular (PIGNATELLI et al., 2001).

Controversamente, outro estudo aponta o PPAR γ como responsável por manter células-tronco de câncer de mama HER-2 positivas, atuando como um promotor de tumor. A presença do oncogene ERBB2 é uma das mudanças genéticas mais relevantes clinicamente, ocorrendo em 30% dos casos e sendo associada com recorrência da doença e mal prognóstico (WANG et al., 2013).

Ligantes de PPAR γ inibem o crescimento celular de diversas linhagens celulares de câncer de mama e também o desenvolvimento de tumores da glândula mamária por meio de várias vias (CLAY et al., 1999; ELSTNER et al., 1998; MEHTA et al., 2000; MUELLER et al., 1998; SUH et al., 1999; YIN et al., 2001). Alguns destes ligantes, como troglitazona e indometacina, inibem a proliferação de linhagens celulares de câncer de mama, como MCF7, MDA-MB-231, BT474 e T47D (ELSTNER et al., 1998). A troglitazona inibe o crescimento de tumores em camundongos (ELSTNER et al., 1998) e tanto ela como o 5dPGJ2 atenuam a proliferação celular de MDA-MB-231, bloqueando a progressão do ciclo celular e induzindo apoptose. Além disso, foi mostrado que o pré-tratamento de células desta linhagem com 5dPGJ2 atenua a capacidade destas células de induzir tumores em camundongos (CLAY et al., 1999). Quando a linhagem MCF7 é tratada com troglitazona, a expressão de vários reguladores da proteína retinoblastoma (pRb), um produto de um gene supressor de tumor cuja fosforilação induz progressão do ciclo celular, diminui. Portanto, a troglitazona induz à parada do ciclo celular em G1 pela atenuação da fosforilação de pRb, resultando na inibição da proliferação celular

(YIN et al., 2001). Esse mesmo ligante também previne a indução de lesões pré-neoplásicas por 7,12-dimetilbenzantraceno em modelo de cultura de glândula mamária de camundongo (MEHTA et al., 2000).

Outro ligante sintético do PPAR γ , GW7845, previne carcinogênese mamária em camundongos tratados com o carcinógeno nitrosometilurea (SUH et al., 1999). O antagonista seletivo GW9662 tem efeitos antiproliferativos em linhagens celulares ER positivas e negativas, e também em células que não expressam p53. Além disso, seus efeitos são melhores que o da rosiglitazona, agonista de PPAR γ mais famoso (BURTON et al., 2008). Muitos outros estudos associam a presença deste receptor nuclear e a ativação por seus ligantes com efeitos antiproliferativos e apoptóticos em linhagens de câncer de mama (YIN et al., 2005). Desta forma, os ligantes de PPAR γ poderiam suprimir a tumorigênese e serem utilizados como drogas antineoplásicas (TACHIBANA et al., 2008).

No entanto, resultados controversos foram obtidos em uma tentativa de validar a contribuição deste receptor nuclear em câncer de mama. Neste estudo, camundongos transgênicos foram gerados expressando PPAR γ constitutivamente na glândula mamária. Estes animais mostravam desenvolvimento normal da glândula mamária e nenhuma tendência aumentada de desenvolver tumores. Para verificar a influência deste aumento de sinalização por PPAR γ em neoplasias da glândula mamária, estes camundongos foram cruzados com outros que expressavam o antígeno MT (*Middle T*) de polioma vírus nas glândulas mamárias, o que gera desenvolvimento tumoral mais rápido e garante maior propensão ao câncer de mama. A prole, que expressava tanto níveis aumentados de PPAR γ como o antígeno MT de polioma vírus, demonstrou um desenvolvimento acelerado de tumores mamários, fato não intuitivo. A base molecular deste efeito promotor de tumor pode ser um aumento na sinalização da via de Wnt, uma vez que a ativação de PPAR γ potencia a função de Wnt em modelo *in vivo*. Desta forma, embora a ativação aumentada de PPAR γ não leve à formação de tumor em tecido mamário normal, este estudo sugere que, uma vez que um evento promotor de tumor seja estabelecido, a sinalização por PPAR γ pode atuar como promotora de tumor nas glândulas mamárias (SAEZ et al., 2004), ilustrando o papel controverso deste receptor nuclear em câncer de mama (TACHIBANA et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

2.1. Interações entre o PPAR γ e outras proteínas celulares

A principal forma de atuação dos RNs ocorre pela regulação direta sobre a transcrição de genes-alvo. No entanto, estudos sobre ações indiretas tem se tornado um foco crucial no campo desses receptores. O melhor entendimento sobre a regulação da transcrição de forma não direta tem se tornado um novo desafio na tentativa de se mapear comportamentos diferenciais, que poderiam resultar em novos alvos para a regulação de diversas patologias, por exemplo. Desta forma, sabendo-se quais complexos proteicos serão formados na regulação da transcrição de um gene, esta poderia ser manipulada apenas pelo impedimento da formação deste complexo. Com isso, muitos dos efeitos indesejáveis advindos de uma regulação comum, poderiam ser evitados. Desta forma, a busca por interações não usuais entre o receptor nuclear PPAR γ e outras proteínas celulares é de extrema importância visto que este está envolvido em patologias como síndrome metabólica e câncer, justificando assim a primeira parte deste trabalho.

2.2. Interações entre o PPAR γ e outras proteínas celulares em câncer de mama

No interactoma de PPAR γ em 293T observou-se que grande parte dos parceiros deste receptor estão envolvidos em câncer de mama, o tipo de câncer mais frequente em mulheres. Linhagens celulares de câncer de mama expressam PPAR γ e estudos indicam que estas podem ser induzidas à parada no crescimento e à diferenciação quando tratadas com ligantes deste receptor, indicando assim uma possível utilidade destes na definição de tratamentos adjuvantes e quimioterápicos. No entanto, outros estudos indicam que uma vez iniciado o desenvolvimento do câncer de mama, o aumento da sinalização por PPAR γ serve como um promotor de tumor na glândula mamária, ilustrando assim o papel controverso deste receptor nuclear neste tipo de câncer (TACHIBANA et al., 2008). Desta forma, é necessário elucidar qual o real papel do PPAR γ no câncer de mama. Na segunda parte deste trabalho, intitulada “Interações entre o receptor nuclear PPAR γ e outras proteínas celulares em câncer de mama”, pretende-se entender a participação deste receptor nuclear em células deste tipo de câncer por meio da busca de parceiros e estudo das vias de sinalização que o receptor participa.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi:

“Mapear as interações que ocorrem entre o receptor nuclear PPAR γ e quaisquer outras proteínas presentes em células da linhagem 293T, da linhagem de mama não tumoral MCF10A e de linhagens de câncer de mama”.

Tendo como objetivos específicos:

- Verificação da expressão endógena de PPAR γ nas linhagens celulares utilizadas, por *western blot*, a fim de validá-las como um bom modelo para a busca de interações com outras proteínas.
- Superexpressão de PPAR γ nas linhagens celulares utilizadas, visando obter maior quantidade de PPAR γ nas células e assim maior número de interações com outras proteínas, além da necessidade técnica de inserir nas células PPAR γ fusionado a uma *tag* FLAG a ser utilizada na imunoprecipitação.
- Imunoprecipitação (IP) dos complexos formados entre PPAR γ e outras proteínas celulares nas linhagens 293T, MCF10A e linhagens de câncer de mama e, posteriormente, identificação das proteínas por espectrometria de massas (IP-LC-MS/MS), buscando assim novas proteínas interactoras para o receptor nuclear.
- Construção de redes de interação entre PPAR γ e proteínas encontradas por IP-LC-MS/MS.
- Análise dos parceiros de interação quanto aos processos biológicos e vias em que atuam e compartimentos celulares nos quais são encontrados.
- Confirmação dos complexos mais promissores via Co-IP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

4.1.1. Linhagem 293T (ATCC® CRL-3216™)

A linhagem celular 293T já era utilizada pelo grupo de pesquisa desde o início do projeto, tendo os protocolos já padronizados. Originalmente derivada de rins de embriões humanos, modificada com a adição do antígeno-T SV40, esta linhagem celular foi escolhida por ser o principal modelo para a realização de imunoprecipitação dada sua facilidade de cultivo e transfecção.

Estas células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco), 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Gibco), 0,37% de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich) e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.1.2. Linhagem MCF 10A (ATCC® CRL-10317™)

A linhagem MCF10A foi utilizada como um controle para a busca de interações entre o PPAR γ e outras proteínas em câncer de mama. Por ser uma linhagem de mama não tumoral, o fato de excluir as interações encontradas nesta linhagem das linhagens de carcinoma mamário leva ao foco apenas naquelas interações que ocorrem em câncer de mama e não em tecido mamário saudável. Esta linhagem também foi gentilmente cedida pela pesquisadora Dra. Sandra Dias. São células epiteliais derivadas de tecido mamário proliferativo benigno de pacientes com doença fibrocística e foram espontaneamente imortalizadas. São células não-tumorigênicas (SOULE et al., 1990) e triplo-negativas (KAO et al., 2009).

Esta linhagem foi cultivada em meio DMEM (Sigma Aldrich) com nutriente Ham F12 (Vitrocell) na proporção 1:1, suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco), 10 μ g/mL de insulina humana (Eli Lilly), 0,5 μ g/mL de hidrocortisona (Sigma Aldrich), 10 ng/mL de fator de crescimento epitelial (*Epithelial Growth Factor*, EGF) (Sigma Aldrich) e 100 ng/mL de toxina colérica (Sigma Aldrich), sendo mantida em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.1.3. Linhagem MCF7 (ATCC® HTB-22™)

A linhagem MCF7, gentilmente cedida pela pesquisadora Dra. Sandra Dias do LNBio e pelo pesquisador Humberto Miguel Garay Malpartida, da USP Leste, por intermédio da aluna de mestrado Izabela Caldeira, foi cultivada com meio DMEM (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco), 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Gibco), 0,37% de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich), 10 µg/mL de insulina humana (Eli Lilly), sendo mantida em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

Trata-se de uma linhagem celular epitelial de adenocarcinoma mamário metastático, classificada como subtipo luminal, que expressa tanto o ER como o PR, mas não possui HER2 amplificado (SUBIK et al., 2010). Esta linhagem foi utilizada para a busca de interações entre o PPAR_γ e outras proteínas em câncer de mama. As demais linhagens de câncer de mama listadas a seguir foram usadas na tentativa de atingir o mesmo propósito desta, buscando assim interações que ocorrem em subtipos diferentes deste tipo de câncer.

4.1.4. Linhagem MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)

A linhagem MDA-MB-231 também foi gentilmente cedida pela pesquisadora Dra. Sandra Dias. Trata-se de células epiteliais derivadas de tumores metastáticos de adenocarcinoma mamário, do subtipo basal B e triplo-negativas, isto é, não expressam ER, PR e não tem HER2 amplificado (KAO et al., 2009).

Esta linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 (Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Gibco), 0,37% de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich) e foi mantida em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.1.5. Linhagem MDA-MB-436 (ATCC® HTB-130™)

A linhagem MDA-MB-436 também foi gentilmente cedida pela pesquisadora Dra. Sandra Dias. Estas células de adenocarcinoma são do subtipo basal B, também triplo-negativas (KAO et al., 2009). Assim como a MDA-MB-231,

esta linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 (Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Gibco), 0,37% de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich) e foi mantida em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.1.6. Linhagem MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™)

A linhagem MDA-MB-468 também foi gentilmente cedida pela pesquisadora Dra. Sandra Dias. São células de adenocarcinoma metastático, do subtipo basal A, também triplo-negativas (KAO et al., 2009). Da mesma forma que as duas linhagens anteriores, esta foi cultivada em meio RPMI 1640 (Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Gibco), 0,37% de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich) e foi mantida em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

4.2. Verificação da expressão de PPAR γ endógeno em diferentes intervalos de tempo por *western blot*

O *western blot* é uma técnica utilizada para identificar proteínas específicas em uma amostra, que pode ser uma mistura complexa de proteínas extraídas de células, por exemplo. A técnica consiste de três etapas principais: separação das proteínas por tamanho em eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE, transferência para uma membrana sólida e marcação da proteína alvo utilizando um anticorpo primário específico e o respectivo anticorpo secundário para visualização (MAHMOOD; YANG, 2012).

A fim de verificar se todas as linhagens a serem utilizadas no projeto expressavam níveis endógenos de PPAR γ e assim utilizar um bom modelo celular, foram feitos *western blot* de extratos celulares coletados em diferentes intervalos de tempo após plaqueamento. Além disso, para cada intervalo de tempo, metade das células foi tratada com o ligante de PPAR γ rosiglitazona a fim de verificar se tal tratamento influencia de alguma forma na expressão do receptor nuclear.

Para isso, foram plaqueadas 5×10^5 células em seus respectivos meios de cultura em placas de 6 poços (Sarstedt) visando obter uma boa confluência no dia seguinte. Metade dos poços foi então tratada com o ligante na concentração final de

10 μM . Dois poços (um sem e um com tratamento) foram coletados após 24, 36 e 48 horas, visando verificar a expressão do receptor, na ausência e presença do ligante, em diferentes intervalos de tempo.

As células foram coletadas utilizando tripsina a 37°C por determinados intervalos de tempo, de acordo com o tipo celular, e transferidas para tubos cônicos, onde foram lavadas com PBS (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1.8 mM KH₂PO₄) e centrifugadas por 5 minutos, com velocidades variando de 1200 a 1500 rpm. Em seguida, o *pellet* de células foi lisado com tampão de lise para *western blot* (50 mM Tris pH 8.0; 150 mM NaCl; 0,1% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS); 1% Triton X-100; 1x Coquetel Inibidor de Protease (CIP); 12,5 mM β -glicerofosfato e 0,2 mM DL-Dithiothreitol (DTT)), a 4°C por 30 minutos, sendo o tubo agitado em um *vortex* a cada 5 minutos para ajudar na lise. Cada amostra foi transferida então para minitubos de centrífuga (*ependorfs*) e centrifugada por 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Um novo pellet foi formado, contendo restos celulares como DNA e membranas, enquanto as proteínas permanecem no sobrenadante, que é transferido para um novo tubo. O sobrenadante é chamado de extrato de proteínas.

Para quantificar as proteínas presentes no extrato total celular, foi utilizado o método do ácido bicinchonínico (BCA) utilizando o kit Pierce™ *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific). Trata-se de um método colorimétrico que quantifica proteínas totais em uma amostra. Este método combina a redução de Cu²⁺ para Cu¹⁺ pelas proteínas em meio alcalino (reação do biureto) com a detecção colorimétrica e altamente sensível do cátion cuproso (Cu¹⁺) por um único reagente, contendo o ácido bicinchonínico. O produto de reação de coloração roxa é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso. Este complexo exibe uma alta absorvância em 562 nm, valor utilizado no leitor de placa, que é linear com o aumento da concentração de proteínas em uma faixa de 20 a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As absorvâncias obtidas são plotadas em um gráfico com base em uma curva padrão de concentrações crescentes conhecidas de uma proteína, no caso a albumina de soro bovino, previamente quantificada pelo mesmo método, e assim são obtidas as concentrações de cada amostra (THERMO SCIENTIFIC).

Após quantificação e anotação das respectivas concentrações, foi adicionado tampão Laemmli com β -mercaptoetanol para uma concentração final de 1x em cada amostra. As mesmas foram fervidas a 95°C visando a desnaturação das proteínas e, então, guardadas a -20°C.

Para iniciar o *western blot*, foram aplicados volumes relativos a 50 μ g de extrato total em cada canaleta de um gel SDS-PAGE 12% obedecendo a ordem de coleta dos extratos, primeiro sem tratamento com ligante, seguido das amostras tratadas com ligante. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). A eletroforese foi realizada em cerca de 110V até a visualização da saída do tampão de amostra do gel.

Cada gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose em sistema *semi-dry* utilizando o aparelho Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD). Para montagem do “sanduíche” de transferência, o papel filtro é previamente imerso em tampão de transferência (24 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS e 20% metanol, em pH 7,5). A ordem de montagem do sanduíche no aparelho é: papel filtro – membrana – gel – papel filtro. A transferência é realizada com amperagem constante que varia de acordo com o número de sanduíches e o tempo total é de 1 hora e 20 minutos. Para a transferência para uma única membrana a amperagem ideal é de 80 mA. Após a transferência, a ocorrência da mesma é verificada com a imersão da membrana em Ponceau S (Sigma Aldrich), um corante de proteínas. Visto que a transferência foi bem sucedida, prossegue-se para a etapa de bloqueio.

O bloqueio foi feito utilizando 5% de leite desnatado (m/v) em tampão TBS-T 0,1% T (50 mM Tris-Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween- 20), por duas horas, em temperatura ambiente. Esta etapa é feita a fim de bloquear ligações inespecíficas entre a membrana e o anticorpo primário. Para isso, é necessário preencher todo o espaço disponível na membrana, exceto aquele onde já estão as proteínas transferidas, com outras proteínas, no caso as proteínas do leite. Após o bloqueio, cada membrana é lavada com tampão TBS-T por três vezes de 5 minutos. Em seguida, é adicionado o anticorpo primário, no caso o anti-PPAR γ (Cell Signaling #2435) na concentração 1:1000 diluído em TBS-T e 0,02% de azida sódica. Como controle de carregamento (*loading*) foi utilizado o anticorpo primário anti-GAPDH

(Abcam ab9484) também na concentração 1:1000 diluído em BSA 3% em TBS-T. Cada membrana foi incubada *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, cada membrana é lavada três vezes com TBS-T e é adicionado o respectivo anticorpo secundário fusionado à peroxidase (diluído em solução de bloqueio) por 1 hora à temperatura ambiente. Para as membranas incubadas com anti-PPAR γ o anticorpo secundário utilizado foi o IgG anti-*rabbit* (Sigma Aldrich) 1:10000. Já para as membranas recortadas para incubação com anti-GAPDH, o anticorpo secundário foi o IgG anti-*mouse* (Calbiochem). A incubação é feita a temperatura ambiente por uma hora e então as membranas são novamente lavadas três vezes por 10 minutos antes da revelação.

Para revelar, a membrana é incubada com Kit *Amersham ECL Prime Western Blot Detection Reagent* (GE Life sciences), de acordo com instruções do fabricante. Utilizou-se câmera CCD para detectar a quimiluminescência proveniente do anticorpo secundário. Para a quantificação das bandas foi utilizado o software ImageStudio Lite (LI-COR). Nessa quantificação é atribuído um valor de intensidade para cada banda de WB. Normalizamos todas as bandas pelo controle de carregamento, uma vez que este é uma proteína referente a um gene de expressão constitutiva em células (*housekeeping*). Utilizando o Microsoft Excel, estes valores foram plotados em gráficos de colunas para visualização e possível comparação da expressão do PPAR γ em diferentes intervalos de tempo e condições.

4.3. Superexpressão de PPAR γ pelo método de transfecção

Depois de confirmado que as linhagens a serem utilizadas expressavam níveis endógenos de PPAR γ , partiu-se para a superexpressão deste receptor, visando conseguir um maior número de interações nos experimentos de imunoprecipitação (IP), além da necessidade técnica da cauda FLAG fusionada ao PPAR γ superexpresso para realizar tais experimentos, utilizando resina anti-FLAG (Sigma Aldrich) para purificar os complexos.

Inicialmente foi feita a superexpressão pelo método de transfecção utilizando fosfato de cálcio na linhagem 293T. Para garantir que a coleta dos extratos celulares, a serem utilizados posteriormente em experimentos de IP, fossem feitas em momentos de maior expressão da proteína de interesse, foi feito um teste

temporal de superexpressão do PPAR γ . Para isso, $3,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas em cada poço de uma placa de seis poços, atingindo uma confluência de aproximadamente 60% após 24 horas.

Prosseguiu-se então com a transfecção das células com o plasmídeo pLVIG (plasmídeo lentiviral Ires-GFP) contendo o gene do PPAR γ fusionado a uma cauda FLAG N-terminal, seguido da sequência IRES (Sítio Interno de Entrada de Ribossomo) e do gene da proteína verde fluorescente (GFP – *Green Fluorescent Protein*), sob a ação do mesmo promotor. Dessa forma, quando o promotor está ativo, dois RNAs mensageiros são transcritos separadamente, um contendo o FLAG-PPAR γ e o outro, GFP. Se for observado GFP intracelular utilizando microscópio de fluorescência, então FLAG-PPAR γ também foi produzido. É um plasmídeo muito útil no caso da transfecção transiente, de forma que se temos GFP visível por microscopia de fluorescência, temos a certeza que o PPAR γ também foi expresso.

Foram feitas seis reações separadas em tubos de centrífuga individuais, um para cada poço da placa. O DNA plasmidial na concentração final de 40 mg/mL foi misturado ao tampão Tris-EDTA 0.1x pH 8.0 (1 mM Tris-HCl; 0.1 mM EDTA) no volume final de 87,5 μ L por poço. Em seguida, adicionou-se 93,75 μ L da solução de HBS 2x pH 6.95 (280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1.5 mM Na₂HPO₄.2H₂O; 12 mM dextrose; 50 mM HEPES) para uma concentração final de 1x e, por último 125 μ M de CaCl₂ 2 M . As reações foram incubadas por 23 minutos em temperatura ambiente, e depois, pipetadas delicadamente nos poços contendo meio de cultura e células na confluência correta. Esta reação precipita o DNA de forma a facilitar sua entrada na célula. O DNA só vai atravessar a membrana durante a fase de mitose, por isso é importante a confluência média da placa.

Após quatro horas de transfecção, foi feito o tratamento com 10 μ M de rosiglitazona em três dos seis poços. As coletas dos extratos celulares foram feitas em 24, 36 e 48 horas após o tratamento com o ligante, da mesma forma que para os testes temporais endógenos, sendo coletados sempre dois poços por vez (um sem e um com tratamento com ligante). Para verificar o sucesso na transfecção, foi feito um *western blot* da mesma forma que o anterior (para níveis endógenos, item 4.2), esperando obter níveis de expressão maiores que o endógeno.

O mesmo método foi tentado para as células da linhagem MCF7, a primeira linhagem celular de câncer de mama conseguida pelo grupo de pesquisa, sempre sem sucesso, como será descrito adiante. Foram feitas ainda tentativas de transfecção das células MCF7 utilizando lipofectamina, método no qual a confluência inicial das células deve ser de 70 a 90%.

Neste método, após o plaqueamento e obtenção das células na confluência ideal, o meio DMEM completo (com soro e antibióticos) é retirado e substituído por DMEM incompleto (sem soro e antibióticos). De acordo com instruções do fabricante do reagente *Lipofectamine 2000* (Thermo Scientific), são separados dois tubos: o primeiro, contendo o DNA diluído em meio incompleto, e o segundo contendo lipofectamina diluída em meio incompleto. A razão DNA(μg):lipofectamina(μL) utilizada foi 1,5:2. Após 5 minutos de incubação, o conteúdo do primeiro tubo é adicionado ao segundo e aguarda-se 20 minutos antes de adicionar o complexo às células. Após 4 horas de transfecção, o meio é trocado novamente para meio completo e, neste momento, faz-se o tratamento com o ligante, se necessário. As tentativas de transfecção utilizando lipofectamina também não funcionaram para a linhagem MCF7, como será descrito posteriormente.

Desta forma, para prosseguir com os mesmos estudos em células de câncer de mama, viu-se a necessidade de utilizar outro método de superexpressão: a transdução utilizando vetores virais, buscando produzir uma linhagem de MCF7 que expressasse níveis elevados estáveis de PPAR γ . Para isso, foi necessário clonar o gene do PPAR γ fusionado à cauda FLAG em um vetor retroviral, o pBABE-puro.

4.4. Subclonagem do gene do PPAR γ no vetor retroviral pBABE-puro

O vetor retroviral pBABE-puro, doado pelo Dr. Marcio Bajgelman, foi o plasmídeo escolhido para a clonagem e produção do vetor viral.

O gene PPAR γ (fusionado à cauda FLAG N-terminal) estava no vetor de expressão em células de mamífero pCDNA-Flag. Através de reação em cadeia da polimerase (PCR), este foi amplificado com os seguintes primers:

<i>Primers</i>	PPAR γ
<i>Forward</i>	5' GTCGACATGGACTACAAAGACG 3'
<i>Reverse</i>	5' GCGGCCGCATACTAGTACAAGTC 3'

Após a amplificação e purificação do inserto, este foi então ligado no vetor intermediário pGEM-T (Promega) 4°C *overnight*. Células competentes de *Escherichia coli* (DH5 α) foram transformadas com o produto da reação de ligação e, em seguida, foram extraídos os plasmídeos de colônias brancas escolhidas na placa.

Para certificar a presença da construção correta (PPAR γ -pGEM-T) nestas colônias foi feita uma análise de restrição utilizando as enzimas *BglII* (Thermo Scientific) e *NdeI* (New England Biolabs), que clivam o gene do PPAR γ e o vetor pGEM-T, respectivamente, além de uma PCR utilizando um primer *Forward* que se anela na região promotora do vetor (T7) e o primer *Reverse* do inserto. Seguiu-se com o sequenciamento do DNA plasmidial das colônias positivas para ambos os experimentos e, após confirmadas, as mesmas foram digeridas com *Sall* (Jena Bioscience) que reconhece um sítio na região 5' e um na 3' do inserto. O vetor pBABE-puro foi digerido com a mesma enzima e desfosforilado.

A reação de desfosforilação é realizada com a enzima fosfatase alcalina (Promega), que remove os fosfatos nas extremidades 5' prevenindo a recircularização do vetor. Para realizar este procedimento dilui-se a enzima em seu tampão para uma concentração final de 0,01 u/ μ L e utiliza-se 0,01 u da enzima para cada pmol de extremidades de DNA (1 μ g de 1000 pb de DNA = 1,52 pmol de DNA = 3,03 pmol de extremidades de DNA). O DNA a ser desfosforilado é purificado por precipitação com etanol e então a reação é montada com o volume apropriado de enzima e o respectivo tampão. A reação é incubada a 37°C por 30 minutos e em seguida adiciona-se a mesma quantidade de enzima novamente e prossegue-se com outra incubação. A reação é parada a 65°C e o produto purificado com o kit de purificação de produtos de PCR (QIAGEN).

As amostras digeridas e desfosforiladas foram aplicadas em gel de agarose e as respectivas bandas foram purificadas do gel. O inserto foi ligado ao vetor pBABE-puro a 4°C *overnight* e o produto da ligação foi utilizado para a transformação de células DH5α. Para confirmar a presença da construção correta (PPAR γ -pBABE-puro), foi feita uma análise de restrição para cada colônia utilizando a enzima *EcoRI* (Thermo Scientific), que cliva o gene do PPAR γ e o vetor pBABE, gerando bandas com cerca de 800 pb e 5800 pb.

Para confirmar a clonagem foi feita uma PCR das colônias positivas para a análise de restrição utilizando um primer *Forward* que se anela no vetor (pBABE *Forward*) em uma região próxima ao início do gene clonado e o primer *Reverse* do inserto, visando obter uma amplificação no tamanho correto apenas se o gene estiver inserido na orientação correta.

Para certificar a sequência do clone, foi feito o sequenciamento do DNA deste e o resultado obtido foi alinhado nas ferramentas de bioinformática BLAST e Multalin.

Após a confirmação do clone, este foi produzido em maior quantidade e uma alíquota do mesmo foi enviada ao Laboratório de Vetores Virais, conforme orientação do Dr. Marcio Bajgelman, para produção do vetor retroviral.

4.5. Transdução do vetor retroviral PPAR γ -pBABE nas linhagens celulares MCF7 e MCF10A e estabelecimento da linhagem permanente

Os vírus contendo os vetores retrovirais pBABE foram produzidos no Laboratório de Vetores Virais (LVV), instalado no LNBio sob coordenação do Dr. Márcio Bajgelman. Células das linhagens MCF10A e MCF7 foram plaqueadas em placas de seis poços na quantidade de 3×10^5 células por poço, o que gerou uma confluência de aproximadamente 50% em 24 horas. Os vírus foram transduzidos nestas células em quantidades de 100 μ L e 1000 μ L por poço; juntamente com o adjuvante polibreno, que é um polícatión que reduz a repulsão por carga entre o vírus e a membrana celular; e meio DMEM em quantidade suficiente para completar o volume de 1 mL. Como controle negativo foi utilizado um poço sem adição de

vírus, e como controle positivo um poço onde foi adicionado o vetor retroviral pBABE fechado sem PPAR γ clonado.

Após 48 horas de transdução o meio dos poços foi trocado por DMEM suplementado com insulina e adicionado 1 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico puromicina, capaz de selecionar as células transduzidas, uma vez que o vetor viral pBABE possui resistência a este antibiótico. Para escolher a concentração de puromicina a ser utilizada para selecionar as células foi feita previamente uma curva de morte com as linhagens não-transduzidas. Verificou-se que a concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ era capaz de matar todas as células do poço em três dias.

