



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

NATÁLIA BERNARDI VIDEIRA

Avaliação do comportamento do PPAR beta/delta em
processos de regeneração de pele e sua modulação por
ligantes

CAMPINAS
2018

NATÁLIA BERNARDI VIDEIRA

Avaliação do comportamento do PPAR beta/delta em processos de regeneração de pele e sua modulação por ligantes

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA NATÁLIA BERNARDI VIDEIRA E ORIENTADA PELA DRA. ANA CAROLINA M. FIGUEIRA, APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA.

Orientadora: Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/22648-2; FAPESP, 2016/16476-2; CNPq, 403433/2016-9
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4184-8046>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

V668a Videira, Natália Bernardi, 1992-
Avaliação do comportamento do PPAR beta/delta em processos de regeneração de pele e sua modulação por ligantes / Natália Bernardi Videira. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

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

1. PPAR beta. 2. Ligantes. 3. PPAR delta - Agonistas. I. Figueira, Ana Carolina Migliorini. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of Peroxisome Proliferator-activated receptor beta/delta behavior in skin regeneration processes and its modulation by ligands

Palavras-chave em inglês:

PPAR beta

Ligands

PPAR delta - Agonists

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Ana Carolina Migliorini Figueira [Orientador]

Sandra Martha Gomes Dias

Adriano Defini Andricopulo

Márcia Regina Cominetti

Carolina Caliári Oliveira

Data de defesa: 10-07-2018

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

Campinas, 10 de julho de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira

Dra. Sandra Martha Gomes Dias

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Prof. Dra. Márcia Regina Cominetti

Dra. Carolina Caliári Oliveira

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

A tese de doutorado aqui apresentada recebeu apoio de agência de fomento à pesquisa científica e tecnológica, conforme descrito abaixo:

Agência: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Linha de Fomento: Doutorado Direto

Número do Processo: 2013/22648-2

Beneficiária: Natália Bernardi Videira

Agência: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Linha de Fomento: Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior - Doutorado Direto

Número do Processo: 2016/16476-2

Beneficiária: Natália Bernardi Videira

Agência: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Linha de Fomento: Chamada Universal 2016- Faixa A

Número do projeto: 403433/2016-9

Beneficiária: Ana Carolina Migliorini Figueira

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ana Carolina Figueira, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, por todos seus ensinamentos, por confiar a mim esse projeto tão querido a ela (e, agora, a mim) e por sempre acreditar que eu era capaz de realizá-lo.

Ao pessoal do LNBio que me ajudou no decorrer deste trabalho. Ao Dr. Márcio Chain por me introduzir aos experimentos de qPCR. Aos Dr. Paulo Oliveira, Dr. José (Zé) Geraldo de Carvalho Pereira e João Victor da Silva Guerra do Laboratório de Biologia Computacional por me ajudarem com o *virtual screening* e por me cederem um lugar no LBC. Ao Dr. Artur Torres Cordeiro pela ajuda inicial para desenvolver o ensaio de transativação semi-automatizado e por ceder a biblioteca TimTec NDL-3,000. Em especial, à Dra. Fernanda Batista pela realização de experimentos essenciais para o fechamento do artigo enquanto eu estava no intercâmbio.

A todos os colegas do LNBio que extra-oficialmente fizeram parte do meu doutorado, seja emprestando reagentes, dividindo protocolos e tirando dúvidas, ou sendo companhia para almoços, lanchinhos da tarde ou barzinhos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro e bolsas concedidas. Ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao CNPEM e LNBio por toda a infraestrutura disponibilizada para realização deste trabalho. Em especial as *facilities* LEC, LPP, sequenciamento, LQPN, LDEE.

Aos colegas que fiz durante um ano de intercâmbio no CIG. Em especial às meninas do grupo por toda a ajuda e à Dra. Liliane Michalik por me receber em seu grupo.

Aos meus revisores extra-oficiais que leram um pedacinho desta tese em busca de pequenos erros que meus olhos não eram mais capazes de encontrar.

Às minhas amigas Renata, Amanda, Giovana, Míriam e Juliana, pela amizade desde a graduação, e pelas “sessões de terapia” nas quais dividimos desabafos sobre os desafios da pós-graduação.

A todos os colegas (e amigos) que fizeram parte do grupo LEC durante os 5 anos deste projeto: Tábata, Michelle, Nathalia, Jéssica, Aline, Juliana, Thaís, Helder, e às alunas novas que participaram do finalzinho: Thayna, Maiara, Izabella e Marieli. Obrigada por me ajudarem com experimentos e a esclarecer minhas dúvidas. Obrigada por tornarem o dia-a-dia mais leve com sua amizade, companheirismo e risadas.

A toda a minha família, por sempre acreditar no que eu era capaz de alcançar, mesmo sem entender totalmente o meu trabalho. Em especial aos meus pais, pelo apoio e amor incondicionais.

“Todo caminho da gente é resvaloso. Mas; também, cair não prejudica demais – a gente levanta, a gente sobe, a gente volta! (...) O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda no meio da tristeza!”

Guimarães Rosa – Grande Sertão: Veredas

RESUMO

Os Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos (PPAR) são fatores de transcrição modulados por ligantes e pertencentes à superfamília dos receptores nucleares. O isotipo PPAR β/δ está envolvido em processos metabólicos como metabolismo energético, adipogênese e metabolismo de lipídios, sendo um alvo interessante para o desenvolvimento de fármacos para doenças metabólicas. Além disso, esse receptor é o isotipo mais expresso em pele e está envolvido em diversos processos nesse órgão, como manutenção da barreira epidermal, síntese de lipídios, diferenciação epidermal e cicatrização, o que o torna um alvo para o desenvolvimento de fármacos ou dermocosméticos que possam atuar em processos de regeneração de pele. O objetivo geral deste trabalho foi prospectar compostos que possam atuar como ligantes ativadores do PPAR β/δ e investigar os efeitos da modulação deste receptor por ligantes em células epiteliais. Foi desenvolvido um protocolo de triagem de agonistas para este receptor, composto por um ensaio de transativação celular seguido por dois ensaios de caracterização biofísica da interação ligante:proteína - ensaio de termoestabilidade e ensaio de supressão da fluorescência da sonda 8-anilino-1-naftalenosulfônico. O protocolo desenvolvido apresenta melhorias em relação aos ensaios de transativação celular comumente utilizados para triagem de ligantes de PPARs: (i) semi-automatização; (ii) análise da citotoxicidade aparente; (iii) uso de metodologias biofísicas para confirmação da interação direta entre ligante:proteína; (iv) e aferição da afinidade entre os *hits* e o receptor por meio do cálculo da constante de dissociação. Após padronização, este racional foi utilizado para triar 121 compostos isolados enviados por colaboradores, 560 extratos de plantas brasileiras da biblioteca Phytobios, 719 compostos da biblioteca *drug-like* NIH-NCC e 80 derivados semi-sintéticos de produtos naturais da biblioteca TimTec NDL-3,000 pré-selecionados por *virtual screening*. Ao final do *pipeline* de busca de agonistas, o Extrato 2 da biblioteca Phytobios e sua fração Extrato 2-18 foram selecionados como *hits* de PPAR β/δ , pois apresentaram componentes que ativam e estabilizam a estrutura terciária do receptor, com constantes de dissociação de $0,011 \pm 0,007$ mg/mL e $0,016 \pm 0,007$ mg/mL, respectivamente. Além do protocolo de triagem, foram padronizados métodos de migração, proliferação e diferenciação de queratinócitos humanos (HaCaT) para caracterização da modulação do PPAR β/δ por ligantes em processos de regeneração de pele. Nestes ensaios, os agonistas comerciais GW0742, GW501516 e L-165,041 aumentaram a taxa de migração 2D de queratinócitos humanos (HaCaT), e os agonistas GW501516 e L-165,041 diminuíram a proliferação deste tipo celular. Em relação à diferenciação de HaCaT, os agonistas GW0742 e L-165,041 não alteraram a expressão gênica dos marcadores de diferenciação celular queratina 14, queratina 1 e involucrina. Avaliando os níveis de expressão de mRNA de componentes da matriz extracelular da pele (colágeno, fibronectina e collagenases), não foram observadas alterações no padrão de expressão desses alvos após a ativação do PPAR β/δ em células HaCaT, ou após a supressão da expressão do receptor em camundongos *knockouts* com estímulo de reparo de feridas cutâneas. Em resumo, neste trabalho foi desenvolvido um *pipeline* de seleção de agonistas para o PPAR β/δ que ativem e estabilizem a estrutura do receptor, além de possibilitar o cálculo da constante de dissociação entre as amostras testadas e a proteína. Por fim, foram acoplados ensaios a este *pipeline* para posterior caracterização dos agonistas de PPAR β/δ quanto a sua ação em processos de regeneração de pele.

Palavras-chave: triagem de ligantes; receptores nucleares; PPAR; queratinócitos; regeneração de pele

ABSTRACT

English title: Evaluation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor beta/delta (PPAR beta/delta) behavior in skin regeneration processes and its modulation by ligands

Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPAR) are transcriptional factors regulated by ligands and members of the nuclear receptor superfamily. The PPAR β/δ is involved in metabolic processes such as energetic metabolism, adipogenesis and lipid metabolisms, which made it an interesting target for the development of drugs for metabolic disorders. In addition, this isotype is the most expressed in skin and, in this organ, it is involved in processes such as epidermal barrier maintenance, lipid synthesis, epidermal differentiation and wound healing, which made it a target for the development of dermocosmetics or drugs for skin repair. Aiming to select new activators (agonists) for PPAR β/δ , for future drug development, in this work, we developed a pipeline for screening of agonists for this receptor. The pipeline is composed of a cellular transactivation assay followed by two biophysical assays (Thermal Shift Assay and 8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) fluorescence quenching assay) for characterization of the direct interaction of ligand:protein. The pipeline brings improvements if compared to traditional methods for PPAR ligand-screening: semi-automatization; parameter of apparent cytotoxicity; biophysical methodologies for confirmation of direct interaction ligand:protein; and calculation of dissociation constant between hits and the receptor. With the pipeline, we screened 121 compounds/extracts given by collaborators, 560 Brazilian plant extracts from Phytobios library, 719 drug-like compounds from NIH-NCC library, and 80 semi-synthetic natural products derivatives from TimTec NDL-3,000 library pre-selected via virtual screening. At the end of the pipeline, Extract 2 and one of its fraction (Extract 2-18) from Phytobios library showed to activate PPAR β/δ , stabilize its tertiary structure and had a dissociation constant of, respectively, 0.011 ± 0.007 mg/mL e 0.016 ± 0.007 mg/mL, being selected as PPAR β/δ agonists. Besides the screening pipeline, methods of migration, proliferation and differentiation of keratinocytes (HaCaT cells) were also developed to characterize PPAR β/δ modulation by ligands in skin regeneration processes. These methods will be incorporated to the pipeline for agonist screening to further characterize new PPAR β/δ ligands. The commercial agonists GW0742, GW501516 and L-165,041 increased the migration rate of HaCaT, and GW501516 and L-165,041 decreased proliferation in this cell type. Regarding HaCaT differentiation, gene expression of the analysed markers (keratin 14, keratin 1 and involucrin) were not changed after ligand treatment in the selected protocols. The RNA expression levels of extracellular matrix proteins (collagens, fibronectin and collagenases) were not altered after keratinocyte activation by PPAR β/δ ligand GW501516, nor in PPAR β/δ - knockout compared to wild type after wound healing stimuli. In summary, in this work we developed a pipeline to screening for PPAR β/δ agonists and further characterize them in skin regeneration processes.

Key-words: ligand screening; nuclear receptors; PPAR; keratinocytes; skin regeneration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ilustração esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares	20
Figura 2. Estrutura cristalográfica do receptor PPAR delta (PBID:2GWX), mostrando as “três camadas” de empacotamento das 12 hélices que compõe os LBDs da maioria dos receptores nucleares	22
Figura 3. Ligação do RNs nos HREs.....	24
Figura 4. Mecanismo de ação clássico dos RNs.....	24
Figura 5. Esquema dos três estados conformacionais do LBD dos RNs.....	26
Figura 6. Identidade dos PPARs.....	27
Figura 7. Atividades transcricionais dos PPAR	29
Figura 8. Esquema mostrando a heterodimerização entre PPAR e RXR.....	30
Figura 9. Estrutura típica da Epiderme. A epiderme é formada por quatro camadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato córneo. Modificado de: Draelos & Thaman, 2006.	33
Figura 10. Estruturas dos ligantes comerciais de PPAR β/δ	46
Figura 11. Princípio do ensaio de transativação do PPAR β/δ	48
Figura 12. Redução do MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) à Formazan	51
Figura 13. Estrutura do PPAR β/δ (PDB ID 2ZNQ) com destaque para os resíduos de aminoácidos Histidina, Arginina e Lisina que podem interagir com o ANS	55
Figura 14. Estrutura química da molécula de ANS	56
Figura 15. Esquema do protocolo 1 de diferenciação de células HaCaT	65
Figura 16. Esquema do protocolo 2 de diferenciação de células HaCaT	65
Figura 17. Fluxograma com todas as etapas do pipeline de triagem de agonistas para o PPAR β/δ	71
Figura 18. Otimização do protocolo de transativação para screening de ligantes.....	75
Figura 19. Ativação dose resposta do PPAR β/δ com os agonistas comerciais (GW0742, GW501516, L-165,041)	78
Figura 20. Ensaio de citotoxicidade	79
Figura 21. Expressão e purificação hPPAR δ LBD.....	80
Figura 22. Espectro de Dicroísmo Circular do hPPAR δ LBD.	81
Figura 23. Desenovelamento térmico do hPPAR δ LBD.	81
Figura 24. DLS do hPPAR δ LBD..	82
Figura 25. TSA com os agonistas comerciais do PPAR β/δ	83
Figura 26. Teste de concentração ANS e proteína para realização do ensaio de Supressão da Fluorescência de ANS	85
Figura 27. Supressão da fluorescência do ANS para ligantes comerciais.....	86
Figura 28. Ensaio de TSA quantitativo com PPAR β/δ e o ligante GW0742	86
Figura 29. Ensaio de transativação para triagem primária de compostos de colaboradores. Placas I, II e III representam três diferentes placas de triagem.	89
Figura 30. Ensaio de transativação confirmatório para compostos triados na transativação primária.....	90
Figura 31. TSA do PPAR β/δ com o hit AN11 e o agonista GW0742.	91
Figura 32. Triagem primária de extratos da biblioteca Phytobios.....	93
Figura 33. Ensaio confirmatório de transativação realizado em triplicata com os candidatos a hits	94
Figura 34. TSA do PPAR β/δ com os extratos da Phytobios e ligantes de PPAR β/δ	95
Figura 35. Curvas de dissociação entre PPAR β/δ e o Extrato 2.....	96

Figura 36. Ensaio de transativação primário e confirmatório para as frações do Extrato 2.....	97
Figura 37. Caracterização biofísica da interação da fração Extrato 2-18 com PPAR β/δ	98
Figura 38. Ativação dos isotipos de PPAR pelos extratos Extrato 2 e Extrato 2-18.....	99
Figura 39. Fator Z' das dez placas de triagem da biblioteca NIH-NCC..	100
Figura 40. Ensaio de transativação primário da biblioteca NIH-NCC.....	101
Figura 41. Ensaio de transativação primário da biblioteca NIH-NCC (parte II).....	102
Figura 42. Triagem secundária dos candidatos a hits da biblioteca NIH- NCC.....	103
Figura 43. Ensaio de TSA do PPAR β/δ com Meloxicam	103
Figura 44. Cavidades do LBD de diferentes cadeias de PPAR β/δ determinadas pelo software KVFinder.	105
Figura 45. Histograma dos scores obtidos para cada uma das 3043 moléculas no docking com o PPAR β/δ	106
Figura 46. Boxplot das moléculas com score mediano maior que 7,00 para o docking em PPAR β/δ	107
Figura 47. Estruturas das moléculas de elevado score no LBD da cadeia de PPAR β/δ	108
Figura 48. Poses de moléculas de elevado <i>score</i> no LBD da cadeia de PPAR β/δ com a qual obtiveram a melhor pontuação.	109
Figura 49. Ensaio de transativação do PPAR β/δ com as moléculas da biblioteca TimTec triadas pelo virtual screening.	110
Figura 50. Ensaio de Transativação Confirmatório para os candidatos a <i>hits</i> da biblioteca TimTec.	111
Figura 51. Experimento de incorporação de EdU para medida de proliferação de células HaCaT.....	116
Figura 52. Análise da migração 2D das células HaCaT em scratch assay após tratamento de ligantes de PPAR β/δ	119
Figura 53. Taxa de fechamento da ferida (risca) em cultura 2D de células HaCaT tratadas com veículo (DMSO), 0,5 μ M dos agonistas GW0742, GW501516 e L-165,041, ou 5 μ M do antagonista GSK0660 como indicado.	119
Figura 54. Efeito dos ligantes de PPAR β/δ na diferenciação de células HaCaT cultivadas após confluência.....	122
Figura 55. Efeito dos ligantes de PPAR β/δ na diferenciação de células HaCaT cultivadas antes da confluência.....	123
Figura 56. Análise da expressão de RNA de componentes da MEC durante cicatrização cutânea de camundongos selvagens (WT) e PPAR β/δ - <i>knockout</i> (KO).....	126
Figura 57. Análise da expressão de PPAR β/δ durante cicatrização cutânea de camundongos selvagens (WT) e PPAR β/δ - <i>knockout</i> (KO)..	127
Figura 58. Análise da expressão de RNA das proteínas da MEC após 48h da ativação do PPAR β/δ por 0,5 μ M de GW501615.....	129
Figura 59. Análise da expressão gênica de dados de um microarray disponível publicamente (GSE35322) no Omnibus Gene Expression (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)	131
Figura 60. Intensidade do sinal de TSA variando-se as concentrações de sonda e proteína.	151
Figura 61. Curvas de supressão da fluorescência do ANS em PPAR β/δ após titulação de GW0742..	152
Figura 62. Teste de concentração de sonda ANS e de proteína	154
Figura 63. Supressão da Fluorescência do ANS com os ligantes de hPPAR δ	155
Figura 64. Triagem primária de extratos da biblioteca Phytobios.....	161
Figura 65. Avaliação da ativação do PPAR β/δ por seus ligantes para o ensaio de proliferação de HaCaT.....	163
Figura 66. Avaliação da ativação do PPAR β/δ por seus ligantes para o ensaio de migração de HaCaT.....	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas do PPAR β/δ humano depositadas no PDB e selecionados para o ensaio de <i>virtual screening</i>	62
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados com mRNA humano.....	69
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados com RNA murino	70
Tabela 4. Tabela de dados do DLS do hPPAR δ LBD	82
Tabela 5. Lista de moléculas selecionadas no <i>virtual screening</i>	108
Tabela 6. Mapa da placa I de compostos dos colaboradores Dr. Reinaldo Pilli, Dr. Alessandro Nascimento e Dra. Daniela Trivella.....	156
Tabela 7. Mapa da placa II de triagem, compostos do colaborador Prof. Dr. Hélio Stefani.	157
Tabela 8. Mapa da placa III de triagem, compostos do colaborador Prof. Dr. Júlio Pastre.	157
Tabela 9. Avaliação da Citotoxicidade das diferentes concentrações estoque da biblioteca Phytobios.....	158
Tabela 10. Candidatos a hits selecionados na triagem primária da biblioteca NIH-NCC	162

LISTA DE ABREVIACÕES

AF-1: Função ativadora 1

AF-2: Função ativadora 2

ANS: sonda 8-anilino-1-naftalenosulfônico

Apo-PPAR: PPAR sem ligante

AR: Receptor de andrógeno

CD: Dicroísmo Circular

DBD: Domínio de Ligação ao DNA

DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz

DMEM: do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Sulfóxido de Dimetilo

DNA: ácido desoxirribonucleico

DR-1: do inglês, *Direct Repeat 1*

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine, análogo de timidina

ER: Receptor de Estrógeno

FBS: Soro Fetal Bovino

FRET: Transferência de Energia por Ressonância de Förster

GR: Receptor de Glicocorticoide

HAT: Histona Acetiltransferase

HDAC: Histonas Desacetilase

HRE: Elementos Responsivos a Hormônios

HTS: do inglês, *High-Throughput Screening*

KO: do inglês, *knockout*

LBD: Domínio de Ligação ao Ligante

LBP: Bolsão de Ligação do Ligante

MEC: Matriz Extracelular

MMP: Metaloproteinase de Matriz

MTT: brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NLS: Sinal de Localização Nuclear

PBS: Solução Salina de Fosfato Tampão

PLIN2: Perilina-2, em inglês *adipose differentiation-related protein*

PPAR: Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos

PPRE: Elementos Responsivos de Proliferador de Peroxissomo

PR: Receptor de Progesterona

QSAR: do inglês, *quantitative structure-activity relationship*

RAR: Receptor de Ácido Retinóide

RN: Receptores Nucleares

RNA: ácido ribonucleíco

RXR: Receptor Retinóide X

SMILES: do inglês, *Simplified Molecular Input Line Entry Specifications*

SNuRM: Moduladores Seletivos de Receptores Nucleares

TGF- β 1: Fator de Transformação do Crescimento Beta 1

TIMP: Inibidores de Metaloproteinases do Tecido

T_m: Temperatura de *melting*

TNF α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

TR: Receptor de hormônio tireoideano

TSA: Ensaio de Termoestabilidade

TZD: Tiazolinedionas

UV: Ultra-violeta

VDR: Receptor de vitamina D

VS: do inglês, *virtual screening*

WT: do inglês, *wild type*

Sumário

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	19
1.1 Receptores Nucleares	19
1.2 Mecanismo de ação dos receptores nucleares	23
1.3 Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos - PPARs	27
1.4 PPAR β/δ	31
1.5 Pele	32
1.6 Envelhecimento de pele	34
1.7 PPAR β/δ e pele	36
1.8 PPAR β/δ e estrutura e função da epiderme	37
1.9 PPAR β/δ e fechamento de feridas da epiderme	39
1.10 Busca de ligantes para o PPAR β/δ	40
CAPÍTULO II: JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	43
2.1 Justificativa	43
2.2 Objetivos	44
CAPÍTULO III: MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Cultura Celular	45
3.2 Ligantes comerciais do PPAR β/δ	45
3.3 Plasmídeos	46
3.4 Ensaio de transativação em 96 poços para triagem de compostos	47
3.4.1 Padronização do ensaio de transativação	47
3.4.2 Protocolo final de transativação para triagem de compostos	48
3.4.3 Análise estatística da transativação em placas de triagem	50
3.5 Ensaio de citotoxicidade por MTT	51
3.6 Expressão heteróloga e caracterização do hPPAR δ LBD	52
3.6.1 Expressão hPPAR δ LBD	52
3.6.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	52
3.6.3 Dicroísmo Circular (CD)	53
3.7 Termoestabilidade (<i>Thermal Shift Assay</i> , TSA)	53
3.8 Supressão de Fluorescência do ANS (<i>ANS fluorescence quenching</i>)	55
3.9 Compostos de colaboradores	56
3.10 Bibliotecas	58
3.10.1 Biblioteca Phytobios	58
3.10.2 Biblioteca NIH- NCC	59

3.10.3	Biblioteca TimTec NDL-3,000.....	59
3.11	<i>Virtual Screening e Molecular Docking</i>	60
3.11.1	Programa de <i>docking</i> : Surflex	60
3.11.2	Preparo das moléculas	61
3.11.3	Preparo das proteínas.....	61
3.11.4	<i>Virtual screening</i>	62
3.11.5	Análise de cavidades	63
3.12	Proliferação celular de queratinócitos	63
3.13	Diferenciação de queratinócitos	64
3.14	Ensaio de migração celular (<i>scratch assay</i>)	66
3.15	Animais e ensaios de cicatrização	67
3.16	Análise banco de dados de expressão gênica	67
3.17	Análise da Expressão Gênica	67
3.17.1	Extração de RNA.....	68
3.17.2	Síntese de cDNA	68
3.17.3	qPCR em tempo real.....	69
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PADRONIZAÇÃO DO PIPELINE E TRIAGEM DE DE AGONISTAS PARA O PPAR BETA/DELTA		71
4.1	Padronização do <i>pipeline</i> de triagem.....	71
4.1.1	Justificativa dos métodos escolhidos para o pipeline de triagem	71
4.1.2	Padronização do ensaio de transativação.....	73
4.1.3	Sensibilidade do ensaio	77
4.1.4	Parâmetro de citotoxicidade aparente.....	78
4.1.5	Expressão, purificação e caracterização do hPPAR δ LBD	80
4.1.6	Termoestabilidade (Termal Shift assay, TSA)	82
4.1.7	Supressão de Fluorescência do ANS (ANS fluorescence quenching) ...	84
4.2	Triagem manual dos compostos em ensaio de transativação	87
4.2.1	Ensaio de transativação primário.....	88
4.2.2	Ensaio de transativação secundário	90
4.2.3	Ensaio de Thermal Shift Assay (TSA)	90
4.3	Triagem semi-automatizada da Biblioteca Phytobios	91
4.3.1	Determinação da concentração ideal	91
4.3.2	Ensaio de transativação primário.....	92
4.3.3	Ensaio de transativação secundário	93
4.3.4	Ensaio de Thermal Shift Assay	94

4.3.5	Ensaio de supressão da fluorescência do ANS	95
4.3.6	Fracionamento do extrato selecionado	96
4.3.7	Ensaio de especificidade.....	98
4.4	Triagem semi-automatizada da biblioteca NIH – NCC.....	99
4.4.1	Ensaio de transativação primário.....	100
4.4.1	Ensaio de transativação secundário e ensaios biofísicos	102
4.5	<i>Virtual screening</i> da biblioteca TimTec NDL-3,000.....	104
4.5.1	Preparo das estruturas	104
4.5.2	Primeira abordagem de virtual screening	105
4.5.3	Segunda abordagem de virtual screening	106
4.5.4	Ensaio de transativação primário e secundário	110
4.5.5	Discussão geral do virtual screening	111
4.6	Conclusão parcial	113
CAPÍTULO V: RESULTADOS E DISCUSSÃO DA CARACTERIZAÇÃO DA MODULAÇÃO DO PPAR BETA/DELTA EM CÉLULAS DE PELE		115
5.1	Proliferação de queratinócitos	115
5.2	Migração celular	117
5.3	Diferenciação de queratinócitos	120
5.4	Análise de expressão gênica de componentes da matriz extracelular	124
5.5	Análise de bancos de dados de expressão gênica	130
5.6	Conclusões parciais	132
CAPITULO VI: CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS		133
6.1	Conclusão	133
6.2	Perspectivas	134
REFERÊNCIAS		137
APÊNDICE A – Lista de peso molecular dos compostos cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes		149
APÊNDICE B – Padronização do Experimento de TSA		151
APÊNDICE C – Teste de ANS e de hPPARδ LBD na proporção 1:1		152
APÊNDICE D – Teste de concentrações de sonda e hPPARδ LBD para experimento de supressão do ANS.....		153
APÊNDICE E – Curvas de supressão do ANS para ligantes de hPPARδ LBD		155
APÊNDICE F – Mapa das placas de triagem de compostos de colaboradores.....		156
APÊNDICE G – Avaliação da Citotoxicidade das diferentes concentrações estoque da biblioteca Phytobios.....		158

APÊNDICE H – Resultados individuais das placas de triagem da biblioteca Phytobios	161
APÊNDICE I – Triagem Biblioteca NIH-NCC	162
APÊNDICE J – Ativação do PPAR β/δ durante ensaios funcionais (proliferação e migração).	163
APÊNDICE K – Artigo publicado sobre o desenvolvimento da metodologia de triagem de agonistas de PPAR β/δ	164
APÊNDICE L – Artigo publicado de um projeto de colaboração de triagem de ligantes para o PPAR γ	165
APÊNDICE M – Artigo de revisão sobre métodos de caracterização da interação entre receptores nucleares e o DNA.	166
ANEXO A – Autorização para experimentação animal.....	167
ANEXO B – Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.....	170

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1.1 Receptores Nucleares

Para o desenvolvimento e bom funcionamento de um organismo é muito importante que haja uma comunicação intra e intercelular eficiente. Essa comunicação é realizada por meios de sinais, que podem ser desde íons, aminoácidos, nucleotídeos e peptídeos, até moléculas maiores como vitaminas, esteróides, retinóides, derivados de ácidos graxos e até mesmo proteínas (LAUDET; GRONEMEYER, 2001). Esses sinais serão identificados por proteínas receptoras, desencadeando eventos de resposta, como por exemplo fosforilação de uma determinada proteína ou o início da transcrição gênica (NELSON; COX, 2008).

Neste contexto, Receptores Nucleares (RN) são sensores de sinais celulares, pois são um grupo de proteínas ativadas na presença de ligantes e que desencadeiam toda uma sinalização para a transcrição de genes alvo (LAUDET; GRONEMEYER, 2001). No ser humano foram encontrados 48 genes que codificam para RNs (LEE et al., 2001; VARGA; CZIMMERER; NAGY, 2011). Os RNs são fatores de transcrição ativados por ligantes que podem ser moléculas pequenas e hidrofóbicas, por exemplo hormônios esteroidais, vitaminas ou intermediários metabólicos. A superfamília dos RNs é dividida em seis subfamílias de acordo com análises evolucionárias (ARANDA; PASCUAL, 2001; LAUDET; GRONEMEYER, 2001): Subfamília 1, receptores tireoidianos/retinóides (Receptor de hormônio tireoideano (TR), receptor de vitamina D (VDR), receptor de ácido retinóico (RAR), e receptor ativador da proliferação de peroxissomos (PPAR)) e alguns receptores órfãos; Subfamília 2, contém os receptores reinóide X (RXR), fator de transcrição de ovoalbumina de galinha (COUP), fator nuclear 4 de hepatócito (HNF4), receptor testicular (TR2) e receptores envolvido no desenvolvimento dos olhos (TLX e PNR); Subfamília 3, receptores de esteróides (ex: Receptor de Progesterona (PR), Receptor de Estrógeno (ER), Receptor de Glicocorticoide (GR), Receptor de andrógeno (AR) e Receptor de Mineralocorticoide (MR)). As sub-famílias 4, 5 e 6 contém os receptores órfãos NGFI-B, FTZ-1/SF-1, e GCNF, respectivamente (ARANDA; PASCUAL, 2001).

De forma geral, os RNs estão envolvidos em muitas das funções fisiológicas de um organismo, regulando o desenvolvimento, inflamação, homeostase, metabolismo, divisão e diferenciação celular (LAUDET; GRONEMEYER, 2001). São considerados importantes alvos para o tratamento de doenças, pois estão intimamente relacionados com diversas patologias metabólicas e vários tipos de câncer. Atualmente, o desenvolvimento de novos ligantes para

RNs se concentra em moduladores seletivos de receptores nucleares (*selective nuclear receptors modulators*, SNuRM). O termo SNuRM é utilizado para indicar compostos que ativem apenas parte das funções dos RNs que são ativadas por ligantes naturais, ou que ativem apenas em um tecido específico (CHEN, 2008). No caso dos PPARs, a busca de moduladores seletivos de primeira geração levou ao desenvolvimento das tiazolinedionas (TZD) para o PPAR γ para o tratamento de diabetes tipo II, e, agora, a busca de SNuRM de segunda geração está focado em reduzir os efeitos colaterais das TZDs e melhorar as propriedades de sensibilização da insulina (CHEN, 2008).

Os RNs apresentam basicamente a mesma composição estrutural, formada por uma região N-terminal (A/B) pouco conservada entre os receptores, um domínio de ligação ao DNA (C ou DBD), uma região de ligação entre os domínios (D), e uma região que contém o domínio de ligação ao ligante (E/F ou LBD), de acordo com a figura 1.

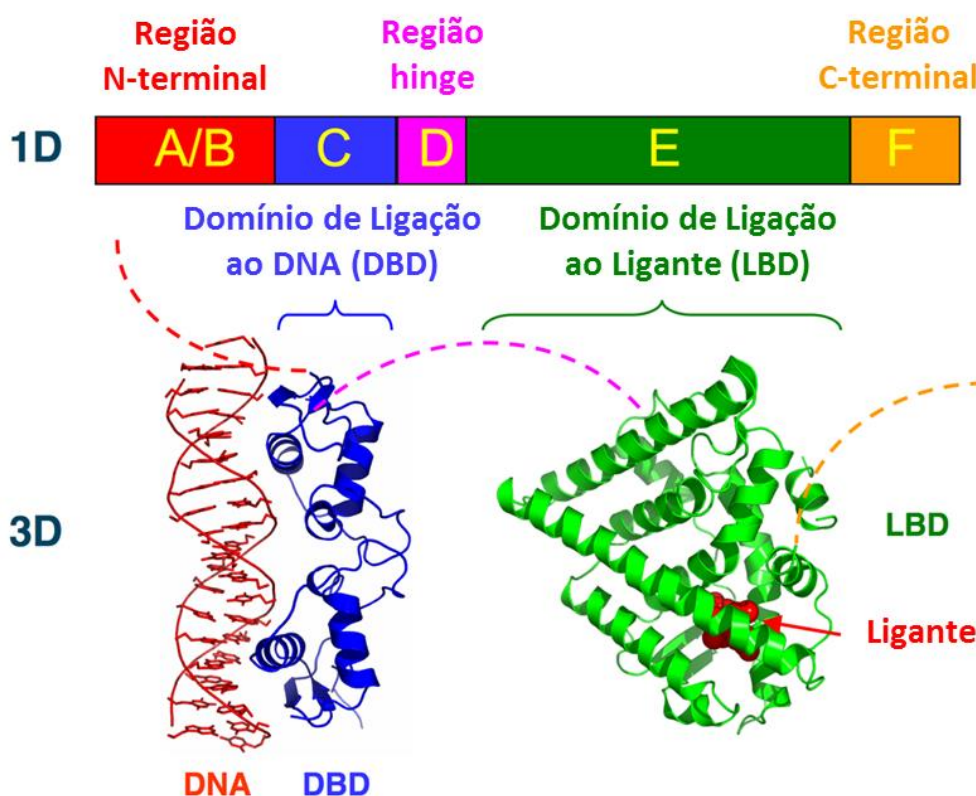


Figura 1. Ilustração esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. As regiões mais bem conservadas C e E e as regiões divergentes A/B, D e F são representadas por barras coloridas. Domínio de ligação ao DNA (C ou DBD), uma região de ligação entre os domínios (D), e uma região que contém o motivo de ligação ao ligante (E/F ou LBD). Modificada de: https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptor

A região A/B é a mais variável em tamanho e composição da sequência, por exemplo seu tamanho pode variar de 23 (Receptor da vitamina D) a 550 aminoácidos (Receptor de Glicocorticoides) (LAUDET; GRONEMEYER, 2001). A nomenclatura dupla A/B se deve

ao fato de que a divisão entre as duas regiões não é sempre evidente. Essa região apresenta, na maioria dos casos, um domínio Função Ativadora (*Activation Function-1*, AF-1) que é responsável pela ativação constitutiva do receptor, independente de ligante. Esta região apresenta atividade específica dependendo do tipo celular e do promotor, sugerindo que ela seja responsável pela especificidade de ação entre isoformas de receptores (ARANDA; PASCUAL, 2001; BAIN et al., 2007). Além disso, a região N-terminal dos RNs pode sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação, que aumenta a probabilidade de transativação da AF-1, assim como a sinergia e cooperatividade do AF-1 com o AF-2 (ARANDA; PASCUAL, 2001; BAIN et al., 2007; PAWLAK; LEFEBVRE; STAELS, 2012).

As interações DNA-proteínas são realizadas por meio de sequências altamente conservadas denominadas Domínio de Ligação ao DNA (*DNA binding domain*, DBD ou região C). Os RNs reconhecerem sequências específicas de DNA, chamadas de elementos responsivos a hormônios (*hormone response elements*, HRE) (LAUDET; GRONEMEYER, 2001). Os HREs são sequências derivadas do mesmo motivo de DNA, formado por seis pares de bases (5'-PuGGTCA, Pu sendo A ou G). Apesar de todos os RNs reconhecerem HREs, mutações, inversões e repetições deste motivo geram elementos responsivos que são específicos para cada classe de receptores (ARANDA; PASCUAL, 2001). Estruturalmente, o DBD é composto por dois motivos em dedos de zinco (*zinc-finger*); sendo que em cada um deles existem 4 resíduos de cisteína coordenados por um íon Zn^{2+} . Além disso, o DBD possui 4 sub-regiões, P-, D-, T- e A- *boxes*, as quais foram caracterizadas por definir ou contribuir diretamente em diversos fatores como: (1) especificidade aos elementos responsivos; (2) formação de uma interface de dimerização entre os DBDs; e (3) contato com o esqueleto do DNA (ARANDA; PASCUAL, 2001; LAUDET; GRONEMEYER, 2001).

A região seguinte, região D, é menos conservada que as regiões que a cercam (C e E) e funciona como uma “dobradiça” (*hinge*) que permite que os domínios de ligação ao ligante e ao DNA adotem diversas conformações. Esta região também contém um sinal de localização nuclear (NLS) ou pelo menos uma parte funcional dele (ARANDA; PASCUAL, 2001).

O domínio de ligação ao ligante (*ligand binding domain*, LBD ou região E) está envolvido em diversas funções reguladas pela ligação do ligante, como liberação do receptor do complexo de proteínas de choque térmico, translocação para o núcleo, homo ou heterodimerização, recrutamento de correguladores e ativação da transcrição de genes-alvo (ARANDA; PASCUAL, 2001). A estrutura terciária deste domínio é comum a todos os receptores, com pequenas variações, sendo basicamente formada por 12 α -hélices, arranjas em três camadas, sendo duas superficiais e uma central (Figura 2) (PAWLAK; LEFEBVRE;

STAELS, 2012). Esse domínio também possui de 2 a 4 folhas- β , que juntamente com as hélices formam uma estrutura de sanduíche que envolve uma cavidade hidrofóbica na forma de T, responsável pela interação com os ligantes (bolsão de ligação do ligante, *ligand binding pocket*, LBP) (PAWLAK; LEFEBVRE; STAELS, 2012). Neste sítio hidrofóbico, ocorre a interação entre os ligantes hidrofóbicos e os aminoácidos do LBP, levando a mudanças conformacionais no receptor, conforme será descrito adiante. Por isso, ligantes diferentes podem provocar diferentes mudanças conformacionais no receptor e, devido a isso, diferentes respostas biológicas são possíveis (PRIVALSKY, 2004). Neste domínio também está presente a função ativadora dependente de ligante, AF-2, responsável pela ativação do receptor, por favorecer o recrutamento de proteínas coativadoras, e também pela dimerização dos receptores (ARANDA; PASCUAL, 2001; PAWLAK; LEFEBVRE; STAELS, 2012).

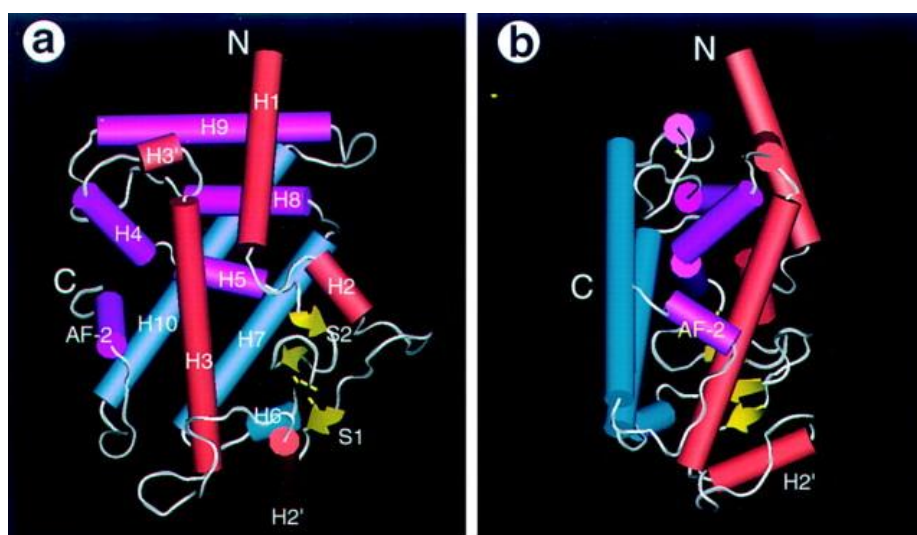


Figura 2. Estrutura cristalográfica do receptor PPAR delta (PDBID:2GWX), mostrando as “três camadas” de empacotamento das 12 hélices que compõe os LBDs da maioria dos receptores nucleares. A) e B) Duas visões do LBD que diferem em 90° uma da outra, em relação ao eixo vertical. As camadas são representadas em vermelho, roxo e azul. As folhas betas são mostradas em amarelo e os loops em branco. A partir de Xu et al. 1999.

As primeiras estruturas tridimensionais de LBDs de RNs: as estruturas do Receptor Retinóide X α (RXR α ; sem ligante), do Receptor de Ácido Retinóico γ (RAR γ ; com ligante) e do Receptor de Hormônios Tireoidianos β (TR β ; com ligante), juntamente com outras, revelaram que é no LBD que agem os agonistas e os antagonistas, ativando ou reprimindo a transcrição, respectivamente (LAUDET; GRONEMEYER, 2001). A associação do LBD com proteínas correguladoras, como correpressores e coativadores, é, respectivamente, essencial para repressão e ativação de genes pelos receptores (ARANDA; PASCUAL, 2001). O mecanismo de ação dos RNs será descrito adiante.

Por último, temos a região F, presente na posição C-terminal de apenas alguns receptores como o Receptor de Progesterona (PR), Receptor de Estrógeno (ER), e Receptor Retinóide X (RXR). Esta região é um domínio pouco conservado com tamanho variável e função desconhecida. Porém estudos mostram que a região F pode ter um papel no recrutamento de coativadores pela região E, além de determinar a especificidade do coativador com o LBD (ARANDA; PASCUAL, 2001).

1.2 Mecanismo de ação dos receptores nucleares

A transcrição de genes em eucariotos é regulada em diferentes níveis. Essa regulação pode ser realizada por diferentes tipos de RNA polimerases e diferentes fatores de iniciação, ou por fatores de transcrição, capazes de se ligar ao DNA. Os RNs são fatores de transcrição modulados por ligantes, que auxiliam na função da RNA polimerase II nos genes alvos mediante formação de complexos multiproteicos (ARANDA; PASCUAL, 2001).

Os RNs podem se ligar a seus HREs na forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros (Figura 3). Homodímeros ocorrem quando é formado um complexo de dois RNs iguais, como no caso dos ERs e TRs. Já os heterodímeros são formados entre dois RNs diferentes, sendo que o Receptor Retinóide X (RXR) é o parceiro mais comum, por exemplo TR-RXR, VDR-RXR e PPAR-RXR (ARANDA; PASCUAL, 2001; LAUDET; GRONEMEYER, 2001). Os elementos responsivos que são reconhecidos por dímeros são constituídos por dois motivos de reconhecimento arranjados de tal forma a permitir o perfeito contato DNA-proteína. As diferentes formas nas quais o receptor pode se ligar a seu elemento responsivo estão relacionadas às diferenças nos domínios de ligação ao DNA e na interface de dimerização. A dimerização é um mecanismo que aumenta a afinidade, a especificidade e a diversidade da ligação do receptor ao DNA (LAUDET; GRONEMEYER, 2001). Já foram descritas duas interfaces de dimerização distintas em receptores nucleares, uma no DBD e outra no LBD, dependendo do tipo de receptor nuclear (PAWLAK; LEFEBVRE; STAELS, 2012). A interface de dimerização do DBD está relacionada com a seleção por elementos responsivos, enquanto que a dimerização favorecida pelo LBD é responsável por estabilizar os dímeros (LAUDET; GRONEMEYER, 2001).

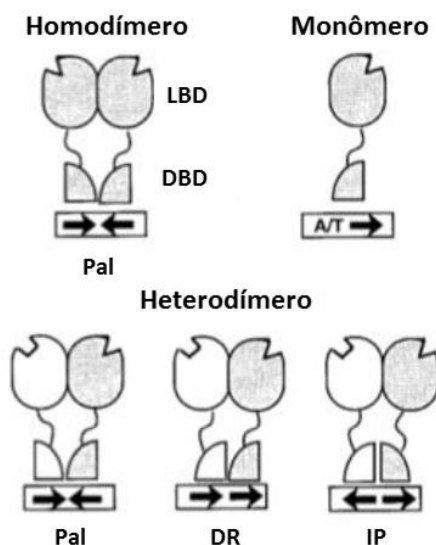


Figura 3. Ligação do RNs nos HREs. As diversas orientações dos motivos hexaméricos: Pal (palíndromo) - para ligação de homodímeros; A/T (sequência rica em A/T+) - motivo hexamérico para a ligação de monômeros; e heterodímeros são formados tanto em Pal, quanto em DR (Repetição Direta) ou IP (palíndromo invertido). Modificado de Aranda & Pascual, 2001.

Os receptores, em sua forma apo (sem ligante), costumam ser encontrados no núcleo, mas para alguns casos também podem ser encontrados no citoplasma (subfamília dos receptores de esteróides) (ARANDA; PASCUAL, 2001). Se ligados ao DNA, os RNs atuam reprimindo a transcrição dos genes-alvo (Figura 4), associados a proteínas correpressoras. Proteínas correpressoras são cofatores que se ligam a receptores apo ou complexados com ligantes antagonistas (ligantes inibidores), sendo assim responsáveis pela inibição da transcrição (PRIVALSKY, 2004). Neste caso, 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 (ARANDA; PASCUAL, 2001; BRAGT; POPEIJUS, 2008).

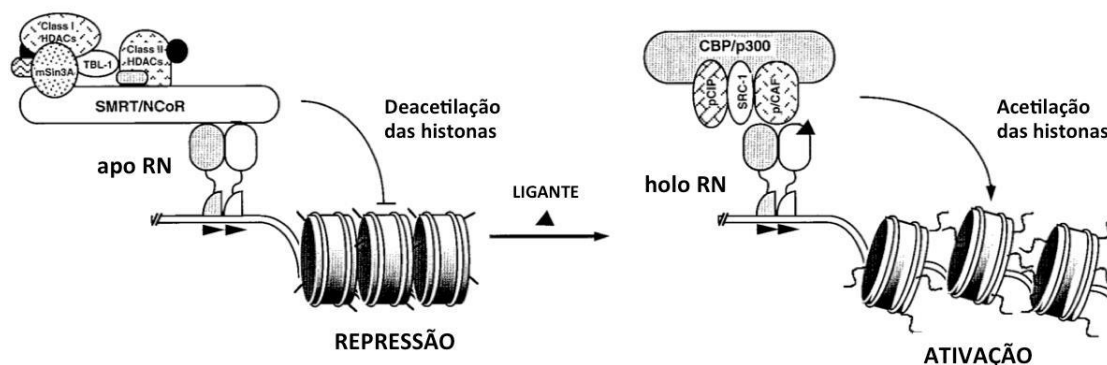


Figura 4. Mecanismo de ação clássico dos RNs. Quando na forma apo (sem ligante), os RNs podem ser encontrados no citoplasma ou no núcleo ligados a correpressores e deacetilases de histonas. Esse estado reprime a transcrição do gene. Uma vez que o ligante ativador chega e se liga ao RN (forma holo), muda sua conformação de forma a recrutar coativadores, acetilases de histona e toda a maquinaria da transcrição, ativando a expressão do gene. Modificado de Aranda & Pascual, 2001.

Alguns exemplos de correpressores que interagem com PPARs são: N-CoR (correpressores de receptores nucleares) e SMRT (mediador silenciador para receptores de retinóides e de hormônios tireoidianos), que contém sequências hidrofóbicas conservadas (convencionalmente CoRNR boxes - motivo LXXXIXXXI/L, onde L é o aminoácido leucina, I é isoleucina e X é um aminoácido qualquer) por onde se ligam aos RNs (BRAGT; POPEIJUS, 2008; PRIVALSKY, 2004). Essas sequências podem aparecer repetidas 3 vezes no N-CoR e 2 vezes no SMRT. Esses correpressores ligam-se à região hidrofóbica formada pelas hélices 3, 5 e 6 dos receptores (PRIVALSKY, 2004).

Para ativação dos RNs é preciso a ligação dos seus respectivos ligantes ativadores. Alguns ligantes hidrofóbicos de RNs, como os ligantes esteroides, se difundem livremente pela membrana plasmática até atingirem seus receptores no citoplasma. Outros, como por exemplo o hormônio triiodotironina (T3), necessitam de transportadores (LAUDET; GRONEMEYER, 2001). Como descrito anteriormente, o ligante, ao encontrar o seu receptor, se adapta ao bolsão de ligação ao ligante (LBP) e provoca uma mudança conformacional na proteína (BAIN et al., 2007). Essa mudança conformacional, em um mecanismo chamado de ‘ratoeira’ (*mouse trap*), é possível de ser observada em estruturas cristalográficas do LBD dos receptores nas formas apo e holo (sem e com ligantes) (Figura 5) (ARANDA; PASCUAL, 2001; BOURGUET; GERMAIN; GRONEMEYER, 2000). Na presença do ligante, a hélice 11 é empurrada por ele e reposicionada em continuidade com a H10, então, o balanço da hélice H12 libera o ômega-loop, que gira abaixo da H6, trazendo consigo a região N-terminal da H3; na posição final, a H12 sela a “tampa” do LBP, criando um ambiente hidrofóbico para estabilizar a ligação, podendo até fazer contatos adicionais com o próprio ligante (Figura 5) (LAUDET; GRONEMEYER, 2001).

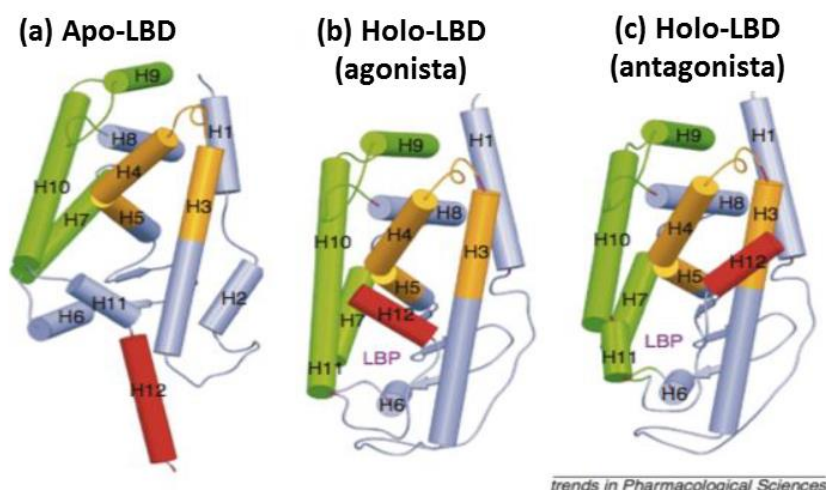


Figura 5. Esquema dos três estados conformacionais do LBD dos RNs. (a) Forma apo (sem ligante) do RXR LBD. (b) Forma holo - ligante agonista - do LBD do RAR. (c) Forma holo – ligante antagonista – do LBD do RAR. A superfície de dimerização está mostrada em verde, os sítios de ligação a correpressores e coativadores está em laranja, e a hélice H12 que contém a AF-2 está em vermelho. LBP – Bolsão de ligação ao ligante. Modificado de Bourguet, Germain & Gronemeyer, 2000.

As mudanças conformacionais observadas na presença de um agonista (ligante ativador) resultam na dissociação do complexo correpressor e no recrutamento de coativadores. Alguns coativadores são responsáveis pela modificação da estrutura de histonas e da cromatina, gerando uma estrutura de DNA aberta para a transcrição, enquanto outros são responsáveis pela ligação à maquinaria transcricional, como por exemplo a TBP (*TATA box-binding protein*) e o fator de transcrição IIB (TFIIB) (Figura 4) (ARANDA; PASCUAL, 2001). A superfície hidrofóbica formada pelas hélices H12, H3 e H4 e H5 (também chamada de AF-2) constitui o sítio de ancoragem das proteínas coativadoras (KROKER; BRUNING, 2015). Coativadores que interagem diretamente com receptores nucleares contém uma ou mais regiões conservadas LXXLL (L=Leucina, X=qualquer aminoácido) (BAIN et al., 2007; PAWLAK; LEFEBVRE; STAELS, 2012). A família p160 (GRIP-1, TRBP-1 e SRC-1) contém exemplos de coativadores que se ligam aos RNs por intermédio deste motivo LXXLL. Os coativadores também formam complexos com outras proteínas como as histonas acetil-transferases (HAT), que por meio do relaxamento e modificação da cromatina próxima à região promotora, recrutam outras moléculas para o local, as quais, estabilizam a ligação da RNA polimerase II (LAUDET; GRONEMEYER, 2001; PRIVALSKY, 2004). Os PPARs, por exemplo, interagem com as proteínas coativadoras CBP, TRAP220 (proteínas associadas a TRs), proteínas da família SRC (coativador de receptor de esteroide), RAP205 ou PGC1- α (coativador-1 de PPAR γ) (ARANDA; PASCUAL, 2001; BERGER; MOLLER, 2002).

1.3 Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos - PPARs

Os Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*, PPAR) são fatores de transcrição modulados por ligantes e pertencentes à superfamília dos RNs (LAUDET; GRONEMEYER, 2001). Os PPARs estão envolvidos em diversos processos metabólicos, como metabolismo de lipídios, adipogênese, metabolismo energético e inflamação (MICHALIK; WAHLI, 1999; VARGA; CZIMMERER; NAGY, 2011; WAHLI; MICHALIK, 2012). A subfamília dos PPARs é composta por três representantes codificados em diferentes genes: PPAR α , β/δ e γ (Figura 6)(WILLSON et al., 2000). Os três PPARs inicialmente foram clonados de uma biblioteca de cDNA de rãs *Xenopus* sp. em 1992, sendo posteriormente clonados de outros organismos como sapo, rato, coelho e humanos (BERGER; MOLLER, 2002). Historicamente esses receptores receberam esta nomenclatura devido ao primeiro isotipo descrito, o PPAR α , se mostrar responsivo a substâncias proliferadoras de peroxissomos em roedores. Entretanto, esta nomenclatura não é adequada para PPAR humano, pois nenhum dos isotipos é responsável pela proliferação de peroxissomos neste organismo (BERGER; MOLLER, 2002; LAUDET; GRONEMEYER, 2001).

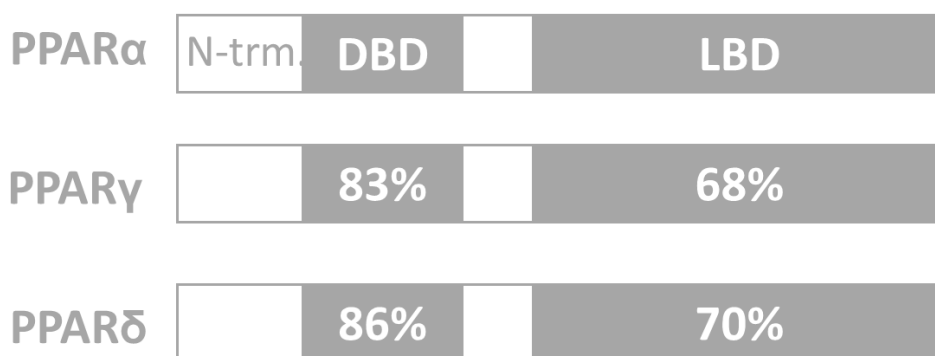


Figura 6. Identidade dos PPARs. Adaptado de Willson et al. 2000.

Os PPARs apresentam expressão tecido-específica dependente do isotipo. O PPAR α (NR1C1), mapeado no cromossomo 22 humano, é expresso em altos níveis nos órgãos que apresentam significativo metabolismo de ácidos graxos como o fígado, rins, coração, músculo esquelético, e tecido adiposo marrom. Estudos mostraram que o PPAR α tem papel crítico no metabolismo de ácidos graxos e no metabolismo energético (BERGER; MOLLER,

2002). O PPAR α também possui alguns papéis não metabólicos no coração (GILDE; FRUCHART; STAELS, 2006; LOCKYER et al., 2010).

O isotipo γ em humanos é encontrado no cromossomo 33. Duas isoformas do PPAR γ (NR1C3), com diferenças apenas no N- terminal, já foram identificadas, sendo ambas derivadas do mesmo gene por meio de *splicing* alternativo e uso de promotores alternativos (BERGER; MOLLER, 2002). As duas isoformas do receptor PPAR γ são encontradas no tecido adiposo marrom e branco, promovendo a diferenciação dos adipócitos e o estoque de lipídios. Além disto, o PPAR γ 1 é expresso em outros tecidos como intestino, células vasculares, células do sistema imune, além de células inflamatórias. O PPAR γ , além de atuar na diferenciação de adipócitos, também atua sobre o metabolismo de lipídios, controle do metabolismo energético, inflamação e sobre o mecanismo de sensibilização de insulina, o que o torna um alvo muito importante para o desenvolvimento de tratamentos para diabetes tipo II (BERGER; MOLLER, 2002; RIBEIRO FILHO et al., 2018).

O PPAR β/δ (NR1C2) foi primeiramente denominado PPAR β quando isolado da biblioteca de *Xenopus*, como será descrito adiante no texto. Em humanos, este isotipo é encontrado no cromossomo 6 (BERGER; MOLLER, 2002). O PPAR β/δ é expresso na maioria dos tecidos humanos, sendo que sua expressão em alguns tecidos é dependente da proliferação e da diferenciação celular (BERGER; MOLLER, 2002).

Estruturalmente, os PPARs possuem algumas especificidades em relação aos demais RNs. Sua cavidade de interação com ligantes (LBP), localizada entre as hélices H7, H10 e H3, é um dos maiores LBPs da superfamília de RNs, com um volume aproximado de 1300 Å³ (BATISTA et al., 2012; CLEVES; JAIN, 2015a; WAHLI, 2002). O volume do LBP do PPAR β/δ e γ é praticamente duas vezes maior que o dos outros receptores, sendo que apenas 40% e 30% do seu volume é ocupado por ligantes como ácido eicosapentaenoico e rosiglitazona, respectivamente (MICHALIK; WAHLI, 1999). No caso do TR, o LBP possui aproximadamente 600 Å³, e seu ligante triiodotironina ocupa 90% de todo o volume (MICHALIK; WAHLI, 1999; WAHLI, 2002). O fato dos ligantes de PPAR identificados até o momento ocuparem apenas parte do LBP levanta a possibilidade de que outros ligantes, talvez mais volumosos, ainda possam ser identificados (MICHALIK; WAHLI, 1999).

