

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UFTM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E NATURAIS – ICBN
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

FERNANDO FREITAS SIQUEIRA SILVA

MODOS DE LIGAÇÃO E INTERAÇÃO ENTRE MEDIADORES LIPÍDICOS DAS
SÉRIES ÔMEGA-3 E ÔMEGA-6 E O RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES
DE PEROXISSOMO GAMA (PPAR γ)

UBERABA

2024

Fernando Freitas Siqueira Silva

Modos de Ligação e Interação entre Mediadores Lipídicos das Séries Ômega-3 e Ômega-6 e o
Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomo Gama (PPAR γ)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Fisiológicas, da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, como requisito
parcial para obtenção do título de doutor.

Área de concentração: Bioquímica,
Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior

Coorientador: Dr. Vinicius Schmitz Nunes

Uberaba

2024

Catálogo na fonte:
Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

S58m	Silva, Fernando Freitas Siqueira Modos de ligação e interação entre mediadores lipídicos das séries Ômega-3 e Ômega-6 e o receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR) / Fernando Freitas Siqueira Silva. -- 2025. 95 f. : il., tab. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024 Orientador: Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior Orientador: Prof. Dr. Vinicius Schmitz Nunes 1. Receptores citoplasmáticos e nucleares. 2. PPAR gama. 3. Ácidos graxos ômega-3. 4. Ácidos graxos ômega-6. I. Abrahão Júnior, Odonório. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título. CDU 577.354.9
------	--

MODOS DE LIGAÇÃO E INTERAÇÃO ENTRE MEDIADORES LIPÍDICOS DAS SÉRIES ÔMEGA-3 E ÔMEGA-6 E O RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA (PPAR γ)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**, área de concentração **"I - BIOQUÍMICA, FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA"** (Linha de Pesquisa: **IMUNOFARMACOLOGIA DA INFLAMAÇÃO E DA INFECÇÃO** da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Uberaba, 07 de novembro de 2024.

Banca Examinadora:

Dr. Odonório Abrahão Junior – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Alexandre de Paula Rogério
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Eduardo de Faria Franca
Universidade Federal de Uberlândia

Dr. Vinícius Carius de Souza
Instituto Butantã



Documento assinado eletronicamente por **ODONIRIO ABRAHAO JUNIOR**, Professor do Magistério Superior, em 08/11/2024, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **ROSELI APARECIDA DA SILVA GOMES**, Professor do Magistério Superior, em 08/11/2024, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALEXANDRE DE PAULA ROGERIO**, Professor do Magistério Superior, em 08/11/2024, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Carius de Souza**, Usuário Externo, em 08/11/2024, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo de Faria Franca**, Usuário Externo, em 09/11/2024, às 13:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1356597** e o código CRC **FA458EB1**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, professor Dr. Odonório Abrahão Júnior, por reiterar sua confiança em mim com mais essa oportunidade de crescer, e de alguma forma contribuir com o conhecimento científico, através desse campo tão fascinante quanto desafiador que é a Química Computacional/ Modelagem Molecular.

Agradeço ao Dr. Vinicius Schmitz Nunes, pela aceitação do convite para ser meu coorientador, pelos ensinamentos, pelo tempo dedicado e pela contribuição fundamental para a realização deste projeto. Aos meus colegas do Laboratório de Química Computacional Medicinal da UFTM, Keli Reis e, especialmente, Roberto Ribeiro Faria, pelo inestimável auxílio nos desafios mais árduos e intrincados inerentes à execução dos cálculos e tarefas da pesquisa.

Agradeço aos técnicos de laboratório, ao pessoal da limpeza e manutenção, aos vigias e aos secretários, em especial a Elisabete Ambrosio, sempre acolhedora e diligente em nos ajudar a resolver as demandas do curso, desde os pormenores até as questões mais burocráticas. Aos colegas das disciplinas da pós-graduação, sempre solícitos em ajudar e compartilhar informações, e aos professores por nos inspirar com suas aulas e com seu entusiasmo em compartilhar conhecimento e na busca pelo melhor no que se propõem a realizar.

A minha irmã, Carolina, aos meus primos e amigos, em especial à minha colega de trabalho, Janaína Lacerda, por estarem sempre presentes, trazendo ânimo e leveza durante esses anos. Às minhas avós, tios e tias, e especialmente aos meus pais, Celice e Reinaldo, não apenas pelo suporte material, mas também pelo apoio contínuo e total às minhas escolhas e jornada acadêmica.

Agradeço a todos aqueles que incentivaram, torceram e de alguma maneira contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho. Muito obrigado!

“Não podemos esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

Os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomo (PPARs) são fatores de transcrição que pertencem à superfamília dos Receptores Nucleares (NRs) e desempenham papéis fundamentais na regulação de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e carboidratos, regulação da resposta inflamatória e controle da diferenciação celular. Três isotipos são expressos no organismo humano, PPAR α , PPAR β/δ , e PPAR γ , cada um apresentando distribuição tecidual e funções distintas. Estruturalmente, os PPARs compartilham domínios em comum com a maioria dos NRs, e sua atividade transcricional depende da heterodimerização com outro NR, o Receptor Retinóide X RXR, e da ativação por moléculas agonistas, que desencadeiam alterações conformacionais essenciais para o recrutamento de proteínas co-ativadoras e a iniciação da transcrição dos genes alvos. O grande do interesse nos efeitos do PPAR γ na melhora da sensibilidade à insulina e permitiu a descoberta de seu papel como agente imunomodulador e de seus ligantes naturais genuínos, os ácidos graxos e seus metabólitos oxidados, como as oxilipinas, geradas por estímulos do microambiente inflamatório. Entre esses ligantes estão ácidos graxos essenciais (AGEs), das séries n-3 e n-6, e derivados, que atuam como mediadores lipídicos (MLs), influenciando de forma significativa a resolução dos processos inflamatórios. Embora agonistas totais do PPAR γ , como as tiazolidinedionas (TZDs), sejam eficazes na melhora da sensibilidade à insulina, seus inúmeros efeitos adversos impulsionaram a pesquisa por agonistas parciais, geralmente ligantes naturais, como os MLs, como alternativas eficazes de ativação do PPAR γ com redução dos efeitos adversos. Após uma busca sistemática no PDB foram identificados 20 complexos do PPAR γ com 17 diferentes MLs n-3 e n-6 ligados ao sítio de ligação do receptor. Esta revisão detalha, a partir desses cristais e de estudos experimentais e computacionais, os modos de ligação e as interações entre os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do PPAR γ e seus potenciais MLs agonistas, destacando também as mudanças conformacionais de regiões cruciais para ativação do receptor, como o loop- Ω , as folhas beta e as α -hélices H3 e H12, decorrentes das interações com os diferentes ligantes. Os achados evidenciam a complexidade e a diversidade das interações dos MLs n-3 e n-6 com o PPAR γ , ressaltando resíduos chave para o desenho racional de novos fármacos que mimetizam ligantes endógenos e modulam seletivamente a atividade do receptor. Além de reafirmar a importância de uma alimentação que forneça quantidades ideais de AGEs para a homeostase imune e metabólica, a compreensão aprofundada dos mecanismos de ligação e ativação do PPAR γ por seus ligantes endógenos

naturais tem se mostrado crucial para o desenvolvimento de novos agonistas, que alcancem resultados terapêuticos eficazes e mais seguros.

Palavras-chave: PPAR γ , Mediadores Lipídicos, Ômega-3, Ômega-6, Interações receptor-ligante.

ABSTRACT

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) are transcription factors that belong to the Nuclear Receptor (NR) superfamily and play fundamental roles in the regulation of genes involved in lipid and carbohydrate metabolism, regulation of the inflammatory response, and control of cell differentiation. Three isotypes are expressed in the human body: PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ , each with distinct tissue distribution and functions. Structurally, PPARs have domains in common with most NRs, and their transcriptional activity depends on heterodimerization with another NR, the Retinoid X Receptor RXR, and on activation by agonist molecules, which trigger conformational changes essential for the recruitment of co-activator proteins and the initiation of transcription of target genes. The great interest in the effects of PPAR γ in improving insulin sensitivity has led to the discovery of its role as immunomodulator agent and of its genuine natural ligands, fatty acids and their oxidized metabolites, such as oxylipins, generated by stimuli from the inflammatory microenvironment. These ligands include the n-3 and n-6 series essential fatty acids (EFAs) and their derivatives, which act as lipid mediators (LMs), significantly influencing the resolution of inflammatory processes. Although full PPAR γ agonists, such as thiazolidinediones (TZDs), are effective in improving insulin sensitivity, their considerable adverse effects boosted the search for partial agonists, usually natural ligands, such as LMs, as alternatives for PPAR γ activation with reduced adverse effects. Through a systematic search on PDB, 20 PPAR γ complexes were identified with 17 different n-3 and n-6 LMs bound to the receptor's ligand binding site. Based on these crystals and on experimental and computational studies, this review details the binding modes and interactions between PPAR γ ligand binding site's amino acid residues and its potential agonist MLs, also highlighting the conformational changes of crucial regions for receptor activation, such as the Ω -loop, beta sheets and α -helices H3 and H12, resulting from the interactions with different ligands. The findings made evident the complexity and diversity of the interactions of MLs n-3 and n-6 with PPAR γ , highlighting key residues for the rational design of new drugs that mimic endogenous ligands and selectively modulate receptor activity. In addition to reaffirming the importance of a diet, that provides optimal amounts of EFAs for immune and metabolic homeostasis, a deeper understanding of the mechanisms of binding and activation of PPAR γ by its natural endogenous ligands has proven crucial for the development of new agonists that achieve effective and safer therapeutic results.

Key-words: PPAR γ , Lipid Mediators, Omega-3, Omega-6, Ligand-Receptor Interactions.

LISTA DE SIGLAS

2HODE	Ácido 2-hidroxi-octadecadienoico
4HDHA	Ácido 4-hidroxi-docosa-hexaenoico
4oxoDHA	Ácido 4-oxo-docosa-hexaenoico
5HEPA	Ácido 5-hidroxi-eicosapentaenoico
5oxoEPA	Ácido 5-oxo-eicosapentaenoico
5oxoETE	Ácido 5-oxo-eicosatetraenoico
5oxoTrHA	Ácido 5-oxo-tricosa-hexaenoico
6HOTrE	Ácido 6-hidroxi-octadecatrienoico
6oxoTHA	Ácido 6-oxo-tetracosa-hexaenoico
8H-6oxoOTE	Ácido 8-hidroxi-6-oxo-octadecatrienoico
8oxoETE	Ácido 8-oxo-eicosatetraenoico
9HODE	Ácido 9-hidroxi-octadecadienoico
9oxoETE	Ácido 9-oxo-eicosatetraenoico
10H-6oxoOTE	Ácido 10-hidroxi-6-oxo-octadecatrienoico
10LNO₂	Ácido 10-nitrolinoleico
11oxoETE	Ácido 11-oxo-eicosatetraenoico
12LNO₂	Ácido 12-nitrolinoleico
12oxoETE	Ácido 12-oxo-eicosatetraenoico
13HODE	Ácido 13-hidroxi-octadecadienoico
13HOTrE	Ácido 13-hidroxi-octadecatrienoico
13oxoODE	Ácido 13-oxo-octadecadienoico
15d-PGJ₂	15-deoxi- Δ -12,14-prostaglandina J2
15d-PGJ3	15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J3
15HEPE	Ácido 15-hidroxi-eicosapentaenoico
15oxoEDE	Ácido 15-oxo-eicosadienoico
15oxoETE	Ácido 15-oxo-eicosatetraenoico
17HDHA	Ácido 17-hidroxi-docosa-hexaenóico
17oxoDHA	Ácido 17-oxo-docosa-hexaenoico
18HEPE	Ácido 18-hidroxi-eicosapentaenoico

AA	Ácido araquidônico
ADGL	Ácido di-homo-gama-linoleico
AED	Ácido eicosadienoico
AET	Ácido eicosatrienoico
AF-1	Domínio de Ativação Transcricional 1 (Activation Function 1)
AF-2	Domínio de Ativação Transcricional 2 (Activation Function 2)
AGE	Ácido Graxo Essencial
AGL	Ácido gama-linolênico
AL	Ácido linoleico
AMP	Adenosina monofosfato
COX	Enzima cicloxigenase
CYP450	Citocromo P450 oxidase
DBD	Domínio de ligação ao DNA (<i>DNA Binding Domain</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FOXP3	Fator de transcrição Forkhead box P3
H1-H12	α -Hélices de 1 à 12
HEPEs	Ácidos hidroxi-eicosapentaenoicos
HODEs	Ácidos hidroxi-octadecadienoicos
IFNγ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
KetoA	Ácido 10-oxo-12Z-octadecenoico
KetoC	Ácido 10-oxo-11E-octadecenoico
LBD	Domínio de interação com o ligante (<i>Ligand Binding Domain</i>)
LBP	Bolsão ou sítio de ligação (<i>Ligand Binding Pocket</i>)
LOX	Enzima lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
ML	Mediador lipídico
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6

NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NPD₁	Neuroprotectina D ₁
NR	Receptor Nuclear (Nuclear Receptor)
PG	Prostaglandina
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomo (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>)
PPRE	Elemento de Resposta Proliferativa de Peroxissomos (<i>Peroxisome Proliferator Response Element</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RvD₁	Resolvina D ₁
RvE₁	Resolvina E ₁
RXR	Receptor Retinóide X (<i>Retinoid X Receptor</i>)
THA	Ácido tetracosa-hexaenóico
TLR	Receptores Toll Like
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TX	Tromboxano
TZD	Tiazolidinediona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO (PPARs).....	13
1.2 EFEITOS IMUNOMODULADORES E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO PPAR γ	18
1.2.1 Efeitos imunomoduladores do PPARγ.....	18
1.2.2 Agonismo total e parcial dos ligantes do PPARγ.....	18
1.3 MEDIADORES LIPÍDICOS COMO AGONISTAS DO PPAR γ	20
1.3.1 Mediadores Lipídicos Da Série n-6 Agonistas Do PPARγ.....	22
1.3.2 Mediadores Lipídicos Da Série n-3 Agonistas Do PPARγ.....	25
1.4 COMPLEXOS MLs-PPAR γ	27
1.4.1 Ligação Covalente à C285.....	31
1.4.2 Modos de ligação dos MLs no LBP do PPARγ.....	33
1.4.3 Interações Não Covalentes Polares.....	35
1.4.4 Interações Hidrofóbicas.....	41
1.4.5 Estabilização do loop-Ω, hélice H3 e folhas beta.....	43
REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE A – Artigo científico.....	57
APÊNDICE B – Material suplementar do artigo.....	84
APÊNDICE C – Comprovante de submissão do artigo.....	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO (PPARs)

Os Receptores Nucleares (*Nuclear Receptors*, NRs) constituem uma superfamília de fatores de transcrição, que respondem a hormônios e outras moléculas ativadoras, regulando a expressão de genes relacionados a processos metabólicos essenciais e integrando inúmeras vias de sinalização no organismo (Berger; Moller, 2002; Evans; Barish; Wang, 2004; Mangelsdorf et al., 1995). A partir da sequência de aminoácidos de seus membros, os NRs podem ser classificados evolutivamente em 7 famílias (NR0 à NR6), e estas subdivididas em grupos, sendo o grupo C da família NR1 constituído pelos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomo (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*, PPARs) (Weikum; Liu; Ortlund, 2018). O nome advém do primeiro isotipo descrito, o PPAR α (NR1C1), identificado na busca pelo alvo de moléculas proliferadoras de peroxissomos, organelas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos e desintoxicação celular (Issemann; Green, 1990). Posteriormente foram descobertos e caracterizados o PPAR β/δ (NR1C2) e o PPAR γ (NR1C3) (Dreyer et al., 1992), sendo os três isotipos codificados por genes distintos (Berger; Moller, 2002).

Os PPARs estão envolvidos em uma ampla variedade de funções no organismo, relacionadas desde a homeostase de lipídeos e carboidratos à resolução da resposta inflamatória, diferenciação e proliferação celular e câncer (Chawla et al., 2001; Marion-Letellier; Savoye; Ghosh, 2016; Michalik et al., 2006; Weikum; Liu; Ortlund, 2018). Enquanto o PPAR α e o PPAR β/δ classicamente facilitam o catabolismo energético, o PPAR γ contribui para o armazenamento de energia aumentando a adipogênese (Grygiel-Górniak, 2014). Conjuntamente, os três isotipos são encontrados na epiderme (células dendríticas e melanócitos) e em células imunológicas como os linfócitos B e T. O PPAR α possui expressão elevada em sítios metabolicamente ativos, como fígado, músculos esquelético e cardíaco, rins, mucosa intestinal e tecido adiposo marrom, além de endotélio e músculo liso. Dentre seus papéis fisiológicos, destacam-se o estímulo à beta-oxidação, à gliconeogênese e a inibição do catabolismo de aminoácidos e de processos inflamatórios ateroscleróticos. O PPAR β/δ está relacionado à beta-oxidação, principalmente nos músculos esqueléticos e no coração, e participa da regulação dos níveis séricos de glicose e colesterol. Sua expressão é ubíqua no organismo, destacando-se no tecido adiposo abdominal, esôfago, intestinos, rins e em menor quantidade no fígado (Angeli et al., 2003; Dubrac et al., 2007; Eastham; Mills; Niles, 2008; Grygiel-Górniak, 2014; Muralikumar et al., 2017; Rivier et al., 1998; Westergaard et al., 2003).