Passados três dias, todas as células dos poços de controle negativo haviam morrido e os outros poços foram cultivados com o meio adequado, suplementado com puromicina, e expandidos até que houvesse células suficientes para fazer o *western blot* e também para congelar. O *western blot* foi feito com a intenção de verificar se as células selecionadas realmente estavam superexpressando a proteína em questão. Este procedimento foi realizado da mesma forma que os *westerns blots* anteriores e os níveis de expressão foram comparados aos níveis de expressão endógena nas mesmas linhagens.

4.6. Imunoprecipitação (IP)

Primeiramente, foram realizados testes piloto de imunoprecipitação do PPAR γ em 293T a partir de quatro placas de 100 mm, uma para cada condição a ser testada: 293T superexpressando FLAG-PPAR γ sem tratamento com ligante, 293T superexpressando FLAG-PPAR γ tratada com ligante, e controles 293T não-transfectada sem e com tratamento. O método de superexpressão utilizado foi a transfecção transiente, utilizando o plasmídeo pLVIG contendo FLAG-PPAR γ . A imunoprecipitação das proteínas é realizada utilizando um kit comercial que tem afinidade pela cauda FLAG, descrito adiante.

Após a confirmação da IP piloto, foram feitos três experimentos independentes de IP do PPAR γ . Nestes foram utilizadas doze placas de 100 mm de cultura celular da linhagem 293T em cada experimento, sendo três para cada uma das quatro condições. O tratamento com o ligante agonista de PPAR γ em metade das placas foi feito no intuito de obter proteínas parceiras que interajam com o

PPAR γ na condição ativado, e também observar se há mudança nas vias que o receptor participa, devido à presença do ligante. A triplicata biológica aumenta a chance de encontrar mais complexos proteicos interactores do PPAR γ , até os menos abundantes. O controle negativo é feito para eliminar as interações inespecíficas da IP.

Seis das doze placas foram transfectadas, pelo método do fosfato de cálcio, com o plasmídeo pLVIG contendo FLAG-PPAR γ . Após quatro horas, três das seis placas transfectadas foram tratadas com o ligante rosiglitazona na concentração final de 10 μ M. Como controle foram utilizadas as outras seis placas de extrato de 293T não transfectadas, sendo três tratadas com o ligante e três não.

Foi observada a presença da coloração verde fluorescente das células transfectadas no microscópio de fluorescência, certificando assim a expressão de FLAG-PPAR γ , por meio da expressão de GFP sob a ação do mesmo promotor, antes de prosseguir com a IP.

Para coletar as células e obter o extrato proteico, estas foram coletadas e lavadas três vezes com PBS em tubos cônicos, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida as células foram lisadas com tampão de lise *High Salt Buffer* (HSB – 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100), capaz de lisar o núcleo das células, liberando assim proteínas ali presentes, por 20 minutos a 4°C, sendo vortexadas a cada 5 minutos para auxiliar a lise. Cada extrato foi então transferido para minitubos de centrífuga e centrifugados a 14000 rpm, por 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante (extrato proteico) foi transferido para novos tubos.

O extrato proteico foi quantificado utilizando o kit Pierce™ *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific), como descrito anteriormente. Foram separados ao menos 50 μ g de extrato para a análise por *western blot*, sendo esta alíquota referente ao *input* da IP. O restante foi adicionado a aproximadamente 40 μ L de resina empacotada ANTI-FLAG M2 *Affinity Gel* (Sigma Aldrich), previamente lavada com tampão TBS. A cauda FLAG fusionada ao PPAR γ tem afinidade por esta resina ANTI-FLAG e o experimento foi realizado segundo instruções do fabricante. Os tubos contendo resina juntamente com o extrato proteico foram submetidos à

rotação suave, a 4°C, por aproximadamente 16 horas (*overnight*). No dia seguinte, o *flow through* (FT), extrato que passa pela resina sem se ligar a ela por falta de afinidade, foi retirado por centrifugação a 800 g, por 1 minuto, a 4°C e a resina foi lavada por três vezes com tampão TBS nestas mesmas condições de centrifugação. Todas as lavagens foram coletadas.

As amostras são então eluídas utilizando peptídeo FLAG na concentração 100 µg/mL diluído em 100 µL de TBS. Este peptídeo tem maior afinidade pela resina do que a cauda FLAG fusionada ao PPAR γ e, desta forma, o PPAR γ e todo o complexo de proteínas interactoras ligadas a ele é liberado. A eluição é feita com a adição do peptídeo FLAG e incubação sob leve rotação por 3 horas a 4°C e as amostras são então centrifugadas a 500 g por 2 minutos a 4°C para coleta dos complexos.

Após a eluição foi feito um *western blot* utilizando amostras de “*input*” (extrato inserido na resina), “*flow through*” (FT – extrato que passa pela resina sem se ligar à ela), lavagem 1 (L1 – primeira lavagem) e eluição, para cada condição imunoprecipitada. O anticorpo utilizado para detecção do PPAR γ foi o anti-PPAR γ (#2435 Cell Signaling) ou o anti-FLAG (Sigma Aldrich).

O mesmo foi feito posteriormente para as linhagens transduzidas PPAR γ -MCF7 e PPAR γ -MCF10A.

Após certificação da imunoprecipitação por *western blot*, as amostras eluídas são analisadas por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

4.7. Padronização de IP endógena em linhagens de câncer de mama

Na intenção de buscar complexos de interação endógenos de PPAR γ em linhagens de câncer de mama, foi tentada a IP endógena deste receptor nuclear nestas linhagens. A IP endógena foi tentada primeiramente para as linhagens MCF10A e MDA-MB-436, as quais expressam uma boa quantidade de PPAR γ endógeno, em experimentos piloto. Para isso, duas placas de 100 mm de cada uma das linhagens foram cultivadas com seus respectivos meios até atingir confluência total e depois lisadas utilizando o tampão HSB e quantificadas.

Foram testados dois protocolos de IP endógena, um do Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) do LNBio (Protocolo 1) e um protocolo da *Cell Signaling*, empresa que produz o anticorpo utilizado na resina (Protocolo 2). Em ambos os protocolos foi utilizada a resina de proteína A sepharose (Sigma Aldrich) que é depois conjugada ao anticorpo específico para o PPAR γ (#2443 Cell Signaling). Para o controle negativo, foi utilizada a mesma quantidade de proteína IgG não-imune de coelho (SantaCruz, sc-2027).

Para Protocolo 1, foi feito primeiramente uma etapa de *pré-clearing* a fim de excluir proteínas que interajam inespecificamente com a resina. Para cada linhagem, 40 μ L de proteína A sepharose (Sigma Aldrich), aproximadamente 20 μ L de resina empacotada, são lavados com 400 μ L de TBS-T a 1000 g e 4°C por 1 minuto. Aproximadamente 500 μ g de extrato proteico são então adicionados à resina e submetidos à rotação orbital, a 4°C, por uma hora. Os minitubos são centrifugados a 1000 g e 4°C, por 1 minuto, e o sobrenadante é o extrato proteico que não interage inespecificamente com a resina.

A segunda etapa do Protocolo 1 é a preparação da resina. Nesta etapa são adicionados 60 μ L de resina de proteína A sepharose, aproximadamente 30 μ L de resina empacotada, em novos minitubos de centrífuga e estes são lavados com 600 μ L de TBS-T, nas mesmas condições de centrifugação. O sobrenadante é retirado e são adicionados 200 μ L de TBS-T e 4 μ g do anticorpo específico para imunoprecipitar o PPAR γ (#2443 Cell Signaling). A resina com o anticorpo é incubada sob agitação em orbital por 1 hora, a 4°C, a fim de que a porção Fc do anticorpo se ligue especificamente à proteína A sepharose (THERMO SCIENTIFIC, 1999), formando então uma resina com afinidade ao PPAR γ capaz de capturar o receptor e os complexos de proteínas que interagem com ele. O extrato proteico que passou pelo “*pré-clearing*” é então adicionado a esta resina e incubado *overnight* sob agitação em orbital a 4°C.

No dia seguinte o extrato que não se ligou a resina (*Flow Through* – FT) é coletado após centrifugação a 1000 g, a 4°C, por 1 minuto. Foram feitas então seis lavagens com 600 μ L de TBS-T nas mesmas condições de centrifugação. Para a eluição são adicionados 30 μ L de tampão Laemmli 4x com β -mercaptoetanol e as

amostras são fervidas a 95°C, por 5 minutos, e depois centrifugadas para baixar a resina.

No protocolo da *Cell Signaling* (Protocolo 2) também é feita a etapa de *Pré-clearing* do extrato proteico. Para a imunoprecipitação, este extrato proteico é adicionado a 4 µg de anticorpo diluídos TBS-T e é feita a incubação *overnight* sob agitação em orbital a 4°C, a fim de maximizar o número de ligações entre moléculas de PPAR γ e o respectivo anticorpo. No dia seguinte, este extrato incubado com o anticorpo é adicionado à proteína A, previamente lavada com TBS-T, e é feita então uma nova incubação de 2 horas, à 4°C, sob agitação em orbital, visando a ligação da porção Fc do anticorpo à proteína A sepharose da resina.

São coletadas as amostras de FT e lavagem, assim como no primeiro protocolo, e a eluição é feita da mesma maneira: adição de tampão Laemmli 4x com β -mercaptoetanol, fervura a 95°C por 5 minutos e centrifugação.

As amostras eluídas foram aplicadas em gel SDS-PAGE e submetidas à eletroforese. As bandas na altura do PPAR γ foram recortadas, preparadas e submetidas à espectrometria de massas, visando obter peptídeos referentes ao receptor nuclear, uma vez que este foi imunoprecipitado com anticorpo específico, validando assim a metodologia utilizada antes de realizá-la em maior escala e para um maior número de linhagens celulares.

4.8. Espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Esta etapa do trabalho foi realizada na *facility* Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) do LNBio, sob coordenação da Dra. Adriana Paes Leme.

Para preparação das amostras para espectrometria de massas, foi tentado primeiramente um protocolo de digestão em solução, já que as eluições são soluções compostas por uma mistura complexa de proteínas. Primeiramente as amostras digeridas são testadas no equipamento Q-TOF, para verificação da qualidade das amostras. Como foi detectada uma alta quantidade de detergente nas amostras do primeiro experimento, capaz de prejudicar o equipamento LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific), que é mais sensível, foi decidido então realizar o protocolo

de digestão em gel, capaz de remover todo o detergente ali presente, evitando problemas.

Para isso, as amostras eluídas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% para separação por tamanho dos complexos proteicos presentes na eluição.

Para a imunoprecipitação piloto endógena de PPAR γ em MCF10A e MDA-MB-436 o gel foi corado com nitrato de prata, usando um protocolo disponibilizado pelo grupo MAS do LNBio. Por se tratar de um experimento piloto, isto é, feito no intuito de verificar se os protocolos funcionam, apenas as bandas em tamanhos próximos ao do PPAR γ foram recortadas e digeridas, tanto para as amostras, como para os controles negativo com IgG normal. Isso foi feito visando obter peptídeos referentes ao PPAR γ nas bandas das amostras e não nos controles, o que indicaria que o protocolo funcionou, já que o PPAR γ deve aparecer em boa quantidade por se ligar às moléculas de anticorpo anti-PPAR γ na resina.

Para a imunoprecipitação após superexpressão de PPAR γ o gel foi corado com corante *Coomassie Blue* (0,2% de azul de bromofenol, 20% de glicerol e 100 mM de Tris-HCl pH 6,8) e, posteriormente descorado com solução descorante (30% de metanol e 10% de ácido acético). Cada canaleta foi dividida igualmente em oito pedaços, de acordo com o padrão de massa molecular, e os mesmos foram recortados visando conseguir proteínas constituintes do complexo de interação de todos os tamanhos disponíveis. O mesmo padrão de recorte foi seguido para os três experimentos independentes. No total foram recortados 32 pedaços de gel por experimento. As 32 amostras obtidas após o recorte do gel de cada experimento foram separadas em diferentes minitubos e digeridas para posterior análise através de espectrometria de massas (LC-MS/MS).

O protocolo utilizado para a digestão em gel foi disponibilizado pela *facility* de Espectrometria de Massas do LNBio. Trata-se de um protocolo modificado de (SHEVCHENKO et al., 1996).

Neste protocolo, primeiramente as bandas recortadas do gel foram descoradas com a adição de solução *destain* (2,5% ácido acético em 50% metanol), capaz de remover o SDS presente no gel. Em seguida é feita a desidratação das amostras retirando a solução de *destain* e adicionando acetonitrila. As amostras são

então reduzidas adicionando-se uma solução de 10 mM de DTT. Em seguida é feita a alquilação das amostras adicionando 50 mM de iodoacetamida. As bandas de gel são então lavadas com 100 mM bicarbonato de amônio e, em seguida, novamente desidratadas com acetonitrila. Reidrata-se o gel com 100 mM bicarbonato de amônio e é feita a desidratação novamente com acetonitrila 100%. É adicionada então uma solução de tripsina (Promega) a 20 ng/ μ L e as amostras são incubadas em gelo por 30 minutos, absorvendo a tripsina. O excesso da enzima é retirado e os pedaços de gel cobertos com 50 mM bicarbonato de amônio. A digestão é feita com a incubação destas amostras a 37°C *overnight*.

No dia seguinte, é adicionada a solução de extração 1 (ácido fórmico 5% em água purificada) em cada uma das amostras e incubado por 10 minutos. Após *spin* rápido, o sobrenadante de cada amostra é coletado e passado para novos tubos. Nos tubos anteriores contendo resquícios do gel é adicionada a solução de extração 2 (5% ácido fórmico em 50% acetonitrila) e incubado por 10 minutos. Após *spin* rápido, o sobrenadante é coletado e adicionado aos tubos previamente separados (que já contêm o extrato do passo anterior). Este passo da solução de extração 2 é repetido.

As amostras são totalmente secadas em evaporador e depois ressuspendidas em 1% ácido fórmico e então é iniciado o protocolo de *Stage Tips* C18 (RAPPSILBER et al., 2007) também disponibilizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massas. Este protocolo é realizado para a retirada dos sais e garantia de melhor qualidade das amostras. Para isso, foram montadas pequenas colunas utilizando ponteiras amarelas e membranas de C18 (EMPORE™ - 3M). Cada coluna é montada em um novo minitubo de centrífuga de 1,5 mL. Após cada passo é feita uma centrifugação a 3500 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente. Primeiro, as colunas são condicionadas com metanol e depois equilibradas com 0,1% ácido fórmico duas vezes. As amostras são então carregadas uma em cada respectiva coluna, totalizando 32 colunas por experimento. Após esta centrifugação, as amostras que passaram são coletadas e novamente carregadas na coluna visando não deixar passar nenhum peptídeo digerido. O que passou é então descartado e são feitas 10 lavagens com 0,1% ácido fórmico. Após a última

lavagem, é feita a eluição das amostras utilizando 0,1% ácido fórmico em 80% acetonitrila e as amostras são secas com vácuo e congeladas a -20°C.

Para aplicação das amostras no espectrômetro de massas, as mesmas são ressuspensas em 0,1% ácido fórmico em um volume que varia de acordo com a quantidade de proteínas observadas previamente no gel corado. As amostras são então transferidas para *vials* (Waters).

Uma alíquota de 4,5 µL foi analisada no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos ETD (Thermo Scientific) conectado ao sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystem) por uma fonte de íon *nanoelectrospray*. Os peptídeos foram separados em um gradiente de acetonitrila de 2 a 90% em ácido fórmico 0,1%, utilizando a coluna analítica *PicoFrit Column* (20 cm x ID 75 µm, 5 µm de tamanho de partícula - New Objective) em um fluxo de 300 nL/min por 85 minutos. A voltagem do *nanoelectrospray* foi ajustada para 2,2 kV e a temperatura da fonte para 275°C. Todos os métodos nos instrumentos foram ajustados no modo de aquisição dependente de dados e a fragmentação foi do tipo CID (dissociação induzida por colisão). A resolução do equipamento foi de 60000 e os picos mais intensos foram fragmentados por CID com energia de colisão normalizada de 35%. Para a obtenção do MS², os íons deveriam ter pelo menos 1000 contagens com exclusão dinâmica de 60 segundos.

O processamento dos dados foi feito utilizando o software *Proteome Discoverer* (Thermo Fisher Scientific) e as buscas foram realizadas utilizando o banco de dados *Human International Protein Database* (IPI) v.3.72 (86392 sequências; 35093930 resíduos). Neste software são inseridos os dados provenientes da corrida de cada uma das oito bandas digeridas de cada condição para cada um dos três experimentos no espectrômetro de massas. O modo de processamento escolhido foi o *Batch Processing* com MudPit, que agrupa as 8 bandas de cada condição, gerando dados separadamente para cada uma delas, totalizando quatro condições para cada experimento. O banco de dados utilizado foi atualizado em 17/03/2016, indicando que os dados dos peptídeos buscados são atuais. Os dados são exportados para uma única tabela no Microsoft Excel que contém todos os peptídeos encontrados.

4.9. Análise dos dados de IP obtidos por LC-MS/MS

A tabela de todos os peptídeos encontrados nas diferentes amostras corridas em LC-MS/MS foi analisada de forma a subtrair todos os peptídeos encontrados no controle 293T sem transfecção de FLAG-PPAR γ da condição 293T superexpressando FLAG-PPAR γ , visando assim eliminar possíveis interações inespecíficas. Além disso, foram separados peptídeos que apareceram em dois ou mais dos três experimentos independentes para aumentar a reprodutibilidade dos dados, separando os que apareceram em apenas um experimento em uma lista a parte.

4.9.1. Plataforma IIS (Integrated Interactome System) – anotação dos dados e construção das redes

Para a anotação dos dados e construção das redes de interação, foi utilizada a plataforma *Integrated Interactome System* (IIS). Esta plataforma integrativa é capaz de agrupar os dados provenientes da imunoprecipitação em diferentes módulos: processamento, anotação, análise e visualização (CARAZZOLLE et al., 2014). Foram submetidas em formato “.txt” as listas com os UNIPROT IDs encontrados nas IPs, e selecionado o UNIPROT ID do PPAR γ (P37231) como isca.

O primeiro módulo utilizado na plataforma foi o *Submission*, onde foi feito o *upload* das listas de proteínas. Em seguida, no módulo *Annotation* foram cadastrados todos os peptídeos encontrados nos experimentos, de acordo com várias bases de dados (CDD, Prosite, SwissProt, HPA, DisEMBL, PDB, Gene Ontology, entre outras). Por último, no módulo *Interactome*, todas as interações foram submetidas a um *blast* contra o banco de dados Global Protein-Metabolite-Gene-Drug Interaction Data Bank (GPMGDID), construído pelo agrupamento dos bancos de dados BioGRID, Intact, DIP, MINT, HPRD, HMDB, YMDB, ECMDB e Drugbank, e as novas interações foram adicionadas na rede que foi construída a partir destes dados. Este módulo gera um arquivo .XGMML que pode ser importado no software Cytoscape, utilizado para visualização e construção das redes de interactoma.

4.9.2. Software Cytoscape – visualização e construção do interactoma

A partir dos dados provenientes da plataforma IIS, é gerada uma rede de interação no formato XGMML contendo todas as anotações e estas podem ser visualizadas no Cytoscape. Este software é uma plataforma aberta que permite a visualização de todas as interações encontradas entre a isca e as proteínas presentes nos extratos celulares (presas) (CARAZZOLLE et al., 2014; SHANNON et al., 2003).

Os *plug-ins* existentes no software permitem a organização dos dados por diferentes métodos de visualização. As proteínas interactoras obtidas nas IPs foram organizadas de acordo com o *Top Enriched Biological Process-TEBP*, proveniente da plataforma *Gene Ontology (GO)* (GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2015). Desta forma, foram separadas em círculos as proteínas que estavam classificadas no mesmo processo biológico buscando novas vias onde o PPAR γ possa atuar. Foi feita também uma análise separando as proteínas encontradas de acordo com o compartimento celular em que atuam, no intuito de observar a participação de PPAR γ em compartimentos diferentes dos quais ele já tenha sido descrito. Além disso, pode-se visualizar quais interações são inéditas (em azul) e quais são provenientes de bancos de dados e já foram descritas na literatura (em verde), podendo reconhecer quais interações são novas e focar nestas nas etapas posteriores de confirmação das interações.

4.9.3. Software MetaCore – principais vias, processos biológicos e doenças

O software MetaCore foi utilizado para visualizar os processos biológicos e vias mais enriquecidas em cada rede de interações produzida. O MetaCore (Thomson Reuters) foi usado para analisar as vias mais comuns encontradas entre as proteínas interactoras, acessando o módulo "*Pathway Maps*". Além disso, acessando o módulo "*Disease Biomarker Networks*" foi investigado se as proteínas encontradas como parceiras de interação do PPAR γ estão envolvidas no desenvolvimento e progressão de doenças. Esta análise permite a discussão da existência e importância da função da proteína estudada nestas doenças.

5. INTERAÇÕES ENTRE O PPAR_γ E OUTRAS PROTEÍNAS CELULARES

No capítulo 5 serão discutidos os principais resultados obtidos através do *screening* de novas interações entre o receptor nuclear PPAR γ e outras proteínas celulares na linhagem 293T.

O campo de pesquisa em Sistemas Biológicos tem se tornado um grande foco de estudo nos últimos anos. Esse interesse pode ser atribuído à grande quantidade de dados gerados por genômica e proteômica disponíveis atualmente, à necessidade de entender sistemas celulares complexos ou doenças multifatoriais como câncer e síndrome metabólica e às tecnologias emergentes que permitem o *screening* em larga-escala (*High-Throughput Screening*) de misturas complexas de biomoléculas. No entanto, todo esse avanço não seria possível sem o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática capazes de analisar a enorme quantidade de dados gerados (BRÜCKNER et al., 2009).

No caso de proteínas com funções desconhecidas, técnicas que identificam redes de interação proteína-proteína, trazem informações importantes sobre quais seriam as funções dessas proteínas (CAUSIER, 2004). Tais redes de interação biológicas podem ser definidas como um conjunto de proteínas (ou genes) que foram ligados umas às outras de acordo com suas relações funcionais. Portanto, entender essas conexões em um dado sistema pode trazer hipóteses de como tal função pode ser coordenada pelas proteínas envolvidas nessa rede (GOH et al., 2012). Diferentemente do que é visto em processos biológicos, que representam sequências de moléculas direcionadas a um resultado final, como por exemplo uma cascata de sinalização, as redes de interação são sistemas interligados entre si (BONETTA, 2010).

Screenings em larga-escala para a busca de interações físicas e genéticas entre proteínas têm revelado novas perspectivas para o estudo dos Sistemas Biológicos. A análise detalhada dessas interações pode trazer novos conhecimentos sobre funções de genes/proteínas e sobre a organização desta rede de interação celular. Com isso, a validação de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos se torna mais fácil (CARAZZOLLE et al., 2014).

Existem duas abordagens principais, efetivas e complementares para revelar estas redes de interação: o duplo-híbrido em levedura (y2h) e proteômica

baseada em espectrometria de massas (MS) (CAUSIER, 2004). Neste trabalho de mestrado foi utilizada a abordagem de proteômica baseada em MS, que trata de formações de complexos de proteínas com interações diretas ou indiretas (GAVIN et al., 2002).

Como exemplo da aplicação desta técnica há um estudo publicado que relaciona a identificação e formação dos diversos complexos de transcrição, estáveis ou transientes, utilizando a técnica de proteômica baseada em MS. O estudo da transcrição na célula é muito relevante, uma vez que esse processo é baseado em uma rede de interações ordenadas entre diferentes complexos de proteínas. Além disso, muitas das proteínas envolvidas nesse processo só apresentam atividade quando em complexo com outras proteínas (MALOVANNAYA et al., 2010).

5.1. Verificação da expressão endógena de PPAR γ em diferentes intervalos de tempo na linhagem 293T

A técnica de *western blot* foi utilizada para verificar a ocorrência de expressão endógena de PPAR γ na linhagem 293T visando validá-la como bom modelo para a busca de interações entre o PPAR γ e outras proteínas.

Pôde-se observar que a linhagem 293T expressa níveis endógenos de PPAR γ (Figura 4). A expressão de PPAR γ diminuiu conforme o tempo no caso das amostras não tratadas com o ligante, sendo menor em 48 horas neste caso. Já na presença do ligante, a expressão praticamente se mantém, alcançando maiores níveis em 48 horas. Assim, o ligante, de alguma forma, pode ser capaz de manter a expressão do receptor nuclear.

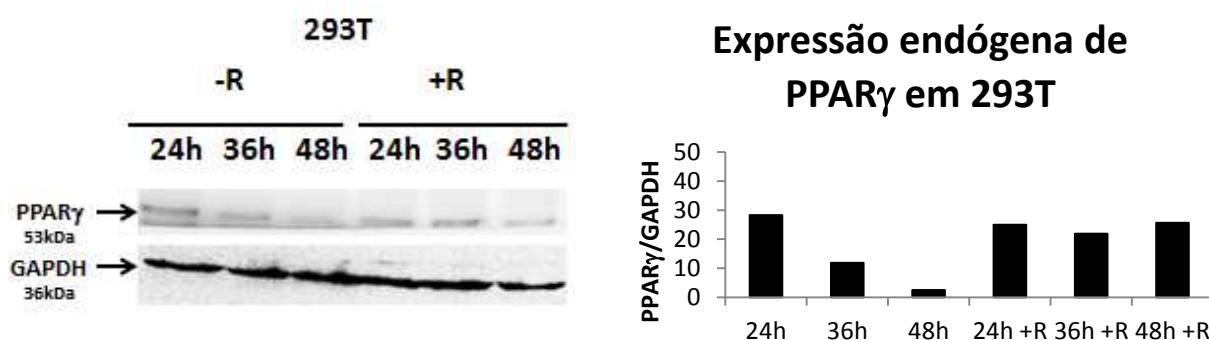


Figura 4. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem 293T. À esquerda, western blot dos extratos celulares coletados em diferentes intervalos de tempo sem e após tratamento com o ligante rosiglitazona (R). À direita, quantificação da intensidade das bandas (ImageStudio LI-COR) em relação ao controle (GAPDH).

5.2. Superexpressão de FLAG-PPAR γ em 293T

Para obter um maior número de interações com outras proteínas, optou-se por superexpressar o PPAR γ nas células das linhagens a serem imunoprecipitadas. O plasmídeo utilizado para a superexpressão foi o pLVIG (Figura 5).

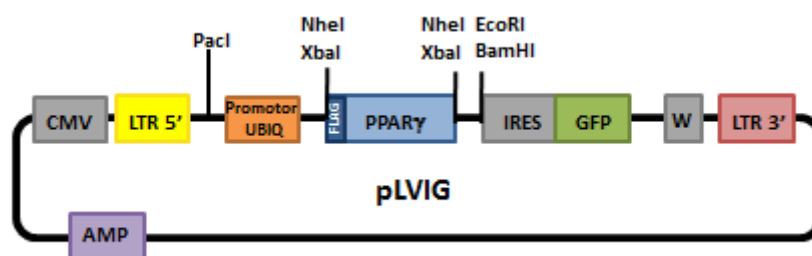


Figura 5. Vetor lentiviral pLVIG. O gene de PPAR γ está clonado após o promotor UBIQ entre os sítios de restrição de NheI e XbaI. As regiões mais importantes do vetor estão destacadas: LTR, regiões que codificam genes necessários à formação do lentivírus; Promotor Ubiquitina, que dirige a expressão dos genes, AMP, gene que confere resistência à ampicilina quando expresso em *Escherichia coli.*; IRES-GFP, região de transcrição policistrônica do gene da proteína GFP.

Observando o *western blot*, feito após a transfecção, coleta e lise das células, e a densitometria das bandas do mesmo (Figura 6), nota-se que houve grande diferença nos níveis de expressão após a transfecção, quando comparado

aos níveis endógenos, indicando que o receptor foi realmente superexpresso. O padrão de expressão nesta linhagem se manteve temporalmente e de acordo com o tratamento com ligante, quando comparamos as células não transfectadas e transfectadas, havendo apenas um aumento na taxa de expressão. Sem ligante, o PPAR γ tem sua expressão diminuída temporalmente, enquanto a presença do ligante é capaz de manter a expressão do receptor nuclear conforme o tempo. Considerando a questão temporal para ambas as condições, o PPAR γ parece ter uma melhor taxa de expressão entre 24 e 36 horas após a transfecção, intervalo que foi utilizado para a coleta das células para os ensaios de imunoprecipitação.