O LBP dos PPARs é composto principalmente por resíduos hidrofóbicos, exceto pelo fundo da cavidade, uma região próxima às folhas- β , que possui resíduos polares, como serinas, que podem fazer contato direto com ligantes. A porção C-terminal do LBD também merece destaque por conter a função de ativação AF-2, que é formada pela estabilização da H12 contra as hélices H3, H4 e H5 do LBD, após ligação do ligante, sendo assim essencial para

a ativação do receptor por favorecer o recrutamento de proteínas coativadoras (KROKER; BRUNING, 2015; LAUDET; GRONEMEYER, 2001; WURTZ et al., 1996), conforme foi descrito anteriormente.

Os PPARs podem regular a transcrição por intermédio de mecanismos que podem envolver, ou não, a ativação a partir da interação com ligantes. Na presença de ligantes, o heterodímero formado com o RXR se liga a regiões de DNA (HRE) chamadas elementos responsivos de proliferador de peroxissomo (PPRE), ativando a transcrição de genes *downstream* do PPRE (Figura 7A). Os PPREs são formados por repetições diretas de dois meio-sítios AGGTCA, com espaçamento de um nucleotídeo entre os meio-sítios (*Direct Repeat-1*, DR-1). Esse mecanismo é chamado de transativação dependente de ligante e está relacionado ao recrutamento de complexos de coativadores que modificam a estrutura da cromatina e facilitam a associação da maquinaria transcritcional ao promotor dos genes alvos (LAUDET; GRONEMEYER, 2001; RICOTE; GLASS, 2007).

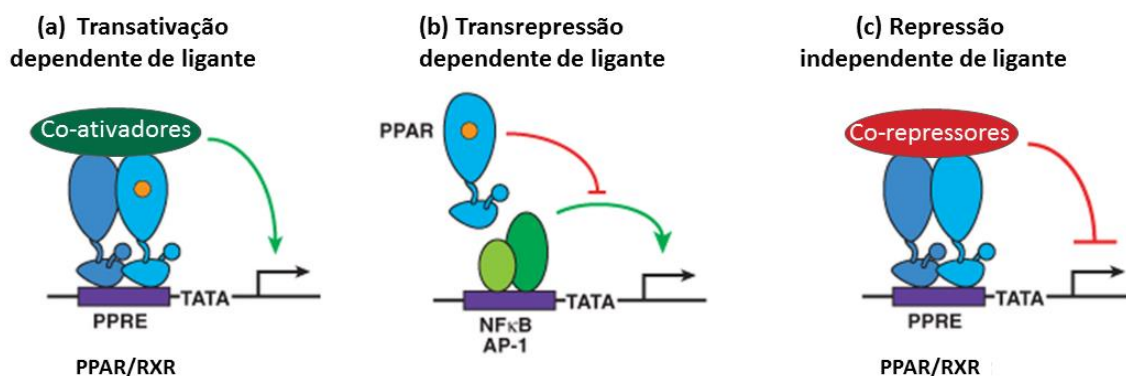


Figura 7. Atividades transcricionais dos PPAR. Os PPARs podem tanto ativar quanto reprimir a expressão de alguns genes. a) Transativação dependente de ligante. Os PPARs ativam a expressão gênica de modo dependente de ligante se ligando a elementos responsivos de PPAR (PPRE) na presença de ligante. Isto acarreta o recrutamento de complexos coativadores que modificam a estrutura da cromatina e facilitam a montagem da maquinaria de transcrição na região promotora. b) Transrepressão dependente de ligante. Os PPAR podem reprimir a transcrição na presença de ligante antagonizando outros fatores de transcrição, como o fator nuclear-κB (NF-κB) e a proteína ativadora-1 (AP-1). c) Repressão independente de ligante. O PPAR pode reprimir a expressão de alguns genes na ausência de ligante se ligando a elementos responsivos e recrutando complexos correpressores. Estes complexos antagonizam a ação com coativadores e mantém a expressão gênica reprimida. Modificado de: Ricote & Glass, 2007.

Além de promover a transcrição, os PPARs também podem reprimí-la de forma ligante-dependente. Neste caso um ligante se liga ao PPAR impedindo-o de se ligar ao PPRE (Figura 7B). A repressão de genes alvos pode ainda ser realizada na ausência de ligantes, sendo denominada repressão independente de ligante, e ocorre quando o PPAR se liga ao PPRE

mesmo na ausência de ligantes, e recruta complexos correpressores que antagonizam as atividades dos complexos coativadores (Figura 7C) (RICOTE; GLASS, 2007).

Os PPARs atuam como heterodímeros com o RXR (Figura 8), sendo que os PPARs são incapazes de se ligar como monômeros aos PPRE do tipo DR-1 (ARANDA; PASCUAL, 2001; LAUDET; GRONEMEYER, 2001). O RXR se liga ao meio-sítio 3' do elemento responsivo, enquanto que o PPAR se liga ao 5', sendo que a região 5' flanqueadora do PPRE contribui para a seletividade de ligação de cada isotipo pertencente à subfamília dos PPAR (LAUDET; GRONEMEYER, 2001).

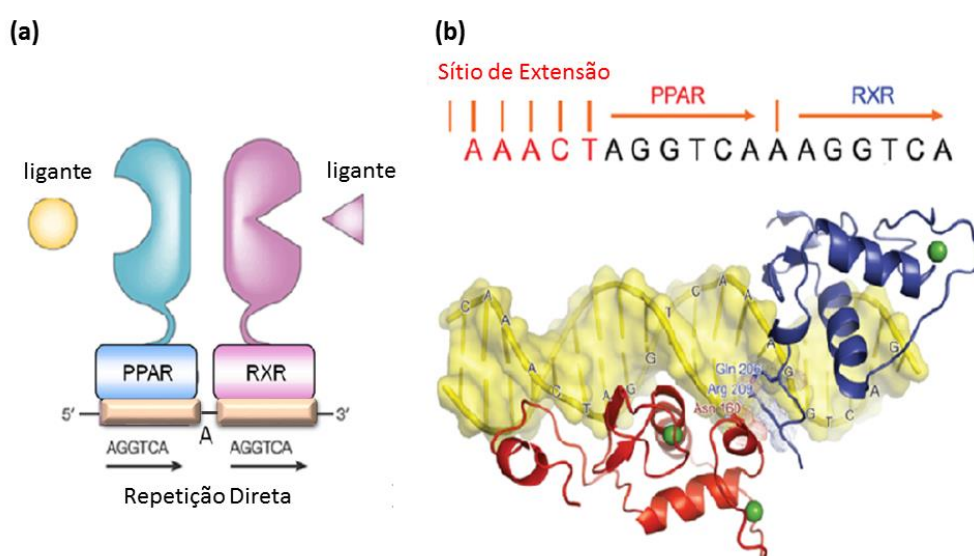


Figura 8. Esquema mostrando a heterodimerização entre PPAR e RXR. A) Heterodímero formado entre os receptores PPAR (azul) e RXR (roxo claro) mostrando o posicionamento de ambos sobre a Repetição direta DR-1 (AGGTCA a AGGTCA). B) na parte superior da figura encontra-se a sequência do elemento responsivo, contendo a DR-1, junto com a sequência flanqueadora 5', importante para a especificidade de ligação do heterodímero PPAR-RXR. Abaixo, posicionamento dos DBDs do PPARy (vermelho) e do RXRa (azul) quando ligados ao elemento responsivo. Modificado a partir de BATISTA et al., 2012.

Os PPARs são considerados sensores de lipídios capazes de transformar alterações nos padrões de lipídios/ácidos graxos dos organismos em atividade metabólica, levando ao catabolismo de ácidos graxos ou ao estoque de lipídios. A diversidade de funções desempenhadas pelos PPARs está relacionada à sua capacidade em acomodar diferentes tipos de ligantes em seu sítio de ligação (WAHLI, 2002). Os três isotipos são capazes de ligar a uma ampla gama de ligantes naturais e sintéticos. Dentre os ligantes naturais destacam-se ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos (BERGER; MOLLER, 2002; LAUDET; GRONEMEYER, 2001). Em relação aos ligantes naturais, os PPARs são ativados por ligantes de baixa afinidade, deste modo estes receptores agem como sensores de uma mistura de ligantes

e são ativados quando estes estão presentes em alta quantidade (SCHWABE; TEICHMANN, 2004).

Devido ao potencial terapêutico da regulação dos PPAR no tratamento de desordens metabólicas, diferentes classes de ligantes sintéticos foram descritas. Para o PPAR α existem fibratos para o tratamento de hipercolesterolemia. Para o PPAR γ existem as glitazonas e as sulfoniluréias, ambos fármacos hipoglicemiantes utilizados para o tratamento de diabetes tipo 2 (BERGER; MOLLER, 2002; MICHALIK; WAHLI, 1999). Diferentes compostos sintéticos, como o GW0742 e o GW501516, já se mostraram capazes de ativar o isotipo β/δ , porém, até o presente momento, não há medicamentos aprovados para uso clínico cujo alvo seja este receptor (BATISTA et al., 2012; NEELS; GRIMALDI, 2014; TAN et al., 2016). Apesar disto, agonistas do PPAR β/δ possuem potencial para o tratamento de dislipidemia, obesidade e/ou resistência à insulina, além de doenças de pele (BATISTA et al., 2012; LUQUET et al., 2004; MICHALIK et al., 2006; WILLSON et al., 2000). Este isotipo foi escolhido como alvo deste projeto para busca de novos agonistas.

1.4 PPAR β/δ

O PPAR β (NR1C2) foi primeiramente isolado em células do ovário de *Xenopus* sp. e, como suas relações com o ortólogo encontrado em mamíferos não era clara, o receptor em mamíferos recebeu outros nomes como PPAR δ , NUC1 e FAAR (receptor ativado por ácidos graxos). Apesar da divergência da nomenclatura, após as análises das sequências primárias desses receptores, concluiu-se que realmente este PPAR pertencia à superfamília dos RNs, sendo que passou a ser denominado PPAR β/δ (NR1C2) (LAUDET; GRONEMEYER, 2001; NEELS; GRIMALDI, 2014; WILLSON et al., 2000).

O PPAR β/δ é expresso na maioria dos tecidos humanos, e é encontrado principalmente em cérebro, tecido adiposo, músculo esquelético, intestino, fígado, coração, e pele (ATTIANESE; DESVERGNE, 2015; MONTAGNER et al., 2011; NEELS; GRIMALDI, 2014; PETERS et al., 2000).

Assim como os demais isotipos, o PPAR β/δ está envolvido em processos metabólicos como metabolismo energético, adipogênese e metabolismo de lipídios. Alguns estudos indicam benefícios da ativação do PPAR β/δ em condições de dislipidemia, aterosclerose, obesidade, aporte de colesterol, assim como no decréscimo nos níveis de triglicérides e glicose em modelos animais portadores de diabetes tipo 2 (BATISTA et al., 2012; BRAGT; POPEIJUS, 2008; LUQUET et al., 2004; TAN et al., 2016).

Este isotipo também possui atividades não-metabólicas, principalmente no cérebro e na pele. Essas atividades incluem efeitos neuroprotetores em doenças cerebrais, como esclerose múltipla, derrame, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (AGARWAL; YADAV; CHATURVEDI, 2017; ALESHIN et al., 2013; BORDET et al., 2006; SKERRETT; MALM; LANDRETH, 2014). Observações *in vivo* e *in vitro* apontam que o PPAR β/δ é o isotipo prevalente no cérebro sendo encontrado em todos os tipos celulares cerebrais em camundongos (HENEKA; LANDRETH, 2007). É sugerido que ele esteja relacionado ao metabolismo de lipídios no cérebro, uma vez que animais que não expressam este isotipo apresentaram um padrão de mielinização alterado (PETERS et al., 2000). A ativação do PPAR β/δ em oligodendrócitos imaturos promove diferenciação celular, *turnover* e maturação da mielina (HENEKA; LANDRETH, 2007). Iwashita e colaboradores demonstraram que agonistas do receptor PPAR β/δ apresentam atividade antiapoptótica *in vitro* (IWASHITA et al., 2007), apontando para um possível potencial neuroprotetor desta classe de drogas, colocando este receptor como um atrativo alvo terapêutico em desordens neurodegenerativas e isquemias.

O PPAR β/δ também atua em processos de diferenciação e proliferação celular, regulação imune, e estresse oxidativo, especialmente na biologia da pele (ICRE; WAHLI; MICHALIK, 2006; KUENZLI; SAURAT, 2003; ROSENFELD; DEPLEWSKI; GREENE, 2000; SCHMUTH et al., 2008; TAN et al., 2004), a qual daremos maior destaque a seguir.

1.5 Pele

A pele é o maior órgão do corpo e protege o corpo da perda de água e de múltiplas agressões (por exemplo, de lesões mecânicas, microorganismos e luz ultravioleta - UV), além de possuir funções de manutenção da temperatura corporal. Durante o envelhecimento, a pele perde parte de sua habilidade protetora e regenerativa devido à genética e às alterações fisiológicas e histológicas (CALLAGHAN; WILHELM, 2008).

A pele é composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é um epitélio escamoso estratificado e é responsável pela barreira contra agentes químicos, físicos e biológicos (ELIAS, 2005). A epiderme é composta por quatro camadas: estrato base, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (Figura 9). O estrato córneo (*stratum corneum*) é a camada mais externa, e é composto de corneócitos, lipídios intercorneócitos e queratina, responsáveis pela função de barreira da pele (contra perda de água e danos físicos ou externos de microorganismos). A epiderme é renovada continuamente e sua integridade depende de um equilíbrio bem regulado entre a proliferação celular, diferenciação e apoptose de queratinócitos,

o tipo celular mais abundante na epiderme. Durante a sua maturação, a epiderme evolui de uma única camada de células epiteliais (queratinócitos) para um epitélio completamente estratificado e diferenciado. Neste processo, as células progenitoras de queratinócitos da membrana basal sofrem um programa de diferenciação sequencial, até atingirem as camadas superiores da epiderme. Cada etapa da diferenciação é caracterizada pela expressão de genes específicos que são considerados marcadores da diferenciação. Diferentes genes de queratina são transcritos na camada basal (queratina 5 (K5) e queratina 14 (K14)) se comparados às células da camada espinhosa (queratina 1 (K1) e queratina 10 (K10)). A transição da camada espinhosa para a granular é acompanhada pelo aumento da expressão de genes que codificam proteínas estruturais do envelope cornificado, como involucrina (IVL) e transglutaminase-1 posterior (Tg-1) (DEL ROSSO; LEVIN, 2011; WIKRAMANAYAKE; STOJADINOVIC; TOMIC-CANIC, 2014).

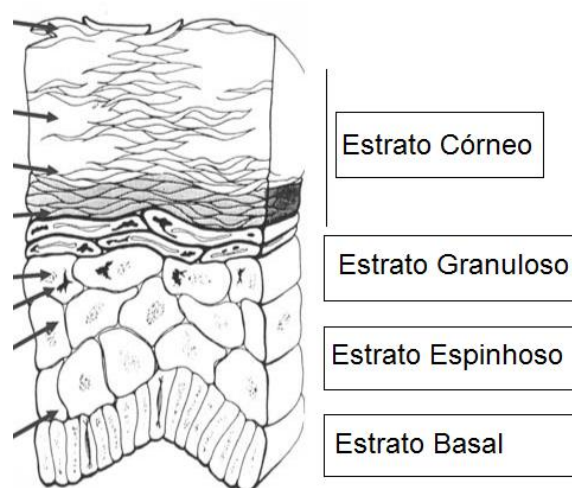


Figura 9. Estrutura típica da Epiderme. A epiderme é formada por quatro camadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato córneo. Modificado de: Draelos & Thaman, 2006.

A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, é o produto final da diferenciação de queratinócitos e consiste em uma camada de proteínas interligadas e lipídios, que funciona como uma barreira à perda de água transepidérmica e como defesa contra danos físicos, micróbios, e xenobióticos (DI-POÏ et al., 2004; MICHALIK; WAHLI, 2006). Os corneócitos são células sem núcleos e organelas, provenientes da diferenciação dos queratinócitos do estrato basal (CALLAGHAN; WILHELM, 2008). Durante sua migração e diferenciação pela camada basal para o estrato córneo, os queratinócitos alteram o tipo de lipídios produzidos: os fosfolipídios e os glicosíngolipídios são esgotados, enquanto que a

produção de ceramida, colesterol e ácidos graxos livres aumenta (DEL ROSSO; LEVIN, 2011; YAAR; GILCHREST, 2001). A epiderme também possui melanócitos e células de Langerhans apresentadoras de antígenos. Além disso, esta camada é separada da derme pela membrana basal.

A segunda camada da pele, a derme, é composta principalmente de proteínas da matriz extracelular (MEC), as quais são produzidas principalmente por fibroblastos. Essas proteínas são responsáveis pela elasticidade e suporte mecânico dos tecidos epiteliais. A proteína mais abundante da MEC é o colágeno tipo I, cujas fibras são responsáveis pela força e resiliência da pele (CALLAGHAN; WILHELM, 2008). Os fibroblastos da derme produzem colágeno tipo I heterotrimérico, o qual consiste de duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma $\alpha 2(I)$ codificadas por dois diferentes genes localizados em diferentes cromossomos. Outras proteínas da MEC são elastina, proteoglicanos, fibronectina e outros tipos de colágeno (III, V, VII). A elastina é uma das principais proteínas estruturais da MEC e mantém a flexibilidade, extensibilidade e elasticidade da pele. Essa proteína também é sintetizada como uma pró-enzima chamada de tropoelastina (PASQUALI-RONCETTI; BACCARANI-CONTRI, 1997; ROSENBLOOM; ABRAMS; MECHAM, 1993). Também estão presentes na derme o suprimento vascular da pele, células do sistema imune, nervos, glândulas sebáceas e folículos pilosos (CALLAGHAN; WILHELM, 2008).

A camada mais profunda da pele é a hipoderme ou tecido subcutâneo, que consiste principalmente de células adiposas responsáveis pelo suporte do tecido conectivo. Essa camada também possui fibroblastos, vasos sanguíneos, raízes de folículos pilosos e nervos cutâneos (CALLAGHAN; WILHELM, 2008).

O amadurecimento e desenvolvimento do tecido epitelial são regulados por diversos receptores nucleares e seus respectivos ligantes (WINTERFIELD et al., 2003). Os três isotipos de PPARs estão envolvidos em processos de regeneração de pele e na manutenção da homeostasia desse tecido, sendo que, de um modo geral, o desbalanço de sua expressão pode levar a algumas doenças de pele como psoríase, acne vulgar e dermatite (DI-POÏ et al., 2004; SERTZNIG et al., 2008). Dessa forma, alguns estudos indicam os PPARs como alvos para desenvolvimento de fármacos ou dermocosméticos (GUPTA et al., 2015; SERTZNIG; REICHRATH, 2011; WINTERFIELD et al., 2003).

1.6 Envelhecimento de pele

O envelhecimento intrínseco da pele, isto é, a passagem do tempo, é um processo biológico natural e complexo que é exemplificado pelo surgimento de rugas e demonstra pouca

mudança histológica no tecido. O envelhecimento extrínseco, também chamado de foto-envelhecimento, é resultado da incidência do sol, que contém radiação ultravioleta (UV) sobre a pele no decorrer dos anos (BAUMANN, 2007; GILCHREST, 2013; GOSAIN; DIPIETRO, 2004; JENKINS, 2002; MORIWAKI; TAKAHASHI, 2008; QUAN; FISHER, 2015).

Vários fatores, independentemente ou em conjunto, resultam no fenótipo da pele envelhecida, como genética, exposição ambiental, processos metabólicos e alterações hormonais. O surgimento de rugas suaves, o aumento da dureza da pele, epiderme mais fina, a atrofia da derme, a redução da elasticidade, a perda de tecido adiposo subcutâneo, a redução da capacidade de regeneração, a resposta imune menos eficiente, as alterações na barreira protetora da pele, e o aumento da incidência de tumores são algumas das alterações observadas na pele extrinsecamente envelhecida (CALLAGHAN; WILHELM, 2008; WATSON; GRIFFITHS, 2005). Durante o processo de envelhecimento também são observadas alterações na proliferação e diferenciação de queratinócitos, e mudanças na produção de citocinas devido a estímulos ambientais (YAAR; GILCHREST, 2001).

O surgimento de sulcos e rugas, juntamente com o afinamento da pele, são o primeiro fenótipo de envelhecimento visual da pele. A maior parte desse fenótipo é causada pelo desequilíbrio entre as enzimas que controlam a remodelação e o reparo da MEC da derme. Uma causa do desenvolvimento de rugas é a produção diminuída das proteínas mais abundantes da MEC, colágeno tipo I e elastina, que são responsáveis pelo suporte mecânico estrutural dos tecidos circundantes e pela sua elasticidade. Essas proteínas são produzidas principalmente por fibroblastos dérmicos, os quais tem seu número e capacidade biossintética reduzidos durante o envelhecimento (CHUNG et al., 2001; KWOK et al., 2012; MOLONEY et al., 1992).

Além da diminuição das proteínas da MEC, há também um aumento na expressão de metaloproteinases de matriz (MMP). Essas proteínas são responsáveis pela degradação de algumas proteínas estruturais da MEC, resultando em perda da integridade estrutural da epiderme e da derme, como será explicado adiante (JENKINS, 2002; RITTIÉ; FISHER, 2002). O processo de envelhecimento também requer a regulação da expressão de inibidores de metaloproteinases do tecido (TIMP), proteínas importantes no processo regulatório de remodelação e reparo da matriz dérmica porque regulam a ação de MMPs (JENKINS, 2002; RITTIÉ; FISHER, 2002).

A epiderme mais fina e a derme achatada encontradas na pele envelhecida tornam este órgão menos resistente, o que pode resultar em perda da sua capacidade de manutenção da temperatura corporal central (CALLAGHAN; WILHELM, 2008). A deficiência na barreira epidérmica também pode resultar em ressecamento devido a perda percutânea de fluidos e

eletrólitos; e falhas na prevenção da penetração de agentes químicos externos e microorganismos. Alguns estudos indicam que o funcionamento imunológico alterado em pele envelhecida resulta em perda percutânea de fluídos, eletrólitos e proteínas (CALLAGHAN; WILHELM, 2008; INAMADAR; PALIT, 2005).

Finalmente, todas as alterações moleculares, fisiológicas e histológicas observadas no tecido envelhecido também contribuem para diminuição da capacidade de regeneração da pele, que será descrita adiante em detalhes (ASHCROFT; MILLS; ASHWORTH, 2002; BALLAS; DAVIDSON, 2001; GOSAIN; DIPIETRO, 2004). Esses processos que estão em desequilíbrio na pele envelhecida mostraram-se influenciados por PPAR β/δ de alguma forma, como será explicado a seguir.

1.7 PPAR β/δ e pele

Todos os três isotipos de PPAR foram detectados em pele humana e de roedor, mas sua expressão é variável em diferentes tipos de células e condições. Em humanos, o PPAR β/δ é o isotipo mais expresso em queratinócitos, principalmente ao nível do extrato basal (RIVIER et al., 1998; WESTERGAARD et al., 2001, 2003). A expressão do PPAR β/δ também é encontrada em melanócitos (KANG et al., 2004; MÖSSNER et al., 2002), sebócitos (ROSENFELD et al., 1999), fibroblastos dérmicos e células do folículo capilar (BILLONI et al., 2000; WEINDL, 2005). Existem diversas revisões a respeito do papel dos PPARs, e em específico do PPAR β/δ , na manutenção da homeostasia deste órgão (ICRE; WAHLI; MICHALIK, 2006; KUENZLI; SAURAT, 2003; ROSENFELD; DEPLEWSKI; GREENE, 2000; SCHMUTH et al., 2008; TAN et al., 2004)

Em relação à pele de camundongos, a expressão de PPAR β/δ possui padrões espaço-temporais específicos. O PPAR β/δ é expresso em pele embrionária e pós-natal de camundongos, sendo que sua expressão diminui até o nascimento (MICHALIK et al., 2001). Na pele adulta de camundongos, todos os isotipos de PPARs têm baixa expressão, mas o PPAR β/δ é o mais expresso. No entanto, esta expressão na pele adulta é principalmente devido à presença de PPARs nos folículos pilosos, pois eles são indetectáveis na epiderme interfolicular (MICHALIK et al., 2001). Em camundongos, utilizando-se estímulos para proliferação de queratinócitos, por exemplo depilação ou aplicação tópica de acetato de tetradecanoilforbol (TPA), a expressão de PPAR β/δ é aumentada (MICHALIK et al., 2001). O aumento da expressão do PPAR β/δ após estímulo também é observado em cultura primária de queratinócitos murinos. Nestes casos, estímulos inflamatórios como citocinas e luz UV

aumentam a expressão do PPAR β/δ (SCHMUTH et al., 2004; TAN et al., 2001). Vários trabalhos descrevem a expressão de PPAR β/δ em pele de camundongos (BRAISSANT et al., 1996; BRAISSANT; WAHLI, 1998; MICHALIK; WAHLI, 2006, 2007; SERTZNIG et al., 2008).

Um dos genes alvos do PPAR β/δ , o fator de transformação do crescimento beta1 (TGF- β 1) (KIM et al., 2008), participa na regulação da deposição das proteínas da MEC, na remodelação de tecidos, na adesão e proliferação celular, na modulação de respostas inflamatórias, e na manutenção e restauração epidérmica (VERRECCHIA; MAUVIEL, 2002). A ativação do PPAR β/δ pelo agonista GW501516 aumenta a expressão TGF- β 1-dependente de colágenos tipo I e III em células primárias humanas de queratinócitos e fibroblastos (HAM et al., 2009). Em relação a outras proteínas da MEC, a ativação do PPAR β/δ pelo agonista GW501516 traz aos níveis normais a expressão de elastina e MMP-2 que foram, respectivamente, *down*- e *up*-reguladas depois do tratamento com luz UV em fibroblastos dermais humanos (HDF) (HAM et al., 2014).

O PPAR β/δ é considerado um alvo válido para o diagnóstico ou tratamento de doenças de pele, pois sua expressão e/ou função desbalanceada foi encontrada em acne vulgar, dermatite, psoríase e melanoma (DI-POÏ et al., 2004; SERTZNIG et al., 2008). No contexto das desordens de pele, a expressão de PPAR β/δ está aumentada em psoríase (RIVIER et al., 1998; SCHMUTH; ELIAS; FEINGOLD, 2003) e em carcinoma de célula escamosa (NIJSTEN et al., 2005). Alguns estudos utilizam o PPAR β/δ como biomarcador para o diagnóstico de acne vulgar (ELMONGY; SHAKER, 2012) e psoríase (EL EISHI et al., 2011; GUDJONSSON et al., 2010; ROMANOWSKA et al., 2010; SWINDELL et al., 2013).

1.8 PPAR β/δ e estrutura e função da epiderme

Conforme mencionado, a barreira epidérmica é muito importante para a saúde humana, pois é responsável por prevenir a desidratação, e a entrada de microorganismos e agentes químicos. Vários estudos foram feitos para abordar os papéis PPAR β/δ na estrutura e função da epiderme, e alguns deles serão destacados no texto.

Camundongos PPAR β/δ -deficientes ou *knockdown* não apresentam defeito grave na maturação epidérmica (MAN et al., 2008; MICHALIK et al., 2001), sugerindo que o processo de maturação epidérmica seja independente de PPAR β/δ . No entanto, a ativação de PPAR β/δ estimula o processo de diferenciação de queratinócitos humanos e de camundongos (KIM et al., 2006; SCHMUTH et al., 2004).

Alguns estudos mostraram que o PPAR β/δ é o isotipo mais expresso durante a diferenciação de queratinócitos em humanos, e sua expressão permanece alta e praticamente inalterada durante este processo em cultura de queratinócitos primários humanos (RIVIER et al., 1998; WESTERGAARD et al., 2001). Além disso, sob estimulação pelo tratamento com agonistas de PPAR β/δ (GW0742 ou GW1514), foi observado um aumento da expressão de involucrina, um marcador de diferenciação de queratinócitos, em pele de camundongo (KIM et al., 2006; SCHMUTH et al., 2004), queratinócito primário de camundongo (KIM et al., 2006) e queratinócitos primários humanos (SCHMUTH et al., 2004; WESTERGAARD et al., 2001). Este aumento da expressão de involucrina observado foi considerado PPAR β/δ -dependente em queratinócitos murinos (KIM et al., 2006). O tratamento com o ligante também resultou no aumento da quantidade de envelopes cornificados em pele de camundongo (KIM et al., 2006).

Algumas alterações observadas em camundongos PPAR β/δ -deficientes, como uma estratificação da epiderme mais pronunciada em animais PPAR β/δ +/- (MICHALIK et al., 2001), e um aumento da espessura da epiderme em animais PPAR β/δ *knockout* (KO) (MAN et al., 2008), foram associadas ao aumento da proliferação de queratinócitos também observado nestes animais. Corroborando esses achados, a ativação farmacológica de PPAR β/δ mostrou diminuir a proliferação celular em queratinócitos primários de camundongo (KIM et al., 2006) e em queratinócitos humanos imortalizados (BURDICK et al., 2007). Essa relação indica que o PPAR β/δ pode estar diretamente envolvido em processos de proliferação de queratinócitos.

Em relação aos lipídios da epiderme, *in vivo*, a ativação do PPAR β/δ pelo agonista GW1514 aumentou o acúmulo de triglicerídeos (SCHMUTH et al., 2004) e a produção de esfingolipídios em pele de camundongos (MAN et al., 2006). Em cultura primária de queratinócitos murinos, o aumento do acúmulo de triglicerídeos também foi observado (SCHMUTH et al., 2004). Em queratinócitos humanos a ativação por GW1514 aumentou a expressão das proteínas Perilipina 2 (*adipose differentiation-related protein*, ADRP ou PLIN2) e Angiopoitina tipo 4 (*fasting induced adipose factor*, FIAF ou ANGPL4) (SCHMUTH et al., 2004). Ambas as proteínas são alvos de regulação por PPAR β/δ e estão envolvidas, respectivamente, no armazenamento e no metabolismo de lipídios (MICHALIK et al., 2006; MONTAGNER et al., 2014).

Uma epiderme funcional deve ser impermeável e proteger o corpo contra agentes externos. Camundongos PPAR β/δ -KO exibiram recuperação retardada da barreira de permeabilidade após lesão aguda (MAN et al., 2008). Além disso, o tratamento tópico da pele murina com agonistas de PPAR β/δ melhorou a homeostase da barreira de permeabilidade,

resultando na aceleração da recuperação da barreira epidermal após disrupção aguda (SCHMUTH et al., 2004).

1.9 PPAR β/δ e fechamento de feridas da epiderme

Após uma lesão na pele, o processo de cicatrização de feridas epiteliais é responsável por cobrir o local exposto com uma nova epiderme. Este processo consiste em três fases principais que interagem e se sobrepõe: inflamação, nova formação de tecido, e diferenciação do novo epitélio. Em se tratando da derme, durante o fechamento de feridas ocorre o remodelamento deste tecido, com a síntese de novas proteínas da MEC, e a formação da cicatriz, processos que podem levar meses (MICHALIK; WAHLI, 2007). Os papéis de PPAR β/δ no processo de reepitelização da pele ferida foram bem documentados em algumas revisões (ICRE; WAHLI; MICHALIK, 2006; MICHALIK; WAHLI, 2006, 2007; TAN et al., 2004; WAHLI, 2002).

Na fase inflamatória, os queratinócitos são expostos a citocinas pró-inflamatórias e a lipídios bioativos (MICHALIK; WAHLI, 2006). Durante a cicatrização de feridas, a expressão de PPAR β/δ é aumentada, e ele torna-se o isotipo PPAR mais expresso na epiderme (MICHALIK et al., 2001). A expressão PPAR β/δ é aumentada na fase inicial da lesão e permanece alta até o fechamento da ferida (MICHALIK et al., 2001). Uma interação equilibrada entre queratinócitos, fibroblastos dérmicos e macrófagos é fundamental para a cicatrização eficiente de feridas. Este processo envolve a secreção de TGF- β 1 por fibroblastos na derme da ferida, levando ao recrutamento de neutrófilos e macrófagos. Estas células inflamatórias secretam Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e mantém assim a expressão de PPAR β/δ e a produção de seus ligantes nos queratinócitos da ferida (TAN et al., 2001). O PPAR β/δ ativado pelos ligantes reprime as cascatas da apoptose (DI-POÏ et al., 2002) e, dessa forma, aumenta a diferenciação e a sobrevivência dos queratinócitos após a exposição ao estresse, e ajuda a manter um número suficiente de queratinócitos viáveis para reepitelização da ferida (MICHALIK; WAHLI, 2006).

Em um segundo momento, que começa horas após uma lesão na pele, os queratinócitos começam a migrar das bordas da ferida e proliferam para cobri-la. Estudos mostram que o PPAR β/δ tem um papel relevante durante a cicatrização: animais PPAR β/δ +/- tem a cicatrização de feridas atrasada devido ao comprometimento da adesão e da migração dos queratinócitos mutantes (MICHALIK et al., 2001). Este retardo na migração também foi observado *ex vivo* em explantes de pele desses animais

PPAR β/δ -/- (TAN et al., 2007). *In vitro*, culturas primárias de queratinócitos PPAR β/δ +/- e PPAR β/δ -/- também apresentaram atraso no fechamento da ferida do ensaio de migração 2D (*scratch assay*) em comparação com as células PPAR β/δ +/+ (MICHALIK et al., 2001; TAN et al., 2007). Corroborando o papel do PPAR β/δ no reparo de feridas epiteliais, a ativação farmacológica do receptor pelo seu agonista GW501516, por tratamento tópico ou liberação de nanopartículas, acelera a cicatrização de feridas em camundongos (HAM et al., 2009; WANG et al., 2015). Em relação à expressão gênica de proteínas de MEC na cicatrização de feridas, não foram encontradas alterações na deposição de elastina e colágeno entre a derme de animais PPAR β/δ -deficientes e selvagens, tanto em pele normal (sem ferida), quanto no tecido ao redor da ferida (MICHALIK et al., 2001). *In vitro*, a ativação farmacológica de PPAR β/δ por TNF- α (com e sem agonista de PPAR β/δ) aumentou a expressão de MMP-9 (enzima gelatinolítica envolvida na migração de queratinócitos nas margens da ferida cicatrizante) em queratinócitos primários murinos; e este resultado não foi observado em células PPAR β/δ -KO (DI-POÏ et al., 2002). Em culturas de queratinócitos e fibroblastos humanos, a ativação do PPAR β/δ por GW501516 aumentou a transcrição TGF- β 1-dependente das proteínas da MEC colágeno tipo I e III (HAM et al., 2009).

O último estágio da cicatrização epidermal consiste da estratificação e diferenciação da nova epiderme, e colonização do epitélio por outros tipos celulares (por exemplo células do sistema imune).

1.10 Busca de ligantes para o PPAR β/δ

Devido ao elevado número de pessoas afetadas por distúrbios relacionados com PPAR β/δ , o desenvolvimento de ligantes específicos para modular a atividade desse receptor é de grande importância.

Um dos métodos mais comuns para verificação da atividade de receptores nucleares é o ensaio de transativação celular (BERGER; MOLLER, 2002; LAI; JIANG; LI, 2006). Na literatura existem alguns artigos sobre triagem em larga escala (*high throughput screening*, HTS) de ligantes, cada um com sua particularidade, para alguns RNs como Receptor de Estrógeno (ER), Receptor de Andrógenos (AR), Receptor de Hormônio Tireoidiano (TR), Receptor de Farnesóide X (FXR) e PPARs, utilizando-se metodologias de Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) e de ensaio de transativação com gene repórter β -lactamase ou gene repórter luciferase (AGRAWAL et al., 2013; ANDRUSKA et al., 2012; BLANKVOORT et al., 2001; DIAS et al., 1998; DU et al., 2011; FREITAS et al., 2011; GROVER et al., 2003;

HSU et al., 2014; HUANG et al., 2011; MATSUURA et al., 2013; SEDLÁK; PAGUIO; BARTŮŇEK, 2011; SEIMANDI et al., 2005; SHI et al., 2005; SONNEVELD et al., 2006; TAKACS; ABBOTT, 2007; WILSON; BOBSEINE; GRAY, 2004; WOLF et al., 2014; XIA et al., 2013; ZHANG et al., 2014; ZHOU et al., 2008).

Em relação ao isotipo PPAR β/δ , existem alguns relatos utilizando-se o método de transativação celular para triagem e caracterização da concentração-reposta de possíveis ligantes ativadores (GROVER et al., 2003; MATSUURA et al., 2013; SEIMANDI et al., 2005; TAKACS; ABBOTT, 2007; XIA et al., 2013). No entanto, estes relatos não utilizam ensaios biofísicos para confirmar a interação direta entre os ligantes e o receptor e, portanto, permitem a seleção de falsos-positivos.

Para ensaios de triagem de compostos em larga escala, geralmente utiliza-se bibliotecas de compostos (sintéticos, semi-sintéticos, naturais) ou bibliotecas de extratos de plantas. O uso de bibliotecas apresenta a vantagem dos compostos ou extratos estarem reunidos em um só local, facilitando o armazenamento e a utilização deles com o uso de pipetadores automáticos multicanais. A semi-automatização dos experimentos permite que eles sejam executados de maneira muito mais rápida e reduzindo erros que poderiam ser causados por exemplo por repetição ou devido ao tamanho reduzido dos poços (RENAUD; DELSUC, 2009; SZYMAŃSKI; MARKOWICZ; MIKICIUK-OLASIK, 2012).

As bibliotecas podem ser organizadas de acordo com a origem dos compostos ou extratos, ou por algum outro critério de similaridade (estrutura química ou uso anterior). A biblioteca de compostos do NIH-NCC, por exemplo, reúne pequenas moléculas que já passaram por ensaios clínicos em humanos. Coleções similares de medicamentos aprovados pela *US Food and Drug Administration* (FDA) provaram ser fontes ricas de bioatividade e potencial terapêutico ainda não descobertos. Esse tipo de biblioteca permite a identificação de um segundo uso para medicamentos, e apresenta a vantagem desses compostos já terem sido avaliados quanto a toxicidade, biodisponibilidade e segurança. Após a identificação desses compostos em uma nova triagem, eles podem ser otimizados quimicamente ou usados diretamente para o tratamento de uma nova doença, após passos de validação.

Extratos naturais também podem ser bons pontos de partida para seleção de compostos que possam desempenhar papéis relevantes no tratamento ou prevenção de doenças metabólicas humanas ou na regulação de funções fisiológicas (HUANG et al., 2009). Além disso, os extratos naturais trazem maior diversidade química de compostos, aumentando a possibilidade de encontrar novas moléculas com atividade biológica em relação a nosso alvo (RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017), especialmente no caso de

bibliotecas que exploram biomas da diversidade brasileira. No caso dos PPARs, já foi reportado na literatura alguns estudos que realizam a busca de moduladores para tratamento da síndrome metabólica com produtos naturais, os quais podem apresentar baixa toxicidade e alta eficiência (HUANG et al., 2009; RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017). No entanto, é importante mencionar que a triagem de bibliotecas de extratos naturais pode resultar em baixos sinais de atividade, uma vez que cada fração/extrato testado é composto por diferentes moléculas, e apenas uma delas pode apresentar atividade contra um alvo específico, e pode estar presente em baixas concentrações na fração/extrato. Neste contexto, as atividades encontradas tendem a ser menores que as obtidas por controles positivos, pois estes geralmente se tratam de um composto isolado e quimicamente otimizado (MATSUURA et al., 2013; XIA et al., 2013).

A triagem experimental em *high throughput screening* (HTS) é uma tecnologia bem estabelecida e adotada pela indústria farmacêutica para a descoberta de *hits* inovadores com potencial interação com alvos específicos. No entanto, o alto custo e baixa taxa de sucesso associada ao HTS estimularam o desenvolvimento de alternativas computacionais (*in silico*) mais baratas e rápidas para aplicação na triagem de compostos, como as técnicas de seleção virtual (*virtual screening*, VS) (CHENG et al., 2012; MENG et al., 2011). Comparado com o HTS, o VS é uma abordagem de descoberta de fármacos mais direta e racional, e tem a vantagem de ser uma técnica efetiva e de baixo custo (LEWIS; BASSAGANYA-RIERA; BEVAN, 2010; MENG et al., 2011; SZYMAŃSKI; MARKOWICZ; MIKICIUK-OLASIK, 2012).

CAPÍTULO II: JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

O PPAR β/δ possui importantes papéis metabólicos (BRAGT; POPEIJUS, 2008; LUQUET et al., 2004) e não-metabólicos, principalmente na manutenção da homeostasia da pele e no reparo de feridas epiteliais (ICRE; WAHLI; MICHALIK, 2006; MICHALIK; WAHLI, 2007). Este RN pode acomodar diferentes ligantes em seu LBP, levando a mudanças conformacionais na estrutura do receptor, que vão desencadear nos diferentes papéis deste receptor (PRIVALSKY, 2004). O grande LBP do PPAR β/δ permite que diferentes tipos de ligantes naturais e sintéticos possam interagir e modular atividade deste receptor, e também que novos ligantes ainda possam ser desenvolvidos para interagir com o seu sítio hidrofóbico, para ações específicas (MICHALIK; WAHLI, 1999).

Baseado nas atividades do PPAR β/δ em aceleração da cicatrização, regulação das respostas inflamatórias na pele, bem como em sua função como biomarcador para doenças de pele humanas, este isotipo é considerado um alvo promissor para o tratamento de cicatrização de feridas e desbalanço da homeostasia da pele (GUPTA et al., 2015; SERTZNIG; REICHRATH, 2011; WINTERFIELD et al., 2003). Estudos também mostram que o PPAR β/δ pode regular indiretamente, por intermédio do TGF- β 1, a expressão gênica de proteínas da MEC (como colágenos e fibronectina) e de collagenases (MMPs) (HAM et al., 2009, 2014). Todos estes processos encontram-se desbalanceados em pele envelhecida, indicando que o PPAR β/δ também possa ser um bom alvo para o desenvolvimento de dermocosméticos buscando amenizar o fenótipo da pele envelhecida.

Até o momento, a importância dos ligantes de PPAR para uso clínico está restrito aos isotipos PPAR α e PPAR γ , e é voltado apenas para o tratamento de desordens metabólicas (BERGER; MOLLER, 2002; MICHALIK; WAHLI, 1999). Os esforços para o desenvolvimento de um novo ligante para PPAR β/δ devem estar focados em moléculas que seletivamente regulem a ativação deste isotipo para a resposta celular desejada. Neste trabalho, consideramos interessante a busca por ligantes que estimulem a cicatrização de pele e possam ter uma atividade “antiidade” neste órgão.

2.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi *prospectar compostos que possam atuar como agonistas do PPAR β/δ e investigar os efeitos da modulação deste receptor por ligantes em células epidermais.*

Para alcançar tal objetivo, os seguintes objetivos específicos foram abordados:

- Desenvolvimento de uma metodologia para triagem de ligantes que ativem e estabilizem o PPAR β/δ ;
- Transferência do ensaio de transativação para microplacas de 96 poços em plataforma semi-automatizada;
- Desenvolvimento dos protocolos de caracterização biofísica dos compostos (TSA e supressão da fluorescência do ANS);
- Validação da metodologia de triagem utilizando-se agonistas comerciais;
- Triagem manual de derivados de produtos naturais e de compostos sintéticos de colaboradores;
- Triagem semi-automatizada de bibliotecas de produtos naturais e compostos sintéticos;
- *Virtual screening* de biblioteca de compostos, buscando-se otimizar a metodologia de triagem;
- Desenvolvimento de protocolos de proliferação, diferenciação e migração de queratinócitos humanos (HaCaT);
- Avaliação dos efeitos dos ligantes comerciais de PPAR β/δ na proliferação, migração, diferenciação e expressão gênica de proteínas de MEC em HaCaT;
- Comparação dos níveis de expressão de RNA de proteínas da MEC entre animais selvagens e *knockout* para PPAR β/δ em modelo de reparo de feridas;
- Comparação dos níveis de expressão de PPAR β/δ em banco de dados de expressão gênica para amostras de pele de animais jovens ou idosos.

CAPÍTULO III: MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

- 293T - A linhagem de células utilizada para a padronização dos experimentos de triagem foi a célula de rim embrionário humano 293T (ATCC® CRL-3216™), devido a facilidade de cultivo e transfecção. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), antibióticos (100 unidades/mL penicilina e 100 mg/mL estreptomicina) e 0,37% de bicarbonato de sódio e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

- HaCaT - Para experimentos de caracterização dos ligantes de PPAR β/δ em células epidermais foi utilizada a linhagem de queratinócitos humanos HaCaT (queratinócitos de pele imortalizados de humanos adultos propagados em baixa concentração de Ca²⁺ e em temperatura elevada - *immortalized Human Adult skin keratinocytes propagated under low Ca⁺⁺ concentration and elevated Temperature*). HaCaT foram cultivadas em meio DMEM, *high glucose GlutaMAX™ Supplement* (Thermo Fisher) que já contém Ca²⁺ 1,8mM, suplementado com 10% (v/v) de FBS e antibióticos (100 unidades/mL penicilina e 100 mg/mL estreptomicina), tripsinizadas com Tripsina-EDTA (0,25%) e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Experimentos com células HaCaT foram realizados durante estágio BEPE-FAPESP (#2016/16476-2) no laboratório da Dra. Michalik no Centro de Genômica Integrativa (*Center for Integrative Genomics, CIG*) da Universidade de Lausanne, na Suíça.

3.2 Ligantes comerciais do PPAR β/δ

Os ligantes comerciais utilizados para a padronização dos experimentos foram: GW0742 (CAS 317318-84-6, Sigma Aldrich), GW501516 (CAS 317318-70-0, Sigma Aldrich), Bezafibrato (CAS41859-67-0, Sigma Aldrich), L-165,041 (CAS 79558-09-1, Sigma Aldrich), e GSK0660 (CAS1014691-61-2, Sigma Aldrich) (Figura 10).

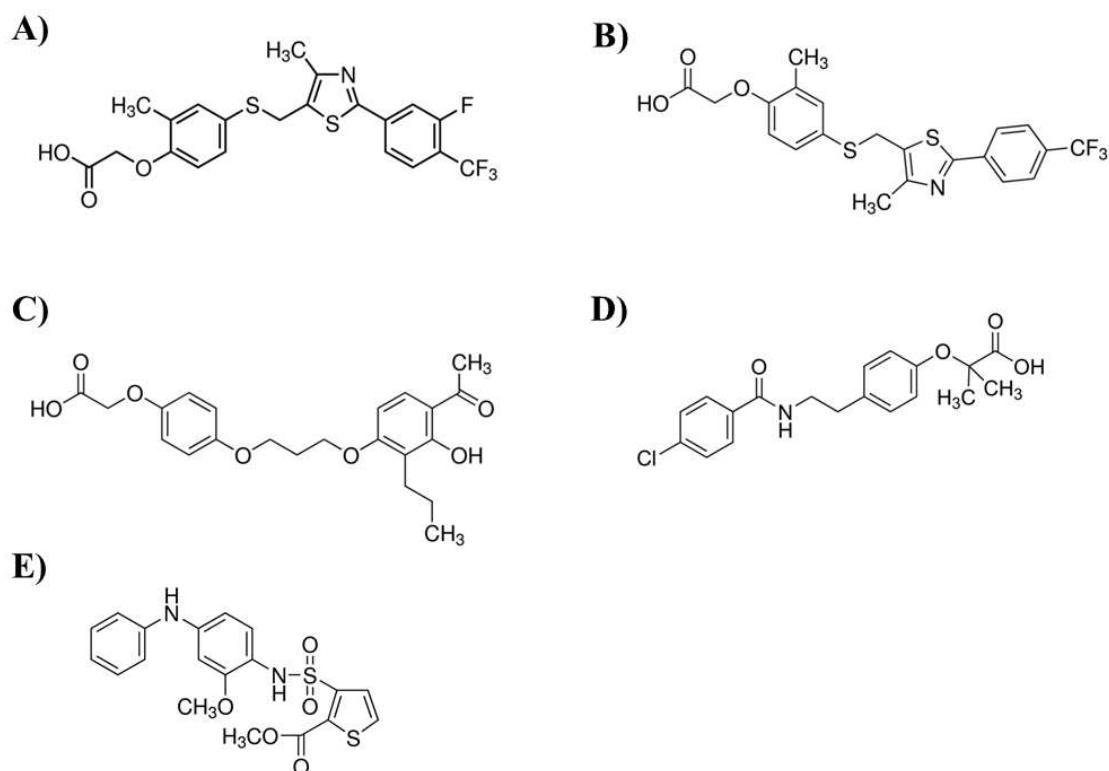


Figura 10. Estruturas dos ligantes comerciais de PPAR β/δ . A) GW0742, B) GW501516 e C) L-165,041 são agonistas de PPAR β/δ , D) Bezafibrato, pan-agonistas dos três isotipos de PPAR β/δ , E) GSK0660, antagonista de PPAR β/δ . Fonte: Sigma-Aldrich/Merck

3.3 Plasmídeos

Ensaio de cultura de células foram realizados com os plasmídeos: 1) pBIND-PPAR δ , o qual, sob o controle do promotor de citomegalovírus (CMV), codifica para uma proteína quimera, composta pelo DBD da Galactosidase 4 (GAL4-DBD) e o LBD do PPAR β/δ humano (hPPAR δ -LBD); 2) pGRE-LUC, o qual contém o elemento responsivo da GAL4 *upstream* do gene repórter de luciferase de vagalume (*firefly*). A proteína PPAR δ :GAL4, quando ativada por um ligante, pode induzir a transcrição do gene repórter de luciferase codificado pelo plasmídeo pGRE-LUC. O plasmídeo pBIND-PPAR δ modificado e o pGRE-LUC foram um presente do Dr. Paul Webb (The Methodist Hospital Research Institute, Houston, EUA) (MATSUURA et al., 2013; XIA et al., 2013). Para controle da eficiência de transfecção (*vector normalization*), foi utilizado o plasmídeo pRL-TL, que constitutivamente expressa luciferase de *Renilla reniformis* (FAN; WOOD, 2007; PAGUIO et al., 2010).

Para experimentos *in vitro* utilizando hPPAR β/δ LBD recombinante, foi utilizado um vetor pET28a-His-LBD-PPAR δ , que contém o LBD do gene humano do PPAR β/δ (aa 171-441) fusionado com uma cauda His-tag (BATISTA et al., 2012).

3.4 Ensaio de transativação em 96 poços para triagem de compostos

3.4.1 Padronização do ensaio de transativação

O ensaio de transativação com gene repórter é o ensaio mais utilizado para verificar a ativação dos receptores nucleares (BERGER; MOLLER, 2002). Quando formatado em microplaca de 96 poços (ou 384) é interessante para a triagem de ligantes por permitir menor gastos com reagentes, possibilitar um teste de mais compostos na mesma placa, reduzir o tempo gasto para a triagem, e possibilitar a robotização do experimento em plataforma de bioensaios.

Para padronização do ensaio em placa de 96 poços foram realizados vários testes buscando-se a melhor condição para a realização do experimento em relação à transfecção, à quantidade de reagente adicionado, ao meio de cultura utilizado na triagem e ao tempo de incubação.

Em nosso protocolo, o modelo de transfecção se baseia na transfecção das células numa etapa anterior ao plaqueamento na placa de 96 poços, assim como nos trabalhos de Matsuura (2013), Xia (2013) e Wolf (2014). Células 293T foram plaqueadas em placas de 100 mm, após atingirem a confluência de 70%, as células foram transientemente co-transfectadas com os plasmídeos pBIND-PPAR δ , pGRE-LUC e pRL-TK, utilizando-se o reagente Lipofectamine 2000® (Life Technologies) (proporção 2 μ L lipo :1,5 μ g de DNA) e 650 ng de cada um dos plasmídeos. O mix foi incubado a temperatura ambiente por 20 minutos e gotejado por toda a superfície da placa. As células foram então incubadas por 6 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram então removidas com tripsina e transferidas para microplaca de 96 poços (placas de triagem, microplacas brancas - Perkin Elmer) a 4×10^4 células/poço (ou 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 células, conforme indicado no experimento) totalizando 100 μ L de meio DMEM 10% FBS. Após o plaqueamento, as células foram tratadas com 1 μ M do agonista GW0742 ou veículo (sulfóxido de dimetilo - DMSO), após 24h a expressão do gene repórter foi quantificada.

A etapa seguinte a ser padronizada foi a determinação das quantidades dos reagentes do kit de leitura do gene repórter Dual Luciferase® necessárias para leitura do ensaio, variando a quantidade dos substratos de leitura de Luciferase (LarII, substrato da luciferase de *firefly*) e Stop&Glo®. O tampão de lise passiva foi utilizado no volume de 20 μ L conforme indicado pelo fabricante, e a placa foi incubada por 20 min com agitação suave. Foram testadas combinações de 50, 25 e 20 μ L de LarII e de Stop&Glo®.

Após determinação da quantidade dos reagentes para leitura do gene repórter, foram realizados testes para escolha do melhor meio para incubação com os compostos (DMEM sem FBS ou DMEM 10% *Charcoal stripped serum*). Este teste foi realizado aos moldes de uma placa de triagem, contendo controles positivos (ligante comercial) e negativos (sem ligante, apenas o veículo DMSO), além de alguns outros ligantes para teste à concentração de 1 μ M. Os resultados do teste foram avaliados utilizando o Fator Z', um fator estatístico para placas de *High-Throughput Screening* (HTS), que será discutido adiante.

3.4.2 Protocolo final de transativação para triagem de compostos

O racional do experimento de transativação é explicado na Figura 11. No protocolo otimizado desenvolvido para triagem em placa de 96 poços, células 293T foram plaqueadas em placas de 100 mm². Após as células atingirem a confluência de 70%, foi preparado um mix com 650 ng de cada um dos plasmídeos (pBIND-PPAR δ , pGRE-LUC e pRL-TK) e Lipofectamine 2000® (Life Technologies) (proporção 2 μ L lipo :1,5 μ g de DNA). Após 20 minutos de incubação, o mix foi gotejado por toda a superfície da placa contendo as células. As células foram então incubadas por 6 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

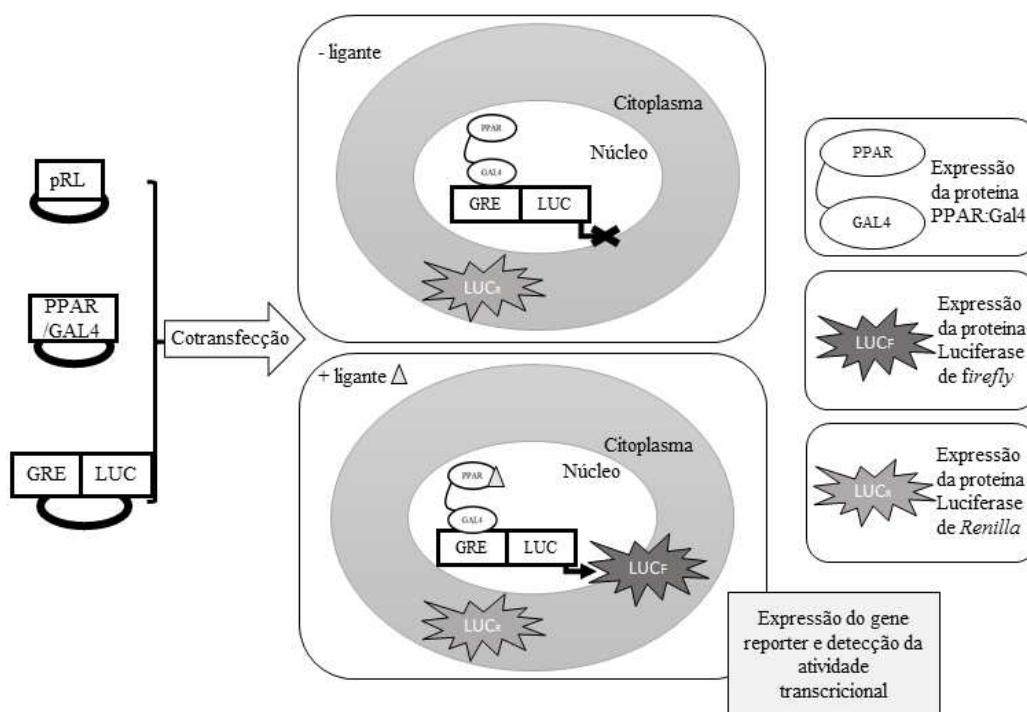


Figura 11. Princípio do ensaio de transativação do PPAR β/δ . Este ensaio é baseado na transfecção transiente de células 293T com três plasmídeos: pBIND-PPAR δ codificando para uma proteína quimera do DBD da GAL4 e LBD do PPAR β/δ ; pGRE-LUC que possui o elemento responsivo da GAL4 *upstream* ao gene repórter de luciferase de vagalume (*firefly*) (LUC_F); e o vetor pRL-TK, que constitutivamente expressa luciferase de *Renilla* (LUC_R). Células transfectadas expressam as proteínas PPAR β/δ de luciferase de *Renilla* de maneira constitutiva.

Quando as células transfectadas são tratadas com alguma molécula que atua como um ligante agonista (+ligante, como GW0742, o PPAR β/δ se liga ao elemento responsivo GRE-LUC e induz a transcrição de LUC_F, processo chamado de ativação de PPAR β/δ . A expressão do gene repórter correlaciona com a bioatividade de PPAR β/δ na amostra. Nota: para simplicidade, apenas o monômero de PPAR β/δ ligado ao GRE é mostrado.