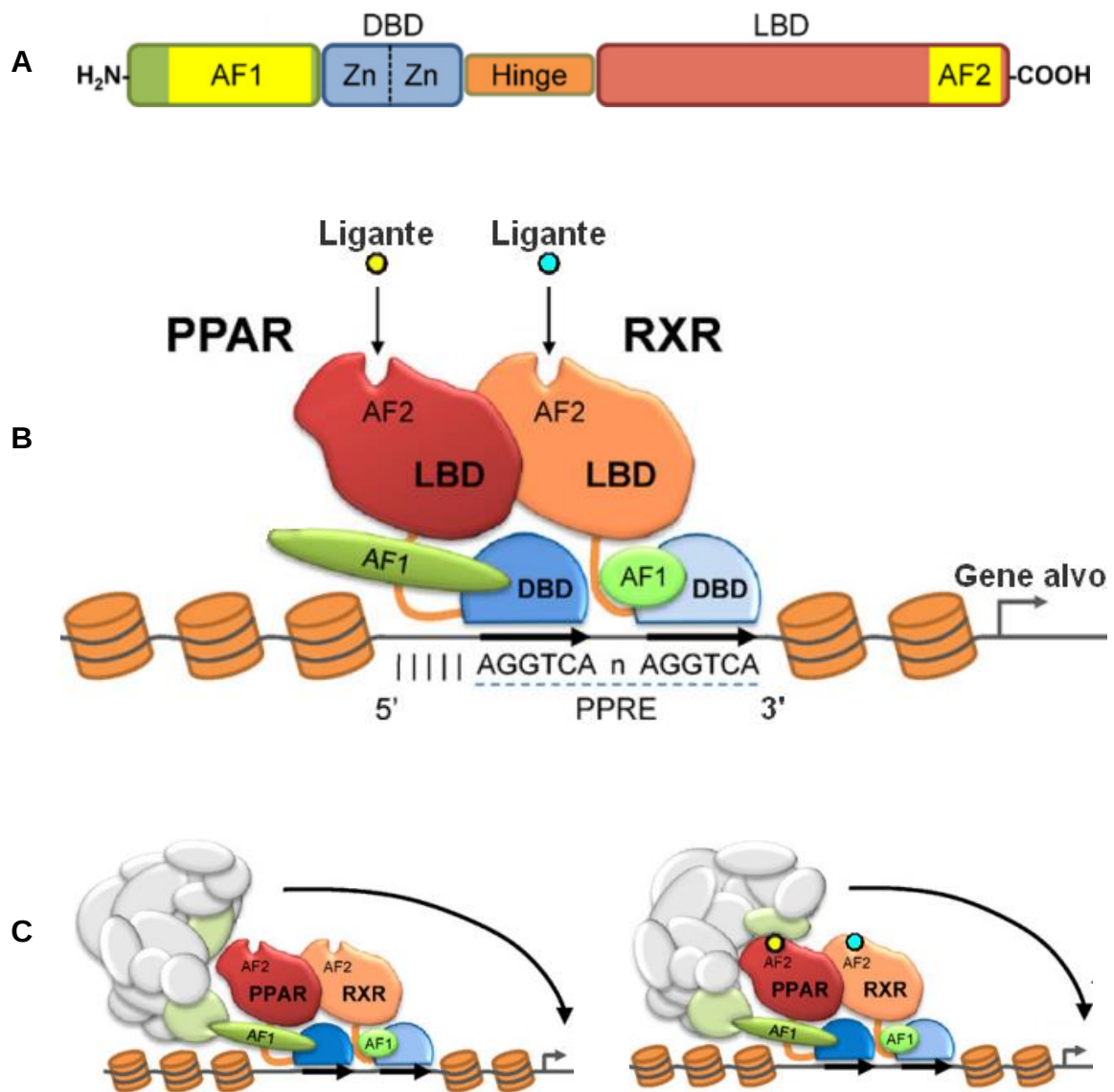
O PPAR γ é encontrado em 2 isoformas principais, o PPAR γ 1 e PPAR γ 2, que se diferem na região N-terminal devido a divisão diferencial de seu gene em diferentes sítios do promotor e subsequente processamento alternativo do RNA mensageiro (*splicing*) (Bermúdez et al., 2010; Fajas et al., 1997). O PPAR γ 1 contém 28 aminoácidos N-terminais a menos e é encontrado em níveis mais altos nos adipócitos (tecido adiposo branco e marrom) e intestino grosso, sendo também expresso em fibroblastos adipogênicos, macrófagos, medula óssea, baço, testículos, cérebro, músculo esquelético, fígado, rins, intestino delgado, enquanto o PPAR γ 2 é mais restrito ao tecido adiposo (Bensinger; Tontonoz, 2008; Elbrecht et al., 1996; Fajas et al., 1997; Greene et al., 1995; Waku et al., 2010). PPAR γ é fisiologicamente necessário para a diferenciação de adipócitos (adipogênese), também é importante na regulação da síntese de lipídeos, balanço energético, metabolismo de lipoproteínas e sensibilidade insulínica e inibição de processos inflamatórios (Muralikumar et al., 2017; Poulsen; Siersbæk; Mandrup, 2012).

Como a maioria dos NRs, os PPARs são estruturalmente organizados, de N para C-terminal, em um domínio com função de ativação transcricional (*Activation Function 1*, AF-1), um domínio conservado de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain*, DBD), um domínio de articulação (*hinge*) e um domínio de interação com o ligante (*Ligand Binding Domain*, LBD) (Figura 1) (Marion-Letellier; Savoye; Ghosh, 2016; Nolte et al., 1998; Poulsen; Siersbæk; Mandrup, 2012); Wärnmark et al., 2003). O domínio AF-1, estruturalmente desordenado nos NRs, tem a função de ativação independente do ligante e interage com diferentes conjuntos de proteínas co-reguladoras (Wärnmark et al., 2003). O curto e flexível domínio de articulação (*hinge*), conhecido como dobradiça, conecta o DBD ao LBD e permite que adotem diferentes conformações sem impedimentos estéricos, além de também ser sítio para modificações pós-transcricionais e capaz de atuar na interação de proteínas co-reguladoras com o receptor (Weikum; Liu; Ortlund, 2018).

O DBD é formado por dois subdomínios, cada um contendo quatro cisteínas que coordenam um íon zinco Zn(II) estruturando dois motivos dedo de zinco canônicos de ligação ao DNA. O primeiro subdomínio contém uma hélice de leitura, capaz de interagir com bases específicas do sulco principal do DNA para fazer interações com bases específicas do DNA, enquanto o segundo subdomínio faz contatos não específicos com o esqueleto carbônico do DNA e contém uma alça com resíduos para dimerização do receptor (Chandra et al., 2008; Weikum; Liu; Ortlund, 2018).

O LBD é formado por 12 α -hélices (H1-H12, uma a mais nos PPARs em relação aos outros NRs, a H2' ou H2b, entre H2 e H3) dispostas em três camadas antiparalelas, 4 fitas beta

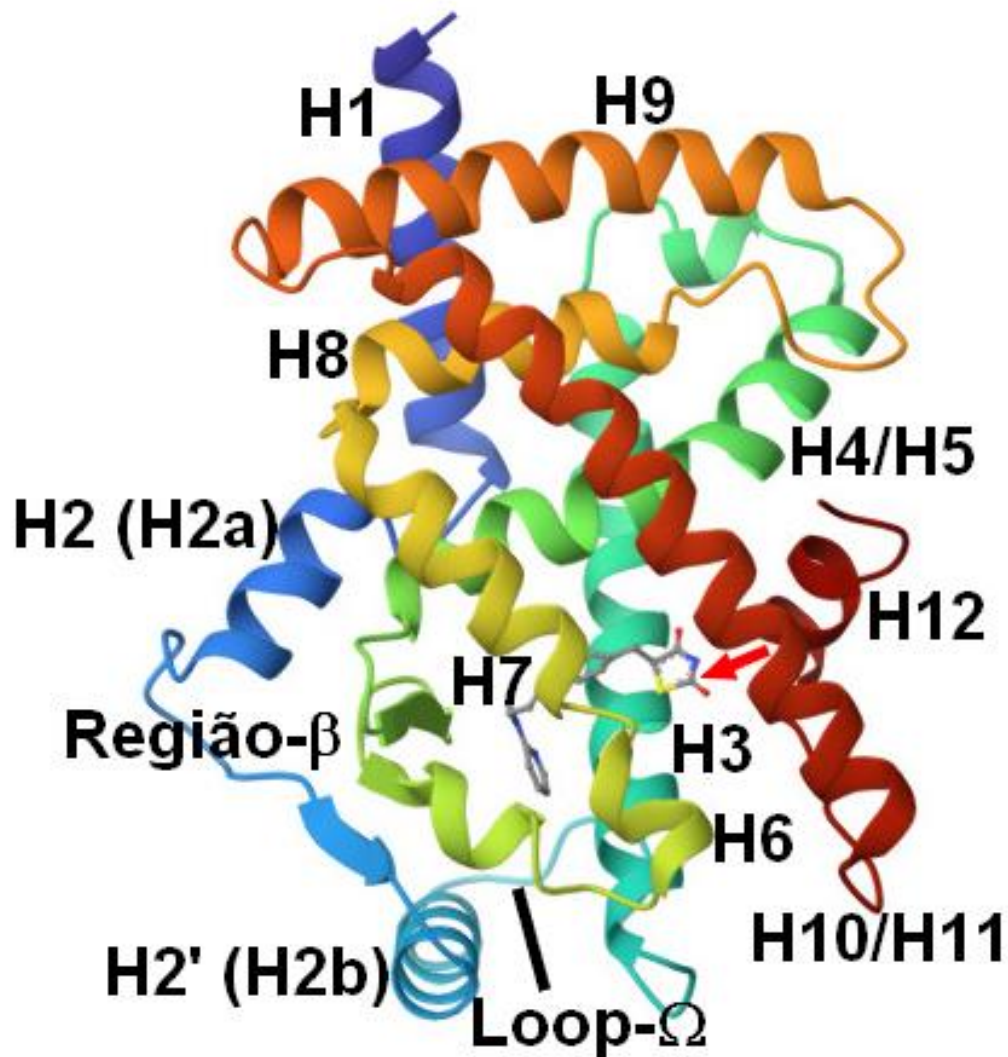
Figura 1 – Domínios e ativação dos PPARs.



A – Domínios comuns dos PPARs. B – Representação esquemática do heterodímero PPAR:RXR ligado ao DNA, evidenciando o domínio de ligação do ligante (LBD), o domínio de ligação ao DNA (DBD), as regiões de função de ativação transcrricional (AF-1 e AF-2) e dois hexanucleotídeos (5'-AGGTCA-3') separados por um nucleotídeo (n) do Elemento de Resposta Proliferativa de Peroxissomos (PPRE) presente na região promotora ou proximal do gene alvo. C – Representação esquemática do complexo transcrricional, formado pelo heterodímero mais proteínas co-ativadoras, promovendo a transativação do gene alvo (setas curvas), de modo independente do ligante (constitutivo) (à esquerda) e de modo dependente do ligante (à direita), com os ligantes nos sítios de ligação (LBP), próximo à AF-2, de seus respectivos receptores. Fonte: Poulsen e colaboradores, 2012, adaptado pelo autor, 2024.

e alças, como o loop-Ω, conectando diferentes regiões (Figura 2). O LBD delimita o bolsão ou sítio de ligação (*Ligand Binding Pocket*, LBP), mais hidrofóbico e volumoso, comparado aos de outros NRs (1.440 Å³ no PPAR γ , por exemplo), onde podem ser acomodadas uma ou mais de uma molécula de ligantes simultaneamente. O LBP possui forma de Y e é definido por 34

Figura 2 – Principais estruturas secundárias do LBD do PPAR γ .



Principais estruturas secundárias do domínio de ligação do ligante (LBD) do PPAR γ representados em diferentes cores: α -hélices (H1-H12), região de folhas- β e loop- Ω . A seta vermelha indica um ligante da classe das tiazolidinedionas, TZDs) presente no interior bolsão de ligação (LBP) do LBD. Fonte: Nolte e colaboradores, 2018 (PDB ID: 2PRG), adaptado pelo autor, 2024.

resíduos, 80% dos quais aproximadamente são conservados nos três isotipos (Marion-Letellier; Savoye; Ghosh, 2016; Nolte et al., 1998; Zoete; Grosdidier; Michielin, 2007).

A atividade transcricional regulada por um PPAR requer sua heterodimerização com um dos isotipos do Receptor Retinóide X (*Retinoid X Receptor*, RXR; NR2B), da família NR2 dos receptores nucleares (Weikum; Liu; Ortlund, 2018). O complexo também deve ser ativado por agonistas de um ou de ambos os receptores, permitindo a integração de respostas transcricionais de duas vias de sinalização distintas (Haffner et al., 2004). O RXR é canonicamente ativado por seu ligante específico, o ácido 9-cis-retinoico (vitamina A), que se liga ao seu LBP (Berger; Moller, 2002; Bruning et al., 2007; Poulsen; Siersbæk; Mandrup,

2012). Já o tamanho relativamente grande dos LBPs dos PPARs permite que uma grande variedade de agonistas naturais e sintéticos estruturalmente diferentes sejam capazes de se ligar ao bolsão (Berger; Moller, 2002; Itoh et al., 2008; Marion-Letellier; Savoye; Ghosh, 2016).

A ativação do PPAR por seu ligante muda a conformação do receptor, propiciando o deslocamento de proteínas co-repressoras e recrutamento de proteínas co-ativadoras, reconhecidas pela superfície de ligação a co-reguladores, a função de ativação 2 (*Activation Function 2*, AF-2). A AF-2 está localizada no LBD e é formada pelas hélices H3, H4, H5 e principalmente H12, que formam um “grampo de carga” e uma cavidade hidrofóbica essenciais para interação direta com motivos específicos presentes em muitos co-ativadores, e atua em sinergismo com a região AF-1 (Berger; Moller, 2002; Brust et al., 2018; Poulsen; Siersbæk; Mandrup, 2012; Wärnmark et al., 2003). As proteínas coativadoras possuem atividade histona-metil - e acetiltransferase para remodelamento do nucleossomo, como o co-ativador do Receptor Esteroidal-1 (SRC1), a Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao AMP Cíclico (*Cyclic AMP Response Element-binding Protein*, CREB) e a Proteína de Ligação ao CREB (*CREB Binding Protein*, CBP), ou podem servir de ponte entre o receptor e componentes da maquinaria transcricional contendo a RNA polimerase, como a Proteína de Ligação ao PPAR γ (PBP). Ambas as funções são essenciais para iniciação da transcrição (Belfiore; Genua; Malaguarnera, 2009; Berger; Moller, 2002; Marion-Letellier; Savoye; Ghosh, 2016; Nolte et al., 1998; Poulsen; Siersbæk; Mandrup, 2012; Yang; Rachez; Freedman, 2000). O recrutamento de determinado coativador é dado também pela conformação particular induzida por um ligante específico, e dependendo do coativador recrutado, outras hélices podem ser indispensáveis para a atividade do receptor, como é o caso da H1 e o Coativador-1 do PPAR γ (PGC-1) (Álvarez-Almazán et al., 2017).

No DNA, o PPAR e o RXR se ligam respectivamente aos meio-sítios 5' e 3' do Elemento de Resposta Proliferativa de Peroxissomos (*Peroxisome Proliferator Response Elements*, PPRE) presente na região promotora ou proximal do gene alvo (Liberato et al., 2012; Muralikumar et al., 2017; Rigano; Sirignano; Taglialatela-Scafati, 2017). O PPRE é composto por elementos de repetições direta consistindo de dois hexanucleotídeos da sequência consenso 5'-AGGTCA-3' separadas por um único nucleotídeo (Berger; Moller, 2002; Poulsen; Siersbæk; Mandrup, 2012). Uma vez ligado ao DNA por seus DBDs, aos seus ligantes por seus LBDs e às proteínas coativadoras, o heterodímero pode promover a transcrição dos genes alvo junto à maquinaria de iniciação transcricional (Dreyer et al., 1992; Keller et al., 1993; Scher; Pillinger, 2005).

1.2 EFEITOS IMUNOMODULADORES E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO PPAR γ

1.2.1 Efeitos imunomoduladores do PPAR γ

Devido ao interesse nos efeitos específicos da ativação do PPAR γ , especialmente na melhora da sensibilidade insulínica, o número de estudos objetivando o desenvolvimento de agonistas para esse isotipo cresceu substancialmente. A partir desses estudos, o envolvimento do PPAR γ como agente imunomodulador, antiaterogênico e anticarcinogênico e em várias outras funções fisiológicas começou a ser descoberto e explorado (Daynes; Jones, 2002; Serhan et al., 2015; Wahli; Michalik, 2012).

Durante a inflamação, as células imunes produzem uma variedade de moléculas mediadoras, como citocinas, prostanoídes (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) e leucotrienos, que, ao permanecerem em níveis circulantes acima do ideal para resolução do quadro agudo, podem favorecer o agravamento e até mesmo o desenvolvimento de doenças degenerativas, como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer (Borniquel; Jädert; Lundberg, 2012; Hanahan; Weinberg, 2011; Kroker; Bruning, 2015).

Foi descoberto que o PPAR γ está envolvido em vários papéis de grande importância para resolução da inflamação, como diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-1 β , IL-2 e IL-6, do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e da proteína quimioatraente de monócitos-1 (quimiocina MCP-1), de receptores Toll Like (TLR2 e TLR4), inibição da maturação de células de Langerhans, da capacidade migratória e proliferativa de células T, da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e assim da produção de óxido nítrico (NO) em monócitos e macrófagos, estimulação da produção *in vitro* de células T reguladoras, mantendo um alto nível de expressão do fator supressor imune FOXP3 (Bassaganya-Riera; Hontecillas; Beitz, 2002; Berger; Moller, 2002; Clark et al., 2000; Belfiore; Genua; Malaguarnera, 2009; Jones et al., 2003; Lei et al., 2010). Clinicamente, o PPAR γ também tem sido relacionado à melhoria de condições autoimunes, como a encefalomielite autoimune experimental e a efeitos anti-aterogênicos (Belfiore; Genua; Malaguarnera, 2009; Michalik et al., 2006).

1.2.2 Agonismo total e parcial dos ligantes do PPAR γ

Em vista do papel crítico dos PPARs no metabolismo lipídico, a busca por seus ligantes naturais começou pelos ácidos graxos e eicosanóides, que, de fato, foram descobertos como

seus ligantes naturais genuínos (Berger; Moller, 2002). O potencial farmacológico dos ligantes sintéticos reside, pelo menos em parte, na reprodução dos mecanismos de ação dos ligantes naturais dos PPARs, como os fibratos, agonistas do PPAR α utilizados no tratamento da dislipidemia, e as tiazolidinedionas (TZDs), agonistas do PPAR γ utilizados no controle da diabetes melito tipo 2 e em terapias anti-inflamatórias (Ceriello, 2008; Waku et al., 2010). Estudos farmacológicos categorizaram os agonistas dos PPARs em totais ou parciais, dependendo de sua atividade transcricional em ensaios celulares com genes repórter (Waku et al., 2009, 2010). Agonistas parciais e totais geralmente mostram diferentes padrões de recrutamento de coativadores e acetilação de histonas (Álvarez-Almazán et al., 2017).

As TZDs, como a rosiglitazona e pioglitazona, são potentes agonistas totais por apresentarem alta afinidade pelo PPAR γ , induzindo a expressão de genes relacionados à melhora na sensibilidade à insulina e à diferenciação de adipócitos (Berger; Moller, 2002). Assim como vários ligantes endógenos do PPAR γ , as TZDs são acomodadas no subsítio denominado ortostérico, no qual interações com os resíduos circundantes, principalmente com tirosina 473 (Y473), da H12, permitem a estabilização da hélice e consequente ativação do receptor. Na ausência de ligantes (apoproteína), a H12 adota uma conformação mais estendida, afastada do LBD, em geral relacionada a formas inativas do PPAR γ (Renaud et al., 1995; Weikum; Liu; Ortlund, 2018; Zoete; Grosdidier; Michielin, 2007).

Embora as TZDs melhorem a sensibilidade à insulina, diminuindo os níveis séricos de glicose, sua associação a efeitos colaterais adversos, como ganho de peso, retenção de líquidos, perda óssea, hepatotoxicidade e aumento do risco de eventos cardiovasculares, levantou questões quanto ao seu uso como agonistas do PPAR γ (Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015; Itoh et al. 2006; Li et al., 2008; Shang et al., 2019). Geralmente ligantes naturais e alguns sintéticos atuam como agonistas parciais do PPAR γ (Wang et al., 2014). O agonismo parcial leva a um efeito gradual de ativação do receptor, específica para do tipo de ligante. Através desse mecanismo, ligantes não ocupam necessariamente o subsítio ortostérico, podendo se acomodar em subsítios distintos dentro do bolsão, denominados alostéricos. Nesses subsítios, comparativamente ao agonismo total, podem ser observadas interações com o loop- Ω , a H3 e a região das folhas beta, mais importantes que interações com a H12 (Álvarez-Almazán et al., 2017; Bruning et al., 2007; Shang et al., 2018).