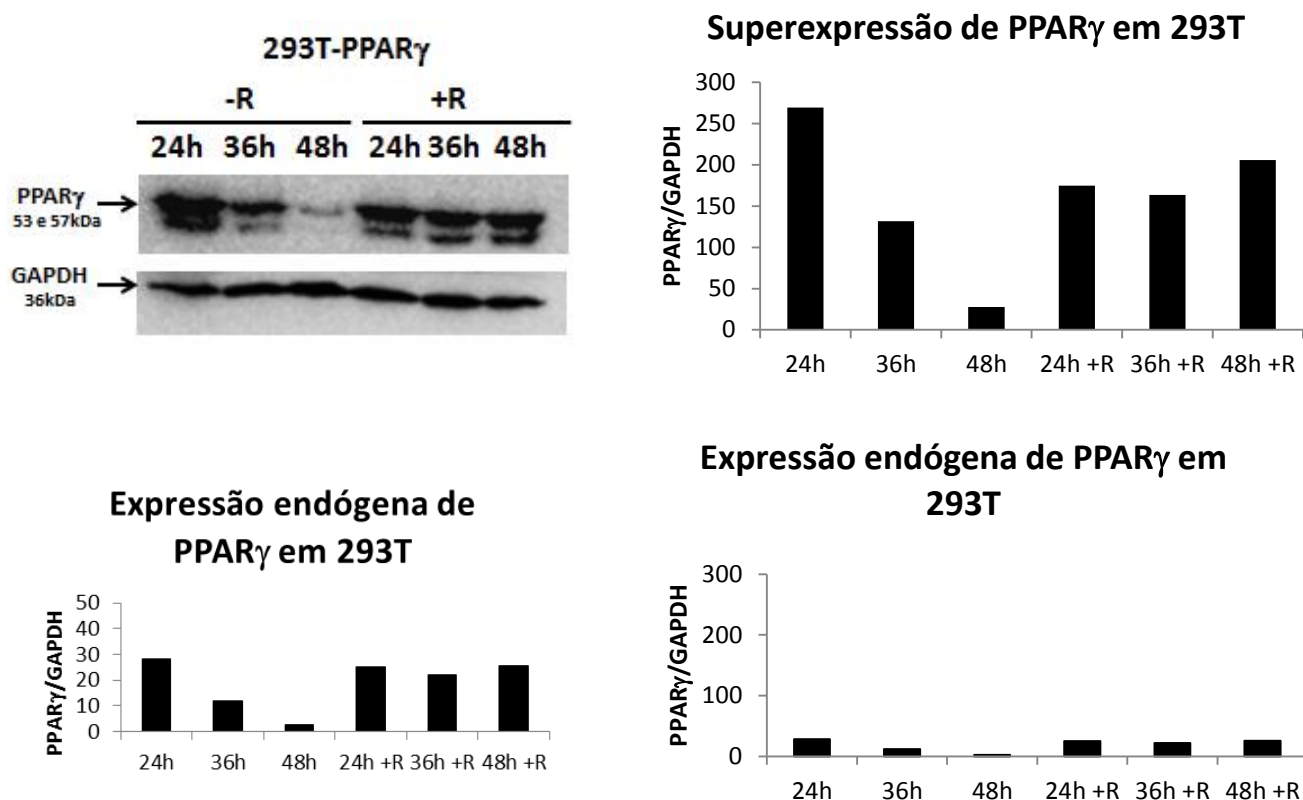


Figura 6. Comparação entre os níveis de expressão endógeno e após transfecção em 293T. Os *western blots* à esquerda foram feitos a partir do teste temporal para verificar níveis de PPAR γ endógeno nas células da linhagem 293T em diferentes intervalos de tempo após tratamento com o ligante rosiglitazona (R) e do teste temporal para PPAR γ superexpresso nesta linhagem por transfecção, sob as mesmas condições. À direita estão os gráficos das quantificações da intensidade das bandas (ImageStudio LI-COR) em relação ao controle (GAPDH).

5.3. Imunoprecipitação (IP) de PPAR γ em 293T

Após verificação da superexpressão de PPAR γ em 293T por microscopia de fluorescência e por *western blot*, as células nas condições transfectadas sem e com tratamento com ligante e não transfectadas sem e com tratamento com ligante (controles) foram lisadas e os extratos celulares imunoprecipitados utilizando a resina ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma Aldrich).

Após a eluição foi feito um *western blot* para certificar a IP. O *western blot* foi feito tanto utilizando os anticorpos primários anti-FLAG (Sigma Aldrich) como o anti-PPAR γ (Cell Signaling) e o resultado foi positivo nos dois casos. No entanto, quando foi utilizado o anticorpo anti-FLAG aparecem bandas inespecíficas devido ao reconhecimento das cadeias leve e pesada da imunoglobulina FLAG (em torno de 25 e 50 kDa respectivamente), pelo anticorpo secundário (anti-*mouse*, no caso). A figura 7 apresenta os *westerns blots* utilizando o anticorpo anti-PPAR γ proveniente de coelho e o anticorpo secundário anti-*rabbit*. Desta forma, certificou-se que as bandas correspondentes à eluição da imunoprecipitação realmente se referiam ao PPAR γ imunoprecipitado e não somente à cadeia pesada da IgG.

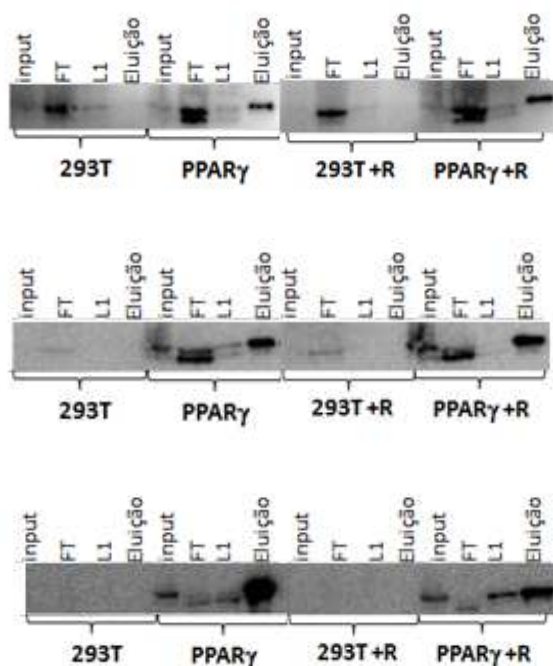


Figura 7. Três experimentos independentes de imunoprecipitação (IP) de FLAG-PPAR γ usando a resina anti-FLAG. As amostras foram aplicadas seguindo as condições controle (293T)/experimento (PPAR γ) sem ligante e depois com ligante (+R), sempre na mesma ordem: input (que mostra FLAG-PPAR γ presente antes da IP), FT (*flowthrough*, que se refere às proteínas que não se ligaram à resina, L1(primeira lavagem após a retirada do FT) e Eluição, onde deve ser observada a presença de FLAG-PPAR γ . A altura observada para as bandas é de aproximadamente 53 kDa.

Após confirmar a presença de PPAR γ nas eluições, as mesmas foram corridas em gel SDS-PAGE (Figura 8) e as canaletas recortadas, digeridas e então seguiram para análise em espectrometria de massas (LC-MS/MS).

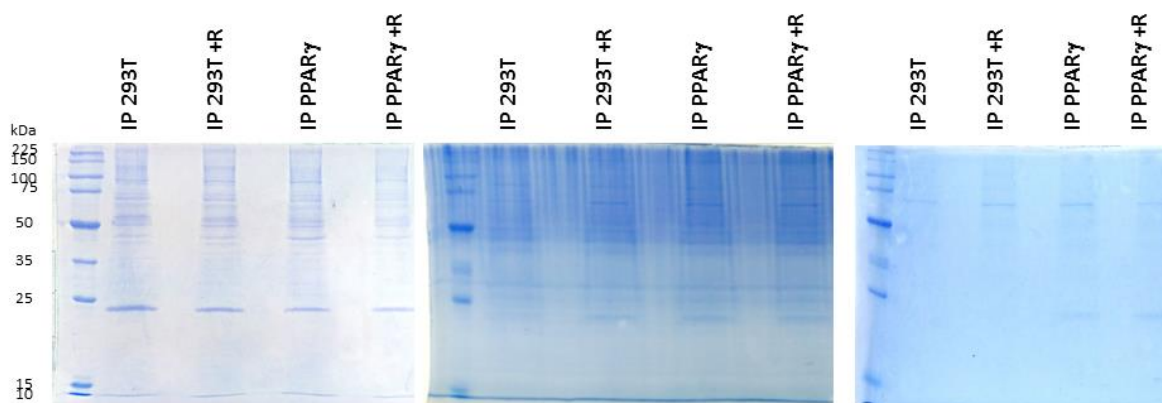


Figura 8. Géis SDS-PAGE das eluições da triplicata das IPs. A ordem de aplicação das amostras foi primeiramente os controles 293T e 293T tratado com Rosiglitazona (R), seguido das amostras imunoprecipitadas de extratos transfectados com PPAR γ , sem e com tratamento (PPAR γ e PPAR γ +R). Todas as canaletas onde foram aplicadas amostras foram recortadas, digeridas e submetidas à LC-MS/MS.

Após processamento dos dados e geração das planilhas com as proteínas encontradas na IP-LC/MS/MS, o primeiro passo foi subtrair da lista total todas aquelas que também imunoprecipitaram nos controles (293T sem transfecção), ou seja, que são considerados ligações inespecíficas. Por exemplo, se uma proteína aparece na amostra 293T, e ela também aparece na amostra PPAR γ , automaticamente este possível parceiro é eliminado.

Em seguida, foram verificadas as triplicatas de cada amostra e separadas as proteínas que apareceram apenas uma vez das que apareceram em dois ou três experimentos independentes. Isto, pois as últimas apresentam maior possibilidade de real interação com o receptor nuclear por terem aparecido mais de uma vez, o que não descarta a possibilidade de parceiros encontrados em apenas um dos experimentos realmente interagirem com o PPAR γ e poderem aparecer novamente se o número de experimentos independentes realizados fosse maior. Muitos parceiros encontrados em apenas um experimento da triplicata são de grande interesse, e outra possível justificativa para o menor aparecimento destes é a possibilidade de alguns deles interagirem rapidamente com o PPAR γ , sendo tais interações não detectadas no momento dos outros experimentos. Todos os potenciais parceiros de PPAR γ precisam ter suas interações com o receptor

confirmadas por outros métodos, como por exemplo por co-immunoprecipitação, para que então possam ser de fato considerados proteínas parceiras.

Foram criadas duas listas de interações seguindo este critério e estas podem ser disponibilizadas posteriormente.

O número de parceiros de interação que apareceram em apenas um experimento foi maior que aqueles encontrados em ao menos dois experimentos. Foram encontrados 393 parceiros para um experimento e 46 para dois ou mais experimentos (Tabela 1). No entanto, apesar de números menores, a confiabilidade é maior conforme a proteína interactora é encontrada em mais de um experimento, devendo-se investir mais nestes parceiros, não descartando aqueles que apareceram em apenas um experimento pelos motivos discutidos anteriormente.

Tabela 1. Número de peptídeos encontrados na IP-LC-MS/MS dos TRs.

PPARγ	2 ou 3 experimentos	1 experimento
Número de peptídeos encontrados	46	393
Interações inéditas	45	386

Para os parceiros encontrados em dois ou três experimentos, foi feita uma análise quanto às proteínas que apareceram nas condições sem e com tratamento com ligante (Figura 9), visando entender se o ligante interfere na atuação do receptor de alguma forma. No entanto, nota-se que a presença do ligante não influencia no número de interações e nem mesmo no tipo de via ou processo biológico em que o PPAR γ está atuando como será descrito adiante.

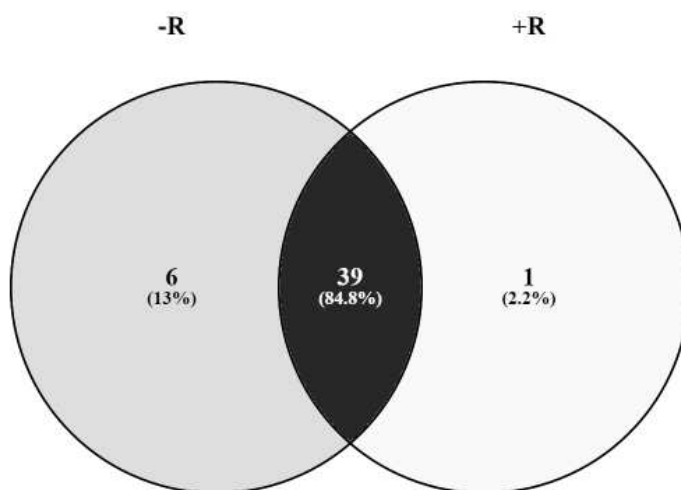


Figura 9. Diagrama de Venn ilustrando os parceiros encontrados nas condições sem ligante (-R) em cinza, com ligante (+R) em branco e a intersecção em preto mostra aqueles encontrados em ambas as condições.

Além disso, apesar da maioria das interações serem inéditas, foram encontrados parceiros conhecidos descritos para o PPAR γ , aumentando assim também a confiabilidade dos experimentos. Dentre estes estão as proteínas: RXR α (Receptor de Retinóide X α), outro receptor nuclear que se liga ao PPAR γ formando um heterodímero para que ocorra o processo de regulação da transcrição de genes-alvo (BARDOT et al., 1993; ISSEMANN et al., 1993); CDK5 (*Cyclin-Dependent Kinase 5*), que fosforila o PPAR γ na Ser273, levando à desregulação na expressão de genes relacionados à obesidade e sensibilização à insulina (CHOI et al., 2011; KAMENECKA et al., 2010); NCoR1 (*Nuclear Corepressor 1*), um corepressor de PPAR γ (KARAGIANNI; WONG, 2007; NAGY et al., 1997), entre outras. Outras interações já conhecidas de PPAR γ apareceram tanto em dois ou três experimentos como em um só, no entanto, para algumas destas, peptídeos também foram detectados nos controles, possivelmente por problemas no *setup* do espectrômetro de massas, então, mesmo assim, foram excluídas.

5.4. Análise dos dados de IP em 293T

5.4.1. Descrição de alguns alvos encontrados

Dentre as proteínas encontradas em dois ou mais experimentos, destacamos algumas cuja interação com o PPAR γ parece envolvê-lo em processos biológicos inéditos ou desvendar novos detalhes sobre seu mecanismo de ação em processos biológicos já descritos.

PPAR γ e fosfatases

Assim como outros receptores nucleares, o PPAR γ é uma fosfoproteína e sua atividade transcricional pode ser afetada por *crosstalk* com quinases e fosfatases (BURNS; HEUVEL, VANDEN, 2007). Sabe-se sobre a fosforilação de PPAR γ por diversas quinases, entre elas a MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que é regulada por ativadores como insulina, e fosforila o receptor causando uma diminuição em sua atividade transcricional (HU et al., 1996). ERK2 e JNK também são capazes de fosforilar PPAR γ no mesmo sítio (ADAMS et al., 1997; CAMP et al., 1999). A proteína quinase A (PKA) também fosforila PPAR γ , mas ao contrário das MAPKs, a fosforilação leva a efeitos de aumento na transcrição tanto basal, como induzida por ligante (LAZENNEC et al., 2000). Outro estudo mostra que efeitos adversos das TZDs como edema e retenção de líquidos podem ser parcialmente devidos à ativação da PKC (Proteína quinase C) no tecido adiposo, e esta por sua vez é capaz de fosforilar o PPAR γ presente neste tecido, levando a tais efeitos (SOTIROPOULOS et al., 2006). Além disso, aumentando a confiabilidade dos experimentos realizados, duas proteínas quinases já descritas como interactoras de PPAR γ foram encontradas nos experimentos de IP: a AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*), que reprime a função de transativação do receptor, tanto dependente como independente de ligante (LEFF, 2003; SOZIO et al., 2011) e a CDK5, que fosforila o PPAR γ causando efeitos ligados à obesidade (CHOI et al., 2011).

No entanto, pouco se sabe sobre a(s) fosfatase(s) responsável(is) pela desfosforilação do receptor. Alguns estudos indicam a relação de PPAR γ com a fosfatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), no âmbito da transcrição, isto é, PPAR γ regula sua transcrição gênica (LEE et al., 2005; PATEL et al., 2001),

porém o mecanismo de desfosforilação do PPAR γ e qual a proteína responsável por tal modificação pós-traducional são fatores desconhecidos.

A proteína **fosfatase PP2A**, codificada pelo gene PPP2CA, e também seu regulador **TIPRL** (*TOR signalling pathway regulator-like*) foram encontrados em dois dos experimentos de IP. Estas são interações inéditas para o PPAR γ , contudo, já foi descrito que a expressão do isotipo α de PPAR está relacionada com a ativação de PP2A em células beta pancreáticas (RAVNSKJAER et al., 2006) e que PP2A pode ser aumentada por PPAR α em células de hepatoma (MUZIO et al., 2007).

A PP2A é uma serina/treonina fosfatase envolvida na manutenção da homeostase celular, que regula negativamente algumas cascatas de sinalização relacionadas ao câncer como as de MEK, Wnt e AKT, sendo assim considerada um supressor tumoral (EICHHORN et al., 2009; PERROTTI; NEVIANI, 2008). Estudos mostram que TIPRL interage com PP2A, sendo um regulador desta proteína por meio da inibição de sua atividade catalítica, podendo também atuar em algum ponto do processo de biogênese da enzima. Ele também regula a via de sinalização de mTOR e a inibição de apoptose (SCORSATO et al., 2016; SMETANA; ZANCHIN, 2007). O PPAR γ possui sítios de fosforilação dotados de serinas e treoninas, sendo assim um possível alvo de desfosforilação por PP2A. Desta forma, as três proteínas poderiam interagir neste contexto de desfosforilação do PPAR γ pela PP2A e regulação da enzima por TIPRL. Outro possível contexto de interação destas proteínas poderia ser o processo biológico de apoptose, visto que PP2A desfosforila diversas proteínas envolvidas em vias de sinalização deste processo (KLUMPP, 2002) e muitas destas foram encontradas como parceiros de PPAR γ em ao menos um experimento, como será descrito adiante. Outra fosfatase da mesma família da PP2A, a fosfatase 5 (PP5) já foi descrita como proteína parceira do PPAR γ , influenciando no metabolismo de lipídeos (HINDS et al., 2011). É importante ainda ressaltar dois fatores: o Ativador da Proteína Serina/Treonina Fosfatase 2A (**PTPA**), um regulador de PP2A, apareceu em um dos experimentos; e, além disso, já foi descrito que PP2A interage com NCoR (LU et al., 2010), um correpressor de PPAR γ , aumentando assim as possibilidades de complexos de interação entre o PPAR γ e a PP2A.

Outra proteína relacionada à fosfatases encontrada em dois experimentos da triplicata de IPs foi um **regulador da proteína fosfatase 1C** (PP1C), codificado pelo gene PPP1R12A. A fosfatase alvo deste regulador se associa com mais de 200 proteínas regulatórias formando holoenzimas específicas capazes de desfosforilar centenas de alvos biológicos. Esta fosfatase interage com o receptor de vitamina D (VDR), que induz sua atividade catalítica de forma dependente de ligante (BETTOUN, 2002). Este mesmo estudo afirma que, ao menos em leveduras, esta fosfatase não é capaz de interagir com os receptores nucleares RAR e RXR. Nada foi descrito a respeito da interação com PPARs, sendo, portanto, um possível modo de explicação desta interação com um de seus reguladores.

Outras fosfatases que são interações inéditas para o PPAR γ apareceram em apenas um experimento da triplicata. Dentre elas está a Proteína Fosfotirosina Fosfatase de Baixo Peso Molecular (**LMW-PTP** – *Low Molecular Weight Phosphotyrosine Phosphatase Protein*), cuja relação com o PPAR α já foi descrita em um mecanismo que envolve o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e moléculas de glutathiona e glutaredoxina (URATA et al., 2010), mas nada foi descrito para o isotipo γ . O PPAR γ pode ser fosforilado em resíduos de tirosina como descrito no estudo de Keshet e colaboradores, que afirma que esta fosforilação ocorre na região AF-1 (KESHET et al., 2014). Desta forma, é possível que tirosina fosfatases desfosforilem o receptor e a LMW-PTP poderia ser uma das proteínas a desempenhar esta atividade. Outra tirosina-fosfatase que apareceu em uma das IPs foi a Proteína Tirosina Fosfatase tipo 4a2 (**PTP4A2**). Esta enzima está envolvida em diversos tipos de câncer, dentre eles o câncer de mama (KWOK et al., 2015), onde sua expressão está relacionada à expressão dos receptores nucleares ER e PR (ANDRES et al., 2013), mas nada ainda foi descrito para o PPAR γ .

Quanto à serina/treonina fosfatases que apareceram em apenas um dos experimentos, a primeira delas foi a Fosfoserina Fosfatase (**PSPH**), uma interação inédita para o PPAR γ . Estudos apontam a relação desta enzima com o ER em células de câncer de mama suplementadas com insulina (WAIRAGU et al., 2015), mas nenhuma relação com qualquer isotipo de PPAR foi mencionada na literatura.

A proteína fosfatase 1 (**PPP1**) também teve uma de suas subunidades regulatórias (subunidade 7) imunoprecipitada em uma das IPs. Uma relação entre

esta fosfatase e o PPAR γ já foi descrita no tecido muscular, especificamente para a subunidade regulatória 3 da enzima, cuja mutação simultânea de ambas as proteínas causa severa resistência insulínica em pacientes (CHATTERJEE, 2004). Esta fosfatase já foi descrita como interagindo com outros receptores nucleares, dentre eles o Receptor de Androstano Constitutivo (CAR) e o Receptor de Pregnano X (PXR), ambos sensores de xenobióticos desfosforilados pela enzima (SUEYOSHI et al., 2008; SUGATANI et al., 2014). Além disso, um estudo mais antigo indica que a enzima é capaz de interagir com o corressor de PPAR γ NCoR (HERMANSON et al., 2002), que também apareceu nos experimentos, evidenciando assim possíveis combinações de complexos de interação.

PPAR γ e metabolismo de lipídeos e insulina

O PPAR γ tem função crucial na adipogênese e na sensibilização à insulina. Dentre os principais processos biológicos que o receptor participa estão aqueles que envolvem vias de metabolismo de insulina, glicose e lipídeos, processos intimamente ligados a patologias da síndrome metabólica, principalmente ao diabetes do tipo 2. Diversos parceiros inéditos encontrados nas IPs estão envolvidos nestes processos, podendo desvendar melhor o mecanismo de ação pelo qual o PPAR atua.

Quanto ao metabolismo de lipídeos, a proteína parceira 3-hidroxil-CoA desidratase (**HACD3**) atua na elongação de ácidos graxos de cadeia longa (IKEDA et al., 2008) e também está envolvida no metabolismo de insulina por meio da internalização de seu receptor (BOUTCHUENG-DJIDJOU et al., 2015), no entanto nunca foi descrita uma relação entre esta proteína e um receptor nuclear.

A proteína parceira Lanosterol 14- α - desmetilase (**CYP51**), uma enzima do citocromo p450, também está envolvida no metabolismo de lipídeos, mais propriamente na biossíntese de colesterol (LEWIŃSKA et al., 2013), cujo aumento na circulação sanguínea pode levar ao surgimento de hipercolesterolemia e aterosclerose, patologias da síndrome metabólica. A interação entre esta proteína e o PPAR α já foi descrita em vias de metabolismo de colesterol no fígado, onde o receptor está envolvido com a manutenção de níveis circulantes da molécula (HUANG et al., 2016), além de outros estudos indicarem que o tratamento de

pacientes com síndrome metabólica com agonistas potentes deste isotipo de PPAR aumenta o efluxo desta molécula (LUSCHER, 2015). No entanto, nada foi dito sobre interação de CYP51 com o isotipo γ . O PPAR γ está envolvido no metabolismo de colesterol por meio do controle da expressão de CD36 em macrófagos, molécula responsável por internalizar LDL e levar à formação de células espumosas (*foam cells*), as quais são responsáveis pela formação de placas que levam à aterosclerose (YU et al., 2016). A interação de PPAR γ e CYP51 pode evidenciar outro mecanismo de ação do receptor nuclear no metabolismo de colesterol.

Outro parceiro inédito de PPAR γ encontrado relacionado ao metabolismo de lipídeos é o transportador de ácidos graxos de cadeia longa **ABC D3** (*ATP-binding cassette subfamily D 3*). A relação entre esta proteína e os PPARs se dá devido ao fato desta proteína transportar ligantes naturais destes receptores nucleares (KARNATI; BAUMGART-VOGT, 2008). Estudos apontam a relação entre a expressão de ABCD3 e PPAR α (HIRAI et al., 2007), mas nada foi descrito quanto ao isotipo γ .

Um parceiro inédito de PPAR γ que está relacionado à biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa e à gliconeogênese é a proteína de transporte de tricarboxilato (**SLC25A1**). Não há registros de interação entre esta proteína e qualquer receptor nuclear na literatura. Trata-se de uma proteína mitocondrial, também chamada de transportador mitocondrial de citrato (CIC ou CTP), que se localiza na membrana interna da mitocôndria e cuja função principal é promover o efluxo de citrato tricarboxílico para o citoplasma em troca por malato dicarboxílico citossólico (PALMIERI; PIERRI, 2010; SUN et al., 2010). Aproximadamente 20% dos parceiros encontrados nas IPs são proteínas de mitocôndria, o que por si só é um fato inédito para o PPAR γ , como será descrito posteriormente na análise de compartimento celular dos parceiros. Desta forma, a interação entre PPAR γ e SLC25A1 pode se dar neste compartimento celular. No entanto, este parceiro mitocondrial especificamente é expresso em diversos tipos de tumor, assim como o PPAR γ e sua interação com o receptor também pode ocorrer neste contexto (CATALINA-RODRIGUEZ et al., 2012; KOLUKULA et al., 2014).

Outros parceiros muito interessantes para o PPAR γ , envolvidos em processos relacionados à síndrome metabólica apareceram em apenas um experimento. Alguns deles já tem interação descrita com PPARs, como é o caso da aldeído desidrogenase (**FALDH**), que tem um elemento responsivo do tipo DR-1 em seu promotor e tem sua expressão modulada por PPAR α (ASHIBE; MOTOJIMA, 2009). A síndrome de Sjögren-Larsson (SLS) é causada devido a mutações nesta proteína e a terapia utilizando agonistas de PPAR α vem sendo estudada (RIZZO, 2016). Uma isoforma desta proteína já foi inversamente correlacionada ao PPAR γ em estudo que mostrou que a diminuição da expressão do receptor nuclear aumenta a expressão da enzima, e vice-versa, em células tumorais ou em tecidos em regeneração (ORALDI et al., 2011). O transportador de monocarboxilato 1 (**MCT1**) também apareceu como proteína interactora de PPAR γ em um dos experimentos, embora até o momento apenas a relação com o PPAR α tenha sido descrita (BENESCH et al., 2014; KÖNIG et al., 2008, 2010). Além de atuar como transportador de monocarboxilato, esta proteína está envolvida na regulação de vias metabólicas centrais e na secreção de insulina com efeitos concomitantes nos níveis sanguíneos de insulina e na homeostase de glicose no sangue (OTONKOSKI et al., 2007).

A apolipoproteína L2 (**APOL2**) também foi encontrada em um dos experimentos. Trata-se de uma proteína citoplasmática envolvida na movimentação de lipídeos na célula. Um estudo infere que possa haver uma relação no âmbito da transcrição entre PPAR γ e APOL2, visto que há um elemento responsivo do receptor no promotor do gene desta proteína. Este mesmo estudo mostra que a expressão de APOL2 aumenta devido à expressão de PPAR γ durante a adipogênese, assim como o silenciamento de PPAR γ em células HepG2 é capaz de diminuir a expressão de APOL2 em até 50% (NAGARAJ et al., 2014)

Outra interação muito interessante encontrada em apenas um dos experimentos é entre PPAR γ e a enzima degradadora de insulina (**IDE**). Esta enzima é uma protease que atua na degradação de β -amilóide e insulina, e sua deficiência está associada com doenças graves como Alzheimer e diabetes tipo 2. Os níveis desta proteína são baixos em pacientes diabéticos e positivamente correlacionados com os níveis de PPAR γ . Em neurônios de camundongos o PPAR γ regula a

expressão de IDE se ligando a um PPRE em seu promotor. Além disso, o mesmo estudo sugere que o PPAR γ participa da expressão de IDE induzida por insulina em neurônios humanos, sugerindo novos mecanismos para o uso de agonistas de PPAR γ no tratamento de Alzheimer e diabetes tipo 2 (DU et al., 2009; QUAN et al., 2013).

PPAR γ e proteínas envolvidas em câncer

O receptor nuclear ER é expresso em diversas linhagens de câncer de mama. Um estudo mostra que o parceiro **MMS19** (proteína sensível ao metilmetanosulfonato 19), encontrado em duas IPs, que atua no reparo de DNA e como regulador transcricional, é um coativador específico da região AF-1 deste receptor nuclear (WU et al., 2001). Trata-se da única interação descrita desta proteína com um receptor nuclear. O contexto da interação com PPAR γ pode ser o mesmo, já que também se trata de um receptor nuclear com a função de ativação da transcrição 1. Esta proteína também foi descrita em câncer de ovário (MOXLEY et al., 2013), esôfago (ZHANG, 2015) e pâncreas (MCWILLIAMS et al., 2009), assim como o PPAR γ (NINOMIYA et al., 2014; SHIGETO et al., 2007; WU et al., 2014).