Enquanto isso, os compostos a serem triados foram reformatados para uma placa de 96 poços (placas de triagem, microplacas brancas - Perkin Elmer) contendo 50 μ L de DMEM suplementado com 10% de Charcoal Stripped FBS. Para triagem de compostos de colaboradores, as amostras de teste foram adicionadas manualmente nas concentrações indicadas em cada experimento. Para triagem de compostos/extratos de bibliotecas, estes foram adicionados utilizando um pipetador automático Thermo Scientific™ Versette™ Automated Liquid Handler equipado com uma cabeça de 96 ponteiras. Para a biblioteca Phytobios, os extratos foram triados na concentração final de 10 μ g/mL; para os compostos da biblioteca NIH-NCC, a 1 μ M. Para todas as placas de triagem, a coluna 1 foi configurada como controle negativo (veículo, 1% de DMSO) e a coluna 12 foi configurada como controle positivo (1 μ M GW0742, ~ 0,00047 μ g/mL).

Após as 6h da transfecção, as células foram plaqueadas nas microplacas brancas de 96 poços (4 x 10⁴ células por poço) que já continham os controles ou compostos/extratos de teste, num volume final de 100 μ L por poço de DMEM suplementado com 10% Charcoal Stripped FBS e antibióticos (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As placas foram incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

Após 24 horas, o meio foi aspirado manualmente, ou com o auxílio do Thermo Scientific™ Versette™ Automated Liquid Handler no caso de ensaios semi-automatizados. Para todos os ensaios, a atividade da luciferase foi medida em cada poço com o kit Dual Luciferase® Assay Reporter System (Promega). As soluções de leitura foram adicionadas com o dispensador de reagente Thermo Scientific™ Multidrop™ Combi Reagent Dispenser da seguinte forma: primeiro, 20 μ L de solução de Lise, seguido de 20 min de incubação; então 25 μ L de substrato LARII, seguido de medições de luminescência no leitor de placas CLARIOstar® (BMG Labtech); finalmente, foram adicionados 25 μ L de substrato Stop&Glo® e mediu-se a luminescência.

Para todas as placas, foi realizado uma normalização pelos resultados de luciferase de *Renilla* (vetor controle de transfecção) para controlar as diferenças na eficiência de transfecção entre as amostras. Para essa normalização pelo vetor (*vector normalization*), calculamos a razão do sinal de luciferase de *firefly*/sinal *Renilla* (sinal *firefly*/*Renilla*). O sinal

de luciferase de *Renilla* ('valor de *Renilla*') também foi utilizado para cálculo da 'citotoxicidade aparente'.

Para ensaios de curva concentração-resposta dos agonistas comerciais (GW0742, L-165,041, GW501516), estes foram testados nas concentrações de 10^{-11} a 10^{-6} M. Foram realizados dois experimentos independentes com três replicatas técnicas cada.

3.4.3 Análise estatística da transativação em placas de triagem

Após normalização pelo controle de transfecção, as placas com os compostos/extratos para triagem foram analisadas quanto a citotoxicidade aparente desses compostos/extratos. Para este cálculo, foram analisados os valores do sinal do luciferase de *Renilla*, gene repórter utilizado como controle de transfecção e cujo valor deve ser próximo entre todos os poços com células transfectadas. Poços com expressão do repórter *Renilla* cinco desvios padrão ($5 \times \text{SD}$) abaixo do valor médio dos controles (positivo e negativo) foram considerados citotóxicos e, conseqüentemente, foram descartados da triagem.

Para analisar o desempenho do ensaio de triagem, utilizamos o fator Z' , um fator estatístico para placas de HTS, como parâmetro para avaliar a robustez e confiabilidade do método entre as diferentes placas de triagem (ZHANG, 1999). Este fator indica se o ensaio tem efeito estatístico suficiente para ser considerado. O fator Z' considerado bom deve ser superior a 0,5. O fator Z' é calculado por meio da fórmula:

$$Z\text{-factor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}.$$

Nessa fórmula são levados em consideração o desvio padrão (σ) do controle positivo- sinal (p) e do controle negativo- *background* (n), bem como a média (μ) desses controles. Para o cálculo do fator Z' , consideramos, após a normalização pelo controle de transfecção, os controles positivos (GW0742) como sinal e controles negativos (DMSO) como *background*.

Para distinguir entre compostos que não ativaram de ligantes em potencial utiliza-se como critério de seleção a medida de sete desvios padrões do controle negativo (D_p), compostos com sinal acima desse valor são considerados candidatos a *hits*. O critério é em relação a cada placa individual, para levar em consideração a variação intrínseca dos sinais de controles negativos por placa. Para confirmação dos candidatos pré-selecionados, estes foram re-testados em triplicata.

3.5 Ensaio de citotoxicidade por MTT

O MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é muito utilizado em ensaios de citotoxicidade, tanto para avaliar compostos em diferentes concentrações, quanto condições de cultivo celular (AOKI et al., 2014; HUANG et al., 2013; JUNG et al., 2007; KIM et al., 2008). Se a célula permanece viva durante o tratamento com o composto, desidrogenases mitocondriais são capazes de reduzir o núcleo tetrazólico do MTT à Formazan (Figura 12), um composto de coloração roxa, cuja intensidade é mensurada por absorbância (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2004).

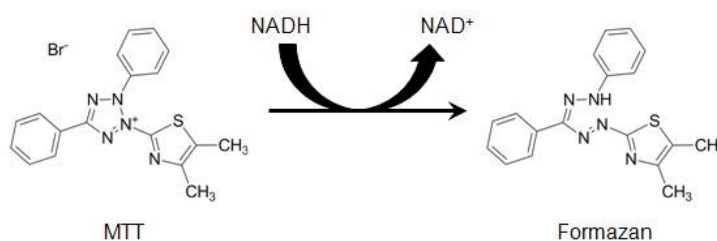


Figura 12. Redução do MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) à Formazan. Retirado de RISS et al., 2004.

Para células 293T, 4×10^4 células por poço foram plaqueadas em microplacas transparentes de 96 poços (Sarstedt) em meio DMEM 10% FBS, com DMSO a 0,1, 1%, 3%, 5%, 10% e 50% e GW0742 1 μ M. Após 20 horas de incubação com o tratamento, o meio celular foi mudado para solução salina de fosfato tampão (PBS), e 10% de MTT (5 mg/mL em PBS) foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas a 37 °C durante 3 h, removeu-se o PBS e adicionou-se 100 μ L de DMSO para dissolver os cristais de formazan. O ensaio foi lido em 560 nm no leitor de placa GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega). No experimento em que relacionamos os resultados do MTT com a expressão do gene repórter *Renilla*, para comparação com nosso parâmetro de citotoxicidade aparente (apenas com base na expressão do repórter de *Renilla*), foram realizados 4 experimentos independentes com três replicatas técnicas cada. Os dados foram analisados pela 2-way ANOVA seguida do teste de comparação múltipla da Sidak no *software* Graphpad Prism.

3.6 Expressão heteróloga e caracterização do hPPAR δ LBD

3.6.1 Expressão hPPAR δ LBD

Para a produção do receptor hPPAR δ LBD de forma heteróloga primeiramente uma cultura de *Escherichia coli* BL21(DE3) cálcio competente foi utilizada para transformar o plasmídeo pET28a contendo a sequência hPPAR δ LBD (aa 171-441) fusionado com histidina.

O protocolo de expressão e purificação do hPPAR δ LBD foi desenvolvido por BATISTA et al., 2012. As células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas cresceram por 12h em meio Luria-Bertani (LB) seletivo contendo canamicina 50 μ g/mL a 37°C sob agitação (250 rpm). Dez mililitros dessa cultura foram utilizados para inocular 1 L de meio LB contendo 50 μ g/mL de canamicina e o inóculo foi incubado a 20 °C sob agitação (200 rpm). Quando a densidade óptica (D.O.) da cultura atingiu um valor entre 0,6 e 0,8 a 660 nm, esta foi induzida pela adição de 0,5 mM isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo (IPTG) e incubada a 20 °C com agitação de 200 rpm *overnight* (BATISTA et al., 2012).

Após a incubação, a cultura foi centrifugada a 7000 rcf por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado, ressuspensionado em tampão A (20 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% glicerol) contendo 10 mM fenilmetilsulfonilfluor (PMSF), 10 mM β -mercaptoetanol e 250 μ g/mL de lisozima. O lisado foi sonificado, centrifugado (30.000 rcf, 60 min, 4 °C) para clarificação e, posteriormente, submetido à cromatografia de afinidade em resina TalonSuperflow Metal Affinity Resin (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) e eluído em gradiente Imidazol 5-300 mM. As frações contendo a proteína foram concentradas e o Imidazol retirado pela lavagem da amostra em tampão A em concentrador Amicon (10 kDa) (BATISTA et al., 2012). Quando necessário, mais um passo de purificação foi acrescentado com o uso de uma coluna de gel filtração Superdex 200 10/300 (GE Life Sciences). Esta purificação ocorreu em tampão GF (20 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 5% Glicerol). A proteína foi quantificada por absorção UV 280 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do hPPAR δ LBD (ϵ = 23,04) e o peso molecular (33,492 kDa).

3.6.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) foi utilizado para verificar o tamanho e homogeneidade da amostra. Neste experimento, a proteína hPPAR δ LBD foi analisada na concentração de cerca de 2 mg/mL (60 μ M) em 100 aquisições de 5 segundos cada, a 15 °C, com 80% da potência do laser. O equipamento utilizado foi o DynaProTM (Protein SolutionsTM).

3.6.3 Dicroísmo Circular (CD)

Para preparo da amostra para aquisição do espectro de dicroísmo circular (*circular dichroism*, CD) primeiramente o hPPAR δ LBD foi diluído em água para 30 μ M e dialisado contra água a 4 °C por 16 h. A diálise foi feita para reduzir a quantidade dos componentes do tampão presentes em solução, pois alguns sais e o Imidazol absorvem nos comprimentos de onda analisados, substituindo o sinal da proteína analisada pelo sinal do reagente, provocando erros na aquisição do espectro da proteína. No caso de avaliação de ligantes ou compostos, estes foram adicionados na concentração de 90 μ M (1proteína:3ligante) à proteína durante a diálise.

Após a diálise, a proteína foi centrifugada com 1 μ L de DTT a 20817 rcf por 10 minutos. Para aquisição do espectro, a proteína foi utilizada a 30 μ M ou diluída para 15 μ M quando os componentes do tampão absorveram no comprimento de onda analisado, mascarando o sinal do espectro da proteína. Para aquisição do espectro foram feitas 20 acumulações de varredura entre os comprimentos de onda de 198 nm a 260 nm (UV *near*). O Tampão A dialisado contra água foi utilizado como padrão. O equipamento utilizado foi um espectropolarímetro J-810 (Jasco). Os dados foram exportados do equipamento e tratados no *software* OriginPro8.

Para aquisição da temperatura de *melting* (T_m) ou temperatura média de desenovelamento da estrutura secundária foi realizado com amostra com a mesma concentração e tratamento (presença ou não de ligantes). O desenovelamento térmico foi realizado variando-se a temperatura da amostra de 10 °C a 90 °C, em uma rampa de 1 em 1 °C, monitorando os comprimentos de onda característicos de α -hélice 208 nm e 222 nm. Os dados foram exportados do equipamento e tratados no *software* OriginPro8.

3.7 Termoestabilidade (*Thermal Shift Assay*, TSA)

O ensaio de termoestabilidade (*Thermal Shift Assay*, TSA ou *Differential Scanning Fluorimetry*, DSF) é um método rápido, sensível e barato para monitorar a estabilidade da estrutura terciária de proteínas, auxiliando na identificação de condições ótimas para a estabilidade proteica e na investigação de interações entre proteínas e seus ligantes específicos. O ensaio de TSA é baseado na desnaturação da proteína, induzida por temperatura, monitorada por um fluoróforo sensível, por exemplo, uma sonda que se liga a partes hidrofóbicas das proteínas. Neste caso, à medida que a proteína se desenovela, suas partes hidrofóbicas são expostas e o fluoróforo emite fluorescência (NIESEN; BERGLUND; VEDADI, 2007). Os

dados de fluorescência são submetidos a um ajuste sigmóide e, a partir deste, é determinada a temperatura de *melting* (T_m). Comparações entre as T_m obtidas podem ser usadas para determinar quais compostos influenciam na estabilidade da estrutura terciária do PPAR β/δ , pois é sabido que receptores nucleares tem sua estrutura terciária estabilizada quando ligados a seus ligantes (FIGUEIRA et al., 2011; HAMURO et al., 2006; PISSIOS et al., 2000; RASTINEJAD et al., 2013).

Este ensaio foi realizado no aparelho 7500 PCR Real Time System (Applied Biosystems) com o fluoróforo SYPRO® Orange (Sigma Aldrich). Primeiramente, foi realizado um teste com diferentes concentrações de sonda e proteína para determinação da melhor condição experimental. Foram testadas em duplicata concentrações de 5X, 10X e 20X da sonda e 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M de proteína, e também foi testado o protocolo genérico de TSA que é aplicado para outras proteínas no laboratório, como o isotipo PPAR γ : 4 μ M de hPPAR δ LBD e 1X de sonda (RIBEIRO FILHO et al., 2018). Em uma placa de 96 poços foram adicionados hPPAR δ LBD e sonda SYPRO® Orange nas condições do teste diluídos em Tampão GF (20mM HEPES pH7,5, 200mM NaCl, 5% glicerol). As medidas se iniciaram em 19°C e terminaram em 89°C, em uma rampa de 1 em 1°C, totalizando 70 medições.

Após determinação da melhor concentração de sonda e de proteína, o ensaio de TSA foi realizado tanto qualitativamente, quanto quantitativamente. Para o protocolo de TSA qualitativo, em uma placa de Micro-amp 96 poços (Applied Biosystems) foram adicionados 10 μ M de hPPAR δ LBD e 5X SYPRO® Orange (Sigma Aldrich) em tampão GF e 30 μ M (~0,01 μ g/mL) de agonistas comerciais (GW0742, GW501516, Bezafibrato e L-165,041, 1 proteína: 3 ligante) ou compostos de colaboradores, ou 140 μ g/mL de extratos da biblioteca Phytobios. A placa contendo proteína e ligantes foi incubada por 1h antes da leitura.

O TSA quantitativo foi realizado nas mesmas condições, variando as concentrações de ligante/extrato (as concentrações de GW0742 foram 0,3 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 30 μ M e 50 μ M, as concentrações de extrato da Phytobios foram: 5, 10, 30, 50, 100, 300, e 500 μ g/mL). Para experimentos qualitativos e quantitativos utilizou-se o equipamento 7500 PCR Real Time System (Applied Biosystems), e as medidas foram tiradas de 9 °C a 89 °C, com um gradiente de 1 °C por minuto, totalizando 80 medidas. O ensaio foi realizado em triplicata e os dados foram analisados no *software* OriginPro8.1. Para os dados de determinação de Kd utilizamos o modelo Hill1 (OriginPro 8.1).

3.8 Supressão de Fluorescência do ANS (ANS *fluorescence quenching*)

Foi realizada também a padronização do experimento de supressão de fluorescência da sonda 8-anilino-1-naftalenosulfônico (ANS) para o hPPAR δ LBD, a fim de selecionar compostos que interajam com o sítio hidrofóbico do receptor, como já foi descrito para o receptor PPAR γ (RIBEIRO FILHO et al., 2018; ZORRILLA; GARZÓN; PÉREZ-SALA, 2010).

A interação do ANS com proteínas ocorre principalmente pelo pareamento iônico entre grupos sulfonatos da sonda e os aminoácidos carregados positivamente (Histidina, Lisina ou Arginina) da proteína (MATULIS; LOVRIEN, 1998). Devido a esta interação, a sonda ANS pode ser utilizada em experimentos para mostrar possíveis interações entre regiões hidrofóbicas do sítio do PPAR β/δ com diferentes ligantes. O sítio de ligação do hPPAR δ LBD consiste em três “braços”, sendo que partes hidrofóbicas dos ligantes interagem com resíduos hidrofóbicos nos braços II (*tail up pocket*) e III (região de entrada do bolsão, *tail down pocket*). Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes no sítio de ligação do PPAR β/δ são Ile249, Leu255, Trp264, Val281, Leu339, Val341, Val328, Leu353, Ile364, Thr288, The292, Leu330, Ile333, Ala342 (MARKT et al., 2007). Existem também Histidinas, Lisinas e Argininas próximas ao sítio de ligação ao ligante (Lys260, Lys336, Lys358, Lys367, Lys457, Lys458, Arg284, Arg350, Arg354, Arg357, Arg455, His250, His280, His323, His449 e His466), proporcionando um ambiente receptivo para a possível ligação do ANS (Figura 13).

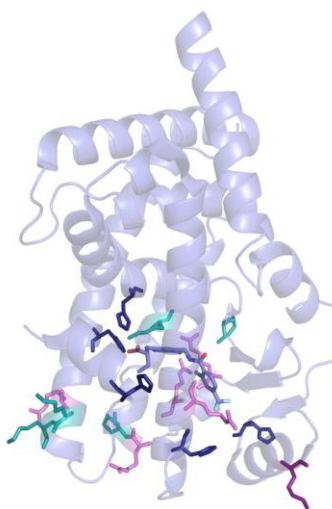


Figura 13. Estrutura do PPAR β/δ (PDB ID 2ZNQ) com destaque para os resíduos de aminoácidos Histidina, Arginina e Lisina que podem interagir com o ANS. O ligante é apresentado em *sticks* azuis, Arg estão em rosa, Lys estão em verde e, His em azul marinho, esses resíduos estão envolvidos por resíduos hidrofóbicos, indicando alguns possíveis locais de ligação para ANS.

A presença desses aminoácidos hidrofóbicos permite a interação com a sonda ANS (Figura 14), que é excitada em 360 nm, resultando em uma emissão com o máximo em torno de 545 nm. Na presença de compostos que interajam com o sítio de ligação ao ligante do receptor, dependendo da sua concentração, ocorre a formação de complexos proteína-composto e a supressão estática da emissão de luz do ANS ao ser deslocado do sítio do receptor. O ANS livre em solução sofre mudanças nos padrões de interações iônicas, diminuindo a intensidade da fluorescência emitida (MATULIS; LOVRIEN, 1998).

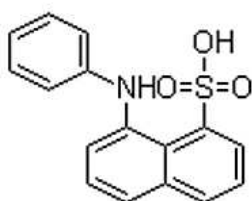


Figura 14. Estrutura química da molécula de ANS. Disponível em: www.chemblink.com/product/82-76-8.html

As condições para o teste ANS foram otimizadas em termos de proteínas e concentrações de ANS, a fim de definir se a supressão da fluorescência do ANS foi realmente promovida pela ligação do ligante no LBD do PPAR β/δ . Variamos as concentrações de hPPAR δ LBD de 0,25 μ M a 2 μ M, e de ANS de 5 μ M a 20 μ M.

Numa microplaca preta de 96 poços (Greiner Bio-One), 2 μ M de hPPAR δ LBD e 20 μ M de ANS foram incubados em 20 mM de HEPES pH 7,5, 200 mM de NaCl e 5% de glicerol, a 4 °C. Após 1 hora, os compostos ou extratos foram adicionados à mistura. Para os agonistas comerciais (GW0742, GW501616, Bezafibrato e L,165-041), utilizou-se 0,3 μ M (0,0001 μ g/mL), 0,5 μ M (0,0002 μ g/mL), 1 μ M (0,0004 μ g/mL), 3 μ M (0,001 μ g/mL), 5 μ M (0,002 μ g/mL), concentrações de 10 μ M (0,004 μ g/mL), 30 μ M (0,01 μ g/mL) e 50 μ M (0,02 μ g/mL); para os extratos, concentrações de 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 30 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 300 μ g/mL, 500 μ g/mL e 1 mg/mL. O ensaio foi lido no leitor de placas EnSpire® multimode (Perkin Elmer) com excitação de 380 nm varredura de emissão entre 400-600 nm, a 25 °C. As intensidades máximas de emissão de fluorescência (480 nm) foram colocadas em um gráfico em relação a cada concentração de composto/extrato para o cálculo constante de afinidade, no OriginPro 8.0, por meio do ajuste sigmoidal Hill1.

3.9 Compostos de colaboradores

Compostos dos seguintes colaboradores foram submetidos ao nosso *pipeline* e foram triados manualmente. Compostos dos tópicos 1 a 4 também foram utilizados em um projeto de colaboração com outros membros do nosso grupo para triagem de ligantes para o PPAR γ (RIBEIRO FILHO et al., 2018). As informações sobre as estruturas dos compostos não nos foram fornecidas por questão de sigilo.

1) 69 compostos, dentre eles Sulfonamidas, Sulfoniluréias, Hidrazonas, Oxadiazóis, Chalconas e Tiazolidinonas do Laboratório de Estrutura e Atividade do Prof. Dr. Ricardo José Nunes do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (APÊNDICE A – informações de peso molecular).

2) 6 compostos derivados de goniitolamida do Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Desses compostos não nos foram fornecidas informações de estrutura por questão de sigilo.

3) 5 compostos comerciais cedidos pelo Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) (DA SILVA et al., 2013).

4) Goniitolamina (GNT), derivado de um metabólito secundário de plantas do gênero *Goniothalamus* (Annonaceae) cedida pelo Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (VENDRAMINI-COSTA et al., 2010).

5) 24 compostos (AF-1 a AF-16, Ber A6, A, B, C, D, E, F e G) cedidos pelo Prof. Dr. Hélio A. Stefani da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). Desses compostos não nos foram fornecidas informações de estrutura por questão de sigilo.

6) 6 compostos derivados do produto natural Espilantol (AN1, AN3, AN5, AN6, AN7, AN11) cedidos pelo Prof. Dr. Júlio Pastre do Departamento de Química Orgânica da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e de seu aluno de doutorado Luiz Novaes. O epilantol é encontrado no extrato do jambu e a maioria dos estudos sobre a atividade biológica foi feita com o extrato bruto. O epilantol é conhecido como o botox de uso tópico, com atividade anti-inflamatória. Desses compostos não nos foram fornecidas informações de estrutura por questão de sigilo.

7) 10 compostos derivados do produto natural Cenocladamida (CF3, CF5, CF13, CF16, CF20, CF21, CF22, CF23, CF24, CF26) cedidos pelo Prof. Dr. Júlio Pastre do Departamento de Química Orgânica da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e de seu aluno de doutorado Luiz Novaes. A cenocladamida foi isolada de uma pimenteira.

Recentemente, foi publicado um trabalho sobre atividade anti-tumoral em câncer de mama (SANTOS et al., 2017).

3.10 Bibliotecas

3.10.1 Biblioteca *Phytobios*

A biblioteca *Phytobios* foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Produtos Naturais (LQPN) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio / CNPEM) em parceria com a *Phytobios Ltda*, que planejou e montou a biblioteca. A biblioteca *Phytobios/LNBio* regularmente extraiu amostras de plantas da: Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. Cada amostra está acompanhada pela localização de coleta registrada por GPS; identificação de plantas por um taxonomista botânico qualificado e um depósito de testemunho exsicata em um herbário certificado. Cada coleção contém pelo menos 5 kg de folhas (e/ou raízes e ou cascas). Após o processamento, cada amostra forneceu cerca de 20 g de extrato seco, suficiente para repetições de teste, e cada amostra foi fracionada em 9 frações cromatográficas e imediatamente transferida para placas de 384 poços na concentração de estoque de 10 mg/mL, em 100% de DMSO, e congelada em freezer -20°C. Portanto, 10 (dez) amostras = 9 frações + extrato bruto estavam disponíveis para teste. Este processamento permite o acesso a baixas concentrações e ainda a substâncias bioativas desconhecidas, geralmente escondidas pelas substâncias majoritárias. Todas as amostras foram submetidas à análise por espectrometria de massa e técnica de rede molecular (dados não mostrados). Por se tratar de uma parceria entre o LNBio e a empresa *Phytobios*, as informações a respeito das espécies utilizadas encontram-se em sigilo.

A biblioteca testada continha 560 extratos hidroalcoólicos de plantas brasileiras reunidas em duas 384 microplacas: placas P1a e P2a. Antes da triagem, os extratos foram transferidos para placas-filha com a utilização de pipetadores automáticos Janus Varispan e Janus MDT do Laboratório de Desenvolvimento de Ensaio Enzimáticos (LDEE) do LNBio, e diluídos para 1 mg/mL, em 100% de DMSO. As colunas 1, 2, 23 e 24 das placas-filha estavam vazias e os controles positivo e negativo foram preenchidos nas placas de triagem.

Em ambas as placas há quatro colunas destinadas aos controles. Portanto a placa P1a apresenta 320 extratos. A placa P2a apresenta apenas 15 colunas com extratos, totalizando 240 extratos. Como o ensaio de transativação foi realizado em microplacas de 96 poços, cada placa da biblioteca *Phytobios* corresponde a quatro microplacas de triagem, ou seja, cada

quadrante da biblioteca corresponde a uma microplaca do ensaio de transativação. Totalizando oito microplacas de 96 poços para triagem. Os quadrantes são denominados de acordo com o eixo Z, ou seja, Q1 corresponde ao quadrante iniciado em A1, Q2 ao iniciado em A2, Q3 ao iniciado em B1, Q4 ao iniciado em B2.

Foram realizados testes em pequena escala (apenas com o quadrante Q1 da placa P1a) para determinação da concentração da biblioteca a ser utilizada em ensaios celulares, pois havia a possibilidade de as concentrações mais elevadas serem tóxicas para as células. Foram testadas as concentrações estoque de 10 mg/mL, 1 mg/mL e 0,1 mg/mL. Para avaliação da citotoxicidade aparente dos extratos foi utilizado o parâmetro indireto do ‘valor de *Renilla*’ descrito no tópico “4.1.4 Parâmetro de citotoxicidade aparente”. A triagem foi realizada com a concentração estoque de 1 mg/mL (concentração final de 0,01 mg/mL).

3.10.2 Biblioteca NIH- NCC

Os *subsets* NIH Clinical Collection (NCC-104) e NIH Clinical Collection 2 (NCC-201) foram adquiridos pelo Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, Campinas, SP) em 2012, totalizando 719 pequenas moléculas já utilizadas em testes Clínicos em humanos. Os *subsets* NIH-NCC fazem parte da biblioteca *NIH Small Molecule Repository* (SMR) do programa *NIH Common Found Molecular Libraries* (<https://commonfund.nih.gov/molecularlibraries/tools>), mantido pelo contrato de governo *US Government HHSN271201200003I* e administrado pelo *National Institutes of Health, Department of Health and Human Services*. Esta biblioteca nos foi entregue no formato de placas de 96 poços, sendo 6 placas da biblioteca NCC-104 e 4 placas da biblioteca NCC-201. As linhas 08, 09, 10 e 11 da placa 104-01 e as linhas 07, 08, 09, 10 e 11 da placa 201-04 estavam sem compostos e seu sinal de leitura foi desconsiderado. A triagem foi realizada na concentração final de 1 μ M.

3.10.3 Biblioteca TimTec NDL-3,000

A biblioteca TimTec NDL-3,000 (*Natural Products Derivatives Library*) da empresa TimTec LLC (Newark, Delaware, USA) possui 3.039 compostos, que abrangem desde moléculas naturais a compostos sintéticos (derivados ou análogos de produtos naturais, semi-naturais ou miméticos). O mapa da biblioteca e a sequência *SMILES* da molécula foram cedidos pelo pesquisador Dr. Artur Cordeiro que possui a biblioteca em seu laboratório no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, Campinas, SP). As 80 moléculas selecionadas no *virtual*

screening com o *software* Surflex 3.06 (BioPharmics LLC) foram cedidas pelo Dr. Artur Cordeiro e aliquotadas em placa de 384 poços com o equipamento JANUS® G3 Varispan Automated Workstation (Perkin Elmer) do Laboratório de Desenvolvimento de Ensaios Enzimáticos (LDEE/LNBio). A triagem foi realizada na concentração final de 1 μ M.

3.11 Virtual Screening e Molecular Docking

O ensaio de *virtual screening* (VS) da biblioteca TimTec NDL-3,000 contra o PPAR β/δ utilizando-se o programa Surflex 3.06 (BioPharmics LLC) foi realizado no Laboratório de Biologia Computacional (LBC) do LNBio com auxílio do Dr. José Geraldo de Carvalho Pereira, do João Victor da Silva Guerra e do Dr. Paulo Sérgio Lopes de Oliveira.

O VS pode ser realizado utilizando uma abordagem baseada em ligante (*ligand-based*) ou em estrutura (*structure-based*). No caso do PPAR β/δ , como existem estruturas cristalográficas do receptor na presença de ligantes, a abordagem baseada de estrutura é a mais adequada para determinar interações que possam ocorrer com qualquer molécula presente em uma biblioteca de ligantes. Para este tipo de abordagem, o método de *docking* molecular é um dos mais utilizados desde os anos 80 (LEWIS; BASSAGANYA-RIERA; BEVAN, 2010; MENG et al., 2011).

O VS, que incorpora técnicas de *docking* molecular em larga escala, é um meio para explorar, em nível atômico, o LBP de uma proteína e fazer previsões sobre a ligação dos ligantes. Esta técnica classifica por pontuação os ligantes que se ligam à proteína de interesse, e também permite que se façam previsões sobre a capacidade de ativação ou inibição da proteína pelo ligante (LEWIS; BASSAGANYA-RIERA; BEVAN, 2010).

O processo de *docking* envolve duas etapas básicas: a previsão da conformação do ligante, bem como sua posição e orientação dentro do sítio (geralmente referida como pose), e a avaliação da afinidade de ligação por meio de esquemas de pontuação (*score*) (LEWIS; BASSAGANYA-RIERA; BEVAN, 2010; MENG et al., 2011).

3.11.1 Programa de docking: Surflex

O programa Surflex 3.06 (BioPharmics LLC) (disponível em <http://www.jainlab.org/downloads.html>) é um algoritmo de *docking* molecular completamente automático que combina a função de pontuação do sistema de *docking* do Hamerhead com um mecanismo de busca que utiliza um método de similaridade molecular baseado em superfície (JAIN, 2003, 2007, 2009). Basicamente, o método é guiado pela representação de um ligante

idealizado (chamado de protomol) no sítio ativo. O protomol serve mimetizar as interações de um ligante que se encaixa perfeitamente no sítio ativo da proteína de interesse para o *docking*. O Surflex-Dock utiliza um algoritmo baseado em similaridade molecular para gerar possíveis alinhamentos de fragmentos de um ligante de teste dentro do protomol. As possíveis posições dos fragmentos são otimizadas, até que se consiga elaborar uma pose ótima (com elevado *score*) para todo o ligante. No final, o programa retorna um número fixo de poses do mais elevado *score* (JAIN, 2009).

A função de *score* utilizada pelo Surflex, também utilizada pelo seu predecessor Hammerhead, é fundamentada em conhecimento e em física, e é baseada na abordagem de Bohm (Bohm's approach). Esta abordagem utiliza termos para contatos hidrofóbicos, interações polares, custos de fixação entrópica para a perda de graus de liberdade torsional, translacional e rotacional (JAIN, 2007).

Para estudos de re-*docking* de ligantes conhecidos, em 75-85% dos casos, a pose correta está entre as Top 20 (JAIN, 2009). Este programa já foi utilizado anteriormente para *docking* de ligantes nos outros isotipos de PPAR (CLEVES; JAIN, 2015a, 2015b), e foi selecionado neste trabalho para o VS de ligantes para o PPAR β/δ .

3.11.2 Preparo das moléculas

A partir da tabela de informações da biblioteca TimTec NDL-3,000, foram obtidas o formato de representação SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specifications*) das moléculas da biblioteca TimTec. Utilizando o programa MarvinSketch (ChemAxon), foram geradas conformações iniciais tridimensionais dessas moléculas e a conformação de menor energia de cada uma delas foi salva em formato "mol2" para ser utilizada no *docking*. Os íons foram removidos das estruturas. Durante a preparação das moléculas da biblioteca, foram removidas 11 moléculas que não possuíam sequência SMILES definida na planilha de dados da biblioteca, restando 3028 moléculas para a realização do VS.

As estruturas mol2 dos agonistas comerciais GW0742, GW501516, L-165,041 e Bezafibrato foram obtidas pelo programa Marvin Beans 16.10.10.0 da Marvin Suite (ChemAxon) por meio do respectivo número CAS.

3.11.3 Preparo das proteínas

No caso dos PPAR, o sítio de ligação para agonistas e antagonistas é o LBD da proteína, e existem estruturas de PPAR co-cristalizadas com ligantes, o que aumenta

significativamente a eficiência do *docking*. Alguns estudos de VS de ligantes de PPAR utilizando *molecular docking* já foram realizados, permitindo a seleção de algumas moléculas que foram confirmadas em ensaios *in vitro* (DA SILVA et al., 2013; LEWIS et al., 2015; MALTAROLLO et al., 2015).

Foram selecionadas todas as estruturas de PPAR β/δ humano com resolução maior que 2,5Å depositadas no PDB (*Protein Data Bank*) até março de 2016, totalizando 20 estruturas (Tabela 1).

Tabela 1. Estruturas do PPAR β/δ humano depositadas no PDB e selecionados para o ensaio de *virtual screening*

1GWX	2GWX	2ZNP	3GWX
1Y0S	2J14	2ZNQ	3GZ9
2AWH	2Q5G	3D5F	3PEQ
2B50H	2XYJ	3DY6	3SP9
2BAW	2XYX	3ET2	3TKM

Os receptores foram preparados utilizando o programa Surflex 3.06 (BioPharmics LLC). Essas estruturas foram separadas por cadeia utilizando-se o comando ‘grindpdb’ do *software*, totalizando 48 cadeias, ou seja, 48 receptores. A preparação envolve a remoção de águas e ligantes e a adição dos átomos de hidrogênios.

O uso de múltiplos receptores durante o *docking*, sobretudo estruturas resolvidas com ligantes, aumenta a confiabilidade do método pois permite a análise de diferentes conformações da estrutura da proteína (JAIN, 2009; LEWIS; BASSAGANYA-RIERA; BEVAN, 2010). Com o comando ‘prism_align_all’ do programa Surflex realizamos o alinhamento estrutural das 48 cadeias de PPAR β/δ .

3.11.4 *Virtual screening*

Preparamos um *shell script* no linux para automatizar o procedimento de *docking* dos ligantes. Foi dado um comando para realização do VS utilizando-se o parâmetro ‘pscreen’ do *software* Surflex 3.06 (BioPharmics LLC). O ‘pscreen’ é um parâmetro da função de busca que define padrões para os algoritmos que tornam o *docking* mais rápido. Foi realizado o *docking* de cada uma das 3028 estruturas da biblioteca TimTec NDL-3,000 e dos 4 agonistas comerciais (GW0742, GW501516, L-165,041 e Bezafibrato) contra uma lista com as 48 cadeias do receptor, utilizando-se o servidor LBI (2 processadores Xeon X5650, totalizando 24 threads,

e 48MB de ram) do LNBio. Após 4 dias, o VS terminou, gerando um arquivo com as 3 melhores poses da molécula e seus respectivos *scores*, sem identificar contra qual estrutura foi obtida a pose. Como o valor de *score* relaciona-se com o valor de pKd ($score = -\log(Kd)^2$, (JAIN, 2003), o critério adotado para seleção foi a ocorrência de um *score* maior que 7,00, que indicaria que a molécula poderia ter um Kd na ordem de micromolar ($10^{-7}M$).

Foi realizado um segundo VS com as moléculas selecionadas na etapa anterior. Desta vez foi realizado um *docking* individual de cada uma das moléculas da biblioteca contra cada uma das estruturas de PPAR β/δ com o comando ‘pscreen’ no servidor LBI do LNBio. O critério de seleção levou em consideração os *scores* das moléculas em relação a todas as estruturas analisadas, selecionando moléculas cujo *score* mediano (dentre todos os 48 scores obtidos) fosse maior que 7,00.

Para melhor visualização da distribuição dos *scores* entre as conformações foram construídos gráficos ‘box plot’ utilizando-se o *software* Mathematica (Wolfram).

3.11.5 Análise de cavidades

As cavidades das cadeias de PPAR β/δ (c0p29l0, c0p23l0, c0p18l1 e c0p4l1) foram analisadas com a ajuda do João Victor da Silva Guerra do LBC utilizando-se o *software* KVFinder desenvolvido no LNBio/CNPEM (disponível em <http://lnbio.cnpem.br/facilities/bioinformatics/software-2/>) (OLIVEIRA et al., 2014).

3.12 Proliferação celular de queratinócitos

Para investigar os efeitos de ligantes dos de PPAR β/δ e outros tratamentos na proliferação celular de queratinócitos humanos HaCaT, foi utilizado o kit Click-iT™ EdU Microplate Assay (Invitrogen/Thermo Fisher). Este kit quantifica a proliferação das células pela incorporação nas novas fitas de DNA de um análogo de desoxirribonucleosídeo que contém uma *tag*, facilitando sua identificação por anticorpos. Neste kit é utilizado o EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), um derivado de timidina que é incorporado ao DNA durante a síntese de novas fitas.

Para HaCaT, 2.000 células foram semeadas em uma microplaca preta com fundo transparente de 96 poços (Costar® 3603, Corning) com 100 μL do meio DMEM Glutamax 10% FBS. Após 24h, 0,5 - 5 μM de GW0742, GW501516, L-165,041 e do antagonista GSK0660 foram adicionados em meio DMEM Glutamax 2% FBS. O DMSO foi usado como controle negativo (veículo). Após 64 h de tratamento, foram adicionados 10 μL de 1:100 EdU aos poços.

Após uma incubação de 3h, o ensaio Click-iT™ EdU Microplate Assay foi feito de acordo com o protocolo do fabricante. Três experimentos independentes foram realizados, cada um com três replicatas para cada condição. A fluorescência foi medida com um leitor de placas Safire2™ multimode (Thermo Fisher).

Para verificar a ativação do PPAR β/δ com os tratamentos, células foram semeadas em placas de 6 poços, tratadas com os ligantes como descrito acima e colhidas para extração de RNA após 48 h de tratamento. Com essas amostras, foi realizado um qPCR com o gene alvo do PPAR β/δ , PLIN2, conforme descrito no tópico de “3.17 Análise da Expressão Gênica”. Os ensaios funcionais foram realizados em duplicatas biológicas para cada experimento.

Este experimento foi realizado durante estágio BEPE-FAPESP (#2016/16476-2) no laboratório da Dra. Michalik no Centro de Genômica Integrativa (CIG) da Universidade de Lausanne, em Lausanne na Suíça.

3.13 Diferenciação de queratinócitos

O objetivo deste ensaio foi definir um protocolo para induzir a diferenciação dos queratinócitos em cultura em monocamada. Alguns estudos mostraram que as células HaCaT tendem a se diferenciar quando cultivadas 100% confluentes e na presença de cálcio (BOUKAMP et al., 1988; MICALLEF et al., 2009). No laboratório da Dra. Michalik, onde parte deste trabalho foi realizado durante intercâmbio (Projeto BEPE Fapesp #2016/16476-2), foi observado que as células HaCaT podem ser cultivadas em meio sem cálcio e com 1,8 mM de Ca⁺⁺ (meio DMEM normal) sem aumento nos marcadores de diferenciação e sem alterações observadas no fenótipo (dados não mostrados), caso sejam cultivadas sem atingir 100% de confluência. Como não foram observadas diferenças entre o uso do meio DMEM sem cálcio e com 1,8 mM de Ca⁺⁺ em relação à expressão dos marcadores de diferenciação e à proliferação, foi decidido utilizar o meio com cálcio por ser um dos mais utilizados para cultivo de HaCaT na literatura.

No primeiro protocolo testado, foi avaliada a influência dos agonistas de PPAR β/δ GW0742 e L-165,041 na expressão dos marcadores de diferenciação queratina 14 (K14), queratina 1 (K1) e involucrina (IVL) em células HaCaT em processo de diferenciação, após atingirem a confluência total (Figura 15). Dois milhões de células de HaCaT foram semeadas em uma placa de 6 poços com DMEM 10% de FBS. O RNA das células foi coletado para posterior análise da expressão gênica em dois pontos de confluência, 80% e 100%. Células 100% confluentes foram tratadas com DMEM suplementado com 2% FBS e 0,5 μ M de

GW0742 ou L-156,041 e o DMSO foi utilizado como controle (veículo) (Dia 1). O RNA das células tratadas foi coletado no Dia 3 (após 72h de incubação com os ligantes). Além disso, no Dia 3, meio de cultura novo (com DMEM suplementado com 2% FBS e 0,5 μ M de GW0742 ou L-156,041, ou veículo) foi adicionado nas células que seriam coletadas no Dia 6, após 144h de incubação com os ligantes.

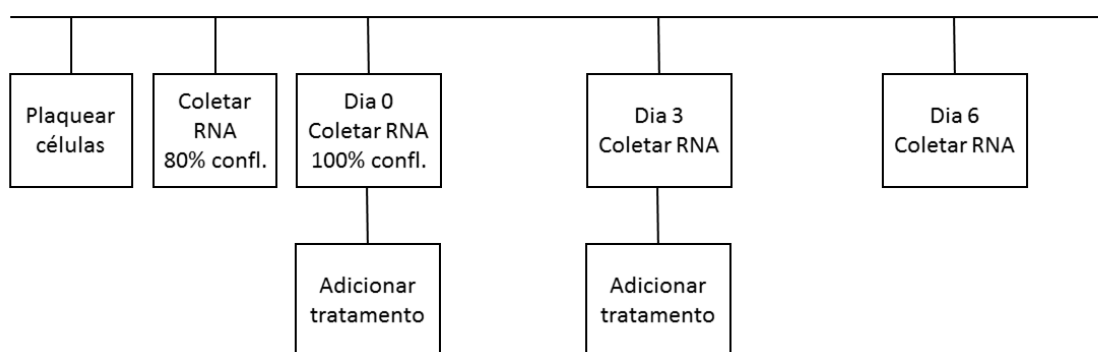


Figura 15. Esquema do protocolo 1 de diferenciação de células HaCaT. O RNA das células HaCaT foi extraído após 80% e 100% de confluência e após 3 e 6 dias de tratamento com DMEM suplementado com 2% FBS e 0,5 μ M de GW0742 ou L-156,041, ou veículo.

Para investigar um possível efeito de ligantes de PPAR β/δ antes que as células começassem a se diferenciar, em um segundo protocolo, 2 x 10⁵ células de HaCaT foram semeadas em uma placa de 6 poços com DMEM 10% de FBS. Com 40% de confluência, o meio foi trocado para DMEM suplementado com 5% FBS e 0,5 μ M de GW0742 ou L-156,041. DMSO foi utilizado como controle (veículo). Com 80% e 100% de confluência, as células tratadas foram coletadas para análises de expressão de RNA dos marcadores de diferenciação (K14, K1 e IVL) (Figura 16). Foram realizados dois experimentos independentes com três replicatas para cada condição.

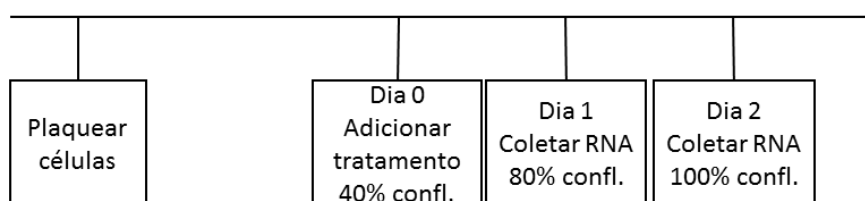


Figura 16. Esquema do protocolo 2 de diferenciação de células HaCaT. Células com 40% de confluência foram tratadas com DMEM suplementado com 2% FBS e 0,5 μ M de GW0742 ou L-156,041, ou veículo. O RNA foi extraído após 80% e 100% de confluência.

Este experimento foi realizado durante estágio BEPE-FAPESP (#2016/16476-2) no laboratório da Dra. Michalik no Centro de Genômica Integrativa (CIG) da Universidade de Lausanne, em Lausanne na Suíça.

3.14 Ensaio de migração celular (*scratch assay*)

O ensaio *scratch assay* é muito utilizado para estudos da migração celular e também para validar compostos que possam interferir no processo migratório de regeneração celular (YARROW et al., 2004).

Para abordar a modulação de HaCaT por ligantes de PPAR β/δ , 9×10^4 células foram semeadas em uma placa de 12 poços com 1 mL de meio DMEM 10% FBS. Após 24 h, adicionou-se DMEM 2% FBS com os tratamentos específicos (0,5 μ M de GW0742, GW501516 e de L,165-041, e 5 μ M GSK0660) e veículo (DMSO 1:20000) como controle negativo. Após 24 horas de incubação com os tratamentos, uma risca foi feita com a ajuda de uma ponteira p-1000 e uma régua, as células foram lavadas duas vezes com PBS e meio fresco com os tratamentos foi adicionado. Os poços foram fotografados a cada 12 h com um microscópio invertido acoplado com câmeras AxioCam (Zeiss) e estações mecânicas motorizadas SMC 2009 (Märzhäuser Wetzlar), que registraram a posição do ponto fotografado da placa. A migração foi seguida por 48h.

Para verificar a ativação do PPAR β/δ pelos tratamentos, células foram semeadas em placas de 6 poços, tratadas com os ligantes como descrito acima e colhidas para extração de RNA após 48 h de tratamento. Com essas amostras, foi realizado um qPCR com o gene alvo do PPAR β/δ , PDK4, conforme descrito no tópico de “análise da expressão gênica”. Os ensaios funcionais foram realizados em duplicatas biológicas para cada experimento. Este ensaio foi realizado durante o estágio no laboratório da Dra. Michalik, no CIG, Universidade de Lausanne, Suíça.

Foram realizados três experimentos independentes com triplicatas biológicas dentro de um experimento. A análise dos resultados foi realizada com o auxílio do *software* Image J, a partir da medida da área do risco utilizando a fórmula $(A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}})/A_{\text{inicial}} \times 100 = \%$ de fechamento da ferida, sendo A medida da área entre as bordas da ferida.

3.15 Animais e ensaios de cicatrização

Camundongos SV129/BL/6J selvagens (WT) e KO PPAR β / $\delta^{-/-}$ foram alojados em salas com ciclo 12/12h de luz/escurecimento e mantidos com água e comida *ad libitum*. Para experiências de cicatrização de feridas, utilizou-se camundongos fêmeas de 9 a 12 semanas de idade. Os camundongos foram anestesiados, tricotomizados e uma ferida de dorsal médio de espessura total (superfície de 0,5 cm², em forma circular) foi criada por excisão da pele e do *panniculus carnosus* subjacente. Para examinar a expressão de genes no local da lesão, o camundongo foi sacrificado e uma área que inclui as bordas epiteliais completas das feridas foi excisada em cada ponto. Para cada camundongo, a biópsia dorsal tomada no dia 0 foi utilizada como controle saudável da pele. O fechamento da ferida ao longo dos dias não foi quantificado, mas seguiu o padrão observado por Michalik (2001) no qual os camundongos KO PPAR β / $\delta^{-/-}$ apresentaram um atraso no processo de cicatrização. Os experimentos envolvendo animais foram aprovadas pelo Escritório Veterinário do Cantão de Vaud (Suíça) de acordo com as Diretrizes Federais do Serviço Veterinário Suíço e estão em conformidade com a Diretiva da Comissão Europeia 86/609/EEC (ANEXO A). Este experimento foi realizado durante estágio BEPE-FAPESP no laboratório da Dra. Michalik no Centro de Genômica Integrativa (CIG) da Universidade de Lausanne, na Suíça.

3.16 Análise banco de dados de expressão gênica

Um conjunto de dados de *microarrays* murino com número de amostras razoavelmente alto e bom desenho experimental (GSE35322) foi selecionado no banco de dados Gene Expression Omnibus – GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, acessado em 13 de outubro de 2017). Analisamos a expressão de PPAR β , COL3A1, TGF β , FABP4, PDK4, PLIN2 em pele jovem (5 meses) e envelhecida (30 meses) de cauda de camundongo usando a ferramenta GEO2R (BARRETT et al., 2012). O *dataset* GSE35322 foi analisado com um teste de one-way Anova, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey nos valores de expressão transformados em log2 para avaliar se a expressão gênica diferiu significativamente entre os dois grupos.

3.17 Análise da Expressão Gênica

3.17.1 Extração de RNA

Para amostras de pele de camundongos, a extração de RNA foi realizada em amostras congeladas de pele normal e da ferida. As amostras de pele foram colocadas em tubos MACS M genéricos (Miltenyi Biotec) com 1 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific), o tecido foi dissociado com gentleMACS™ Dissociator por 30 s e transferido para um microtubo de 1,5 mL. A extração de RNA foi realizada seguindo o protocolo geral (descrito abaixo).

Para células HaCaT, a extração de RNA foi realizada com o protocolo TRIzol (Thermo Fisher Scientific) ou peqGOLD TriFast (Pepqlab). As células foram colhidas com um raspador e 1 mL de TRIzol ou Trifast por poço de uma placa de 6 poços (34,8 mm de diâmetro) e transferidas para um microtubo de 1,5 ml.

As amostras em microtubos foram incubadas 5 min à temperatura ambiente para a dissociação de complexos nucleoproteicos, depois 150 µL de BCP (1,3-bromocloropropano) (por 1 mL de TRIzol / Trifast). Os tubos foram invertidos 15X, incubados 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugados 30 min a 4 °C, 9400 rcf. A fase aquosa (~400 µL) foi transferida para um novo microtubo no gelo, foram adicionados 600 µL de Isopropanol gelado (por 1 mL de TRIzol / Trifast). Os tubos foram incubados 2h em -20 ° C para uma melhor precipitação de RNA. Depois, os tubos foram incubados 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugados 30 min a 4 °C, 11.000 rcf. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 mL de etanol 75% gelado aos tubos, que foram agitados por vortex durante 5 s e centrifugados por 15 min a 4 °C, 7400 rcf. Este último passo de lavagem foi repetido. O sobrenadante foi removido e os tubos foram deixados abertos invertidos em papel de toalha durante 15 min. Foram adicionados 20 µL de H₂O livre de nucleases, mantendo os tubos no gelo. O rendimento de RNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Scientific™).

3.17.2 Síntese de cDNA

Todas as reações de síntese de cDNA foram realizadas seguindo as instruções do fabricante. Para amostras de pele de camundongos, a síntese de cDNA foi realizada com 0,5-1 µg de RNA usando *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* para RT-qPCR (Thermo Fisher). O cDNA final foi diluído 20x em H₂O livre de nuclease.

Para análises de RNA de células HaCaT, a síntese de cDNA foi realizada com 0,5-1 µg de RNA usando GoScript™ (Promega) ou iScript™ (Bio Rad). O cDNA final foi diluído 20x em H₂O livre de nucleases.

3.17.3 qPCR em tempo real

Para análises de expressão de mRNA de HaCaT e de animais por qPCR, foram utilizados GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 5 µL de cDNA diluído e 200 nM do mix de *primers* (F: R) ou 300 nM quando utilizados *primers* Qiagen, volume final de 20 µL. A reação também foi realizada com volume final de 10 µL (e metade do volume de todos os reagentes). As placas qPCR foram colocadas em uma máquina Stratagene MX3005P (Agilent Technologies) por 5 minutos a 95 °C, seguidas por 40 ciclos durante 10 min 95 °C, 15 s 60 °C e, finalmente, 1 min 95 °C, 30 s 55 °C e 30 s 95 °C. O qPCR foi realizado com duplicatas técnicas para cada amostra. A lista de *primers* pode ser encontrada na Tabela 2 e Tabela 3. Dependendo do experimento e do tipo de célula/tecido, foram utilizados como genes *housekeeping* EEF1a ou RPL27.

Tabela 2. *Primers* utilizados para PCR em experimentos com células HaCaT.

GENE CARDS (UNIPROT ID)	NOME DA PROTEÍNA (UNIPROT)	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
PLIN2 (Q99541)	Perilipin-2	Qiagen - QT00001911	Qiagen - QT00001911
PDK4 (Q16654)	Piruvato desidrogenase quinase 4, mitocondrial (PDK4)	Qiagen - QT00003325	Qiagen - QT00003325
KRT14 (P02533)	Queratina 14 (K14)	ATA TGGG TGG TGG CCT TGG TA	GAG GTT CTG CAT GGT CAC CT
KRT1 (P04264)	Queratina 1 (K1)	GTT CCA GCG TGA GGT TTG TT	TAA GGC TGG GAC AAA TCG AC
IVL (P07476)	Involucrina	GGC CCT CAG ATC GTC TCA TA	CAC CCT CAC CCC ATT AAA GA
MMP1 (P03956)	Colagenase Intestinal	TGGACCAACAATTTTCAGAG AGTACA	AGGGTACATCAAAGCCCCG A
EEF1a (EEF1A1)	Fator de Enlogação 1 alfa	CTG AAC CAT CCA GGC CAA AT	GCC GTG TGG CAA TCC AAT

Tabela 3. *Primers* utilizados para PCR em experimentos *in vivo*.

GENE CARDS (UNIPROT ID)	NOME DA PROTEINA (UNIPROT)	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer reverse</i>
Ppard (P35396)	Receptor Ativador da Proliferação de Peroxisomos delta	CGG CAG CCT CAA CAT GG	AGA TCC GAT CGC ACT TCT CAT AC
Tgfb1 (P04202)	Fator de Transformação do Crescimento Beta 1	GCA GTG GCT GAA CCA AGG A	AGA GCA GTG AGC GCT GAA TC
Mmp1a (Q9EPL5)	Colagenase Intersticial A	Qiagen - QT00138894	Qiagen - QT00138894
Mmp9 (P41245)	Metaloproteinase de matriz 9	Qiagen - QT00108815	Qiagen - QT00108815
Rpl27 (P61358)	Proteína ribossomal 60S L27	CTG GCC TTG CGC TTC AA	TCA TGC CCA CAA GGT ACT CTG T
Colla1 (P11087)	Colágeno tipo I cadeia alfa	Qiagen - QT00162204	Qiagen - QT00162204
Col3a1 (P08121)	Colágeno tipo III cadeia alfa	GAA AGG ATG GAG AGT CAG GAA GAC	GGA GAA CTC GTT AGA GAC GAC TT
Col4a1 (P02463)	Colágeno tipo IV cadeia alfa	Qiagen - QT00100128	Qiagen - QT00100128
Fn1 (P11276)	Fibronectina	CCT ACG GAG AGA CAG GAG GA	TGA TGG TGG CTG TGG ACT TG
Tnf (P06804)	Fator de necrose tumoral alfa	Qiagen - QT00104006	Qiagen - QT00104006

CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PADRONIZAÇÃO DO *PIPELINE* E TRIAGEM DE AGONISTAS PARA O PPAR BETA/DELTA

Neste capítulo serão apresentados resultados da padronização de um conjunto de métodos de triagem de ligantes para o PPAR β/δ e resultados da (i) triagem manual de compostos fornecidos por colaboradores, (ii) triagem semi-automatizada das bibliotecas NIH-NCC e Phytobios, e (iii) *virtual screening* da biblioteca TimTec NDL-3,000.

4.1 Padronização do *pipeline* de triagem

Em geral, os métodos descritos na literatura para triagem de agonistas para PPAR β/δ utilizam apenas o ensaio de transativação (GROVER et al., 2003; MATSUURA et al., 2013; SEIMANDI et al., 2005; TAKACS; ABBOTT, 2007; XIA et al., 2013). Este método pode permitir a seleção de compostos falso-positivos que possam ativar de forma indireta o PPAR β/δ , sem propriedades agonistas. Para superar esta lacuna, neste trabalho foi desenvolvido um *pipeline* mais completo para pesquisar e caracterizar os agonistas PPAR β/δ , utilizando experimentos que verificam a ativação do receptor, a estabilização da estrutura terciária e que permitem o cálculo da constante de afinidade entre o receptor e o ligante (Figura 17).

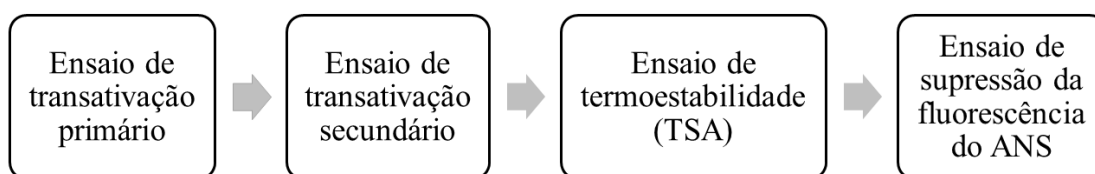


Figura 17. Fluxograma com todas as etapas do *pipeline* de triagem de agonistas para o PPAR β/δ . Primeiro a realização de um ensaio de transativação primário para seleção de candidatos a *hits*, seguido por um ensaio de transativação secundário realizado em triplicata para confirmação dos *hits* selecionados. Em seguida, esses *hits* são submetidos a um ensaio de *Thermal Shift Assay* (TSA) para seleção de compostos que estabilizem a estrutura terciária do LBD do PPAR β/δ . No último passo, é calculada uma constante de afinidade aparente entre o *hit* e o receptor por meio do ensaio de supressão da fluorescência do ANS.

4.1.1 Justificativa dos métodos escolhidos para o *pipeline* de triagem

O primeiro passo deste conjunto de experimentos é uma triagem primária com um ensaio de transativação, mais rápido e mais barato que os métodos descritos anteriormente (MATSUURA et al., 2013; TAKACS; ABBOTT, 2007; XIA et al., 2013). A triagem primária

é seguida por um ensaio de transativação secundário, realizado em triplicata para confirmação dos *hits* selecionados (Figura 17). Além do ensaio de transativação celular, foram acrescentados ao racional de triagem dois métodos biofísicos, com o objetivo de excluir falso-positivos e selecionar moléculas ou extratos que se liguem diretamente ao PPAR β/δ . O primeiro ensaio biofísico foi o ensaio de *Thermal Shift Assay* (TSA), para verificar a estabilização da estrutura terciária de PPAR β/δ pelos *hits* encontrados, indicando ligação direta à proteína. A terceira metodologia empregada foi o ensaio de supressão de fluorescência da sonda ANS (sonda 8-anilino-1-naftalenosulfônico), para determinar a afinidade do composto/extrato pelo LBD do PPAR β/δ .