Além do agonismo total e parcial, a co-ligação simultânea cooperativa de ligantes endógenos e sintéticos no bolsão, pode levar a um mecanismo de ativação, no qual a molécula ligada a um subsítio alostérico age como sinergista ou modulador do efeito farmacológico da molécula do subsítio ortostérico. Explorar esses diferentes padrões de ativação são

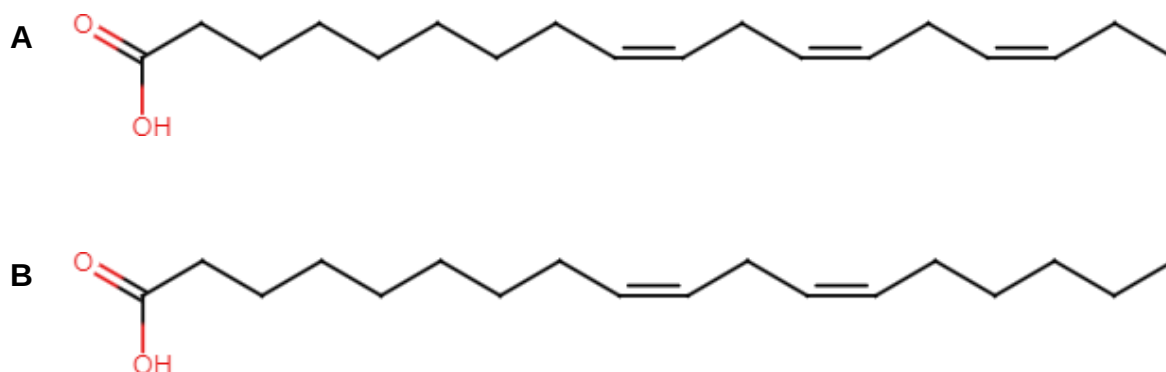
imprescindíveis para o projeto de novos agonistas do PPAR γ , buscando um resultado fisiológico efetivo e mitigando efeitos colaterais adversos decorridos do uso de agonistas totais (Agosta; Cozzini, 2024; Shang et al., 2018).

1.3 MEDIADORES LIPÍDICOS COMO AGONISTAS DO PPAR γ

Diversos ácidos graxos do organismo dos mamíferos são sintetizados endogenamente. A condensação de acetil-coA no citoplasma permite a formação de ácido palmítico, a partir do qual outros ácidos graxos são gerados pela ação de duas classes de enzimas localizadas no retículo endoplasmático predominantemente dos hepatócitos, as alongases e as dessaturases (Martin et al., 2006). As alongases estendem as cadeias dos ácidos graxos em unidades de dois carbonos e as dessaturases adicionam ligações duplas (configuração *cis*) em locais específicos ($\Delta 9, 6, 5, 4$), mas são incapazes de adicioná-los em posições acima do 10º carbono (Itoh; Tomiyasu; Yamamoto, 2011; Roynette et al., 2004; Sande et al., 2019; Santos; Price; Bueno, 2020). Os ácidos graxos necessários ao organismo humano, com insaturações acima dessa posição, como o ácido alfa-linolênico (AAL) e seus derivados (série ômega 3 ou n-3) e o ácido linoleico (AL) e seus derivados (série ômega 6 ou n-6), são classificados como ácidos graxos essenciais (AGEs), devendo ser obtidos através da alimentação (Sande et al., 2019).

O interesse nos potenciais clínicos dos AGEs se deu com base em estudos epidemiológicos mostrando como populações, cujas dietas contêm quantidades significativas dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenoico (DHA), ambos n-3, apresentavam baixa incidência de doenças autoimunes (Martin et al., 2006). Inúmeros estudos têm evidenciado os efeitos imunomoduladores dos AGEs, muito semelhantes aos ocasionados pela ação do PPAR γ , como diminuição da proliferação ou atividade de células mononucleares do sangue periférico (monócitos, linfócitos e células *natural killer*), da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ), de moléculas de adesão, prostaglandinas e da atividade da iNOS (Marion-Letellier; Savoye; Ghosh, 2016; Martin et al., 2006). Similarmente, diversos benefícios clínicos diretos também têm sido associados à ingestão de alimentos ricos em AGEs, por exemplo, na artrite reumatoide (James; Cleland, 1997; Kremer, 2000), na prevenção de eventos cardiovasculares (Hu; Manson; Willett, 2001; Khan et al., 2021), em doenças inflamatórias do trato gastrointestinal (Toborek et al., 2018).

Figura 3 – Fórmula estrutural dos ácidos alfa-linolênico (n-3) e linoleico (n-6).



A – Ácido alfa-linolênico (AAL, 18:3n3). B – Ácido linoleico (AL, 18:2n-6). Os ácidos graxos essenciais (AGEs) n-3 e n-6 contêm as primeiras insaturações no 3º e 6º átomo de carbono, respectivamente, contando a partir do final da cauda carbônica, por tal sendo as séries denominadas n-3 e n-6. Em pH fisiológico, o grupo carboxílico dos ácidos graxos se encontram na forma ionizada (carboxilato). Estruturas desenhadas através da ferramenta de desenho e edição molecular Chemical Sketch Tool do PDB. Fonte: Do autor, 2024.

Os ácidos graxos e seus metabólitos com atividades imunomoduladoras são denominados mediadores lipídicos (MLs), e se originam inicialmente via estímulos inflamatórios que ativam fosfolipases específicas, principalmente as fosfolipases A2, capazes de clivar esses lipídeos da bicamada das membranas celulares (Lefils-Lacourtablaise et al., 2013; Martin et al., 2006). Logo, a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios da membrana, sua variabilidade regional e localização em diferentes tipos de células são fatores que impactam na resposta inflamatória, desde seu início à sua resolução (David; López-Vales, 2021).

De forma canônica, os MLs são exportados para o espaço extracelular e se ligam a receptores acoplados à proteína G específicos nas células alvo, e em seguida são sequestrados e rapidamente degradados por via enzimática ou processos não-enzimáticos (Murakami, 2011). Por outro lado, um número crescente de estudos tem mostrado que os MLs também podem atuar como agonistas dos PPARs (Marion-Letellier; Savoye; Ghosh, 2016). Variações nas sequências primárias do loop-Ω sugerem a adaptação dos três isotipos a diferentes classes de ácidos graxos (Waku et al., 2009). Enquanto o PPARα e, em menor grau, PPARβ/δ se ligam a ácidos graxos saturados, mais hidrofóbicos, o PPARγ tem preferência pelos poli-insaturados (como os AGEs), mais hidrofílicos, e seus derivados (Berger; Moller, 2002; Narala et al., 2014).

Inúmeros estudos cristalográficos, envolvendo ensaios bioquímicos, celulares entre outros experimentos, têm revelado complexos ML-PPARγ bem como dados importantes acerca da potência e eficácia desses lipídeos bioativos na ativação do receptor. Concomitantemente,

metodologias de química computacional, como Docking e especialmente Dinâmica Molecular, para a simulação de complexos ML-PPAR γ em fluídos biológicos, têm avançado e permitido explorar propriedades cada vez mais próximas das observações experimentais (Alexander et al., 2008; Harmon; Lam; Glass 2011; Ju et al., 2018), a partir de um maior detalhamento das interações entre ligante e receptor a nível atômico e molecular, contribuindo para o entendimento da relação entre a estrutura química e a atividade biológica das moléculas envolvidas. Em conjunto, diferentes abordagens podem corroborar diretamente com o desenvolvimento de agonistas inspirados na resolução natural da inflamação e manutenção da homeostase metabólica. O uso de tais agonistas tem como objetivo principal minimizar os efeitos adversos que persistem em muitas das terapias farmacológicas vigentes, cujo alvo é o PPAR γ (Fratev; Steinbrecher; Jónsdóttir, 2018; Ju et al., 2018; Lewis; Bassaganya-Riera; Bevan, 2010).

Talvez a maior dificuldade de se obter informações estruturais sobre a interação dos MLs com os receptores esteja relacionada à grande diversidade e liberdade conformacional dos ligantes no enorme sítio de ligação dos PPARs (Narala et al., 2014; Zoete; Grosdidier; Michielin, 2007). O objetivo deste trabalho é detalhar os tipos de modos ligação a nível atômico e molecular dos MLs da séries n-3 e n-6 no sítio de ligação do PPAR γ , a partir de complexos receptor-ligante co-cristalizados (Belfiore; Genua; Malaguarnera, 2009; Egawa et al., 2016; Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015; Itoh et al., 2008; Li et al., 2008; Malapaka et al., 2012; Waku et al., 2009, 2010), correlacionando-os e comparando-os com achados de estudos teóricos computacionais e experimentais disponíveis na literatura. A partir dessa análise, padrões nos modos ligação de MLs quimicamente relacionados e a importância dos principais resíduos de aminoácidos e grupos químicos dos MLs para a ativação do receptor, poderão ser apontados, permitindo relacionar as estruturas químicas dos participantes à sua atividade biológica.

1.3.1 Mediadores Lipídicos Da Série n-6 Agonistas Do PPAR γ

O AL é o ácido graxo poli-insaturado mais comum na dieta humana e nos tecidos de mamíferos, sendo, pela ação das alongases e dessaturases, precursor de vários outros AGEs da série n-6 com atividade imunomoduladora, como os ácidos gama-linolênico (AGL, 18:3n-6), (11Z, 14Z)-eicosadienoico (AED, 20:2n-6), (5Z, 11Z, 14Z)-eicosatrienoico (AET, 20:3n-6), di-homo-gama-linoleico (ADGL, 20:3n-6) e araquidônico (AA, 20:4n-6) (Abu-Ghosh et al., 2021; Berger; Moller, 2002; Huang et al., 2011). O AET e AGL inibem a translocação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) para o núcleo celular e, conseqüentemente, seu papel

na ativação de genes envolvidos em vias inflamatórias, como a de síntese do óxido nítrico (NO) e da cicloxigenase-2 (COX-2) (Harmon; Lam; Glass, 2011; Huang et al., 2011). Huang e colaboradores (2011) demonstraram que a inibição da síntese do NO pelo AL e AED na resposta inflamatória ao lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos murinos pode ser em parte via PPAR γ . Apesar de não ter sido eficaz em ativar o PPAR γ em outros estudos experimentais (Goto et al., 2015; Li et al., 2008), também foi demonstrado através de *docking molecular* que o AL é um ligante plausível do receptor (Yu et al., 2004).

Embora muitos desses ligantes apresentarem níveis séricos mais que suficientes para ativação dos PPARs (micromolares), sua relevância fisiológica é pouco clara, devido à dificuldade de determinar precisamente suas faixas de concentração intracelulares (Varga; Czimmerer; Nagy, 2011). As condições inflamatórias criam um microambiente que promove a oxidação enzimática e não enzimática (auto-oxidação) de ácidos graxos insaturados, resultando em um aumento de lipídeos eletrofílicos. Acredita-se que muitos eventos metabólicos e inflamatórios sejam regulados por uma população de enzimas e outras proteínas dependentes do potencial redox responsivas à concentração de derivados lipídicos eletrofílicos, sendo exemplo delas o PPAR γ e outros NRs (Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015). As enzimas cicloxigenases (COX), lipoxigenases (LOX), citocromo P450 oxidase (CYP450), são as responsáveis pela oxidação enzimática dos AGEs a uma série de moléculas bioativas, denominadas oxilipinas (Chavan-Gautam; Rani; Freeman, 2018; Dalle et al., 2022). Dentre as oxilipinas de maior interesse estão os eicosanoides (prostanoides e leucotrienos), os hidróxi-, oxo- e nitro-ácidos graxos, muitos já identificados como agonistas do PPAR γ (Derogis et al., 2013; Duan et al., 2023). Em geral, as oxilipinas são ativadores mais potentes do receptor que seus ácidos graxos precursores (Goto et al., 2015; Itoh et al., 2008), logo, a oxidação também contribui para o aumento dos níveis intracelulares de potenciais agonistas com maior afinidade pelo PPAR γ , tanto nos adipócitos quanto em células imunológicas (Berger; Moller, 2002; Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015; Waku et al., 2010).

A partir do AA, são produzidos pela atividade das COXs as prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) da série 2 (PGE₂, PGI₂, TXA₂) e, pela atividade das LOXs, os leucotrienos (LTs) da série 4. Apesar de ambas as séries desses eicosanoides, 2 e 4, serem classicamente conhecidas por iniciar processos inflamatórios, tem sido demonstrado que seus membros, assim como outras oxilipinas derivadas do AA, podem também participar de vias pró-resolução da inflamação envolvendo o PPAR γ (Shang et al., 2018; Waku et al., 2008, 2009, 2010). O LTE₄, por exemplo, potente broncoconstritor, foi capaz de estimular a síntese da PGD₂ pela COX-2 em mastócitos, via PPAR γ (Paruchuri et al., 2008). A PGD₂ é o precursor natural da 15-deoxi-

Δ -12,14-prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), formada a partir da PGJ₂, um produto da desidratação espontânea da PGD₂, e uma série de atividades enzimáticas específicas (Lefils-Lacourtablaise et al., 2013; Scher; Pillinger, 2005). A 15d-PGJ₂ foi o primeiro ligante endógeno descoberto do PPAR γ e um de seus agonistas lipídicos mais potentes (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995; Waku et al., 2009). Tem sido demonstrado que a 15d-PGJ₂ exibe efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos tanto in vitro quanto in vivo, sendo capaz de inibir a expressão de vários genes pró-inflamatórios por mecanismos tanto dependentes quanto independentes do PPAR γ (Harmon; Lam; Glass, 2011; Jones et al., 2003; Lefils-Lacourtablaise et al., 2013).

Embora não haja dúvida de que a 15d-PGJ₂ seja um agonista potente do PPAR γ , é questionável que sua concentração nos tecidos biológicos seja suficiente para ativação do PPAR γ in vivo (Powell, 2003). Hidroxi- e oxo-ácidos graxos e seus precursores não oxidados geralmente ocorrem em níveis mais abundantes nos tecidos que a 15d-PGJ₂ e demais eicosanoides (Itoh et al., 2008; Kliewer et al., 1997). Os ácidos 9-hidroxi-octadecadienoico (9HODE) e 13-hidroxi-octadecadienoico (13HODE) são produtos estáveis gerados pela 15-LOX-1 a partir do AL (Bull et al., 2003; Li et al., 2008; Nieman et al., 2014). Ambos podem atuar através do receptor 132 acoplado à proteína G (GPCR132) para exercer efeitos pró-inflamatórios (Nieman et al., 2014). Porém tanto o 9HODE quanto o 13HODE são potentes agonistas do PPAR γ em vários tecidos e células imunológicas, como macrófagos e monócitos, onde exercem efeito pró-apoptótico via ativação do receptor (Duan et al., 2023). Além dos HODES, o ácido 6-hidroxi-octadecatrienoico (6HOTrE), derivado do AGL, também é ligante n-6 do PPAR γ (Itoh et al., 2008).

Os oxo-ácidos graxos são os produtos finais do metabolismo dos hidroxi-ácidos graxos, onde o grupo hidroxila da cauda carbônica é oxidado à carbonila (Cipollina et al. 2014; Schopfer; Cipollina; Freeman, 2011). Os ácidos 10-oxo-12Z-octadecenoico (KetoA) e 10-oxo-11E-octadecenoico (KetoC), ambos produzidos pela microbiota bacteriana intestinal a partir do AL, se mostraram potentes ativadores do PPAR γ em modelo murino (Goto et al., 2015). Os ácidos oxo-eicosatetraenoicos (5-, 8-, 9-, 11-, 12- e 15oxoETEs) (Waku et al., 2009; Waku et al., 2010), 13-oxo-octadecadienoico (13oxoODE), derivados do AL, o ácido 15-oxo-eicosadienoico (15oxoEDE) do AED (Huang et al., 2011), também são oxo-ácidos graxos agonistas ou prováveis agonistas endógenos do PPAR γ .

Itoh e colaboradores (2008) demonstraram ainda que oxilipinas apresentando simultaneamente grupo hidroxila e carbonila na cauda, os ácidos 8-hidroxi-6-oxo-octadecatrienoico (8H-6oxoOTE) e 10-hidroxi-6-oxo-octadecatrienoico (10H-6oxoOTE), derivados do AGL podem atuar como prováveis ligantes efetivos naturais do PPAR γ . Além das

oxilipinas oxigenadas, os nitro-ácidos graxos, como os ácidos 10-nitrolinoleico (10LNO₂) e 12-nitrolinoleico (12LNO₂), demonstraram ser ligantes endógenos de alta afinidade pelo PPAR γ , ainda mais potentes que os HODES, aumentando fortemente sua interação com vários coativadores e ativando o receptor em concentrações nanomolares (Bull et al., 2003; Li et al., 2008). Porém, apesar dos níveis relativamente altos de nitro-ácidos graxos encontradas no plasma (500 nM), acredita-se que dentro das células tenham meia-vida mais curta que os oxo-ácidos graxos, devido às altas concentrações intracelulares de glutathione, a qual são prontamente acoplados (Yaqoob et al., 2015; Itoh et al., 2008).

1.3.2 Mediadores Lipídicos Da Série n-3 Agonistas Do PPAR γ

Os efeitos anti-inflamatórios do AAL têm sido amplamente estudados. Além de seu papel conjunto com o AL (n-6) na manutenção das membranas celulares (Martin et al., 2006), foi evidenciado que, por inibição da via do NF-kB através da ativação do PPAR γ , o AAL foi capaz de diminuir a secreção de IL-1, IL-6 e TNF α (Zhao et al., 2011). No retículo endoplasmático dos hepatócitos, o AAL é convertido em EPA (20:5n-3), que é alongado e dessaturado até se tornar o ácido tetracosa-hexaenóico (THA, 24:6n-3), que por sua vez é transportado para os peroxissomos e beta-oxidado a DHA, que é o produto do final da ação das alongases, dessaturases e beta-oxidação no metabolismo dos ácidos graxos n-3 (Martin et al., 2006).

Efeitos anti-inflamatórios semelhantes aos do AAL foram observados tanto para o EPA quanto para o DHA. Ambos se relacionam-se à baixa incidência de doenças autoimunes e inflamatórias, à melhora na sensibilidade à insulina e aumentam rapidamente a secreção de adiponectina, hormônio secretado, principalmente, pelo tecido adiposo, com papel significativo na melhoria da sensibilidade insulínica, além de efeitos anti-inflamatórios e anti-aterogênicos (Cocate; Domingues; Natali, 2011; Zhao *et al.*, 2011). Assim como os AGEs da série n-6 AET e AGL, o EPA inibe a superexpressão da COX-2 e iNOS induzida por LPS através da supressão da ativação das vias de transdução de sinal do NF-kB, resultando em uma diminuição significativa nos níveis de PGE₂ e NO, respectivamente (Huang et al., 2011; Novak et al., 2003). Além de ser precursor de potentes mediadores neuroprotetores e plausível agonista direto do PPAR γ , o DHA também atua como componente essencial das membranas celulares dos neurônios e da retina (Itoh et al., 2008; Martin et al., 2006).

Similarmente aos AGEs n-6, os n-3 também podem ser oxidados pela COX e LOX a prostanoídes, hidroxi- e oxo-ácidos graxos bioativos, inclusive podendo inibir a produção de

prostaglandinas e leucotrienos derivados da série n-6, por competição pelas enzimas com os AGEs n-6 (Zhao et al., 2011). Contudo, Cipollina e colaboradores (2014) demonstraram que dietas ricas em AGEs n-3 podem não levar à supressão direta de níveis de metabólitos n-6 circulantes, mas preferencialmente à geração de oxilipinas n-3 e à transdução de suas vias anti-inflamatórias próprias.

O EPA é precursor direto dos prostanoides da série 3 e leucotrienos da série 5, pela ação da COX e LOX respectivamente, conhecidos comumente por suas propriedades anti-inflamatórias (Kiezel-Tsugunova; Kendall; Nicolaou, 2018; Martin et al., 2006; Yaqoob et al., 2000). Um desses prostanoides é a 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₃ (15d-PGJ₃), derivada da PGD₃. Formada em quantidade significativa após a incubação de células com EPA, aumentou a secreção de adiponectina, parcialmente por meio de um mecanismo dependente de PPAR γ (Lefils-Lacourtablaise et al., 2013).