BRCA1 E BRCA2 também foram parceiros encontrados em um único experimento. Tratam-se de supressores tumorais, cuja mutação pode predispor os pacientes a cânceres de mama e ovário. BRCA1 é uma proteína que atua no reparo do dano ao DNA, enquanto BRCA2 é uma mediadora do mecanismo de recombinação homóloga (ROY et al., 2011). Já foi descrita a presença de um PPRE na região promotora do gene de BRCA1 e PPAR γ é um fator de transcrição crucial na expressão de BRCA1, podendo ser importante nas vias em que esta proteína atua em câncer (APOSTOLI et al., 2015; PIGNATELLI et al., 2003). Já quanto à relação entre BRCA2 e PPAR γ nada foi descrito na literatura.

As listas de peptídeos obtidas por LC-MS/MS foram carregadas na plataforma IIS, a partir da qual foram feitas as análises dos interactomas através de softwares para análise de dados de proteoma (Cytoscape e MetaCore).

5.4.2. IIS e Cytoscape – Construção do interactoma

Para melhor analisar o panorama de interações realizadas pelo PPAR γ , os resultados de IP foram adicionados no IIS e um arquivo de interactoma foi gerado para as duas listas organizadas: parceiros que apareceram em dois ou três experimentos e parceiros que apareceram em um único experimento. O interactoma foi organizado no Cytoscape para os dois casos. Nessas redes de interação, foram feitos dois tipos de análise: de acordo com os processos biológicos em que as proteínas atuam e de acordo com o compartimento celular em que são encontradas.

Primeiramente, cada proteína (identificada por um código UNIPROT) foi classificada de acordo com o principal processo biológico em que atua ou *Top Enriched Biological Process* (TEBP), segundo o banco de dados do *Gene Ontology* (ASHBURNER et al., 2000; GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2015), sendo o enriquecimento feito de acordo com o melhor *p-value* dentre os processos biológicos que aquela proteína participa. Em seguida, a árvore inferida para cada TEBP foi analisada e aqueles processos que se juntavam em um ramo superior foram agrupados e renomeados como mostrado nos interactomas a seguir (Figuras 10 e 11).

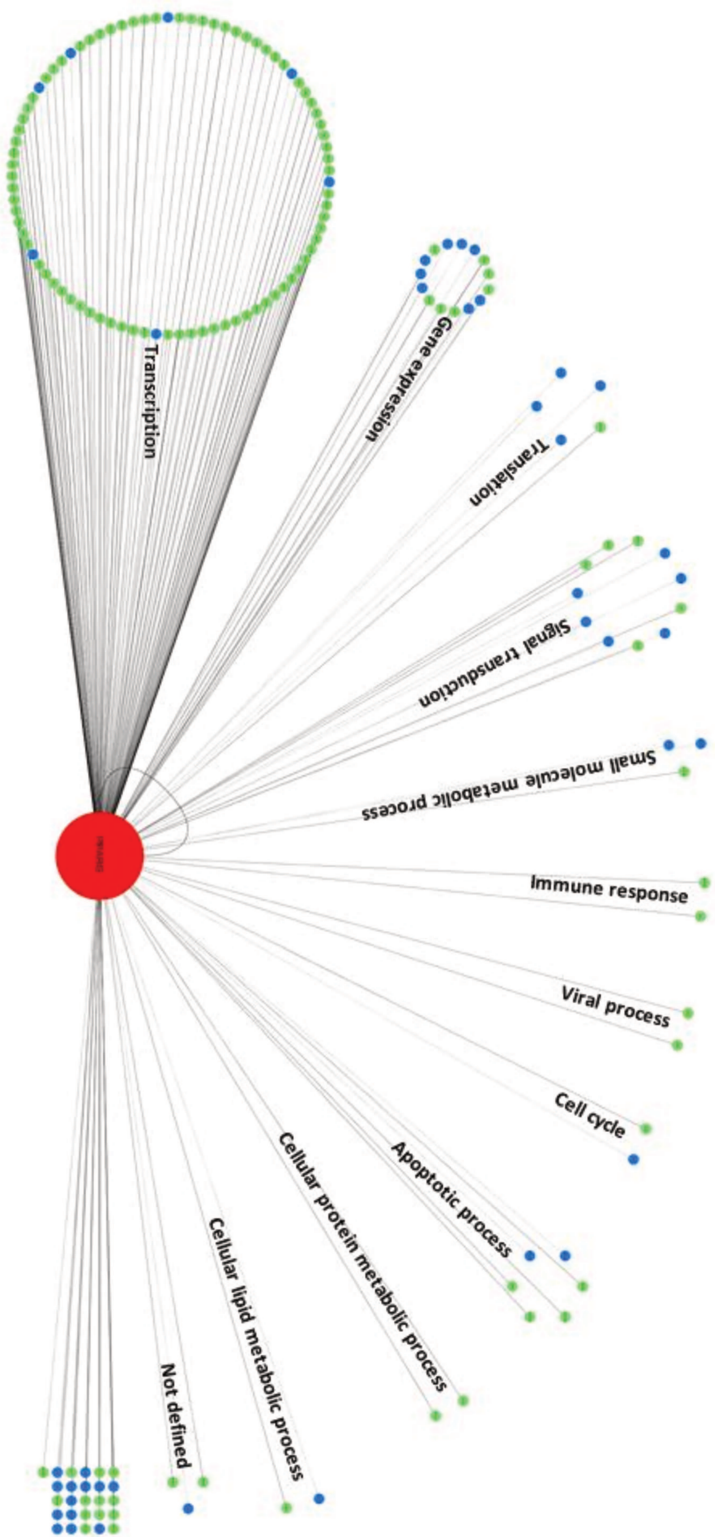


Figura 10. Rede de interações da IP de parceiros de PPAR γ que apareceram em 2 ou mais experimentos agrupados por processos biológicos. A rede foi gerada no IIS e visualizada e organizada no Cytoscape. As proteínas foram agrupadas de acordo com os TEBP (*Top Enriched Biological Processes* – Gene Ontology) em comum. No quadrado estão agrupadas as proteínas que participavam de processos biológicos únicos. Em vermelho está a isca, PPAR γ . Em verde, os parceiros já descritos pela literatura, juntamente com interações retiradas do banco de dados. Em azul, os parceiros inéditos encontrados pela IP.

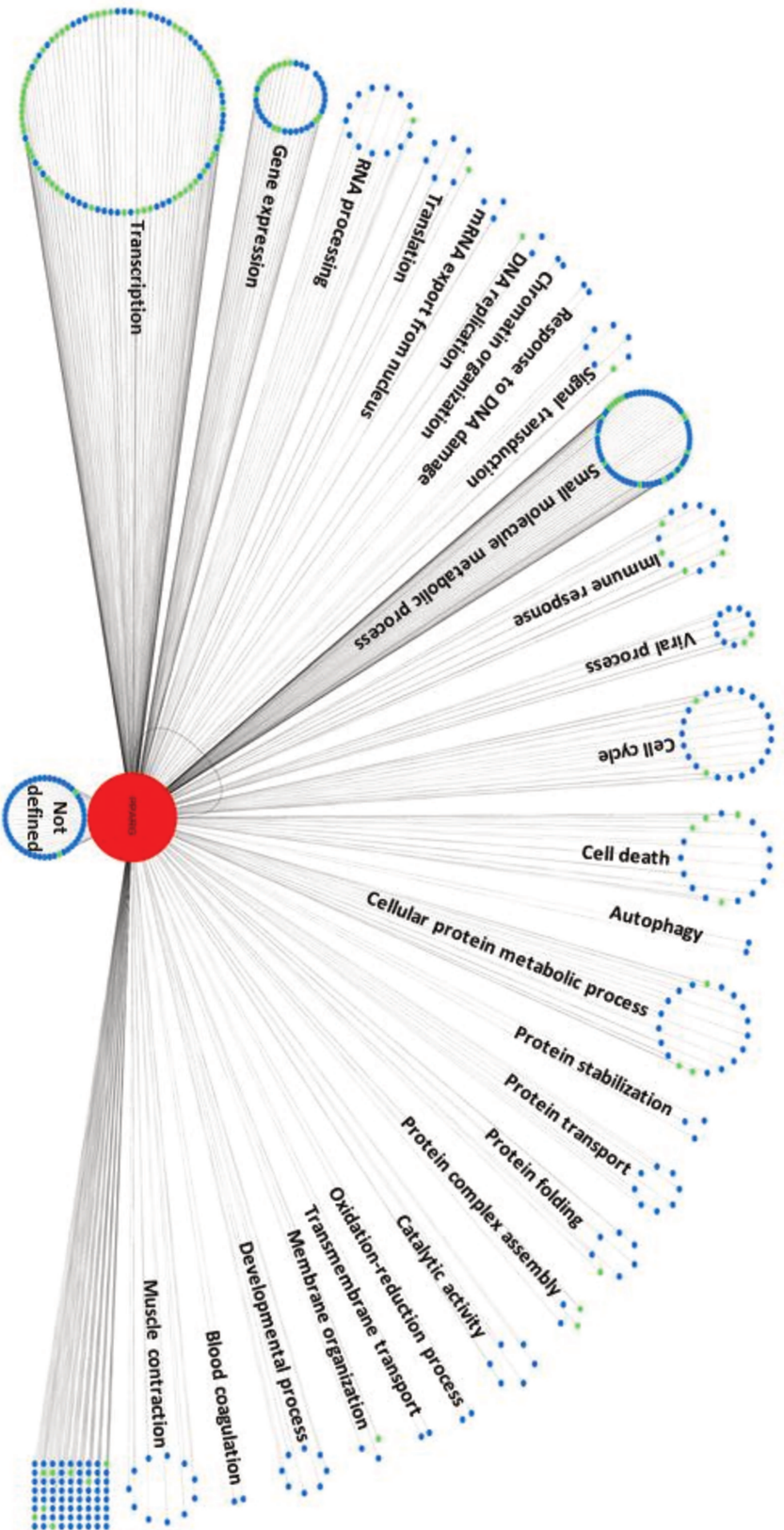


Figura 11 Rede de interações da IP de parceiros de PPAR γ que apareceram em apenas um experimento da triplicata agrupados por processos biológicos. A rede foi gerada no IIS e visualizada e organizada no Cytoscape. As proteínas foram agrupadas pelos TEBP (*Top Enriched Biological Processes* – Gene Ontology) em comum. No quadrado estão agrupadas as proteínas que participavam de processos biológicos únicos. Em vermelho está a isca, PPAR γ . Em verde, os parceiros já descritos pela literatura, juntamente com interações retiradas do banco de dados. Em azul, os parceiros inéditos encontrados pela IP.

Como mencionado anteriormente, as redes não foram montadas separando proteínas que interagiram de acordo com as condições sem e com tratamento com ligante (rosiglitazona), pois o ligante pareceu não influenciar na interação de PPAR γ com outras proteínas, já que a grande maioria dos parceiros interagiu nas duas condições e não houve interações de processos específicos que ocorressem em apenas uma condição, pelo menos para aqueles encontrados em dois ou mais experimentos.

Nas figuras, em vermelho está o PPAR γ , isca com a qual as proteínas interagiram. Em verde, aparecem as proteínas parceiras já descritas na literatura, tanto as que apareceram nos experimentos deste trabalho como aquelas já confirmadas como parceiras de PPAR γ em outros estudos, uma vez que já estão armazenadas em bancos de dados. Em azul estão os parceiros inéditos encontrados nas IPs. Desta forma, observando as cores das proteínas agrupadas em cada processo pode-se inferir sobre novos processos biológicos dos quais o PPAR γ pode participar ou observar novos modos de participação em processos já bem descritos. As proteínas que apareceram atuando em processos individuais específicos, isto é, que não tiveram ao menos uma dupla atuando no mesmo processo, foram agrupadas no quadrado à direita. Algumas proteínas ainda não tiveram um TEBP definido e foram agrupadas no grupo *Not Defined*.

Observando o interactoma montado para proteínas que apareceram em dois ou três experimentos (Figura 10), as quais são potenciais parceiros mais confiáveis de PPAR γ por terem aparecido em mais de um experimento da triplicata, nota-se que o PPAR γ participa de 11 processos biológicos principais, dentre eles processos bem descritos para este receptor como transcrição, expressão gênica e metabolismo de lipídeos, além de interagir com outras 26 proteínas não agrupadas em processos específicos (proteínas agrupadas em um quadrado). Outros processos celulares menos descritos para o PPAR γ , mas não menos importantes, como, tradução, metabolismo de pequenas moléculas, ciclo celular e apoptose, os dois últimos diretamente envolvidos em câncer, também apareceram com cinco, três, duas e seis proteínas interactoras respectivamente. Os cinco processos com

maior número de parceiros neste interactoma são: transcrição, no qual a maioria dos parceiros já foi descrita; expressão gênica e transdução de sinal, que possuem mais da metade dos parceiros inéditos; apoptose, com 1/3 dos parceiros inéditos; e tradução, com apenas um parceiro já descrito.

Já quando se atém ao interactoma de parceiros que apareceram em apenas um experimento (Figura 11), o PPAR γ passa a participar de 27 processos biológicos, sendo 12 deles agrupados apenas por parceiros inéditos, podendo então caracterizar processos biológicos inéditos para o receptor nuclear. Estes são exportação de mRNA do núcleo, organização da cromatina, resposta ao dano no DNA, autofagia, estabilização de proteínas, transporte de proteínas, atividade catalítica, processo de oxidação-redução, transporte transmembrana, desenvolvimento, coagulação sanguínea e contração muscular. Além disso, dentre os demais processos que já possuem parceiros conhecidos, grande parte é composta por muitos parceiros inéditos. Os cinco processos com maior número de parceiros levando em conta este interactoma são transcrição, desta vez com um equilíbrio no número de interações novas e já descritas; processos metabólicos de pequenas moléculas, com maioria de parceiros inéditos; expressão gênica, com aproximadamente 65% de parceiros inéditos; ciclo celular, com 91% de parceiros inéditos; processos metabólicos de proteínas celulares, com quase 85% dos parceiros ainda não descritos; e morte celular, com mais de 75% dos parceiros sendo interações novas para o PPAR γ .

Na segunda forma de análise, as proteínas foram agrupadas na rede de acordo com o principal componente celular em que estão localizadas, utilizando a aba *Selected Cellular Component* do Cytoscape. Esta aba permite separar as proteínas de acordo com um enriquecimento para o principal componente celular em que atuam, não sendo necessariamente o único. Os interactomas organizados desta forma são mostrados a seguir (Figuras 12 e 13).

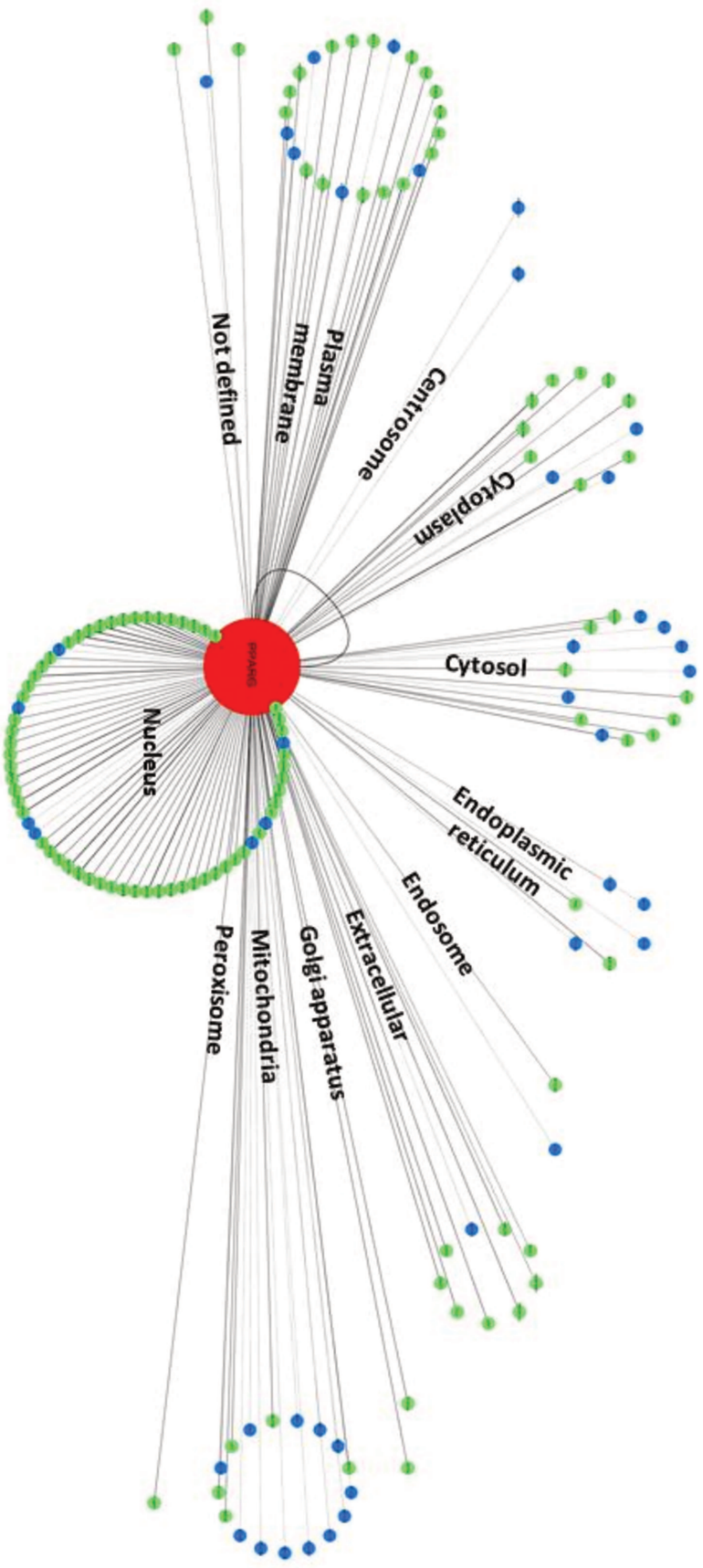


Figura 12. Rede de interações da IP de parceiros de PPAR γ que apareceram em 2 ou mais experimentos agrupados por compartimento celular. A rede foi gerada no IIS e visualizada e organizada no Cytoscape. As proteínas foram agrupadas de acordo com o componente celular (*Selected Cellular Component*) em comum. Em vermelho está a isca, PPAR γ . Em verde, os parceiros já descritos pela literatura, juntamente com interações retiradas do banco de dados. Em azul, os parceiros inéditos encontrados pela IP.

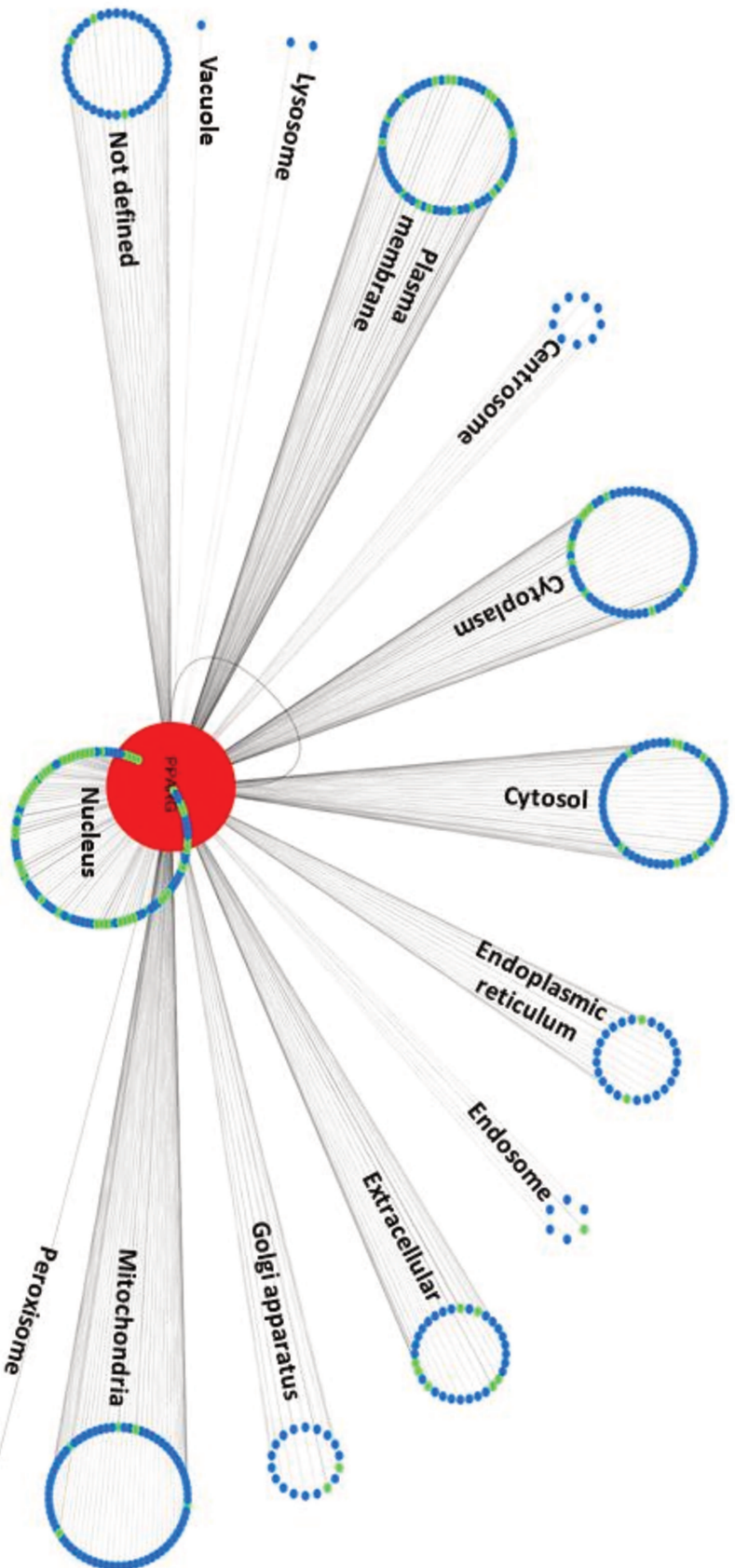


Figura 13. Rede de interações da IP de parceiros de PPAR γ que apareceram em apenas um dos experimentos agrupados por compartimento celular. A rede foi gerada no IIS e visualizada e organizada no Cytoscape. As proteínas foram agrupadas de acordo com o principal compartimento celular (*Selected Cellular Component*) em que estão localizadas. Em vermelho está a isca, PPAR γ . Em verde, os parceiros já descritos pela literatura, juntamente com interações retiradas do banco de dados. Em azul, os parceiros inéditos encontrados pela IP.

Como era esperado, o compartimento celular com maior número de proteínas interactoras de PPAR γ é o núcleo, visto que se trata de um receptor nuclear cujas principais atividades são exercidas nesta organela. No entanto, muitos parceiros já descritos foram agrupados em outros compartimentos como membrana plasmática, citoplasma, outras organelas e até mesmo extracelularmente.

Tanto para o interactoma de parceiros observados em mais de um experimento, como para o de parceiros encontrados em apenas uma IP, alguns compartimentos celulares são praticamente inéditos para o PPAR γ , com poucos ou nenhum parceiro já descrito ali agrupado. Dentre estes estão o centróssomo e a mitocôndria.

O centróssomo é o principal organizador dos microtúbulos em células animais, muito conhecido por seu papel na organização do fuso mitótico (GALLETTA et al., 2016). Ele é importante no posicionamento de organelas, formato das células, polaridade e motilidade das mesmas e também atua na segregação de cromossomos e divisão celular (BAUER et al., 2016). Os centróssomos são formados por dois centríolos embebidos em uma matriz de proteínas, incluindo reguladores do ciclo celular, proteínas relacionadas aos *check points* e moléculas sinalizadoras. A forma precisa como estas proteínas se associam para desempenhar suas muitas funções ainda não é bem entendida, mas muitas observações indicam que os centróssomos são essenciais para muitos processos celulares (CONDUIT et al., 2015; GALLETTA et al., 2016).

Todos os parceiros de PPAR γ encontrados nas IPs que se localizam no centróssomo são inéditos. Apenas uma referência indica que o PPAR γ pode se translocar para o núcleo devido a interações com uma proteína associada a essa estrutura, a CAP350, também encontrada nas IPs, porém este estudo detalha apenas a interação entre esta proteína e o PPAR α , mencionando a possibilidade de interação com os outros isotipos de PPAR, β/δ e γ (PATEL et al., 2005). Dentre os parceiros encontrados cujo principal compartimento celular é o centróssomo, a maioria está relacionada a processos biológicos já descritos nesta organela. São eles: a proteína associada ao centróssomo 350 (**CAP350**), o complexo gama-tubulina (**GCP**), a proteína de checkpoint da montagem de fuso mitótico MAD1

(**MAD1**), a proteína organizadora do fuso mitótico 2B (**MZT2B**), a dinactina (**Dyn**) e a centrina 2 (**CETN2**). Estas proteínas atuam principalmente no ciclo celular, transporte de proteínas e no ancoramento de microtúbulos.

Outras proteínas interactoras que atuam principalmente em processos que não envolvem atividades centrossomáticas também foram agrupadas neste compartimento, dando indícios de que realmente o centrossomo possa ter funções mais diversificadas na célula. Entre elas está a proteína 26 que contém o domínio de repetição anquirina (**ANKRD26**), que está relacionada à obesidade, patologia em que o PPAR γ também atua (ACS et al., 2015). O PPAR γ parece interagir com o domínio anquirina de outras proteínas e, desta forma, a interação com Ankrd26 deve ocorrer nesta interface. Outra parceira que atua no centrossomo em papel distinto é a proteína *zinc-finger* ubi-d4 (**DPF2**). A interação direta entre ela e o ER- α já foi descrita e a DPF2 suprime a atividade deste receptor (MATUSYAMA et al., 2015), mas nada foi descrito para nenhum dos PPARs. Uma possibilidade é a de que a interação entre o PPAR γ e estas proteínas não-tradicionalmente centrossomais possa não ocorrer necessariamente no centrossomo e sim em outras organelas mais comuns tanto para o receptor nuclear, como o núcleo, ou para estas proteínas, como o citoplasma. No entanto, o compartimento mais enriquecido para estas parceiras preditas, segundo o Gene Ontology, é o centrossomo.

Por fim, dentre os compartimentos menos descritos para o PPAR γ , o de maior interesse é a mitocôndria, uma organela muito importante para as células. Ela é envolta por duas membranas e possui genoma próprio herdado maternamente, além de se dividir independentemente da célula em que reside, características herdadas de seus ancestrais, os procariotos. A mitocôndria atua como a máquina energética da célula. Além de regular o processo de produção de energia, esta organela regula outros processos celulares críticos como apoptose, atuando em diferentes aspectos do metabolismo celular. Quanto às suas funções mais estudadas, a mitocôndria é o sítio principal da síntese de ATP em células aeróbicas, usando a energia liberada pela oxidação de combustíveis metabólicos pelo oxigênio. A matriz destas organelas contém enzimas do ciclo do ácido cítrico e da β -oxidação, e é cercada por uma membrana interna que contém quatro complexos da cadeia de transporte de elétrons, além da ATP sintase e transportadores de metabólitos. Esta

organela possui ainda uma membrana externa relativamente permeável e um espaço intermembranas. A síntese de ATP, ou fosforilação oxidativa, depende criticamente da integridade estrutural da organela (PICARD et al., 2011).

Outros receptores nucleares já foram descritos neste compartimento, mas os PPARs não. Um estudo indica que as TZDs, ligantes sintéticos de PPAR, podem ter efeitos na mitocôndria, mas tais efeitos são independentes dos receptores nucleares (SCATENA et al., 2008). Dentre estes efeitos está a indução de estresse oxidativo, um processo intimamente relacionado ao câncer.

Os parceiros encontrados nas IPs deste trabalho agrupados na mitocôndria são todos inéditos. Dos 46 parceiros encontrados em dois ou três experimentos, 11 têm a mitocôndria como compartimento principal, totalizando quase 24%. Já para aqueles encontrados em apenas um experimento, 74 se localizam na mitocôndria, o que indica 19% dos parceiros sendo mitocondriais.

Dentre estes parceiros estão muitas proteínas envolvidas na apoptose. A primeira delas, a **Diablo**, que apareceu em dois experimentos, promove apoptose possibilitando a ativação das caspases na via que relaciona o citocromo C, Apaf-1 e a caspase 9. Esta proteína suprime a atividade de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) (DU et al., 2000). Outra parceira envolvida neste processo é a **Bid** (BH3-interacting domain death agonist), que apareceu em um dos experimentos, cujo fragmento proteolítico induz a apoptose interagindo com as proteínas da família Bcl-2 (Bak e Bax). Ela também permite a liberação de citocromo C e outras proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria (RENSHAW et al., 2004).