A escolha do ensaio de transativação celular com gene repórter como o primeiro passo neste conjunto de métodos permite iniciar a triagem em um ponto de vista mais fisiológico (BAGCHI BHATTACHARJEE; PAUL KHURANA, 2014; LAI; JIANG; LI, 2006), pois para se observar uma resposta de ativação em um ensaio celular, as moléculas ou extratos de teste precisam primeiro permear as membranas celulares, encontrar e ligar ao receptor, para enfim promover sua ativação.

Embora outros métodos, como TSA, ANS e Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET), tenham sido propostos para avaliar a ligação do ligante aos RNs (DESANTIS et al., 2012; HILAL et al., 2010; ZORRILLA; GARZÓN; PÉREZ-SALA, 2010), considera-se que o ensaio de transativação produz informações quantitativas e funcionais em um curto período de tempo, o que o torna um dos mais relevantes métodos para triagem de compostos e descoberta de drogas aplicada a RNs (BAGCHI BHATTACHARJEE; PAUL KHURANA, 2014; LAI; JIANG; LI, 2006).

Os ensaios biofísicos apresentam algumas desvantagens quando utilizados como o primeiro ensaio de triagem. O ensaio de FRET *in vitro* é o mais fácil de configurar com *kits* comerciais, no entanto não se correlaciona bem com as condições celulares (GUNTHER et al., 2009; HILAL et al., 2010). O ensaio de supressão de fluorescência do ANS também é mais barato; entanto, é laborioso e exige tempo para uma triagem HTS, além do fato de ser uma abordagem *in vitro* (JASUJA et al., 2009; ZORRILLA; GARZÓN; PÉREZ-SALA, 2010). Além disso, mesmo que o TSA seja projetado para ser aplicado para triagem de ligantes (DESANTIS et al., 2012; VIVOLI et al., 2014), o ensaio não considera a fluorescência intrínseca de extratos naturais ou a alta hidrofobicidade do LBD do PPAR β/δ , o que pode interferir no sinal de fluorescência. Em resumo, TSA, ANS e FRET compartilham as desvantagens dos ensaios biofísicos: nem sempre correlacionam-se bem com os estudos *in vivo* (LAI; JIANG; LI, 2006).

Em resumo, os ensaios de transativação com gene repórter em cultura de células foram considerados os mais verossimilhantes, pois eles exploram a via de sinalização natural de RNs: quando os ligantes são adicionados ao sistema, o receptor é ativado e há produção consequente de proteína-repórter, o que pode ser quantificado (BAGCHI BHATTACHARJEE; PAUL KHURANA, 2014). Portanto, métodos biofísicos podem e devem ser usados como etapas adicionais na metodologia de triagem, pois fornecem informações importantes para caracterização de *hits* como confirmação de ligação direta (TSA) e avaliação da constante de dissociação (ANS). Esses dois métodos são mais baratos que os kits comerciais de FRET e de Lantha-Screen, que também apresentam a desvantagem de fornecer resultados indiretos utilizando medidas de coativadores (GLICKMAN et al., 2002; LIU et al., 2003; OZERS et al., 2005).

4.1.2 Padronização do ensaio de transativação

O ensaio de transativação celular para PPAR β/δ estava bem estabelecido em nosso grupo para placas de 24 poços. No entanto, esta configuração do ensaio não é adequada para triagem de ligantes de PPAR β/δ em larga escala, pois utiliza um grande volume de reagentes e não permite a semi-automatização / automatização do ensaio. Para tornar este ensaio adequado para campanhas de triagem, optou-se por padronizá-lo para ser realizado em placas de 96 poços, analisando-se diversas condições como: etapa a ser realizada a transfecção, número de células por poço, meio de incubação, e volume de substratos de leitura.

4.1.2.1 Etapa de transfecção

O primeiro ponto a ser padronizado se refere ao momento em que a transfecção das células seria realizada. No ensaio de transativação padronizado em placas 24 poços realizado em nosso laboratório no LNBio, as células são transfectadas um dia após serem plaqueadas. No entanto, este protocolo não seria viável em placas de 96 poços, pois o volume de reagentes necessário para cada poço seria muito pequeno, aumentando o risco de variabilidade entre cada um dos poços da placa em relação a erros de pipetagens ou de calibração das pipetas, sem garantir homogeneização da transfecção entre os poços.

Ao analisar diferentes protocolos de transfecção para ensaios de triagem de ligantes descritos na literatura, foi encontrado um estudo no qual a transfecção era feita individualmente em cada poço da microplaca de triagem (TAKACS; ABBOTT, 2007), o que não foi considerado interessante, dado que não é possível confirmar se todos os poços foram

igualmente transfectados, recebendo a mesma quantidade de DNA. Por outro lado, outros estudos de busca de ligantes de PPAR β/δ (GROVER et al., 2003; MATSUURA et al., 2013; XIA et al., 2013) reportaram a transfecção do DNA em placas de 100 mm previamente ao plaqueamento nas microplacas de triagem. Baseado nesses estudos, a transfecção foi realizada em etapa anterior ao plaqueamento das células nas placas de triagem, deste modo todas as células receberiam o mesmo tratamento de transfecção antes de serem transferidas para a placa de triagem. Dessa forma, seriam evitadas possíveis variações e erros de pipetagem, garantindo um tratamento mais homogêneo às células tratadas em todos os poços da placa.

4.1.2.2 Volumes de substratos de leitura

Em seguida, foi avaliado o menor volume dos substratos para leitura da transativação que poderia ser utilizado mantendo boa discriminação de sinal/ruído. Os volumes de solução recomendados pelo fabricante são 100 μ L de substratos de luciferase (LarII e Stop&Glo®) por poço, no entanto, o uso de 25 μ L de cada substrato para leitura do ensaio de transativação em 24 poços já era prática rotineira em nosso grupo (DA SILVA et al., 2013; FATTORI et al., 2015; RIBEIRO FILHO et al., 2018). Para avaliar o melhor volume de substratos que produziriam o melhor sinal em ensaios em placas de 96 poços, foram testados diferentes volumes das soluções.

Os resultados obtidos na Figura 18A, demonstraram que 25 μ L de cada substrato (LarII e Stop&Glo®) foram suficientes para fornecer alto sinal com boa discriminação entre PPAR β/δ ativado e não ativado em ensaio em placa de 96 poços. Desta forma, foi possível reduzir 75% nos custos e uso de reagentes, sem perda de informação de sinal. Esta redução representa uma grande diminuição nos custos nos ensaios de *medium* e *high throughput screening*, campanhas que costumam triar centenas e milhares de compostos ao mesmo tempo. Os resultados mostram uma clara discriminação entre o sinal da ativação do receptor na presença do agonista comercial GW0742 em relação ao sinal das células não tratadas, confirmando que a escolha desses plasmídeos e a formulação do ensaio é adequada para a triagem de compostos que possam atuar como agonistas do PPAR β/δ .

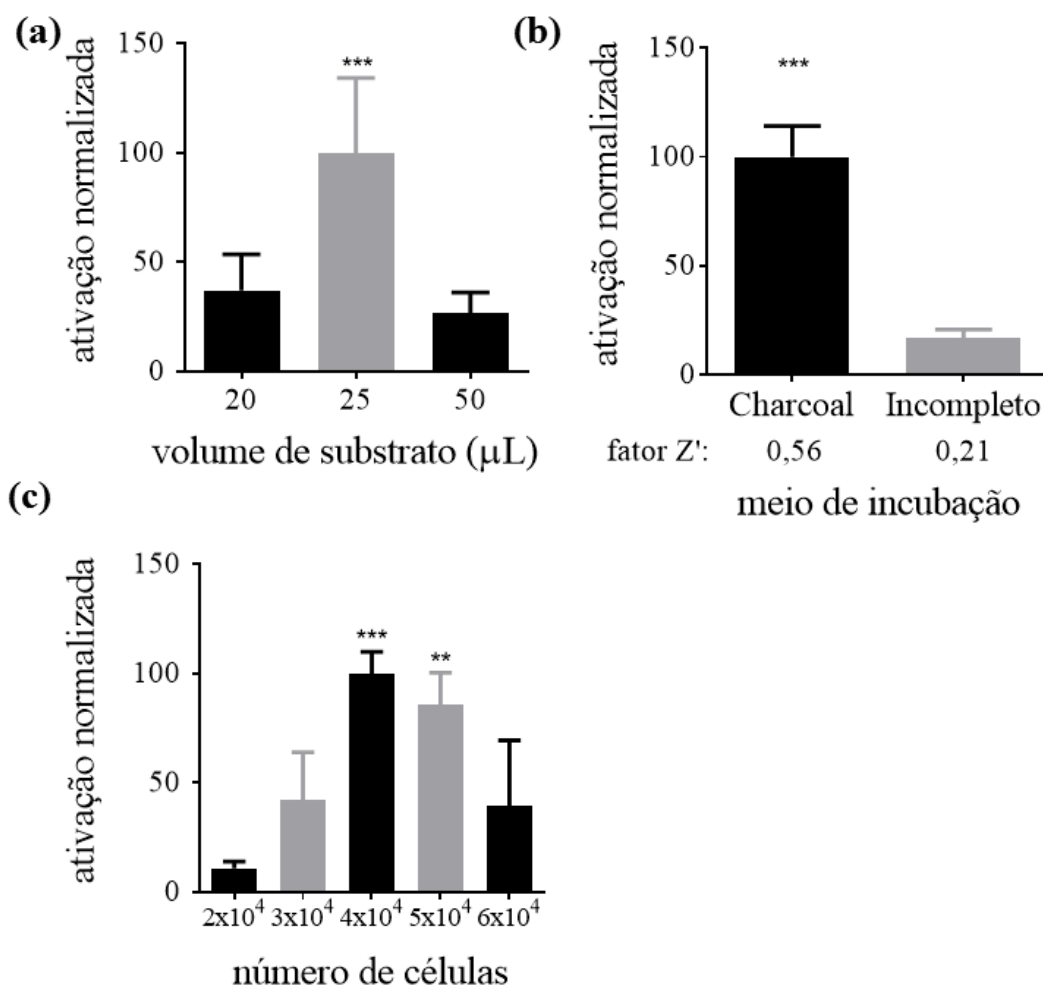


Figura 18. Otimização do protocolo de transativação para screening de ligantes. Quando não especificado, o controle positivo foi 1 μM de GW0742 e o número de células por poço foi 4 x 10⁴. Os gráficos de barras representam o número de vezes de ativação do receptor em relação a mesma condição na ausência do agonista GW0742 normalizada pelo valor de mais alta ativação (100%), e foram apresentadas como média ± SD. Os p valores foram calculados com teste t não-pareado (**p < 0.01, e ***p < 0.001). Todos os gráficos de barras e cálculos foram realizados com GraphPad Prism. A: Avaliação do volume dos substratos. Foi utilizado 20 μL do tampão de lise passiva e os volumes de LarII e Stop&Glo® variaram (50, 25 e 20 μL). Dados de um experimento realizado com 6 replicatas técnicas. B: Avaliação do melhor meio para incubação com os compostos. Neste teste, células 293T foram incubadas com GW0742 em meio DMEM incompleto ou suplementado com 10% FBS Charcoal Stripped. É mostrado 1 experimento representativo de três replicatas experimentais independentes. C: Avaliação do número de células por poço. Células 293T foram semeadas em 2 x 10⁴, 3 x 10⁴, 4 x 10⁴, 5 x 10⁴, 6 x 10⁴ células por poço. É mostrado 1 experimento representativo de três replicatas experimentais independentes.

4.1.2.3 Meio de incubação

O passo seguinte a ser determinado foi a definição do melhor meio utilizado no ensaio para incubação dos compostos, sendo testadas diferentes composições de meio. Como ácidos graxos naturais podem funcionar como ligantes naturais de PPARβ/δ e, como o FBS contém muitos destes ácidos graxos, o meio DMEM suplementado com 10% de FBS pode não ser adequado para a triagem de agonistas de PPARβ/δ (GROVER et al., 2003; MATSUURA et

al., 2013; TAKACS; ABBOTT, 2007). Para superar esta limitação, foi testada a utilização dos meios DMEM sem suplementação e suplementado por FBS Charcoal Stripped para incubação com os compostos / extratos. Os resultados mostraram que o DMEM incompleto (sem soro fetal bovino - FBS) foi considerado inadequado, pois a ativação do GW0742 foi mais baixa e o fator Z' calculado da placa testada estava abaixo do limite de confiabilidade (fator $Z' = 0,21$) (ZHANG, 1999) (Figura 18B). Por outro lado, o ensaio realizado com DMEM suplementado 10% de FBS Charcoal Stripped (FBS delipidado) mostrou uma maior ativação do PPAR β/δ e menor variação dos controles, observada por meio do Fator Z' (0,56). Devido a estes resultados, o DMEM 10% de FBS Charcoal Stripped foi selecionado como meio de incubação para ensaios de triagem de agonistas de PPAR β/δ . O uso do soro delipidado é interessante pois diminui a quantidade de ácidos graxos presentes no meio, que poderiam atuar como ligantes naturais do receptor, mas mantém alguns fatores de crescimento e outras moléculas importantes para manutenção da viabilidade celular.

4.1.2.4 Número de células por poço

Em relação às células utilizadas, ao invés de células Hela ou Cos-1, a linhagem celular 293T, que ainda não tinha sido descrita para ensaios de triagem de ligantes de PPAR β/δ , foi escolhida. Essa linhagem é fácil de cultivar, crescer e transfectar, e uma das linhagens celulares mais relevantes do ponto de vista industrial (CERVERA et al., 2011). Como a linhagem, 293T ainda não havia sido descrita para campanhas de triagem, a quantidade de células a ser utilizada por poço foi avaliada, com base nas quantidades (10.000-40.000) descritas anteriormente para outros tipos de celulares (MATSUURA et al., 2013; SEIMANDI et al., 2005; XIA et al., 2013) (Figura 18C). A maior ativação do PPAR β/δ (199 vezes) foi obtida quando 40.000 células foram semeadas por poço (Figura 18C), dessa forma, essa quantidade foi selecionada por permitir uma alta ativação do receptor, com pouca variabilidade.

4.1.2.5 Semi-automatização do ensaio

Para facilitar a manipulação de diversas placas de triagem, diminuir o tempo gasto com os ensaios e reduzir a variabilidade, o ensaio foi semi-automatizado nas etapas de pipetagem dos compostos de triagem, adição e remoção do meio de cultura e adição dos reagentes de leitura do gene repórter. O ensaio foi semi-automatizado com a utilização dos seguintes itens: multidispensador Thermo Scientific™ Multidrop™ Combi Reagent Dispenser

para dispensar meio de cultura e os reagentes de leitura nas placas; pipetador automático Thermo Scientific™ Versette™ Automated Liquid Handler para dispensar os compostos das bibliotecas nas placas de triagem e para aspirar o meio de cultura no final do ensaio; e CLARIOstar® (BMG Labtech) para leitura da luminescência do ensaio. O desenvolvimento de métodos nesses equipamentos foi realizado com auxílio do Dr. Artur Cordeiro do Laboratório de Desenvolvidos de Ensaio Enzimáticos (LDEE) do LNBio. A semi-automatização do ensaio representa um aumento na confiabilidade e robustez do experimento, e representa uma melhoria se comparado a protocolos anteriores (MATSUURA et al., 2013; SEIMANDI et al., 2005; XIA et al., 2013).

A partir dos experimentos descritos anteriormente foi possível definir um protocolo para realização de transativação em placa de 96 poços. Em resumo, foi padronizado um protocolo semi-automatizado para triagem de ligantes de PPAR β/δ que utiliza 4×10^4 células 293T por poço da microplaca, meio DMEM 10% FBS Charcoal Stripped para incubação, com 75% de redução de substratos de luciferase (25 μ L de LARII e Stop&Glo®). Além disso, o método proposto é de 1 a 2 dias mais rápido que os protocolos relatados na literatura (MATSUURA et al., 2013; TAKACS; ABBOTT, 2007; XIA et al., 2013), ou seja, um maior número de campanhas de triagem poderiam ser realizadas em menor tempo. .

4.1.3 Sensibilidade do ensaio

Como durante as campanhas de triagem de ligantes moléculas ou extratos que ativassem o PPAR β/δ com pouca intensidade poderiam ser encontrados, a sensibilidade do ensaio de transativação foi avaliada, testando-se a ativação provocada por baixas concentrações dos agonistas comerciais GW0742, GW501516 e L-165,041.

Para caracterização do ensaio de transativação PPAR β/δ , foi medida a ativação do receptor por seus agonistas comerciais: GW0742, GW501516, L-165,041 em diferentes concentrações (10^{-11} – 10^{-6} M) em curvas dose resposta (Figura 19). Os agonistas comerciais são compostos puros conhecidos por induzir alta ativação celular do PPAR β/δ (BASSÉNE et al., 2006; BATISTA et al., 2012; OLIVER et al., 2001). No ensaio de transativação padronizado neste trabalho, foi calculado o EC₅₀ para os ligantes comerciais: EC₅₀ GW501516 = 0,71 nM, EC₅₀ GW0742 = 10,87 nM e EC₅₀ L-165,041 = 26,40 nM. Esses resultados estão na mesma escala nanomolar de EC₅₀ encontrada na literatura para esses ligantes: EC₅₀ GW501516 = 1,8 nM (OLIVER et al., 2001), EC₅₀ GW0742 = 1 – 3,5 nM (BATISTA et al., 2012). e EC₅₀ L-165,041 = 125 nM (BASSÉNE et al., 2006).

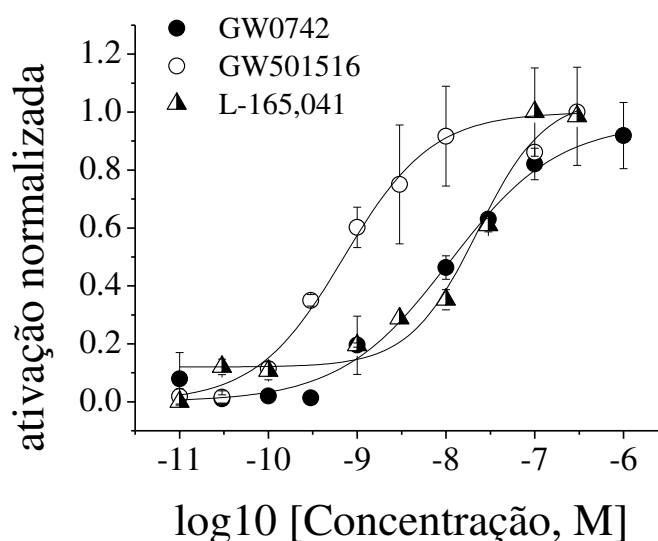


Figura 19. Ativação dose resposta do PPAR β/δ com os agonistas comerciais (GW0742, GW501516, L-165,041). As concentrações variaram de 10^{-11} a 10^{-6} M. Os dados mostrados representam a ativação normalizada de 1 (ativação máxima) a 0 (células tratadas com o veículo), e representam a média de 2 experimentos independentes realizados com 3 replicatas técnicas. Os gráficos e as curvas concentração-resposta foram realizados com o *software* OriginPro 8.0. GW0742: $R^2=0.98549$ e $EC_{50}=1.08708E-8M$; GW601516: $R^2=0.98028$ e $EC_{50}=7.10385E-10M$; L-165,041: $R^2=0.9725$ e $EC_{50}=2.23969E-8M$.

O ensaio padronizado neste trabalho, além de confirmar valores de ativação do PPAR β/δ similares aos encontrados na literatura, ainda foi sensível o suficiente para detectar baixas intensidades de ativação do receptor. Neste caso a baixa intensidade foi provocada por uma pequena concentração do agonista comercial, mas no contexto de triagem de moléculas uma pequena ativação pode ser provocada por moléculas com potencial de serem agonistas de PPAR β/δ , mas que ainda necessitem otimização química para melhorar a afinidade ao receptor.

4.1.4 Parâmetro de citotoxicidade aparente

A expressão do repórter de *Renilla* é comumente utilizada como controle para a eficiência de transfecção (FAN; WOOD, 2007; PAGUIO et al., 2010). Neste trabalho, foi proposta a utilização deste parâmetro para avaliar a citotoxicidade de maneira indireta. Uma vez que as células foram transfectadas em lote antes do plaqueamento nas placas de triagem, a expressão do repórter *Renilla* deve estar na mesma ordem de magnitude entre os poços, e as diminuições neste sinal podem indicar citotoxicidade (PAGUIO et al., 2010). Tendo isso em vista, o esperado é que o sinal da luciferase de *Renilla* (controle de transfecção) seja similar entre cada poço. Ou seja, foi considerado que se o ‘valor de *Renilla*’ para os poços com tratamento possui um sinal baixo em relação ao sinal dos controles positivo e negativo, é porque

o extrato/composto testado foi citotóxico para as células 293T. Esse parâmetro indireto de citotoxicidade foi validado com um ensaio de MTT.

A concentração de GW0742 (1 μ M, 1% de DMSO como veículo) utilizada como controle positivo na triagem, não apresentou diferença estatística (2way ANOVA seguido pelo teste Tukey de comparação múltipla) em comparação com 1% de DMSO (concentração de veículo utilizada no controle negativo), mostrando que o GW0742 *per se* não possui citotoxicidade. Usando concentrações tóxicas de DMSO (3-50%) (PICOLI et al., 2015), foi demonstrado que as análises da expressão do ‘valor de *Renilla*’ têm o mesmo resultado que o experimento de citotoxicidade MTT (Figura 20), ou seja, pode-se concluir que compostos ou extratos que levaram a expressões baixas do repórter de *Renilla* também resultaram em alta toxicidade celular. Portanto, um baixo ‘valor de *Renilla*’ foi definido como um parâmetro de citotoxicidade indireta do ensaio e, durante as triagens, os compostos/extratos que levaram a baixos ‘valores de *Renilla*’ foram desconsiderados.

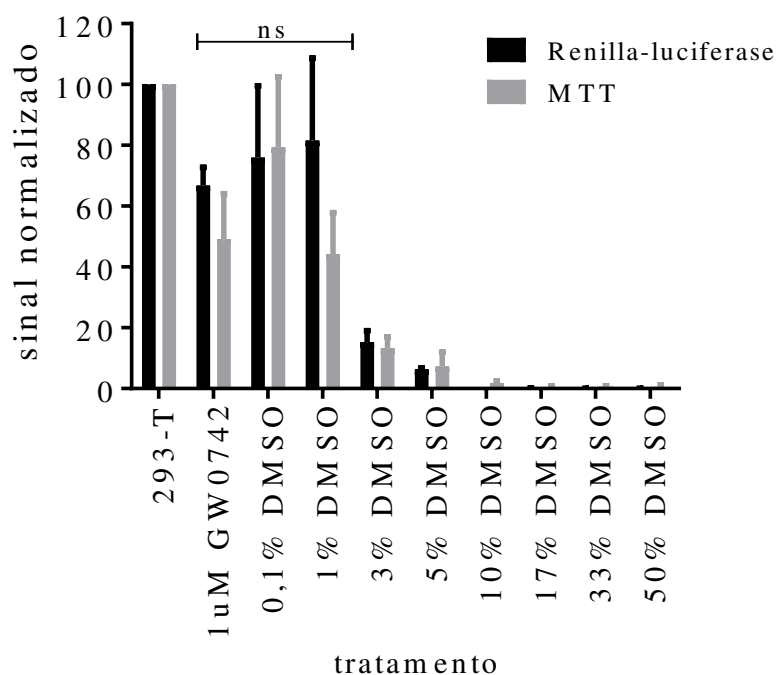


Figura 20. Ensaio de citotoxicidade. O sinal de luciferase de *Renilla* e o resultado do ensaio de MTT foram comparados para DMSO em diferentes concentrações (0,15%, 1%, 3%, 5%, 10% e 50%) de forma a validar o ‘valor de *Renilla*’ como um parâmetro indireto de citotoxicidade. 293T indica células não tratadas e a condição com 1 μ M de GW0742 contém 1% de DMSO como veículo. N=4. Utilizando a estatística 2way ANOVA seguido pelo teste Tukey de comparação múltipla, ambas os métodos (sinal de luciferase de *Renilla* e citotoxicidade por MTT) foram considerados com o mesmo efeito nas diferentes concentrações de DMSO ($p = 0,008$, interação muito significativa, **) e o efeito da concentração de DMSO foi considerado extremamente significativo (***) ($p < 0,0001$). Realizado no *software* Graphpad Prism.

Como critério de exclusão por citotoxicidade, estabelecemos que os controles positivos e negativos possuem sinal normal do ‘valor de *Renilla*’. Dessa forma, durante a

realização de campanhas de triagem de ligantes, tratamentos que resultarem em um ‘valor de *Renilla*’ menor que a ‘média menos cinco vezes o desvio padrão’ do valor normal serão classificados como valores anormais de transfecção e serão desconsiderados por apresentarem citotoxicidade aparente.

Desta forma, foi possível confirmar que o ensaio inicial de triagem proposto nesta tese fornece dois tipos de resultados: o sinal de luciferase de *firefly* indica compostos que ativem o PPAR β/δ (objetivo principal), e o sinal de luciferase de *Renilla* indica compostos que apresentam citotoxicidade.

4.1.5 Expressão, purificação e caracterização do hPPAR δ LBD

Para ensaios *in vitro*, hPPAR δ LBD foi expresso de forma heteróloga conforme descrito anteriormente (BATISTA et al., 2012). Pode-se observar que, após a gel filtração, a proteína foi obtida de forma pura e no peso molecular correto (33,492 kDa) para a construção utilizada, que corresponde à porção LBD (aminoácidos 171 a 441) (Figura 21). A expressão da proteína rende geralmente 3 mg por litro de expressão.

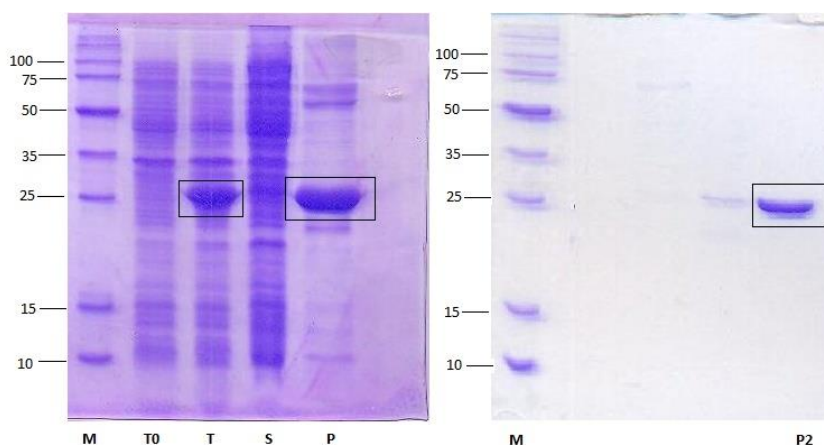


Figura 21. Expressão e purificação hPPAR δ LBD. M: marcador de peso molecular, T0: amostra da cultura de *E. coli* antes da indução, T: amostra da cultura de *E. coli* após indução overnight com IPTG 500mM, S: sobrenadante da cultura celular lisada, P: eluição da purificação com resina de afinidade, P2: eluição da purificação em gel filtração. Massa molecular do PPA β/δ com cauda de histidina: 33,492kDa.

Após expressão e purificação da proteína, foram realizados estudos de caracterização biofísica da proteína para confirmar se ela foi expressa na forma ativa e enovelada. Primeiramente foi realizado um dicroísmo circular para verificação da estrutura secundária do hPPAR δ LBD (Figura 22). A estrutura observada corresponde à estrutura descrita

na literatura, de que o PPAR β/δ é formado majoritariamente por alfa-hélices, apresentando os mínimos característicos em 208 e 222nm.

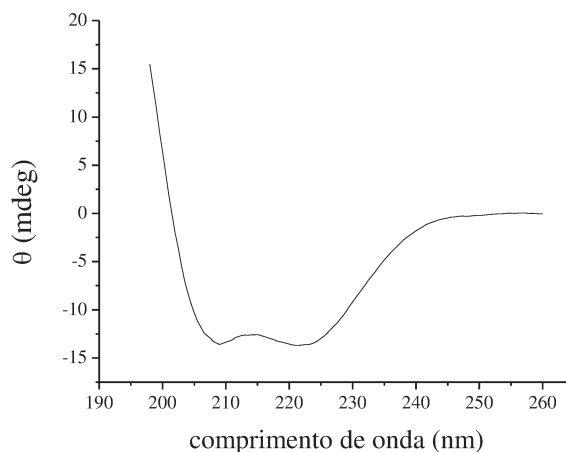


Figura 22. Espectro de Dicroísmo Circular do hPPAR δ LBD. Vinte aquisições de 200 a 260nm.

Foi realizado também um ensaio de desnaturação, buscando encontrar, entre 10 e 90 °C, a temperatura em que metade das proteínas estariam enoveladas e metade estariam desenoveladas (Temperatura de *melting*, T_m). Este ensaio infere sobre a estabilidade da estrutura secundária da amostra. Foi observado que a temperatura de T_m do hPPAR δ LBD é $43,07\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,41$, indicando que a proteína recombinante possui boa estabilidade (Figura 23).

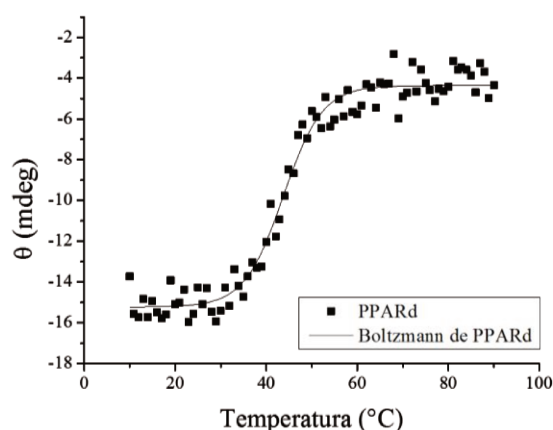


Figura 23. Desenovelamento térmico do hPPAR δ LBD. Variação de temperatura de 10 a 90°C observado em 208nm. $T_m = 43,07^{\circ}\text{C} \pm 0,41$. *Fitting* de Boltzman para cálculo da T_m realizado no *software* OriginPro 8.0.

Antes da realização de experimentos *in vitro*, a proteína previamente purificada e estocada a -80°C foi submetida a uma análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS), para verificar se após descongelamento, o hPPAR δ LBD ainda se encontrava monodisperso em solução. Os resultados normalmente obtidos estão aqui representados com o gráfico referente a um experimento. Com o ensaio de DLS, podemos observar um raio hidrodinâmico de 3,1 nm,

com polidispersão de 4,7 % (Figura 24, Tabela 4), que corresponde ao hPPAR δ LBD, que se apresenta monodisperso e com raio hidrodinâmico de dímero, pois em solução (na ausência de RXR) há preferência para a formação de dímeros de PPAR β/δ (dados não mostrados).

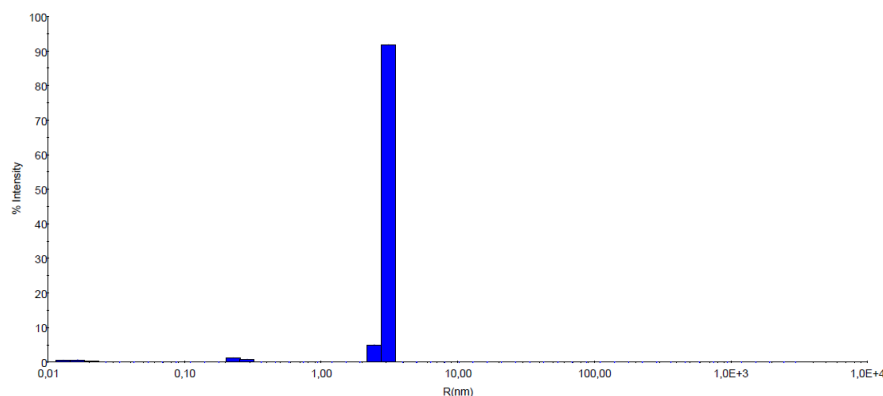


Figura 24. DLS do hPPAR δ LBD. A amostra apresenta um raio de 3,1nm.

Tabela 4. Tabela de dados do DLS do hPPAR δ LBD. Pd = Polidispersão, Int = Intensidade.

Item	Raio (nm)	%Pd	%Int
Pico 1	0.0	16.3	1.3
Pico 2	0.2	11.8	1.9
Pico 3	3.1	4.7	96.8
Pico 4	1879.1	15.6	---

Após garantir com o dicroísmo circular e com o DLS que as amostras contêm hPPAR δ LBD dimérico, monodisperso, indicando que a proteína foi expressa de forma adequada, as amostras foram utilizadas nos ensaios de caracterização biofísica entre hPPAR δ LBD e ligantes comerciais de PPAR β/δ ou possíveis ligantes triados.

4.1.6 Termoestabilidade (*Termal Shift assay, TSA*)

O ensaio de Termo Estabilidade (TSA) qualitativo é uma das metodologias adicionais de validação adicionadas ao nosso conjunto de metodologias de triagem. Este ensaio mede a estabilização da estrutura terciária do PPAR β/δ antes e depois da adição de ligantes ou potenciais ligantes.

Para determinação do protocolo de TSA para o hPPAR δ LBD, foram testadas diferentes concentrações de sonda (5, 10 e 20X) e de proteína (5, 10 e 20 μ M), e a condição genérica de TSA utilizada para outras proteínas no laboratório (4 μ M de proteína e 1X de sonda) (APÊNDICE B - Figura 60). Pode-se observar que a condição genérica de 4 μ M do LBD do

hPPAR δ LBD e 1X de sonda apresenta um sinal de intensidade do fluoróforo muito baixa ao longo dos ciclos do TSA (Linha Rosa, APÊNDICE B - Figura 60). Concentrações crescentes de quantidade de proteína apresentaram uma intensidade de sinal maior ao longo de todos os ciclos da rampa de temperatura do TSA. No entanto, aumento na concentração de sonda não significou um aumento diretamente proporcional na intensidade de sinal. Para as concentrações de 5 μ M e de proteína o sinal foi maior quanto menor a quantidade de sonda utilizada. No caso de 20 μ M de proteína, a melhor concentração de sonda foi a intermediária, 10X. Com este teste foi possível determinar parâmetros experimentais com maior sinal de emissão do fluoróforo durante a leitura do ensaio. As condições experimentais de maior sinal foram as que utilizaram 20 μ M de hPPAR δ LBD. A condição experimental escolhida para os próximos experimentos foi a de 5X de sonda e de 10 μ M de hPPAR δ LBD, que representa uma intensidade de sinal 5 vezes maior que a condição genérica previamente utilizada no laboratório (4 μ M de proteína e 1X de sonda), sem demandar grandes quantidades de proteína purificada ou sonda.

Após determinação das condições experimentais, foi realizado um TSA com os ligantes comerciais GW0742, GW501516, L-165,041 (Figura 25). Os agonistas específicos (GW0742, GW501516 e L-165,041) provocam um aumento nas temperaturas de fusão da proteína (T_m) em comparação com a T_m do apo-PPAR β/δ , indicando estabilização da estrutura terciária (Figura 25). Em particular, o agonista GW0742 estabilizou a estrutura terciária de PPAR β/δ , como foi relatado por Batista (2012), aumentando a T_m do receptor de $39,41 \pm 0,09$ °C (apo-PPAR β/δ) para em $53,1 \pm 0,3$ °C. Os outros agonistas específicos, GW501516 e L-165,041, também deslocaram a T_m s do PPAR β/δ para $51,1 \pm 0,2$ °C e $43,99 \pm 0,06$ °C, respectivamente.

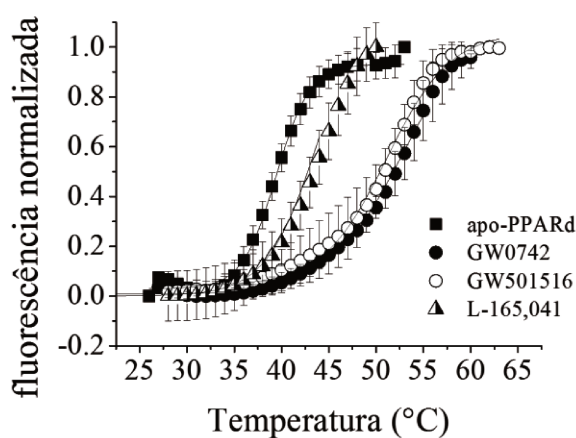


Figura 25. TSA com os agonistas comerciais do PPAR β/δ . TSA de 10 μ M hPPAR δ LBD com 30 μ M dos agonistas GW0742, GW501516 e L-165,041. Dados de três experimentos independentes realizados com três replicatas técnicas. *Fitting* de Boltzman para cálculo da T_m realizado no *software* OriginPro 8.0.

Como já foi reportado em diversos estudos, ligantes de RNs aumentam a estabilidade estrutural de RNs, principalmente porque a ligação do ligante organiza interações específicas dentro do LBP, essas ligações aumentam o grau de proteção contra o solvente e, com isso, tornam a estrutura do receptor mais rígida (FIGUEIRA et al., 2011; HAMURO et al., 2006; PISSIOS et al., 2000; RASTINEJAD et al., 2013). Logo, o ensaio de TSA pode ser muito útil em campanhas de triagem de ligantes, pois o cálculo da T_m da proteína na presença de compostos pode auxiliar na seleção de compostos que estabilizem a estrutura terciária da proteína, indicando interação direta com o PPAR β/δ .

Em resumo, após determinação das condições experimentais de concentração de sonda (5X) e de proteína (10 μ M de hPPAR δ LBD), um ensaio com os ligantes comerciais de PPAR β/δ foi realizado com sucesso, mostrando que o experimento foi padronizado, podendo ser utilizado para caracterização de compostos triados.

4.1.7 Supressão de Fluorescência do ANS (*ANS fluorescence quenching*)

O terceiro experimento do *pipeline* foi o ensaio de supressão de fluorescência da sonda 8-anilino-1-naftalenosulfônico (ANS), que determina a afinidade do *hit* selecionado pelo bolsão hidrofóbico do LBD do PPAR β/δ . Neste ensaio, a sonda ANS liga-se ao bolsão de ligação do ligante (LBP) hidrofóbico do PPAR β/δ , sendo deslocada por ligantes do receptor, causando a supressão da fluorescência. À medida que a concentração do agonista aumenta, maior a diminuição da fluorescência do ANS. Este ensaio já foi utilizado para o isotipo PPAR γ (RIBEIRO FILHO et al., 2018; ZORRILLA; GARZÓN; PÉREZ-SALA, 2010), no entanto, até o momento não foram encontrados relatos de protocolos descritos para o PPAR β/δ .

Primeiramente, foram feitas curvas de ligação de PPAR β/δ -ligante com estequiometria 1:1 (sonda:proteína), para mostrar que o agonista (GW0742) é efetivo para dissociar ANS do sítio de ligação de PPAR β/δ , mesmo na concentração de ANS não saturada (APÊNDICE C – este experimento foi realizado pela Dra. Fernanda Batista).

Em seguida, foram realizados vários testes para avaliar a proporção adequada de sonda:proteína com a intenção de obter o melhor desempenho no experimento. Nos testes com diferentes concentrações de sonda ANS e proteína hPPAR δ LBD, a concentração do ligante GW0742 foi variada para observação do deslocamento e da supressão de fluorescência. Os dados apresentados na Figura 26 foram referentes a concentração de 2 μ M de hPPAR δ , os resultados foram semelhantes para as demais concentrações da proteína (APÊNDICE D). Pode-

se observar que as menores concentrações de hPPAR δ LBD resultaram em um sinal muito baixo e ruidoso, portanto as concentrações de 0,25 μ M e 0,5 μ M não foram selecionadas para a realização deste ensaio.

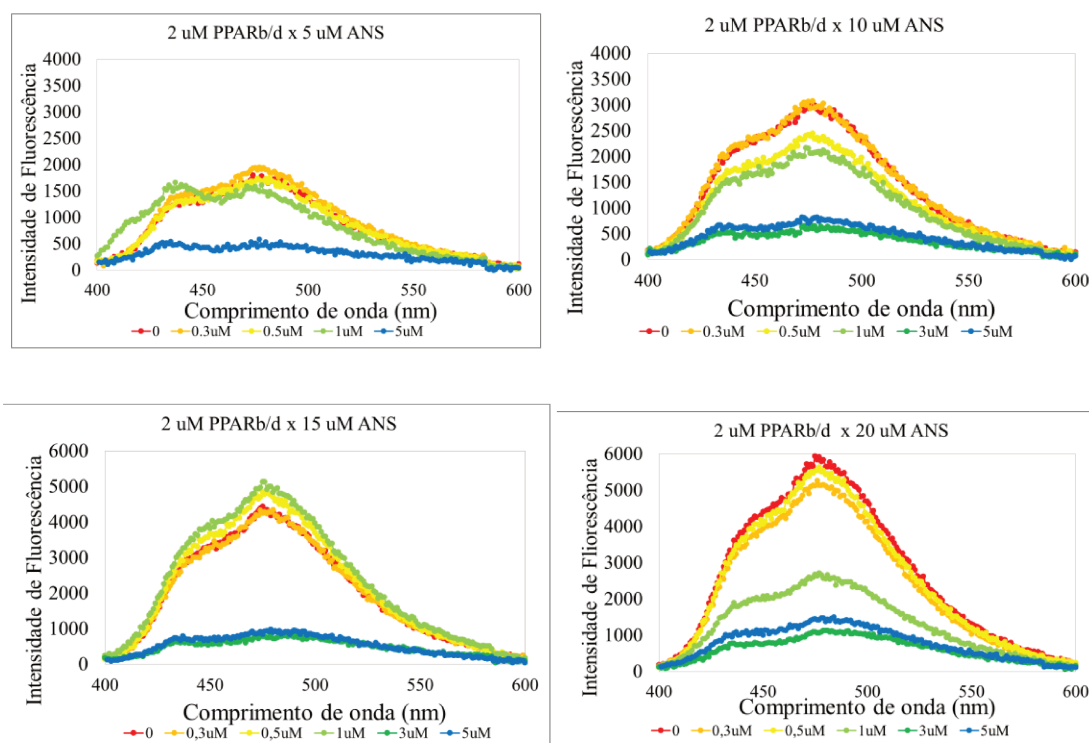


Figura 26. Teste de concentração ANS e proteína para realização do ensaio de Supressão da Fluorescência de ANS. A concentração de sonda ANS variou em 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M e 20 μ M. Aqui exibimos resultados de quando a concentração de hPPAR δ LBD foi mantida em 2 μ M. Agonista GW0742 nas concentrações 0 μ M (apenas proteína e ANS), 0,3 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 3 μ M e 5 μ M.

Após os testes realizados, os experimentos foram padronizados com 10 vezes o excesso de ANS (2 μ M hPPAR δ LBD:20 μ M ANS) para garantir que todo o PPAR β/δ esteja saturado por ANS, e que todas as modificações conformacionais causadas por possíveis ligantes no LBP do receptor provoquem o deslocamento da sonda ANS.

Após padronização, foi realizado um ensaio com os ligantes comerciais e cálculo das constantes de dissociação aparentes (K_{dapp}) entre PPAR β/δ e esses agonistas: GW0742 ($1,2 \pm 0,3$ μ M), GW501516 ($1,8 \pm 0,1$ μ M) e L-165,041 ($1,09 \pm 0,08$ μ M) (Figura 27 e APÊNDICE E).

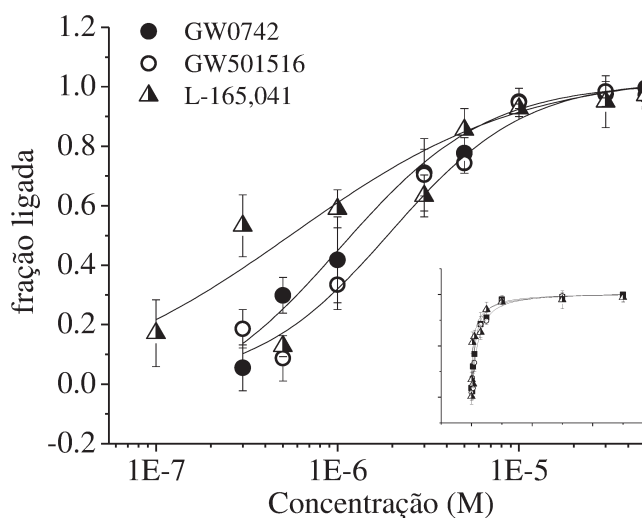


Figura 27. Supressão da fluorescência do ANS para ligantes comerciais. Os agonistas comerciais GW0742, GW501516 e L-165,041 foram adicionados nas concentrações de 0,3 μM (0,0001 $\mu\text{g/mL}$), 0,5 μM (0,0002 $\mu\text{g/mL}$), 1 μM (0,0004 $\mu\text{g/mL}$), 3 μM (0,001 $\mu\text{g/mL}$), 5 μM (0,002 $\mu\text{g/mL}$), concentrações de 10 μM (0,004 $\mu\text{g/mL}$), 30 μM (0,01 $\mu\text{g/mL}$) e 50 μM (0,02 $\mu\text{g/mL}$). O experimento foi realizado em triplicata. A constante de afinidade aparente foi calculada com o ajuste sigmoidal Hill 1, no *software* OriginPro 8.0.

Para validar o uso da metodologia da supressão da fluorescência do ANS e do cálculo da constante de afinidade aparente para o PPAR β/δ e ligantes, também foi realizado um ensaio de TSA quantitativo com o ligante GW0742 e o receptor. Esse ensaio é bem estabelecido para cálculo de constante de afinidade entre proteínas e ligantes (CIMMPERMAN et al., 2008; SENISTERRA; CHAU; VEDADI, 2012). O TSA quantitativo foi realizado pela Dra. Fernanda Batista. Neste segundo ensaio, a constante de dissociação encontrada foi de $2,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Figura 28), muito próxima da constante obtida no ensaio de ANS. O resultado obtido no ensaio de TSA quantitativo corrobora com o ensaio de ANS para cálculo da constante de dissociação entre PPAR β/δ e ligantes.

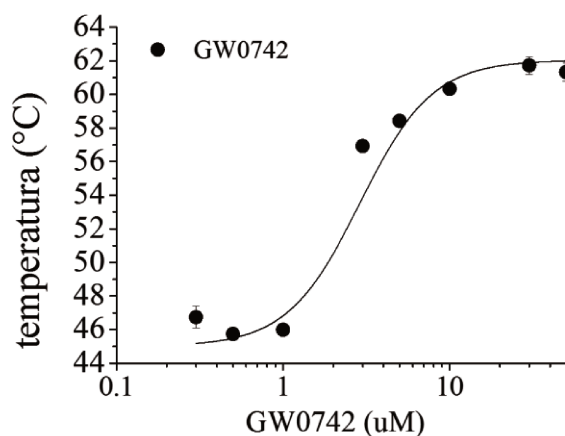


Figura 28. Ensaio de TSA quantitativo com PPAR β/δ e o ligante GW0742. O ligante GW0742 foi utilizado na concentração de 0,3 μM , 0,5 μM , 1 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM , 30 μM e 50 μM . O experimento foi realizado em

triplicata. A constante de afinidade aparente foi calculada com o ajuste sigmoidal Hill 1, no *software* OriginPro 8.0.

Até o início deste trabalho não foram encontrados na literatura artigos sobre experimentos de supressão da fluorescência do ANS com a proteína PPAR β/δ . Os resultados deste trabalho foram publicados na revista *PPAR Research* (VIDEIRA et al., 2018), apresentando a padronização de um experimento novo e muito importante para a caracterização da afinidade de compostos pelo hPPAR δ LBD.

Poucos estudos mostram constantes de afinidade entre os NR e seus ligantes, especialmente para o PPAR β/δ , sendo que, quando existe algum tipo de quantificação de afinidade, a mesma é realizada por meio de ensaios concentração-resposta celular, gerando valores de EC₅₀ e não de constantes de afinidade (BASSÉNE et al., 2006; OLIVER et al., 2001). Os resultados derivados deste trabalho demonstram como proceder com a caracterização da interação ligante:receptor de forma mais acurada, utilizando-se o ensaio de supressão de fluorescência ANS, que é capaz de avaliar afinidades de compostos que se ligam ao LBP do PPAR β/δ .

Finalmente, a aplicação das metodologias biofísicas propostas (TSA e supressão de fluorescência do ANS) também apresentam a vantagem de medir a atividade relativa de um composto (ou uma mistura de substâncias) sem a necessidade de informações prévias sobre a estrutura química do ligante (ZORRILLA; GARZÓN; PÉREZ-SALA, 2010). Portanto, este trabalho propõe que essas metodologias são úteis como etapas adicionais na triagem de bibliotecas de extratos naturais.

4.2 Triagem manual dos compostos em ensaio de transativação

Ao longo deste trabalho de doutorado e durante o processo de padronização dos protocolos dos métodos de triagem, compostos de colaboradores foram testados em diversas ocasiões e, para facilitar a visualização, os resultados foram apresentados de maneira agrupada. No APÊNDICE F estão listados os compostos e extratos, e a posição na placa de triagem. Como o teste de compostos de colaboradores foi realizado manualmente antes da finalização da padronização do ensaio de transativação, as placas não foram formatadas aos moldes das placas de triagem semi-automatizada, e apresentam menos poços de controles positivos e negativos por placa (conforme indicado na legenda).

4.2.1 Ensaio de transativação primário

Foram testados 121 compostos de colaboradores em um ensaio de transativação primário, dos quais 7 (LFNT-74, LFNT-75, AF-4, CF24, AN5, AN7 e AN11) foram selecionados como candidatos a *hits* na triagem primária (Figura 29). O valor do sinal *firefly/Renilla* dos candidatos a *hits* selecionados é muito inferior ao valor obtido pelo controle positivo. No entanto, é importante lembrar que o controle positivo, GW0742, é um agonista comercial que já passou por todas as etapas de melhoramento da sua estrutura química para aumentar sua afinidade pelo PPAR β/δ . Para a triagem manual de compostos de colaboradores não foi aplicado o fator estatístico Z' pois a placa não foi montada aos moldes das placas de triagem (com o número adequado de replicatas dos controles para avaliação estatística).

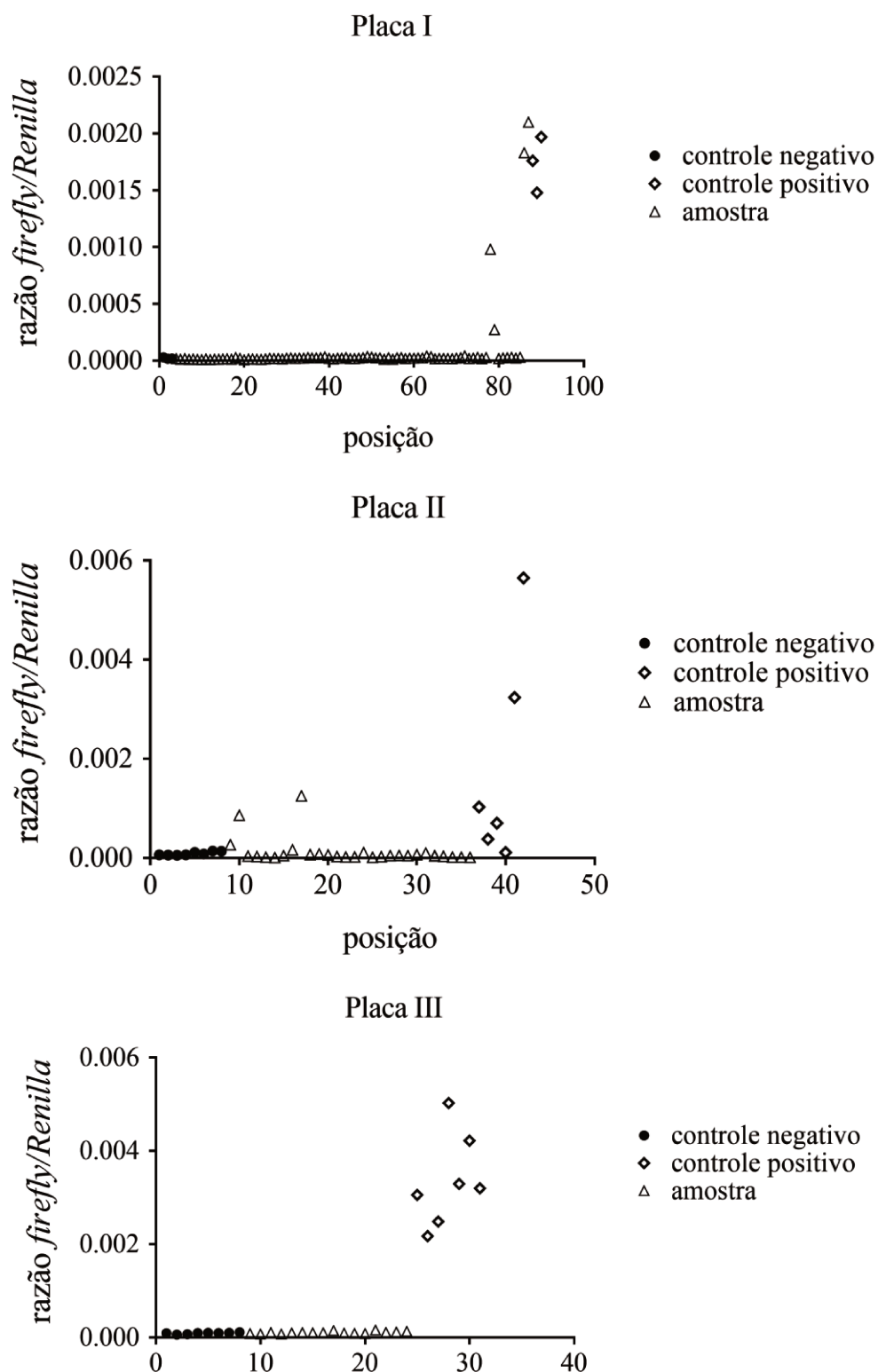


Figura 29. Ensaio de transativação para triagem primária de compostos de colaboradores. Placas I, II e III representam três diferentes placas de triagem. Triagem dos compostos expressa como razão *firefly/Renilla* de cada composto. • Controle negativo (1% DMSO), ◆ controle positivo (1 μ M GW0742), △ compostos (1 μ M). Os candidatos a *hits* foram selecionados de acordo com o critério: apresentar razão *firefly/Renilla* 7 vezes o desvio padrão do controle negativo.

4.2.2 Ensaio de transativação secundário

Os 7 candidatos a *hits* (CF24, AN5, AN7, AN11, LFNT-74, LFNT-75, AF-4) selecionados na triagem primária foram submetidos a uma triagem secundária em triplicata para confirmação do seu efeito de ativação do PPAR β/δ . Neste ensaio confirmatório, foram selecionados apenas compostos que apresentaram uma razão de sinal *firefly/Renilla* superior a sete vezes o desvio padrão do controle negativo em pelo menos duas das triplicatas (Figura 30). Segundo este critério de seleção, apenas o composto AN11 foi selecionado neste ensaio confirmatório, apresentando uma ativação média de 1,26X em relação ao controle negativo (Figura 30). No entanto a variabilidade da triplicata e a baixa ativação média indicam que a ativação observada pode ser um falso-positivo, o que será analisado melhor na etapa seguinte do *pipeline* de triagem. Os demais compostos (CF24, AN5, AN7, LFNT-74, LFNT-75, AF-4) não foram confirmados, sendo definidos como falso-positivos do primeiro experimento de transativação.

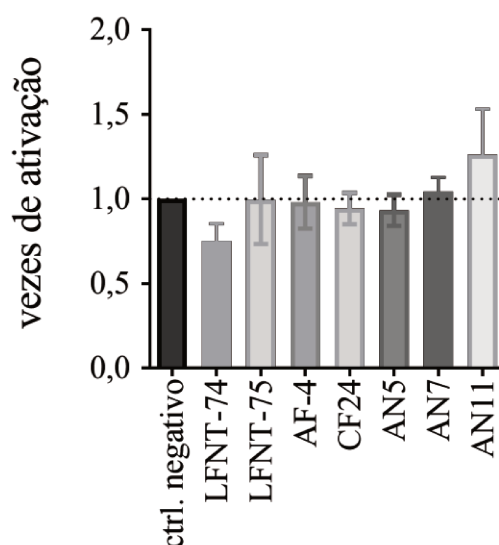


Figura 30. Ensaio de transativação confirmatório para compostos triados na transativação primária. Sete candidatos a *hit* (CF24, AN5, AN7, AN11, LFNT-74, LFNT-75, AF-4) foram selecionados em diferentes testes. Para simplificação os resultados foram agrupados em um mesmo gráfico, indicando que o controle negativo foi normalizado para 1. Todos os testes foram realizados na presença do controle positivo, mas para efeito de simplificação, a ativação do GW0742 não foi mostrada. O critério para confirmação de um *hit* é possuir razão *firefly/Renilla* sete vezes o desvio padrão para pelo menos duas das três replicatas. Apenas o composto AN11 foi confirmado.

4.2.3 Ensaio de Thermal Shift Assay (TSA)

O segundo método do racional de triagem é um ensaio de *Thermal Shift Assay* (TSA), para verificar se os compostos escolhidos na triagem inicial estabilizam a estrutura terciária do PPAR β/δ (Figura 31). O *hit* AN11 selecionado na etapa anterior foi submetido ao

ensaio de TSA, juntamente com o controle positivo (o agonista comercial de PPAR β/δ , GW0742). É possível observar que o GW0742 estabiliza a estrutura terciária da proteína, pois desloca a T_m do apo-PPAR β/δ de $36,68 \pm 0,07$ °C para $51,61^\circ\text{C} \pm 0,08$ °C. No ensaio de TSA, a incubação da proteína hPPAR δ LBD com o composto AN11 resultou em uma T_m de $36,18 \pm 0,07$ °C, ou seja, não alterou a T_m em relação ao apo-PPAR β/δ , indicando que este composto não altera a estabilidade térmica do receptor. Portanto, o AN11 não foi selecionado para as próximas etapas de triagem.