O ácido 5-hidroxi-eicosapentaenoico (5HEPA) é sintetizado a partir do EPA por neutrófilos e células mononucleares do sangue periférico e é um ligante do PPAR γ . Seu derivado, o ácido 5-oxo-eicosapentaenoico (5oxoEPA), junto ao 5oxoETE, n-6 derivado do AA, sintetizados por neutrófilos e células mononucleares do sangue periférico, são provavelmente os oxo-ácidos graxos mais abundantes do organismo (Itoh et al., 2008).

O ácido 17-hidroxi-docosa-hexaenoico (17HDHA) possui conhecido efeito pró-resolução da inflamação, porém se mostrou um ativador menos potente do PPAR γ que seu oxo-ácido graxo derivado, o ácido 17-oxo-docosa-hexaenoico (17oxoDHA). O 17oxoDHA é agonista dual do PPAR α (ligado à C275) e do PPAR γ (ligado à C285), diferente do ácido 4-oxo-docosa-hexaenoico (4oxoDHA), que é seletivo para o PPAR γ , sugerindo que o PPAR γ pode ser ativado por um maior número de isômeros de oxo-ácidos graxos, com o grupo carbonila em diferentes posições (Egawa et al., 2016).

O 4oxoDHA é o derivado cetônico do ácido 4-hidroxi-docosa-hexaenoico (4HDHA) outro provável ligante natural fisiológico do PPAR γ , que mostrou inibir o surgimento e proliferação de células endoteliais, além de seus efeitos anti-inflamatórios via PPAR γ (Itoh et al., 2008; Sapieha et al., 2011).

Os ácidos 5-oxo-tricosa-hexaenoico (5oxoTrHA) e 6-oxo-tetracosa-hexaenoico (6oxoTHA) são derivados do ácido tricosa-hexaenoico (TrHA, 23:6n-3) e THA (24:6n-3), respectivamente. Ambos demonstraram ser agonistas parciais do PPAR γ , sendo o 6oxoTHA mais potente que a 15d-PGJ₂ para reagir com o receptor via reação de Michael, além de ter

substituído o agonista total não covalente pioglitazona, uma TZD, do LBP (Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015; Gotoh et al., 2018).

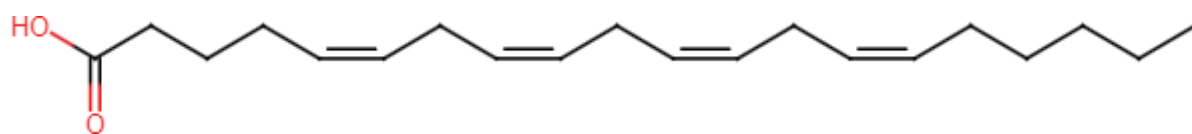
Em dietas ricas em n-3, ácidos hidroxi-eicosapentaenoicos (HEPEs) são gerados em células endoteliais humanas pela COX-2 a partir do EPA, e foi demonstrado que o 18HEPE e 15HEPE, podem ser usados por neutrófilos para atenuar eventos-chave na microinflamação, como expressão de moléculas de adesão e transmigração (Bassaganya-Riera; Hontecillas; Beitz, 2002; Serhan et al., 2000). Foi também demonstrado que o 15HEPE e o ácido 13-hidroxi-octadecatrienoico (13HOTrE), derivado do ALA, inibem a ativação da via NF-kB através de agonismo com o PPAR γ (Ávila-Román et al., 2018).

As resolvinas e protectinas são derivados não oxo-ácidos dos hidroxi-ácidos graxos n-3 pela ação das LOXs, e são conhecidas pelos seus papéis nos processos de resolução da inflamação (Groeger et al., 2010; Nunes et al., 2022; Serhan et al., 2015; Sulciner et al., 2018). Seus representantes derivados do DHA são agrupados na série D, enquanto os derivados do EPA pertencem a série E (Makino et al., 2019). Assim como outros MLs, as resolvinas e protectinas agem por meio de receptores acoplados à proteína G e seus prováveis mecanismos de ação sobre o PPAR γ ainda são pouco claros (Krishnamoorthy et al., 2012; Marion-Letellier; Savoye; Ghosh, 2016). Porém foi demonstrado que efeitos anti-inflamatórios do ácido tri-hidroxi-docosa-hexaenoico (resolvina D₁, RvD₁) e do ácido di-hidroxi-docosa-hexaenoico (neuroprotectina D₁, NPD₁), em modelos animais se dão via PPAR γ (Liao et al., 2012; Zhao et al., 2011).

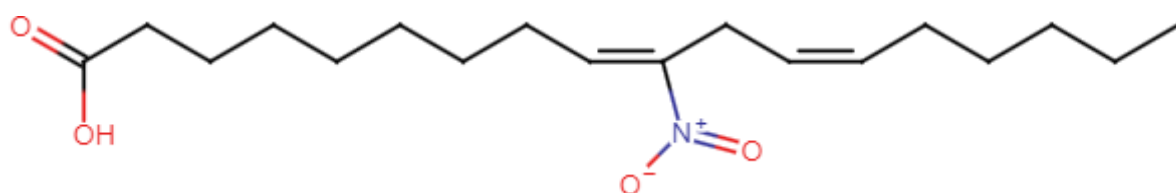
1.4 COMPLEXOS MLs-PPAR γ

Após uma busca sistemática no repositório de estruturas tridimensionais de macromoléculas *Protein Data Bank* (PDB) (Berman et al., 2000), foram identificados 20 complexos do PPAR γ com 10 diferentes MLs da série n-6 (AA, 10LNO₂, 12LNO₂, 9HODE, 13HODE, 15d-PGJ₂, 8oxoETE, 15oxoETE, 8H-6oxoOTE e 10H-6oxoOTE) e 7 da série n-3 (DHA, 4HDHA, 4oxoDHA, 5HEPA, 5oxoTrHA, 6oxoTHA e 17oxoDHA) (Figura 4).

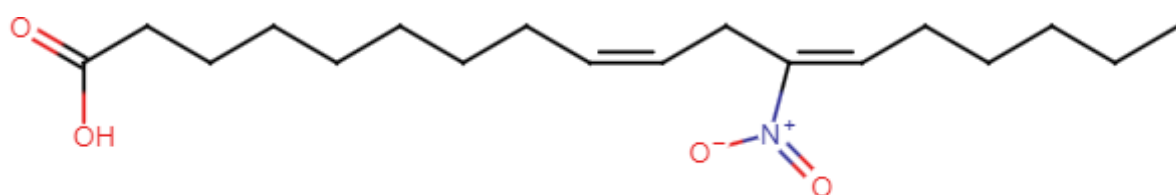
Figura 4 – MLs n-3 e n-6 encontrados ligados ao PPAR γ em cristais depositados no PDB.



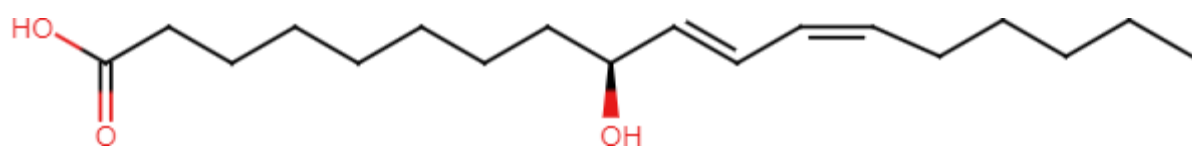
AA (PDB IDs: 6MCZ, 6MD2)



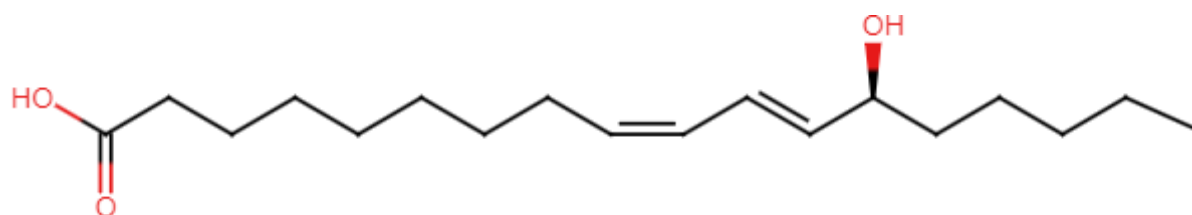
10LNO₂ (PDB ID: 3CWD)



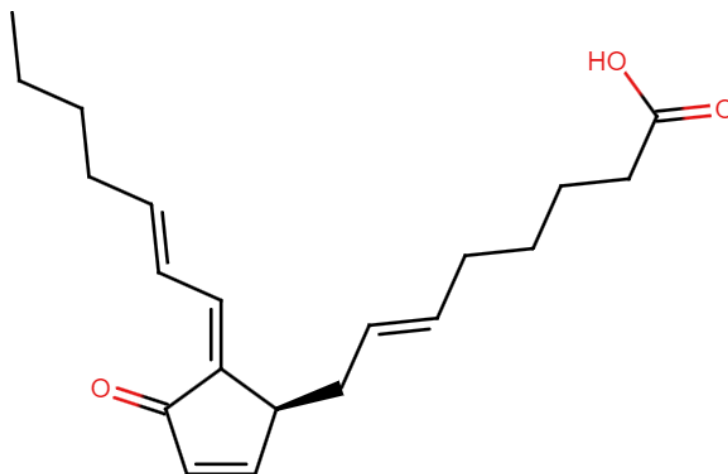
12LNO₂ (PDB ID: 3CWD)



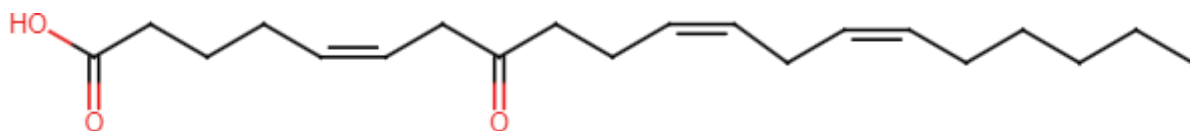
9HODE (PDB ID: 2VSR)



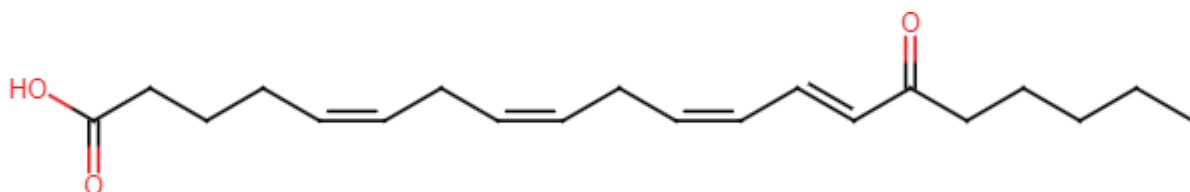
13HODE (PDB ID: 2VST)



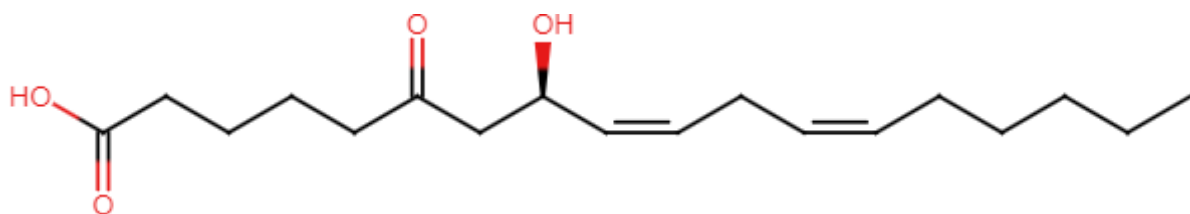
15d-PGJ₂ (PDB IDs: 2ZVT, 2ZK1, 2ZK2)



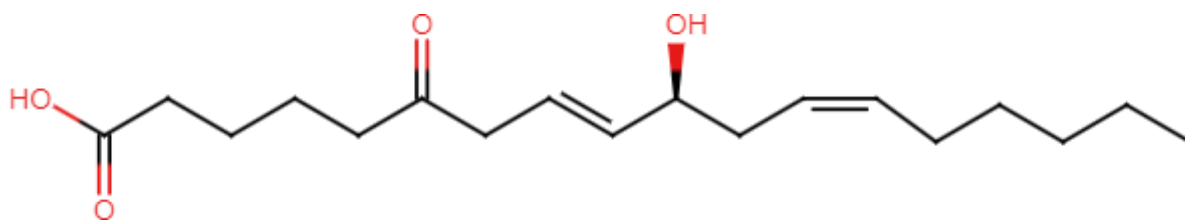
8oxoETE (PDB ID: 2ZK3)



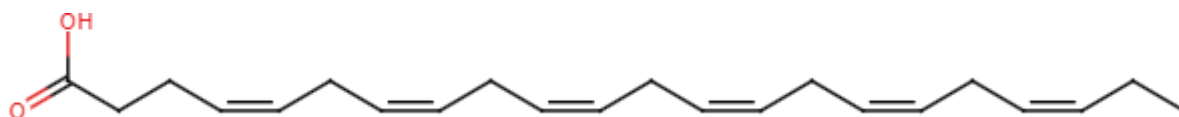
15oxoETE (PDB IDs: 2ZK4, 3ADW)



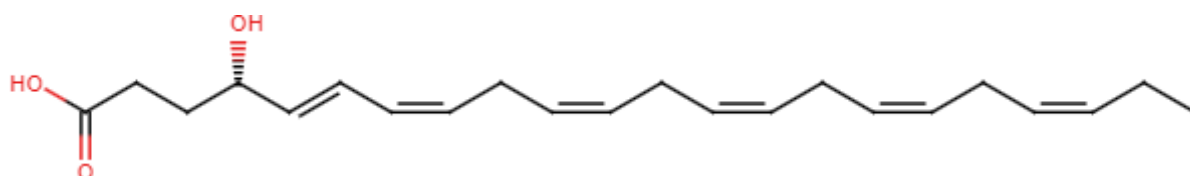
8H-6oxoOTE (PDB ID: 2VV4)



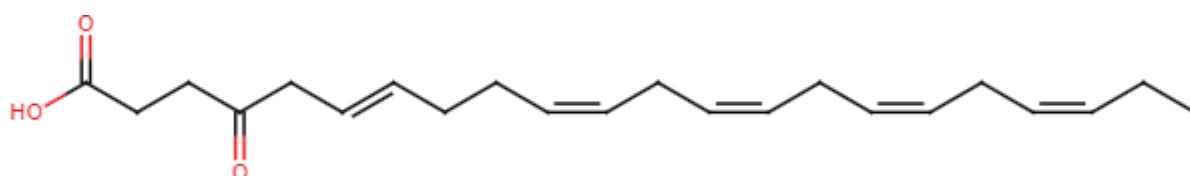
10H-6oxoOTE (PDB ID: 2VV4)



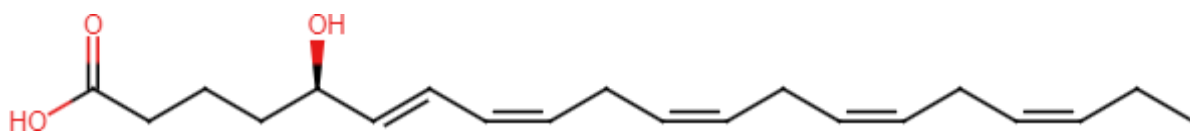
DHA (PDB ID: 2VV0)



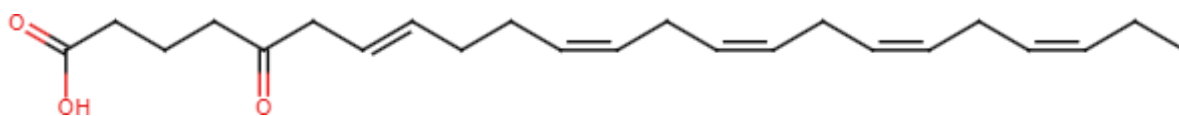
4HDHA (PDB ID: 2VV1)



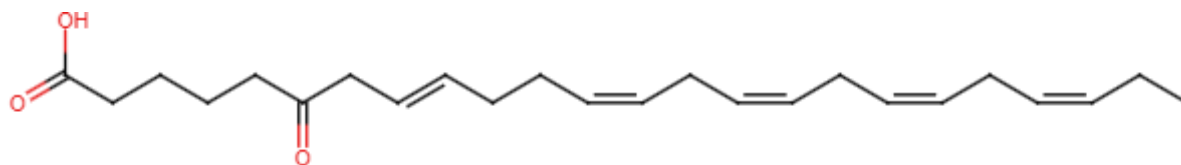
4oxoDHA (PDB ID: 2VV3)



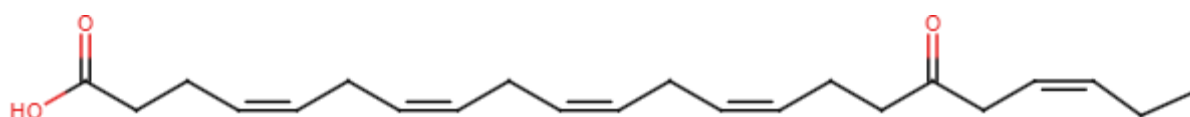
5HEPA (PDB ID: 2VV2)



5oxoTrHA (PDB ID: 3X1H)



6oxoTHA (PDB ID: 3X1I)



17oxoDHA (PDB ID: 5AZV)

Estruturas desenhadas através da ferramenta de desenho e edição molecular Chemical Sketch Tool do PDB. Fonte: Do autor, 2024.

Na maioria desses cristais, além de moléculas de água, os mediadores compartilham simultaneamente o sítio de ligação do PPAR γ com pelo menos outra molécula, que pode ser do mesmo ligante, de outro ácido graxo, como o nonanoico (Shang et al., 2018) e o decanoico (Malapaka et al., 2012), de um composto natural, como a glutationa (Waku et al., 2009) e a luteolina (Puhl et al., 2012), ou de um agonista sintético (Shang et al., 2018). Em cada caso, são formadas interações específicas entre os ligantes e o receptor.

1.4.1 Ligação Covalente à C285

A partir das estruturas cristalizadas e de estudos experimentais com ensaios bioquímicos e espectrometria de massa, ficou evidenciado que os nitro-, oxo-ácidos graxos e a 15d-PGJ₂ formam uma ligação covalente no bolsão do PPAR γ com a cisteína 285 (C285) localizada na H3 do receptor. A reação ocorre pelo mecanismo de adição de Michael, no qual os grupos carbonila cetônica ou nitro, fortes retirantes de elétrons, favorecem o ataque nucleofílico do grupo tiol da C285 a um carbono conjugado da cadeia carbônica da oxilipina (Cipollina et al. 2014; Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015; Groeger et al., 2010; Itoh et al., 2008; Li et al., 2008; Waku et al., 2009). Essa ligação é exclusiva dos PPARs, acontecendo também com o PPAR α e PPAR β/δ e em seus ortólogos em outras espécies, mas não ocorre em outros NRs (Waku et al., 2009).

Itoh e colaboradores (2008) mostrou que a ligação covalente aos oxo-ácidos graxos tornou o LBD mais estável à desnaturação térmica e que esses agonistas ativaram o receptor em até uma ordem de magnitude acima que seus precursores hidroxilados e não oxidados.

Através de estudos cristalográficos e mutação gênica do PPAR γ , Waku e colaboradores (2008, 2009) compararam três estruturas do receptor ligadas à 15d-PGJ₂ e demonstraram que a conformação do loop- Ω muda pela interação não covalente com o bolsão e que a ligação covalente com a C285 rearranja as cadeias laterais em torno do resíduo, especialmente da fenilalanina 287 (F287). Tal rearranjo se mostrou crucial para indução da anti-repressão do receptor causada pela dissociação de co-repressores e também foi observado nos cristais com oxo-ácidos graxos (Itoh et al., 2008; Waku et al., 2009). A substituição da F287 em ensaios com LBP mutantes reduziu a ativação do receptor pelos nitro-ácidos graxos, mas não pela TZD rosiglitazona em ensaios baseados em células, sugerindo a importância do resíduo para ativação pelos agonistas lipídicos endógenos (Li et al., 2008).