O **citocromo C** está relacionado crucialmente à síntese de ATP, mas também tem papel importante na apoptose, pois quando a célula recebe certos estímulos, ele é liberado da mitocôndria e desencadeia o processo apoptótico (OW et al., 2008). Muitas proteínas parceiras que interagem diretamente com esta proteína foram encontradas nos experimentos. Dentre elas estão a **CCHL** (Citocromo-C heme liase), que apareceu em dois experimentos; a **COA** (Citocromo oxidase), que atua na formação dos complexos I e IV da cadeia respiratória e a **RISP** (citocromo C redutase), integrante do complexo III envolvido na cadeia respiratória (KOZJAK-PAVLOVIC et al., 2014).

Além de parceiros localizados na mitocôndria e envolvidos em apoptose, muitas proteínas interactoras presentes neste compartimento estão envolvidas na síntese de ATP. A própria **ATP sintase** foi imunoprecipitada em dois experimentos. Assim, o PPAR γ parece interagir com parceiros mitocondriais envolvidos em diversos processos importantes como apoptose e fosforilação oxidativa, podendo participar destes processos de alguma forma ainda não descrita.

É necessário confirmar a localização do PPAR γ juntamente com estes parceiros na mitocôndria para se afirmar que o receptor pode estar participando destes processos biológicos não usuais para o mesmo. Outra possibilidade é de que estas interações ocorram em compartimentos mais conhecidos para o PPAR γ , como núcleo e citoplasma, e desta forma, a proteína parceira se translocaria até estes locais e a interação poderia se dar ali envolvendo algum outro processo biológico.

5.4.3. MetaCore (Thomson Reuters®)

Foram analisadas via Software MetaCore (módulo *Pathway Maps*, agosto de 2016) as proteínas encontradas em relação às vias em que estão envolvidas, e estas foram agrupadas de acordo com as vias mais enriquecidas (visualização das 10 vias mais enriquecidas, Figuras 14 e 15). A análise foi feita separadamente para proteínas encontradas em dois ou mais experimentos e aquelas que apareceram em um único experimento.

#	Pathway maps	pValue
➔ 1	Mechanism of Pioglitazone/Metformin and Rosiglitazone/Metformin cooperative action in Diabetes mellitus, Type 2	5.449e-4
2	DeltaF508-CFTR traffic/ ER-to-Golgi in CF	6.167e-4
3	wtCFTR traffic / ER-to-Golgi (normal)	6.167e-4
➔ 4	Regulation of lipid metabolism. Regulation of acetyl-CoA carboxylase 2 activity in muscle	7.734e-4
➔ 5	Transcription ChREBP regulation pathway	9.472e-4
6	Immune response. Regulation of T-cell function by CTLA-4	2.786e-3
➔ 7	Regulation of lipid metabolism. Regulation of lipid metabolism via LXR NF-Y and SREBP	3.100e-3
8	Development Beta-adrenergic receptors signaling via Cyclic AMP	5.740e-3
9	Oxidative stress. Role of Sirtuin1 and PGC1-alpha in activation of antioxidant defense system	7.581e-3
10	Neurophysiological process. Activity-dependent synaptic AMPA receptor removal	8.078e-3

Figura 14. MetaCore Pathway Maps para parceiros que apareceram em 2 ou 3 experimentos. Análise das 10 vias mais enriquecidas (agosto de 2016). As setas evidenciam as vias já bem estudadas como transcrição, metabolismo de lipídeos e mecanismo de ação da rosiglitazona.

#	Pathway maps	pValue	
1	Apoptosis and survival. FAS signaling cascades	5.829e-6	
→	2	Mechanism of Pioglitazone and Rosiglitazone action in Diabetes mellitus, Type 2	4.043e-5
→	3	Signal transduction. mTORC1 downstream signaling	5.274e-5
	4	Apoptosis and survival. TNFR1 signaling pathway	6.013e-5
	5	Apoptosis and survival. Role of IAP-proteins in apoptosis	1.250e-4
	6	Apoptosis and survival. Caspase cascade	1.969e-4
	7	Cytoskeleton remodeling	2.355e-4
	8	Cell cycle. The metaphase check point	2.599e-4
	9	Cytoskeleton remodeling. Regulation of actin cytoskeleton by Rho GTPases	4.572e-4
→	10	Mechanism of Pioglitazone/Glimepiride and Rosiglitazone/Glimepiride cooperative action in Diabetes mellitus, Type 2	6.210e-4

Figura 15. MetaCore Pathway Maps para parceiros que apareceram em um único experimento. Análise das 10 vias mais enriquecidas (agosto de 2016). As setas evidenciam as vias já bem estudadas como mecanismo de ação da rosiglitazona e da pioglitazona e transdução de sinal.

Dentre as vias evidenciadas estão as relacionadas aos processos biológicos de **transcrição de genes**, **metabolismo de lipídeos** e **transdução de sinal** e a via que explica o **mecanismo de ação da rosiglitazona e da pioglitazona** (vias indicadas por setas nas Figuras 14 e 15), o que confirma a atuação de parceiros em funções já bem estabelecidas para o PPAR γ e aumenta a confiabilidade dos métodos utilizados.

No mecanismo de ação da rosiglitazona e da pioglitazona o PPAR γ aparece formando um heterodímero com RXR α e, após adição dos ligantes, atua diretamente, acoplado a um complexo de coativadores, na transcrição de genes responsivos à insulina.

Já na transdução de sinal, os dados indicaram o PPAR γ atuando em algumas vias, como na via de sinalização por cAMP em adipócitos e células musculares intestinais, como um dos últimos componentes da mesma, na qual, após uma grande cascata de sinalização, é ativado pelo coativador PGC1- α e em complexo com RXR α , promovendo a transcrição de UCP1 (Mitochondrial brown fat uncoupling protein). Esta proteína participa de processos fisiológicos de termogênese em adipócitos no tecido adiposo marrom e no relaxamento de células musculares intestinais (CAO et al., 2001; SHABALINA et al., 2002).

Outros processos interessantes e menos estudados para o PPAR γ também podem ser observados, como apoptose, regulação do ciclo celular, estresse oxidativo e processos neurofisiológicos.

Dentre os processos biológicos menos estudados para PPAR γ , os dados indicaram o processo de apoptose envolvendo parceiros do receptor em diversas vias. Parte destas vias ocorre na mitocôndria, compartimento discutido anteriormente com grande número de proteínas interactoras. Desta forma, devido à grande possibilidade do PPAR γ estar atuando de alguma forma nestas vias, estas serão descritas a seguir. A apoptose é uma forma de morte celular programada que envolve as caspases, proteases encontradas em células animais como pré-enzimas inativas (SPENCER; SORGER, 2011). Trata-se de um processo biológico diretamente relacionado com diversas doenças, dentre elas o câncer. Este processo pode ser desencadeado por estímulos intrínsecos ou extrínsecos. Na via intrínseca, os estímulos indutores de morte celular envolvem dano ou mau funcionamento nas células gerado por estresse, radiação UV ou ionizante, ativação de oncogenes, exposição a toxinas, dentre outros fatores. Já a via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes extracelulares a receptores transmembrana específicos e algumas vias analisadas no MetaCore serão descritas a seguir.

A primeira delas é a **via de sinalização por Fas** (Figura 16). Os receptores de morte como FasR pertencem à superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF), os quais estão envolvidos em proliferação, diferenciação e apoptose. A ligação de ligantes nestes receptores induz a trimerização dos mesmos, requerida para iniciar o processo de apoptose nas células. A via extrínseca de apoptose, induzida por FasR, faz um *crossstalk* com a via intrínseca pela clivagem de Bid, um parceiro de PPAR γ encontrado em uma IP, pela caspase-8, gerando o fragmento apoptótico tBid (GONG et al., 2004). Na mitocôndria, tBid ativa Bax e desencadeia a liberação das proteínas mitocondriais citocromo C, Diablo e HTRA2 (YAMAGUCHI et al., 2003), todas parceiras de PPAR γ em um ou dois experimentos, indicando que o receptor pode atuar neste contexto de alguma forma. Estas proteínas reforçam a cascata das caspases. O citocromo C induz a oligomerização de Apaf-1 em complexos que recrutam e ativam as caspases-9. Diablo e HTRA2 antagonizam inibidores de apoptose (SAELENS et al., 2004).

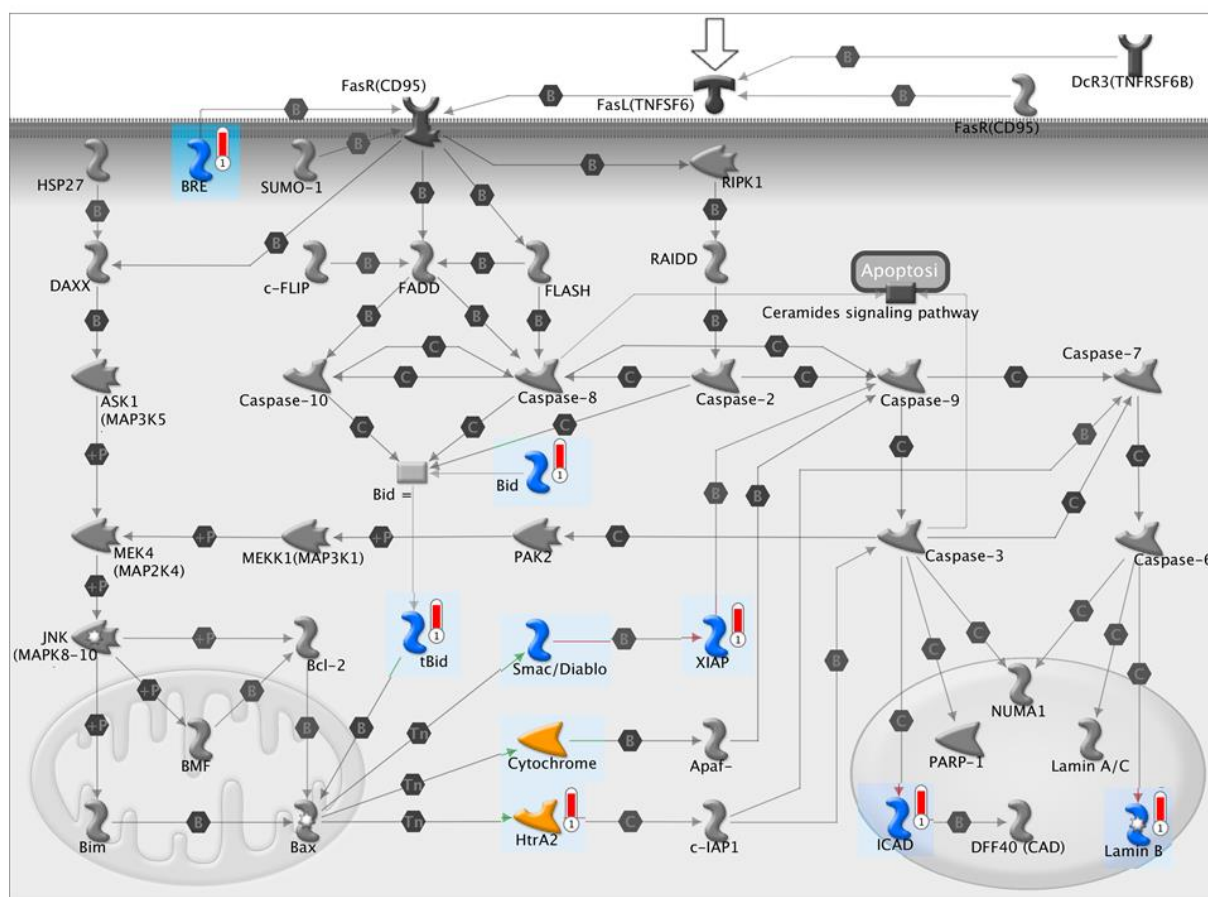


Figura 16. MetaCore Pathway Maps. Via de apoptose relacionada a cascatas de sinalização Fas. Apoptosis and survival FAS signaling cascades. Parceiros de PPAR γ encontrados nos experimentos de IP estão evidenciados em colorido.

Outra via descrita é a **via de sinalização do fator de necrose tumoral alfa (TNF α)** (Figura 17). TNF α , uma citocina produzida por diversos tipos celulares que gera efeitos como proliferação celular, diferenciação e apoptose, induz a ativação da JNK, o que resulta na quebra da proteína apoptótica Bid, um dos parceiros encontrados nas IPs, gerando o produto de clivagem jBid que se transloca para a mitocôndria e libera a proteína Diablo, interactora de PPAR encontrada em 2 experimentos, sem alterar a localização do citocromo C. No citoplasma, Diablo se liga a c-IAP1, c-IAP2 e XIAP, outro parceiro de PPAR γ , abolindo a ação inibitória nas caspases, o que leva à apoptose.

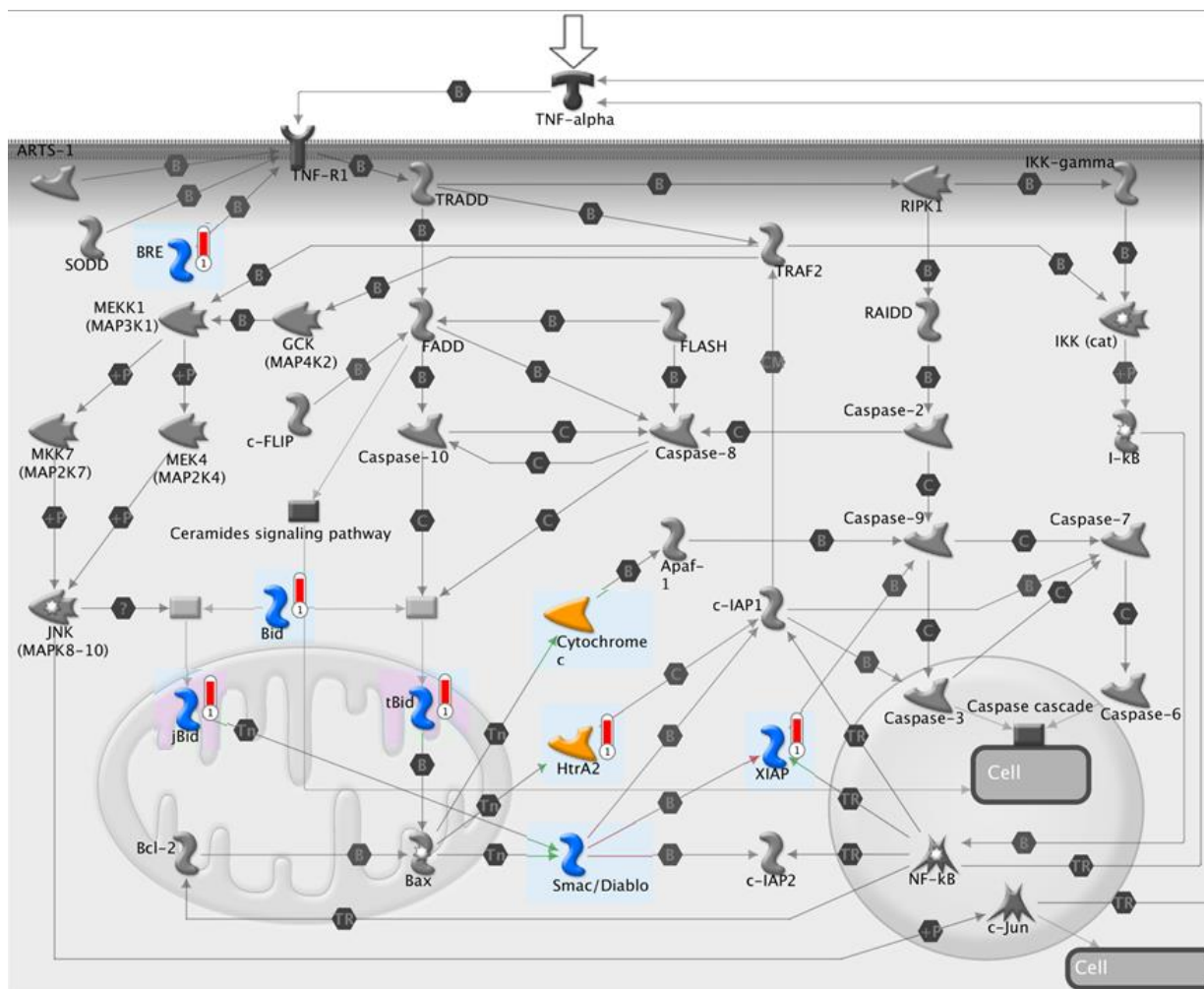


Figura 17. MetaCore Pathway Maps. Via de apoptose relacionada à sinalização por TNF α . *Apoptosis and survival_TNFR1 signaling pathway*. Parceiros de PPAR γ encontrados nos experimentos de IP estão evidenciados em colorido.

Outra via evidenciada nos dados do MetaCore ilustra o **papel das proteínas IAP na apoptose** (Figura 18). As proteínas IAPs, que incluem c-IAP1, c-IAP2, NAIP, survivina e XIAP, esta última interactora de PPAR γ nos dados de IP, inibem certas caspases por ligação direta ou ubiquitinação. A parceira mitocondrial de PPAR γ Diablo, quando liberada da mitocôndria, se liga a estas proteínas de modo a dissociar as caspases. Assim, Diablo é um regulador negativo das IAPs, sendo uma molécula pró-apoptótica. A outra parceira mitocondrial de PPAR γ , a serina protease HTRA2, também inibe as proteínas IAP por ligação ou clivagem (SAELENS et al., 2004). A apoptose se acopla a mecanismos de sobrevivência e a survivina é a molécula de interface entre a apoptose e o ciclo celular. Ela é seletivamente

expressa na fase G2/M e é um substrato mitótico para CDK1, outra parceira de PPAR γ , e está envolvida na ativação de XIAP.

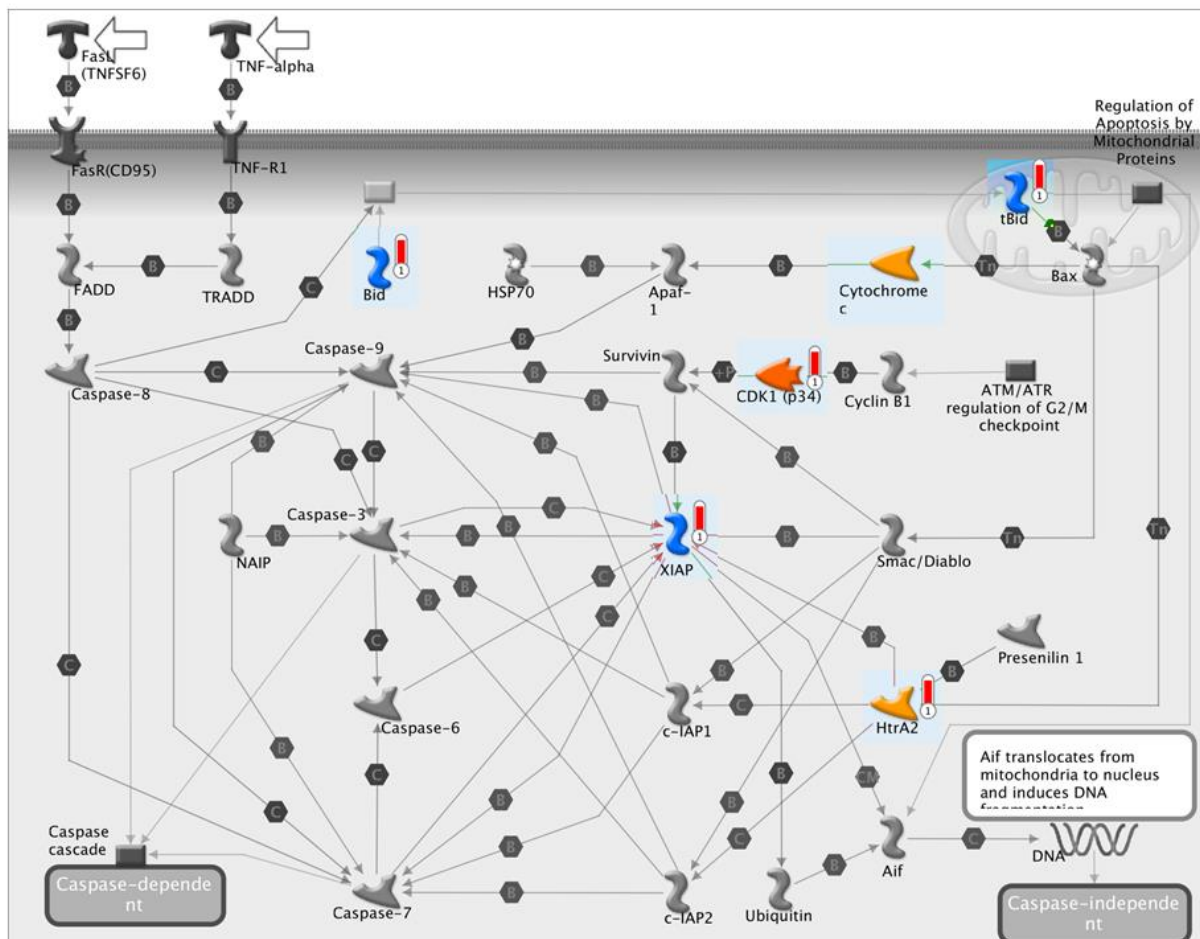


Figura 18. MetaCore Pathway Maps. Via de apoptose relacionada ao papel das proteínas IAPs. Apoptosis and survival_Role of IAP-proteins in apoptosis. Parceiros de PPAR γ encontrados nos experimentos de IP estão evidenciados em colorido.

A última via de apoptose descrita no MetaCore, onde parceiros de PPAR γ encontrados nas IPs atuam, é a **cascata das caspases** (Figura 19). As caspases são os componentes centrais da resposta apoptótica e são divididas em caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10) e efetoras (3, 6 e 7). Estas proteínas são enzimas inativas e passam por ativação proteolítica durante a apoptose, as iniciadoras ativando as efetoras, que por sua vez são responsáveis pela clivagem proteolítica de muitos alvos celulares que por fim levam à morte celular (RIEDL; SHI, 2004). A ativação da resposta apoptótica se dá pelas vias intrínseca ou extrínseca, já descritas

anteriormente. Parceiros de PPAR γ , como Bid e XIAP atuam regulando a ativação de caspases. Já outros parceiros como Lamina-B e ICAD atuam após as caspases efetoras, em mecanismos que levam à morte celular. O PPAR γ pode atuar em algum destes mecanismos já que os mesmos ocorrem no núcleo, principal componente celular deste receptor.

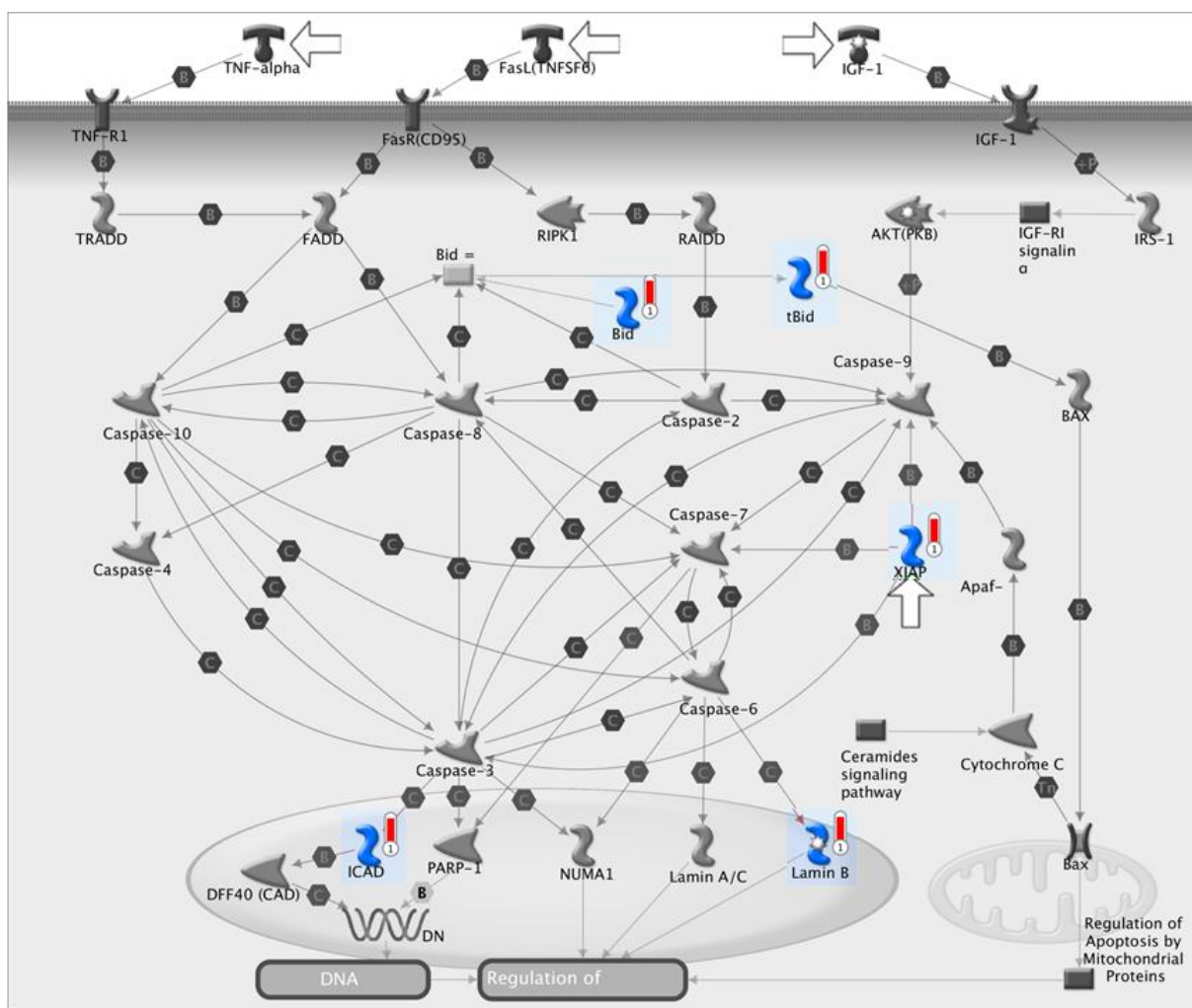


Figura 19. MetaCore Pathway Maps. Via de apoptose relacionada à cascata de sinalização das caspases. Apoptosis and survival_Caspase cascade. Parceiros de PPAR γ encontrados nos experimentos de IP estão evidenciados em colorido.

5.4.4. Análise de 'Disease Biomarker Networks' – MetaCore

Em seguida, foi investigado se as proteínas encontradas como parceiras de interação do PPAR γ estão envolvidas no desenvolvimento e progressão de doenças. Esta análise permite a discussão da existência e importância da função

deste receptor nestes processos. De acordo com a análise do MetaCore, usando o módulo de biomarcadores de doenças, foram encontradas diversas vias onde o PPAR γ está participando (Figuras 20 e 21).

#	Networks
1	Prostatic neoplasms. Transcription
2	Alzheimer disease (core network)
3	Breast neoplasm. Apoptosis through caspases
4	Breast neoplasm. Transcription regulation
5	Pancreatic neoplasms (core network)
6	Breast neoplasm. TGF signaling cell cycle
7	Breast neoplasm ESR1
8	Bladder neoplasms (core network)
9	Prostatic neoplasms. Inflammatory response
10	Colorectal neoplasms. Immune response
11	Diabetes mellitus, Type 2 (core network)
12	Thyroid neoplasms (core network)
13	Breast neoplasm. NGFR signaling through Erk
14	Breast neoplasm. Inflammatory response
15	Breast neoplasm. IL-2 and apoptosis
16	Breast neoplasm. CREB1
17	Breast neoplasm. Gene transcription
18	Breast neoplasm. PPAR regulation by TGF-beta
19	Lung neoplasms. Signal transduction
20	Ovarian neoplasms (core network 2)
21	Obesity (core network)
22	Atherosclerosis (core network)

Figura 20. MetaCore – ‘Disease Biomarker Networks’ – Análise das vias mais enriquecidas para parceiros que apareceram em 2 ou mais experimentos. As vias relacionadas à câncer de mama estão indicadas por setas.

#	Networks
1	Prostatic neoplasms. Transcription
2	Alzheimer disease (core network)
3	Breast neoplasm. Apoptosis through caspases
4	Breast neoplasm. Transcription regulation
5	Pancreatic neoplasms (core network)
6	Breast neoplasm. TGF signaling cell cycle
7	Breast neoplasm ESR1
8	Bladder neoplasms (core network)
9	Prostatic neoplasms. Inflammatory response
10	Colorectal neoplasms. Immune response
11	Diabetes mellitus, Type 2 (core network)
12	Thyroid neoplasms (core network)
13	Breast neoplasm. NGFR signaling through Erk
14	Breast neoplasm. Inflammatory response
15	Breast neoplasm. IL-2 and apoptosis
16	Breast neoplasm. CREB1
17	Breast neoplasm. Gene transcription
18	Breast neoplasm. PPAR regulation by TGF-beta
19	Lung neoplasms. Signal transduction
20	Ovarian neoplasms (core network 2)
21	Obesity (core network)
22	Atherosclerosis (core network)

Figura 21. MetaCore – ‘Disease Biomarker Networks’ – Análise das vias mais enriquecidas para parceiros que apareceram em apenas um experimento. As vias relacionadas à câncer de mama estão indicadas por setas.