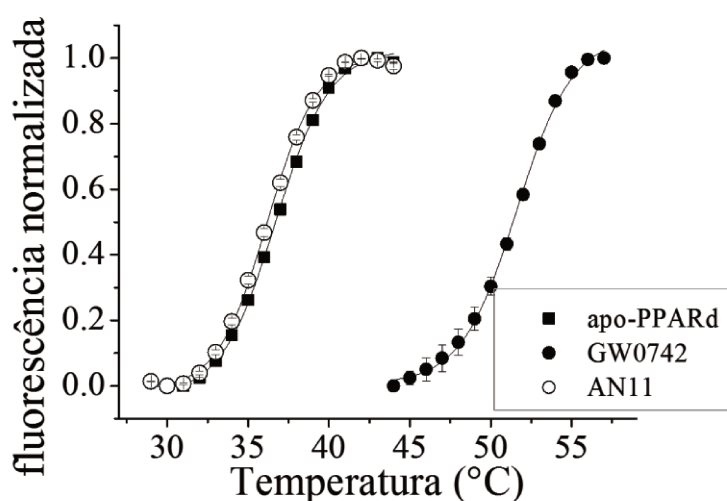


Figura 31. TSA do PPAR β/δ com o *hit* AN11 e o agonista GW0742. O experimento foi realizado com 10 μM de hPPAR δ LBD e 30 μM das moléculas. O experimento foi realizado em triplicata e analisado no *software* OriginPro8 com realização de Boltzman para cálculo da T_m .

4.3 Triagem semi-automatizada da Biblioteca Phytobios

Após a otimização do conjunto de métodos de triagem e dos testes manuais com compostos de colaboradores, testamos o *pipeline* de maneira semi-automatizada com uma biblioteca de extratos naturais da flora brasileira (biblioteca Phytobios).

A biblioteca Phytobios foi escolhida dentre outras bibliotecas disponíveis no LNBio por ser uma biblioteca de produtos naturais, pelo fato do PPAR β/δ aceitar ligantes hidrofóbicos naturais, e devido ao forte apelo para o uso de produtos naturais no desenvolvimento de cosméticos. Outro fator importante foi o tamanho da biblioteca (apenas 560 compostos) para uma primeira triagem e validação da metodologia.

4.3.1 Determinação da concentração ideal

Como a biblioteca havia apenas sido utilizada com ensaios enzimáticos *in vitro*, foi necessário realizar um teste de concentração estoque dos extratos da biblioteca com o intuito

de avaliar se as concentrações mais elevadas seriam tóxicas para as células. Foram testadas as concentrações estoque de 10 mg/mL, 1 mg/mL e 0,1 mg/mL, que ao serem adicionadas no meio de cultura das microplacas foram diluídas 1:100 (concentrações finais 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,001 mg/mL). Para esta avaliação o critério de citotoxicidade aparente baseado na leitura da luciferase de *Renilla* foi utilizado, conforme descrito anteriormente. Foram testados em placa de 96 poços os quadrantes Q1 da placa P1a da biblioteca Phytobios para as concentrações detalhadas anteriormente. A tabela com a análise do valor de *Renilla* para as 96 amostras de cada condição está detalhada no APÊNDICE F.

A placa testada com extratos na concentração estoque de 10 mg/mL apresentou, para 53% das condições testadas, um valor de *Renilla* inferior a 60% em relação à média dos poços controle (positivos e negativos), indicativo de que essa concentração da biblioteca apresenta toxicidade para as células (Tabela 9, APÊNDICE G).

A placa testada com a concentração estoque de 1 mg/mL apresentou citotoxicidade aparente apenas para três extratos testados, o que foi considerado aceitável. A placa testada com a concentração estoque de 0,1 mg/mL não apresentou citotoxicidade aparente, podendo indicar ser uma concentração tão diluída que não provocou nas células nenhuma reação positiva (ativação) ou negativa (citotoxicidade). Portanto, a concentração estoque de 1 mg/mL foi selecionada para triagem por apresentar uma reação, mesmo que negativa, com alguns extratos (Tabela 9, APÊNDICE G).

4.3.2 Ensaio de transativação primário

A triagem da biblioteca Phytobios foi realizada na concentração final de 0,01 mg/mL (utilizando-se o estoque de 1 mg/mL). Os resultados mostram que a maioria dos extratos/frações e controles negativos apresentou baixa expressão de luciferase de *firefly* e, portanto, baixa razão *firefly/Renilla* (Figura 32 e APÊNDICE H). Por outro lado, o tratamento com os controles positivos apresentou alta expressão de luciferase de *firefly* e alta relação *firefly/Renilla*, como esperado.

Após a análise de dados (avaliação da citotoxicidade aparente, normalização pelo controle de transfecção e cálculo do fator Z'), encontramos 31 candidatos a *hits* como agonistas de PPAR β/δ (extratos 1 a 31), que mostraram taxas de ativação de 1,3 - 2,1X da ativação basal (Figura 32). No entanto, o sinal obtido foi muito inferior ao do controle positivo. Como descrito anteriormente, estes resultados podem ser justificados pelo fato de que o GW0742 é um agonista comercial com alta especificidade e afinidade para PPAR β/δ (BATISTA et al., 2012).

Isso significa que este ligante já foi submetido a etapas de otimização (geração de *leads*) enquanto que a biblioteca Phytobios é composta por extratos brutos e suas frações, ou seja, uma mistura de diferentes compostos em diferentes concentrações, cuja atividade poderia ser aumentada por intermédio de novos fracionamentos e da otimização dos compostos, se isolados.

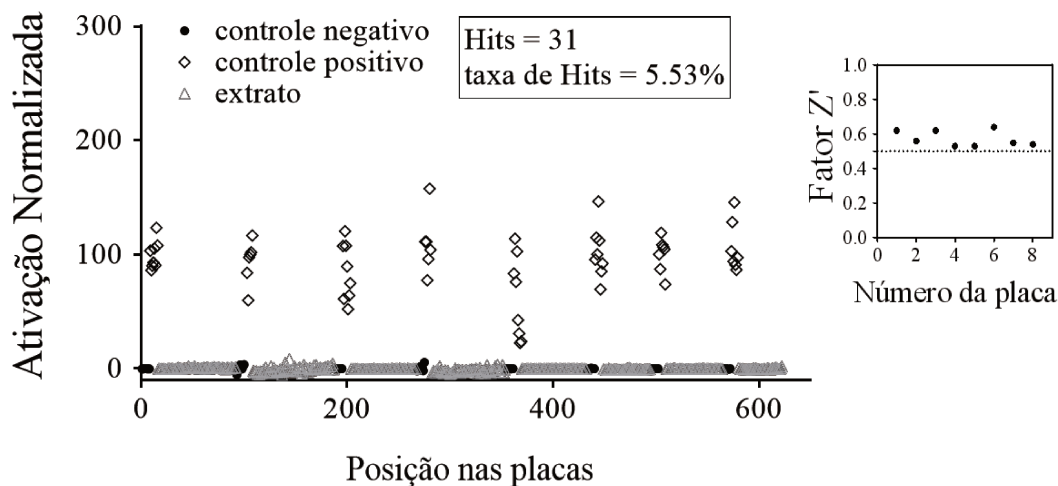


Figura 32. Triagem primária de extratos da biblioteca Phytobios. • Controle negativo (1% DMSO), $\diamond$ controle positivo (1 μ M GW0742), $\triangle$ extratos (0,01 mg/mL). Resumo com as oito placas de triagem normalizadas por controles positivos (100%) e negativos (0%), para cada placa. Inseto: fator Z' para cada placa de screening, mostrando a confiabilidade da triagem.

Para todas as placas de triagem, obtivemos um fator Z' apropriado (0,53 - 0,64) (ZHANG, 1999), indicando que nosso ensaio é confiável e adequado para a triagem de agonistas PPAR β/δ (Figura 32, inserto a direita). A variabilidade da ativação de PPAR β/δ observada para o controle positivo (GW0742) não interferiu na avaliação do fator Z' e foi considerada intrínseca ao experimento, pois foi utilizado o mesmo lote de células transfectadas, de meio de cultura, de alíquota do agonista e das soluções de leitura.

4.3.3 Ensaio de transativação secundário

Em seguida, para confirmar os candidatos a *hits* selecionados, realizamos um ensaio de transativação secundário, em triplicata, com os 31 extratos selecionados (Extratos de 1 a 31). Após o ensaio de transativação confirmatório, 10 extratos (Extrato 1, Extrato 2, Extrato 3, Extrato 4, Extrato 9, Extrato 19, Extrato 20, Extrato 29, Extrato 30, Extrato 31) foram selecionados como *hits*, por possuir razão *firefly/Renilla* acima do nosso critério de seleção. Estes *hits* apresentaram de ativação de 1,2 a 2,4X em relação a atividade basal dos controles negativos (Figura 33). Quando comparado com a ativação do PPAR β/δ causada pelo GW0742

(56X), todas as frações apresentaram um sinal muito menor, mas ainda acima dos nossos critérios de seleção com base no desvio padrão dos controles negativos. Além disso, como foi mencionado anteriormente, a biblioteca contém extratos de plantas, que são uma mistura de compostos diversos em diferentes concentrações e, provavelmente, os compostos que ativam PPAR β/δ estão presentes em quantidade muito baixa. Neste contexto, mesmo as baixas taxas de ativação PPAR β/δ encontradas com os extratos devem ser consideradas significativas.

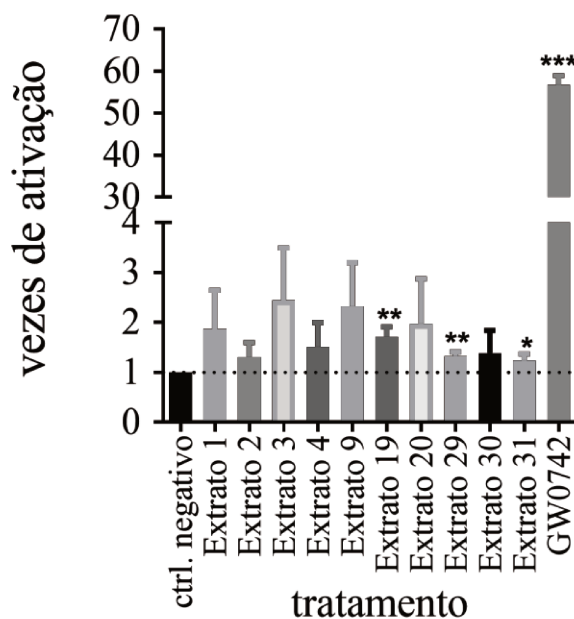


Figura 33. Ensaio confirmatório de transativação realizado em triplicata com os candidatos a *hits*. Controle positivo: 1 μ M GW0742, controle negativo (veículo, 1% DMSO), e 0,01 mg/mL dos extratos. O ensaio foi realizado com os 31 candidatos a *hits*, mas para efeito didático apresentamos apenas os 10 *hits* confirmados com sinal acima do nosso critério de seleção para pelo menos duas das três replicatas. No gráfico de barras, os resultados são apresentados na forma de média $\pm$ SD. p valores foram calculados com teste t não pareado (*p < 0,05, **p < 0,01, e ***p < 0,001) com o *software* GraphPad Prism.

4.3.4 Ensaio de Thermal Shift Assay

Em seguida, os 10 *hits* selecionados foram submetidos ao segundo método de triagem: o ensaio qualitativo de TSA, para seleção de extratos que estabilizem a estrutura terciária do PPAR β/δ .

Neste ensaio de TSA, além do controle positivo (GW0742), foram adicionados os demais agonistas de PPAR β/δ (GW501516 e L-165,041), e também o pan-agonista de PPARs Bezafibrato (Figura 34). É possível observar que os agonistas específicos (GW0742, GW501516 e L-165,041) estabilizam a estrutura terciária do hPPAR δ LBD de 7 a 14 graus, enquanto que o Bezafibrato apresentou um aumento de T_m de apenas $2,9 \pm 0,1$ °C. A baixa estabilidade encontrada pelo Bezafibrato pode ser explicada pelo fato dele ser um pan-agonista

de PPAR com especificidade muito baixa para PPAR β/δ e que fornece pouca ativação (WILLSON et al., 2000). Este resultado mostra que nosso ensaio é sensível para avaliar candidatos com baixa ativação que possam aparecer durante a triagem de ligantes.

Os resultados do TSA para os *hits* mostram que 2 frações selecionadas (Extrato 1 e Extrato 9) não mostraram as curvas de desenovelamento esperadas, indicando que esses extratos, de alguma forma, podem desestabilizar a estrutura terciária de PPAR β/δ , ou mesmo, não se ligar diretamente a este receptor. Por outro lado, 2 frações (Extrato 2 e Extrato 19) aumentaram a T_m do PPAR β/δ em $3,5 \pm 0,3$ °C e $2,5 \pm 0,3$ °C, respectivamente, em comparação com a T_m do apo-PPAR β/δ (Figura 34). Este resultado sugere que estes extratos podem ter componentes que se ligam fisicamente ao receptor e promovem a estabilização da estrutura proteica.

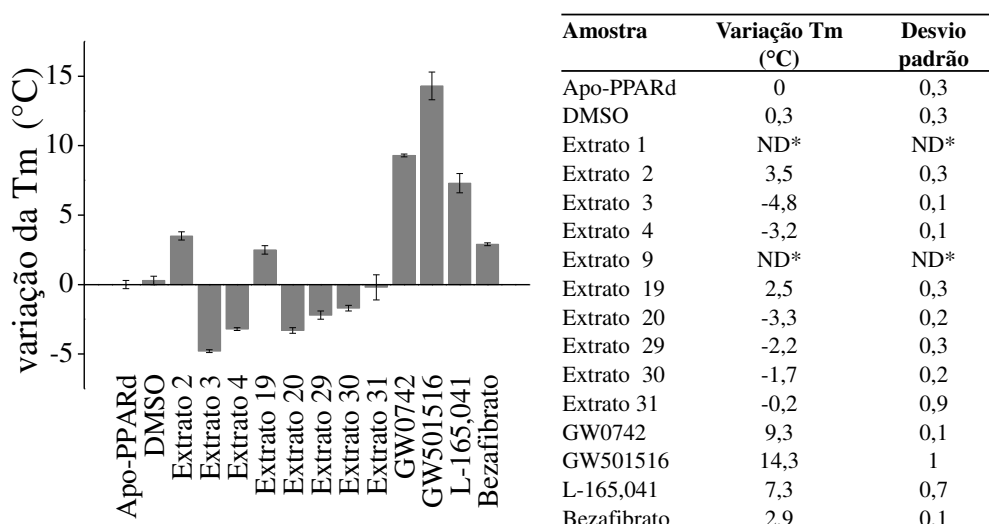


Figura 34. TSA do PPAR β/δ com os extratos da Phytobios e ligantes de PPAR β/δ . O experimento foi realizado com 10 μ M de hPPAR δ LBD e 30 μ M dos ligantes (GW0742, GW501516, L-165,041, Bezafibrato), e 0,14 mg/mL das frações e extratos. O experimento foi realizado em triplicata e analisado no *Software* OriginPro8 com realização de Boltzman para cálculo da T_m . ND* não definido.

4.3.5 Ensaio de supressão da fluorescência do ANS

Em seguida, um dos extratos selecionados foi submetido ao terceiro método do *pipeline* de triagem: o ensaio de supressão de fluorescência do ANS. Para o Extrato 2, calculamos entre o PPAR β/δ e o extrato uma constante de dissociação aparente (K_{dapp}) de $0,011 \pm 0,007$ mg/mL (Figura 35A), que é bem próxima da concentração utilizada no ensaio de transativação celular (0,01mg/mL). Também calculamos a K_{dapp} utilizando o método de TSA quantitativo, e o valor encontrado ($K_{dapp} = 20 \pm 3,7$ μ g/mL) corrobora com o valor obtido com o experimento de ANS (Figura 35B).

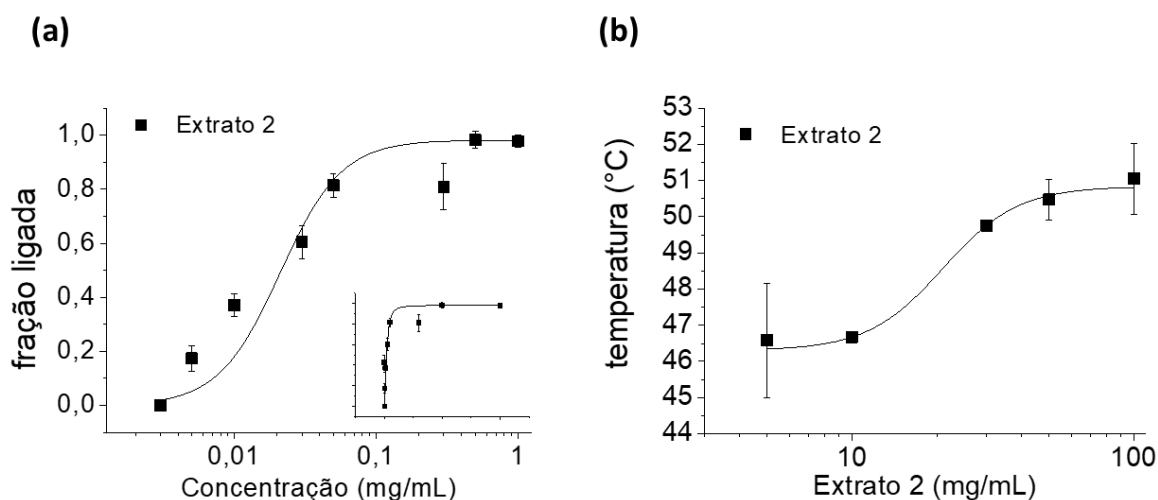


Figura 35. Curvas de dissociação entre PPARβ/δ e o Extrato 2. A: Curva de dissociação com o experimento de supressão do ANS. Intensidade normalizada de fluorescência no máximo de emissão (480 nm) *versus* a concentração do Extrato 2, ajustado pela curva de Hill1 com OriginPro 8.0. A concentração do extrato para cálculo da curva de dissociação variou de 0,003 – 1 mg/mL. O experimento foi realizado em triplicata. Inserto: curva em escala linear. B: Curva de dissociação com o experimento de TSA quantitativo. O ligante GW0742 foi utilizado na concentração de 0,3 μM, 0,5 μM, 1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM, 30 μM e 50 μM. O experimento foi realizado em triplicata. A constante de afinidade aparente foi calculada com o ajuste sigmoidal Hill 1, no *software* OriginPro 8.0.

4.3.6 Fracionamento do extrato selecionado

Conforme dito anteriormente, as baixas ativações obtidas utilizando-se extratos podem ser explicadas por este conter uma mistura de diversas moléculas em baixa concentração, sendo interessante o posterior fracionamento desses extratos buscando-se concentrar os componentes que tenham atividade com o PPARβ/δ. Foi solicitado o fracionamento do Extrato 2 para o laboratório da Dra. Daniela Trivella no LNBio, e nos foi entregue 24 frações do Extrato 2 (Extrato 2-01 a Extrato 2-24).

Dentre as 24 frações do Extrato 2, quatro apresentaram citotoxicidade aparente (Extrato 2-07, Extrato 2-16, Extrato 2-22 e Extrato 2-24) e foram descartadas. As frações Extrato 2-11, Extrato 2-18, Extrato 2-23 apresentaram sinal *firefly/Renilla* superior a sete vezes o desvio padrão dos controles negativos foram consideradas candidatas a *hit* no ensaio primário de transativação (Figura 36A). Nesta triagem primária, a fração Extrato 2-18 ativou o PPARβ/δ 4,43X quando comparado com o controle negativo (o controle positivo GW0742 ativou $118 \pm 22X$) e seguiu para o ensaio de transativação secundário do *pipeline* de triagem. As frações Extrato 2-11 e Extrato 2-23 foram selecionadas pelo critério de sinal *firefly/Renilla* sete vezes o desvio padrão dos controles negativos, mas ativaram o PPARβ/δ apenas 1,01X e 1,04X, respectivamente, o que não representa uma ativação do receptor. O fato dessas duas frações

terem sido selecionadas pelo critério do sinal *firefly/Renilla* foi um artefato devido ao controle negativo ter variado pouco e o critério de seleção ser um valor baixo. As frações Extrato 2-11 e Extrato 2-23 por não ativarem o PPAR β/δ não seguiram adiante no *pipeline* de triagem.

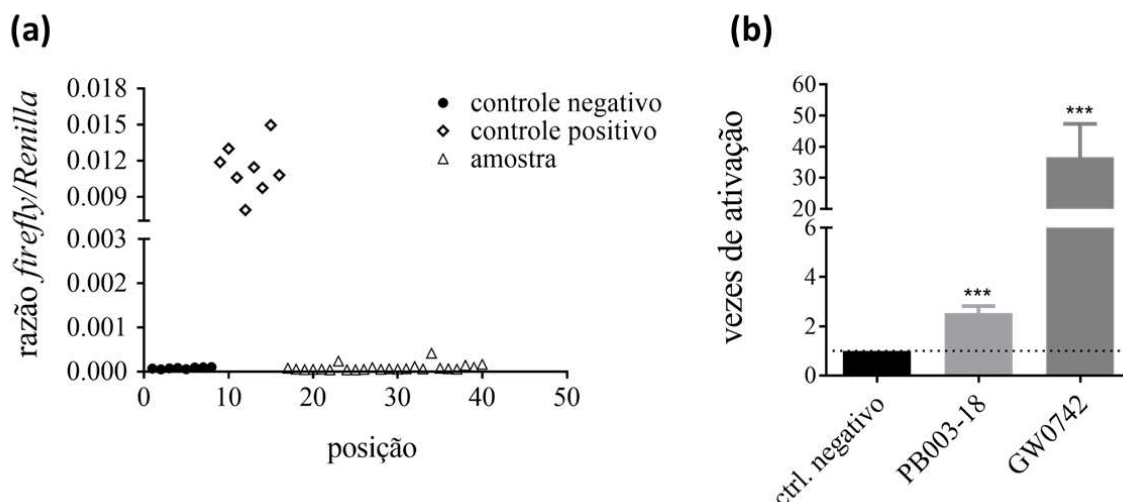


Figura 36. Ensaio de transativação primário e confirmatório para as frações do Extrato 2. A: Ensaio de triagem primária das frações do Extrato 2. • Controle negativo (1% DMSO), $\diamond$ controle positivo (1 μ M GW0742), Δ extratos (0,01 mg/mL). Resultado mostrado como razão *firefly/Renilla* de cada composto/controle. Candidatos a *hits* foram selecionados de acordo com o critério: apresentar razão *firefly/Renilla* 7 vezes o desvio padrão do controle negativo. B: Ensaio confirmatório de transativação realizado em triplicata com o Extrato 2-18. Controle positivo: 1 μ M GW0742, controle negativo (veículo, 1% DMSO), e 0,01 mg/mL do Extrato 2-18. No gráfico de barras, os resultados são apresentados na forma de média $\pm$ SD. p valores foram calculados com teste t não pareado (*p < 0,05, **p < 0,01, e ***p < 0,001) com o *software* GraphPad Prism.

No ensaio secundário, realizado em triplicata, a fração Extrato 2-18 foi confirmada como *hit*, ativando o PPAR β/δ $2,5 \pm 0,3X$ a mais que o controle negativo (Figura 36B).

Seguindo o *pipeline* de triagem, foi realizado um ensaio de TSA com a fração Extrato 2-18 a 0,28 mg/mL, obtivemos um aumento na T_m em 4 ± 1 °C em relação a T_m do apo-PPAR β/δ (Figura 37A). Em seguida o Extrato 2-18 foi submetido ao ensaio de supressão de fluorescência do ANS (Figura 37B). Neste ensaio foi calculado uma $K_{dapp} = 0,016 \pm 0,007$ mg/mL para o Extrato 2-18 que é bem próxima da concentração utilizada no ensaio de transativação celular (0,01 mg/mL).

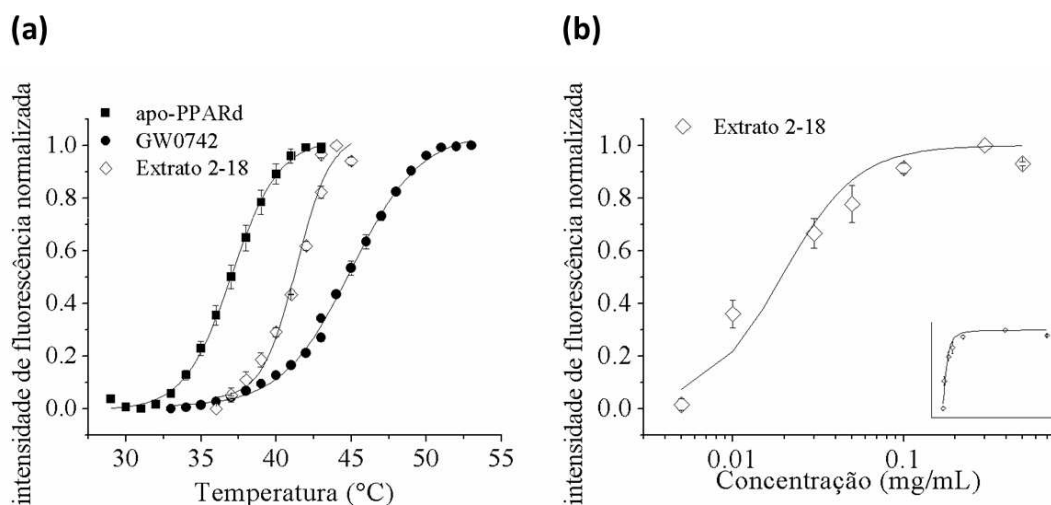


Figura 37. Caracterização biofísica da interação da fração Extrato 2-18 com PPAR β/δ . A: TSA do Extrato 2-18. O experimento foi realizado com 10 μ M hPPAR δ LBD, 30 μ M GW0742, 0,14 mg/mL Extrato 2-18 e 0,28 mg/mL Extrato 2-18. O experimento foi realizado em triplicata e analisado no *Software* OriginPro8 com realização de Boltzman para cálculo da T_m. B: Curva de dissociação com o experimento de supressão do ANS. Intensidade normalizada de fluorescência no máximo de emissão (480 nm) versus a concentração do Extrato 2-18, ajustado pela curva de Hill1 com OriginPro 8.0. A concentração do extrato para cálculo da curva de dissociação variou de 0,003 – 1 mg/mL. O experimento foi realizado em triplicata. Inserto: curva em escala linear.

Observando o K_d_{app} das frações Extrato 2 e Extrato 2-18, é possível perceber que no ensaio de transativação é utilizada uma concentração de extrato de 0,01 mg/mL que é muito próxima ao K_d_{app}, respectivamente 0,011 $\pm$ 0,007 mg/mL e 0,016 $\pm$ 0,007 mg/mL. *In vitro*, o K_d_{app} indica a concentração de extrato na qual metade dos PPAR β/δ estão ligados. Num ensaio celular, apenas parte das moléculas presentes no extrato penetram a célula e atingem o núcleo. Seguindo esse raciocínio, ao utilizar 0,01 mg/mL de extrato no ensaio de transativação celular, apenas parte dos PPAR β/δ estariam ligados a componentes do extrato. Isso pode explicar a baixa ativação (1,31X) encontrada no ensaio de ativação celular. Entretanto, altas concentrações de extrato se mostraram citotóxicas no ensaio de transativação celular (dados não mostrados). Com isso, podemos sugerir que tanto o extrato bruto Extrato 2 quanto a fração Extrato 2-18 deveriam ser mais fracionadas para o isolamento e enriquecimento de compostos que ativam o PPAR β/δ .

4.3.7 Ensaio de especificidade

Um ensaio de transativação foi realizado para os demais isotipos de PPAR para avaliar a especificidade dos extratos. Foi observado que o extrato bruto Extrato 2 podem ativar tanto o PPAR β/δ , quanto o PPAR α (Figura 38). Nenhuma das amostras mostrou ativar o

PPAR γ , embora, devido ao erro associado, este experimento devesse ser repetido para confirmação dos resultados observado.

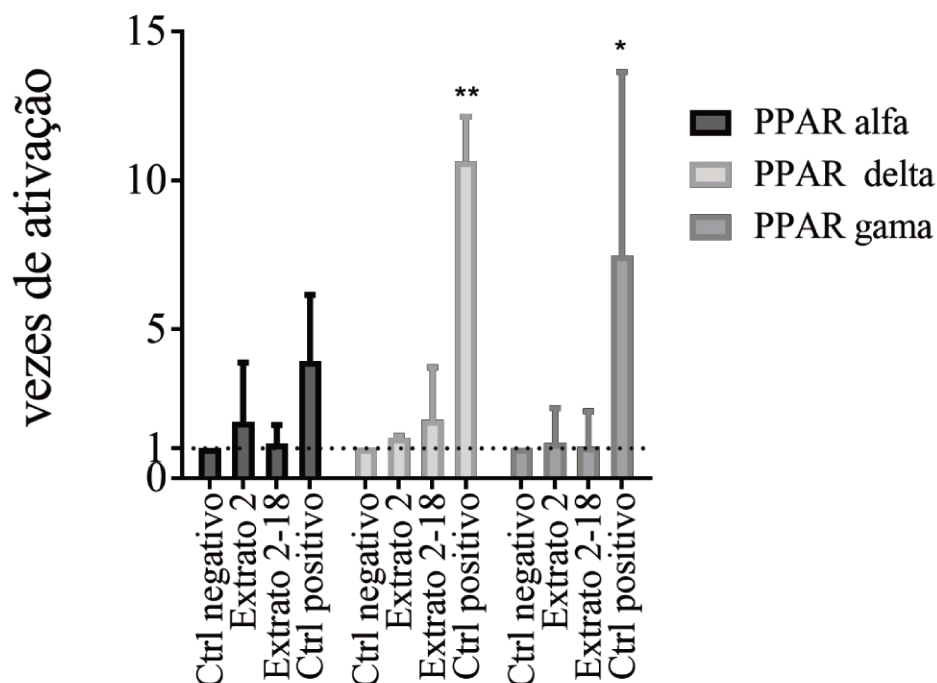


Figura 38. Ativação dos isotipos de PPAR pelos extratos Extrato 2 e Extrato 2-18. Como controle positivos foram utilizados 1 μ M de Bezafibrato (PPAR α), de GW0742 (PPAR β/δ) e de Rosiglitazona (PPAR γ). O veículo DMSO foi utilizado como controle negativo (ctrl. negativo). Resultados são apresentados na forma de media $\pm$ SD. Dados de dois experimentos independentes realizados em triplicata. P values (*p < 0,05, **p < 0,01) foram calculados por teste two-way Anova seguido pelo teste de Dunnet para comparações múltiplas pelo *software* GraphPad Prism.

Com esses testes foi possível validar o conjunto de metodologias de triagem para agonistas de PPAR β/δ e encontrar 2 *hits* (Extrato-2 e sua fração Extrato 2-18). Estes extratos poderão, após *resupply* pela Phytobios, seguir adiante para as etapas de caracterização de seus efeitos em células de pele.

4.4 Triagem semi-automatizada da biblioteca NIH – NCC

A biblioteca NIH-NCC foi escolhida para a realização de uma campanha de triagem semi-automatizada por conter compostos já foram utilizados em testes clínicos em humanos. Ou seja, caso fossem identificados como candidatos a *hits*, as informações sobre a segurança dessas moléculas já seriam conhecidas. O objetivo de utilizar esta biblioteca era buscar um “segundo-uso” para essas moléculas como ativadoras de PPAR β/δ .

4.4.1 Ensaio de transativação primário

Na primeira análise dos resultados da triagem com transativação celular, os tratamentos que provocaram citotoxicidade aparente foram descartados. Para este ensaio, embora tenha sido utilizado o mesmo lote de células e reagentes, e tenha sido observada ativação do PPAR β/δ pelo controle positivo, o fator Z' das placas não foram considerados adequados (Figura 39).

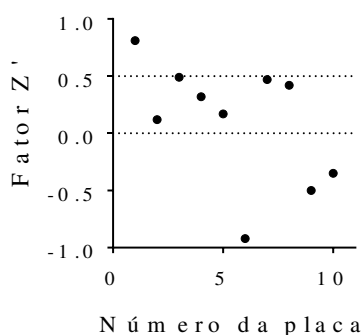


Figura 39. Fator Z' das dez placas de triagem da biblioteca NIH-NCC. Valores adequados de Z' devem ser maiores ou iguais a 0,5.

Durante a análise dos dados da transativação da biblioteca NIH-NCC foi observado que os controles negativos variaram pouco, logo o desvio padrão dos controles negativos foi pequeno (Figura 40 e Figura 41). Portanto, o parâmetro escolhido para uma molécula ser considerada ‘candidata a *hit*’ do PPAR β/δ foi possuir sinal *firefly/Renilla* 9 vezes maior que o desvio padrão do controle negativo. Sendo que para a placa 201-04 o desvio padrão observado apresentou baixa variação e foi preciso estabelecer o critério de possuir sinal *firefly/Renilla* 11 vezes maior que o desvio padrão do controle negativo. Essa alteração de critério possui a finalidade de excluir os próprios controles negativos como ‘candidatos a *hits*’, pois, quando o sinal *firefly/Renilla* dos controles negativos é muito constante, o desvio padrão se torna tão pequeno que mesmo multiplicando este valor por nove, a leitura do sinal do controle negativo acaba sendo selecionada como ‘candidato a *hit*’.

Na triagem da biblioteca NIH-NCC foram identificados 24 candidatos a *hits*, mais 3 agonistas comerciais GW501516, L-165,041 e Bezafibrato que não faziam parte da biblioteca, mas foram adicionados como controle (Figura 40 e Figura 41). O nome dos 24 compostos selecionados como candidatos a *hits* pode ser encontrado no APÊNDICE I (Tabela 10).

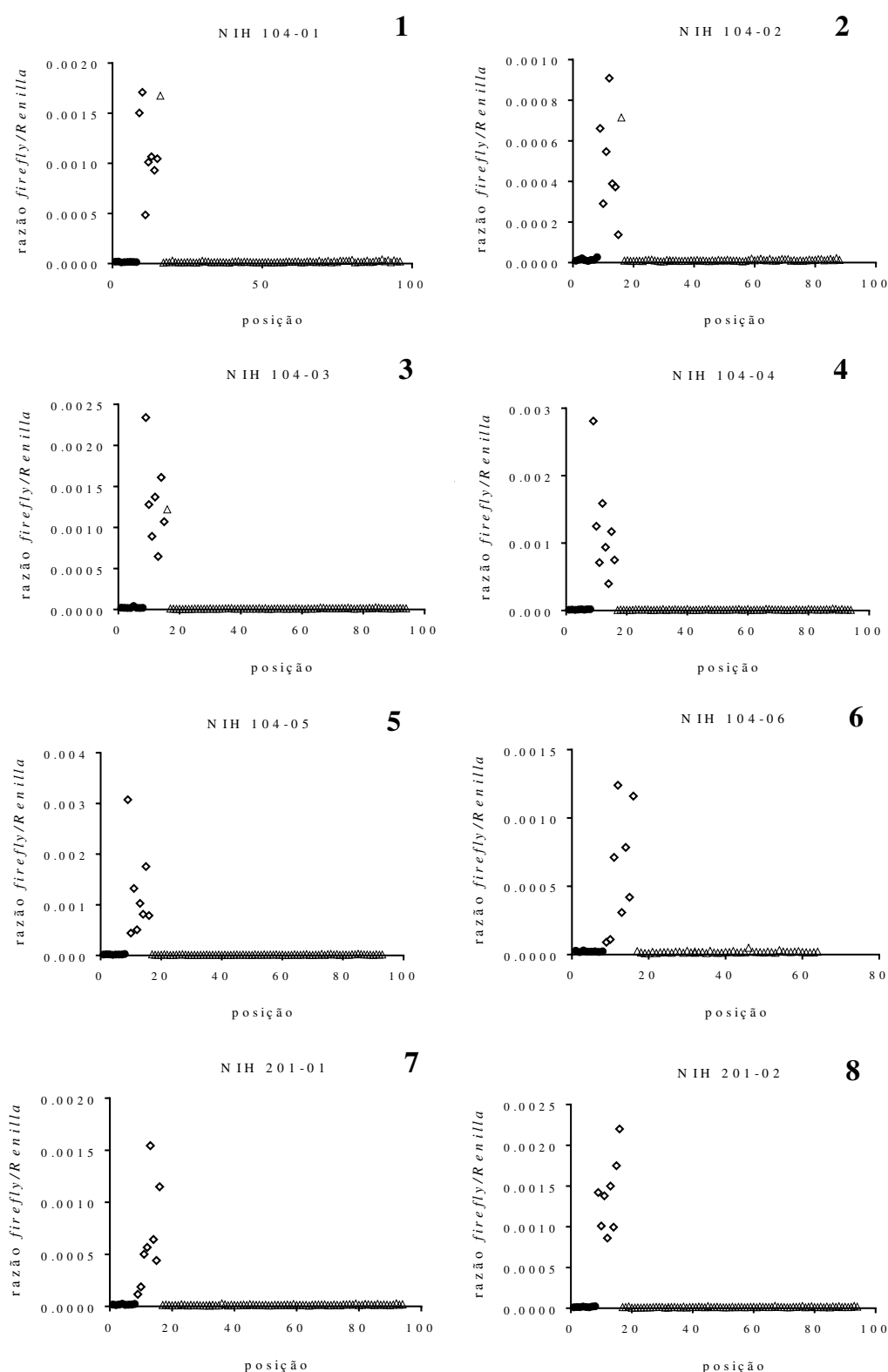


Figura 40. Ensaio de transativação primário da biblioteca NIH-NCC. **1-6:** 6 placas da biblioteca NCC-104. **7-8:** 2 placas da biblioteca NCC-201. • Controle negativo (1% DMSO), ◊ controle positivo (1 μ M GW0742), Δ compostos da biblioteca (1 μ M). Extratos que resultaram em sinal *firefly/Renilla* nove vezes maior que o desvio padrão do controle negativo foram considerados candidatos a *hits*.

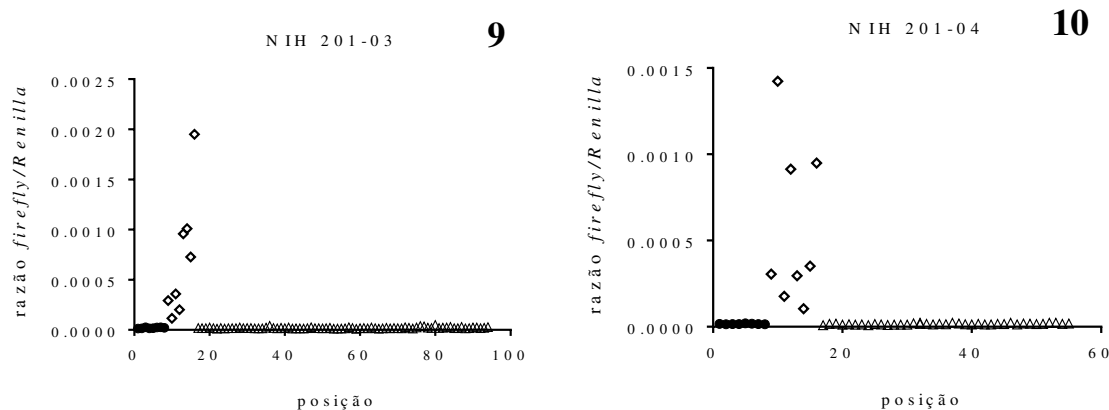


Figura 41. Ensaio de transativação primário da biblioteca NIH-NCC (parte II). **9-10:** 2 placas da biblioteca NCC-201. • Controle negativo (1% DMSO), $\diamond$ controle positivo (1 μ M GW0742), Δ compostos da biblioteca (1 μ M). Extratos que resultaram em sinal *firefly/Renilla* nove vezes maior que o desvio padrão do controle negativo foram considerados candidatos a hits.

4.4.1 Ensaio de transativação secundário e ensaios biofísicos

Foi realizado um ensaio de transativação secundário em triplicata para confirmação dos 24 candidatos a *hits* da biblioteca NIH-NCC selecionados no passo anterior. Apenas o Meloxicam foi confirmado no ensaio de transativação secundário, apresentando sinal *firefly/Renilla* acima do nosso critério de seleção de sete vezes o desvio padrão do controle negativo em pelo menos duas das três replicatas, e apresentando ativação do PPAR β / δ de 1,4X (Figura 42). O Meloxicam é um anti-inflamatório da família dos não-esteróides, utilizado para aliviar a inflamação e a dor. No entanto a variabilidade da triplicata e a baixa ativação média indicam que a ativação observada para o Meloxicam pode ser um falso-positivo, o que será melhor analisado na etapa seguinte do *pipeline* de triagem

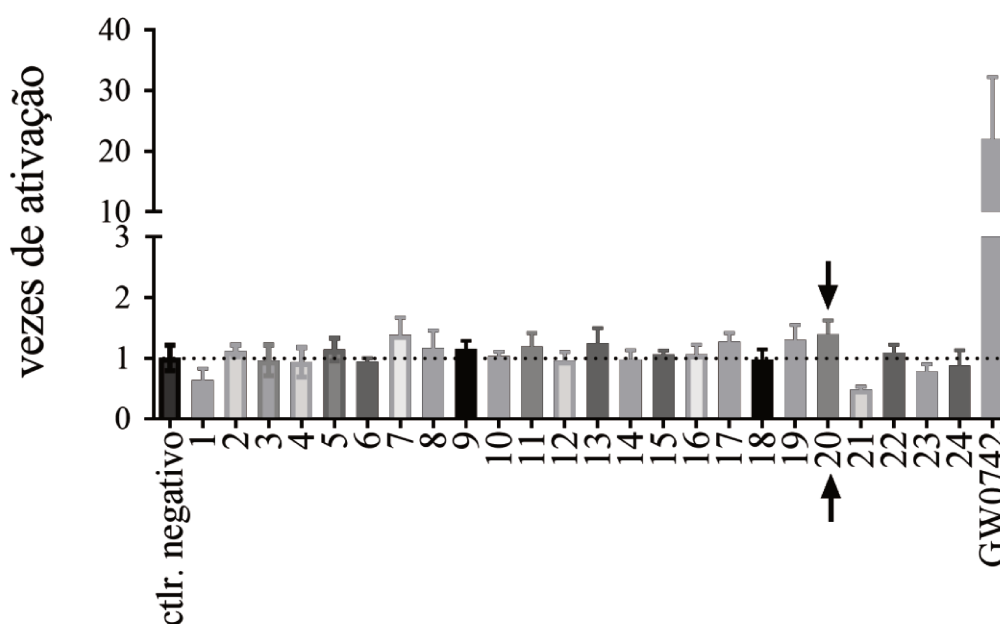


Figura 42. Triagem secundária dos candidatos a *hits* da biblioteca NIH- NCC. Ensaio de transativação confirmatório em triplicata. Controle positivo: 1 μ M GW0742, controle negativo (veículo, 1% DMSO), e 1 μ M dos candidatos a *hits*. Resultados são apresentados na forma de média $\pm$ SD. Foram considerados *hits* compostos que resultaram em sinal *firefly/Renilla* sete vezes maior que o desvio padrão do controle negativo para pelo menos duas das três replicatas. O *hit* (#20, Meloxicam) selecionado está indicado pelas setas.

Em seguida foi realizado um TSA para verificar se o Meloxicam estabiliza a estrutura terciária do PPAR β/δ (Figura 43). O agonista comercial GW0742 foi utilizado como controle positivo e provocou um deslocamento na T_m do receptor em relação a T_m do apo-PPAR β/δ de 7 $^{\circ}$ C. O TSA do Meloxicam com o PPAR β/δ resultou em uma T_m de $37,07 \pm 0,06$ $^{\circ}$ C, e o apo-PPAR β/δ apresentou uma T_m de $37,04 \pm 0,05$ $^{\circ}$ C.

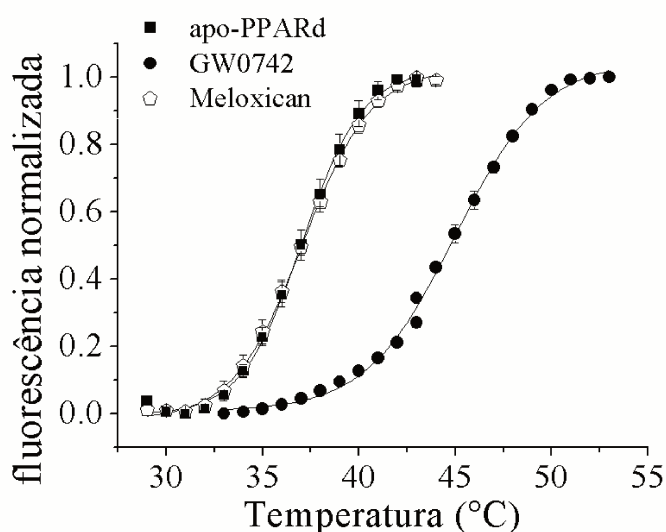


Figura 43. Ensaio de TSA do PPAR β/δ com Meloxicam. 10 μ M PPAR β/δ , 30 μ M GW0742, 100 μ M de Meloxicam. O experimento foi realizado em triplicata e analisado no *Software* OriginPro8 com realização de Boltzman para cálculo da T_m .

O Meloxicam não promoveu aumento da termoestabilidade da estrutura terciária do PPAR β/δ e, portanto, não seguiu para a próxima etapa da metodologia de triagem.

4.5 *Virtual screening* da biblioteca TimTec NDL-3,000

Com o objetivo de diminuir os custos das campanhas de triagem em busca de ligantes para o PPAR β/δ , decidimos avaliar o método de *Virtual Screening* (VS) para pré-seleção de moléculas com potencial de interação com nosso alvo, reduzindo o número de compostos que seriam submetidos ao *pipeline in vitro*. Por exemplo, a biblioteca de compostos isolados derivados semi-sintéticos de produtos naturais TimTec NDL-3,000 estava disponível para triagem, no entanto possuía 3039 compostos, que, formatados para nosso ensaio em microplacas de 96 poços, resultaria num total de 38 placas de teste, uma triagem inviável do ponto de vista financeiro.

Dessa forma, após um VS, os ensaios experimentais seriam realizados com uma menor quantidade de moléculas, de uma maneira mais racional, com informações *a priori* sobre a interação com o alvo, e com menor gasto de reagentes.

A biblioteca TimTec NDL-3,000 foi utilizada para testar o método de VS baseado em estrutura utilizando-se o programa Surflex 3.06 (BioPharmics LLC), e todas as estruturas do LBD de PPAR β/δ disponíveis no PDB.

4.5.1 *Preparo das estruturas*

Primeiramente foi realizada a preparação das moléculas da biblioteca TimTec NDL-3,000: todas as moléculas que possuíam estrutura SMILES definida (3028 moléculas) foram transformadas para o formato mol2. Em seguida, das estruturas de PPAR β/δ baixadas do PDB (Tabela 1, material e métodos), 20 delas foram selecionadas e 3 (PDB ID: 2GWXA, 2Q5G, 3DY6A) foram descartadas por não se adequarem aos critérios: (i) presença de ligante, necessário para o cálculo do protomol, e (ii) hélice 12 estruturada, pois é sabido que agonistas PPAR β/δ interagem com átomos dessa região (ARANDA; PASCUAL, 2001). As estruturas cristalográficas geralmente possuíam duas ou mais cadeias de PPAR β/δ , que foram separadas em monômeros para realização do VS, gerando 59 cadeias de monômeros de PPAR β/δ .

Para a realização do VS com o PPAR β/δ , optou-se por utilizar o maior número de cadeias disponíveis pois é sabido que o bolsão de ligação do ligante (LBP) é flexível e muda de conformação dependendo do ligante que está presente dentro do sítio (BOURGUET;

GERMAIN; GRONEMEYER, 2000; PRIVALSKY, 2004; WAHLI, 2002). Essa mudança de conformação do LBP devido a diferentes ligantes pode ser ilustrada por meio do programa KVFinder (Figura 44). Como dito anteriormente, as diferentes cadeias selecionadas para o VS foram extraídas de estruturas do PDB cristalizadas na presença de ligantes no LBP, e estes promoverem diferentes mudanças conformacionais nas cavidades das cadeias (Figura 44 B e C).

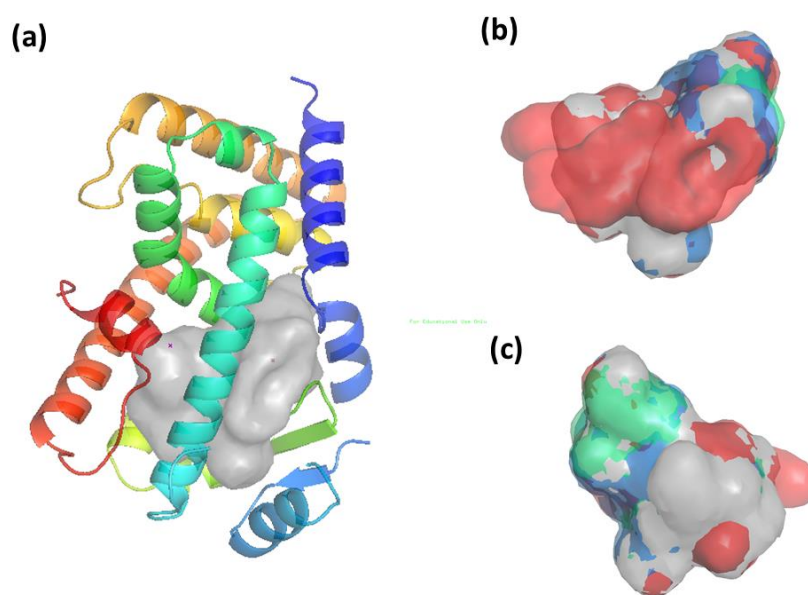


Figura 44. Cavidades do LBD de diferentes cadeias de PPAR β/δ determinadas pelo *software* KVFinder. (a) Representação da cadeia c0p2910 do PPAR β/δ e sua respectiva cavidade em cinza. (b) Sobreposição das cavidades das cadeias c0p2910 (cinza), c0p2310 (vermelho), c0p1811 (azul) e c0p411 (verde). (c) Sobreposição das cavidades rotacionada 180 ° no eixo y.

Devido ao fato dos métodos de *docking* utilizarem a estrutura rígida da proteína, o uso do maior número de cadeias de PPAR β/δ disponíveis permite abranger a maior quantidade possível de conformações do LBP do receptor. Essa abordagem contorna o problema de falta de flexibilidade da estrutura durante o *docking* e aumenta as chances do VS encontrar uma conformação de cadeia pela qual as moléculas testadas tenham maior afinidade e melhor *score*.

4.5.2 Primeira abordagem de virtual screening

Em seguida, realizamos o alinhamento das estruturas selecionadas, por meio do comando “psim_align_all” do Surflex-Dock. Esse comando alinha todas as proteínas contra todas, baseado pelo sítio de ligação, e resulta em árvores hierárquicas de similaridade entre as

proteínas (CLEVES; JAIN, 2015a). Após análise das árvores hierárquicas, 11 cadeias foram excluídas por não se alinharem, totalizando 48 cadeias utilizadas para o VS.

O primeiro VS foi realizado utilizando as estruturas de 3039 moléculas (3028 moléculas da biblioteca TimTec NDL-3,000 + as estruturas dos agonistas GW0742, GW501516, L-165,041 e Bezafibrato) contra uma lista com todas as 48 cadeias de PPAR β/δ . Nesta abordagem de VS, como resultado foram reportadas as três melhores poses para cada uma das moléculas, sem distinção de com qual cadeia essas poses foram geradas. Foi feita uma lista com o *score* da melhor pose de todas as 3032 moléculas e, a partir desta lista, foram selecionadas apenas as moléculas que apresentavam *score* maior ou igual a 7,00, pois esta pontuação correlaciona-se com o Kd na ordem de micromolar em ensaios de afinidade experimentais (JAIN, 2003). Devido a este critério, 2107 moléculas que possivelmente interagiriam com o LBP do PPAR β/δ foram selecionadas (Figura 45).

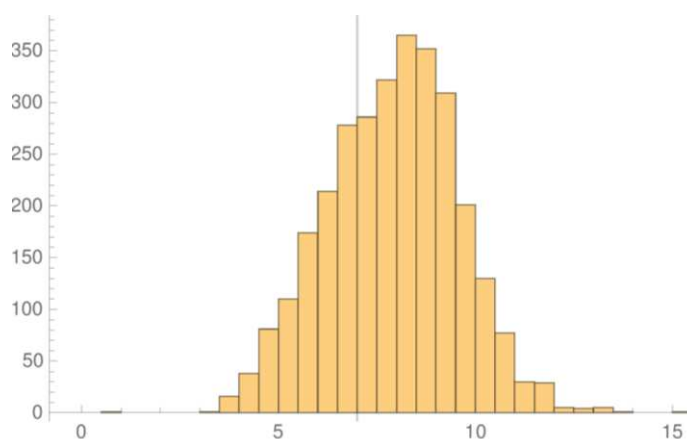


Figura 45. Histograma dos *scores* obtidos para cada uma das 3043 moléculas no *docking* com o PPAR β/δ . Foram selecionadas para a próxima etapa as moléculas com *score* maior que 7,00.

Com esta primeira abordagem de *docking* o tamanho da biblioteca foi restringido em 30%, sendo que foram selecionadas 2107 moléculas das 3032 moléculas iniciais. No entanto, esta abordagem não informava se as poses de mais alto *score* poderiam ser obtidas com um número variado de cadeias (diferentes conformações) de PPAR β/δ ou com apenas uma cadeia específica.

4.5.3 Segunda abordagem de virtual screening

Com o intuito de confirmar se o *score* 7,00 obtido na primeira abordagem representa uma afinidade contra o maior número de conformações de cadeias, e com o intuito de reduzir o número de moléculas que seguiriam para as etapas experimentais *in vitro*, foi

realizada uma segunda abordagem que utiliza o *docking* ‘pscreen’ independente para cada uma das 2107 moléculas e cada uma das 48 cadeias. Por meio dessa abordagem, uma lista com os valores de *score* de cada molécula para cada uma das 48 estruturas foi organizada, e, a partir dessa lista, foram selecionadas as moléculas que possuíam a mediana dos *scores* maior que 7,0, isto é, moléculas que possuíam elevada pontuação com o maior número de conformações de cadeias de PPAR β/δ (Figura 46). Utilizando-se esse segundo critério foram selecionadas 81 moléculas das 2107 pré-selecionadas, restringindo o conjunto de moléculas que seriam submetidas ao ensaio experimental para apenas 2,67% do conjunto inicial de moléculas (Tabela 5). No entanto, os agonistas comerciais específicos para PPAR β/δ , GW0742 e GW501516, e o pan-agonista Bezafibrato, não foram selecionados por este critério. Esses agonistas foram adicionados ao *dataset* como controles positivos do método de *docking*; no entanto, com os parâmetros utilizados, eles não foram selecionados, indicando que os parâmetros avaliados no *docking* podem não ser os mais adequados para se encontrar ligantes de PPAR β/δ .

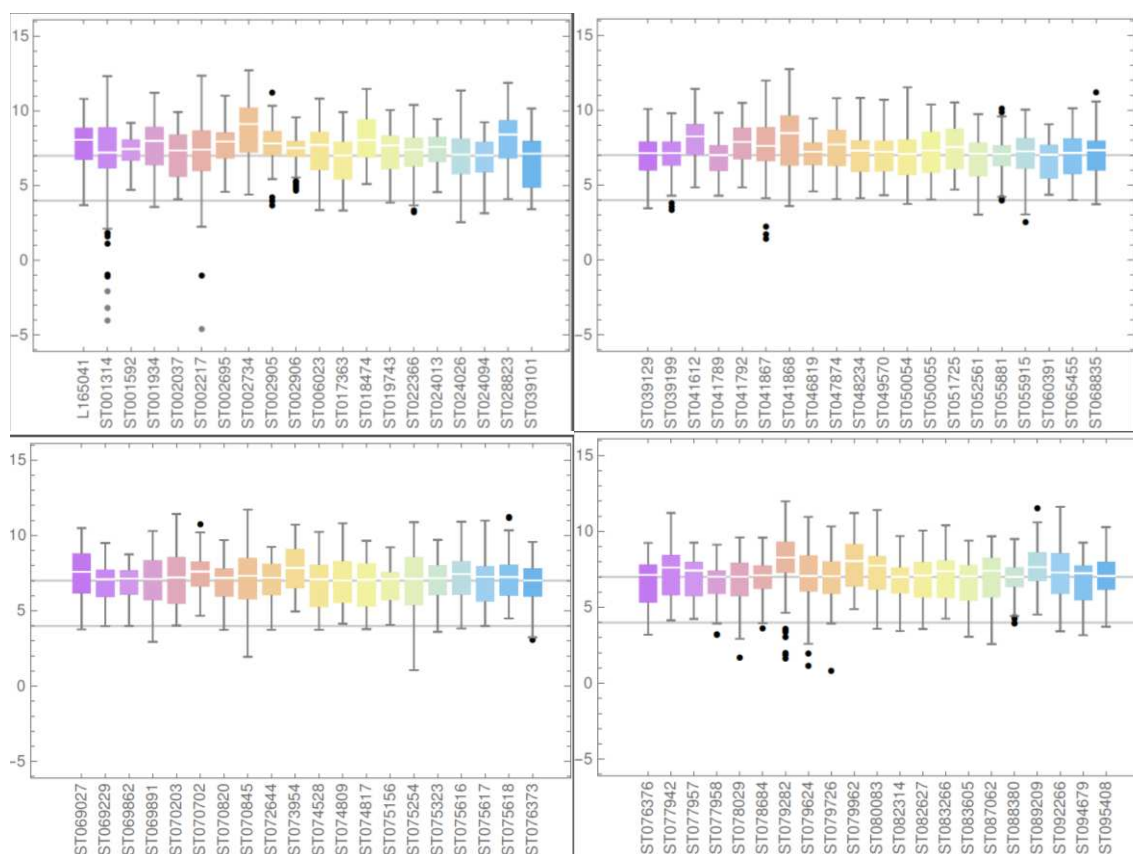


Figura 46. Boxplot das moléculas com *score* mediano maior que 7,00 para o *docking* em PPAR β/δ . Foram identificadas 81 moléculas com *score* mediano maior que 7,00.