Com a cabeça polar do ligante relativamente fixa por ligações de hidrogênio, uma cauda mais flexível, longa e hidrofóbica tem mais chance de acessar o tiol, o que explica, por exemplo, a maior reatividade do 6oxoTHA, de 24 carbonos, em relação aos outros oxo-ácidos graxos (Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015). Além das interações intermoleculares, a posição do grupo cetônico é crucial para a ligação covalente e depende diretamente da conformação da cauda hidrocarbonada do ácido graxo, ditada predominantemente pelas interações hidrofóbicas que realiza com resíduos apolares no interior do sítio. A 15d-PGJ₂ é metabolizada via conjugação com a glutatona, poderoso nucleófilo intracelular. Conjugada, o prostanoide ainda se liga à C285 e rearranjo semelhante das cadeias laterais é observado (Waku et al., 2009). A substituição da C285 por outro resíduo em LBPs mutantes tornou os oxo-ácidos graxos menos potentes que os hidroxilados (Itoh et al., 2008).

Apesar da reação ser considerada reversível em certas condições (Cipollina et al., 2014), no caso das oxilipinas ligadas ao PPAR γ é irreversível, provavelmente devido à C285 estar enterrada no bolsão e inacessível para outro ligante (Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015). Com o acoplamento covalente, o receptor deve apresentar equilíbrio cinético de ativação diferente do ocasionado por ligantes não covalentes, permanecendo ativo até sua degradação pelo proteossomo (Bassaganya-Riera; Hontecillas; Beitz, 2002).

1.4.2 Modos de ligação dos MLs no LBP do PPAR γ

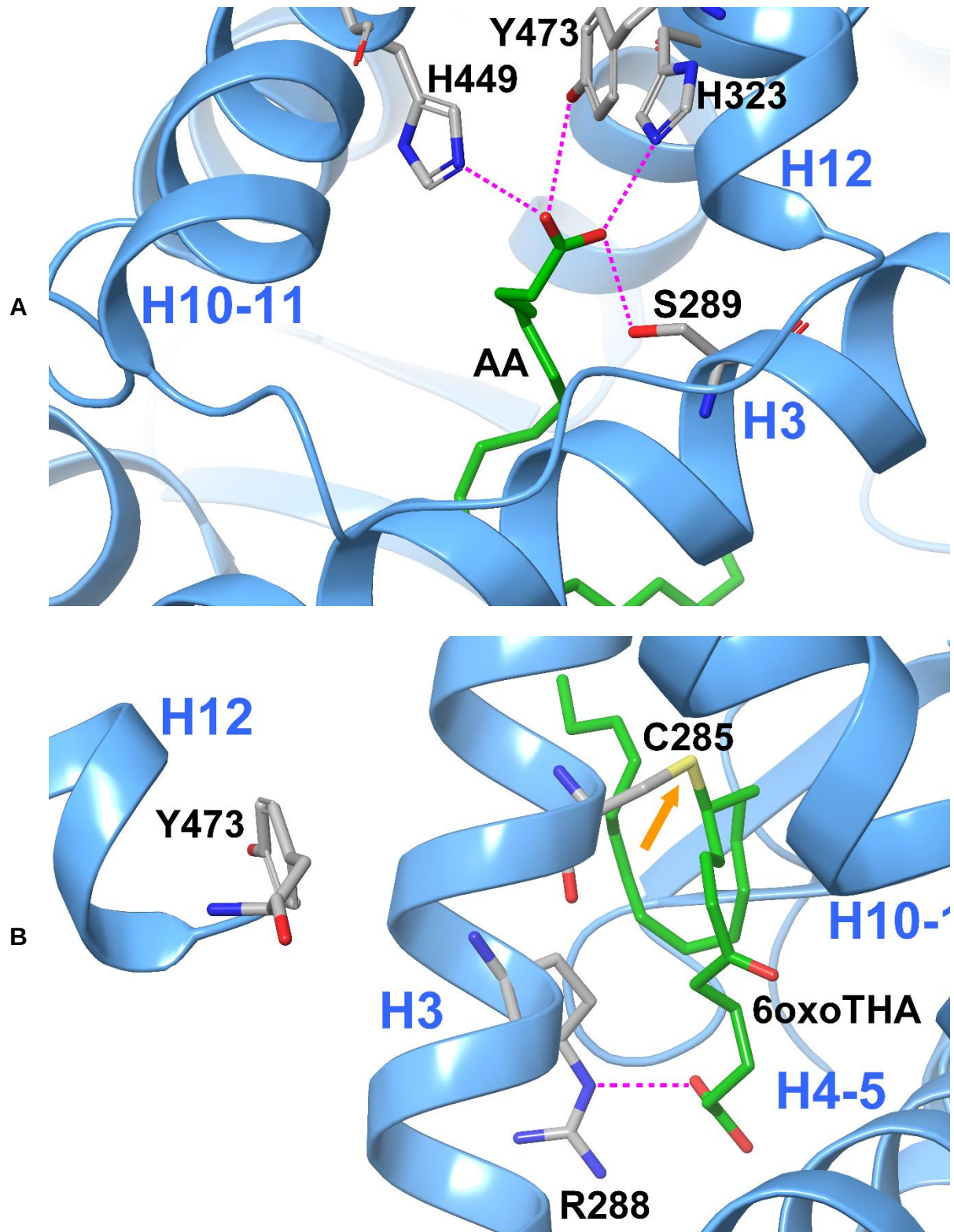
A localização e orientação dos ligantes nos subsítios, bem como suas interações intermoleculares com os resíduos do LBP, permitem definir os modos de ligação dos MLs como canônico ou alternativos (Figura 5).

No modo canônico, a cabeça polar (carboxilato), comum a todos os MLs, se encontra circundada por aminoácidos da vizinhança da H12, especialmente as cadeias laterais da serina 289 (S289), histidina 323 (H323), histidina 449 (H449) e tirosina 473 (Y473), com as quais estabelece ligações de hidrogênio, pontes salinas e outras interações polares mais fracas, específicas de cada ligante (Figura 5A). A interação com esses resíduos é comum a vários ligantes do PPAR γ , incluindo compostos sintéticos que atuam como agonistas totais ligados no subsítio ortostérico (Álvarez-Almazán et al., 2017; Shang et al., 2018; Waku et al., 2010).

É importante notar que, mesmo ligados de modo canônico, no subsítio ortostérico, o ML não necessariamente atua como agonista total do receptor, como evidencia ensaios experimentais conduzidos nos mesmos estudos em que foram cristalizados esses complexos (Itoh et al., 2008; Li et al., 2008; Waku et al., 2009). Como esperado, nos cristais em que os ligantes se encontram localizados em subsítios alostéricos e orientados em modos de ligação diferentes do canônico (alternativos), o carboxilato interage preferencialmente com outras regiões do LBP, não necessariamente próximas à H12 (Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015; Waku et al., 2010).

Um mesmo ligante pode se apresentar em mais de um modo de ligação no LBP de diferentes complexos. Isso pode ocorrer devido aos diferentes métodos de cristalização (Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015) ou à presença simultânea de outro ligante no sítio. A posição do 13HODE, por exemplo, se sobrepõe às posições das duas moléculas de 9HODE ligadas simultaneamente em seu cristal, ficando claro que se 9HODE e 13HODE se ligarem simultaneamente, suas conformações e conseqüentemente interações devem ser diferentes (rearranjadas) no interior do bolsão (Itoh et al., 2008).

Figura 5 – MLs ligados ao sítio de ligação (LBP) do PPAR γ .



Ácido araquidônico (A) e ácido 6-oxo-tetracosa-hexaenoico (B) ligados de modo canônico e não-canônico, respectivamente, no bolsão de ligação do PPAR γ . As linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio. Os ligantes estão representados em verde, átomos de carbono (dos resíduos de aminoácidos) em cinza, de oxigênio em vermelho, de nitrogênio em azul e de enxofre em amarelo. A seta laranja indica a ligação covalente formada pela reação de Michael entre o oxo-ácido graxo e o C285 do receptor. Imagens elaboradas através da ferramenta de interface gráfica de desenho e edição molecular Maestro (Schrödinger, 2020). Fonte: Do autor, 2024.

1.4.3 Interações Não Covalentes Polares

Propriedades hidrofílicas únicas do LBP do PPAR γ devem ditar a discriminação entre as oxilipinas (preferidas pelo PPAR γ) e ácidos graxos saturados ou insaturados não oxidados (preferidos pelos outros dois isotipos) (Li et al., 2008). As interações polares entre os MLs e os resíduos de aminoácidos do LBP do PPAR γ evidenciadas nos complexos encontrados estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Interações polares entre resíduos do PPAR γ e MLs n-3 e n-6.

Distâncias entre os heteroátomos da interação resíduo-grupo funcional do ligante (em Å)					
Resíduo	Ligante	Carboxilato	Nitro	Hidroxila	Carbonila
C285	8oxoETE				4
	15d-PGJ ₂	4,5			
	4HDHA			3,3	
Q286	8oxoETE	3,0			
	10LNO ₂	1,7			
	12LNO ₂	1,9			
R288	4HDHA	3,4			
	5oxoTrHA	2,5			
	6oxoTHA	2,7			
	9HODE	3,0		3,4	
	10H-6oxoOTE	2,8			
	10LNO ₂		4,2		
	12LNO ₂		4,0		
	13HODE	2,7		4,0	

	15d-PGJ ₂	2,8	3,4
	15oxoETE	3,4	
	17oxoDHA	3,9	
	AA	3,8	
	DHA	3,6	
	4HDHA	3,3	3,7
	4oxoDHA	4,2	
	5HEPA	3,7	
	5oxoTrHA	3,4	2,7
	6oxoTHA	3,0	4,5
	8H- 6oxoOTE	3,6	4,1
	8oxoETE	3,9	2,7
S289	9HODE	3,1	
	10H- 6oxoOTE	7,9	3,2
	10LNO ₂	4,8	
	12LNO ₂	4,4	
	15oxoETE		3,8
	17oxoDHA		3,5
	AA	3,4	
	DHA	2,8	
E291	9HODE		3,9
E295	9HODE		3,0
H323	4HDHA	2,8	

	4oxoDHA	2,8		
	5HEPA	3,2		
	5oxoTrHA	2,7		
	6oxoTHA	2,6		
	8H- 6oxoOTE	2,7		
	8oxoETE	4,3		
	9HODE	3,1		
	AA	3,0		
	DHA	2,9		
	4oxoDHA			2,9
	5HEPA	4,2	3	
	5oxoTrHA			3,8
	8H- 6oxoOTE	4,5		
	8oxoETE	4,5		4,6
Y327	9HODE		4,0	
	15d-PGJ ₂	3,4		
	15oxoETE			4,4
	AA	5		
	DHA	4,9		
	4HDHA	3,6		
L330	9HODE	3,4		
	DHA	4,2		
S342	13HODE	2,7	3,9	

	15d-PGJ ₂	3,7	
	15oxoETE	3,2	
	17oxoDHA	3,0	
E343	15d-PGJ ₂	3,0	
	15oxoETE	3,4	
	17oxoDHA	3,4	
	4oxoDHA		3,5
	5HEPA		3,8
	5oxoTrHA		3,1
K367	8oxoETE		2,6
	15d-PGJ ₂		2,7
	15oxoETE		4,4
	17oxoDHA		4,3
H449	4HDHA	3	
	4oxoDHA	2,8	3,8
	5HEPA	2,9	4
	5oxoTrHA	3,4	3,1
	6oxoTHA	3,4	
	8H- 6oxoOTE	2,9	
	8oxoETE	3,0	
	9HODE	2,7	
	10LNO ₂	3,1	
	12LNO ₂	2,9	

	15d-PGJ ₂	2,6	5
	17oxoDHA		4,3
	AA	3	
	DHA	2,8	
	4HDHA	2,8	
	4oxoDHA	2,8	
	5HEPA	2,8	
	5oxoTrHA	2,5	
	6oxoTHA	2,8	
	8H-		
	6oxoOTE	2,9	
Y473	8oxoETE	2,4	
	9HODE	2,6	
	10LNO ₂	4,0	
	12LNO ₂	3,8	
	15d-PGJ ₂	3,0	
	AA	3,4	
	DHA	3,0	

Os valores foram obtidos medindo-se as distâncias entre heteroátomos potencialmente doadores e aceptores de ligação de hidrogênio entre a proteína e os ligantes, por meio da ferramenta de análise e visualização tridimensional do PDB. Distâncias até 3,5 Å foram consideradas para ligação de hidrogênio ou pontes salinas (Horowitz; Trievel, 2012), e entre 3,5 e 4,5 Å, para demais possíveis contatos polares, visto a natureza dinâmica de formação das interações. Distâncias acima desses cut-offs não foram listadas. Fonte: Do autor, 2024.

Como pode ser observado na Tabela 1, através de seus carboxilatos, 13 dos 17 lipídeos co-cristalizados com o LBD do PPAR γ estabelecem contatos polares com a H449 e a Y473 e, dentre eles, 11 com a S289, e 10 com a H323. Concluiu-se que as 13 moléculas se encontram ligadas de modo canônico em seus respectivos cristais. A tirosina 473 (Y473) é um resíduo chave no reconhecimento do PPAR γ por seus agonistas sintéticos totais clássicos, as TZDs (Xu

et al., 2001). Receptor mutante Y473F mesmo ligado covalentemente à 15d-PGJ₂ através da C285 fica inativo (Waku et al., 2008). Apesar do posicionamento canônico do 13HODE observado no cristal, nenhum contato de seu carboxilato com a Y473 foi revelado pelo cristal, indicando que apenas a orientação não permite afirmar que os ligantes estabilizem a H12 com a mesma eficiência (Itoh et al., 2008). Quanto aos lipídeos ligados de modos alternativos no receptor, a S289 e a H449 ainda fazem contatos polares com 8 e 4 ligantes, respectivamente, através dos grupos da cauda (carbonila, hidroxila e/ ou nitro) dessas oxilipinas.

Moléculas de 11 dos 17 lipídeos cristalizados formaram, a partir de suas cabeças polares, ligações de hidrogênio com a cadeia lateral nitrogenada da arginina 288 (R288), distante de H12, evidenciando que tais ligantes se encontram ligados de modo não canônico no receptor. O 9HODE, por exemplo, posicionado entre a H3 e as folhas beta, permitiu que a R288 formasse uma ponte salina com o E295, que por sua vez, reposicionado da apoconformação da proteína, formou uma ligação de hidrogênio com a S289 (Itoh et al., 2008). Através de um trabalho por docking e dinâmica molecular, Alvarez-Almazán e colaboradores (2017) mostraram que as ligações de hidrogênio mais persistentes dos ligantes do referido estudo, que inclui a 15d-PGJ₂, foram com a R288, E295 e E343, e que a R288 foi resíduo com a menor energia livre de ligação, portanto o que mais contribuiu com a afinidade dos ligantes pelo receptor. Em outra abordagem também por dinâmica molecular, foi demonstrado que o ácido oleico (AO), um ácido graxo não essencial agonista do PPAR γ , pode ser estabilizado por ponte salina entre seu carboxilato e a R288 (Agosta; Cozzini, 2024).

A R288 também forma interações polares com os grupos carbonila, hidroxila e nitro de mais 5 ligantes. Além da R288, em um mesmo cristal, a hidroxila do 9HODE interage simultaneamente com os carboxilatos do E291 e E295. Itoh e colaboradores (2008) sugerem que a cadeia lateral longa e flexível da R288 parece ser chave para a adaptação do PPAR γ a diferentes ligantes, em diferentes orientações. Foi demonstrado que receptor mutante, R288H, comum em cânceres de cólon, tem afinidade reduzida por pelos ligantes 9HODE e 15d-PGJ₂ (Sarraf et al., 1999), destacando a importância clínica e a correlação da estrutura e interações químicas desse resíduo e sua atividade biológica.

Contatos polares da cadeia lateral da tirosina 327 (Y327) foram observados com o carboxilato de 4 ligantes (8oxoETE, 8H-6oxoOTE, 5HEPA e especialmente a 15d-PGJ₂) e com os grupos hidroxila e carbonila de 6 ligantes (4oxoDHA, 5HEPA, 5oxoTrHA, 8oxoETE, 9HODE e 15oxoETE) (Tabela 1). Itoh e colaboradores (2008) sugerem que a cadeia lateral da Y327 possa catalisar a reação de adição de Michael ao potencializar o efeito retirante de elétrons da carbonila.

Yamamoto e colaboradores (2015) descreveram ligações de hidrogênio entre o carboxilato do 5oxoTrHA e 6oxoTHA com a lisina 367 (K367) do receptor ativado. Porém é com a carbonila e hidroxila de 7 ligantes (4oxoDHA, 5HEPA, 5oxoTrHA, 8oxoETE, 15d-PGJ₂, 15oxoETE e 17oxoDHA) que o resíduo realiza suas principais interações. A posição das cadeias laterais de resíduos envolvidos em interações estabilizadoras do grupo cetônico, como a K367, pode ter papel determinante na especificidade dos ligantes que se acoplam covalentemente ao receptor, como é o caso do 4oxoDHA, que faz ligações de hidrogênio simultaneamente com a Y327 e a K367 (Itoh et al., 2008).

A glutamina 286 (Q286) forma ligações de hidrogênio evidentes com o carboxilato de 3 ligantes (ambos os nitro-ácidos graxos e 8oxoETE) e com a hidroxila do 4HDHA. A TZD rosiglitazona também faz ligação de hidrogênio com a Q286, podendo indicar que o a estabilização do resíduo faz parte de um mecanismo conservado entre agonistas endógenos e sintéticos para a ativação do PPAR γ (Li et al., 2008).

A serina 342 (S342) é observada formando ligações de hidrogênio tanto a partir de sua cadeia lateral hidroxilada quanto da amida de seu esqueleto carbônico (Itoh et al., 2008; Li et al., 2008; Waku et al., 2009). O resíduo faz contatos polares com o carboxilato de 4, e a hidroxila de 1 ligante (13HODE). Também através da amida de seu esqueleto carbônico, o glutamato 343 (E343) é observado formando ligação de hidrogênio com o carboxilato de 3 ligantes. Li e colaboradores (2008) descrevem ainda interações polares importantes do resíduo com o grupo nitro do 12LNO₂ e a hidroxila do 13HODE. Interações simultâneas do carboxilato do ligante com os dois resíduos, S342 e E343, podem indicar um provável mecanismo alternativo de ativação do receptor, como possivelmente é o caso dos agonistas 15oxoETE e 17oxoDHA (Waku et al., 2010; Egawa et al., 2016).

Outras interações polares foram observadas entre a leucina 228 (L228), a histidina 266 (H266), a serina 285 (S285) e a leucina 330 (L330) com as cabeças polares de 1, 2, 1 e 3 ligantes, respectivamente, e entre a C285 com a carbonila do 8oxoETE. Itoh e colaboradores (2008) ainda descrevem uma favorável interação π entre a fenilalanina 282 (F282) e a hidroxila do 4HDHA, posicionada diretamente sobre o anel aromático do resíduo.