Parceiros de PPAR γ aparecem participando de doenças como mal de Alzheimer, diabetes tipo 2, obesidade e aterosclerose, porém a maioria das vias está relacionada a tipos de câncer, sendo eles neoplasmas de mama, ovário, próstata, bexiga, cólon e reto, tireoide, pulmão e pâncreas. A relação entre PPAR γ e câncer já foi descrita em muitos estudos, no entanto, em alguns casos o mecanismo de ação pelo qual o receptor suprime ou ajuda na proliferação de tumores não é totalmente entendido.

O potencial supressivo de tumor de PPAR γ foi descrito primeiramente pelo mesmo grupo de pesquisa que caracterizou seu papel na diferenciação de adipócitos, indicando que uma linhagem de liposarcoma humana poderia ser re-diferenciada por meio de tratamento com troglitazona (TONTONOZ et al., 1997). Logo em seguida, o mesmo grupo confirmou efeitos similares em linhagens de câncer de cólon e de mama (MUELLER et al., 1998; SARRAF et al., 1998), enquanto outro grupo fez estudo semelhante em câncer de próstata (KUBOTA et al.,

1998). Além de atuar modulando a expressão de genes envolvidos na diferenciação celular, o PPAR γ é capaz de promover apoptose, inibir a angiogênese e bloquear a subpopulação de células-tronco cancerosas em alguns tipos de câncer (ROBBINS, 2012).

No entanto, outros estudos mostram o PPAR γ atuando favoravelmente ao desenvolvimento tumoral. Estudos mostram que a taxa expressão de PPAR γ é diretamente proporcional à sobrevivência de pacientes em alguns casos de câncer de cólon e mama, mas inversamente proporcional em alguns casos de câncer pancreático, por exemplo (GIAGINIS et al., 2009; JIANG et al., 2009; OGINO et al., 2009). Quando os estudos passaram a ser realizados em modelo animal, surgiram mais resultados controversos na ação do PPAR γ em câncer, mostrando-o como um promotor tumoral em alguns casos (LEFEBVRE et al., 1998; SAEZ et al., 1998). Desta forma, numerosos mecanismos de ação de PPAR γ são contexto-dependentes e podem, portanto, variar de acordo com o tipo de tumor.

Algumas vias de sinalização envolvidas no câncer são moduladas por PPAR γ e seus ligantes. Uma delas é a via de sinalização de Wnt/ β -catenina que contribui para a biologia tumoral e é inibida por PPAR γ . O receptor também inibe a sinalização por IL-6/STAT3/NF-kappa β , uma via relacionada à inflamação ativa em metade de todas as linhagens celulares de câncer já estudadas. Como mencionado, alvos genômicos relacionados ao câncer também são modulados por PPAR γ . Dentre eles, destaca-se p53, um gene supressor de tumor muito estudado por induzir apoptose, parada do ciclo celular e autofagia, cuja transcrição é promovida por ligantes de PPAR γ . Outro exemplo é a ativação do promotor de PTEN, que por sua vez suprime Akt, outra via muito importante em câncer (ROBBINS, 2012).

Como pode ser observado nas figuras 20 e 21, o tipo de câncer que teve maior número de vias enriquecidas de acordo com análise no MetaCore foi o câncer de mama, indicadas por uma seta. O PPAR γ já teve sua atividade estabelecida em câncer de mama em muitos estudos, como descrito no item 1.5 da Introdução, que por sua vez é controversa, ora atuando como supressor e ora como promotor tumoral. Analisando os dados do MetaCore, pode-se inferir que muitos parceiros de PPAR γ estão envolvidos de alguma forma neste tipo de câncer e que a modulação

destes ou do receptor, dependendo do contexto em que interagem, possa contribuir na busca por novas terapias. É importante entender o modo como o PPAR γ interage com estes e outros possíveis parceiros e as vias em que estão envolvidos em células de câncer de mama, tentando desvendar em quais contextos o PPAR γ exerce papel colaborativo ou supressivo neste tipo de câncer. Assim, optou-se por realizar o mesmo estudo de interactoma do PPAR γ em células de câncer de mama, buscando interações que ocorram em células de linhagens de carcinoma mamário e que não ocorram em células de mama não tumoral.

6. INTERAÇÕES ENTRE PPAR_γ E OUTRAS PROTEÍNAS CELULARES EM CÂNCER DE MAMA

6.1. Verificação da expressão endógena de PPAR γ em diferentes intervalos de tempo nas linhagens, MCF7, MCF10A, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MDA-MB-468 por *western blot*

A técnica de *western blot* foi utilizada para verificar a ocorrência de expressão endógena de PPAR γ nas células das linhagens utilizadas neste projeto, a fim de validá-las como bons modelos para a busca de interações entre o PPAR γ e outras proteínas.

A primeira linhagem de câncer de mama avaliada foi a linhagem de câncer de mama MCF7, obtida primeiramente pelo grupo de pesquisa (Figura 22). Esta linhagem expressa níveis endógenos de PPAR γ e a expressão de do receptor parece diminuir conforme a passagem do tempo, sendo menor em 48 horas tanto para células tratadas como não tratadas com rosiglitazona, diminuindo mais ainda na presença do ligante. Na ausência do ligante, a expressão de PPAR γ diminuiu em níveis mínimos de 24 para 36 horas.

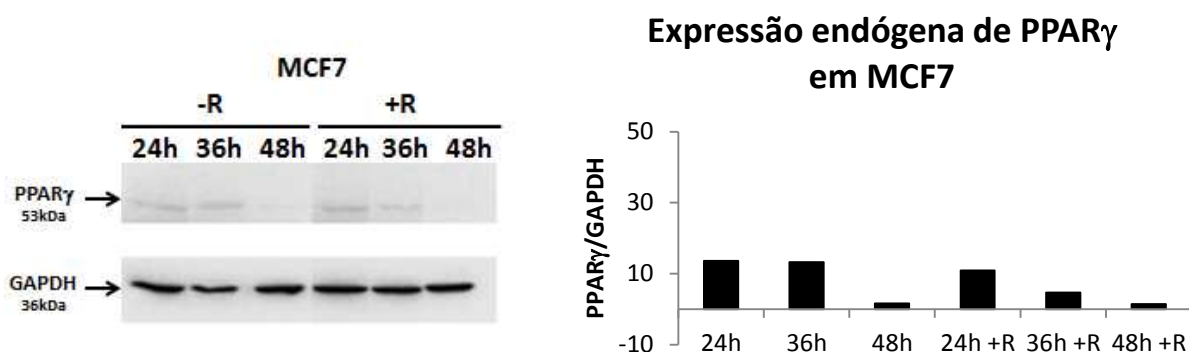


Figura 22. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MCF7. À esquerda, *western blot* dos extratos celulares coletados em diferentes intervalos de tempo sem e após tratamento com o ligante rosiglitazona (R). À direita, quantificação da intensidade das bandas (ImageStudio LI-COR) em relação ao controle (GAPDH).

No teste temporal de expressão endógena de PPAR γ na linhagem de mama não tumoral MCF10A (Figura 23) observa-se que esta linhagem também expressa níveis endógenos de PPAR γ , sendo estes maiores que os da linhagem MCF7. A expressão de PPAR γ diminuiu conforme a passagem do tempo para as duas condições, sendo menor em 48 horas tanto para células tratadas como não tratadas com rosiglitazona.

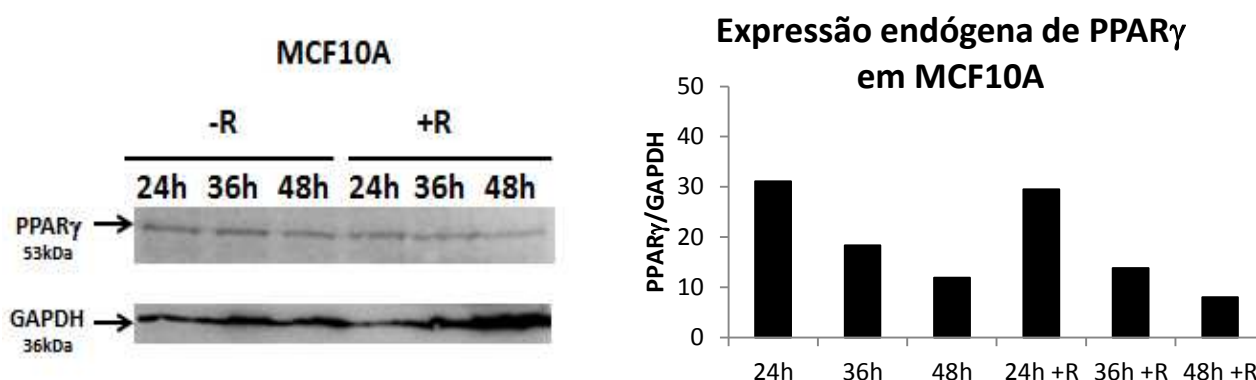


Figura 23. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MCF10A. À esquerda, *western blot* dos extratos celulares coletados em diferentes intervalos de tempo sem e após tratamento com o ligante rosiglitazona (R). À direita, quantificação da intensidade das bandas (ImageStudio LI-COR) em relação ao controle (GAPDH).

A próxima linhagem analisada, MDA-MB-231, mostrou expressar altos níveis endógenos de PPAR γ , quando comparado às linhagens analisadas anteriormente (Figura 24). Além disso, no *western blot* foi possível observar a expressão das duas isoformas deste receptor, ambas detectadas pelo mesmo anticorpo em 53 e 57 kDa. Isto pode ser explicado pelo fato destas células serem derivadas de adenocarcinoma mamário, isto é, câncer nas glândulas mamárias, as quais são envoltas por tecido adiposo, que expressa altos níveis de PPAR γ 2, cujas bandas foram mais fortes. Observa-se que o ligante parece não exercer influência alguma na expressão do receptor neste tipo celular.

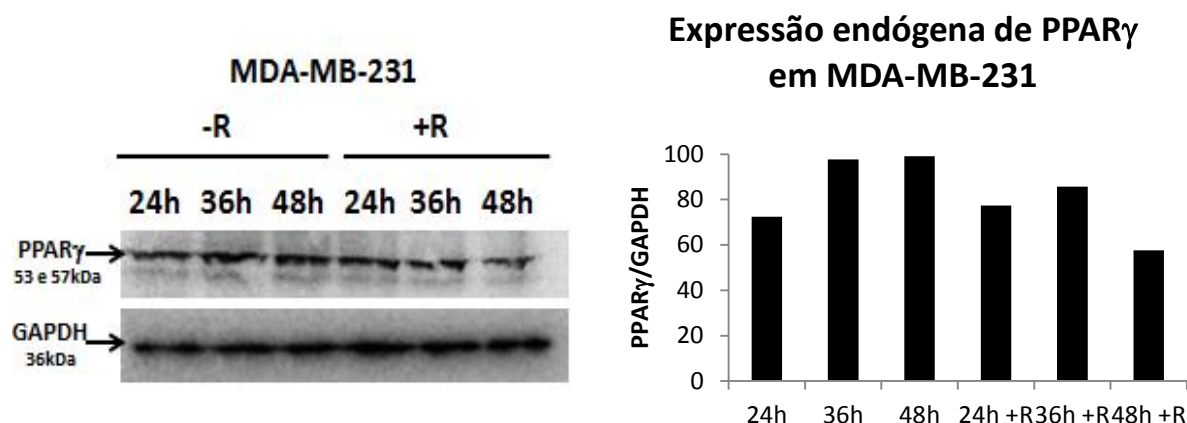


Figura 24. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MDA-MB-231. À esquerda, western blot dos extratos celulares coletados em diferentes intervalos de tempo sem e após tratamento com o ligante rosiglitazona (R). À direita, quantificação da intensidade das bandas (ImageStudio LI-COR) em relação ao controle (GAPDH).

A linhagem MDA-MB-436 foi a linhagem que mostrou expressar os maiores níveis endógenos de PPAR γ dentre as linhagens analisadas (Figura 25). Além disso, no *western blot* também foi possível observar a expressão das duas isoformas deste receptor, assim como em MDA-MB-231, ambas detectadas pelo mesmo anticorpo em 53 e 57 kDa. No entanto, nesta linhagem a isoforma 1 parece ser mais expressa. Observa-se que o ligante parece não exercer influência alguma na expressão do receptor neste tipo celular, que não mostra um padrão de expressão temporal ou devido ao tratamento.

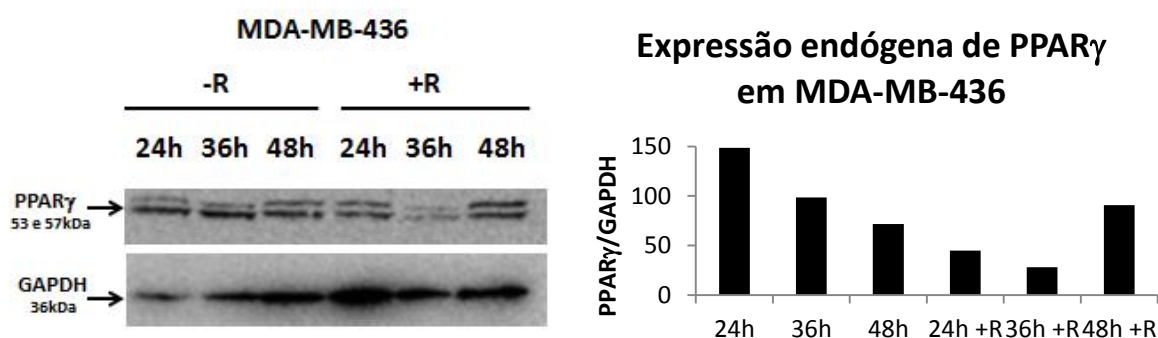


Figura 25. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MDA-MB-436. À esquerda, western blot dos extratos celulares coletados em diferentes intervalos de tempo sem e após tratamento com o ligante rosiglitazona (R). À direita, quantificação da intensidade das bandas (ImageStudio LI-COR) em relação ao controle (GAPDH).

Dentre as linhagens “MDA-MB” analisadas, a 468 foi a que apresentou menor expressão de PPAR γ (Figura 26). Trata-se de uma linhagem de cultivo mais difícil que as outras duas. Além disso, na coleta de 36 horas sem tratamento, não houve presença de proteínas, o que pode ter ocorrido devido à degradação do extrato proteico, uma vez que nem a proteína-alvo nem o controle de carregamento aparecem. Este *western blot* foi repetido mais vezes, visando obter bandas que demonstrassem a expressão de níveis endógenos em todos os intervalos coletados, porém os outros não foram bem sucedidos. Observa-se que não há um padrão de aumento ou diminuição na expressão do receptor neste tipo celular, levando em conta as amostras tratadas com o ligante.

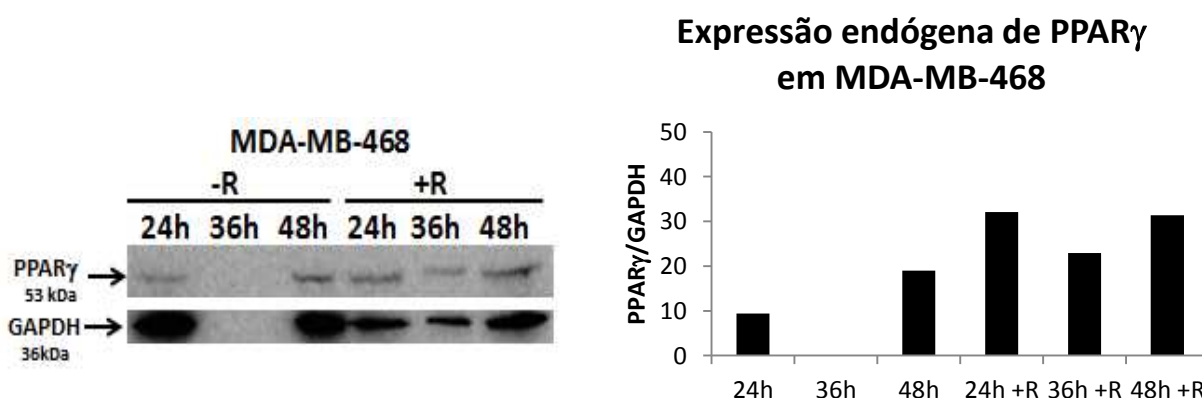


Figura 26. Níveis de expressão endógena de PPAR γ na linhagem MDA-MB-468. À esquerda, western blot dos extratos celulares coletados em diferentes intervalos de tempo sem e após tratamento com o ligante rosiglitazona (R). À direita, quantificação da intensidade das bandas (ImageStudio LI-COR) em relação ao controle (GAPDH).

6.2. Tentativa de imunoprecipitação endógena de PPAR γ em linhagens de câncer de mama

Visto que o PPAR γ é expresso em todas as linhagens testadas, tanto de carcinoma mamário como de mama não-tumoral, a ser utilizada como um controle, optou-se por tentar imunoprecipitar o PPAR γ endógeno destas células juntamente com o complexo proteico de interação, obtendo assim resultados mais próximos do que ocorre *in vivo*.

Foram testados dois protocolos de IP endógena: o primeiro (Protocolo 1) foi fornecido e padronizado pelo grupo do Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio, e o segundo (Protocolo 2) é o protocolo proveniente da empresa que produz o anticorpo utilizado na resina (Cell Signaling).

O PPAR γ foi imunoprecipitado primeiramente, em experimentos piloto, nas linhagens MCF10A e MDA-MB-436 que expressam bons níveis do receptor. Após a eluição, as amostras foram corridas em géis SDS-PAGE e coradas com nitrato de prata (Figura 27).

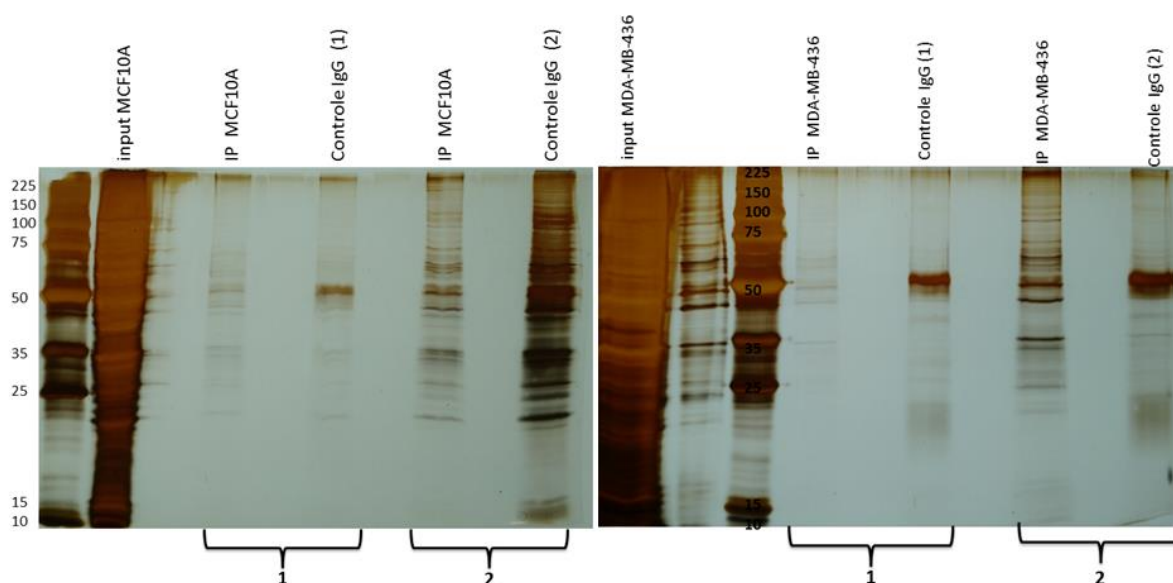


Figura 27. Tentativa de imunoprecipitação endógena de PPAR γ nas linhagens MCF10A e MDA-MB-436. Foram utilizados os protocolos do grupo MAS do LNBio (1) e o protocolo da Cell Signaling (2). Como controle negativo foi utilizado o anticorpo normal IgG (Santa Cruz) na resina.

Ambos os protocolos foram repetidos mais de uma vez e não funcionaram, pois o espectrômetro de massas não detectou nenhum peptídeo referente ao PPAR γ .

Uma vez que os protocolos de IP endógena não funcionaram, optou-se por superexpressar o PPAR γ em algumas das linhagens de mama para realizar os experimentos de IP, desta vez usando resina anti-FLAG (Sigma Aldrich), método convencional utilizado em imunoprecipitações. As linhagens escolhidas foram a

MCF10A como controle e a MCF7 como célula de carcinoma mamário, por terem um padrão de expressão parecido do receptor nuclear.

6.3. Superexpressão de PPAR γ por transfecção e verificação por *western blot*

A linhagem MCF7, a primeira linhagem de câncer de mama obtida pelo grupo de pesquisa, teve sua superexpressão testada por transfecção. Foram feitas muitas tentativas de superexpressão pelo método do fosfato de cálcio (Figura 28) e também utilizando Lipofectamine2000 (Thermo Scientific), todas sem sucesso. Pode ser observado que os níveis de expressão após a tentativa de superexpressão são próximos aos níveis endógenos de PPAR γ nestas células, indicando que a transfecção não é um bom método para superexpressar proteínas na linhagem MCF7.

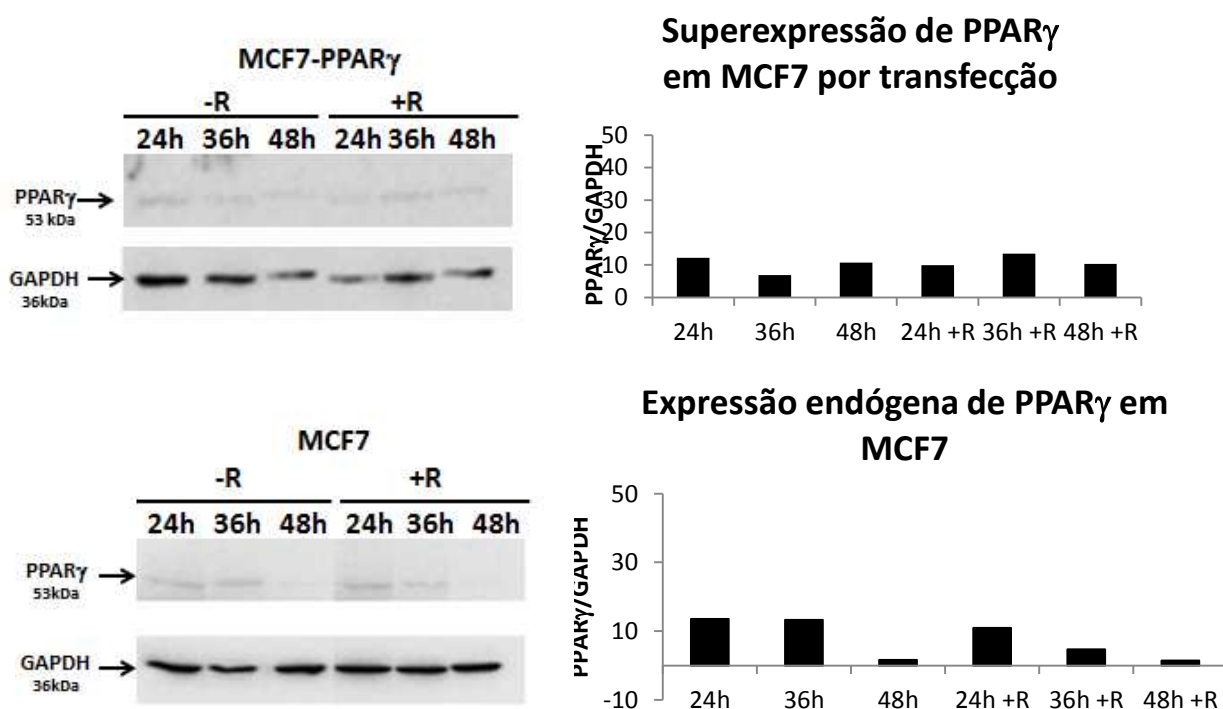


Figura 28. Comparação entre os níveis de expressão endógeno e após transfecção em MCF7. Os *western blots* à esquerda foram feitos a partir do teste temporal para verificar níveis de PPAR γ endógeno nas células da linhagem 293T em diferentes intervalos de tempo após tratamento com o ligante rosiglitazona (R) e do teste temporal para PPAR γ superexpresso nesta linhagem por transfecção, sob as mesmas condições. À direita estão os gráficos das quantificações da intensidade das bandas (ImageStudio LI-COR) em relação ao controle (GAPDH).

Desta forma, após várias tentativas de melhora e padronização da transfecção sem sucesso, decidiu-se subclonar o gene do PPAR γ em um vetor viral para a transdução destas células e produção de uma linhagem de expressão estável que superexpresse este receptor nuclear em altos níveis permanentemente.

6.4. Subclonagem do gene do PPAR γ no vetor retroviral pBABE-puro

O inserto PPAR γ estava clonado no vetor de expressão em células de mamífero pcDNA-FLAG e foi subclonado no vetor retroviral pBABE-puro (Figura 29).

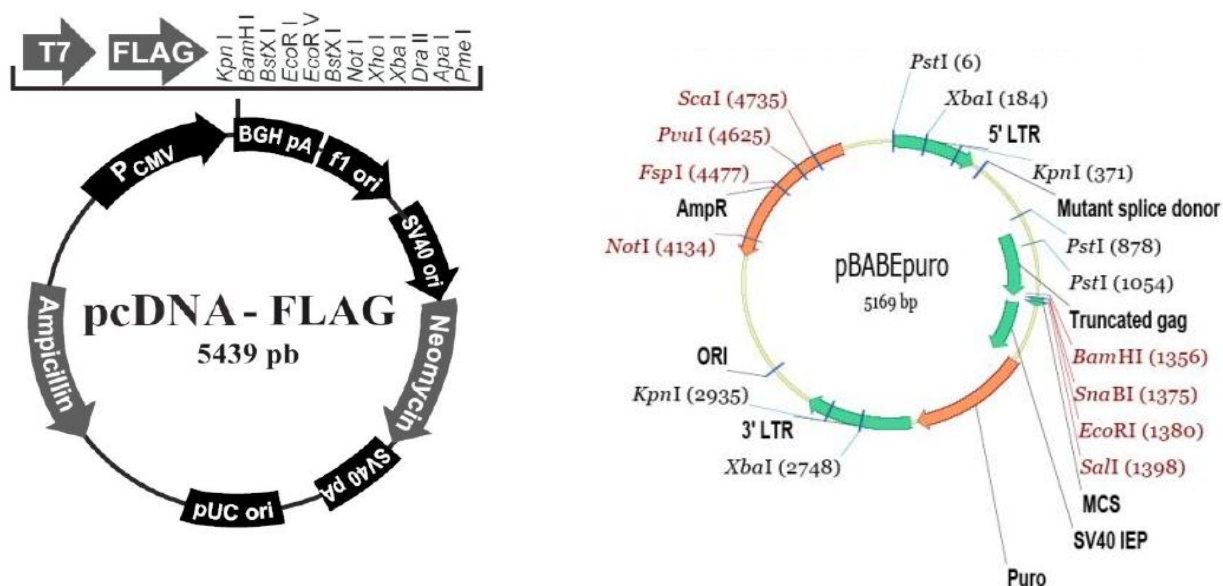


Figura 29. Vetores utilizados na subclonagem para produção do vetor retroviral PPAR γ -pBABE-puro.

Foi feita a amplificação do inserto no vetor pcDNA-FLAG por PCR gerando fragmentos de aproximadamente 1500 pb, altura correta esperada (Figura 30). O marcador de peso molecular utilizado foi o 1kb *DNA Ladder* (NEB).

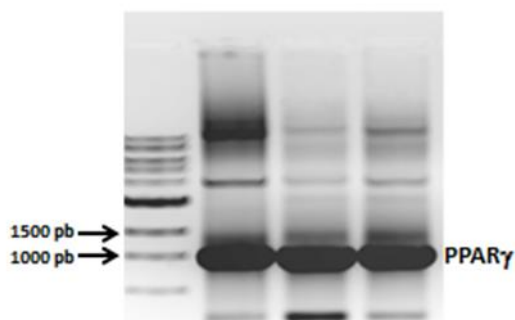


Figura 30. Amplificação do inserto FLAG-PPAR γ . Gel de agarose 1% dos produtos amplificados pelo PCR em torno de 1400pb: FLAG-PPAR γ .

Após amplificação e purificação do inserto, este foi ligado no vetor intermediário pGEM-T e bactérias competentes DH5 α foram transformadas com o vetor. Após a confirmação das subclonagens por PCR de colônia e por sequenciamento, os clones foram digeridos com *Sall* (Jena Bioscience) (Figura 31) que reconhece um sítio na região 5' e um na 3' do inserto e o vetor de destino, pBABE-puro, também foi digerido com a mesma enzima e passou por um processo de desfosforilação.