Tabela 5. Lista de moléculas selecionadas no *virtual screening*.

L165041	ST028823	ST080083	ST079624	ST069891	ST022366	ST055881	ST002906	ST069229
ST041868	ST092266	ST068835	ST082314	ST073954	ST083266	ST039129	ST070820	ST077957
ST002734	ST070845	ST041789	ST075616	ST049570	ST082627	ST019743	ST087062	ST046819
ST002217	ST079962	ST002905	ST075254	ST051725	ST079726	ST074817	ST078029	ST076376
ST001314	ST024026	ST075618	ST070702	ST041792	ST055915	ST002037	ST001592	ST083605
ST018474	ST089209	ST077942	ST048234	ST069027	ST095408	ST017363	ST078684	ST072644
ST079282	ST070203	ST001934	ST006023	ST024013	ST074528	ST060391	ST076373	ST075156
ST041867	ST050054	ST002695	ST047874	ST065455	ST039199	ST052561	ST094679	ST077958
ST050055	ST041612	ST075617	ST074809	ST075323	ST039101	ST024094	ST088380	ST069862

Dentre as 80 moléculas selecionadas na segunda rodada de VS, destacamos cinco delas (ST002734, ST041868, ST079282, ST018474, ST028823) (Figura 47) com a maior mediana de valor de *score* para ilustrar a pose prevista dessas moléculas dentro do LBP do receptor (Figura 48). É possível observar que algumas moléculas tiveram a pose predita próxima a hélice 12 (em vermelho) do receptor (Figura 48B, C e D), similar a pose do GW042 na estrutura cristalográfica (Figura 48 A), indicando um possível efeito agonista no PPAR β/δ . Outras moléculas, como a ST018474 e a ST028 823 (Figura 48E e F) foram posicionadas no *docking* no fundo do LBP, o que pode indicar que elas se ligam, mas não provocam ativação do receptor. Como nosso *pipeline* de triagem é voltado para a busca de agonistas de PPAR β/δ , pode ser que essas moléculas não apresentem atividade no ensaio de transativação celular.

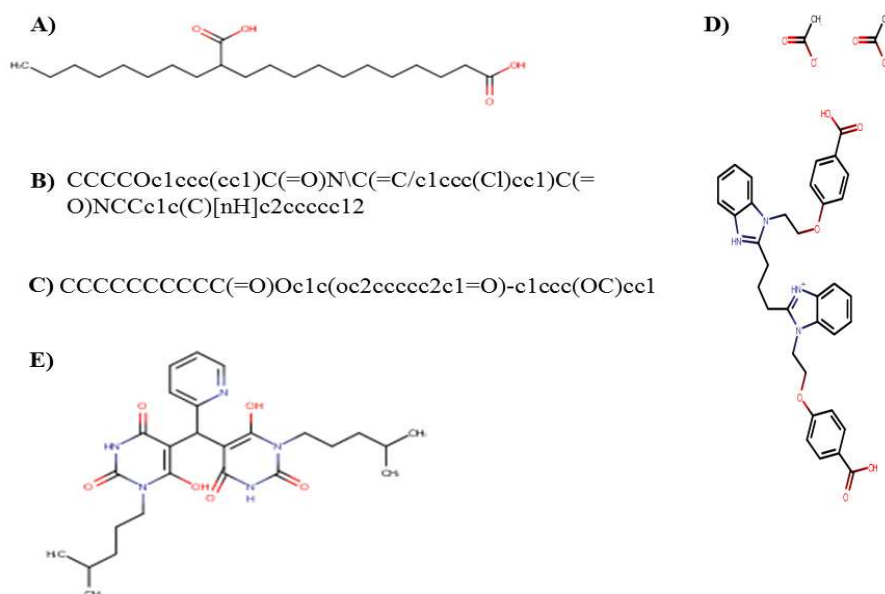


Figura 47. Estruturas das moléculas de elevado *score* no LBD da cadeia de PPAR β/δ A) ST002734, B) ST041868 (não havia estrutura disponível), C) ST079962 (não havia estrutura disponível), D) ST018474, E) ST028823.

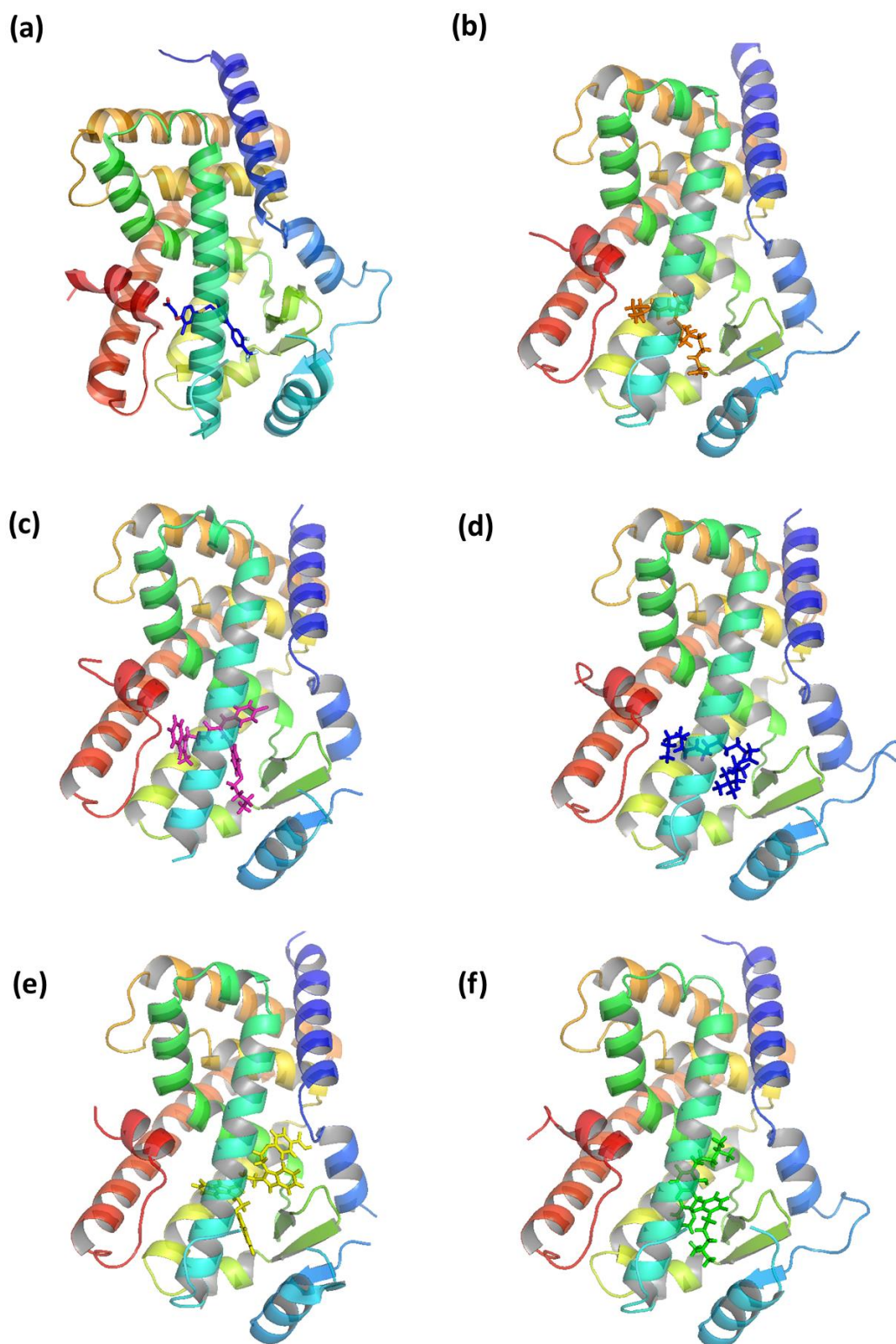


Figura 48. Poses de moléculas de elevado *score* no LBD da cadeia de PPAR β/δ com a qual obtiveram a melhor pontuação. A) Para efeito de comparação com o VS, estrutura cristalográfica do ligante GW0742 (PDB ID 3TKM), e modelo previsto no *docking* para as moléculas. B) ST002734 com a cadeia c0p711, C) ST041868 com a cadeia c0p411, D) ST079962 com a cadeia c0p1811, E) ST018474 com a cadeia c0p210, F) ST028823 com a cadeia c0p3210.

4.5.4 Ensaios de transativação primário e secundário

As 80 moléculas da biblioteca TimTec NDL-3,000 selecionadas no segundo VS foram gentilmente cedidas pelo Dr. Artur Cordeiro (Laboratório de Ensaios Enzimáticos – LDEE/LNBIO) e foram submetidas ao conjunto de métodos *in vitro* para triagem de ligantes para o PPAR β/δ . Após o primeiro ensaio da metodologia de triagem, o ensaio de transativação primário, 23 moléculas foram identificadas como candidatas a *hits* do PPAR β/δ pelo nosso critério de seleção. As 23 moléculas selecionadas neste ensaio de transativação ativaram o receptor de 2,17 a 5,34X em relação as células tratadas com o veículo, neste ensaio o controle positivo (GW0742) ativou o receptor 41,66X (Figura 49).

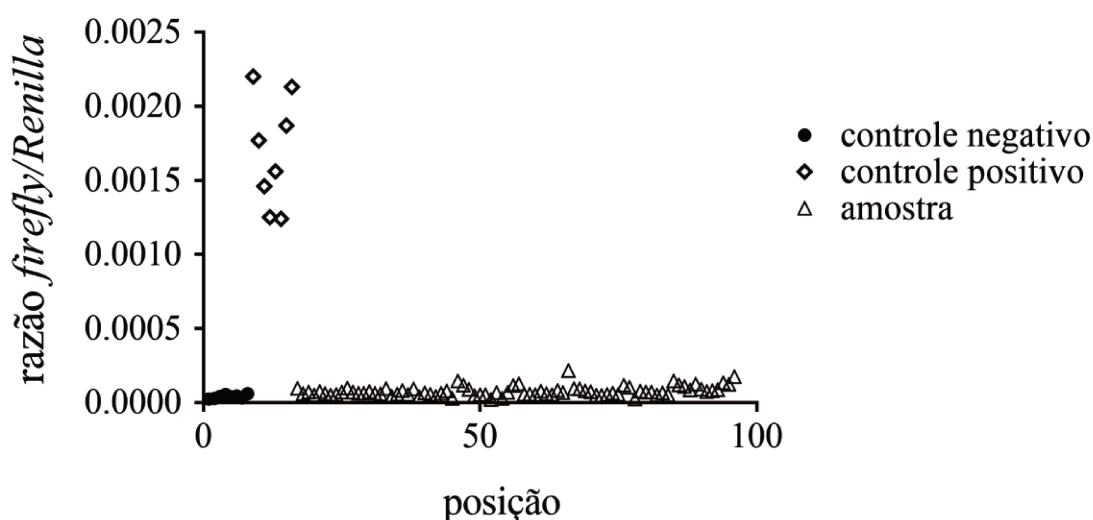


Figura 49. Ensaio de transativação do PPAR β/δ com as moléculas da biblioteca TimTec triadas pelo *virtual screening*. • Controle negativo (1% DMSO), ◇ controle positivo (1 μ M GW0742), Δ compostos da biblioteca (1 μ M). Foram considerados candidatos a *hits* extratos que resultaram em sinal *firefly/Renilla* sete vezes maior que o desvio padrão do controle negativo.

As 23 moléculas selecionadas no ensaio de transativação primário foram submetidas a um ensaio de transativação confirmatório em triplicata. Nesse ensaio não foi adicionado o agonista comercial L-165,041, pois já é sabido que este provoca ativação no PPAR β/δ (OLIVER et al., 2001). No entanto, após este segundo ensaio, nenhuma das moléculas apresentou sinal *firefly/Renilla* elevado para ser selecionada por nosso critério (Figura 50) e, portanto, não seguiram adiante para os demais passos do conjunto de metodologias de triagem. O controle positivo de 1 μ M de GW0742 funcionou com 9,54X de ativação e o Fator Z' foi de 0,62. O funcionamento do controle positivo e o Fator Z' da placa indicam que o experimento funcionou e, no entanto, para nenhuma das moléculas triadas foi confirmada a ativação do

PPAR β/δ . Entretanto, o método de *docking* realizado pode selecionar moléculas que interajam com o LBP do receptor, mas que não façam interações estabilizando a hélice 12, ou seja, moléculas que se liguem ao PPAR β/δ mas que não tenham funções agonistas, não proporcionando a ativação do receptor.

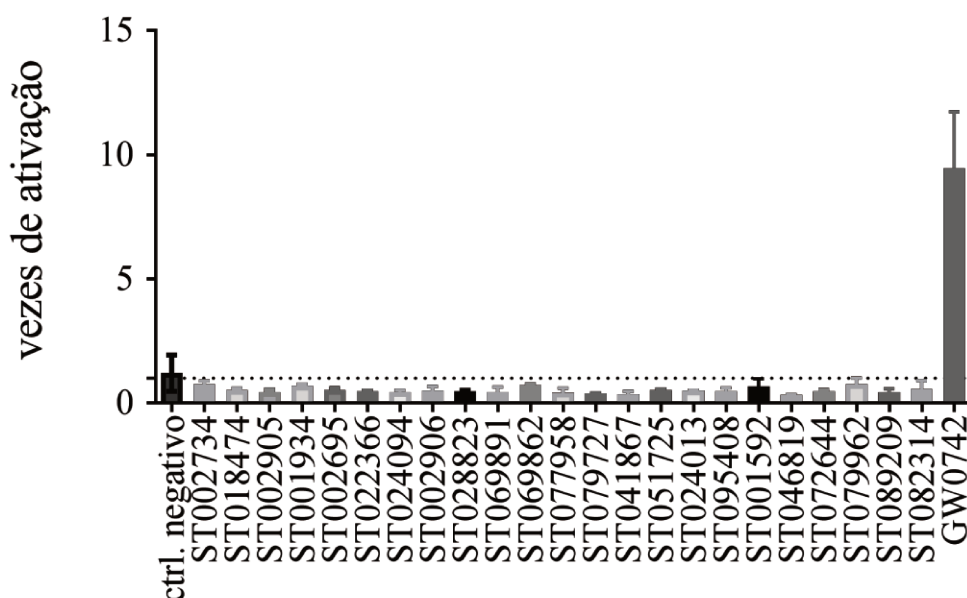


Figura 50. Ensaio de Transativação Confirmatório para os candidatos a *hits* da biblioteca TimTec. Controle positivo: 1 μ M GW0742, controle negativo (veículo): 1% DMSO, e 1 μ M dos candidatos a *hits*. Resultados são apresentados na forma de média $\pm$ SD. Critério de seleção sinal *firefly/Renilla* sete vezes maior que o desvio padrão do controle negativo para pelo menos duas das três replicatas.

Para seleção de moléculas com elevado *score*, mas com potencial de ativação do receptor, este *docking* deveria ser direcionado para desfavorecer poses no fundo do sítio, selecionando moléculas que interajam com a hélice 12 de maneira que esta feche a entrada do sítio, conforme descrito na Figura 5 (LAUDET; GRONEMEYER, 2001).

4.5.5 Discussão geral do virtual screening

Apesar da alta expectativa de sucesso com o ensaio de VS, alguns comentários merecem atenção. Para o PPAR β/δ , os parâmetros utilizados com programa Surflex não se mostraram muito eficientes, pois o VS não foi capaz de selecionar os agonistas de alta afinidade GW0742 e GW501516, sendo que o GW0742 possui estrutura cristalográfica dentro do LBP do receptor (PDB ID 3TKM) (BATISTA et al., 2012).

Na literatura, o programa Surflex também não foi muito eficiente para realizar o *cross-docking* com isotipo PPAR γ , isto é, utilizar detalhes da ligação entre um ligante co-cristalizado com o receptor (ligante de treinamento) para prever poses de moléculas

desconhecidas (moléculas de teste) (CLEVES; JAIN, 2015a). No trabalho em questão, o PPAR γ foi um ponto fora da reta no quesito performance mesmo variando-se os parâmetros de *docking*. Enquanto para outras proteínas a melhor taxa de sucesso foi cerca de 85% para as 5 melhores poses, para o PPAR γ a taxa foi de 39%. Cleves e Jain, em 2015, discutiram que o sítio ativo do PPAR γ é de grande volume (1400 Å³) e os ligantes testados possuíam moderada flexibilidade, as quais eram bem diferentes dos ligantes de treinamento, o que gerou uma grande diversidade de possíveis interações entre o sítio ativo da proteína e os ligantes de teste. As dificuldades em se realizar *docking* com o PPAR γ devido ao seu grande LBP também foram discutidas em outros trabalhos (ITOH et al., 2008). O PPAR β/δ também possui um grande LBP (cerca de 1300 Å³) (BATISTA et al., 2012), o que pode dificultar o *docking* de moléculas em seu sítio ativo.

Em um estudo de VS com o PPAR β/δ utilizando-se o *software* DOCK 3.5.54, não foi descrito o uso dos agonistas comerciais como controles positivos da capacidade preditiva da interação entre LBP da proteína e a molécula (MALTAROLLO et al., 2015), dificultando a comparação entre esse e o nosso trabalho. Neste mesmo estudo, as moléculas selecionadas no VS, foram submetidas a um *re-docking* utilizando dois programas diferentes de *docking*, o Surflex e o GOLD 3.1.

Essa abordagem de *re-docking* das moléculas selecionadas no VS, antes de partir para os experimentos *in vitro*, é muito interessante. Programas diferentes de *docking* utilizam parâmetros diferentes para cálculo do *score*, e, por isso, podem trazer resultados discrepantes (MALTAROLLO et al., 2015). O uso de mais de um programa para o *re-docking* acompanhado da seleção de moléculas mediante um consenso entre as poses melhor qualificadas é uma boa abordagem para validar as moléculas selecionadas no VS e evitar falso-positivos. Talvez a alta taxa de falso-positivos encontrada em nosso VS com a biblioteca TimTec possa ser explicada pela ausência de validação por intermédio de *re-docking* antes dos ensaios *in vitro*. Futuramente, tal abordagem será aplicada em ensaios de VS em nosso grupo, bem como uma cuidadosa avaliação visual da interação entre as moléculas e os aminoácidos do LBP do receptor.

Apesar das limitações de VS e da impossibilidade de ele substituir o HTS completamente, os dois métodos podem ser abordagens complementares na busca de candidatos para o desenvolvimento de fármacos. Um VS cuidadoso, analisando-se e testando diferentes parâmetros e programas, pode reduzir o número de moléculas a serem submetidas ao ensaio de HTS, restringindo às etapas experimentais *in vitro* apenas moléculas com potencial de apresentar afinidade para o alvo.

4.6 Conclusão parcial

O primeiro resultado deste projeto de doutorado foi a padronização de um pipeline de triagem para agonistas de PPAR β/δ formado por uma triagem primária com ensaio de transativação celular, um ensaio de transativação secundário para confirmação dos *hits*, seguido por dois experimentos biofísicos para caracterização da interação entre as moléculas triadas e a proteína. Particularmente, as principais inovações no *pipeline* de ensaios propostos são a redução do comprimento e do volume do ensaio de transativação; o tipo celular escolhido; a automação de algumas etapas; e a adição de métodos de validação biofísica, em comparação com outros métodos propostos de transativação PPAR β/δ . Além disso, os ensaios aqui propostos foram validados com três agonistas altamente específicos para PPAR β/δ (GW0742, GW501516 e L-165,041) e pelo fator de confiabilidade de HTS, o fator Z'. Em resumo, a proposição desta sequência de ensaios é uma ferramenta robusta, mais barata e mais rápida para identificar os agonistas de PPAR β/δ , sendo recentemente publicado na revista *PPAR Research* (VIDEIRA et al., 2018).

No total, 840 compostos isolados e 560 extratos foram submetidos ao racional de triagem *in vitro* para agonistas de PPAR β/δ . Destas 1400 amostras, 65 (4,42%) foram selecionadas no ensaio primário de transativação e 12 (0,86% do total) foram confirmadas no ensaio de transativação confirmatório. Em seguida, foi realizado o ensaio de caracterização biofísica de TSA com os 12 *hits* selecionados. Nesta etapa, 2 compostos (AN11 e Meloxicam) não promoveram estabilização da estrutura terciária do PPAR β/δ . Dois extratos da biblioteca Phytobios promoveram aumento na T_m do receptor no ensaio de TSA, e para um deles (Extrato 2) foi calculado a K_{dapp} com o ensaio de supressão de fluorescência do ANS. Os resultados referentes a essa parte da triagem da biblioteca Phytobios foram recentemente publicados por nós na revista *PPAR Research* (VIDEIRA et al., 2018). O Extrato 2 foi fracionado para tentarmos isolar os compostos com atividade biológica para o PPAR β/δ . Após o fracionamento, foi encontrada 1 fração (Extrato 2-18) que apresentou ativação e estabilização da estrutura terciária do receptor, com a qual também foi possível o cálculo da K_{dapp} .

O método de *Virtual Screening* (VS) foi realizado com o intuito de ser uma etapa de pré-seleção de compostos que seguiriam para os métodos *in vitro* de triagem de ligantes para o PPAR β/δ . A biblioteca TimTec NDL-3,000 de 3039 compostos foi escolhida para teste do método de VS utilizando-se o programa Surflex 3.06. Por meio da primeira abordagem de *docking* foram selecionadas 2107 moléculas com o *score* da melhor pose maior ou igual a 7,00, reduzindo a quantidade de moléculas em teste para 70% do conjunto inicial. Em seguida, uma

segunda abordagem de VS (todas as moléculas contra todas as estruturas de proteínas), permitiu a seleção de 80 moléculas que possuíam a mediana de todos os *scores* maior que 7,00, restringindo o conjunto de moléculas em teste para 2,7% do conjunto inicial. Apenas essas 80 moléculas foram submetidas ao racional *in vitro* de triagem, ou seja, o VS possibilitou uma redução de cerca de 97% em reagentes e custos, ao selecionar apenas moléculas com potencial para interagir com o LBP do PPAR β/δ . Dessas 80 moléculas, 23 delas submetidas ao ensaio de transativação secundário. No entanto nenhuma delas foi confirmada neste ensaio em triplicata. Os parâmetros utilizados no VS ainda precisam ser otimizados para este método ser aplicado para a triagem de ligantes agonistas para o PPAR β/δ .

Em resumo, foi desenvolvido e testado um racional de triagem de agonistas de PPAR β/δ que confere informações celulares de ativação do receptor e informações biofísicas de estabilização e de afinidade entre as amostras testadas e a proteína. Este *pipeline* pode ser aplicado também para a busca de agonistas para outros receptores nucleares que aceitem diferentes ligantes em seu sítio.

CAPÍTULO V: RESULTADOS E DISCUSSÃO DA CARACTERIZAÇÃO DA MODULAÇÃO DO PPAR BETA/DELTA EM CÉLULAS DE PELE

Os papéis do PPAR β/δ na regulação da proliferação e diferenciação dos queratinócitos e no reparo da pele são bem caracterizados em camundongos e em cultura de queratinócitos primários desses animais (HAM et al., 2009; KIM et al., 2006; MICHALIK et al., 2001; SCHMUTH et al., 2004; TAN et al., 2007; WANG et al., 2015). Em humanos, no entanto, há menos relatos sobre os papéis PPAR β/δ em pele, devido a dificuldade em realizar modelos de experimentação com tecidos humanos. É possível encontrar alguns relatos com cultura de queratinócitos primários humanos, demonstrando que o tratamento com ligantes de PPAR β/δ aumenta a expressão de colágeno tipos I e III (HAM et al., 2009) e de marcadores de diferenciação, como a involucrina (SCHMUTH et al., 2004; WESTERGAARD et al., 2001).

Embora os queratinócitos primários humanos sejam o modelo celular de escolha para estudar mecanismos moleculares de diferenciação epidérmica em cultura celular, o uso de células primárias é difícil na prática, porque estas possuem crescimento lento e não podem ser cultivadas por muitas passagens. Portanto, ao desenvolver campanhas de triagem para descoberta de medicamentos, o uso de linhagens de células imortalizadas é mais recomendável, devido a seu rápido crescimento e alta viabilidade. Tendo em vista futura aplicação em campanhas de desenvolvimento de ligantes de PPAR β/δ , foi decidido estudar o papel da ativação e inibição farmacológica d em uma linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados, HaCaT.

5.1 Proliferação de queratinócitos

Existem relatos na literatura mostrando que animais PPAR β/δ -deficientes possuem proliferação aumentada de queratinócitos (MAN et al., 2008; MICHALIK et al., 2001), e que queratinócitos primários de camundongo tratadas com o agonista de PPAR β/δ , GW0742, tiveram proliferação diminuída (KIM et al., 2006), indicndo um possível papel do receptor no controle do processo de proliferação.

O objetivo deste ensaio foi analisar os efeitos da ativação ou inibição farmacológica do PPAR β/δ na proliferação de uma linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT), tratando estas células com diferentes concentrações (0,5 μ M, 1 μ M e 5 μ M) dos agonistas

GW0742, GW501516 e L-165,041, e com 5 μ M do antagonista GSK0660. Como a deficiência de PPAR β/δ provocou um aumento na proliferação de queratinócitos, a hipótese inicial testada era de que a ativação do receptor poderia provocar uma diminuição na proliferação celular.

No experimento de proliferação mensurando a incorporação do desoxirribonucleosídeo modificado EdU, foi observada uma diminuição de 25% e 35% da proliferação quando utilizado 5 μ M dos agonistas GW501516 e L-165,041, respectivamente, sugerindo que a ativação do PPAR β/δ pode reduzir a proliferação celular em células HaCaT (Figura 51). No entanto, a diminuição da proliferação celular não foi considerada dose-dependente, pois a mesma não foi observada em doses menos concentradas (0,5 μ M e 1 μ M) dos agonistas GW501516 e L-165,041. Para as diferentes concentrações de GW0742 (0,5 μ M, 1 μ M e 5 μ M) e para a concentração de 5 μ M de GSK0660, não foram observadas alterações na proliferação de queratinócitos. A verificação da ativação e repressão do PPAR β/δ pelos ligantes pode ser encontrada no APÊNDICE J (Figura 65).

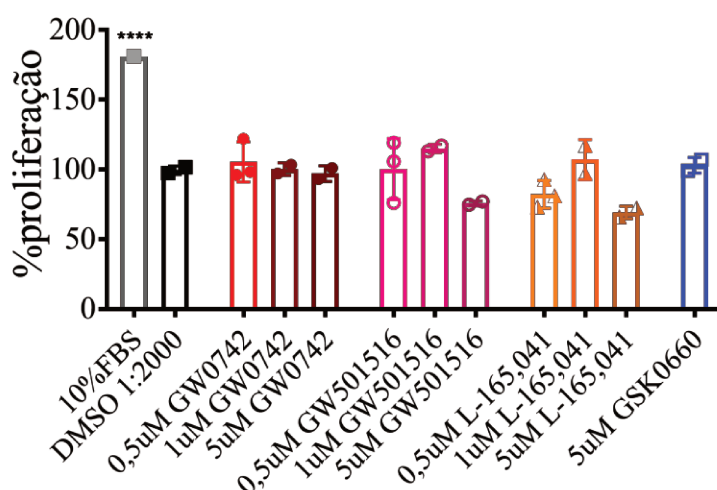


Figura 51. Experimento de incorporação de EdU para medida de proliferação de células HaCaT. Foram testadas três diferentes concentrações (0,5 μ M, 1 μ M e 5 μ M) de cada um dos agonistas (GW0742, GW501516, L-165,041), e 5 μ M do antagonista GSK0660. 10% FBS foi utilizado como controle positivo para proliferação de HaCaT. Dados de 3 experimentos independentes, cada símbolo representa um experimento independente, barras: SD. A análise estatística realizada foi 2-way Anova seguida de teste de múltiplas comparações de Dunnet (****p < 0,0001).

Para esse ensaio de proliferação, as células foram incubadas com os tratamentos (agonistas, antagonista ou veículo) em meio suplementado com 2% de FBS, ao invés de 10% FBS, pois os fatores de crescimento presentes no soro (10% FBS em meio de cultura) poderiam mascarar o impacto que a modulação do PPAR β/δ causa na proliferação. É possível notar que nossa hipótese estava correta, o tratamento das células com DMEM 2% FBS *per se* diminuiu a proliferação das células em relação ao uso do meio de cultura com 10% FBS. O tratamento com

10% de soro funciona como um controle positivo do experimento, mostrando que o protocolo de incorporação de EdU é capaz de distinguir entre poços da placa com menor ou maior proliferação celular. Este tratamento, assim como o uso de 5 μ M de GW501516 ou L-165,041, pode ser utilizado como controle positivo do experimento, em futuros testes de caracterização de novos ligantes para o PPAR β/δ .

Comparando com dados da literatura, apenas um outro estudo demonstra a diminuição da proliferação em células HaCaT via modulação de PPAR β/δ (BORLAND et al., 2008). No entanto, esse estudo foi realizado por contagem de células tratadas com meio sem suplementação de FBS, e mostra uma diminuição da proliferação com 1 e 10 μ M dos agonistas GW0742 e GW501516 (BORLAND et al., 2008). É importante destacar que a diminuição da proliferação com 1 μ M de agonistas foi observada apenas após 96h de tratamento com o ligante. Os resultados apresentados nesta tese demonstraram que foi necessário 5 μ M dos agonistas GW501516 e L-165,041 para a diminuição da proliferação celular no tempo de incubação de 65h. Essa concentração foi utilizada como intermediária entre 1 e 10 μ M, pois a utilização de 10 μ M de agonistas pode não causar a ativação direta de PPAR β/δ , mas sim uma ativação inespecífica de outros alvos, resultando em uma regulação indireta de PPAR β/δ .

Em relação a outras linhagens de queratinócitos humanos, o tratamento com agonistas de PPAR β/δ mostrou a diminuição da proliferação de células NCTC 2544 (MARTINASSO et al., 2006) e N/TERT-1 (BURDICK et al., 2007). Por outro lado, Liang e colaboradores mostraram que o agonista L-165,041 aumenta a proliferação de células HaCaT. Devido a todos os relatos encontrados na literatura, o efeito da ativação de PPAR β/δ em células imortalizadas de queratinócitos humanos é considerado controverso, pois depende do tipo celular, do tipo e concentração do agonista, do tempo de incubação e do tipo de ensaio realizado.

Os resultados permitem concluir que o protocolo de proliferação em células HaCaT pode ser utilizado para a triagem e caracterização inicial de ligantes que aumentem ou diminuam a proliferação neste tipo celular. Em seguida, os ligantes que alterarem a proliferação de células HaCaT devem ser testados também em culturas primárias de queratinócitos ou em outras linhagens para que suas atividades sejam melhor caracterizadas.

5.2 Migração celular

Outra abordagem utilizada neste trabalho foi a análise do possível impacto de ligantes de PPAR β/δ na migração 2D de células HaCaT, método mimetizador *in vitro* do

processo de epitelização ocorrido na cicatrização de feridas. Neste experimento, as células são cultivadas até a confluência e, então, um arranhão é feito com a ajuda de um raspador ou ponteira, criando uma zona livre de células. Essas, então, iniciam um movimento migratório para fechar a lacuna e estabelecer novas conexões célula-célula.

Para o experimento de migração, foram utilizados tanto 0,5 μM de agonistas de PPAR β/δ (GW0742, GW501516 e L-165,041), quanto 5 μM do antagonista de PPAR β/δ GSK0660. Os resultados observados são independentes dos efeitos dos ligantes na proliferação celular, pois, como foi descrito anteriormente (Figura 51), 0,5 μM de agonistas e 5 μM do antagonista GSK0660 não provocaram alteração na proliferação de células HaCaT. Desta forma, os resultados observados no experimento de migração são relacionados apenas aos efeitos dos ligantes de PPAR β/δ na capacidade de migração das células (Figura 52).

Foi observado que o tratamento com os agonistas (GW0742, GW501516 e L-165,041) resultaram num aumento significativo na taxa de fechamento de feridas quando comparado com DMSO (Figura 52 e Figura 53), indicando que a ativação do PPAR β/δ pode ser relevante também para o processo migratório de queratinócitos HaCaT. O tratamento com o antagonista GSK0660 não provocou alterações significativas (p valor = 0,1473) na taxa de migração das células HaCaT comparadas com o controle (DMSO). A verificação da ativação e repressão do PPAR β/δ pelos ligantes pode ser encontrada no APÊNDICE J (Figura 66).

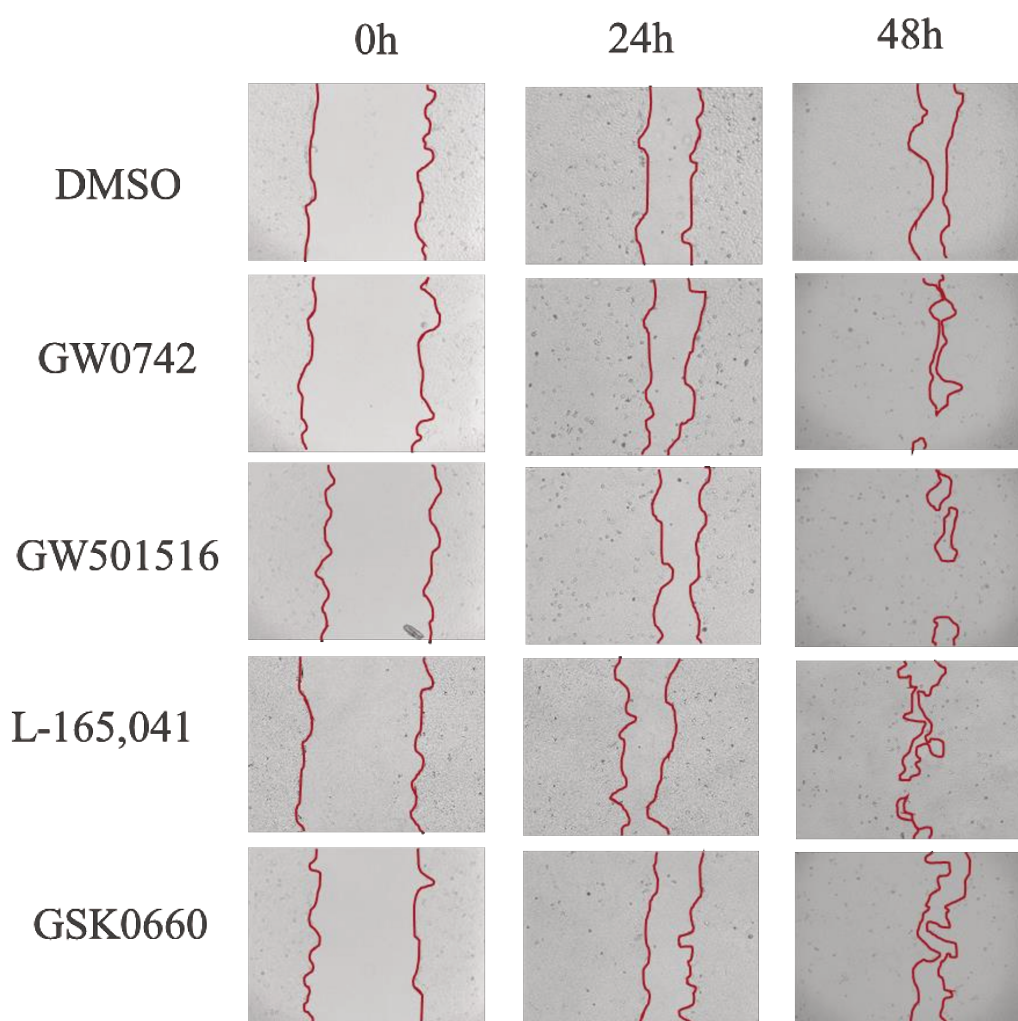


Figura 52. Análise da migração 2D das células HaCaT em *scratch assay* após tratamento de ligantes de PPAR β/δ . As células HaCaT foram tratadas com veículo (DMSO), 0,5 μ M dos agonistas GW0742, GW501516 e L-165,041, ou 5 μ M do antagonista GSK0660. Imagens de um experimento representativo nos tempos 0h, 24h e 48h após a risca. A área sem células foi calculada com o software Image J.

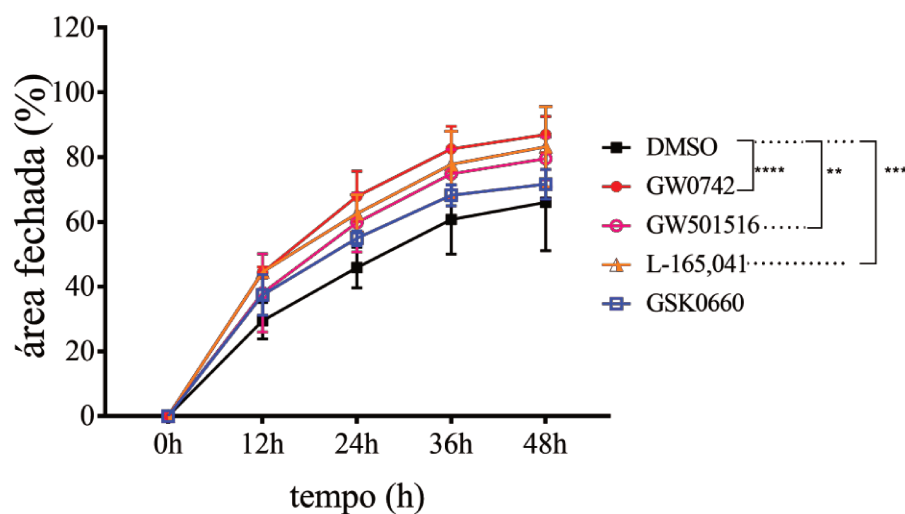


Figura 53. Taxa de fechamento da ferida (risca) em cultura 2D de células HaCaT tratadas com veículo (DMSO), 0,5 μ M dos agonistas GW0742, GW501516 e L-165,041, ou 5 μ M do antagonista GSK0660 como indicado. As células foram fotografadas após 0h, 12h, 24h 36h e 48h da riscagem da placa para criação da ferida. Foram

realizados 3 experimentos independentes. A análise estatística realizada foi 2-way Anova seguida de teste de múltiplas comparações de Dunnet (**p < 0,01, ***p < 0,001, e ****p < 0,0001).

Os resultados de *scratch assay* de HaCaT apresentados neste trabalho, indicam que o tratamento com 0,5 μ M dos agonistas de PPAR β/δ (GW0742, GW501516 e L-165,041) aumentou a taxa de migração da linhagem de células HaCaT, corroborando os estudos em cultura primária de queratinócitos PPAR β/δ -deficientes. Nestes estudos, a ausência de PPAR β/δ levou a um atraso na migração das células (DI-POÏ et al., 2002, 2003; MICHALIK et al., 2001; TAN et al., 2007). Em relação a modelos de cicatrização de ferida *in vivo*, foi observado um atraso na cicatrização de animais PPAR β/δ -deficientes (MICHALIK et al., 2001). Em se tratando da ativação farmacológica do PPAR β/δ , alguns estudos mostraram que animais tratados com o agonista de PPAR β/δ , GW501516, têm cicatrização mais rápida (HAM et al., 2009; WANG et al., 2015). Todos estes resultados corroboram a importância do PPAR β/δ para processos de migração de queratinócitos.

É importante destacar que, no presente trabalho, foi definido um protocolo de migração de células HaCaT para caracterização de novos ligantes de PPAR β/δ quanto a sua capacidade de promover migração de queratinócitos. Apesar de ser um método limitado – pois apenas mimetiza o processo de epitelização, independentemente da inflamação e das interações célula-célula, sem corresponder totalmente ao processo de cicatrização de feridas *in vivo* –, a migração por *scratch assay* é um dos métodos mais utilizados para estudar o reparo cutâneo *in vitro* (UD-DIN; BAYAT, 2017). Além disso, este método é adequado para triagem e caracterização de novos ligantes de PPAR β/δ , se tratando de um ensaio simples e rápido para medir o impacto deles na migração de queratinócitos *in vitro*. Outros ensaios, como migração *transwell*, reparo de pele reconstruída e cicatrização de feridas em camundongos podem ser feitos posteriormente, para caracterização adicional de um novo ligante.

5.3 Diferenciação de queratinócitos

Para a formação da epiderme, queratinócitos progenitores da membrana basal sofrem um programa de diferenciação, no qual cada etapa é caracterizada pela expressão de genes específicos que são considerados marcadores da diferenciação. Por exemplo, a transição da camada espinhosa para a granular é acompanhada pelo aumento da expressão de involucrina (IVL) e transglutaminase-1 posterior (Tg-1) (WIKRAMANAYAKE; STOJADINOVIC; TOMIC-CANIC, 2014).

Os agonistas de PPAR β/δ , GW0742 e L-165,041, foram testados quanto a sua capacidade de estimular a diferenciação da linhagem celular de queratinócitos humanos, HaCaT. A indução do processo de diferenciação foi quantificada pelo nível de expressão gênica de genes marcadores de diferenciação, como queratina 14 (K14) – marcador de queratinócitos em estado proliferativo, queratina 1 (K1) – marcador da fase inicial da diferenciação, e involucrina (IVL) – marcador da fase tardia da diferenciação (WIKRAMANAYAKE; STOJADINOVIC; TOMIC-CANIC, 2014).

Primeiramente, foi utilizado um protocolo no qual células 100% confluentes foram tratadas com DMEM 2% FBS e 0,5 μ M dos agonistas (GW0742 ou L-165,041), e o RNA foi colhido após 3 e 6 dias de incubação com o tratamento (Figura 54). Os estágios de diferenciação das células HaCaT foram avaliados pela quantificação da expressão de RNA dos marcadores de diferenciação por qPCR. Este desenho experimental permitiu avaliar se era possível induzir a diferenciação de HaCaT cultivando-as sob confluência completa por vários dias, e se este processo era acelerado pelos agonistas de PPAR β/δ GW0742 e L-165,041.

Ao comparar células não tratadas coletadas com confluência de 80% e 100% com as células tratadas com DMSO após 3 e 6 dias, foi observado um aumento na expressão de queratina 1 e involucrina, indicando que essas células iniciaram o processo de diferenciação de queratinócitos após serem cultivadas em condições confluentes (Figura 54). No entanto, a comparação entre células tratadas com os agonistas de PPAR β/δ GW0742 e L-165,041 e com veículo (DMSO), não apresentou alterações nos níveis de expressão de queratina 14, queratina 1 e involucrina, apesar da ativação do PPAR β/δ ser confirmada pelo aumento da expressão de seu gene alvo PLIN2 (Figura 54). Estes resultados indicam que a ativação de PPAR β/δ por GW0742 e L-165,041 pode não ser relevante para o processo de diferenciação das células HaCaT *in vitro*.

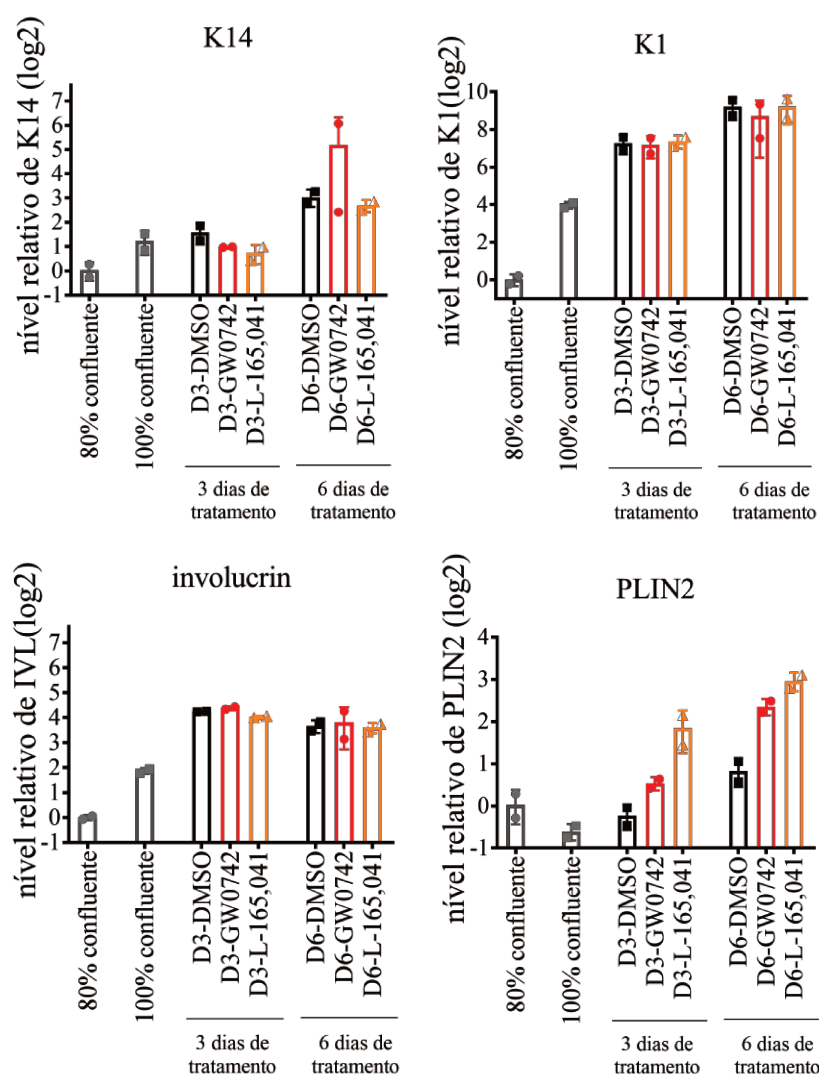


Figura 54. Efeito dos ligantes de PPAR β/δ na diferenciação de células HaCaT cultivadas após confluência. Expressão relativa dos níveis de RNA dos marcadores de diferenciação de queratinócitos queratina 1 (K1), queratina 14 (K14) e involucrina (IVL), e do gene alvo do PPAR β/δ (PLIN2), quantificados em células HaCaT em 80% ou 100% de confluência (como indicado), ou tratados com veículo (DMSO) ou 0,5 μ M dos agonistas de PPAR β/δ GW0742 e L-165,041 de 3 a 6 dias. Símbolos representam duplicatas técnicas de um experimento (N=1), barras: SD.

Depois disso, um segundo protocolo experimental foi desenhado, para avaliar se o tratamento com os agonistas poderia ter algum efeito pró ou anti diferenciação na etapa entre o estado proliferativo (80% de confluência) e a etapa inicial de diferenciação (primeiro dia a 100% de confluência). Neste segundo desenho experimental, o tratamento com 0,5 μ M dos agonistas de PPAR β/δ GW0742 e L-165,041 foi realizado quando as células estavam com 40% de confluência, e o RNA foi extraído nos estágios de 80% de confluência (24h após o tratamento) e 100% de confluência (48h após o tratamento) (Figura 55).

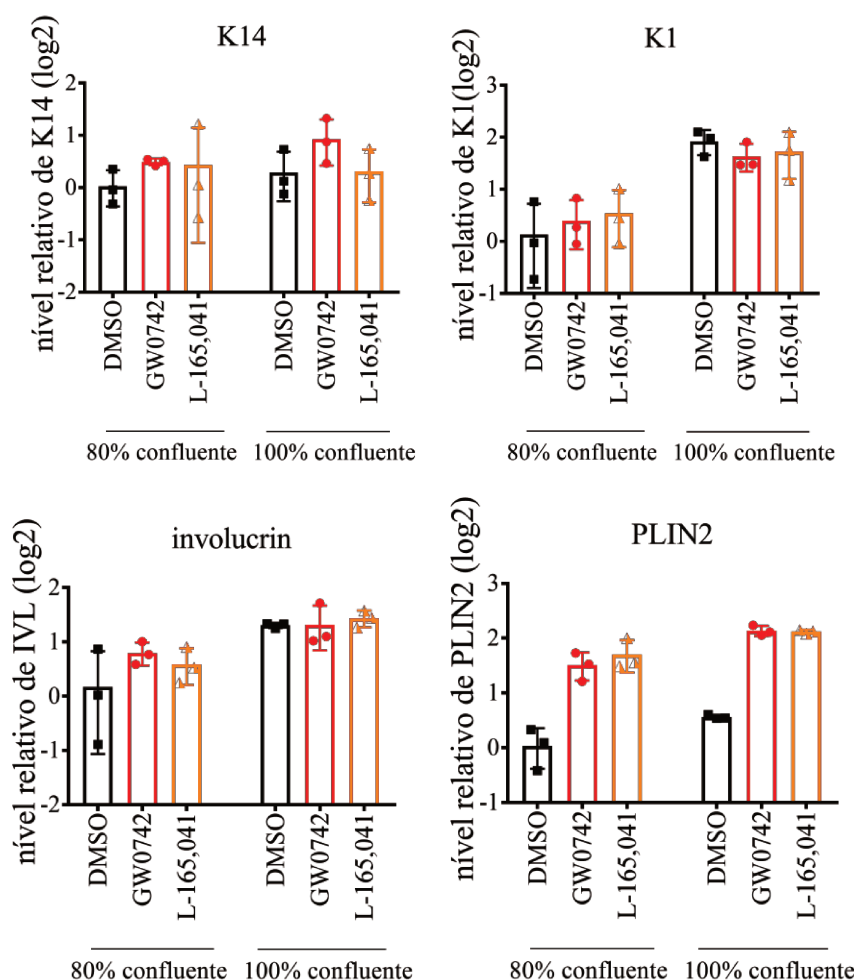


Figura 55. Efeito dos ligantes de PPAR β/δ na diferenciação de células HaCaT cultivadas antes da confluência. Expressão relativa dos níveis de RNA dos marcadores de diferenciação de queratinócitos queratina 1 (K1), queratina 14 (K14) e involucrina (IVL), e do gene alvo do PPAR β/δ (PLIN2), quantificados em células HaCaT em 80% ou 100% de confluência (como indicado), ou tratados com veículo (DMSO) ou 0,5 μ M dos agonistas de PPAR β/δ GW0742 e L-165,041, como indicado. Dados de 1 experimento representativo de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Símbolos representam duplicatas técnicas de um experimento, barras: SD

Neste segundo desenho experimental, foi observado que a expressão dos genes marcadores de diferenciação queratina 1 (K1) e involucrina (IVL) é aumentada nas células em confluência total, em relação as células no estado proliferativo (80% de confluência), indicando que essas iniciaram o processo de diferenciação induzido por confluência celular (Figura 55). Porém, quando comparado o nível da expressão gênica entre as células tratadas com os agonistas e as com o veículo (DMSO) nos dois períodos, não foram observadas diferenças nos níveis de expressão dos marcadores de diferenciação (queratina 14, queratina 1 e involucrina). No entanto, foi observado um aumento na expressão do gene alvo do PPAR β/δ (PLIN2), indicando a ativação do receptor pelos agonistas GW0742 e L-165,041. Estes resultados

analisados juntos sugerem que a ativação do PPAR β/δ por estes agonistas não resulta em alterações na expressão destes marcadores de diferenciação de queratinócitos em HaCaT, e que a ativação do receptor neste tipo celular não está envolvida com processos de diferenciação celular.

Comparando com dados da literatura, em animais, a ablação de PPAR β/δ também não resultou em mudanças importantes no desenvolvimento epidérmico, indicando que esse receptor pode não ser importante para a diferenciação normal de queratinócitos (MAN et al., 2008; MICHALIK et al., 2001).

Em relação a células HaCaT, de acordo com levantamento bibliográfico, esta é a primeira tentativa de abordar os efeitos dos agonistas PPAR β/δ em queratinócitos imortalizados humanos. Em nossos experimentos com a linhagem HaCaT, não foi possível reproduzir os resultados obtidos com células primárias de humanos e de camundongos, as quais demonstraram que o tratamento com ligantes de PPAR β/δ aumentaram a expressão de marcadores de diferenciação, como a involucrina (KIM et al., 2006; SCHMUTH et al., 2004; WESTERGAARD et al., 2001). O uso de linhagens celulares tem sua limitação, às vezes, os resultados observados em células primárias não podem ser replicados em linhagens celulares. Embora existam alguns protocolos mostrando que é possível induzir o processo de diferenciação em células HaCaT (BOUKAMP et al., 1988; MICALLEF et al., 2009), outros demonstraram que este processo induzido está atrasado em comparação com células primárias (SEO et al., 2012).

Entretanto, para a triagem e caracterização de novos fármacos, o uso de linhagens celulares é mais recomendado por ser um modelo de estudo de mais fácil acesso, mais barato e mais rápido do que o uso de células primárias. Por isso as células HaCaT podem ser utilizadas em um ensaio de diferenciação celular para a caracterização de novos ligantes de PPAR β/δ , e, caso sejam encontradas diferenças nos níveis de expressão dos genes marcadores de diferenciação de queratinócitos, eles podem ser testados em cultura primária ou em outras linhagens de queratinócitos para confirmar os resultados obtidos em HaCaT.

5.4 Análise de expressão gênica de componentes da matriz extracelular

Ao longo da fase de remodelação do tecido durante a cicatrização da pele também é importante a reconstrução da matriz extracelular (MEC), onde as células serão aderidas. A MEC é composta por proteínas, secretadas principalmente por fibroblastos, as quais são responsáveis pela elasticidade e suporte mecânico da pele (CALLAGHAN; WILHELM, 2008).

As principais proteínas MEC na pele são colágenos (tipos I, III, IV, V, VII), fibronectina e elastina (PASQUALI-RONCHETTI; BACCARANI-CONTRI, 1997; ROSENBLOOM; ABRAMS; MECHAM, 1993).

Para analisar se a expressão gênica de proteínas da MEC poderia ser dependente de PPAR β/δ *in vivo*, foi analisada, a partir de amostras de pele (derme e epiderme), a expressão do RNA de algumas dessas proteínas (colágeno tipo I, III e IV, fibronectina), de suas collagenases (MMP-1 e MMP-9) e de TGF- β 1 e TNF- α em animais selvagens e *knockout* (KO) para PPAR β/δ durante 10 dias do processo de cicatrização de feridas de pele.

Deste conjunto de proteínas, os colágenos tipo I e III são os principais componentes da MEC, e alguns estudos mostraram que sua expressão pode ser regulada pela ativação PPAR β/δ (HAM et al., 2009). As outras proteínas estudadas não estão diretamente relacionadas ao PPAR β/δ na literatura, mas desempenham papéis importantes na cicatrização e remodelação de pele, sendo: (i) o colágeno tipo IV, um componente importante da membrana basal (SAND; GENOVESE; KARSDAL, 2016); (ii) a fibronectina, uma proteína que media as interações celulares com a MEC e está envolvida na adesão celular, migração, crescimento e diferenciação (PANKOV; YAMADA, 2002); (iii) a MMP-1, uma collagenase intersticial que quebra colágenos tipos I e III para remodelação tecidual (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002); (iv) a MMP-9, uma collagenase envolvida na proteólise local da matriz extracelular (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002); (v) o TGF- β 1, fator de transcrição que regula o estágio inflamatório da cicatrização (PAKYARI et al., 2013), (vi) o TNF- α , citocina rapidamente liberada por células na ferida e que inicia o processo inflamatório, recrutando neutrófilos e macrófagos (RITSU et al., 2017).

Os resultados demonstram que os níveis de RNA de TGF- β 1, MMP-1 e MMP-9 aumentaram logo no primeiro dia da cicatrização de feridas e diminuíram um pouco no final da cicatrização (Figura 56). Os resultados são consistentes com o papel importante destas proteínas desde o início do processo de cicatrização: o TGF- β 1 é importante para modular o estágio inflamatório da cicatrização (PAKYARI et al., 2013); e MMP-1 e MMP-9 são proteases da MEC expressas para degradar a MEC em períodos iniciais da cicatrização, (CALEY; MARTINS; O'TOOLE, 2015). Os níveis de TNF- α atingiram um pico logo no primeiro dia após a ferida, e voltaram ao nível basal no decorrer dos dias (Figura 56), de acordo com o descrito na literatura (RITSU et al., 2017), essa citocina promove o processo inflamatório logo após a ferida. Em relação ao colágeno tipo I, III e IV e fibronectina, a expressão do RNA desses genes aumentou a partir do terceiro dia da cicatrização de lesões na pele (Figura 56). Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, que demonstram que a expressão

de colágenos e fibronectinas é aumentada por fibroblastos no estágio proliferativo do fechamento da ferida, geralmente 2-3 dias após a lesão (XUE; JACKSON, 2015).