1.4.4 Interações Hidrofóbicas

Entre resíduos do LBP do PPAR γ que realizaram mais interação hidrofóbicas com os MLs, descritas nos estudos cristalográficos estão: I281, G284, C285, F287, R288, S289, V290, H323, I326, Y327, L330, L333, V339, I341, M348, M364, K367, H449, L453, L469, Y473

(Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015; Li et al., 2008; Waku et al., 2010). Em estudos por modelagem molecular, principalmente dinâmica molecular, destacaram-se a F282, L330, L333, L340 e F363 para estabilização da cauda dos ácidos oleico e nonanoico (Agosta; Cozzini, 2024; Liberato et al., 2012; Shang et al., 2018); os resíduos F226, P227, L228, I281, F282, C285, A292, I296, I326, Y327, M329, L330, L333, L334, V339, I341, M348, L353, F363 e M364 para estabilização da 15d-PGJ₂ mais ligantes sintéticos (Álvarez-Almazán et al., 2017); e os resíduos M329, L330, L333 para estabilização da RvE₁ e NPD₁, e a I326 e I341 para estabilização do ácido 2-hidroxi-octadecadienoico (2HODE) (Muralikumar et al., 2017). Em nosso estudo de dinâmica molecular, a ser publicado, C285, L330 e I341 estão entre os resíduos não carregados que apresentaram menores energia de ligação entre o receptor e os quatro MLs usados no trabalho (AA, DHA, 4HDHA e 9HODE), provavelmente através de interações hidrofóbicas entre suas cadeias laterais e os 4 ligantes (Siqueira-Silva et al., 2024).

Notavelmente, as cadeias laterais de resíduos que em geral são móveis na apoproteína se apresentaram reposicionadas de forma específica em certos cristais, favorecendo a formação de contatos hidrofóbicas com os ligantes, como é caso da isoleucina 267 (I267) interagindo com a 15d-PGJ₂, 8oxoETE e 15oxoETE (Waku et al., 2008, 2009, 2010), da fenilalanina 263 (F263), que particularmente faz extensivas interações de van der Waals com os carbonos 2, 3 e 4, 16, 17 e 18 de duas moléculas de 9HODE presentes no bolsão (Itoh et al., 2008), e da F287 com o 10LNO₂, 12LNO₂ e 15d-PGJ₂ (Li et al., 2008; Waku et al., 2008), como descrito anteriormente nesta revisão.

Apesar dos resíduos polares ditarem a predileção do PPAR γ por ligantes mais hidrofílicos em relação aos outros dois isotipos (Li et al., 2008), a prevalência do caráter lipofílico do seu bolsão explica o grande número de ácidos graxos e outros compostos sintéticos e naturais hidrofóbicos que se ligam ao receptor (Agosta; Cozzini, 2024) visto que o aumento da hidrofobicidade de um composto em geral está relacionado a uma maior afinidade por sua molécula alvo (Lafont et al., 2007).

No cristal com o DHA, quebras nos mapas de densidade eletrônica sugerem que a cauda desse AGE pode ter múltiplas conformações no interior do sítio (Itoh et al., 2008). É possível que a presença dos grupos substituintes (carbonila, hidroxila e nitro) nas oxilipinas, na cauda leve a um maior ordenamento dos longos ligantes no receptor, através das suas interações polares discutidas na seção anterior. Contudo, apesar de tais grupos conferirem um caráter menos apolar que o das caudas alifáticas dos AGEs não oxidados, interações hidrofóbicas das oxilipinas com diversos resíduos do sítio se mantêm cruciais para ativação do receptor como evidenciado pelos complexos cristalizados, ensaios experimentais e por dinâmica molecular.

1.4.5 Estabilização do loop-Ω, hélice H3 e folhas beta

As mudanças conformacionais do loop-Ω podem variar substancialmente segundo o ligante presente no bolsão do PPAR γ , e levar a efeitos biológicos distintos em termos de grau de atividade do receptor. No cristal com receptor na forma ativa ligado à 15d-PGJ₂, o arranjo das cadeias laterais dos resíduos da H3 são similares aos cristais com o 8oxoETE e o 15oxoETE, mas a conformação do loop-Ω só foi similar ao cristal com o 15oxoETE. Apesar de propriedades químicas e estruturais semelhantes, os ácidos 5, 8, 9, 11, 12 e 15oxoETE exibiram graus distintos de atividade transcricional em ensaio com a luciferase ($15 > 12 > 11 = 5 > 9 > 8$), associados à conformação do loop-Ω ao invés da interação com a H12 (Waku et al., 2009). No cristal com o AA, este e o ácido oleico, ambos ligados ao LBP, ao competirem com ligantes sintéticos pelo subsítio ortostérico, são “empurrados” para um subsítio alternativo próximo ao loop-Ω, sinergicamente afetando a estrutura e atividade do receptor (Shang et al., 2018). Um ligante sintético nitrado, mais potente que a 15d-PGJ₂, apresentou modo de ligação e conformação do loop-Ω similares aos dos cristais com o 15oxoETE e outros oxo-ácidos graxos agonistas parciais (Waku et al., 2009).

Abordagens por dinâmica molecular evidenciam a importância do loop-Ω, como modulador da atividade do PPAR γ , principalmente quando estão envolvidos agonistas parciais nos subsítios alostéricos do receptor. Shang e colaboradores (2019) mostraram que a coligação da edaglitazona, uma TZD, no subsítio ortostérico, com o ácido graxo nonanoico (agonista não AGE do PPAR γ), no subsítio alostérico, estabilizou mais a H12 em comparação com o edaglitazone sozinho, e que o loop-Ω se mostrou fundamental na regulação da conformação da H12. Agosta e colaboradores (2024) mostrou através de dinâmica molecular que o complexo do PPAR γ com a TZD rosiglitazona (subsítio ortostérico) mais ácido oleico no subsítio alostérico reduz a flexibilidade do loop-Ω, mesmo sem interagir diretamente com ele.

Em suma, o estudo de dinâmica do loop-Ω corrobora com o desenho racional de fármacos mimetizando os MLs endógenos, especialmente os ligados covalentemente ao PPAR γ com os oxo-ácidos graxos (Waku et al., 2009).

Agonistas parciais geralmente também estabilizam a hélice H3 e a região das folhas beta do PPAR γ (Álvarez-Almazán et al., 2017). Em certos modos de ligação não canônicos, como em cristais com 5oxoTrHA, 6oxoTHA e 17oxoDHA, fica evidente que os ligantes interagem com a região das folhas beta do receptor através de suas cabeças polares, e não de suas caudas, como acontece no modo canônico (Egawa; Itoh; Yamamoto, 2015; Egawa et al., 2016).

Enquanto a cabeça polar está ancorada nas folhas beta, a cauda do 17oxoDHA seria capaz de guiar a H12 para sua posição ativa por interação de van der Waals com o anel aromático da Y473, ou ainda de se enrolar em torno da H3 estabilizando a hélice como acontece na interação com outros agonistas parciais do PPAR γ (Montanari et al., 2008; Egawa et al., 2016). Através de dinâmica molecular, Agosta e colaboradores (2024) demonstraram ainda que interações intramoleculares entre o loop- Ω flexível e a hélice H3 desencadeadas pelo mecanismo de ligação alostérica estão envolvidas na interconversão entre estados conformacionais do receptor.

REFERÊNCIAS

- ABU-GHOSH, S.; DUBINSKY, Z.; VERDELHO, V.; ILUZ, D. Unconventional high-value products from microalgae: A review. **Bioresource Technology**, v. 329, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124895>
- AGOSTA, F.; COZZINI, P. A Combined Molecular Dynamics and Hydropathic INTERaction (HINT) Approach to Investigate Protein Flexibility: The PPAR γ Case Study. **Molecules**, v. 29, n. 10, p. 1–13, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29102234>
- ALEXANDER, R. L.; WRIGHT, M. W.; GORCZYNSKI, M. J.; SMITHERMAN, P. K.; AKIYAMA, T. E.; WOOD, H. B.; BERGER, J. P.; KING, S. B.; MORROW, C. S. Differential Potencies of Naturally Occurring Regioisomers of Nitrolinoleic Acid in PPAR γ Activation. **Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 492–498, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi8016747>
- ÁLVAREZ-ALMAZÁN, S.; BELLO, M.; TAMAY-CACH, F.; MARTÍNEZ-ARCHUNDIA, M.; ALEMÁN-GONZÁLEZ-DUHART, D.; CORREA-BASURTO, J.; MENDIETA-WEJEBE, J. E. Study of new interactions of glitazone's stereoisomers and the endogenous ligand 15d-PGJ₂ on six different PPAR gamma proteins. **Biochemical Pharmacology**, v. 142, p. 168–193, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.07.012>
- ANGELI, V.; HAMMAD, H.; STAELS, B.; CAPRON, M.; LAMBRECHT, B. N.; TROTTEIN, F. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Inhibits the Migration of Dendritic Cells: Consequences for the Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 5295–5301, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.10.5295>
- ÁVILA-ROMÁN, J.; TALERO, E.; DE LOS REYES, C.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; MOTILVA, V. Microalgae-derived oxylipins decrease inflammatory mediators by regulating the subcellular location of NF κ B and PPAR- γ . **Pharmacological Research**, v. 128, p. 220–230, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.10.009>
- BASSAGANYA-RIERA, J.; HONTECILLAS, R.; BEITZ, D. C. Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. **Clinical Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 451–459, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1054/clnu.2002.0594>
- BELFIORE, A.; GENUA, M.; MALAGUARNERA, R. PPAR- γ Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. **PPAR Research**, v. 2009, p. 1–18, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2009/830501>
- BENSINGER, S. J.; TONTONNOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 470–477, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature07202>
- BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 409–435, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104018>

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>

BERMÚDEZ, V.; FINOL, F.; PARRA, N.; PARRA, M.; PÉREZ, A.; PEÑARANDA, L.; VÍLCHEZ, D.; ROJAS, J.; ARRÁIZ, N.; VELASCO, M. PPAR- γ Agonists and Their Role in Type 2 Diabetes Mellitus Management. **American Journal of Therapeutics**, v. 17, p. 274–283, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e3181c08081>

BORNIQUEL, S.; JÄDERT, C.; LUNDBERG, J. O. Dietary conjugated linoleic acid activates PPAR γ and the intestinal trefoil factor in SW480 cells and mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 12, p. 2135–2140, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/jn.112.163931>

BRUNING, J. B.; CHALMERS, M. J.; PRASAD, S.; BUSBY, S. A.; KAMENECKA, T. M.; HE, Y.; NETTLES, K. W.; GRIFFIN, P. R. Partial Agonists Activate PPAR γ Using a Helix 12 Independent Mechanism. **Structure**, v. 15, n. 10, p. 1258–1271, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.07.014>

BRUST, R. *et al.* A structural mechanism for directing corepressor-selective inverse agonism of PPAR γ . **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07133-w>

BULL, A. W.; STEFFENSEN, K. R.; LEERS, J.; RAFTER, J. J. Activation of PPAR γ in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPAR γ . **Carcinogenesis**, v. 24, n. 11, p. 1717–1722, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg131>

CERIELLO, A. Thiazolidinediones as anti-inflammatory and anti-atherogenic agents. **Diabetes/ Metabolism Research and Reviews**, v. 24, n. 1, p. 14–26, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dmrr.790>

CHANDRA, V.; HUANG, P.; HAMURO, Y.; RAGHURAM, S.; WANG, Y.; BURRIS, T. P.; RASTINEJAD, F. Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 350–356, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature07413>

CHAVAN-GAUTAM, P.; RANI, A.; FREEMAN, D. J. Distribution of Fatty Acids and Lipids During Pregnancy. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 84, p. 209–239, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.12.006>

CHAWLA, A.; REPA, J. J.; EVANS, R. M.; EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. **Lipid Biology**, v. 294, p. 1866–1870, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.12.006>

CIPOLLINA, C.; SALVATORE, S. R.; MULDOON, M. F.; FREEMAN, B. A.; SCHOPFER, F. J. Generation and Dietary Modulation of Anti-Inflammatory Electrophilic Omega-3 Fatty Acid Derivatives. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094836>

CLARK, R. B.; BISHOP-BAILEY, D.; ESTRADA-HERNANDEZ, T.; HLA, T.; PUDDINGTON, L.; PADULA, S. J. The Nuclear Receptor PPAR γ and Immunoregulation: PPAR γ Mediates Inhibition of Helper T Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1364–1371, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1364>

DALLE, C. *et al.* The Plasma Oxylin Signature Provides a Deep Phenotyping of Metabolic Syndrome Complementary to the Clinical Criteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 1–28, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms231911688>

DAVID, S.; LÓPEZ-VALES, R. Bioactive Lipid Mediators in the Initiation and Resolution of Inflammation after Spinal Cord Injury. **Neuroscience**, v. 466, p. 273–297, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.04.026>

DAYNES, R. A.; JONES, D. C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 748–759, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri912>

DEROGIS, P. B. M. C.; FREITAS, F. P.; MARQUES, A. S. F.; CUNHA, D.; APPOLINÁRIO, P. P.; DE PAULA, F.; LOURENÇO, T. C.; MURGU, M.; MASCIO, P. Di; MEDEIROS, M. H. G.; MIYAMOTO, S. The Development of a Specific and Sensitive LC-MS-Based Method for the Detection and Quantification of Hydroperoxy- and Hydroxydocosahexaenoic Acids as a Tool for Lipidomic Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077561>

DREYER, C.; KREY, G.; KELLER, H.; GIVEL, F.; HELFTENBEIN, G.; WAHLIT, W. Control of the Peroxisomal Beta-Oxidation Pathway by a Novel Family of Nuclear Hormone Receptors. **Cell**, v. 68, p. 879–887, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90031-7)

DUAN, J.; DONG, W.; WANG, G.; XIU, W.; PU, G.; XU, J.; YE, C.; ZHANG, X.; ZHU, Y.; WANG, C. Senescence-associated 13-HODE production promotes age-related liver steatosis by directly inhibiting catalase activity. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44026-z>

DUBRAC, S.; STOITZNER, P.; PIRKEBNER, D.; ELENTNER, A.; SCHOONJANS, K.; AUWERX, J.; SAELAND, S.; HENGSTER, P.; FRITSCH, P.; ROMANI, N.; SCHMUTH, M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Activation Inhibits Langerhans Cell Function. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4362–4372, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4362>

EASTHAM, L. L.; MILLS, C. N.; NILES, R. M. PPAR α/γ expression and activity in mouse and human melanocytes and melanoma cells. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 6, p. 1327–1333, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9524-9>

EGAWA, D.; ITOH, T.; AKIYAMA, Y.; SAITO, T.; YAMAMOTO, K. 17-OxoDHA Is a PPAR α/γ Dual Covalent Modifier and Agonist. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 9, p. 2447–2455, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00338>

EGAWA, D.; ITOH, T.; YAMAMOTO, K. Characterization of covalent bond formation between PPAR γ and Oxo-fatty acids. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 690–698, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00021>

ELBRECHT, A.; CHEN, Y.; CULLINAN, C. A.; HAYES, N.; LEIBOWITZ, M. D.; MOLLER, D. E.; BERGER, J. Molecular Cloning, Expression and Characterization of Human Peroxisome Proliferator Activated Receptors γ 1 and γ 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 2, p. 431–437, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1044>

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, v. 10, p. 355–361, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm1025>
FAJAS, L. *et al.* The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18779–18789, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18779>

FORMAN, B. M.; TONTONOZ, P.; CHEN, J.; BRUN, R. P.; SPIEGELMAN, B. M.; EVANS, R. M. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. **Cell**, v. 83, p. 803–812, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90193-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90193-0)

FRATEV, F.; STEINBRECHER, T.; JÓNSDÓTTIR, S. Ó. Prediction of Accurate Binding Modes Using Combination of Classical and Accelerated Molecular Dynamics and Free-Energy Perturbation Calculations: An Application to Toxicity Studies. **ACS Omega**, v. 3, n. 4, p. 4357–4371, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00123>

GOTO, T.; KIM, Y.; FURUZONO, T.; TAKAHASHI, N.; YAMAKUNI, K.; YANG, H. E. *et al.* 10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, potently activates PPAR γ and stimulates adipogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 459, n. 4, p. 597–603, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.154>

GOTOH, N.; NAGAO, K.; ISHIDA, H.; NAKAMITSU, K.; YOSHINAGA, K.; NAGAI, T.; BEPPU, F.; YOSHINAGA-KIRIAKE, A.; WATANABE, H.; YANAGITA, T. Metabolism of natural highly unsaturated fatty acid, tetracosahexaenoic acid (24:6n-3), in C57BL/KsJ-db/db mice. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 12, p. 1597–1607, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5650/jos.ess18167>

GREENE, M. E.; BLUMBERG, B.; MCBRIDE, O. W.; YI, H. F.; KRONQUIST, K.; KWAN, K.; HSIEH, L.; GREENE, G.; NIMER, S. D. Isolation of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma cDNA: Expression in Hematopoietic Cells and Chromosomal Mapping. **Gene Expression**, v. 4, p. 281–299, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6134382/>

GROEGER, A. L.; CIPOLLINA, C.; COLE, M. P.; WOODCOCK, S. R.; BONACCI, G.; RUDOLPH, T. K.; RUDOLPH, V.; FREEMAN, B. A.; SCHOPFER, F. J. Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 6, p. 433–441, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.367>

GRYGIEL-GÓRNIK, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications - A review. **Nutrition Journal**, v. 13, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>

HAFFNER, C. D.; LENHARD, J. M.; MILLER, A. B.; McDOUGALD, D. L.; DWORNIK, K.; ITTOOP, O. R. *et al.* Structure-Based Design of Potent Retinoid X Receptor α Agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 2010–2029, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm030565g>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HARMON, G. S.; LAM, M. T.; GLASS, C. K. PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6321–6340, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr2001355>

HOROWITZ, S.; TRIEVEL, R. C. Carbon-oxygen hydrogen bonding in biological structure and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, p. 41576–41582, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.418574>

HU, F. B.; MANSON, J. A. E.; WILLETT, W. C. Types of Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 5–19, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07315724.2001.10719008>

HUANG, Y. S.; HUANG, W. C.; LI, C. W.; CHUANG, L. Te. Eicosadienoic acid differentially modulates production of pro-inflammatory modulators in murine macrophages. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, p. 85–94, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0924-0>

ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, p. 645–650, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/347645a0>

ITOH, T.; FAIRALL, L.; AMIN, K.; INABA, Y.; SZANTO, A.; BALINT, B. L.; NAGY, L.; YAMAMOTO, K.; SCHWABE, J. W. R. Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 15, n. 9, p. 924–931, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1474>

ITOH, T.; MUROTA, I.; YOSHIKAI, K.; YAMADA, S.; YAMAMOTO, K. Synthesis of docosahexaenoic acid derivatives designed as novel PPAR γ agonists and antidiabetic agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 98–108, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.07.074>

ITOH, T.; TOMIYASU, A.; YAMAMOTO, K. Efficient synthesis of the very-long-chain n-3 fatty acids, tetracosahexaenoic acid (C24:6n-3) and tricosahexaenoic acid (C23:6n-3). **Lipids**, v. 46, n. 5, p. 455–461, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3541-5>

JAMES, M. J.; CLELAND, L. G. Dietary n-3 Fatty Acids and Therapy for Rheumatoid Arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 27, n. 2, p. 85–97, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0049-0172\(97\)80009-1](https://doi.org/10.1016/s0049-0172(97)80009-1)

JONES, D. C.; DING, X.; ZHANG, T. Y.; DAYNES, R. A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Negatively Regulates T-bet Transcription Through Suppression of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 1, p. 196–203, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.196>

JU, Z.; SU, M.; HONG, J.; ULLAH, S.; KIM, E. La; ZHAO, C. H.; MOON, H. R.; KIM, S.; JUNG, J. H. Design of PPAR- γ agonist based on algal metabolites and the endogenous ligand 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1192–1201, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.08.090>

KELLER, H.; DREYER, C.; MEDIN, J.; MAHFOUDI, A.; OZATO, K.; WAHLI, W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 2160–2164, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.6.2160>