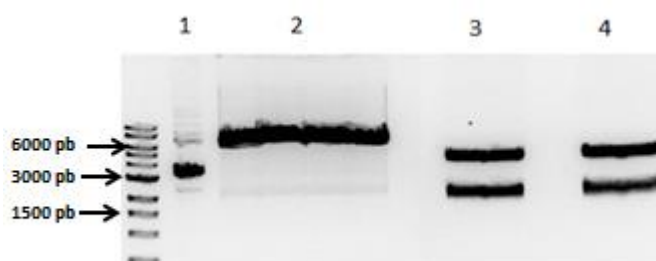


Figura 31. Digestão do clone PPAR γ -pGEM-T e do vetor retroviral pBABE-puro. Gel de agarose 0,8% com amostras da digestão de duas colônias PPAR γ -pGEM (bandas das canaletas 3 e 4), do vetor pBABE-puro (banda 2) e como controle o pBABE-puro fechado (banda 1).

Após purificação das bandas, o inserto foi ligado ao vetor pBABE-puro e células DH5 α foram transformadas com o produto desta reação de ligação. Aproximadamente 20 colônias de cada placa foram escolhidas para extração dos seus plasmídeos recombinantes. Foi feita uma análise de restrição e as bandas corretas esperadas deveriam ter cerca de 800 pb e 5800 pb (Figura 32).

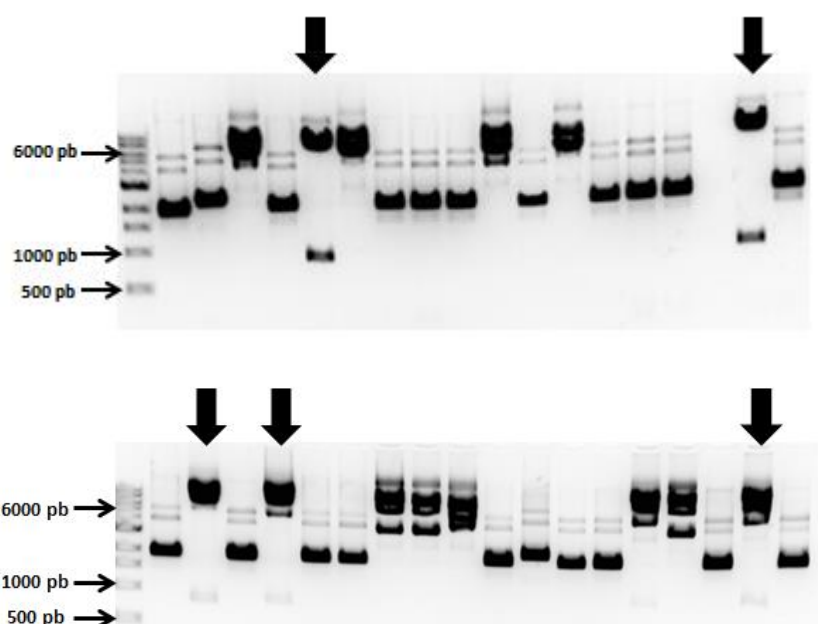


Figura 32. Análise de restrição. Digestão dos clones PPAR γ -pBABE com a enzima de restrição *EcoRI*. Foram testadas 19 colônias de uma placa de transformação e 18 colônias da segunda placa. Apenas cinco colônias apresentaram o padrão de bandas esperado (indicadas com as setas verticais).

Cinco colônias foram positivas para a análise de restrição. Foi feita uma PCR destas para confirmar a clonagem e a amplificação no tamanho correto (em torno de 1,5 kb) deveria ocorrer apenas se o gene estivesse inserido na orientação correta. Apenas uma colônia apresentou a banda na altura esperada (Figura 33).

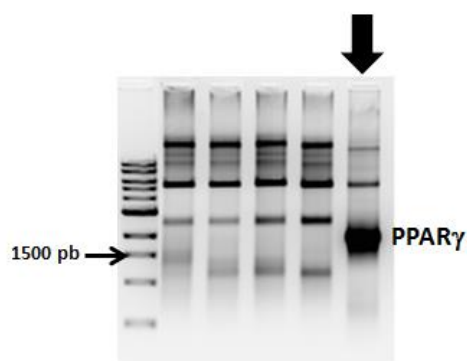


Figura 33. PCR para confirmar a orientação correta do clone. Gel de agarose 1% com amostras da PCR dos clones PPAR γ -pBABE, que deram positivo na análise de restrição, utilizando primers *Forward* do vetor e *Reverse* do inserto.

O clone foi certificado por sequenciamento do DNA deste e alinhando o resultado obtido nas ferramentas BLAST e Multalin observou-se que o clone estava correto.

6.5. Transdução do vetor retroviral PPAR γ -pBABE nas linhagens celulares MCF10A e MCF7 e estabelecimento de linhagens de expressão estável

Os vírus contendo os vetores retrovirais pBABE foram produzidos no Laboratório de Vetores Virais (LVV), instalado no LNBio sob coordenação do Dr. Márcio Bajgelman. A transdução nas linhagens MCF10A e MCF7 foi feita a partir de células plaqueadas em placa de 6 poços. Após transdução e seleção dos clones com o antibiótico puromicina, foi feito um *western blot* (Figura 34) destas células para verificar a expressão de PPAR γ . Vale ressaltar que o processo de seleção dos clones foi muito demorado, visto que uma grande quantidade de células morreu durante o processo, principalmente na linhagem MCF7, e as que restaram demoraram muito para se replicar e gerar uma quantidade suficiente de células.

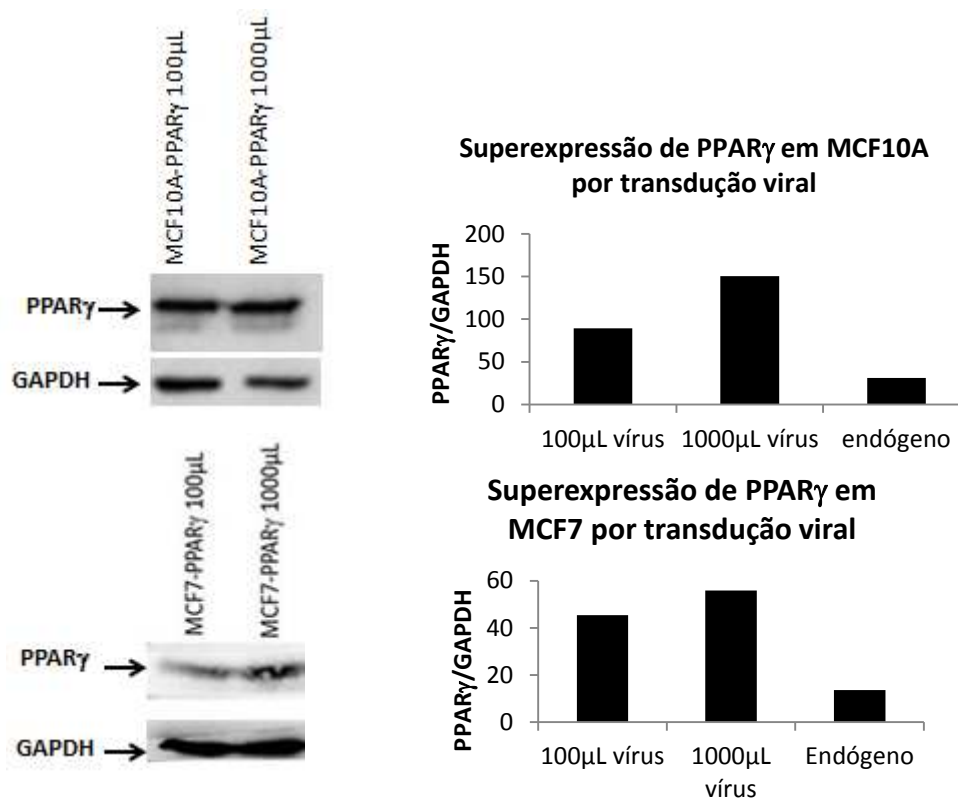


Figura 34. Expressão permanente de FLAG-PPAR γ nas linhagens MCF10A e MCF7 após transdução. À esquerda, *western blots* para verificar a expressão de PPAR γ nas células MCF10A e MCF7 após transdução com vetor retroviral PPAR γ -pBABE puro nas quantidades de 100 e 1000 μ L. À direita, estão os gráficos das quantificações da intensidade das bandas (ImageStudio LICOR) em relação ao controle (GAPDH) e também com a coluna que indica a expressão endógena do receptor na mesma linhagem.

Nota-se que a expressão de PPAR γ por meio da transdução de vetor viral foi bem maior que a expressão endógena nas mesmas linhagens (item 6.1). Comparando a níveis de superexpressão em 293T utilizando a técnica de transfecção, ambas as linhagens, MCF10A e MCF7 têm uma expressão menor quando transduzidas, sendo a da MCF7 bem inferior. Tal nível de expressão pode ser mais adequado à realização dos experimentos de imunoprecipitação, visto que se aproxima mais do que ocorre *in vivo* do que utilizando uma superexpressão, gerando resultados de interactoma mais confiáveis e reais.

6.6. Imunoprecipitação em MCF7 e MCF10A

Após certificação da expressão estável de PPAR γ nas linhagens MCF10A e MCF7, foi realizada a imunoprecipitação de extratos destas células utilizando a

resina anti-FLAG, assim como foi feito na primeira parte do trabalho em 293T. Como controle negativo foi imunoprecipitado o extrato de ambas as linhagens não-transduzidos utilizando a mesma resina.

As amostras de input, Flow through (FT) Lavagem 1 (L1) e Eluição foram analisadas em *western blot* (Figura 35) para certificar a ocorrência da IP antes de enviar as eluições para a espectrometria de massas.

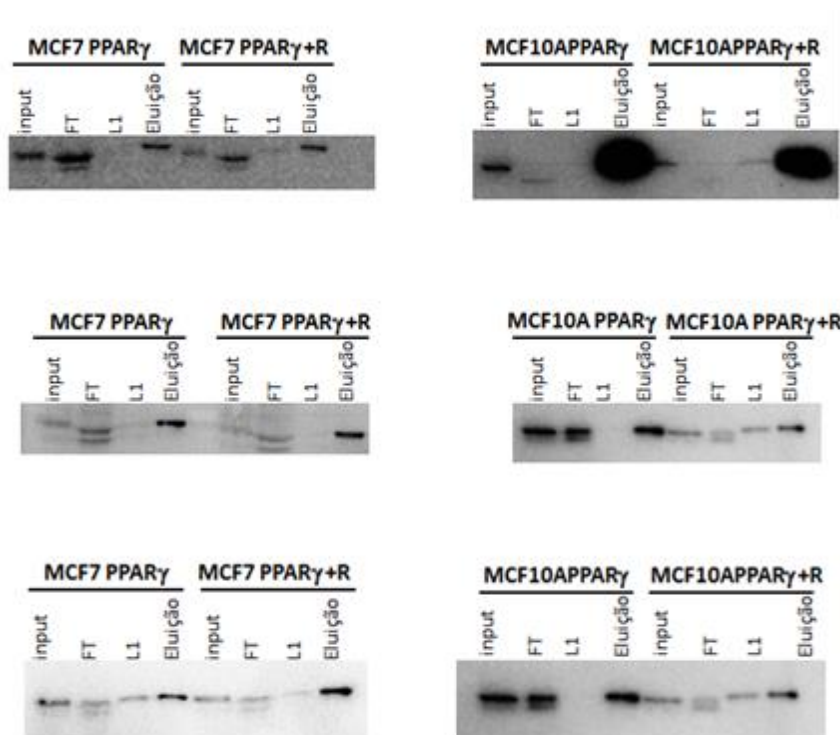


Figura 35. Três experimentos independentes de imunoprecipitação (IP) de FLAG-PPAR γ usando a resina anti-FLAG nas linhagens MCF7 e MCF10A. As amostras foram aplicadas sempre na mesma ordem: input (que mostra FLAG-PPAR γ presente antes da IP), FT (*flowthrough*, que se refere às proteínas que não se ligaram à resina, L1 (primeira lavagem após a retirada do FT) e Eluição, onde deve ser observada a presença de FLAG-PPAR γ .

Como observado na Figura 35, o PPAR γ foi imunoprecipitado em todos os experimentos nas duas linhagens, embora um pouco tenha sido perdido nas frações de FT e L1. Desta forma, as amostras eluídas estão armazenadas em freezer a -80°C aguardando a chamada da *facility* de espectrometria de massas do LNBio.

7. Conclusão e Perspectivas

A busca por novas interações de PPAR γ na célula 293T abriu muitas novas frentes de trabalho para o grupo de pesquisa. A partir das imunoprecipitações seguidas por LC-MS/MS, foram obtidos muitos parceiros de interação, sendo a maioria deles inéditos para o PPAR γ de acordo com o banco de dados do software Cytoscape.

O receptor interage com muitas fosfatases ou reguladores de fosfatases, o que abre caminho para uma possível descoberta da fosfatase responsável por desfosforilar o PPAR γ , já que sua fosforilação acarreta efeitos que influenciam em patologias. Além disso, diversos parceiros envolvidos em processos biológicos nos quais o PPAR γ já foi descrito podem auxiliar no melhor entendimento do mecanismo de ação deste receptor nuclear em tais processos. Filtrando e analisando estes dados em conjunto com dados da literatura, pôde-se observar ainda que o PPAR γ parece exercer funções não descritas em outros processos biológicos muito relevantes, como morte celular, ciclo celular e tradução. Além disso, muitos parceiros de PPAR γ que atuam em compartimentos não descritos para o receptor, como mitocôndria, foram encontrados, indicando uma possível atuação dele em tais organelas e nos processos biológicos que ali ocorrem.

Por fim, a análise dos parceiros encontrados quanto a biomarcadores relacionados às doenças indicou um enriquecimento de vias relacionadas ao câncer de mama, condição na qual o papel do PPAR γ ainda não é totalmente definido, sendo muito controverso. Desta forma, estudos de proteômica buscando interações do receptor em linhagens de câncer de mama poderão auxiliar no melhor entendimento da função de PPAR γ neste tipo de câncer e tais estudos foram iniciados neste projeto.

Como perspectivas, são necessárias confirmações dos parceiros encontrados na IP em 293T por co-imunoprecipitação, *pulldown*, co-localização celular e métodos biofísicos, a fim de certificar a real ocorrência das interações mais interessantes.

Além disso, estudos de localização celular podem ser realizados para confirmar a atuação de PPAR γ em outros compartimentos celulares, que não o núcleo.

Quanto aos estudos de interactoma de PPAR γ em câncer de mama, as amostras ainda ter o de ser submetidas   espectrometria de massas e análise de dados para a finaliza o do trabalho, que além de descrever melhor o papel do receptor nuclear neste neoplasma, deve, assim como o interactoma em 293T, abrir um leque de novas frentes de estudo para o grupo de pesquisa.

8. Referências Bibliográficas

- AAGAARD, M. M.; SIERSBÆK, R.; MANDRUP, S. Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1812, n. 8, p. 824–35, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193032>>. Acesso em: 3/12/2014.
- ACS, P.; BAUER, P. O.; MAYER, B.; et al. A novel form of ciliopathy underlies hyperphagia and obesity in Ankr26 knockout mice. **Brain Structure and Function**, v. 220, n. 3, p. 1511–1528, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00429-014-0741-9>>. .
- ADAMS, M.; REGINATO, M. J.; SHAO, D.; LAZAR, M. A.; CHATTERJEE, V. K. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 8, p. 5128–5132, 1997.
- AHMADIAN, M.; SUH, J. M.; HAH, N.; et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature medicine**, v. 19, n. 5, p. 557–66, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3870016&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10/7/2014.
- AMATO, A. A.; RAJAGOPALAN, S.; LIN, J. Z.; et al. GQ-16, a Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Ligand, Promotes Insulin Sensitization without Weight Gain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 33, p. 28169–28179, 2012. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.332106>>. .
- ANDRES, S. A.; WITTLIFF, J. L.; CHENG, A. Protein Tyrosine Phosphatase 4A2 Expression Predicts Overall and Disease-Free Survival of Human Breast Cancer and Is Associated with Estrogen and Progesterone Receptor Status. **Hormones and Cancer**, v. 4, n. 4, p. 208–221, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12672-013-0141-2>>. .
- APOSTOLI, A. J.; ROCHE, J. M.; SCHNEIDER, M. M.; et al. Opposing roles for mammary epithelial-specific PPAR γ signaling and activation during breast tumour progression. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 85, 2015. Disponível em: <<http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0347-8>>. .
- ARANDA, A. N. A.; PASCUAL, A.; BIOME, I. D. I. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. , v. 81, n. 3, p. 1269–1304, 2001.
- ASCHRAFI, A.; MEINDL, N.; FIRLA, B.; BRANDES, R. P.; STEINHILBER, D. Intracellular localization of ROR α is isoform and cell line-dependent. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1763, n. 8, p. 805–14, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806533>>. Acesso em: 3/12/2014.
- ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/75556>>. .
- ASHIBE, B.; MOTOJIMA, K. Fatty aldehyde dehydrogenase is up-regulated by polyunsaturated fatty acid via peroxisome proliferator-activated receptor α and suppresses polyunsaturated fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress. **FEBS Journal**, v. 276, n. 23, p. 6956–6970, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2009.07404.x>>. .
- BARAK, Y.; NELSON, M. C.; ONG, E. S.; et al. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. **Molecular Cell**, v. 4, n. 4, p. 585–595, 1999.
- BARDOT, O.; ALDRIDGE, T. C.; LATRUFFE, N.; GREEN, S. PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 192, n. 1, p. 37–45, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386511>>. .
- BARISH, G. D.; NARKAR, V. A.; EVANS, R. M. PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. , v. 116, n. 3, 2006.
- BATISTA, F. A. H.; TRIVELLA, D. B. B.; BERNARDES, A.; et al. Structural Insights into Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta (PPAR-Delta) Selective Ligand Binding. (A. Pastore, Ed.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e33643, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033643>>. .
- BAUER, M.; CUBIZOLLES, F.; SCHMIDT, A.; NIGG, E. A. Quantitative analysis of human centrosome architecture by targeted proteomics and fluorescence imaging. **The EMBO Journal**, p. e201694462, 2016. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emboj.201694462>>. .
- BAUMANN, C. A.; CHOKSHI, N.; SALTIEL, A. R.; RIBON, V. Cloning and characterization of a functional peroxisome proliferator activator receptor- γ -responsive element in the promoter of the CAP gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9131–9135, 2000.
- BENESCH, F.; DENGLER, F.; MASUR, F.; PFANNKUCHE, H.; GABEL, G. Monocarboxylate transporters 1 and 4: expression and regulation by PPAR in ovine ruminal epithelial cells. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 12, p. R1428–R1437, 2014. Disponível em: <<http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00408.2013>>. .
- BERG, A. H.; COMBS, T. P.; DU, X.; BROWNLEE, M.; SCHERER, P. E. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nature medicine**, v. 7, n. 8, p. 947–953, 2001.
- BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 409–435, 2002.
- BETTOUN, D. J. A Vitamin D Receptor-Ser/Thr Phosphatase-p70 S6 Kinase Complex and Modulation of Its Enzymatic Activities by the Ligand. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 24847–24850, 2002. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.C200187200>>. .
- BOCCA, C.; BOZZO, F.; MARTINASSO, G.; CANUTO, R. A.; MIGLIETTA, A. Involvement of PPAR α in the growth inhibitory effect of arachidonic acid on breast cancer cells. **The British journal of nutrition**, v. 100, n. 4, p. 739–750, 2008.
- BONETTA, L. Protein–protein interactions: Interactome under construction. **Nature**, v. 468, n. 7325, p. 851–854, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/468851a>>. .

- BOSSCHER, K. DE; BERGHE, W. VANDEN; HAEGEMAN, G. Glucocorticoid repression of AP-1 is not mediated by competition for nuclear coactivators. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 15, n. 2, p. 219–27, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158329>>[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158329?ordinalpos=49&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum)>.
- BOSSCHER, K. DE; BERGHE, W. VANDEN; HAEGEMAN, G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6868–86, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072333>>. Acesso em: 2/11/2014.
- BOUTCHUENG-DJIDJOU, M.; COLLARD-SIMARD, G.; FORTIER, S.; et al. The Last Enzyme of the De Novo Purine Synthesis Pathway 5-aminoimidazole-4-carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase (ATIC) Plays a Central Role in Insulin Signaling and the Golgi/Endosomes Protein Network. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 4, p. 1079–1092, 2015. Disponível em: <<http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M114.047159>>.
- BRAISSANT, O.; WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor- alpha, -beta, and gamma during rat embryonic development. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 2748–2754, 1998.
- BRÜCKNER, A.; POLGE, C.; LENTZE, N.; AUERBACH, D.; SCHLATTNER, U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. **International Journal of Molecular Sciences**, 2009.
- BURNS, K. A.; HEUVEL, J. P. VANDEN. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2007.
- BURTON, J. D.; GOLDENBERG, D. M.; BLUMENTHAL, R. D. Potential of peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist compounds as therapeutic agents for a wide range of cancer types. **PPAR Research**, 2008.
- CAELLES, C.; GONZÁLEZ-SANCHO, J. M.; MUÑOZ, A. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. **Genes & development**, v. 11, n. 24, p. 3351–3364, 1997.
- CAMP, H. S.; TAFURI, S. R.; LEFF, T. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 392–397, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886850>>.
- CAO, W.; MEDVEDEV, A. V.; DANIEL, K. W.; COLLINS, S. B-Adrenergic Activation of p38 MAP Kinase in Adipocytes: cAMP INDUCTION OF THE UNCOUPLING PROTEIN 1 (UCP1) GENE REQUIRES p38 MAP KINASE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27077–27082, 2001. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M101049200>>.
- CARAZZOLLE, M. F.; CARVALHO, L. M. DE; SLEPICKA, H. H.; et al. IIS - Integrated Interactome System: A web-based platform for the annotation, analysis and visualization of protein-metabolite-gene-drug interactions by integrating a variety of data sources and tools. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014. Public Library of Science.
- CARMICHAEL, A. R.; BATES, T. Obesity and breast cancer: a review of the literature. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 13, n. 2, p. 85–92, 2004.
- CARRIGAN, A.; WALTHER, R. F.; SALEM, H. A.; et al. An active nuclear retention signal in the glucocorticoid receptor functions as a strong inducer of transcriptional activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 15, p. 10963–71, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314103>>. Acesso em: 3/12/2014.
- CATALINA-RODRIGUEZ, O.; KOLUKULA, V. K.; TOMITA, Y.; et al. The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis Supplementary Data. **Oncotarget**, v. 3, n. 10, p. 1220–35, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3717962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- CAUSIER, B. Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, n. 5, p. 350–367, 2004.
- CHANDRA, V.; HUANG, P.; HAMURO, Y.; et al. Structure of the intact PPAR-γ-RXR-α nuclear receptor complex on DNA. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 350–356, 2009.
- CHATTERJEE, V. K. K. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ and Insulin Action: Insights from Human Genetics. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 60, n. 3, p. 51–55, 2004. Disponível em: <<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000074501>>.
- CHAWLA, A.; LEE, C.; BARAK, Y.; et al. PPAR alpha is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. **PNAS**, v. 100, n. 3, p. 1268–1273, 2003.
- CHENG, J.; ZHANG, C.; SHAPIRO, D. J. A functional serine 118 phosphorylation site in estrogen receptor-alpha is required for down-regulation of gene expression by 17beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4634–41, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17615152>>. Acesso em: 3/12/2014.
- CHINETTI, G.; GRIGLIO, S.; ANTONUCCI, M.; et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25573–25580, 1998.
- CHINETTI, G.; GRIGLIO, S.; ANTONUCCI, M.; et al. Activation of Proliferator-activated Receptors alpha and gamma Induces Apoptosis of Human Monocyte-derived Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25573–25580, 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.40.25573>>. Acesso em: 7/12/2014.
- CHOI, J. H.; BANKS, A. S.; KAMENECKA, T. M.; et al. Antidiabetic actions of a non-agonist PPARγ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 477–81, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3179551&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- CLAY, C. E.; NAMEN, A. M.; ATSUMI, G. I.; et al. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 10, p. 1905–1911, 1999.

COMBS, T. P.; WAGNER, J. A.; BERGER, J.; et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPAR γ agonists: A potential mechanism of insulin sensitization. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 998–1007, 2002.

CONDUIT, P. T.; WAINMAN, A.; RAFF, J. W. Centrosome function and assembly in animal cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 10, p. 611–624, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm4062>>.

CONZEN, S. D. Minireview: nuclear receptors and breast cancer. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 22, n. 10, p. 2215–28, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2582530&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/10/2014.

CUNARD, R.; ETO, Y.; MULJADI, J. T.; et al. Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 12, p. 7530–7536, 2004.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, 2011.

DRESSEL, U.; ALLEN, T. L.; PIPPAL, J. B.; et al. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 17, n. 12, p. 2477–93, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525954>>. Acesso em: 8/12/2014.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 33–42, 2000.

DU, J.; ZHANG, L.; LIU, S.; et al. PPAR γ transcriptionally regulates the expression of insulin-degrading enzyme in primary neurons. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 383, n. 4, p. 485–490, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X09007451>>.

EICHHORN, P. J. A.; CREYGHTON, M. P.; BERNARDS, R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, 2009.

ELSTNER, E.; MÜLLER, C.; KOSHIZUKA, K.; et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXN mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8806–8811, 1998.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. European Medicines Agency recommends suspension of Avandia, Avandamet and Avaglim. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2010/09/news_detail_001119.jsp>. Acesso em: 13/10/2016.

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, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057233>>. Acesso em: 10/11/2014.

FAJAS, L.; AUBOEU, D.; RASPÉ, E.; et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18779–18789, 1997.

FAJAS, L.; FRUCHART, J. C.; AUWERX, J. PPAR γ 3 mRNA: A distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. **FEBS Letters**, v. 438, n. 1-2, p. 55–60, 1998.

FATTORI, J.; CAMPOS, J. L. O.; DORATIOTO, T. R.; et al. RXR Agonist Modulates TR: Corepressor Dissociation Upon 9- cis Retinoic Acid Treatment. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 258–273, 2015. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2014-1251>>.

FRUCHART, J.-C. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation and high-density lipoprotein metabolism. **American Journal of Cardiology**, v. 88, n. 12, p. 24–29, 2001.

FRUEBIS, J.; TSAO, T. S.; JAVORSCHI, S.; et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 2005–2010, 2001.

GALLETTA, B. J.; FAGERSTROM, C. J.; SCHOBORG, T. A.; et al. A centrosome interactome provides insight into organelle assembly and reveals a non-duplication role for Plk4. **Nature Communications**, v. 7, p. 12476, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms12476>>.

GARZA, A. M. S.; KHAN, S. H.; KUMAR, R. Site-specific phosphorylation induces functionally active conformation in the intrinsically disordered N-terminal activation function (AF1) domain of the glucocorticoid receptor. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 1, p. 220–30, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798295&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/12/2014.

GAVIN, A.-C.; BÖSCHE, M.; KRAUSE, R.; et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 141–147, 2002.

GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Gene Ontology Consortium: going forward. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D1049–56, 2015. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gku1179>\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428369\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4383973>.

GERVOIS, P.; VU-DAC, N.; KLEEMANN, R.; et al. Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33471–33477, 2001.