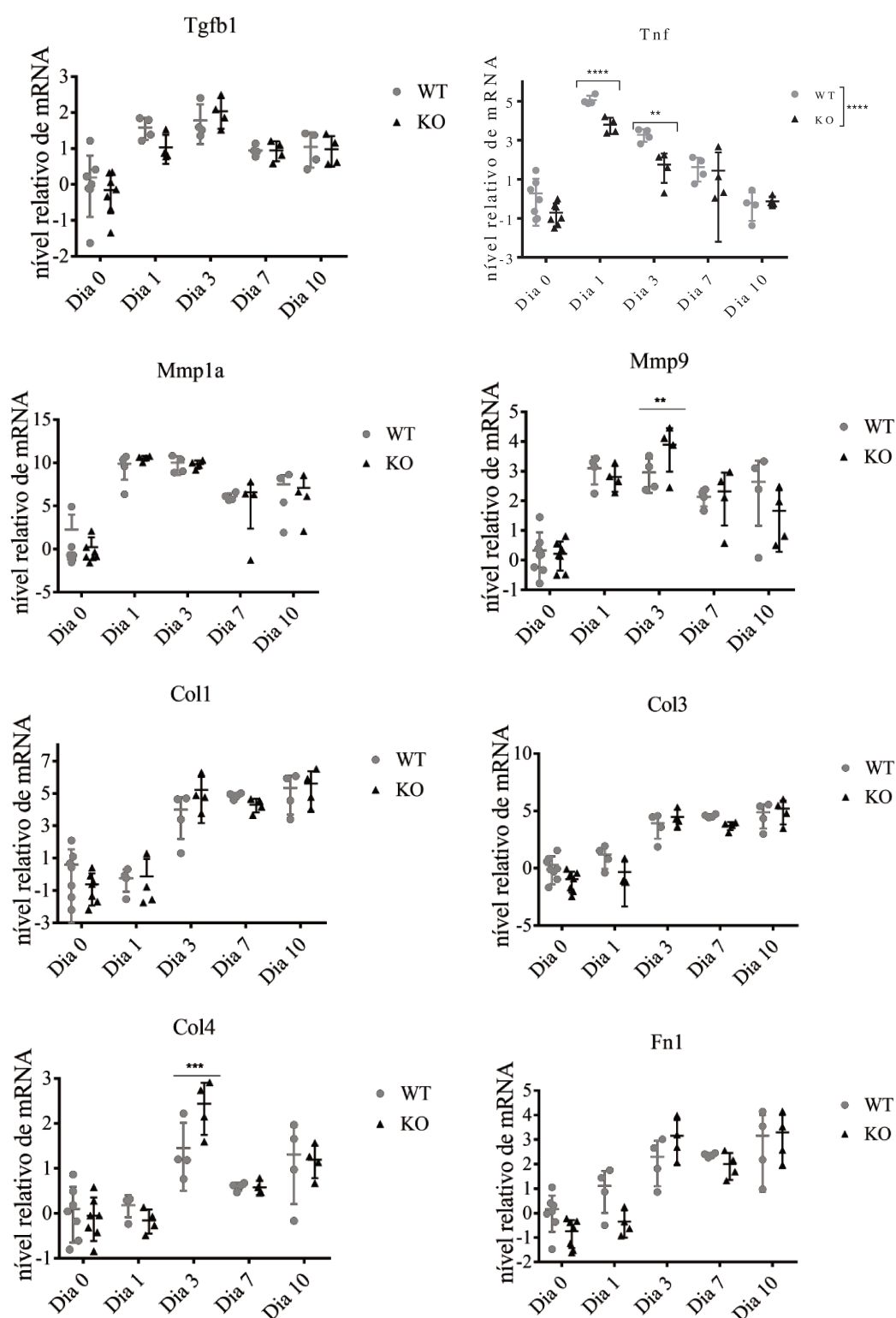


Figura 56. Análise da expressão de RNA de componentes da MEC durante cicatrização cutânea de camundongos selvagens (WT) e PPAR β/δ -knockout (KO). Nível de expressão relativa de RNA das proteínas da MEC colágeno tipo I (Col1), colágeno tipo III (Col3), colágeno tipo IV (Col4), fibronectina (Fn1), de TNF- α (Tnf), das proteases MMP-1 (Mmp1) e MMP-9 (Mmp9), e do TGF- β 1 (Tgfb1), em diferentes dias após a ferida cutânea: dia 0, 1, 3, 7 e 10, como indicado. Animais selvagens (WT) e PPAR β/δ -knockdown (KO), como indicado. Símbolos

representam cada animal, barras: SD. Os resultados foram analisados com 2way ANOVA seguido pelo teste Sidak de comparação múltipla. P valores = * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$.

Comparando os animais selvagens aos KO, visualmente foi possível observar que os camundongos KO apresentaram uma cicatrização retardada da ferida (dados não quantificados), conforme reportado por Michalik (2001). Analisando-se a expressão gênica por qPCR, os resultados mostraram a ablação eficiente de PPAR β/δ nos camundongos KO (Figura 57). Em relação a expressão do TNF- α (Tnf), os resultados mostraram que tanto os animais KO quando WT tiveram um pico de expressão da citocina no primeiro dia, que retornou ao nível basal no dia 10, mas a expressão em camundongos KO foi cerca de 2X menor nos dias 1 e 3 (Figura 56). Esses resultados indicam que a depleção do PPAR β/δ desencadeou alterações nos estágios inflamatórios iniciais do processo de cicatrização alterando os níveis de expressão do TNF- α (Figura 56), e possivelmente, essas alterações resultaram numa cicatrização retardada nos animais KO. A ausência do PPAR β/δ não resultou em alterações nos níveis de RNA de Tgfb1, da collagenase Mmp1, fibronectina (Fn1), colágeno tipos I (Col1a1) e III (Col3a1) entre os animais selvagens e KO durante a cicatrização de feridas na pele (Figura 56). Para o colágeno tipo IV (Col4a1) e Mmp9 foi observado que no dia 3 a expressão desses mRNAs foi maior em camundongos KO (Figura 56), indicando um possível efeito da regulação do PPAR β/δ sobre esses genes nesse estágio do processo de cicatrização.

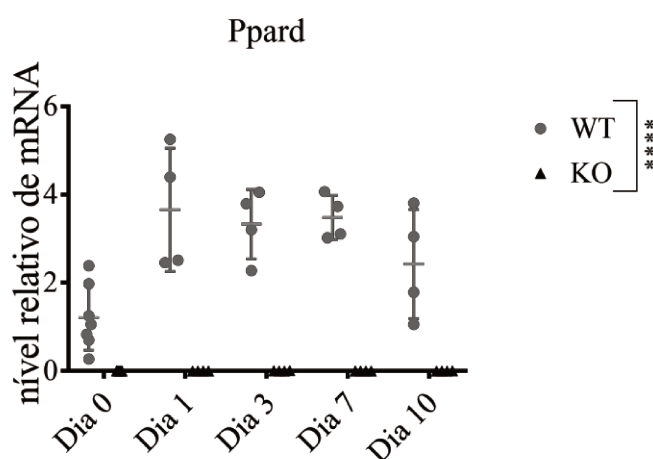


Figura 57. Análise da expressão de PPAR β/δ durante cicatrização cutânea de camundongos selvagens (WT) e PPAR β/δ -knockout (KO). Nível de expressão relativa de RNA de PPAR β/δ (Ppard), em diferentes dias após a ferida cutânea: dia 0, 1, 3, 7 e 10, como indicado. Animais selvagens (WT) e PPAR β/δ -knockdown (KO), como indicado. Símbolos representam cada animal, barras: SD. Os resultados foram analisados com 2way ANOVA seguido pelo teste Sidak de comparação múltipla. P valores = * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$.

Em animais, um outro grupo de pesquisa, observou por coloração imuno-histoquímica que, após injeção peritoneal do agonista de PPAR β/δ GW501516, houve um

aumento no TGF- β 1 e um ligeiro aumento no colágeno tipo I e III (HAM et al., 2009). Os resultados obtidos por ativação farmacológica do PPAR β/δ podem não correlacionar com ensaios de *knockout* do receptor, pois na ausência da proteína, outras vias sinalizadoras podem ser ativadas para compensar a falta de PPAR β/δ , mascarando o fenótipo.

Além disso, os modelos *in vivo* são mais complexos do que os modelos celulares *in vitro*. Por exemplo, nos organismos existem mais interações célula-célula, diferentes tipos celulares em sinestesia, mais fatores de crescimento secretados, e respostas inflamatórias, fatores que também podem regular a deposição da MEC e suprimir a deficiência do PPAR β/δ neste processo. Tais fatores não estão presentes em cultura *in vitro* de um tipo celular isolado, indicando que tais modelos podem melhor reproduzir processos que sejam dependentes de PPAR β/δ . Por isso, foi decidido abordar os níveis de RNA das proteínas de MEC também *in vitro* com células HaCaT. Nesse ensaio, o PPAR β/δ foi ativado farmacologicamente por seu agonista GW501516, para verificar se a ativação do receptor é capaz de alterar a expressão de algumas proteínas da MEC (colágeno tipo I, III e IV, fibronectina, e MMP-9) em células HaCaT. O aumento da expressão de TGF- β 1 após ativação do PPAR β/δ em células HaCaT já havia sido previamente observado no grupo da Dra. Michalik (DEGUEURCE et al., 2016) e, portanto, não foi realizado novamente.

Após 48h de incubação com 0,5 μ M do agonista de PPAR β/δ GW501516, o gene alvo PDK4 foi super-expresso, indicando que o receptor foi ativado (Figura 58). No entanto, não foi observado nenhum impacto da ativação do PPAR β/δ na expressão de RNA de colágenos tipos I, III e IV, fibronectina, MMP-9 e PPAR β/δ (Figura 58). Estes resultados sugerem que a ativação do PPAR β/δ por GW501516 não tem um efeito sobre a expressão destas proteínas da MEC em células HaCaT. Apesar de queratinócitos expressarem colágeno tipo I, III e IV e fibronectina, essas proteínas são majoritariamente expressas por fibroblastos dermais.

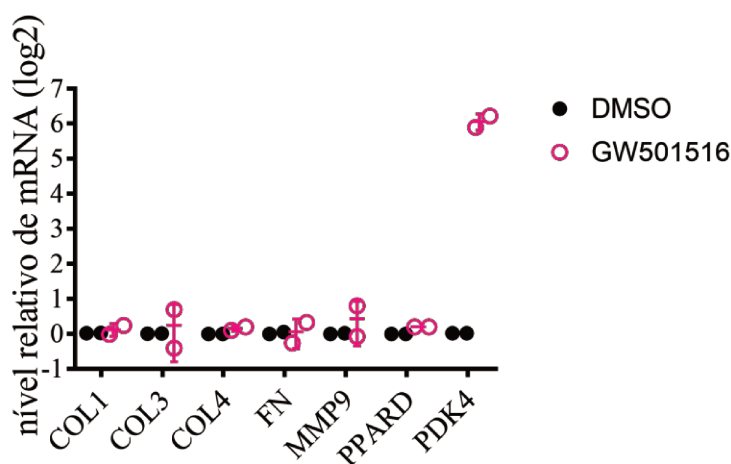


Figura 58. Análise da expressão de RNA das proteínas da MEC após 48h da ativação do PPAR β/δ por 0,5 μ M de GW501516. Nível de expressão relativa de RNA das proteínas da MEC colágeno tipo I (COL1), colágeno tipo III (COL3), colágeno tipo IV (COL4), fibronectina (FN), da protease MMP-9 (MMP9), e do PPAR β/δ (PPARD). Símbolos representam a média de dois experimentos independentes realizados com duplicatas técnicas, barras: SD. Os resultados foram analisados com 2way ANOVA seguido pelo teste Sidak de comparação múltipla.

A quantificação do RNA para proteínas da MEC em células HaCaT foi realizada na tentativa de reproduzir o trabalho realizado por Ham e colaboradores (2009). Nesse trabalho, foi relatado que em células primárias e imortalizadas de queratinócitos e fibroblastos humanos, tratadas com 20 a 200 nM de GW501516 por 38h, houve um aumento nos níveis de RNA de colágeno tipo I e III, elastina, fibronectina e TGF- β 1. Os resultados de Ham foram corroborados por outro estudo do mesmo grupo de pesquisa que demonstrou que, nas mesmas condições, a ativação de PPAR β/δ aumentou a expressão de colágeno tipo I e III, elastina, fibronectina, TGF- β 1 e TIMP3 em células de músculo liso vascular (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) (KIM et al., 2009). Ham e Kim também indicaram, por meio de experimentos de shPPAR β/δ , que o colágeno tipo III poderia ser um alvo direto do PPAR β/δ nesses tipos celulares (HAM et al., 2009; KIM et al., 2009). Este grupo também relatou que a ativação de PPAR β/δ por 50 nM de GW501516 por 38h restaurou os níveis de elastina e MMP-2 que foram, respectivamente, reprimidos e super-expressos após tratamento com luz ultravioleta-B em fibroblastos dérmicos humanos (HDF) (HAM et al., 2014).

Adicionalmente, outro estudo demonstra que queratinócitos primários de camundongos PPAR β/δ -KO possuem expressão reduzida de MMP-9 em relação a células selvagens, e que a expressão de MMP-9 aumentou quando ambas as células foram tratadas com TNF- α somente ou com TNF- α e o agonista de PPAR β/δ L-165,041 (DI-POÏ et al., 2002). Neste trabalho, a ativação de HaCaT por GW501516 não promoveu aumento na expressão de MMP-9, sugerindo que o TNF- α tem um papel importante nessa regulação.

5.5 Análise de bancos de dados de expressão gênica

Os processos de manutenção da barreira epitelial, cicatrização de feridas e produção de proteínas da MEC foram descritos na literatura como processos em desequilíbrio em pele envelhecida (BAUMANN, 2007; GILCHREST, 2013; GOSAIN; DIPIETRO, 2004; JENKINS, 2002; MORIWAKI; TAKAHASHI, 2008; QUAN; FISHER, 2015). Como estes processos mostraram-se influenciados por PPAR β/δ de alguma forma (DI-POÏ et al., 2004; HAM et al., 2009, 2014, 2013; KIM et al., 2006; MICHALIK et al., 2001; SCHMUTH et al., 2004; TAN et al., 2007; WANG et al., 2015), existe a hipótese de que o PPAR β/δ pudesse estar desregulado ou diferencialmente expresso no tecido envelhecido, alterando a homeostasia da pele foi analisada. No entanto, apesar desses indícios, não foi encontrado nenhum relato na literatura analisando experimentalmente o papel do PPAR β/δ em modelos de pele envelhecida (por exemplo com animais idosos ou uso de pele de pálpebra humana removida em cirurgias de blefaroplastia).

Com isso, neste trabalho, foi investigado se o fenótipo observado na pele envelhecida é causado pela diminuição da expressão do mRNA do PPAR β/δ neste órgão. Essa análise foi realizada em um conjunto de dados de *microarrays* públicos disponível no banco de dados Omnibus Gene Expression (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Também foi investigada a ativação de PPAR β/δ em pele envelhecida, medindo-se os níveis de expressão dos seus genes alvo (Plin2, Fabp4, Tgfb1, Pdk4) e colágeno tipo III, um potencial gene alvo de PPAR β/δ (HAM et al., 2009; KIM et al., 2009) (Figura 59) .

Diante da diversidade dos conjuntos de dados experimentais em camundongos e de coleta de biópsias humanas, o conjunto de dados GSE35322 foi selecionado para análise por possuir um bom desenho experimental e um número adequado de amostras. Nesse conjunto, amostras de pele foram coletadas da cauda de camundongos CB6F1 jovens (8 semanas) e idosos (30 meses). As informações referentes aos níveis de expressão de RNA de PPAR β/δ e de alguns dos seus genes alvo (Plin2, Tgfb1, Pdk4, Fabp4) (Figura 59) foram selecionadas e não foi observado alterações no nível de expressão de RNA do PPAR β/δ e nem de seus genes alvo. Isto indica que neste modelo experimental, as alterações fenotípicas de pele envelhecida observadas nos animais não eram relacionadas à expressão de RNA de PPAR β/δ , pois esta não se encontrou alterada nessas amostras. A ativação do PPAR β/δ também foi considerada inalterada em relação a amostras do grupo jovem e idoso dado que não foram encontradas alterações no nível de expressão do RNA dos genes alvo do receptor (Plin2, Tgfb1, Pdk4, Fabp4).

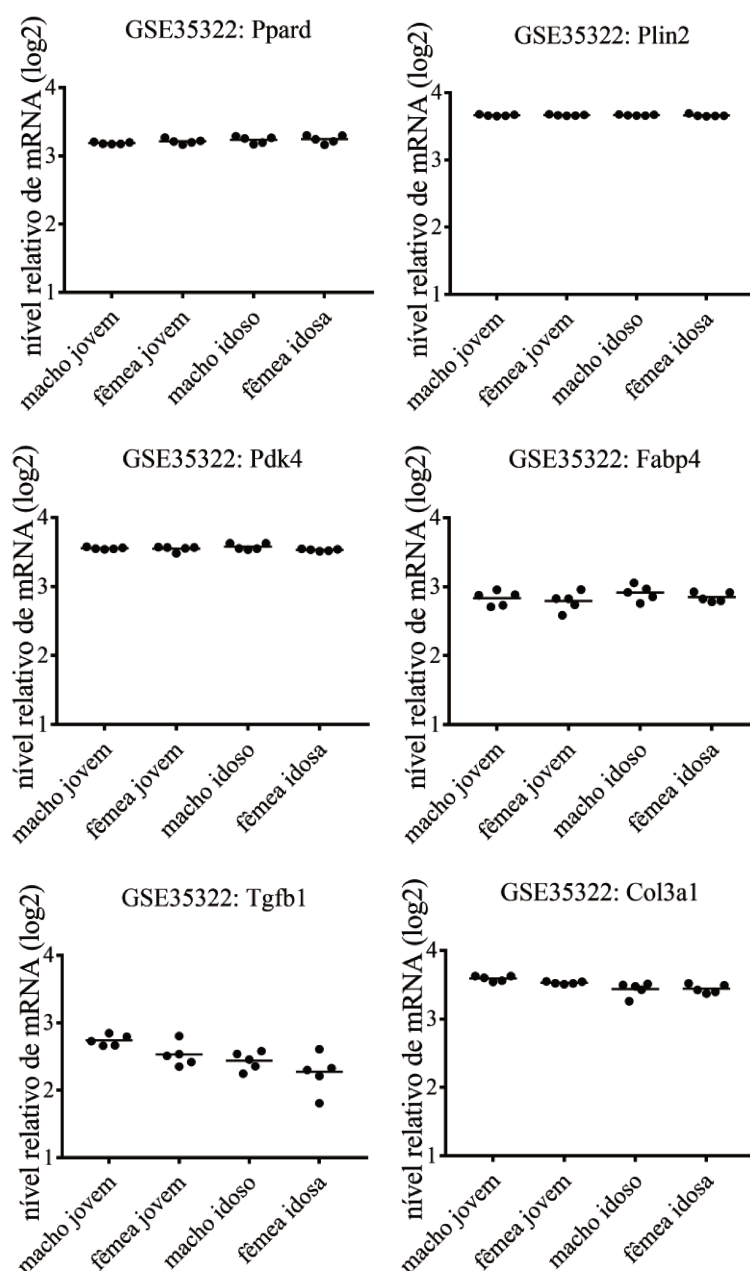


Figura 59. Análise da expressão gênica de dados de um *microarray* disponível publicamente (GSE35322) no Omnibus Gene Expression (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Expressão relativa de PPAR β/δ (Ppard), de alguns dos seus genes alvo (Plin2, Tgfb1, Pdk4, Fabp4) e de genes marcadores com expressão diferencial em pele envelhecida (colágeno tipo III – Col3a1), a partir de dados de *microarray* realizado com pele de cauda de camundongo jovem (8 semanas) e idosos (30 meses), machos e fêmeas, como indicado.

Algumas observações sobre os resultados obtidos são possíveis. Primeiro, os níveis inalterados da expressão de RNA de PPAR β/δ não significam que o nível de proteína seja o mesmo entre as amostras de pele jovem e envelhecida, pois os níveis de RNA e proteína de PPAR β/δ nem sempre são correlacionados (dados não apresentados do grupo da Dra.

Michalik). Para melhor caracterização do PPAR β/δ em pele envelhecida, seria interessante quantificar também os níveis de proteína PPAR β/δ em pele jovem e envelhecida.

Segundo, em alguns casos, o efeito de PPAR β/δ só é observado quando o sistema é exposto a um desafio. Por exemplo, na pele normal de camundongos, o nível de PPAR β/δ é baixo, e sua expressão só aumenta após estímulos como depilação ou cicatrização de feridas. Nestas condições estimuladas, é possível observar também as diferenças de fenótipo entre os animais de selvagem e PPAR β/δ -KO em processos de proliferação de queratinócitos e de cicatrização de pele (DI-POÏ et al., 2002, 2003, MICHALIK et al., 2001, 2005).

Como não foi possível estabelecer uma relação direta e experimental sobre o papel do PPAR β/δ e o envelhecimento de pele, consideramos que esta é uma área interessante para ser melhor investigada. Caso o PPAR β/δ tenha sua expressão ou atividade desregulada em pele envelhecida, há a possibilidade do desenvolvimento de ligantes para este receptor que possam atuar como fármacos anti-idade e dermocosméticos.

5.6 Conclusões parciais

Em primeiro lugar, decidimos abordar os papéis da ativação e/ou inibição PPAR β/δ na proliferação, diferenciação e migração de uma linhagem de queratinócitos imortalizados humanos (HaCaT). Em ensaios de migração celular (*scratch assay*), o tratamento com os agonistas de PPAR β/δ GW0742, GW501516 e L-165,041 aumentou as taxas de fechamento da ferida. Em ensaio de incorporação de EdU, o tratamento com 5 μ M de GW501516 e L-1,65041 diminuiu a proliferação em cerca de 30%. Com o ensaio de diferenciação proposto não foi possível observar efeitos dos ligantes de PPAR β/δ na expressão dos marcadores analisados. Os protocolos de migração, proliferação e diferenciação de HaCaT podem ser incorporados ao *pipeline* de triagem para caracterização de novos ligantes de PPAR β/δ quanto a seus efeitos em células epidermais.

Em segundo lugar, decidimos investigar mais a fundo o efeito do PPAR β/δ na regulação da expressão gênica de proteínas da MEC. Em nossos experimentos, *in vivo* e *in vitro*, a ablação e a ativação PPAR β/δ , respectivamente, não promoveu alteração na expressão do RNA de algumas proteínas da MEC (colágeno tipo I, III e IV, fibronectina) e também de PPAR β/δ , MMP-1, MMP-9 e TGF- β 1. Em relação ao envolvimento do PPAR β/δ com o fenótipo de pele envelhecida, a análise de dados de *microarray* disponíveis publicamente não mostrou alteração nos níveis de expressão de RNA de PPAR β/δ , nem de seus genes alvo comparando pele jovem e envelhecida de camundongos.

CAPITULO VI: CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusão

O principal resultado deste trabalho foi o desenvolvimento de um racional de triagem de agonistas de PPAR β/δ que, além da ativação do receptor, proporciona mais informações sobre os ligantes selecionados e sua interação com o LBD do PPAR β/δ . O ensaio de transativação celular de RNs realizado em nosso laboratório foi padronizado para um formato semi-automatizado em microplacas de 96 poços, com redução de 75% dos custos e volumes dos reagentes de leitura do gene repórter, mantendo a qualidade do sinal obtido. O racional de triagem foi complementado com dois ensaios biofísicos: TSA e fluorescência do ANS, que permitiram verificar a interação dos *hits* selecionados com a estrutura terciária do receptor, em particular com o LBP, e calcular a constante de afinidade entre proteína-ligante, permitindo a exclusão de falso-positivos. O desenvolvimento desse conjunto de metodologias para triagem de ligantes para o PPAR β/δ foi recentemente publicado no periódico *PPAR Research*.

Essa metodologia de triagem foi utilizada para testar 1400 compostos/extratos provenientes de colaboradores, da biblioteca Phytobios e da biblioteca NIH-NCC. Destes, 65 extratos/compostos foram selecionados na transativação primária, e 12 foram confirmados no ensaio de transativação secundário. Os ensaios de caracterização biofísica seguintes selecionaram 2 extratos que aumentaram a estabilidade da estrutura terciária do PPAR β/δ , o Extrato 2 e Extrato 19, sendo que constante de dissociação aparente foi calculada para o Extrato 2. Em relação às amostras fracionadas do Extrato 2, das 24 frações testadas, a fração Extrato 2-18 foi a única que promoveu ativação e estabilização do receptor e permitiu o cálculo da constante de dissociação.

Em um ensaio de *virtual screening* (VS) baseado em estrutura, de uma biblioteca de 3028 moléculas, 80 foram pré-selecionadas e, posteriormente, submetidas à metodologia *in vitro* de triagem de ligantes do PPAR β/δ . No ensaio primário de transativação 23 moléculas da biblioteca foram selecionadas, no entanto, nenhuma delas foi confirmada no ensaio secundário de transativação, indicando que este protocolo de VS ainda precisa ser otimizado antes de ser aplicado como etapa anterior aos ensaios *in vitro* para triagem de ligantes do PPAR β/δ .

Com relação aos processos de regeneração de pele, a ativação do PPAR β/δ pelos agonistas GW0742, GW501516 e L-165,041 foi capaz de acelerar a migração em *scratch assay*; e a ativação por GW501516 e L-165,041 diminuiu a proliferação das células HaCaT. No

processo de diferenciação *in vitro*, os ligantes GW0742 e L-165,041 não se mostraram capazes de alterar a expressão dos marcadores de diferenciação de queratinócitos analisados. Os protocolos de proliferação, migração e diferenciação de queratinócitos HaCaT desenvolvidos podem ser aplicados para caracterização de novos ligantes de PPAR β/δ que possam ser descobertos por intermédio da nossa metodologia de triagem.

Em relação ao papel da expressão e da ativação do PPAR β/δ na produção de proteínas da MEC, os resultados demonstraram que tanto a ativação farmacológica, quanto a depleção de PPAR β/δ (animais KO) não influenciaram a expressão das proteínas colágeno tipo I, III e IV, fibronectina, MMP-1, e MMP-9 e TGF β -1. Com relação ao papel do PPAR β/δ em pele envelhecida, não foram encontradas diferenças na expressão de RNA entre animais jovens e idosos para PPAR β/δ e seus genes alvo (Plin2, Tgfb1, Pdk4, Fabp4), indicando que, caso o PPAR β/δ esteja envolvido no fenótipo envelhecido, não é devido a um desbalanço na quantidade de seu mRNA.

Em resumo, neste trabalho foi desenvolvido um conjunto de métodos para triagem de novos ligantes de PPAR β/δ composto por um ensaio semi-automatizado de transativação celular (primário e secundário), seguido por dois ensaios de caracterização biofísica (TSA e supressão da fluorescência do ANS) que avaliam a estabilização da estrutura terciária do LBD do PPAR β/δ e permitem o cálculo da constante de afinidade entre o receptor e o ligante. Também foram desenvolvidos protocolos para posterior caracterização desses novos ligantes em processos de migração, diferenciação e proliferação de queratinócitos, com interesse na identificação de ligantes que possam atuar no reparo de feridas de pele. Além do desenvolvimento de protocolos, foram realizadas campanhas de triagem com três bibliotecas e diversos compostos isolados.

6.2 Perspectivas

Devido ao interesse na descoberta de novos ligantes para o alvo PPAR β/δ , preferencialmente ligantes que atuem no processo de reparo de feridas de pele, uma das perspectivas deste trabalho é a continuidade da aplicação do *pipeline* na triagem de novas bibliotecas de moléculas ou extratos naturais.

Além disso, otimização do processo de triagem deve ser contínua, sempre buscando novas técnicas que possam ser adicionadas ao conjunto de métodos, ou melhorias que possam ser implementadas nos processos utilizados. Por exemplo, o *virtual screening* pode ser realizado como uma etapa anterior a metodologia de triagem *in vitro*, desde que os parâmetros

de *docking* sejam aperfeiçoados (*re-docking* ou utilizando outros programas). Em relação ao aperfeiçoamento dos métodos já presentes no *pipeline*, é oportuno buscar uma maior automatização do ensaio de transativação (por exemplo o plaqueamento robotizado das células), ou desenvolver o ensaio em placas de 384 poços sem prejuízo na leitura do sinal. Também é interessante a utilização de estatísticas que melhor se apliquem ao ensaio de transativação celular, por exemplo o uso de *strictly standardized mean difference* (SSMD) que se mostra mais adequado para ensaios celulares nos quais o controle positivo apresenta sinal variável e os *hits* possuem um sinal distante do controle positivo (ZHANG, 2007)

Com relação à modulação das proteínas da MEC por ativadores de PPAR β/δ , outros experimentos poderiam ser realizados. Para analisar a expressão de MMPs por queratinócitos, esses poderiam ser estimulados a migrar sobre uma matriz de colágeno, para em seguida ser quantificado os níveis de expressão das MMPs de células tratadas ou não com os agonistas. Para caracterizar melhor a expressão gênica de proteínas estruturais da MEC, células de fibroblastos dermais poderiam ser tratadas com os agonistas de PPAR β/δ por diferentes períodos de tempo para quantificação via qPCR e *western blotting* da expressão de colágenos, elastina e fibronectina. Uma terceira possibilidade é o uso de pele reconstituída, tratada ou não com ligantes de PPAR β/δ , para quantificação por imuno-histoquímica e qPCR das proteínas anteriormente mencionadas.

A atuação do PPAR β/δ nos processos moleculares que ocorrem na pele envelhecida ainda não está completamente elucidada. Como não foram encontrados relatos de experimentos analisando diretamente o papel do receptor em pele envelhecida, seria oportuno a realização de experimentos que busquem esclarecer se há diferenças na atividade ou na expressão a nível proteico do PPAR β/δ entre tecidos jovens e envelhecidos de pele. Para isso, propomos alguns experimentos, por exemplo, um ensaio de cicatrização de feridas comparando amostras de pele de camundongos jovens (8 semanas) e idosos (30 meses), para verificar se há diferença na capacidade de cicatrização e nos níveis de expressão de PPAR β/δ , tanto de RNA quanto de proteína. Além disso, também seria relevante analisar o processo de cicatrização de feridas em animais jovens e idosos PPAR β/δ -KO, comparando com animais selvagens tanto o desempenho deste processo, quanto os níveis de RNA e proteína de PPAR β/δ e de proteínas da MEC. Caso seja observado alguma diferença entre animais jovens e idosos, em algum dos aspectos abordados, seria válido realizar um experimento de cicatrização com ativação farmacológica do PPAR β/δ , para avaliar um possível efeito clínico do uso de ligante de PPAR β/δ na cicatrização de pele envelhecida.

Buscando analisar o papel do PPAR β/δ em tecidos humanos, seria interessante utilizar pele removida de cirurgia de blefaroplastia como fonte de tecido envelhecido. No entanto, pode ser difícil abordar a migração e a diferenciação dos queratinócitos ou explorar a ativação farmacêutica de PPAR β/δ nessas amostras, porque as células primárias envelhecidas podem ser difíceis de cultivar *in vitro* para experimentos que requerem células em quantidade. Por outro lado, é possível utilizar o tecido da pálpebra para medir os níveis de PPAR β/δ e proteínas da MEC tanto de RNA quanto de proteína, e comparar esses níveis com os de tecido do prepúcio (pele jovem), por exemplo. Com estes experimentos, poder-se-ia verificar se os níveis de PPAR β/δ em pele envelhecida estão alterados, o que pode indicar a relevância desse receptor no desbalanço das funções de homeostasia encontradas na pele envelhecida. Caso isso seja confirmado, esse receptor possui um potencial para ser modulado por meio de dermocosméticos ou fármacos para restaurar a homeostasia e melhorar o fenótipo de pele envelhecida.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; YADAV, A.; CHATURVEDI, R. K. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as therapeutic target in neurodegenerative disorders. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 483, n. 4, p. 1166–1177, fev. 2017.
- AGRAWAL, M. et al. Discovery of thiazolyl-phthalazinone acetamides as potent glucose uptake activators via high-throughput screening. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 20, p. 5740–5743, 2013.
- ALESHIN, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ , a possible nexus of PPAR α - and PPAR γ -dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses. **Neurochemistry international**, v. 63, n. 4, p. 322–30, out. 2013.
- ANDRUSKA, N. et al. Evaluation of a Luciferase-Based Reporter Assay as a Screen for Inhibitors of Estrogen-ER -Induced Proliferation of Breast Cancer Cells. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 7, p. 921–932, 1 ago. 2012.
- AOKI, M. et al. siRNA knockdown of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in keloid fibroblasts leads to degradation of collagen type I. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 3, p. 818–26, 2014.
- ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1269–1304, jul. 2001.
- ASHCROFT, G.; MILLS, S.; ASHWORTH, J. Ageing and wound healing. **Biogerontology**, v. 3, n. 6, p. 337–345, 2002.
- ATTIANESE, G.; DESVERGNE, B. Integrative and systemic approaches for evaluating PPAR β/δ (PPARD) function. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 13, p. 1–32, 2015.
- BAGCHI BHATTACHARJEE, G.; PAUL KHURANA, S. M. In Vitro Reporter Assays for Screening of Chemicals That Disrupt Androgen Signaling. **Journal of Toxicology**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- BAIN, D. L. et al. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. **Annual Review of Physiology**, v. 69, n. 1, p. 201–220, mar. 2007.
- BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 19, p. 3719–27, 1 out. 2002.
- BALLAS, C. B.; DAVIDSON, J. M. Delayed wound healing in aged rats is associated with increased collagen gel remodeling and contraction by skin fibroblasts, not with differences in apoptotic or myofibroblast cell populations. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 3, p. 223–237, maio 2001.
- BARRETT, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D991–D995, 26 nov. 2012.
- BASSÉNE, C. E. et al. Studies towards the conception of new selective PPAR β/δ ligands. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 17, p. 4528–32, 1 set. 2006.
- BATISTA, F. A. H. et al. Structural insights into human peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR- δ) selective ligand binding. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–7, 2012.
- BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **The Journal of pathology**, v. 211, n. 2, p. 241–51, jan. 2007.
- BERGER, J.; MOLLER, D. E. The Mechanisms of Action of PPARs. **Annual Review of**

Medicine, v. 53, n. 1, p. 409–435, fev. 2002.

BILLONI, N. et al. Expression of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) in human hair follicles and PPAR alpha involvement in hair growth. **Acta dermatovenereologica**, v. 80, n. 5, p. 329–34, 2000.

BLANKVOORT, B. M. G. et al. Development of an Androgen Reporter Gene Assay (AR-LUX) Utilizing a Human Cell Line with an Endogenously Regulated Androgen Receptor. **Analytical Biochemistry**, v. 298, n. 1, p. 93–102, nov. 2001.

BORDET, R. et al. PPARs: A new target for neuroprotection. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 77, n. 3, p. 285–286, 2006.

BORLAND, M. G. et al. Ligand Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- / Inhibits Cell Proliferation in Human HaCaT Keratinocytes. **Molecular Pharmacology**, v. 74, n. 5, p. 1429–1442, 1 ago. 2008.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **The Journal of cell biology**, v. 106, n. 3, p. 761–71, mar. 1988.

BOURGUET, W.; GERMAIN, P.; GRONEMEYER, H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, n. 10, p. 381–8, out. 2000.

BRAGT, M. C. E.; POPEIJUS, H. E. Peroxisome proliferator-activated receptors and the metabolic syndrome. **Physiology & behavior**, v. 94, n. 2, p. 187–97, 23 maio 2008.

BRAISSANT, O. et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 354–366, jan. 1996.

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. 2748–54, jun. 1998.

BURDICK, A. D. et al. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta(PPARbeta/delta) inhibits cell growth of human N/TERT-1 keratinocytes. **Cellular signalling**, v. 19, n. 6, p. 1163–71, jun. 2007.

CALEY, M. P.; MARTINS, V. L. C.; O'TOOLE, E. A. Metalloproteinases and Wound Healing. **Advances in wound care**, v. 4, n. 4, p. 225–234, 1 abr. 2015.

CALLAGHAN, T.; WILHELM, K. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. **International journal of cosmetic ...**, v. 30, p. 313–322, 2008.

CERVERA, L. et al. Optimization of HEK 293 cell growth by addition of non-animal derived components using design of experiments. **BMC Proceedings**, v. 5, n. Suppl 8, p. P126, 2011.

CHEN, T. Nuclear receptor drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 418–426, ago. 2008.

CHENG, T. et al. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: a Problem-Centric Review. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 1, p. 133–141, 27 mar. 2012.

CHUNG, J. H. et al. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. **The Journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 5, p. 1218–24, nov. 2001.

CIMPERMAN, P. et al. A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 7, p. 3222–3231, out. 2008.

CLEVES, A. E.; JAIN, A. N. Knowledge-guided docking: Accurate prospective prediction of

bound configurations of novel ligands using Surflex-Dock. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 29, n. 6, p. 485–509, 2015a.

CLEVES, A. E.; JAIN, A. N. Chemical and protein structural basis for biological crosstalk between PPAR α and COX enzymes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 29, n. 2, p. 101–112, 27 fev. 2015b.

DA SILVA, F. M. C. et al. Structure-based identification of novel PPAR gamma ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 21, p. 5795–5802, 1 nov. 2013.

DEGUEURCE, G. et al. Identification of a novel PPAR β/δ /miR- 21- 3p axis in UV- induced skin inflammation. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 8, p. 919–936, 1 ago. 2016.

DEL ROSSO, J. Q.; LEVIN, J. The clinical relevance of maintaining the functional integrity of the stratum corneum in both healthy and disease-affected skin. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 4, n. 9, p. 22–42, set. 2011.

DESANTIS, K. et al. Use of differential scanning fluorimetry as a high-throughput assay to identify nuclear receptor ligands. **Nuclear receptor signaling**, v. 10, p. e002, 2012.

DI-POI, N. et al. Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. **Molecular cell**, v. 10, n. 4, p. 721–33, out. 2002.

DI-POI, N. et al. The anti-apoptotic role of PPAR β contributes to efficient skin wound healing. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 85, n. 2–5, p. 257–265, 2003.

DI-POI, N. et al. Functions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in skin homeostasis. **Lipids**, v. 39, n. 11, p. 1093–9, nov. 2004.

DIAS, J. M. et al. Genetic Recombination as a Reporter for Screening Steroid Receptor Agonists and Antagonists. **Analytical Biochemistry**, v. 258, n. 1, p. 96–102, abr. 1998.

DRAELOS, Z.; THAMAN, L. **Cosmetic formulation of skin care products**. Nova York: Taylor & Francis, 2006.

DU, J. et al. Establishment of a luciferase assay-based screening system for detecting estrogen receptor agonists in plant extracts. **Bone**, v. 49, n. 3, p. 572–579, 2011.

EL EISHI, N. et al. Peroxisome proliferator receptor (PPAR) β/δ in psoriatic patients before and after two conventional therapeutic modalities: methotrexate and PUVA. **European journal of dermatology : EJD**, v. 21, n. 5, p. 691–5, 1 jan. 2011.

ELIAS, P. M. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. **The Journal of investigative dermatology**, v. 125, n. 2, p. 183–200, ago. 2005.

ELMONGY, N. N.; SHAKER, O. Expression of peroxisome proliferator activator receptor β/δ (PPAR β/δ) in acne vulgaris. **European journal of dermatology : EJD**, v. 22, n. 1, p. 42–5, 1 jan. 2012.

FAN, F.; WOOD, K. V. Bioluminescent assays for high-throughput screening. **Assay and drug development technologies**, v. 5, n. 1, p. 127–136, 2007.

FATTORI, J. et al. RXR Agonist Modulates TR: Corepressor Dissociation Upon 9- cis Retinoic Acid Treatment. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 258–273, 1 fev. 2015.

FIGUEIRA, A. C. M. et al. Analysis of agonist and antagonist effects on thyroid hormone receptor conformation by hydrogen/deuterium exchange. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 25, n. 1, p. 15–31, jan. 2011.

FREITAS, J. et al. Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 257–266, 2011.

GILCHREST, B. A. Photoaging. **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. E1, p. E2-6, jun. 2013.

GILDE, A. J.; FRUCHART, J.-C.; STAELS, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors at the Crossroads of Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 9, p. A24–A32, nov. 2006.

GLICKMAN, J. F. et al. A Comparison of ALPHAScreen, TR-FRET, and TRF as Assay Methods for FXR Nuclear Receptors. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 7, n. 1, p. 3–10, 1 fev. 2002.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. Aging and wound healing. **World journal of surgery**, v. 28, n. 3, p. 321–6, mar. 2004.

GROVER, G. S. et al. Multiplexing nuclear receptors for agonist identification in a cell-based reporter gene high-throughput screen. **Journal of biomolecular screening: the official journal of the Society for Biomolecular Screening**, v. 8, n. 3, p. 239–246, 2003.

GUDJONSSON, J. E. et al. Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample: additional regulated genes and comparisons with in vitro models. **The Journal of investigative dermatology**, v. 130, n. 7, p. 1829–40, jul. 2010.

GUNTHER, J. R. et al. A Set of Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Assays for the Discovery of Inhibitors of Estrogen Receptor-Coactivator Binding. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 14, n. 2, p. 181–193, 2009.

GUPTA, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and PPAR agonists: the ‘future’ in dermatology therapeutics? **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 9, p. 767–780, 2015.

HAM, S. A. et al. PPAR δ promotes wound healing by up-regulating TGF- β 1-dependent or -independent expression of extracellular matrix proteins. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6b, p. 1747–1759, 16 jun. 2009.

HAM, S. A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor δ modulates MMP-2 secretion and elastin expression in human dermal fibroblasts exposed to ultraviolet B radiation. **Journal of Dermatological Science**, v. 76, n. 1, p. 44–50, out. 2014.

HAM, S. A. et al. PPAR δ inhibits UVB-induced secretion of MMP-1 through MKP-7-mediated suppression of JNK signaling. **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. 11, p. 2593–600, nov. 2013.

HAMURO, Y. et al. Hydrogen/deuterium-exchange (H/D-Ex) of PPAR γ LBD in the presence of various modulators. **Protein Science**, v. 15, n. 8, p. 1883–1892, ago. 2006.

HENEKA, M. T.; LANDRETH, G. E. PPARs in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 8, p. 1031–1045, ago. 2007.

HILAL, T. et al. A dual estrogen receptor TR-FRET assay for simultaneous measurement of steroid site binding and coactivator recruitment. **Journal of biomolecular screening**, v. 15, n. 3, p. 268–78, 2010.

HSU, C.-W. et al. Quantitative High-Throughput Profiling of Environmental Chemicals and Drugs that Modulate Farnesoid X Receptor. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6437, 26 set. 2014.

HUANG, R. et al. Chemical genomics profiling of environmental chemical modulation of human nuclear receptors. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 8, p. 1142–1148, 4 maio 2011.

HUANG, T. H.-W. et al. The role of herbal PPAR modulators in the treatment of

- cardiometabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 3, p. 195–206, set. 2009.
- HUANG, Y.-C. et al. Fenofibrate suppresses melanogenesis in B16-F10 melanoma cells via activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Chemico-biological interactions**, v. 205, n. 3, p. 157–64, 5 out. 2013.
- ICRE, G.; WAHLI, W.; MICHALIK, L. Functions of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and beta in skin homeostasis, epithelial repair, and morphogenesis. **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings**, v. 11, n. 1, p. 30–5, set. 2006.
- INAMADAR, A.; PALIT, A. Acute skin failure: Concept, causes, consequences and care. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 71, n. 6, p. 379, 1 jan. 2005.
- ITOH, T. et al. Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 9, p. 924–31, set. 2008.
- IWASHITA, A. et al. Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor delta-selective agonists in vitro and in vivo. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 320, n. 3, p. 1087–96, mar. 2007.
- JAIN, A. N. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 499–511, 13 fev. 2003.
- JAIN, A. N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 5, p. 281–306, 2007.
- JAIN, A. N. Effects of protein conformation in docking: Improved pose prediction through protein pocket adaptation. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 23, n. 6, p. 355–374, 2009.
- JASUJA, R. et al. Kinetic and thermodynamic characterization of dihydrotestosterone-induced conformational perturbations in androgen receptor ligand-binding domain. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 23, n. 8, p. 1231–41, ago. 2009.
- JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanisms of ageing and development**, v. 123, n. 7, p. 801–10, abr. 2002.
- JUNG, E. et al. Effect of Camellia japonica oil on human type I procollagen production and skin barrier function. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 127–31, 30 maio 2007.
- KANG, H. Y. et al. Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptors in human melanocytes. **The British journal of dermatology**, v. 150, n. 3, p. 462–8, mar. 2004.
- KIM, D. J. et al. PPARbeta/delta selectively induces differentiation and inhibits cell proliferation. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 1, p. 53–60, 2006.
- KIM, H. J. et al. Transforming growth factor-beta1 is a molecular target for the peroxisome proliferator-activated receptor delta. **Circulation research**, v. 102, n. 2, p. 193–200, 1 fev. 2008.
- KIM, H. J. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Regulates Extracellular Matrix and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Through the Activation of Transforming Growth Factor-1/Smad3. **Circulation Research**, v. 105, n. 1, p. 16–24, 2 jul. 2009.
- KROKER, A. J.; BRUNING, J. B. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPAR γ Partial Agonism. **PPAR Research**, v. 2015, p. 1–15, 8 set. 2015.
- KUENZLI, S.; SAURAT, J.-H. Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous

biology. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 2, p. 229–236, ago. 2003.

KWOK, H.-H. et al. Ginsenoside Rb₁ induces type I collagen expression through peroxisome proliferator-activated receptor-delta. **Biochemical pharmacology**, v. 84, n. 4, p. 532–9, 15 ago. 2012.

LAI, C.; JIANG, X.; LI, X. Development of Luciferase Reporter-Based Cell Assays. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 4, n. 3, p. 307–315, jun. 2006.

LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. **The Nuclear Receptor FactsBook**. 1. ed. Londres: Elsevier, 2001.

LEE, J. W. et al. Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 289–297, fev. 2001.

LEWIS, S. N. et al. Pharmacophore modeling improves virtual screening for novel peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 2015.

LEWIS, S. N.; BASSAGANYA-RIERA, J.; BEVAN, D. R. Virtual Screening as a Technique for PPAR Modulator Discovery. **PPAR research**, v. 2010, p. 861238, jan. 2010.

LIU, J. et al. A Homogeneous in Vitro Functional Assay for Estrogen Receptors: Coactivator Recruitment. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 3, p. 346–355, mar. 2003.

LOCKYER, P. et al. Minireview: Won't get fooled again: the nonmetabolic roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the heart. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 24, n. 6, p. 1111–9, jun. 2010.

LUQUET, S. et al. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ) in the control of fatty acid catabolism. A new target for the treatment of metabolic syndrome. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 833–837, 2004.

MALTAROLLO, V. G. et al. Structure-based virtual screening and discovery of new PPAR δ / γ dual agonist and PPAR δ and γ agonists. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.

MAN, M.-Q. et al. Basis for Improved Permeability Barrier Homeostasis Induced by PPAR and LXR Activators: Liposensors Stimulate Lipid Synthesis, Lamellar Body Secretion, and Post-Secretory Lipid Processing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 2, p. 386–392, fev. 2006.

MAN, M.-Q. et al. Deficiency of PPAR β / δ in the Epidermis Results in Defective Cutaneous Permeability Barrier Homeostasis and Increased Inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 2, p. 370–377, fev. 2008.

MARKT, P. et al. Pharmacophore modeling and parallel screening for PPAR ligands. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 10–11, p. 575–590, 2007.

MARTINASSO, G. et al. Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate, A Widely Used Peroxisome Proliferator and Plasticizer, on Cell Growth in the Human Keratinocyte Cell Line NCTC 2544. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 69, n. 5, p. 353–365, fev. 2006.

MATSUURA, N. et al. γ -Mangostin from *Garcinia mangostana* pericarps as a dual agonist that activates Both PPAR α and PPAR δ . **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 12, p. 2430–5, 23 dez. 2013.

MATULIS, D.; LOVRIEN, R. 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate Anion-Protein Binding Depends Primarily on Ion Pair Formation. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 1, p. 422–429, 1998.

MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 1 jun. 2011.

- MICALLEF, L. et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 2, p. 143–151, 1 fev. 2009.
- MICHALIK, L. et al. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. **The Journal of cell biology**, v. 154, n. 4, p. 799–814, 20 ago. 2001.
- MICHALIK, L. et al. Selective Expression of a Dominant-Negative Form of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Keratinocytes Leads to Impaired Epidermal Healing. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 9, p. 2335–2348, set. 2005.
- MICHALIK, L. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 4, p. 726–41, dez. 2006.
- MICHALIK, L.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. **Current opinion in biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 564–70, dez. 1999.
- MICHALIK, L.; WAHLI, W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 3, p. 598–606, mar. 2006.
- MICHALIK, L.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1771, n. 8, p. 991–8, ago. 2007.
- MOLONEY, S. J. et al. the Hairless Mouse Model of Photoaging: Evaluation of the Relationship Between Dermal Elastin, Collagen, Skin Thickness and Wrinkles. **Photochemistry and Photobiology**, v. 56, n. 4, p. 505–511, out. 1992.
- MONTAGNER, A. et al. New insights into the role of PPARs. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 85, n. 5, p. 235–243, 2011.
- MONTAGNER, A. et al. Src is activated by the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor β/δ in ultraviolet radiation-induced skin cancer. **EMBO molecular medicine**, v. 6, n. 1, p. 80–98, 1 jan. 2014.
- MORIWAKI, S.; TAKAHASHI, Y. Photoaging and DNA repair. **Journal of dermatological science**, v. 50, n. 3, p. 169–76, jun. 2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- MÖSSNER, R. et al. Agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit cell growth in malignant melanoma. **The Journal of investigative dermatology**, v. 119, n. 3, p. 576–82, set. 2002.
- NEELS, J. G.; GRIMALDI, P. A. Physiological Functions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β . **Physiological Reviews**, v. 94, n. 3, p. 795–858, jul. 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry 5th ed. Book**, 2008.
- NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–21, jan. 2007.
- NIJSTEN, T. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors in squamous cell carcinoma and its precursors. **Journal of cutaneous pathology**, v. 32, n. 5, p. 340–7, maio 2005.
- OLIVEIRA, S. H. et al. KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 197, 2014.
- OLIVER, W. R. et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist

promotes reverse cholesterol transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 9, p. 5306–5311, 2001.

OZERS, M. S. et al. Analysis of ligand-dependent recruitment of coactivator peptides to estrogen receptor using fluorescence polarization. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 19, n. 1, p. 25–34, 2005.

PAGUIO, A. et al. Improved dual-luciferase reporter assays for nuclear receptors. **Current chemical genomics**, v. 4, p. 43–9, 2010.

PAKYARI, M. et al. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. **Advances in wound care**, v. 2, n. 5, p. 215–224, jun. 2013.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 20, p. 3861–3, 15 out. 2002.

PASQUALI-RONCHETTI, I.; BACCARANI-CONTRI, M. Elastic fiber during development and aging. **Microscopy research and technique**, v. 38, n. 4, p. 428–35, 15 ago. 1997.

PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAEELS, B. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 12, n. 6, p. 486–504, jan. 2012.

PETERS, J. M. et al. Growth, Adipose, Brain, and Skin Alterations Resulting from Targeted Disruption of the Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta (delta). **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 14, p. 5119–5128, jul. 2000.

PICOLI, T. et al. Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (dmso) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (mdbk). **Science and Animal Health**, v. 3, n. 2, p. 159–168, 2015.

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

PRIVALSKEY, M. L. The Role of Corepressors in Transcriptional Regulation by Nuclear Hormone Receptors. **Annual Review of Physiology**, v. 66, n. 1, p. 315–360, mar. 2004.

QUAN, T.; FISHER, G. J. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 61, n. 5, p. 427–434, 2015.

RASTINEJAD, F. et al. Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 51, n. 3, p. T1–T21, 7 nov. 2013.

RENAUD, J.-P.; DELSUC, M.-A. Biophysical techniques for ligand screening and drug design. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 5, p. 622–628, 1 out. 2009.

RIBEIRO FILHO, H. V. et al. Screening for PPAR Non-Agonist Ligands Followed by Characterization of a Hit, AM-879, with Additional No-Adipogenic and cdk5-Mediated Phosphorylation Inhibition Properties. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 11, 1 fev. 2018.

RICOTE, M.; GLASS, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1771, n. 8, p. 926–35, ago. 2007.

RIGANO, D.; SIRIGNANO, C.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. The potential of natural products for targeting PPAR α . **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 4, p. 427–438, 2017.

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. [s.l.] Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

RITSU, M. et al. Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. **Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery**, v. 21, n. 1, p. 14–19, 1 jan. 2017.

- RITTIE, L.; FISHER, G. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing research reviews**, v. 1, p. 705–720, 2002.
- RIVIER, M. et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. **The Journal of investigative dermatology**, v. 111, n. 6, p. 1116–21, dez. 1998.
- ROMANOWSKA, M. et al. Activation of PPAR β /delta causes a psoriasis-like skin disease in vivo. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9701, jan. 2010.
- ROSENBLOOM, J.; ABRAMS, W. R.; MECHAM, R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 13, p. 1208–18, out. 1993.
- ROSENFELD, R. L. et al. Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. **The Journal of investigative dermatology**, v. 112, n. 2, p. 226–32, fev. 1999.
- ROSENFELD, R. L.; DEPLEWSKI, D.; GREENE, M. E. Peroxisome proliferator-activated receptors and skin development. **Hormone research**, v. 54, n. 5–6, p. 269–74, jan. 2000.
- SAND, J. M. B.; GENOVESE, F.; KARSDAL, M. A. Type IV Collagen. In: **Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 31–41.
- SANTOS, C. C. F. et al. Design and synthesis of cenocladamide analogues and their evaluation against breast cancer cell lines. **MedChemComm**, v. 8, n. 4, p. 755–766, 2017.
- SCHMUTH, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. **The Journal of investigative dermatology**, v. 122, n. 4, p. 971–83, abr. 2004.
- SCHMUTH, M. et al. Thematic review series: skin lipids. Peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptors in epidermal biology. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 3, p. 499–509, mar. 2008.
- SCHMUTH, M.; ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. [Beyond glucocorticoids, retinoids and vitamin D--the evolution of nuclear hormone type transcription factor targeting in the skin]. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, v. 1, n. 5, p. 352–62, maio 2003.
- SCHWABE, J. W. R.; TEICHMANN, S. A. Nuclear receptors: the evolution of diversity. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2004, n. 217, p. pe4, 20 jan. 2004.
- SEDLÁK, D.; PAGUIO, A.; BARTŮŇEK, P. Two panels of steroid receptor luciferase reporter cell lines for compound profiling. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 14, n. 4, p. 248–266, 2011.
- SEIMANDI, M. et al. Differential responses of PPAR α , PPAR δ , and PPAR γ reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. **Analytical Biochemistry**, v. 344, n. 1, p. 8–15, 2005.
- SENISTERRA, G.; CHAU, I.; VEDADI, M. Thermal Denaturation Assays in Chemical Biology. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 10, n. 2, p. 128–136, abr. 2012.
- SEO, M.-D. et al. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 171, mar. 2012.
- SERTZNIG, P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the human skin: importance of PPARs in skin physiology and dermatologic diseases. **American journal of**

clinical dermatology, v. 9, n. 1, p. 15–31, jan. 2008.

SERTZNIG, P.; REICHRATH, J. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in dermatology: Challenge and promise. **Dermato-endocrinology**, v. 3, n. 3, p. 130–5, jul. 2011.

SHI, X. et al. A short-incubation reporter-gene assay for high-throughput screening of estrogen receptor-alpha antagonists. **Assay and drug development technologies**, v. 3, n. 4, p. 393–400, ago. 2005.

SKERRETT, R.; MALM, T.; LANDRETH, G. Nuclear receptors in neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 72, p. 104–116, 2014.

SONNEVELD, E. et al. Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. **Toxicological Sciences**, v. 89, n. 1, p. 173–187, 2006.

SWINDELL, W. R. et al. Modulation of epidermal transcription circuits in psoriasis: new links between inflammation and hyperproliferation. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79253, jan. 2013.

SZYMAŃSKI, P.; MARKOWICZ, M.; MIKICIUK-OLASIK, E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 427–452, 2012.

TAKACS, M. L.; ABBOTT, B. D. Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (alpha, beta/delta, gamma) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 95, n. 1, p. 108–17, 17 jan. 2007.

TAN, N. S. et al. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. **Genes & development**, v. 15, n. 24, p. 3263–77, 15 dez. 2001.

TAN, N. S. et al. Critical roles of the nuclear receptor PPAR β (peroxisome-proliferator-activated receptor β) in skin wound healing. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, n. 1, p. 97–102, 1 fev. 2004.

TAN, N. S. et al. The Nuclear Hormone Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor / Potentiates Cell Chemotactism, Polarization, and Migration. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 20, p. 7161–7175, 15 out. 2007.

TAN, N. S. et al. Transcriptional control of physiological and pathological processes by the nuclear receptor PPAR β/δ . **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 98–122, out. 2016.

UD-DIN, S.; BAYAT, A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. **Wound Repair and Regeneration**, v. 25, n. 2, p. 164–176, 2017.

VARGA, T.; CZIMMERER, Z.; NAGY, L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 8, p. 1007–1022, ago. 2011.

VENDRAMINI-COSTA, D. B. et al. Effect of goniothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 18, p. 6742–6747, 15 set. 2010.

VERRECCHIA, F.; MAUVIEL, A. Transforming Growth Factor- β Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, n. 2, p. 211–215, fev. 2002.

VIDEIRA, N. B. et al. Cellular and Biophysical Pipeline for the Screening of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/Delta Agonists: Avoiding False Positives. **PPAR Research**, v. 2018, p. 1–14, 12 abr. 2018.

- VIVOLI, M. et al. Determination of Protein-ligand Interactions Using Differential Scanning Fluorimetry. **Journal of Visualized Experiments**, n. 91, p. 51809, 13 set. 2014.
- WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. **Swiss medical weekly**, v. 132, n. 7–8, p. 83–91, 23 fev. 2002.
- WAHLI, W.; MICHALIK, L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 7, p. 351–363, 2012.
- WANG, X. et al. Early controlled release of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW501516 improves diabetic wound healing through redox modulation of wound microenvironment. **Journal of Controlled Release**, v. 197, p. 138–147, jan. 2015.
- WATSON, R. E. B.; GRIFFITHS, C. E. M. Pathogenic aspects of cutaneous photoaging. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 4, n. 4, p. 230–6, dez. 2005.
- WEINDL, G. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: entry into the post-glucocorticoid era of skin treatment? **Drugs**, v. 65, p. 191901934, 2005.
- WESTERGAARD, M. et al. Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid. **The Journal of investigative dermatology**, v. 116, n. 5, p. 702–12, maio 2001.
- WESTERGAARD, M. et al. Expression and localization of peroxisome proliferator-activated receptors and nuclear factor kappaB in normal and lesional psoriatic skin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 121, n. 5, p. 1104–17, nov. 2003.
- WIKRAMANAYAKE, T. C.; STOJADINOVIC, O.; TOMIC-CANIC, M. Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 3, p. 272–280, 2014.
- WILLSON, T. M. et al. The PPARs: From orphan receptors to drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 527–550, 2000.
- WILSON, V. S.; BOBSEINE, K.; GRAY, L. E. Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 1, p. 69–77, 2004.
- WINTERFIELD, L. et al. Changing paradigms in dermatology: nuclear hormone receptors. **Clinics in Dermatology**, v. 21, n. 5, p. 447–454, set. 2003.
- WOLF, C. J. et al. Evaluating the additivity of perfluoroalkyl acids in binary combinations on peroxisome proliferator-activated receptor- α activation. **Toxicology**, v. 316, n. 1, p. 43–54, 2014.
- WURTZ, J.-M. et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 1, p. 87–94, jan. 1996.
- XIA, Z. et al. Development of a cell-based high-throughput peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) screening model and its application for evaluation of the extracts from *Rhizoma Coptis*. **Journal of Asian natural products research**, v. 15, n. 3, p. 225–234, mar. 2013.
- XU, H. E. et al. Molecular Recognition of Fatty Acids by Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Molecular Cell**, v. 3, n. 3, p. 397–403, mar. 1999.
- XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. **Advances in wound care**, v. 4, n. 3, p. 119–136, 1 mar. 2015.
- YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes.