KHAN, S. U.; LONE, A. N.; KHAN, M. S.; VIRANI, S. S.; BLUMENTHAL, R. S.; NASIR, K.; MILLER, M.; MICHOS, E. D.; BALLANTYNE, C. M.; BODEN, W. E.; BHATT, D. L. Effect of omega-3 fatty acids on cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis. **EClinicalMedicine**, v. 38, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100997>

KIEZEL-TSUGUNOVA, M.; KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Fatty acids and related lipid mediators in the regulation of cutaneous inflammation. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 1, p. 119–129, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20160469>

KLIEWER, S. A.; LENHARD, J. M.; WILLSON, T. M.; PATEL, L.; MORRIS, D. C.; LEHMANN, J. M. A Prostaglandin J2 Metabolite Binds Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Promotes Adipocyte Differentiation. **Cell**, v. 83, p. 813–819, 1995. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90194-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90194-9)

KLIEWER, S. A.; SUNDSETH, S. S.; JONES, S. A.; BROWN, P. J.; BRUCE, G.; KOBLE, C. S.; DEVCHAND, P.; WAHLI, W.; WILLSON, T. M.; LENHARD, J. M.; LEHMANN, J. M. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, p. 4318–4323, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4318>

KREMER, J. M. n-3 Fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 349S–351S, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.349s>

KRISHNAMOORTHY, S.; RECCHIUTI, A.; CHIANG, N.; FREDMAN, G.; SERHAN, C. N. Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving MicroRNAs. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 5, p. 2018–2027, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.028>

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, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/816856>

LAFONT, V.; ARMSTRONG, A. A.; OHTAKA, H.; KISO, Y.; MARIO AMZEL, L.; FREIRE, E. Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 69, n. 6, p. 413–422, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00519.x>

LEFILS-LACOURTABLAISE, J.; SOCORRO, M.; GÉLOËN, A.; DAIRA, P.; DEBARD, C.; LOIZON, E.; GUICHARDANT, M.; DOMINGUEZ, Z.; VIDAL, H.; LAGARDE, M.; BERNOUD-HUBAC, N. The Eicosapentaenoic Acid Metabolite 15-Deoxy- δ 12,14-Prostaglandin J3 Increases Adiponectin Secretion by Adipocytes Partly via a PPAR γ -Dependent Mechanism. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063997>

LEI, J.; HASEGAWA, H.; MATSUMOTO, T.; YASUKAWA, M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α and γ Agonists Together with TGF- β Convert Human CD4+CD25⁺ T Cells into Functional Foxp3⁺ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7186–7198, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001437>

LEWIS, S. N.; BASSAGANYA-RIERA, J.; BEVAN, D. R. Virtual Screening as a Technique for PPAR Modulator Discovery. **PPAR Research**, v. 2010, p. 1–10, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2010/861238>

LI, Y.; ZHANG, J.; SCHOPFER, F. J.; MARTYNOWSKI, D.; GARCIA-BARRIO, M. T.; KOVACH, A.; SUINO-POWELL, K.; BAKER, P. R. S.; FREEMAN, B. A.; CHEN, Y. E.; XU, H. E. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR γ . **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 15, n. 8, p. 865–867, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1447>

LIAO, Z.; DONG, J.; WU, W.; YANG, T.; WANG, T.; GUO, L.; CHEN, L.; XU, D.; WEN, F. Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR γ /NF- κ B pathway. **Respiratory Research**, v. 13, p. 1–11, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-110>

LIBERATO, M. V. *et al.* Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and Pan-PPAR partial agonists. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036297>

MAKINO, Y.; MIYAHARA, T.; NITTA, J.; MIYAHARA, K.; SEO, A.; KIMURA, M.; SUHARA, M.; AKAI, A.; AKAGI, D.; YAMAMOTO, K.; HOSHINA, K. Proresolving lipid mediators resolvin D1 and protectin D1 isomer attenuate neointimal hyperplasia in the rat carotid artery balloon injury model. **Journal of Surgical Research**, v. 233, p. 104–110, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.07.049>

MALAPAKA, R. R. V *et al.* Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 183–195, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.294785>

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHÜTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, p. 835–839, 1995.

MARION-LETELLIER, R.; SAVOYE, G.; GHOSH, S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. **European Journal of Pharmacology**, v. 785, p. 44–49, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.004>

MARTIN, C. A.; DE ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; DE SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev. Nutr**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000600011>

MICHALIK, L. *et al.* International union of pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 726–741, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.5>

MONTANARI, R. *et al.* Crystal structure of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand binding domain complexed with a novel partial agonist: A new region of the hydrophobic pocket could be exploited for drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7768–7776, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm800733h>

MURAKAMI, M. Lipid Mediators in Life Science. **Experimental Animals**, v. 60, n. 1, p. 7–20, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1538/expanim.60.7>

MURALIKUMAR, S.; VETRIVEL, U.; NARAYANASAMY, A.; DAS, U. N. Probing the intermolecular interactions of PPAR γ -LBD with polyunsaturated fatty acids and their anti-inflammatory metabolites to infer most potential binding moieties. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0404-3>

NARALA, V. R.; SUBRAMANI, P. A.; NARASIMHA, V. R.; SHAIK, F. B.; PANATI, K. The role of nitrated fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in modulating inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 283–287, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.09.009>

NIEMAN, D. C.; SHANELY, R. A.; LUO, B.; MEANEY, M. P.; DEW, D. A.; PAPPAN, K. L. Metabolomics approach to assessing plasma 13- and 9-hydroxy-octadecadienoic acid and linoleic acid metabolite responses to 75-km cycling. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 1, p. 1–8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00092.2014>

NOLTE, R. T.; WISELY, G. B.; WESTIN, S.; COBB, J. E.; LAMBERT, M. H.; KUROKAWA, R.; ROSENFELDK, M. G.; WILLSON, T. M.; GLASS, C. K.; MILBURN, M. V. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Nature**, v. 395, p. 137–143, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/25931>

NOVAK, T. E.; BABCOCK, T. A.; JHO, D. H.; HELTON, W. S.; ESPAT, N. J.; JOSEPH, N. NF-B inhibition by-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-transcription. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 284, p. 84–89, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00077.2002.--3>

NUNES, V. S.; ABRAHÃO, O.; ROGÉRIO, A. P.; SERHAN, C. N. ALX/FPR2 Activation by Stereoisomers of D1 Resolvins Elucidating with Molecular Dynamics Simulation. **The Journal**

of **Physical Chemistry B**, v. 127, n. 29, p. 6479–6486, 2023. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c01787>

PARUCHURI, S.; JIANG, Y.; FENG, C.; FRANCIS, S. A.; PLUTZKY, J.; BOYCE, J. A. Leukotriene E4 activates peroxisome proliferator-activated receptor γ and induces prostaglandin D2 generation by human mast cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 24, p. 16477–16487, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M705822200>

POULSEN, L. la C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 6, p. 631–639, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.003>

POWELL, W. S. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂: endogenous PPAR γ ligand or minor eicosanoid degradation product? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 6, p. 828–830, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci200318337>

PUHL, A. C. *et al.* Mode of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by luteolin. **Molecular Pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 788–799, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/mol.111.076216>

RENAUD, J. P.; ROCHEL, N.; RUFF, M.; VIVAT, V.; CHAMBON, P.; GRONEMEYER, H.; MORAS, D. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. **Nature**, v. 378, p. 681–689, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/378681a0>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.05.005>

RIVIER, M.; SAFONOVA, I.; LEBRUN, P.; GRIFFITHS, C. E. M.; AILHAUD, G.; MICHEL, S. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 6, p. 1116–1121, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00439.x>

ROYNETTE, C. E.; CALDER, P. C.; DUPERTUIS, Y. M.; PICHARD, C. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 139–151, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2003.07.005>

SANDE, D.; DE OLIVEIRA, G. P.; E. MOURA, M. A. F.; DE ALMEIDA MARTINS, B.; LIMA, M. T. N. S.; TAKAHASHI, J. A. Edible mushrooms as a ubiquitous source of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 125, p. 1–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108524>

SANTOS, H. O.; PRICE, J. C.; BUENO, A. A. Beyond fish oil supplementation: The effects of alternative plant sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids upon lipid indexes and cardiometabolic biomarkers - an overview. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 1–19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12103159>

SAPIEHA, P.; STAHL, A.; CHEN, J.; SEAWARD, M. R.; WILLETT, K. L.; KRAH, N. M. *et al.* 5-Lipoxygenase Metabolite 4-HDHA Is a Mediator of the Antiangiogenic Effect of ω -3

Polyunsaturated Fatty Acids. **Anti-Angiogenesis**, v. 3, n. 69, p. 1–12, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001571>

SARRAF, P.; MUELLER, E.; SMITH, W. M.; WRIGHT, H. M.; KUM, J. B.; AALTONEN, L. A.; CHAPELLE, A. D. La; SPIEGELMAN, B. M. Loss-of-Function Mutations in PPAR-gamma Associated with Human Colon Cancer. **Molecular Cell**, v. 3, p. 799–804, 1999.

SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. 15d-PGJ₂: The anti-inflammatory prostaglandin? **Clinical Immunology**, v. 114, n. 2, p. 100–109, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.09.008>

SCHOPFER, F. J.; CIPOLLINA, C.; FREEMAN, B. A. Formation and signaling actions of electrophilic lipids. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5997–6021, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr200131e>

Schrödinger Release 2020-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J.; LEVY, B. D. Lipid mediators in the resolution of inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 2, p. 1–20, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>

SERHAN, C. N.; CLISH, C. B.; BRANNON, J.; COLGAN, S. P.; CHIANG, N.; GRONERT, K. Novel Functional Sets of Lipid-derived Mediators with Antiinflammatory Actions Generated from Omega-3 Fatty Acids via Cyclooxygenase 2-Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Transcellular Processing. **J. Exp. Med**, v. 192, n. 8, p. 1197–1204, 2000. Disponível em: <http://www.jem.org/cgi/content/full/192/8/1197>

SHANG, J.; BRUST, R.; GRIFFIN, P. R.; KAMENECKA, T. M.; KOJETIN, D. J. Quantitative structural assessment of graded receptor agonism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 44, p. 22179–22188, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1909016116>

SHANG, J.; BRUST, R.; MOSURE, S. A.; BASS, J.; MUNOZ-TELLO, P.; LIN, H.; HUGHES, T. S.; TANG, M.; GE, Q.; KAMENECKA, T. M.; KOJETIN, D. J. Cooperative cobinding of synthetic and natural ligands to the nuclear receptor PPAR γ . **eLife**, v. 7, p. 1–34, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.43320.001>

SULCINER, M. L.; GARTUNG, A.; GILLIGAN, M. M.; SERHAN, C. N.; PANIGRAHY, D. Targeting lipid mediators in cancer biology. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, p. 557–572, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9754-9>

TOBOREK, M.; LEE, Y. W.; GARRIDO, R.; KAISER, S.; HENNIG, B. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. **Am J Clin Nutr**, v. 75, p. 119–125, 2002.

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, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.001>

WAKU, T.; SHIRAKI, T.; OYAMA, T.; MORIKAWA, K. Atomic structure of mutant PPAR γ LBD complexed with 15d-PGJ₂: Novel modulation mechanism of PPAR γ /RXR α function by covalently bound ligands. **FEBS Letters**, v. 583, n. 2, p. 320–324, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.017>

WAKU, T.; SHIRAKI, T.; OYAMA, T.; FUJIMOTO, Y.; MAEBARA, K.; KAMIYA, N.; JINGAMI, H.; MORIKAWA, K. Structural Insight into PPAR γ Activation Through Covalent Modification with Endogenous Fatty Acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 1, p. 188–199, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.039>

WAKU, T.; SHIRAKI, T.; OYAMA, T.; MAEBARA, K.; NAKAMORI, R.; MORIKAWA, K. The nuclear receptor PPAR γ individually responds to serotonin-and fatty acid-metabolites. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 29, n. 19, p. 3395–3407, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.197>

WANG, L. *et al.* Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): A review. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 73–89, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.018>

WÄRNMARK, A.; TREUTER, E.; WRIGHT, A. P. H.; GUSTAFSSON, J. Å. Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 10, p. 1901–1909, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/me.2002-0384>

WEIKUM, E. R.; LIU, X.; ORTLUND, E. A. The nuclear receptor superfamily: a structural perspective. **Protein Science**, v. 27, n. 11, p. 1876–1892, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.3496>

WESTERGAARD, M. *et al.* Expression and Localization of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Nuclear Factor κ B in Normal and Lesional Psoriatic Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 5, p. 1104–1117, 2003. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12536.x>

XU, H. E. *et al.* Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. **PNAS**, v. 98, n. 24, p. 13919–13924, 2001. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.241410198

YANG, W.; RACHEZ, C.; FREEDMAN, L. P. Discrete Roles for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor and Retinoid X Receptor in Recruiting Nuclear Receptor Coactivators. **Molecular And Cellular Biology**, v. 20, n. 21, p. 8008–8017, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.20.21.8008-8017.2000>

YAQOOB, P.; PALA, H. S.; CORTINA-BORJA, M.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER², P. C. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **European Journal of Clinical**

Investigation, v. 30, p. 260–274, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2000.00623.x>

YU, C.; CHEN, L.; LUO, H.; CHEN, J.; CHENG, F.; GUI, C.; ZHANG, R.; SHEN, J.; CHEN, K.; JIANG, H.; SHEN, X. Binding analyses between Human PPAR γ -LBD and ligands: Surface plasmon resonance biosensor assay correlating with circular dichroic spectroscopy determination and molecular docking. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 2, p. 386–397, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03937.x>

ZHAO, Y.; CALON, F.; JULIEN, C.; WINKLER, J. W.; PETASIS, N. A.; LUKIW, W. J.; BAZAN, N. G. Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPAR γ -mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015816>

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 8, p. 915–925, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.01.007>

APÊNDICE A – Artigo científico

Molecular Dynamics Simulations of Omega-3 and Omega-6 Lipid Mediators as Partial Agonists of PPAR γ

Simulações de Dinâmica Molecular de Mediadores Lipídicos Ômega-3 e Ômega-6 como Agonistas Parciais do PPAR γ .

Fernando Freitas Siqueira Silva^a, Roberto Ribeiro Faria^{a,b}, Vinícius Schmitz Nunes^{a,c}, Odonório Abrahão Júnior^{a,*}

^a Laboratório de Química Computacional Medicinal do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Praça Manoel Terra, 330, 38015-050, Uberaba - MG, Brasil.

^b Instituto Federal de Minas Gerais – IFMG - 33805-488, Ribeirão das Neves - MG, Brasil.

^c Laboratório Nacional de Computação Científica – LNCC, 25651-075, Petrópolis - RJ, Brasil.

Abstract

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) are nuclear receptor proteins vital for metabolism, cell growth, cell differentiation, autoimmune diseases, and inflammation resolution. However, the activation mechanism by lipid-mediating agonists remains unclear. This study explores the molecular interactions and per-residue binding energy calculations between the PPAR γ subtype and four lipid mediators from n-3 and n-6 fatty acids: AA, DHA, 4HDHA, and 9HODE, identified as natural PPAR γ agonists. These findings reveal the intricate atomic-level interactions between particular residues and ligands, which are critical for determining agonistic activity. The most relevant residues were located in the loop, sheets, and H3 helix of the receptor. Positively charged residues such as K263, K265, R280, and R288 were prominent, with hydrophobic residues I281, L330, I341, and C285 also playing significant roles in ligand affinity. Residues R280, Y327, S342, and K367 were notable for persistent hydrogen bonds. The lipid carboxylate groups form stronger contacts through hydrogen bonds and electrostatic interactions than the hydroxyl groups of oxidized lipids. This study sheds new insights on the molecular mechanisms underlying the preferences of these lipid mediators, aiding the development of safer and more effective PPAR γ -targeted therapies inspired by the agonistic properties of its endogenous ligands.

Keywords: Molecular Dynamics; PPAR γ ; PUFAs; Omega-3; Omega-6; Lipid Mediators.

1. Introduction

Lipid mediators (LMs) are signaling molecules derived from fatty acids that are typically exported to the extracellular space where they bind to specific G protein-coupled receptors (GPCRs) on the cell surface.¹ However, an increasing body of research has indicated that LMs from various classes can also function as agonists of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), members of the nuclear receptor (NR) superfamily.² Within this superfamily, three subtypes of PPARs have been identified: PPAR α , PPAR β/δ , and PPAR γ .³

Since, in the mid-1990s, PPAR γ was determined to be a molecular target of the insulin-sensitizing and antidiabetic agent thiazolidinediones (TZDs), several other physiological functions of the receptor, such as its role in immunomodulation and cancer, have been discovered and explored.⁴⁻⁹ However, severe adverse effects have been associated with receptor activation by highly potent ligands or full agonists such as TZDs.¹⁰⁻¹¹ Therefore, research has focused on studying and exploring natural endogenous ligands that often act as partial agonists. Although partial agonists have reduced potency or efficacy for receptor activation, leading to a more attenuated physiological response, such activation is often associated with fewer undesirable events.¹²⁻¹⁴

The PPAR γ ligand-binding pocket (LBP) is a bulky cavity that is larger than the pockets of other NRs and can accommodate many different ligands in different positions.¹⁵ Among the physiologically relevant ligands of PPARs, more hydrophobic, saturated fatty acids are preferred by PPAR α and, to a lesser extent, by PPAR β/δ , while PPAR γ prefers more hydrophilic lipids, as prostaglandins, leukotrienes, phospholipids and polyunsaturated fat acids (PUFAs), including essential fat acids from the omega-3 (n-3) and omega-6 (n-6) series.^{3,16,17} Diets rich in essential fatty acids are linked to several health benefits, including inflammatory and autoimmune diseases, and the prevention and treatment of cardiovascular diseases.¹⁸⁻²¹ Additionally, inflammatory conditions create a microenvironment that promotes enzymatic and nonenzymatic oxidation of PUFAs, to molecules such as hydroxy, oxo, and nitro-fatty acids, resulting in an increase in electrophilic fatty acids levels and providing additional intracellular ligands to PPAR γ .^{3,22} Many metabolic and inflammatory events are regulated by a population of enzymes and other redox potential-dependent proteins that are responsive to electrophilic lipid derivatives.¹⁷

Computational studies involving PPAR γ and its different natural and synthetic agonists, especially docking and molecular dynamics, have revealed specific ligand-residue interactions and binding affinity between these ligands and the the receptor.²³⁻²⁹ In this study, Molecular Dynamics (MD) calculations were used to analyze the molecular interactions between PPAR γ and four endogenous LMs identified as partial receptor agonists: arachidonic

acid (AA, n-6), docosahexaenoic acid (DHA, n-3), 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9HODE, n-6), and 4-hydroxydocosahexaenoic acid (4HDHA, n-3). 4HDHA and 9HODE are hydroxylated (oxidized) metabolites derived from DHA and AA, respectively, which are stronger activators of PPAR γ than their nonoxidized counterparts. Moreover, the serum concentrations of 4HDHA and 9HODE in mammalian models were higher than those of other AGE oxidized metabolites and were consistent with the levels required for PPAR γ activation.^{15,30-32} Using these criteria, these four fatty acids were selected to compare PPAR γ interactions with oxidized and nonoxidized LMs, understand the agonistic mechanisms of these lipids at the molecular and atomic levels, and support the development of agonists inspired by the natural resolution of inflammation, while minimizing the adverse effects that persist in many current therapies targeting PPAR γ .

2. Methods

2.1 Protein model and ligands preparation

A model file for the PPAR γ ligand-binding domain (LBD) was constructed from three crystal structures (PDB ID codes: 3DZU, 3DZY, and 3E00) using Modeller version 9.20.^{33,34} The quality assessment involved the generation of 50 models and the evaluation of each model using Ramachandran plots and ERRAT.³⁵

Ligands were designed using Maestro.³⁶ Their carboxylic acid groups remained deprotonated, consistent with the pH of 7.2–7.4.