- GIAGINIS, C.; KATSAMANGOU, E.; TSOUROULIS, G.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor-alpha expression in pancreatic ductal adenocarcinoma: association with clinicopathological parameters, tumor proliferative capacity, and patients' survival. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 15, n. 5, p. BR148-56, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396032>>. .
- GLASS, C. K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. **Endocrine Reviews**, v. 15, p. 391-407, 1994.
- GOH, W. W. B.; LEE, Y. H.; CHUNG, M.; WONG, L. How advancement in biological network analysis methods empowers proteomics. **Proteomics**, 2012.
- GONG, X.-M.; CHOI, J.; FRANZIN, C. M.; et al. Conformation of Membrane-associated Proapoptotic tBid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 28, p. 28954-28960, 2004. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M403490200>>. .
- GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J.-A.; LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 950-64, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520817>>. Acesso em: 24/10/2014.
- HELSEN, C.; CLAESSENS, F. Looking at nuclear receptors from a new angle. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 97-106, 2014. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055275>>. Acesso em: 21/9/2014.
- HERMANSON, O.; JEPSEN, K.; ROSENFELD, M. G. N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. **Nature**, v. 419, n. 6910, p. 934-939, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12410313>. .
- HINDS, T. D.; STECHSCHULTE, L. A.; CASH, H. A.; et al. Protein phosphatase 5 mediates lipid metabolism through reciprocal control of glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-?? (PPAR??)*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 42911-42922, 2011.
- HIRAI, T.; FUKUI, Y.; MOTOJIMA, K. PPARalpha agonists positively and negatively regulate the expression of several nutrient/drug transporters in mouse small intestine. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 11, p. 2185-2190, 2007.
- HONG, C.; TONTONOZ, P. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. **Current Opinion in Genetics and Development**, 2008.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; MURRAY, D. L.; CHOY, L. N.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 11, p. 4854-4858, 1994.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.
- HOTTA, K.; FUNAHASHI, T.; ARITA, Y.; et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, n. 6, p. 1595-1599, 2000.
- HU, E.; KIM, J. B.; SARRAF, P.; SPIEGELMAN, B. M. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5295, p. 2100-2103, 1996.
- HUANG, H.; XIE, Z.; YOKOYAMA, W.; YU, L.; WANG, T. T. Y. Identification of liver CYP51 as a gene responsive to circulating cholesterol in a hamster model. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e16, 2016. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S2048679016000033>. .
- HWANG, E. J.; LEE, J. M.; JEONG, J.; et al. SUMOylation of RORalpha potentiates transcriptional activation function. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 378, n. 3, p. 513-7, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041634>>. Acesso em: 3/12/2014.
- IKEDA, M.; KANAO, Y.; YAMANAKA, M.; et al. Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. **FEBS Letters**, v. 582, n. 16, p. 2435-2440, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2008.06.007>>. .
- INOUE, I.; SHINO, K.; NOJI, S.; AWATA, T.; KATAYAMA, S. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in Primary Cultures of Human Vascular Endothelial Cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 374, n. 246, p. 370-374, 1998.
- ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645-650, 1990.
- ISSEMANN, I.; PRINCE, R. A.; TUGWOOD, J. D.; GREEN, S. The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 37-47, 1993.
- JIANG, Y.; ZOU, L.; ZHANG, C.; et al. PPARgamma and Wnt/beta-Catenin pathway in human breast cancer: expression pattern, molecular interaction and clinical/prognostic correlations. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, n. 11, p. 1551-1559, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00432-009-0602-8>>. .
- KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, 2006.
- KAMENECKA, T. M.; BUSBY, S. A.; KUMAR, N.; et al. Potent Anti-Diabetic Actions of a Novel Non-Agonist PPARgamma Ligand that Blocks Cdk5-Mediated Phosphorylation. **Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program**, p. 1-30, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762958>>. .

- KAO, J.; SALARI, K.; BOCANEGRA, M.; et al. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. (M. V. Blagosklonny, Ed.) **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6146, 2009. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006146>>.
- KARAGIANNI, P.; WONG, J. HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5439–5449, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17694085>>.
- KARNATI, S.; BAUMGART-VOGT, E. Peroxisomes in mouse and human lung: their involvement in pulmonary lipid metabolism. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 4, p. 719–740, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00418-008-0462-3>>.
- KESHET, R.; BRYANSKER KRAITSHEIN, Z.; SHANZER, M.; et al. c-Abl tyrosine kinase promotes adipocyte differentiation by targeting PPAR-gamma 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 46, p. 16365–16370, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1411086111>>.
- KILGORE, M. W.; TATE, P. L.; RAI, S.; SENGOKU, E.; PRICE, T. M. MCF-7 and T47D human breast cancer cells contain a functional peroxisomal response. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 129, n. 2, p. 229–235, 1997.
- KLIEWER, S. A.; UMESONO, K.; NOONAN, D. J.; HEYMAN, R. A.; EVANS, R. M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, v. 358, p. 771–774, 1992.
- KLUMPP, S. Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 458–462, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489202001765>>.
- KOEFLER, H. P. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Cancers. , p. 1–9, 2003.
- KOLUKULA, V. K.; SAHU, G.; WELLSTEIN, A.; et al. SLC25A1, or CIC, is a novel transcriptional target of mutant p53 and a negative tumor prognostic marker. **Oncotarget**, v. 5, n. 5, p. 1212–1225, 2014. Disponível em: <<http://oncotarget.com/abstract/1831>>.
- KÖNIG, B.; FISCHER, S.; SCHLOTTE, S.; et al. Monocarboxylate transporter 1 and CD147 are up-regulated by natural and synthetic peroxisome proliferator-activated receptor α agonists in livers of rodents and pigs. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 9, p. 1248–1256, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.200900432>>.
- KÖNIG, B.; KOCH, A.; GIGGEL, K.; et al. Monocarboxylate transporter (MCT)-1 is up-regulated by PPAR α . **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 6, p. 899–904, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416508000585>>.
- KOZJAK-PAVLOVIC, V.; PRELL, F.; THIEDE, B.; et al. C1orf163/RESA1 Is a Novel Mitochondrial Intermembrane Space Protein Connected to Respiratory Chain Assembly. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 4, p. 908–920, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283613007390>>.
- KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; MIKI, H.; et al. PPARgamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. **Molecular Cell**, v. 4, n. 4, p. 597–609, 1999.
- KUBOTA, T.; KOSHIZUKA, K.; WILLIAMSON, E. A.; et al. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. **Cancer research**, v. 58, n. 310, p. 3344–3352, 1998.
- KUMAR, R.; LITWACK, G. Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. **Steroids**, v. 74, n. 12, p. 877–883, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3074935&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/12/2014.
- KWOK, H. F.; ZHAO, D.; GUO, L.; et al. The prognostic significance of protein tyrosine phosphatase 4A2 in breast cancer. **OncoTargets and Therapy**, p. 1707, 2015. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/the-prognostic-significance-of-protein-tyrosine-phosphatase-4a2-in-bre-peer-reviewed-article-OTT>>.
- LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. **The Nuclear Receptor FactsBook**. Elsevier, 2002.
- LAZENNEC, G.; CANAPLE, L.; SAUGY, D.; WAHLI, W. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) by Their Ligands and Protein Kinase A Activators. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 12, p. 1962–1975, 2000. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/mend.14.12.0575>>.
- LEE, K. S.; PARK, S. J.; HWANG, P. H.; et al. PPAR-gamma modulates allergic inflammation through up-regulation of PTEN. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 8, p. 1033–1035, 2005. Disponível em: <<http://www.fasebj.org>>.
- LEFEBVRE, A.-M.; CHEN, I.; DESREUMAUX, P.; et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. **Nature Medicine**, v. 4, n. 9, p. 1053–1057, 1998. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/2036>>.
- LEFF, T. AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. **Biochemical Society transactions**, v. 31, n. Pt 1, p. 224–7, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12546690>>.
- LEHMANN, J. M.; MOORE, L. B.; SMITH-OLIVER, T. A.; et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 22, p. 12953–12956, 1995.
- LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The many faces of PPARgamma. **Cell**, v. 123, n. 6, p. 993–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16360030>>. Acesso em: 10/9/2014.
- LEWIŃSKA, M.; ZELENKO, U.; MERZEL, F.; et al. Polymorphisms of CYP51A1 from Cholesterol Synthesis: Associations with Birth Weight and Maternal Lipid Levels and Impact on CYP51 Protein Structure. (C. M. Soares, Ed.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82554, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0082554>>.

- LI, T.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; et al. Fenofibrate induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells via activation of NF-kappaB pathway. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 96, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24529079>>. .
- LU, J.; ZHUANG, Z.; SONG, D. K.; et al. The effect of a PP2A inhibitor on the nuclear receptor corepressor pathway in glioma. **Journal of Neurosurgery**, v. 113, n. 2, p. 225–233, 2010. Disponível em: <<http://thejns.org/doi/abs/10.3171/2009.11.JNS091272>>. .
- LUSCHER, T. F. Cholesterol production, accumulation, reverse transport, and excretion: opportunities for statins, PPAR-agonists, and PCSK9 inhibitors. **European Heart Journal**, v. 36, n. 43, p. 2965–2967, 2015. Disponível em: <<http://eurheartj.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/eurheartj/ehv576>>. .
- MAHMOOD, T.; YANG, P. C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 9, p. 429–434, 2012.
- MALOVANNAYA, A.; LI, Y.; BULYNKO, Y.; et al. Streamlined analysis schema for high-throughput identification of endogenous protein complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 6, p. 2431–6, 2010. National Academy of Sciences. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/107/6/2431.full>>. .
- MANDARD, S.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 4, p. 393–416, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999402>>. Acesso em: 27/10/2014.
- MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835–839, 1995.
- MASUGI, J.; TAMORI, Y.; KASUGA, M. Inhibition of adipogenesis by a COOH-terminally truncated mutant of PPARgamma2 in 3T3-L1 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 264, n. 1, p. 93–99, 1999.
- MATUSYAMA, R.; TAKADA, I.; YOKOYAMA, A.; et al. Double PHD fingers protein DP2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of estrogen-related receptor α through histone deacetylase 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 8, p. 4816–4816, 2015. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.A109.077024>>. .
- MCWILLIAMS, R. R.; BAMLET, W. R.; ANDRADE, M. DE; et al. Nucleotide Excision Repair Pathway Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk: Evidence for role of MMS19L. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 4, p. 1295–1302, 2009. Disponível em: <<http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-08-1109>>. .
- MEHTA, R. G.; WILLIAMSON, E.; PATEL, M. K.; KOEFFLER, H. P. A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 5, p. 418–423, 2000.
- MILES, P. D. G.; ROMEO, O. M.; HIGO, K.; et al. TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1678–1683, 1997.
- MOLL, U. M.; MARCHENKO, N.; ZHANG, X.-K. p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4725–4743, 2006.
- MOXLEY, K. M.; BENBROOK, D. M.; QUEIMADO, L.; et al. The role of single nucleotide polymorphisms of the ERCC1 and MMS19 genes in predicting platinum-sensitivity, progression-free and overall survival in advanced epithelial ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 130, n. 2, p. 377–382, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825813003107>>. .
- MUELLER, E.; SARRAF, P.; TONTONOZ, P.; et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. **Molecular cell**, v. 1, n. 3, p. 465–470, 1998.
- MUZIO, G.; MAGGIORA, M.; ORALDI, M.; TROMBETTA, A.; CANUTO, R. A. PPAR α and PP2A are involved in the proapoptotic effect of conjugated linoleic acid on human hepatoma cell line SK-HEP-1. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2395–2401, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.23004>>. .
- NAGARAJ, S.; RAGHAVAN, A. V.; RAO, S. N.; MANJAPPARA, U. V. Obestatin and Nt8U influence glycerolipid metabolism and PPAR gamma signaling in mice. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 53, p. 414–422, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272514002040>>. .
- NAGY, L.; KAO, H. Y.; CHAKRAVARTI, D.; et al. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. **Cell**, v. 89, n. 3, p. 373–380, 1997.
- NINOMIYA, I.; YAMAZAKI, K.; OYAMA, K.; et al. Pioglitazone inhibits the proliferation and metastasis of human pancreatic cancer cells. **Oncology Letters**, v. 8, n. 6, p. 2709–2714, 2014. Spandidos Publications.
- OBERKOFER, H.; ESTERBAUER, H.; LINNEMAYR, V.; et al. Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Coactivator-1 Recruitment Regulates PPAR Subtype Specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16750–16757, 2002. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M200475200>>. .
- OGAWA, S.; LOZACH, J.; BENNER, C.; et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 707–721, 2005.
- OGINO, S.; SHIMA, K.; BABA, Y.; et al. Colorectal Cancer Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPARG, PPARgamma) Is Associated With Good Prognosis. **Gastroenterology**, v. 136, n. 4, p. 1242–1250, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508508023068>>. .
- ORALDI, M.; SARACINO, S.; MAGGIORA, M.; et al. Importance of inverse correlation between ALDH3A1 and PPAR γ in tumor cells and tissue regeneration. **Chemico-Biological Interactions**, v. 191, n. 1-3, p. 171–176, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279711000160>>. .

- ORDÓÑEZ-MORÁN, P.; MUÑOZ, A. Nuclear receptors: Genomic and non-genomic effects converge. **Cell Cycle**, 2009.
- OTONKOSKI, T.; JIAO, H.; KAMINEN-AHOLA, N.; et al. Physical Exercise-Induced Hypoglycemia Caused by Failed Silencing of Monocarboxylate Transporter 1 in Pancreatic β Cells. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 467–474, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707613445>>.
- OW, Y.-L. P.; GREEN, D. R.; HAO, Z.; MAK, T. W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 532–542, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2434>>.
- PALMIERI, F.; PIERRI, C. L. Mitochondrial metabolite transport. **Essays in biochemistry**, v. 47, p. 37–52, 2010. Portland Press Limited. Disponível em: <<http://essays.biochemistry.org/content/47/37.abstract>>.
- PATEL, H.; TRUANT, R.; RACHUBINSKI, R. A.; CAPONE, J. P. Activity and subcellular compartmentalization of peroxisome proliferator-activated receptor α are altered by the centrosome-associated protein CAP350. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 1, p. 175–186, 2005. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.01600>>.
- PATEL, L.; PASS, I.; COXON, P.; et al. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPAR γ agonists are mediated via upregulation of PTEN. **Current Biology**, v. 11, n. 10, p. 764–768, 2001.
- PERALDI, P.; XU, M.; SPIEGELMAN, B. M. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor α induced inhibition of insulin signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 7, p. 1863–1869, 1997.
- PERISSI, V.; AGGARWAL, A.; GLASS, C. K.; ROSE, D. W.; ROSENFELD, M. G. A Corepressor/Coactivator Exchange Complex Required for Transcriptional Activation by Nuclear Receptors and Other Regulated Transcription Factors. **Cell**, v. 116, n. 4, p. 511–526, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404001333>>.
- PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.
- PERROTTI, D.; NEVIANI, P. Protein phosphatase 2A (PP2A), a drugable tumor suppressor in Ph1(+) leukemias. **Cancer and Metastasis Reviews**, 2008.
- PETERS, J. M.; SHAH, Y. M.; GONZALEZ, F. J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. **Nature Reviews Cancer**, 2012.
- PICARD, M.; TAVASSALO, T.; GOUSPILOU, G.; HEPPLER, R. T. Mitochondria: isolation, structure and function. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 18, p. 4413–4421, 2011.
- PICHARD, C.; PLU-BUREAU, G.; NEVES-E CASTRO, M.; GOMPEL, A. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. **Maturitas**, 2008.
- PIGNATELLI, M.; COCCA, C.; SANTOS, A.; PEREZ-CASTILLO, A. Enhancement of BRCA1 gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor γ in the MCF-7 breast cancer cell line. **Oncogene**, v. 22, n. 35, p. 5446–5450, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1206824>>.
- PIGNATELLI, M.; CORTÉS-CANTELI, M.; LAI, C.; SANTOS, A.; PEREZ-CASTILLO, A. The peroxisome proliferator-activated receptor γ is an inhibitor of ErbB activity in human breast cancer cells. **Journal of cell science**, v. 114, n. Pt 22, p. 4117–4126, 2001.
- POULSEN, L. L. C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 23, n. 6, p. 631–9, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273692>>. Acesso em: 25/11/2014.
- PUTTI, T. C.; EL-REHIM, D. M. A.; RAKHA, E. A.; et al. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.**, v. 18, n. 1, p. 26–35, 2005.
- QUAN, Q.; WANG, J.; LI, X.; WANG, Y. Ginsenoside Rg1 Decreases A β 1–42 Level by Upregulating PPAR γ and IDE Expression in the Hippocampus of a Rat Model of Alzheimer's Disease. (J. D. Fryer, Ed.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59155, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059155>>.
- QUIGG, M.; CLAYBURN, H.; STRAUME, M.; MENAKER, M.; BERTRAM, E. H. Hypothalamic neuronal loss and altered circadian rhythm of temperature in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 40, n. 12, p. 1688–1696, 1999.
- RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, 2007.
- RAVNSKJÆR, K.; BOERGESEN, M.; DALGAARD, L. T.; MANDRUP, S. Glucose-induced repression of PPAR α gene expression in pancreatic beta-cells involves PP2A activation and AMPK inactivation. **Journal of molecular endocrinology**, v. 36, n. 2, p. 289–99, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595700>>.
- RENSHAW, S. A.; DEMPSEY, C. E.; BARNES, F. A.; et al. Three Novel Bid Proteins Generated by Alternative Splicing of the Human Bid Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 2846–2855, 2004.
- RIBON, V.; JOHNSON, J. H.; CAMP, H. S.; SALTIEL, A. R. Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor γ activation stimulates expression of the CAP gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14751–14756, 1998.
- RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897–907, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm1496>>.

- RIGGINS, R. B.; MAZZOTTA, M. M.; MANIYA, O. Z.; CLARKE, R. Orphan nuclear receptors in breast cancer pathogenesis and therapeutic response. **Endocrine-related cancer**, v. 17, n. 3, p. R213–31, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3518023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/10/2014.
- RIZZO, W. B. Genetics and prospective therapeutic targets for Sjögren-Larsson Syndrome. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 4, n. 4, p. 395–406, 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/21678707.2016.1154453>>.
- ROBBINS, G. T. PPAR gamma, bioactive lipids, and cancer progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, n. 1, p. 1816, 2012.
- ROLE, T. H. E.; PEROXISOME, O. F.; CARCINOGENESIS, R. I. N. 15Deoxy-A 12g 14-Prostaglandin J2 Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR γ . , v. 12, n. 3, p. 181–195, 2013.
- ROSEN, E. D.; SARRAF, P.; TROY, A. E.; et al. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Molecular Cell**, v. 4, n. 4, p. 611–617, 1999.
- ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 41, p. 37731–37734, 2001. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R100034200>>.
- ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68–78, 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3181>>.
- SAELENS, X.; FESTJENS, N.; WALLE, L. VANDE; et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861–2874, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1207523>>.
- SAEZ, E.; ROSENFELD, J.; LIVOLSI, A.; et al. PPAR gamma signaling exacerbates mammary gland tumor development. **Genes & development**, v. 18, n. 5, p. 528–40, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=374235&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/10/2014.
- SAEZ, E.; TONTONNOZ, P.; NELSON, M. C.; et al. Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. **Nature Medicine**, v. 4, n. 9, p. 1058–1061, 1998. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/2042>>.
- SANTOS, G. M.; FAIRALL, L.; SCHWABE, J. W. R. Negative regulation by nuclear receptors: a plethora of mechanisms. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 22, n. 3, p. 87–93, 2011.
- SARRAF, P.; MUELLER, E.; JONES, D.; et al. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . **Nature medicine**, v. 4, n. 9, p. 1046–1052, 1998.
- SCATENA, R.; BOTTONI, P.; GIARDINA, B. Mitochondria, PPARs, and Cancer: Is Receptor-Independent Action of PPAR Agonists a Key? **PPAR Research**, v. 2008, p. 1–10, 2008. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ppar/2008/256251/>>.
- SCHOONJANS, K.; PEINADO-ONSURBE, J.; LEFEBVRE, A. M.; et al. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. **The EMBO journal**, v. 15, n. 19, p. 5336–5348, 1996.
- SCHOONJANS, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, H.; et al. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 33, p. 19269–19276, 1995.
- SCIENTIFIC, T. Pierce BCA Protein Assay Kit. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf>. Acesso em: 5/7/2016.
- SCIENTIFIC, T. PROTEIN A-SEPHAROSE® 4B CONJUGATE. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/101041_Rev1008.pdf>. Acesso em: 5/8/2016.
- SCORSATO, V.; LIMA, T. B.; RIGHETTO, G. L.; et al. Crystal structure of the human Tip41 orthologue, TIPRL, reveals a novel fold and a binding site for the PP2Ac C-terminus. **Scientific Reports**, v. 6, p. 30813, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep30813>>.
- SFEIR, Z.; IBRAHIMI, A.; AMRI, E. Z.; GRIMALDI, P.; ABUMRAD, N. A. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. **Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids**, v. 57, n. 1, p. 17–21, 1997.
- SHABALINA, I.; WIKLUND, C.; BENGTSOON, T.; et al. Uncoupling protein-1: involvement in a novel pathway for β -adrenergic, cAMP-mediated intestinal relaxation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 5, p. G1107–G1116, 2002. Disponível em: <<http://ajpgi.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpgi.00193.2002>>.
- SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; et al. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003.
- SHERMAN, M. H.; DOWNES, M.; EVANS, R. M. Nuclear receptors as modulators of the tumor microenvironment. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 5, n. 1, p. 3–10, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3408218&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16/10/2014.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.
- SHIGETO, T.; YOKOYAMA, Y.; XIN, B.; MIZUNUMA, H. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands inhibit the growth of human ovarian cancer. **Oncology reports**, v. 18, n. 4, p. 833–840, 2007.
- SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24399786>>.

- SMETANA, J. H. C.; ZANCHIN, N. I. T. Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, $\alpha 4$ and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL). **FEBS Journal**, v. 274, n. 22, p. 5891–5904, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2007.06112.x>>. .
- SMITH, U.; GOGG, S.; JOHANSSON, A.; et al. Thiazolidinediones (PPAR γ agonists) but not PPAR α agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 1, p. 215–220, 2001.
- SOTIROPOULOS, K. B.; CLERMONT, A.; YASUDA, Y.; et al. Adipose-specific effect of rosiglitazone on vascular permeability and protein kinase C activation: novel mechanism for PPAR γ agonist's effects on edema and weight gain. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 8, p. 1203–1205, 2006.
- SOULE, H. D.; MALONEY, T. M.; WOLMAN, S. R.; et al. Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-101. **CANCER RESEARCH**, v. 50, p. 6075–6086, 1990.
- SOZIO, M. S.; LU, C.; ZENG, Y.; LIANGPUNSAKUL, S.; CRABB, D. W. Activated AMPK inhibits PPAR- $\{\alpha\}$ and PPAR- $\{\gamma\}$ transcriptional activity in hepatoma cells. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 301, n. 3, p. G739–47, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3191559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
- SPENCER, S. L.; SORGER, P. K. Measuring and Modeling Apoptosis in Single Cells. **Cell**, v. 144, n. 6, p. 926–939, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741100239X>>. .
- STAELS, B.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J.; et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, v. 98, n. 19, p. 2088–2093, 1998.
- STAELS, B.; KOENIG, W.; HABIB, A.; et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. , 1998. MACMILLAN MAGAZINES LTD. Disponível em: <<http://discovery.ucl.ac.uk/97014/>>. .
- SU, C. G.; WEN, X.; BAILEY, S. T.; et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 4, p. 383–389, 1999.
- SUBIK, K.; LEE, J. F.; BAXTER, L.; et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 4, n. 1, p. 35–41, 2010.
- SUEYOSHI, T.; MOORE, R.; SUGATANI, J.; MATSUMURA, Y.; NEGISHI, M. PPP1R16A, The Membrane Subunit of Protein Phosphatase 1 , Signals Nuclear Translocation of the Nuclear Receptor Constitutive Active/Androstane Receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 73, n. 4, p. 1113–1121, 2008. Disponível em: <<http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.107.042960>>. .
- SUGATANI, J.; HATTORI, Y.; NOGUCHI, Y.; et al. Threonine-290 Regulates Nuclear Translocation of the Human Pregnane X Receptor through Its Phosphorylation/Dephosphorylation by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Protein Phosphatase 1. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 42, n. 10, p. 1708–1718, 2014. Disponível em: <<http://dmd.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/dmd.114.059139>>. .
- SUH, N.; WANG, Y.; WILLIAMS, C. R.; et al. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. **Cancer research**, v. 59, n. 22, p. 5671–5673, 1999.
- SUN, J.; ALUVILA, S.; KOTARIA, R.; et al. Mitochondrial and Plasma Membrane Citrate Transporters: Discovery of Selective Inhibitors and Application to Structure/Function Analysis. **Molecular and cellular pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 101–110, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2913483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
- TACHIBANA, K.; YAMASAKI, D.; ISHIMOTO, K.; DOI, T. The Role of PPARs in Cancer. **PPAR research**, v. 2008, p. 102737, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2435221&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/10/2014.
- TAKAHASHI, S.; TANAKA, T.; KODAMA, T.; SAKAI, J. Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR delta), a novel target site for drug discovery in metabolic syndrome. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 53, n. 6, p. 501–7, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713711>>. Acesso em: 8/12/2014.
- TAMASI, V.; MILLER, K. K. M.; RIPP, S. L.; et al. Modulation of Receptor Phosphorylation Contributes to Activation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor α by Dehydroepiandrosterone and Other Peroxisome Proliferators. **Molecular pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 968–976, 2009.
- TANAKA, T.; YAMAMOTO, J.; IWASAKI, S.; et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. **PNAS**, v. 100, p. 15924–15929, 2003.
- TONTONOZ, P.; GRAVES, R. A.; BUDAVARI, A. I.; et al. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ and RXR α . **Nucleic acids research**, v. 22, n. 25, p. 5628–5634, 1994.
- TONTONOZ, P.; HU, E.; DEVINE, J.; BEALE, E. G.; SPIEGELMAN, B. M. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 1, p. 351–357, 1995.
- TONTONOZ, P.; HU, E.; GRAVES, R. A.; BUDAVARI, A. I.; SPIEGELMAN, B. M. mPPAR γ 2: Tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes and Development**, v. 8, n. 10, p. 1224–1234, 1994.
- TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, 1994.
- TONTONOZ, P.; SINGER, S.; FORMAN, B. M.; et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and the retinoid X receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 1, p. 237–241, 1997.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. **Annual review of biochemistry**, v. 77, p. 289–312, 2008.

TSUZUKI, S.; KITAJIMA, K.; NAKANO, T.; et al. Cross talk between retinoic acid signaling and transcription factor GATA-2. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 15, p. 6824–36, 2004. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/content/24/15/6824.short>>.

URATA, Y.; GOTO, S.; KAWAKATSU, M.; et al. DHEA attenuates PDGF-induced phenotypic proliferation of vascular smooth muscle A7r5 cells through redox regulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 2, p. 489–494, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X10008181>>.

WAHLI, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism *. , v. 20, n. December, p. 649–688, 2014.

WAIRAGU, P. M.; PHAN, A. N.; KIM, M.-K.; et al. Insulin priming effect on estradiol-induced breast cancer metabolism and growth. **Cancer Biology & Therapy**, v. 16, n. 3, p. 484–492, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384047.2015.1016660>>.

WANG, X.; KILGORE, M. W. Signal cross-talk between estrogen receptor alpha and beta and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 194, n. 1-2, p. 123–133, 2002.

WANG, X.; SUN, Y.; WONG, J.; CONKLIN, D. S. PPARγ maintains ERBB2-positive breast cancer stem cells. **Oncogene**, v. 32, n. 49, p. 5512–21, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3898098&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/10/2014.

WEBB, P.; NGUYEN, N.-H.; CHIELLINI, G.; et al. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2002.

WHO. Cancer - World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>.

WILLSON, T. M.; BROWN, P. J.; STERNBACH, D. D.; HENKE, B. R. The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery †. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 527–550, 2000. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm990554g>>.

WU, K.; YANG, Y.; LIU, D.; et al. Activation of PPARγ suppresses proliferation and induces apoptosis of esophageal cancer cells by inhibiting TLR4-dependent MAPK pathway. **Oncotarget**, 2014. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/abstract/10067>>.

WU, X.; LI, H.; CHEN, J. D. The Human Homologue of the Yeast DNA Repair and TFIIH Regulator MMS19 Is an AF-1-specific Coactivator of Estrogen Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 23962–23968, 2001.

XU, J.; LI, Q. Review of the in Vivo Functions of the p160 Steroid Receptor Coactivator Family. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 9, p. 1681–1692, 2003. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2003-0116>>.

YAMAGUCHI, H.; BHALLA, K.; WANG, H. G. Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 release from mitochondria. **Cancer Research**, v. 63, n. 7, p. 1483–1489, 2003.

YIN, F.; WAKINO, S.; LIU, Z.; et al. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 286, n. 5, p. 916–922, 2001.

YIN, Y.; RUSSELL, R. G.; DETTIN, L. E.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor Delta and Gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 65, n. 9, p. 3950–3957, 2005.

YU, M.; JIANG, M.; CHEN, Y.; et al. Inhibition of Macrophage CD36 Expression and Cellular Oxidized Low Density Lipoprotein (oxLDL) Accumulation by Tamoxifen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 33, p. 16977–16989, 2016. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M116.740092>>.

ZHANG, J.-L. Methyl-methanesulfonate sensitivity 19 expression is associated with metastasis and chemoradiotherapy response in esophageal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 14, p. 4240, 2015. Disponível em: <<http://www.wjnet.com/1007-9327/full/v21/i14/4240.htm>>.

ZHOU, X.-F. F.; SHEN, X. Q.; SHEMSHEDINI, L. Ligand-activated retinoic acid receptor inhibits AP-1 transactivation by disrupting c-Jun/c-Fos dimerization. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 2, p. 276–285, 1999. Disponível em: <<http://mend.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/me.13.2.276>\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973257>.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Interações entre o receptor nuclear PPAR gama e outras proteínas celulares em câncer de mama*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Nathalia de Carvalho Indolfo
Nome do(a) aluno(a): Nathalia de Carvalho Indolfo

Assinatura: Ana Carolina Migliorini Figueira
Nome do(a) orientador(a): Ana Carolina Migliorini Figueira


Data: 14/10/2016

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada "**Interações entre o receptor nuclear PPAR gama e outras proteínas celulares em câncer de mama**", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 14 de outubro de 2016

Assinatura : Nathalia de Carvalho Indolfo
Nome do(a) autor(a): **Nathalia de Carvalho Indolfo**
RG n.º 46675517-X

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Ana Carolina Migliorini Figueira**
RG n.º