Clinical and experimental dermatology, v. 26, p. 583–591, 2001.

YARROW, J. C. et al. **A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods** BioMed Central, , 2004. Disponível em: <<http://dash.harvard.edu/handle/1/4739592>>. Acesso em: 27 jan. 2015

ZHANG, J.-H. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 4, n. 2, p. 67–73, 1 abr. 1999.

ZHANG, Q. et al. Characterization of estrogen receptor α activities in polychlorinated biphenyls by in vitro dual-luciferase reporter gene assay. **Environmental Pollution**, v. 189, p. 169–175, jun. 2014.

ZHANG, X. D. A pair of new statistical parameters for quality control in RNA interference high-throughput screening assays. **Genomics**, v. 89, n. 4, p. 552–561, abr. 2007.

ZHOU, C. et al. Discovery and biological characterization of a novel series of androgen receptor modulators. **British journal of pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 440–50, 29 maio 2008.

ZORRILLA, S.; GARZÓN, B.; PÉREZ-SALA, D. Selective binding of the fluorescent dye 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid to peroxisome proliferator-activated receptor γ allows ligand identification and characterization. **Analytical Biochemistry**, v. 399, n. 1, p. 84–92, abr. 2010.

APÊNDICE A – Lista de peso molecular dos compostos cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Composto	Peso da amostra (mg)	Peso molecular (g/mol)	Observação
Sulfonamidas (série Gli a)			
1ª	5,2	340,42	
2ª	5,2	391,46	
3ª	5,2	358,41	
4ª	6,3	354,44	
5ª	5,4	466,66	
6ª	7,3	374,86	
7a	5,8	409,31	
10a	5,6	414,54	
13a	5,3	419,31	
14a	6,5	370,44	
15a	5,3	346,45	
20a	6,5	549,62	
Sulfoniluréias (série Gli c)			
1c	8,0	475,60	
2c	5,2	526,65	
15c	7,1	481,63	
Hidrazonas			
F1	4,8	314,34	
F2	7,1	393,24	
F3	5,8	359,34	
F8	5,6	364,40	
F9	5,4	364,40	
F29	4,4	365,36	
G3	5,6	335,32	
G6	5,4	259,22	
G7	6,0	285,26	
G21	5,7	274,11	
G22	6,4	274,11	
Oxadiazóis (derivados das hidrazonas)			
Y7	5,6	327,30	
Y13	5,3	266,30	
Y18	4,9	311,30	
Z1	4,0	356,14	
Z3	4,8	401,12	
Z21	4,5	401,12	
Chalconas			
P4	10,1	297,27	Chemico-Biological Interactions 171 (2008) 355–362
P11	5,2	297,27	Chemico-Biological Interactions 171 (2008) 355–362

L5	5,1	297,27	Biochimie 91 (2009) 1493-1498
L6	5,9	297,27	Biochimie 91 (2009) 1493-1498
R7	5,5	303,32	European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010) 1332-1337
R8	5,7	303,32	European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010) 1332-1337
C29	6,0	303,32	European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010) 1332-1337
C30	5,8	303,32	European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010) 1332-1337
A15	6,7	303,32	European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010) 1332-1337
A19	5,4	303,32	European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010) 1332-1337
L50	5,0	363,33	
N7	5,2	305,29	
R56	5,0	369,38	
CH8	5,7	329,31	
R32	5,9	302,33	
Tiazolidinonas			
PDNV32	6,0	330,10	
PDNV33	4,9	330,10	
PDNV34	6,5	330,10	
PDNV35	6,4	313,12	
B27	4,7	288,07	
N02	5,6	304,04	
N03	5,2	295,08	
N04	5,8	300,09	
N05	5,1	300,09	
N12	5,3	286,08	
N15	5,1	286,08	
N16	5,2	288,07	
N20	6,8	295,08	
N23	5,8	315,07	
N24	5,0	315,07	
N27	4,7	288,07	
P74	4,7	304,04	
P76	5,4	304,04	
P77	6,8	315,07	
P79	5,1	284,10	
P80	5,5	300,09	
P81	7,7	271,08	
P92	4,7	271,08	

APÊNDICE B – Padronização do Experimento de TSA

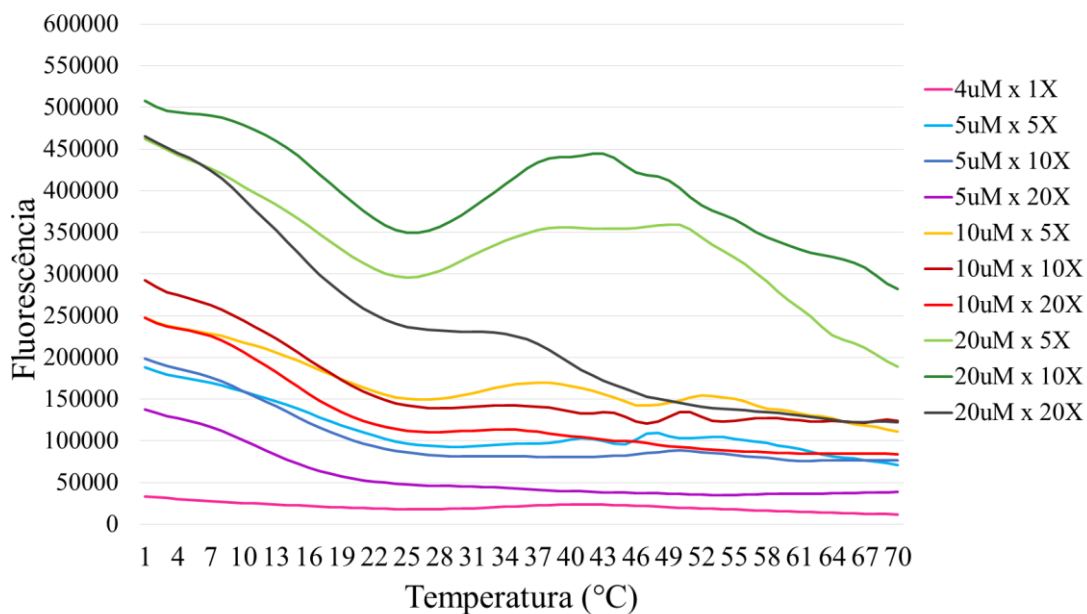


Figura 60. Intensidade do sinal de TSA variando-se as concentrações de sonda e proteína. A condição genérica testada foi 4 μ M de proteína e 1X de sonda (linha rosa), e foram testadas as concentrações de sonda SYPRO® Orange (5X, 10X e 20X) e de proteína (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M).

APÊNDICE C – Teste de ANS e de hPPAR δ LBD na proporção 1:1

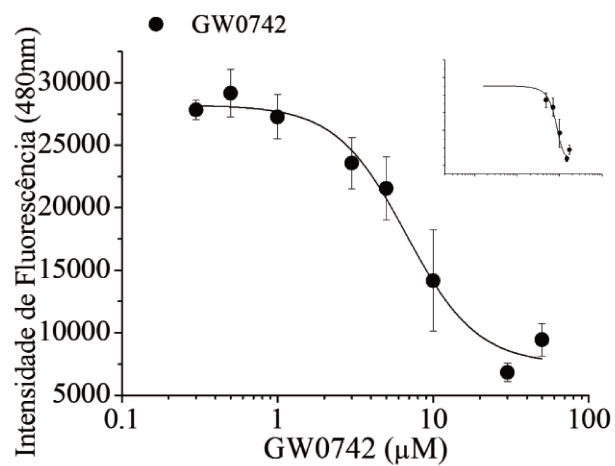
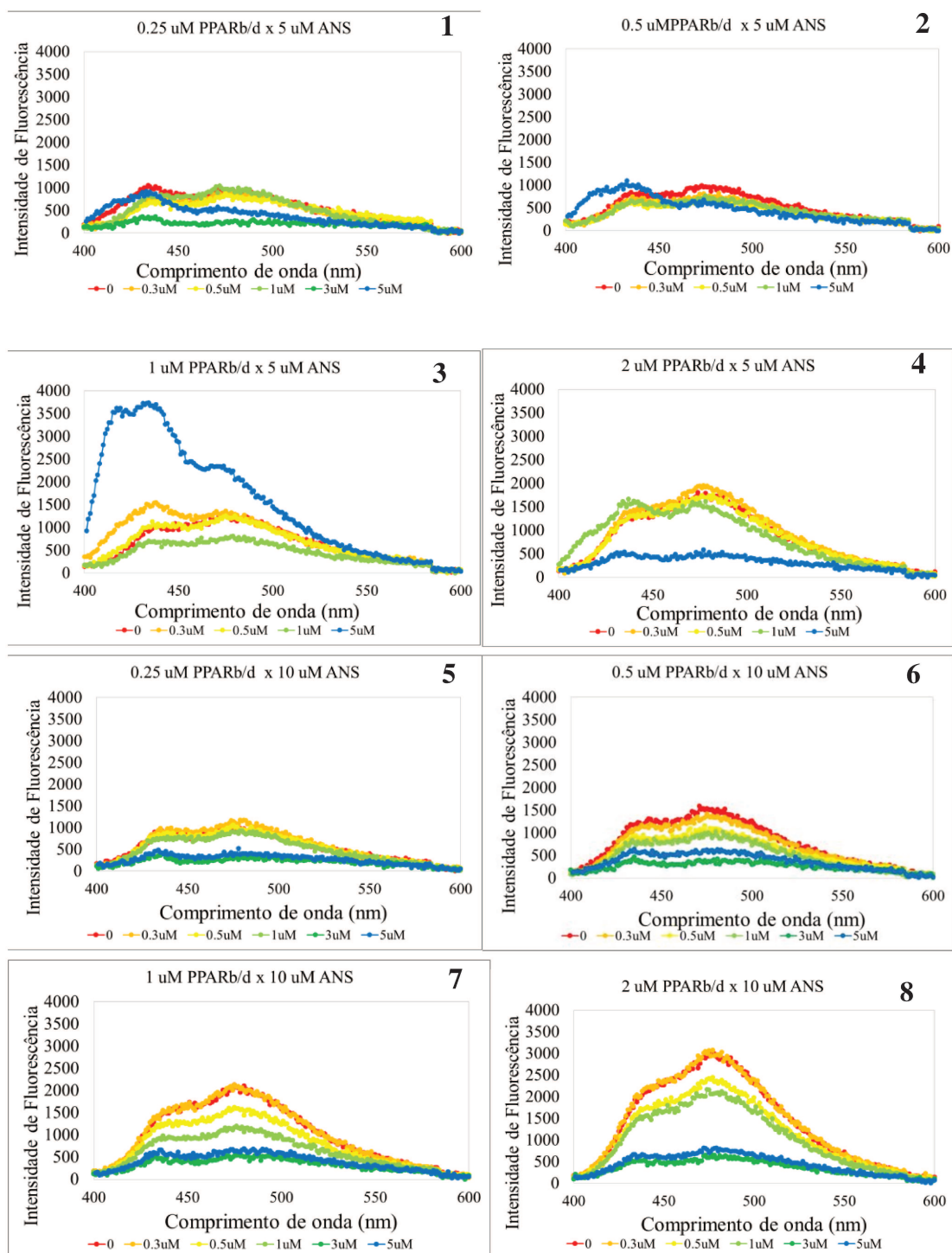


Figura 61. Curvas de supressão da fluorescência do ANS em PPAR β/δ após titulação de GW0742. Foram utilizados 10 μM hPPAR δ LBD e 10 μM de ANS. A concentração de GW0742 variou de 0,3 μM a 50 μM . $K_{d \text{ app}}$ de $6,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ para GW0742.

APÊNDICE D – Teste de concentrações de sonda e hPPAR δ LBD para experimento de supressão do ANS



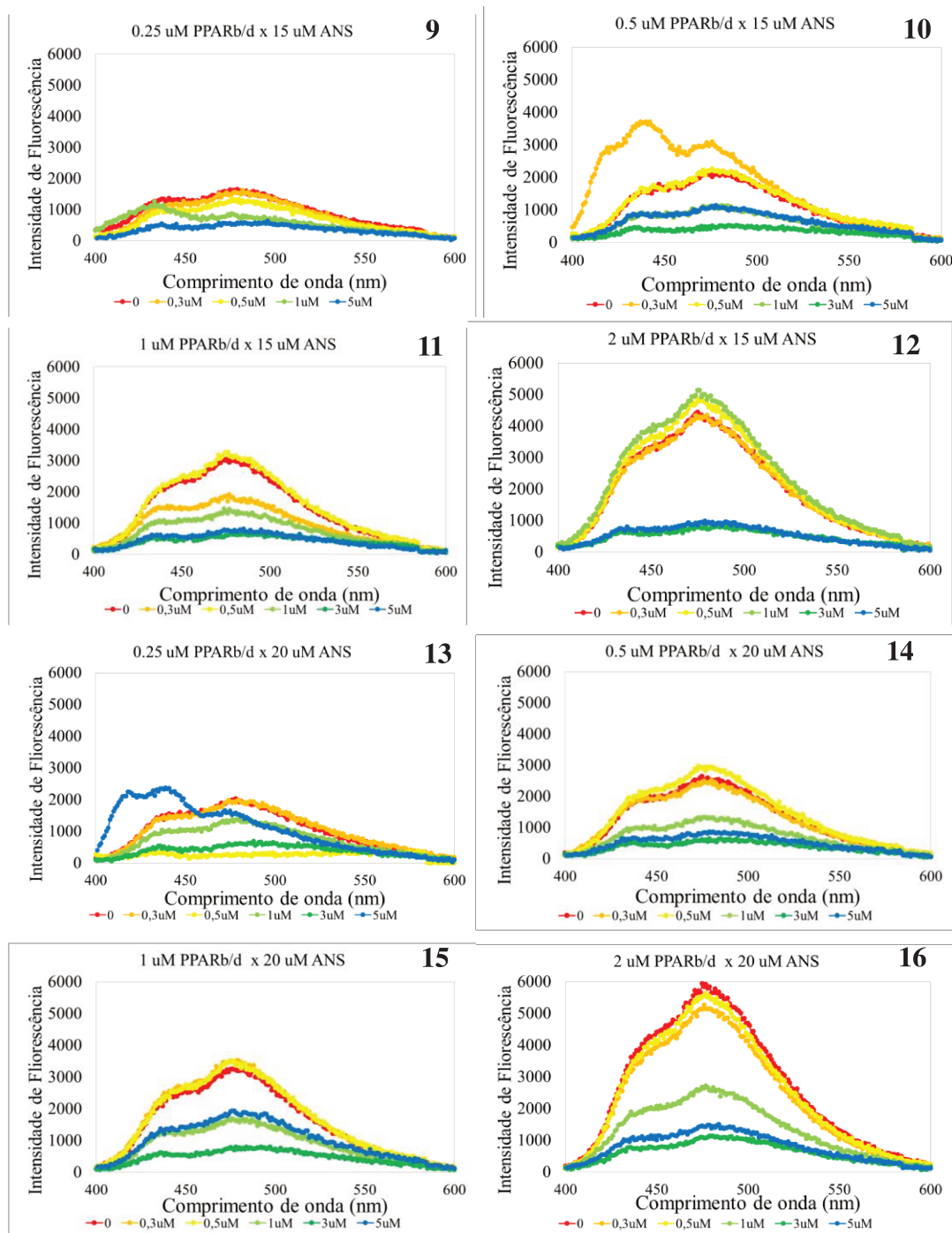


Figura 62. Teste de concentração de sonda ANS e de proteína. A concentração de hPPAR δ LBD (PPARb/d) variou de 0,25 a 2 μ M. A concentração de ANS variou de 5 a 20 μ M. Após incubação da sonda com a proteína por 1h a 4 $^{\circ}$ C, o agonista GW0742 foi adicionado nas concentrações de 0,3 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M. DMSO foi utilizado como veículo (0). 1-4: Variação da concentração de hPPAR δ LBD na presença de 5 μ M ANS; 5-8: Variação da concentração de hPPAR δ LBD na presença de 10 μ M ANS; 9-12: Variação da concentração de hPPAR δ LBD na presença de 15 μ M ANS; e 13-16: Variação da concentração de hPPAR δ LBD na presença de 20 μ M ANS.

APÊNDICE E – Curvas de supressão do ANS para ligantes de hPPAR δ LBD

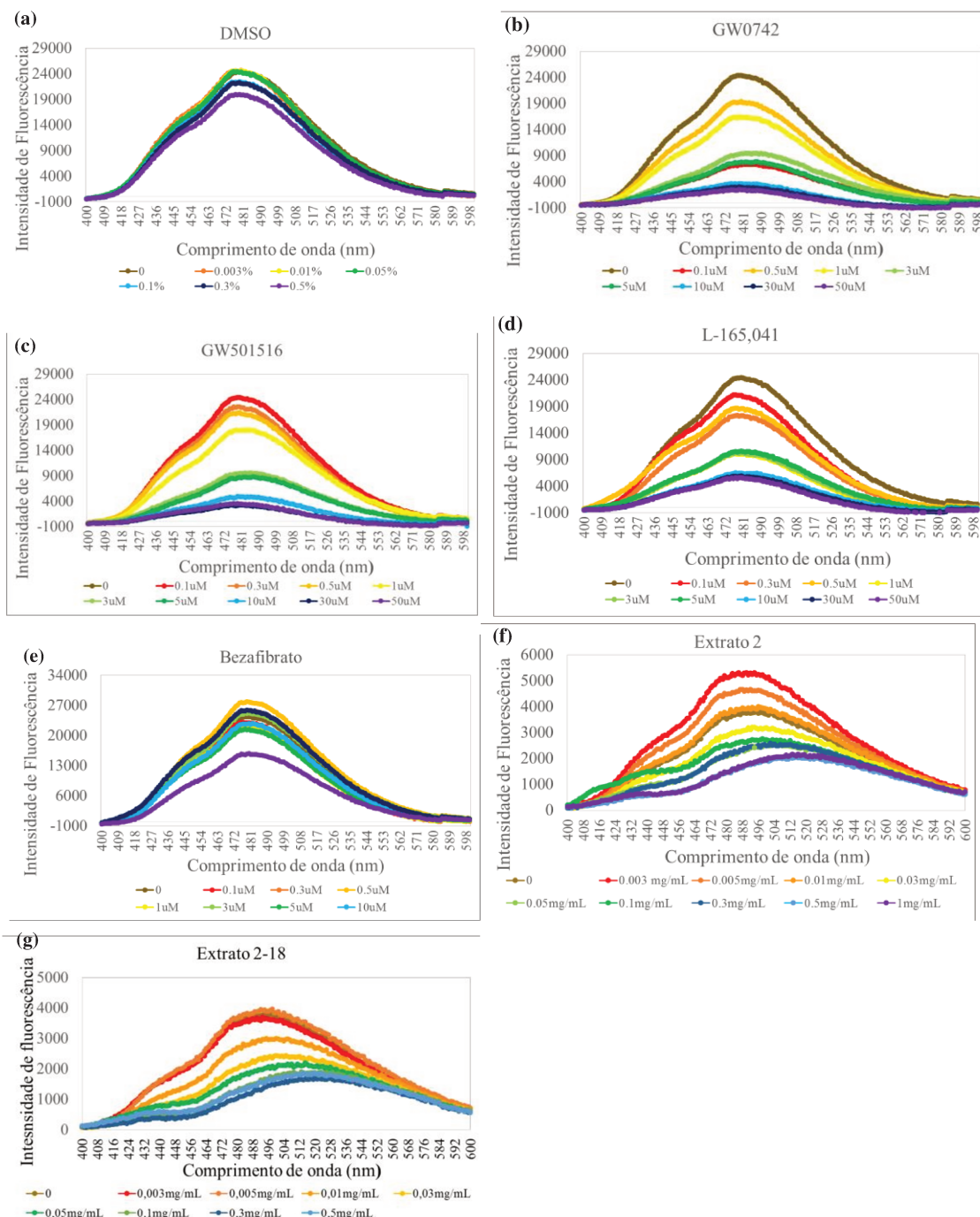


Figura 63. Supressão da Fluorescência do ANS com os ligantes de hPPAR δ . O experimento foi realizado em triplicata. O veículo DMSO foi utilizado nas mesmas diluições presente nas amostras com os agonistas: 0, 0,003%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,3%, 0,5%. Os agonistas comerciais B) GW0742, C) GW1516, D) L-165,041, E) Bezafibrato foram titulados nas concentrações de 0,3 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M. O Extrato 2 (F) da Phytobios foi titulado nas concentrações de 0, 0,003 mg/mL, 0,005 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,03 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL.

APÊNDICE F – Mapa das placas de triagem de compostos de colaboradores

Tabela 6. Mapa da placa I de compostos dos colaboradores Dr. Reinaldo Pilli, Dr. Alessandro Nascimento e Dra. Daniela Trivella.

Posição no gráfico	Poço	Amostra	Posição no gráfico	Poço	Amostra	Posição no gráfico	Poço	Amostra
1	H1	Controle Negativo	31	C4	Y13	61	E10	N16
2	H2	Controle Negativo	32	C5	Y18	62	E11	N23
3	H3	Controle Negativo	33	C6	Z1	63	E12	N20
4	A1	1a	34	C7	Z3	64	F1	N24
5	A2	2a	35	C8	Z21	65	F2	N27
6	A3	3a	36	C9	P4	66	F3	P74
7	A4	4a	37	C10	P11	67	F4	P76
8	A5	5a	38	C11	L5	68	F5	P77
9	A6	6a	39	C12	L6	69	F6	P79
10	A7	7a	40	D1	R7	70	F7	P80
11	A8	10a	41	D2	R8	71	F8	P81
12	A9	13a	42	D3	C29	72	F9	P92
13	A10	14a	43	D4	C30	73	F10	27AM
14	A11	15a	44	D5	A15	74	F11	AHX
15	A12	20a	45	D6	A19	75	F12	ACFOI
16	B1	1c	46	D7	L50	76	G1	LFNT122
17	B2	2c	47	D8	N7	77	G2	LFNT139
18	B3	15c	48	D9	R56	78	G3	LFNT74
19	B4	F1	49	D10	CH8	79	G4	LFNT75
20	B5	F2	50	D11	R32	80	G5	ASNOO7
21	B6	F3	51	D12	PDNV32	81	G6	AC1
22	B7	F8	52	E1	PDNV33	82	G7	AC2
23	B8	F9	53	E2	PDNV34	83	G8	13AG
24	B9	F29	54	E3	PDNV35	84	G9	14PPAR
25	B10	G3	55	E4	B27	85	G10	GNT
26	B11	G6	56	E5	N02	86	G11	GW501516
27	B12	G7	57	E6	N03	87	G12	L-165,041
28	C1	G21	58	E7	N05	88	H4	Controle Positivo
29	C2	G22	59	E8	N12	89	H5	Controle Positivo
30	C3	Y7	60	E9	N15	90	H6	Controle Positivo

Tabela 7. Mapa da placa II de triagem, compostos do colaborador Prof. Dr. Hélio Stefani.

Posição no gráfico	Poço	Amostra	Posição no gráfico	Poço	Amostra
1	A1	Controle Negativo	23	B6	AF-10
2	B12	Controle Negativo	24	B7	AF-11
3	C1	Controle Negativo	25	B8	AF-12
4	D12	Controle Negativo	26	B9	AF-13
5	E1	Controle Negativo	27	B10	AF-14
6	F12	Controle Negativo	28	D10	AF-16
7	G1	Controle Negativo	29	D11	Ber A6
8	H12	Controle Negativo	30	E2	A
9	A2	GW1516	31	E3	B
10	A3	Bezafibrato	32	E4	C
11	A4	13AG	33	E5	D
12	A5	14PPAR	34	E6	E
13	A6	GNT	35	E7	F
14	A7	AF-1	36	E8	G
15	A8	AF-2	37	A12	Controle Positivo
16	A9	AF-3	38	B1	Controle Positivo
17	A10	AF-4	39	E12	Controle Positivo
18	A11	AF-5	40	F1	Controle Positivo
19	B2	AF-6	41	G12	Controle Positivo
20	B3	AF-7	42	H1	Controle Positivo
21	B4	AF-8	43		
22	B5	AF-9			

Tabela 8. Mapa da placa III de triagem, compostos do colaborador Prof. Dr. Júlio Pastre.

Posição no gráfico	Poço	Amostra	Posição no gráfico	Poço	Amostra
1	A1	Controle Negativo	17	D10	AN3
2	B1	Controle Negativo	18	C9	CF16
3	C1	Controle Negativo	19	C10	CF5
4	D1	Controle Negativo	20	C11	CF13
5	E1	Controle Negativo	21	D11	AN5
6	F1	Controle Negativo	22	E2	AN6
7	G1	Controle Negativo	23	E3	AN7
8	H1	Controle Negativo	24	E4	AN11
9	D2	CF3	25	E5	Controle Positivo
10	D3	CF20	26	E6	Controle Positivo
11	D4	CF21	27	E7	Controle Positivo
12	D5	CF22	28	E8	Controle Positivo
13	D6	CF23	29	E9	Controle Positivo
14	D7	CF24	30	E10	Controle Positivo
15	D8	CF26	31	E11	Controle Positivo
16	D9	AN1			

APÊNDICE G – Avaliação da Citotoxicidade das diferentes concentrações estoque da biblioteca Phytobios

Tabela 9. Avaliação da Citotoxicidade das diferentes concentrações estoque da biblioteca Phytobios. Foi testado o quadrante Q1 da placa P1a da Phytobios nas concentrações de 10 mg/mL, 1 mg/mL e 0,1 mg/mL. A média do Valor de *Renilla* para ambos os controles positivo e negativo foi considerada 100%. Os valores individuais de *Renilla* foram comparadas em relação ao controle 100%. Condições com valor de *Renilla* inferior a 60% do valor de *Renilla* dos controles foram consideradas com citotoxicidade aparente e estão destacadas com o texto em vermelho. A biblioteca de 10 mg/mL apresentou citotoxicidade em 53% das condições. A biblioteca de 1 mg/mL apresentou citotoxicidade em 3 condições (3,75%). A biblioteca de 1 mg/mL não apresentou citotoxicidade aparente para nenhuma das condições.

Amostra			10mg/mL		1mg/mL		0,1mg/mL	
Linha	Coluna	Conteúdo	Valor de <i>Renilla</i>	Porcentagem do valor de <i>Renilla</i> dos controles (%)	Valor de <i>Renilla</i>	Porcentagem do valor de <i>Renilla</i> dos controles (%)	Valor de <i>Renilla</i>	Porcentagem do valor de <i>Renilla</i> dos controles (%)
-	-	Media dos controles	2340188	100	2632688	100	2588813	100
A	1	Controle Negativo	3119000	167	3333000	138,5	3514000	148,2
B	1	Controle Negativo	2856000	152,9	3138000	130,4	3290000	138,8
C	1	Controle Negativo	3430000	183,7	2971000	123,5	3296000	139
D	1	Controle Negativo	2696000	144,4	2774000	115,3	2710000	114,3
E	1	Controle Negativo	3333000	178,5	2888000	120	2754000	116,2
F	1	Controle Negativo	2618000	140,2	2802000	116,4	2535000	106,9
G	1	Controle Negativo	2892000	154,8	2581000	107,3	2549000	107,5
H	1	Controle Negativo	1559000	83,5	2387000	99,2	1807000	76,2
A	12	Controle Positivo	2078000	111,3	2853000	118,6	2699000	113,8
B	12	Controle Positivo	1941000	103,9	2756000	114,6	2664000	112,4
C	12	Controle Positivo	1506000	80,7	2372000	98,6	2424000	102,3
D	12	Controle Positivo	2205000	118,1	2577000	107,1	2426000	102,3
E	12	Controle Positivo	1779000	95,2	2223000	92,4	2378000	100,3
F	12	Controle Positivo	1808000	96,8	2253000	93,7	2380000	100,4
G	12	Controle Positivo	1992000	106,7	2107000	87,6	2027000	85,5
H	12	Controle Positivo	1631000	87,3	2108000	87,6	1968000	83
A	2	Amostra X1	2040000	109,2	2940000	122,2	3001000	126,6
A	3	Amostra X2	372374	19,9	2977000	123,7	2856000	120,5
A	4	Amostra X3	2169000	116,1	3495000	145,3	2978000	125,6
A	5	Amostra X4	9983	0,5	2618000	108,8	3101000	130,8
A	6	Amostra X5	3453000	184,9	2961000	123,1	2940000	124
A	7	Amostra X6	1625000	87	3501000	145,5	3155000	133,1
A	8	Amostra X7	669901	35,9	3189000	132,5	2819000	118,9
A	9	Amostra X8	1460000	78,2	3793000	157,6	2560000	108
A	10	Amostra X9	20746	1,1	3159000	131,3	2734000	115,3
A	11	Amostra X10	1037000	55,5	2958000	122,9	2594000	109,4
B	2	Amostra X11	1670000	89,4	2750000	114,3	2716000	114,6
B	3	Amostra X12	464367	24,9	2859000	118,8	3130000	132
B	4	Amostra X13	4243000	227,2	3530000	146,7	2983000	125,8
B	5	Amostra X14	129070	6,9	3059000	127,1	2834000	119,5
B	6	Amostra X15	3528000	188,9	2811000	116,8	2934000	123,8

B	7	Amostra X16	457187	24,5	2811000	116,8	2897000	122,2
B	8	Amostra X17	598874	32,1	2854000	118,6	2848000	120,1
B	9	Amostra X18	170867	9,1	3118000	129,6	2879000	121,5
B	10	Amostra X19	6017	0,3	53010	2,2	2776000	117,1
B	11	Amostra X20	540278	28,9	2909000	120,9	2961000	124,9
C	2	Amostra X21	2672000	143,1	2216000	92,1	2476000	104,4
C	3	Amostra X22	3592000	192,3	2674000	111,1	2763000	116,5
C	4	Amostra X23	29217	1,6	2538000	105,5	2726000	115
C	5	Amostra X24	2113000	113,2	2758000	114,6	2772000	116,9
C	6	Amostra X25	4050000	216,9	2901000	120,6	2654000	111,9
C	7	Amostra X26	539788	28,9	3489000	145	2646000	111,6
C	8	Amostra X27	2909000	155,8	2684000	111,6	2758000	116,4
C	9	Amostra X28	2614000	140	4573000	190,1	2496000	105,3
C	10	Amostra X29	130507	7	2900000	120,5	2692000	113,6
C	11	Amostra X30	609605	32,6	2484000	103,2	2425000	102,3
D	2	Amostra X31	2614000	140	2147000	89,2	2390000	100,8
D	3	Amostra X32	3326000	178,1	2388000	99,3	2475000	104,4
D	4	Amostra X33	2480000	132,8	2529000	105,1	2661000	112,2
D	5	Amostra X34	10350	0,6	2150000	89,4	2651000	111,8
D	6	Amostra X35	2607000	139,6	2330000	96,8	2567000	108,3
D	7	Amostra X36	360395	19,3	2301000	95,6	2663000	112,3
D	8	Amostra X37	70073	3,8	2311000	96,1	2825000	119,1
D	9	Amostra X38	1201000	64,3	1472000	61,2	2539000	107,1
D	10	Amostra X39	1306000	69,9	2401000	99,8	2480000	104,6
D	11	Amostra X40	1374000	73,6	2277000	94,6	2688000	113,4
E	2	Amostra X41	679161	36,4	2472000	102,7	2458000	103,7
E	3	Amostra X42	72274	3,9	2397000	99,6	2417000	101,9
E	4	Amostra X43	260196	13,9	3000000	124,7	2492000	105,1
E	5	Amostra X44	5168	0,3	3005000	124,9	2392000	100,9
E	6	Amostra X45	2276000	121,8	2219000	92,2	2319000	97,8
E	7	Amostra X46	2819000	150,9	2307000	95,9	2310000	97,4
E	8	Amostra X47	401062	21,5	2129000	88,5	2307000	97,3
E	9	Amostra X48	1902000	101,8	3012000	125,2	2397000	101,1
E	10	Amostra X49	2102000	112,5	2286000	95	2526000	106,6
E	11	Amostra X50	2809000	150,4	1831000	76,1	2415000	101,9
F	2	Amostra X51	906688	48,5	1909000	79,3	2183000	92,1
F	3	Amostra X52	2986000	159,9	2179000	90,6	2478000	104,5
F	4	Amostra X53	413780	22,2	2555000	106,2	2489000	105
F	5	Amostra X54	78064	4,2	2422000	100,7	2285000	96,4
F	6	Amostra X55	83557	4,5	2032000	84,4	2192000	92,5
F	7	Amostra X56	2372000	127	2082000	86,5	2150000	90,7
F	8	Amostra X57	2963000	158,7	1918000	79,7	2318000	97,8
F	9	Amostra X58	2501000	133,9	2500000	103,9	2257000	95,2
F	10	Amostra X59	2547000	136,4	2190000	91	2337000	98,6
F	11	Amostra X60	546111	29,2	2026000	84,2	2287000	96,5
G	2	Amostra X61	687637	36,8	1729000	71,8	2113000	89,1
G	3	Amostra X62	98904	5,3	1887000	78,4	2109000	88,9
G	4	Amostra X63	391092	20,9	2382000	99	2490000	105

G	5	Amostra X64	498784	26,7	1871000	77,7	2237000	94,3
G	6	Amostra X65	1378000	73,8	1841000	76,5	2234000	94,2
G	7	Amostra X66	910144	48,7	2304000	95,7	2195000	92,6
G	8	Amostra X67	1348000	72,2	2000000	83,1	2255000	95,1
G	9	Amostra X68	156171	8,4	4269000	177,4	2410000	101,7
G	10	Amostra X69	201694	10,8	2807000	116,7	2245000	94,7
G	11	Amostra X70	1052000	56,3	1852000	77	2211000	93,3
H	2	Amostra X71	978905	52,4	2330000	96,8	2022000	85,3
H	3	Amostra X72	912110	48,8	2353000	97,8	2214000	93,4
H	4	Amostra X73	1184000	63,4	2619000	108,9	2394000	101
H	5	Amostra X74	1687000	90,3	2084000	86,6	2172000	91,6
H	6	Amostra X75	869895	46,6	1994000	82,9	2261000	95,4
H	7	Amostra X76	55497	3	1873000	77,8	2163000	91,3
H	8	Amostra X77	4182000	223,9	2166000	90	2375000	100,2
H	9	Amostra X78	54098	2,9	628012	26,1	2318000	97,8
H	10	Amostra X79	41135	2,2	127266	5,3	2269000	95,7
H	11	Amostra X80	2448000	131,1	2080000	86,4	2306000	97,3

APÊNDICE H – Resultados individuais das placas de triagem da biblioteca Phytobios

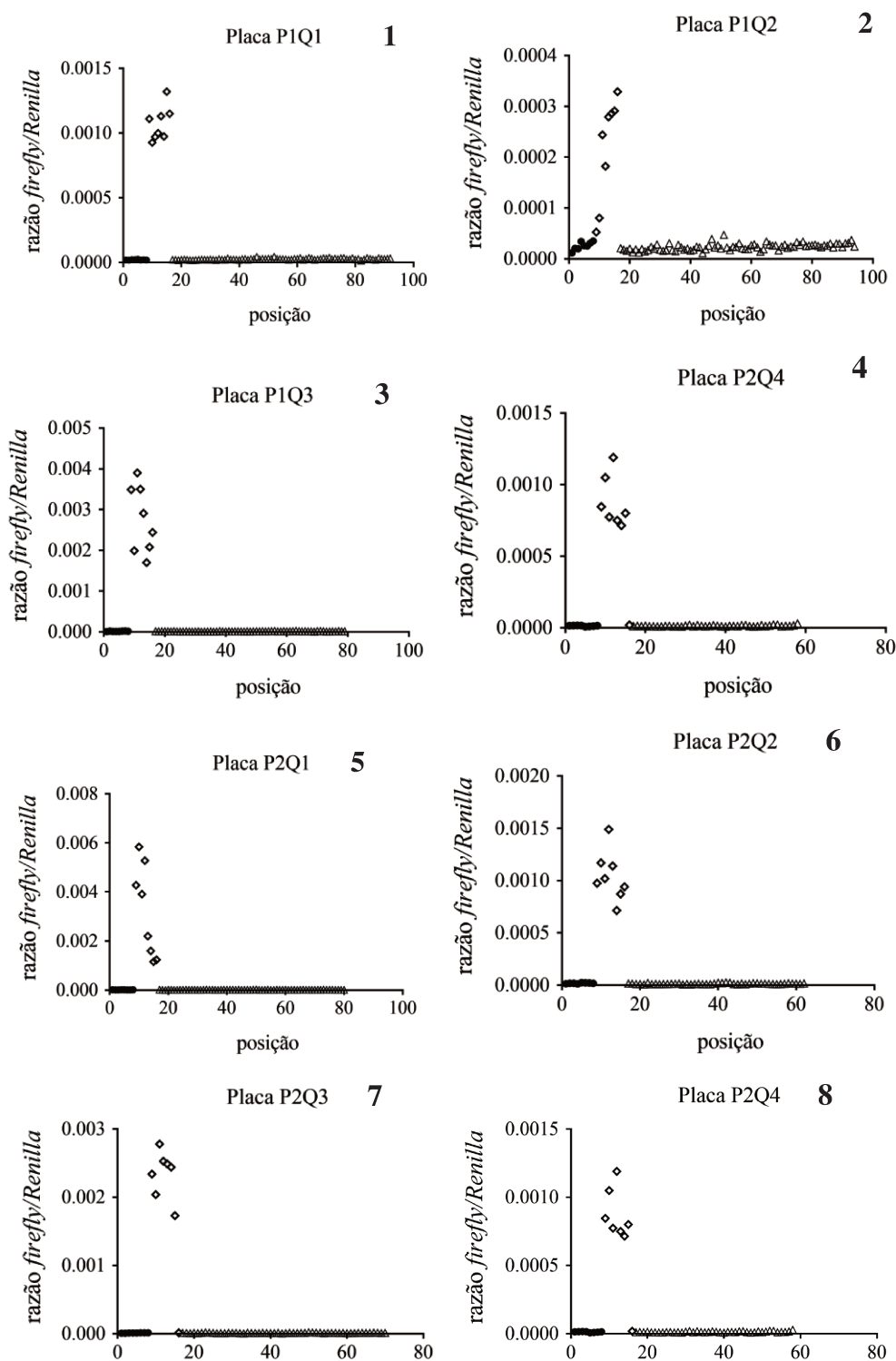


Figura 64. Triagem primária de extratos da biblioteca Phytobios. • Controle negativo (1% DMSO), $\diamond$ controle positivo (1 μ M GW0742), Δ extratos (0.01 mg/mL). **1-8:** triagem dos extratos expressa como razão *firefly/Renilla* de cada composto/controle para cada placa de triagem, como indicado.

APÊNDICE I – Triagem Biblioteca NIH-NCC

Tabela 10. Candidatos a *hits* selecionados na triagem primária da biblioteca NIH-NCC

Código	# placa	Poço	ID Amostra	ID PUBCHEM
1	NGP-104-01	A05	Sulfato de Salbutamol	9884233
2	NGP-104-01	B05	Hidrocloride de Vesamicol	6603219
3	NGP-104-01	C07	Cinanserín	23581800
4	NGP-104-01	F04	“Benzenoacetnitrila, alpha-[3-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]methylamino]propyl]-3,4-dimethoxy-alpha-(1-methylethyl)-, (r)- [cas]”	23581799
5	NGP-104-01	F07	Hidrocloride de Trazodone	62935
6	NGP-104-01	F11	Epigallocatechin Gallate (EGCG)	65064
7	NGP-104-01	G02	Hidrocloride de Pilocarpina	5909
8	NGP-104-01	G03	“Ácido Benzeno acético, 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]-, monosodium salt [cas]”	5018304
9	NGP-104-01	G04	Deprenalin	26758
10	NGP-104-01	G05	Mesoridazine	36207
11	NGP-104-01	G10	“Ácido L-Glutâmico, n-[4-[(2,4-diamino-6-pteridiny]methyl]methylamino]benzoyl]- [cas]”	165528
12	NGP-104-01	H03	Progesterona	5994
13	NGP-104-01	H04	Capsaicina	1548942
14	NGP-104-01	H05	“3(2h)-pyridazinone6-[4-(difluoromethoxy)-3-methoxyphenyl]- [cas]”	5723
15	NGP-104-01	H07	Hidrocloride de Urapidil	167980
16	NGP-104-01	H09	Piribedil	23581808
17	NGP-104-06	F03	Mifepristona	55245
18	NGP 201-03	G07	Cloranfenicol	298
19	NGP 201-04	C06	Felodipina	3333
20	NGP 201-04	D03	Meloxicam	5388987
21	NGP 201-04	E03	Hidroclorideo de Doxorubicina	3085107
22	NGP 201-04	G02	Hidroclorídeo de Naltrexona	5485201
23	NGP 201-04	H03	Gatifloxacino	5379
24	NGP 201-04	H04	Tiotixeno	6444849

APÊNDICE J – Ativação do PPAR β/δ durante ensaios funcionais (proliferação e migração).

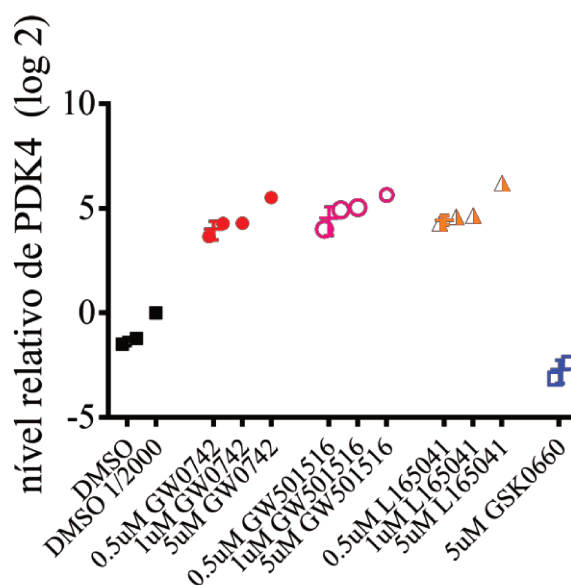


Figura 65. Avaliação da ativação do PPAR β/δ por seus ligantes para o ensaio de proliferação de HaCaT. Para confirmar se o efeito observado na proliferação das células era devido aos ligantes de PPAR β/δ , o mesmo tratamento do ensaio de proliferação foi aplicado em células HaCaT cultivadas em placa de 6 poços. Dados de um experimento realizado com duplicatas técnicas. Erro: SD.

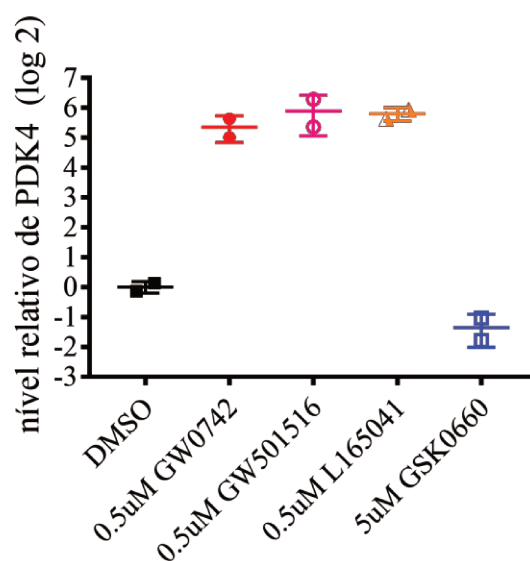


Figura 66. Avaliação da ativação do PPAR β/δ por seus ligantes para o ensaio de migração de HaCaT. Para confirmar se o efeito observado na migração das células era devido aos ligantes de PPAR β/δ , o mesmo tratamento do ensaio de migração foi aplicado em células HaCaT cultivadas em placa de 6 poços. Dados de quatro experimentos independentes. Símbolos: média de um ensaio independente realizado com duas replicatas técnicas, Erro: SD.

APÊNDICE K – Artigo publicado sobre o desenvolvimento da metodologia de triagem de agonistas de PPAR β/δ

Hindawi
PPAR Research
Volume 2018, Article ID 3681590, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/3681590>



Research Article

Cellular and Biophysical Pipeline for the Screening of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/Delta Agonists: Avoiding False Positives

Natália Bernardi Videira^{1,2},[✉] Fernanda Aparecida Heleno Batista,¹
Artur Torres Cordeiro¹,[✉] and Ana Carolina Migliorini Figueira¹

¹Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), 13083-970 Campinas, SP, Brazil

²Graduate Program in Biosciences and Technology of Bioactive Products, Institute of Biology, State University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Ana Carolina Migliorini Figueira; ana.figueira@lnbio.cnpe.br

Received 29 September 2017; Revised 22 January 2018; Accepted 5 February 2018; Published 12 April 2018

Academic Editor: Stéphane Mandard

Copyright © 2018 Natália Bernardi Videira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR β/δ) is considered a therapeutic target for metabolic disorders, cancer, and cardiovascular diseases. Here, we developed one pipeline for the screening of PPAR β/δ agonists, which reduces the cost, time, and false-positive hits. The first step is an optimized 3-day long cellular transactivation assay based on reporter-gene technology, which is supported by automated liquid-handlers. This primary screening is followed by a confirmatory transactivation assay and by two biophysical validation methods (thermal shift assay (TSA) and (ANS) fluorescence quenching), which allow the calculation of the affinity constant, giving more information about the selected hits. All of the assays were validated using well-known commercial agonists providing trustworthy data. Furthermore, to validate and test this pipeline, we screened a natural extract library (560 extracts), and we found one plant extract that might be interesting for PPAR β/δ modulation. In conclusion, our results suggested that we developed a cheaper and more robust pipeline that goes beyond the single activation screening, as it also evaluates PPAR β/δ tertiary structure stabilization and the ligand affinity constant, selecting only molecules that directly bind to the receptor. Moreover, this approach might improve the effectiveness of the screening for agonists that target PPAR β/δ for drug development.

1. Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR β/δ) is a lipid-activated transcription factor, which is a member of the nuclear receptors (NR) superfamily that regulates the activation or silencing of several target genes. PPAR β/δ is ubiquitously expressed in humans, although it is mainly found in the skin, placenta, brain, liver, kidneys, spleen, fat skeletal muscle, and digestive tube [1–3].

PPAR β/δ is involved in some metabolic pathways such as energy metabolism, homeostasis, adipogenesis, and lipid metabolism [4–6]. Several studies have suggested that PPAR β/δ modulation by agonists regulates food intake, body weight, insulin sensitivity, adiposity, and body mass [5, 7]. It has also been associated with diverse physiopathological

processes, such as inflammation, obesity, dyslipidemia, diabetes, cancer, and cardiovascular diseases [6, 8–10]. PPAR β/δ also has described extra-metabolic roles including neuroprotective effects against brain diseases, such as multiple sclerosis, strokes, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, and acts in cell differentiation and proliferation, immune regulation, oxidative stress, and skin biology [2, 3, 11].

The diversity in PPAR β/δ function has been related to its ability to accommodate and bind different ligands in its ligand binding domain (LBD), with a wide range of natural and synthetic ligands. Among the natural ligands, there are fatty acids, prostaglandins, and leukotrienes [12, 13]. Several high affinity and subtype-specific PPAR β/δ agonists have been developed and submitted for clinical trials for the treatment

APÊNDICE L – Artigo publicado de um projeto de colaboração de triagem de ligantes para o PPAR γ



Screening for PPAR Non-Agonist Ligands Followed by Characterization of a Hit, AM-879, with Additional No-Adipogenic and cdk5-Mediated Phosphorylation Inhibition Properties

Helder Veras Ribeiro Filho^{1,2}, Natália Bernardi Videira^{1,2}, Aline Villanova Bridi³, Thais Helena Tittanegro^{1,2}, Fernanda Aparecida Helena Batista¹, José Geraldo de Carvalho Pereira¹, Paulo Sérgio Lopes de Oliveira¹, Marcio Chaim Bajgelman¹, Albane Le Maire^{1,2} and Ana Carolina Migliorini Figueira^{1,2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Jan-Ake Gustafsson,
University of Houston, United States

Reviewed by:

Jonathan Bogan,
Yale University, United States
Andrew C. B. Cato,
Karlsruhe Institute of Technology,
Germany

*Correspondence:

Ana Carolina Migliorini Figueira
ana.figueira@lnbio.cnpem.br

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Structural
Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 29 October 2017

Accepted: 11 January 2018

Published: 01 February 2018

Citation:

Ribeiro Filho HV, Bernardi Videira N,
Bridi AV, Tittanegro TH,
Batista FA,
de Carvalho Pereira JG,
de Oliveira PSL, Bajgelman MC,
Le Maire A and Figueira ACM (2018)
Screening for PPAR Non-Agonist
Ligands Followed by Characterization
of a Hit, AM-879, with Additional
No-Adipogenic and cdk5-Mediated
Phosphorylation Inhibition Properties.
Front. Endocrinol. 9:11.
doi: 10.3389/fendo.2018.00011

¹Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPq),
Campinas, Brazil, ²Post Graduation Program in Biosciences and Technology of Bioactive Products, Institute of Biology,
University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil, ³Centre de Biochimie Structurale CNRS, Université de Montpellier,
Montpellier, France

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is a member of a nuclear receptor superfamily and acts as a ligand-dependent transcription factor, playing key roles in maintenance of adipose tissue and in regulation of glucose and lipid homeostasis. This receptor is the target of thiazolidinediones, a class of antidiabetic drugs, which improve insulin sensitization and regulate glycemia in type 2 diabetes. Despite the beneficial effects of drugs, such as rosiglitazone and pioglitazone, their use is associated with several side effects, including weight gain, heart failure, and liver disease, since these drugs induce full activation of the receptor. By contrast, a promising activation-independent mechanism that involves the inhibition of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5)-mediated PPAR γ phosphorylation has been related to the insulin-sensitizing effects induced by these drugs. Thus, we aimed to identify novel PPAR γ ligands that do not possess agonist properties by conducting a mini-trial with 80 compounds using the sequential steps of thermal shift assay, 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid fluorescence quenching, and a cell-based transactivation assay. We identified two non-agonist PPAR γ ligands, AM-879 and P11, and one partial-agonist, R32. Using fluorescence anisotropy, we show that AM-879 does not dissociate the NCOR corepressor *in vitro*, and it has only a small effect on TRAP coactivator recruitment. In cells, AM-879 could not induce adipocyte differentiation or positively regulate the expression of genes associated with adipogenesis. In addition, AM-879 inhibited CDK5-mediated phosphorylation of PPAR γ *in vitro*. Taken together, these findings supported an interaction between AM-879 and PPAR γ ; this interaction was identified by the analysis of the crystal structure of the PPAR γ :AM-879 complex and evidenced by AM-879's mechanism of action as a putative

APÊNDICE M – Artigo de revisão sobre métodos de caracterização da interação entre receptores nucleares e o DNA.

Nuclear Receptor Research
Vol. 1 (2014), Article ID 101090, 20 pages
doi:10.11131/2014/101090



Review Article

Investigation of Interactions between DNA and Nuclear Receptors: A Review of the Most Used Methods

Juliana Fattori, Nathalia de Carvalho Indolfo, Jéssica Christina Lóis de Oliveira Campos, Natália Bernardi Videira, Aline Villanova Bridi, Tábata Renée Doratioto, Michelle Alexandrino de Assis, and Ana Carolina Migliorini Figueira

Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), P.O. Box 6192, Campinas-SP, Brazil

Corresponding Author: Ana Carolina Migliorini Figueira; email: ana.figueira@lnbio.cnpe.br

Received 29 April 2014; Accepted 5 August 2014

Editor: Mario Galigniana

Copyright © 2014 Juliana Fattori et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract. Nuclear receptors (NRs) comprise a superfamily of proteins modulated by ligands that regulate the expression of target genes. These proteins share a multidomain structure harboring an N-terminal domain, a highly conserved DNA binding domain, and a ligand binding domain, which has ligand dependent activation function. They play key roles in development, metabolism, and physiology being closely related to diseases. Most of the knowledge about this superfamily emerges from investigations on new ligands and are mostly centered in the ligand binding domain. However, more investigation focusing on interactions between DNA and DNA binding domain is necessary to shed light on important roles of NRs' participation in transcriptional mechanisms and in specific genes network. Here, our goal is to discuss some nuances of NRs-DNA interaction, describing details of the most used techniques in this sort of study, such as gel shift (EMSA), DNA footprinting, reporter gene assay, ChIP-Seq, 3C, and fluorescence anisotropy. Additionally, we aim to provide tools, presenting advantages and disadvantages of these common methods, when choosing the most suitable one to study NRs-DNA interactions to answer specific questions.

Keywords: nuclear receptors, DNA binding domain, protein-DNA interaction, ChIP-seq, DNA footprinting, EMSA, fluorescence anisotropy

1. Introduction

Nuclear receptors (NRs) are members of a superfamily of transcription factors modulated by ligands, which regulate the expression of target genes and, therefore, play key roles in development, metabolism, physiology, and disease [1–3]. The activity of the majority of NRs is induced by ligands or small lipophilic molecules such as steroids, hormones,

vitamins, and fatty acids. However, this family also possesses the orphan nuclear receptors, for which once ligands remain unknown or could not exist, presenting unknown activity and suggesting that NRs' activity can also be regulated by other processes [2, 4, 5].

Traditionally, NRs act as homo- or heterodimers and share the same mechanism of action. In a classical view, unliganded NRs may be located in the cytoplasm, bound to

ANEXO A – Autorização suíça para experimentação animal

	Service de la consommation et des Affaires vétérinaires (SCAV) Ch. des Boveresses 155 Case postale 68 CH-1066 Epalinges	VD1808.5
Service de la consommation et des affaires vétérinaires, Ch. des Boveresses 155, 1066 Epalinges Friedrich Beermann, personne responsable		26787

Autorisation pour expériences sur animaux (Formulaire B)

Art. 18 al. 1 Loi fédérale sur la protection des animaux (LPA, RS455)

Directeur/trice de l'expérimentation animale Laure Seriot	Institut UNIL_N Ch. des Boveresses 155 1066 Epalinges 021 692 56 58
--	---

Directeur/trice de l'expérience

Liliane Michalik

Titre de l'expérience

Etude de la fonction des PPARs et de leurs cibles dans la cicatrisation cutanée

Type de la demande

☐ [R] demande de renouvellement

Demande précédente:

VD1808.4

Décision La demande fait partie intégrante de l'autorisation.

Autorisée

Date de l'autorisation

03.11.2015

Valid From_fr

03.12.2015

Autorisation valable jusqu'à

03.12.2018

Charges et conditions

- 1. 18 animaux supplémentaires sont accordés pour l'étude pilote. Un rapport avec conclusions sera envoyé au SCAV.
- 2. La score sheet révisée est à utiliser (cf annexe)
- 3. Utilisation du gel oculaire Viscotears

Dérégations relatives au personnel, à la formation continue, à la détention d'animaux, etc.

Animaux autorisés

Espèce	Nombre d'animaux demandés	Nombre d'animaux autorisés
Mice / Souris	240	258

Degré de gravité prospectif maximal:

2

Emoluments

Description	Nombre	Unité	Prix
Renouvellement DG 1,2 et 3	1	CHF	500.0
Total			500.0

Charges relatives aux rapports et à des modifications de la demande

3.1 Le directeur de l'expérimentation animale doit communiquer au Service de la consommation et des affaires vétérinaires, en utilisant le système e-expérimentation animale, pour chaque expérience:

- a) la fin d'une expérience ou d'une série d'expériences: dans les deux mois qui suivent la clôture des travaux
- b) les informations concernant les expériences effectuées lors de l'année écoulée s'il s'agit d'expériences s'étendant sur plusieurs années: avant fin février.

3.2 Avant toute modification de l'expérience selon Indications du formulaire A et ch. 1 à 4 de cette autorisation/décision (telle que modification de la méthode et durée de l'expérience, utilisation d'autres espèces animales, augmentation du nombre des animaux, changement du responsable de l'Institut ou du laboratoire), il faut demander une autorisation.

Moyens légaux

La présente décision peut faire l'objet d'un recours à la Cour de droit administratif et public (CDAP) du Tribunal cantonal, Av. Eugène-Rambert 15, 1014 Lausanne. L'acte de recours doit être déposé auprès de la Cour de droit administratif et public dans les 30 jours dès celui où l'intéressé a été avisé de la décision prise à son égard. Il doit être daté, signé et indiquer les conclusions et motifs du recours. La décision attaquée est jointe au recours.

VD 03.11.2015 Friedrich Beermann

Fichiers annexés

Titre du document	Nom du fichier	Taille du fichier
Score sheet cicatrisation	Score-sheet skin WH.pdf	45 KB
Experience pilote Temgesic	Experience pilote_Temgesic.pdf	87 KB
Form M db mice	FormM_dbMice_signe.pdf	326 KB
Fiche technique db mice	Fiche technique db mice.pdf	103 KB

ANEXO B – Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora

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 **Avaliação do comportamento do PPAR beta/delta em processos de regeneração de pele e sua modulação por ligantes**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27/08/2018

Assinatura : Natália B. Videira
Nome do(a) autor(a): Natália Bernardi Videira
RG n.º 358552965

Assinatura [Assinatura]
Nome do(a) orientador(a):
RG n.º 25.046.098-1