2.2 Molecular docking

Molecular docking was conducted using the DockThor program to generate protein–ligand complexes for MD simulations. The grid box was configured to center the lipid mediator within the receptor binding site, with coordinates of -8.684, 24.634, and 14.025 for the x, y, and z axes, respectively. A discretization value of 0.2755 was assigned, resulting in 942,400 grid points. Default parameters were used for the genetic algorithm in DockThor.^{37,38}

2.3 Molecular dynamics simulations

MD simulations were employed to investigate the dynamic behavior, conformational changes, and molecular interactions of PPAR γ with ligands. Input preparation for all the complexes and apo-protein systems was performed using the CHARMM-GUI tool.³⁹ The ligands were parameterized using CGenFF.^{40,41} The complexes were constructed based on the ligand docking poses with the lowest total energy (Table S1, Supplementary Material). The water box dimensions were set at 100 Å $\times$ 80 Å $\times$ 60 Å with a 12 Å spacing between the protein and the boundary. K⁺ and Cl⁻ ions were added at a concentration of 0.15 M for system neutrality. The CHARMM36 force field was employed to model protein–ligand interactions.⁴²

The MD protocol included energy minimization using the steepest descent method with 10,000 steps to remove local atomic collisions, conducted in two stages, with and without restrictions on the protein and ligand atoms. The temperature was gradually increased from 50 to 310 K in the NVT ensemble over 500 ps of MD simulations with the restrained nonhydrogen atoms. Equilibration was achieved through 10 ns of NPT ensemble simulations at 310 K and 1 bar with a 1 fs time step. Production MD simulations were conducted in an NPT ensemble using the leapfrog algorithm with a 2 fs time step, recording conformations every 10 ps. The temperature was maintained at 310 K using a Nose-Hoover thermostat with a relaxation time of 0.1 ps, while the pressure was maintained at 1.0 bar using a Parrinello–Rahman barostat with a relaxation time of 10 ps and a compressibility of 4.5×10^{-6} (kJ.mol⁻¹nm⁻³)⁻¹.^{43,44} The Lincs algorithm was used to constrain all-bond stretching and bending motions. Short-range electrostatic and van der Waals interactions utilized a 1.1 nm cutoff, while long-range electrostatic contributions were determined using the particle mesh Ewald (PME) method.⁴⁵ GROMACS-2019.6 was employed for all simulations, with triplicate production runs for complex systems and a single 500 ns simulation for the apo form of PPAR γ .⁴⁶

To assess which residues were engaged in hydrogen bonding, the VMD Timeline Hydrogen Bonds was used to calculate the hydrogen bond frequencies during the simulations for each replica separately, using a donor–acceptor distance cut-off of 3.5 Å and a hydrogen-donor–acceptor angle cut-off of 30°. ⁴⁷ An additional calculation employing different distance and angle cut-offs was carried out for comparison using AMBER tool.⁴⁸ Results analysis was focused on interactions that occurred with a frequency $\geq 10\%$ (normalized to 0.1) in at least one of the replicas.

2.4 Molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area

To calculate the binding affinity, frames were collected at 0.2 ns intervals from 300 and 500 ns trajectories, resulting in 1500 and 2500 frames, respectively. Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area (MM/PBSA) binding free energy calculations were performed using the `g_mmpbsa` tool.^{49,50} The protocol closely followed the guidelines of the `g_mmpbsa` tutorials (https://rashmikumari.github.io/g_mmpbsa/Tutorial.html) with the temperature set to 310 K. This analysis assessed the relative affinities of PPAR γ receptor residues for the ligands.

3. Results and Discussion

3.1 Stability of the systems and global structural analysis

The RMSD (Root Mean Square Deviation) (Fig. 1) and RMSF (Root Mean Square Fluctuation) (Fig. 2) analysis of the protein backbone and alpha-carbon did not reveal significant differences in global structural variations among the PPAR γ apo-form and PPAR γ –ligand complexes. Throughout the simulation period, all the systems remained stable. Additionally, the analysis of the average gyration radius of the alpha carbons of the protein indicated subtle variations in PPAR γ compactness during the simulations, consistent with overall protein stability observed in the RMSD results (Figs. S1, Table S2; Supplementary Material).

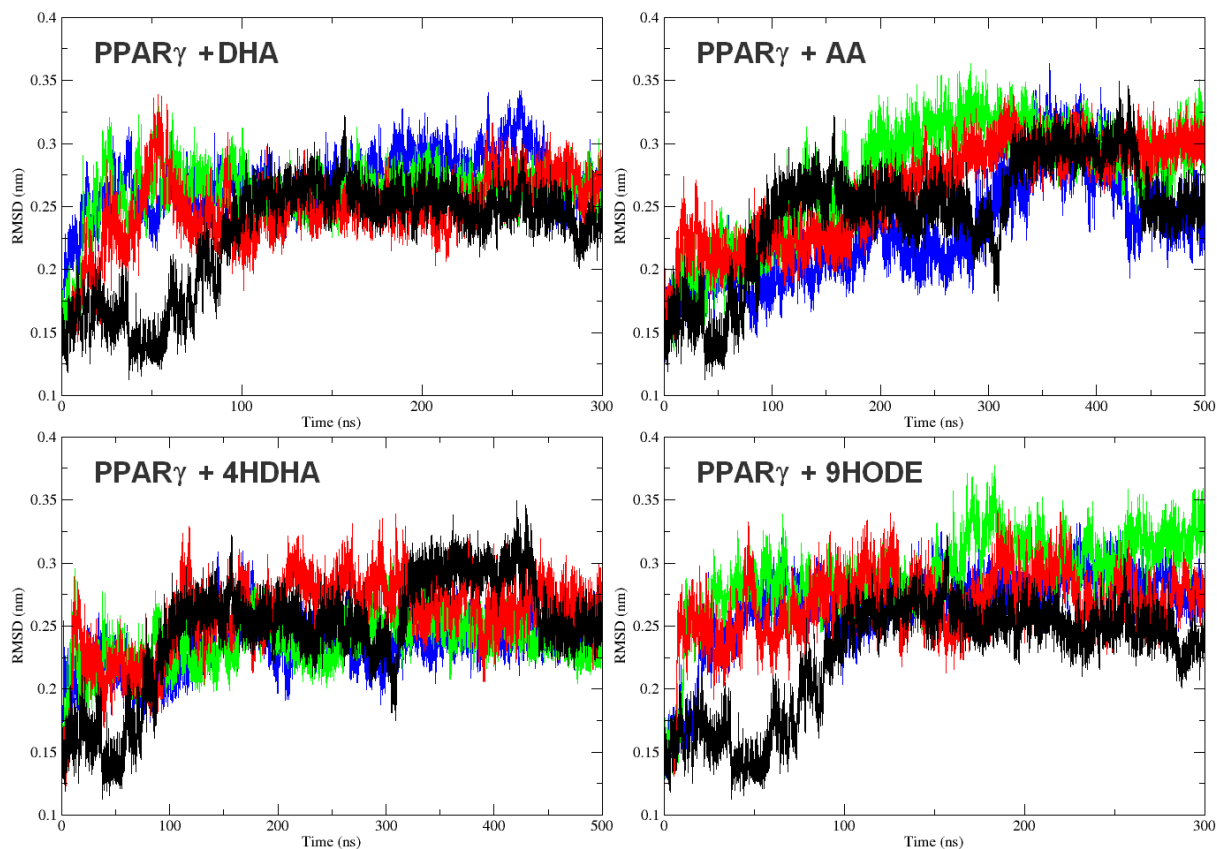


Figure 1. Root mean square deviation (RMSD) analysis of apo-PPAR γ and PPAR γ -ligand complexes. Simulations are depicted in different colors: the apo-system (black) and the complexed systems replicas r1 (red), r2 (green) and r3 (blue).

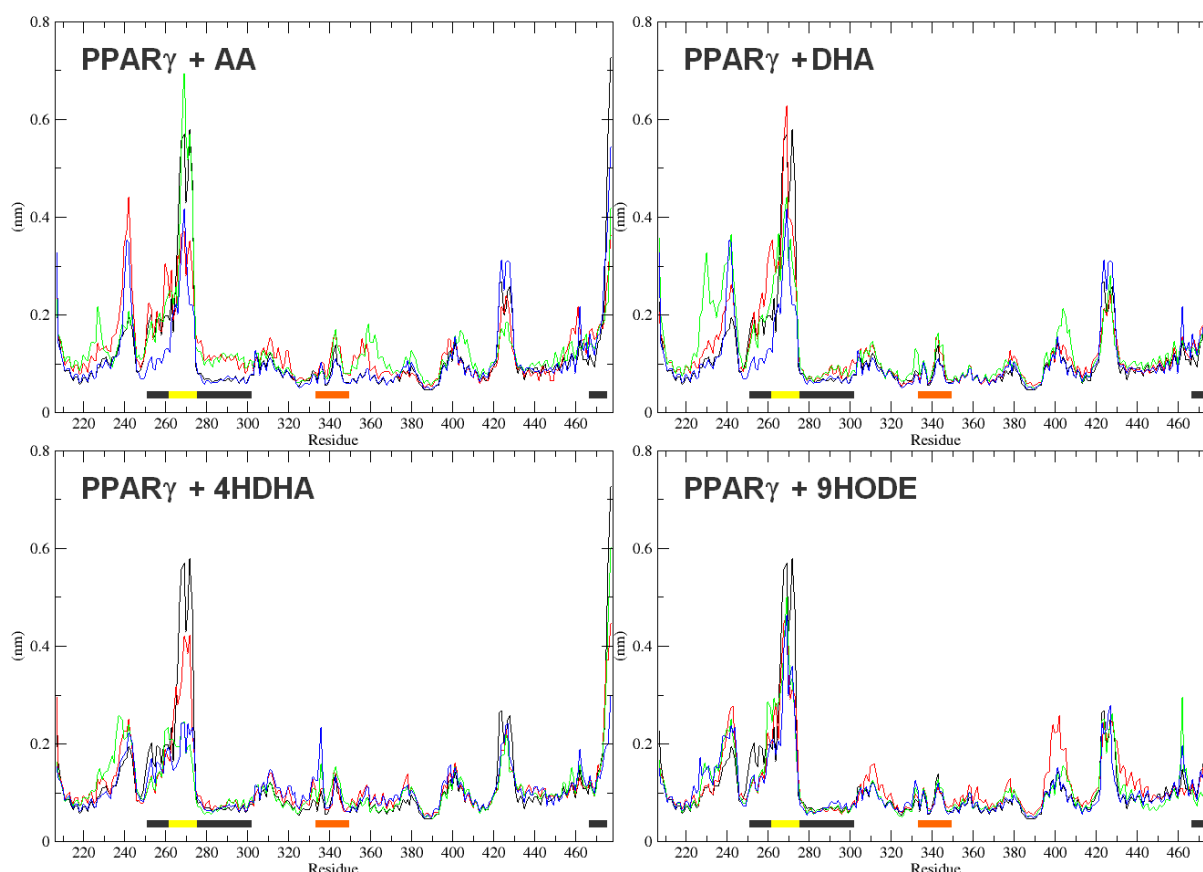


Figure 2. Root mean square fluctuation (RMSF) analysis of apo-PPAR γ and PPAR γ -ligand complexes. Simulations are depicted in different colors: the apo-system (black) and the complexed systems replicas r1 (red), r2 (green) and r3 (blue). The residue sequences of major regions in the protein are indicated by bars: from left to right, α -helices H2b, H3 and H12 (black bars), Ω -loop (yellow bar), β -sheet region (orange bar).

Higher local flexibility was observed in less-ordered structures such as the Ω -loop (from I262 to E276), which is consistent with the more dynamic nature of this region.⁵¹⁻⁵³ Other PPAR γ secondary structures that showed greater relevance in this work were helices H2a (from K230 to L237), H2b (M252 to K261), H3 (V277 to K301), H4–H5 (from L311 to S332), H6–H7 (from K358 to A376), H10–H11 (from L431 to T459), H12 (from P467 to Y473), and the β -sheet region (from M334 to T349). Snapshots taken at both the initial and final stages of each simulation are available in the Supplementary Material, Figure S2. The subtle differences among the system simulations may be attributed to specific interactions between the ligands and protein residues, influencing their ability to restrict or allow conformational changes. Therefore, a more detailed analysis of the interactions between the ligands and PPAR γ amino acids was conducted to elucidate potential sites for ligand recognition and affinity.

3.2 Hydrogen bonds

The results obtained from VMD and AMBER were highly comparable. The major residues engaged in hydrogen bonding with one or more specific ligands were K263 (Ω -loop), R280 (H3), R288 (H3), Y327 (H4-H5), and K367 (H6-H7), predominantly through their side chains, E343 (β -sheets) through its backbone, and K265 (Ω -loop), H266 (Ω -loop) and S342 (β -sheets) through their side chains and their backbones. Notably, the residues acted as bond donors in all the interactions. The frequency values obtained from VMD calculations are shown in Table 1. For comparison with values from AMBER, see Table S3 in the Supplementary Material.

Table 1. Hydrogen bond frequencies in the protein-ligand complexes simulations, according to VMD Timeline Hydrogen Bonds calculations.

Ligand	Simulation Replica	Residues	Hydrogen Bonds Frequency
AA ^a	r1	K265	0.23
		R288	0.15
		S342	0.49
		E343	0.11
	r2	R288	0.48
		S342	0.34
DHA ^b	r1	R288	0.38
		S342	0.77
	r2	Y327	0.86
		K367	0.68
	r3	Y327	0.77
		K367	0.73
4HDHA ^c	r1	Y327	0.58
		K367	0.56
	r2	H266	0.43
		R280	0.93
	r3	K265	0.10
		H266	0.48
9HODE ^d	r1	R280	0.91
		S342	0.82
	r2	E343	0.11
		K265	0.56
	r3	S342	0.60
		R280	0.21

^aArachidonic acid; ^bdocosahexaenoic acid; ^c4-hydroxydocosahexaenoic acid; ^d9-hydroxyoctadecadienoic acid.

3.3 Radial distribution function

Radial distribution function (RDF) analysis was employed to determine the functional groups of the ligands that were most likely to be involved in the observed hydrogen bonds. The calculations evaluated the average distance between the residues identified in the hydrogen bonds, the carboxylic carbons (C1 in all four ligands), and the carbon atoms to which the hydroxyl radicals were attached (C4 and C9 in 4HDHA and 9HODE, respectively).

The results for the AA and DHA ligands indicate that the residues exhibiting the highest hydrogen bond frequencies were also those with the shortest average distances to the carboxylate groups of the ligands throughout the simulation period (Fig. 3).

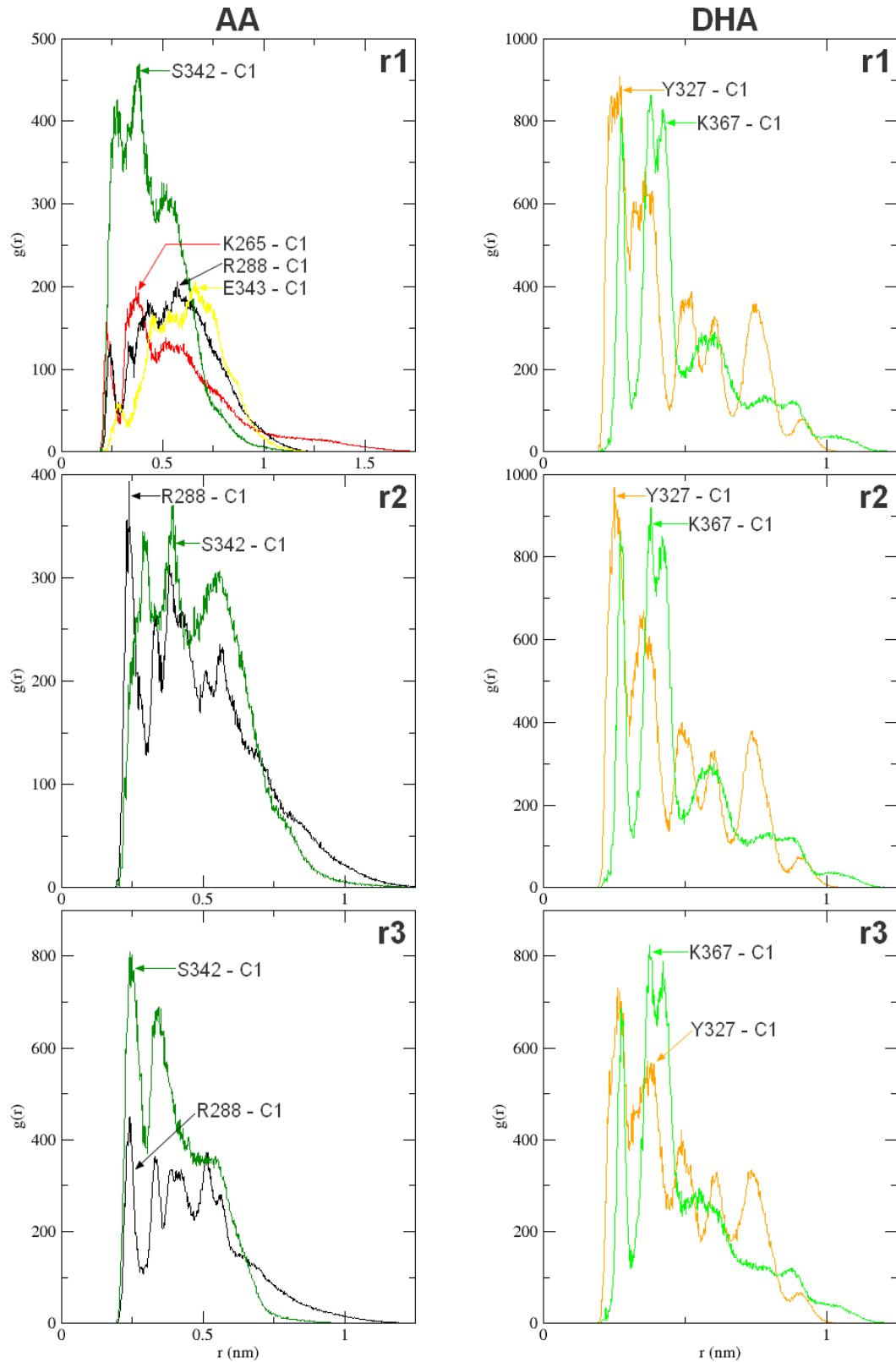


Figure 3. Average distances between carboxylate carbons (C1) in AA and DHA ligands and hydrogen-bonded residues were determined using RDF calculations. The x-axis represents the ligand's atom-to-residue distance (r), while the y-axis represents the $g(r)$ values, indicating the distribution and frequency of interactions during the simulation.

For the hydroxylated lipids 4HDHA and 9HODE, the distances from their carboxylate and hydroxyl groups to the residues were compared (Fig. 4). For the 4HDHA ligand, R280, H266, S342, and R288 were closer to the carboxylate moiety but also showed considerable proximity to the hydroxyl group, whereas K265 (r2) was nearly equidistant from both groups throughout the simulation. For 9HODE, residues R280, K265, and K263 were closer to the carboxylate group. This trend was also evident for S342 during r1; however, a distinct pattern emerged for r2, in which S342 showed a notably more substantial interaction peak with the hydroxyl radical than with the carboxylate group. Although its interaction with carboxylate was less prominent, it was slightly more frequent at shorter distances than its interaction with the hydroxyl groups. In r3, S342 demonstrated nearly equivalent distances from both functional groups, indicating a balanced interaction profile.

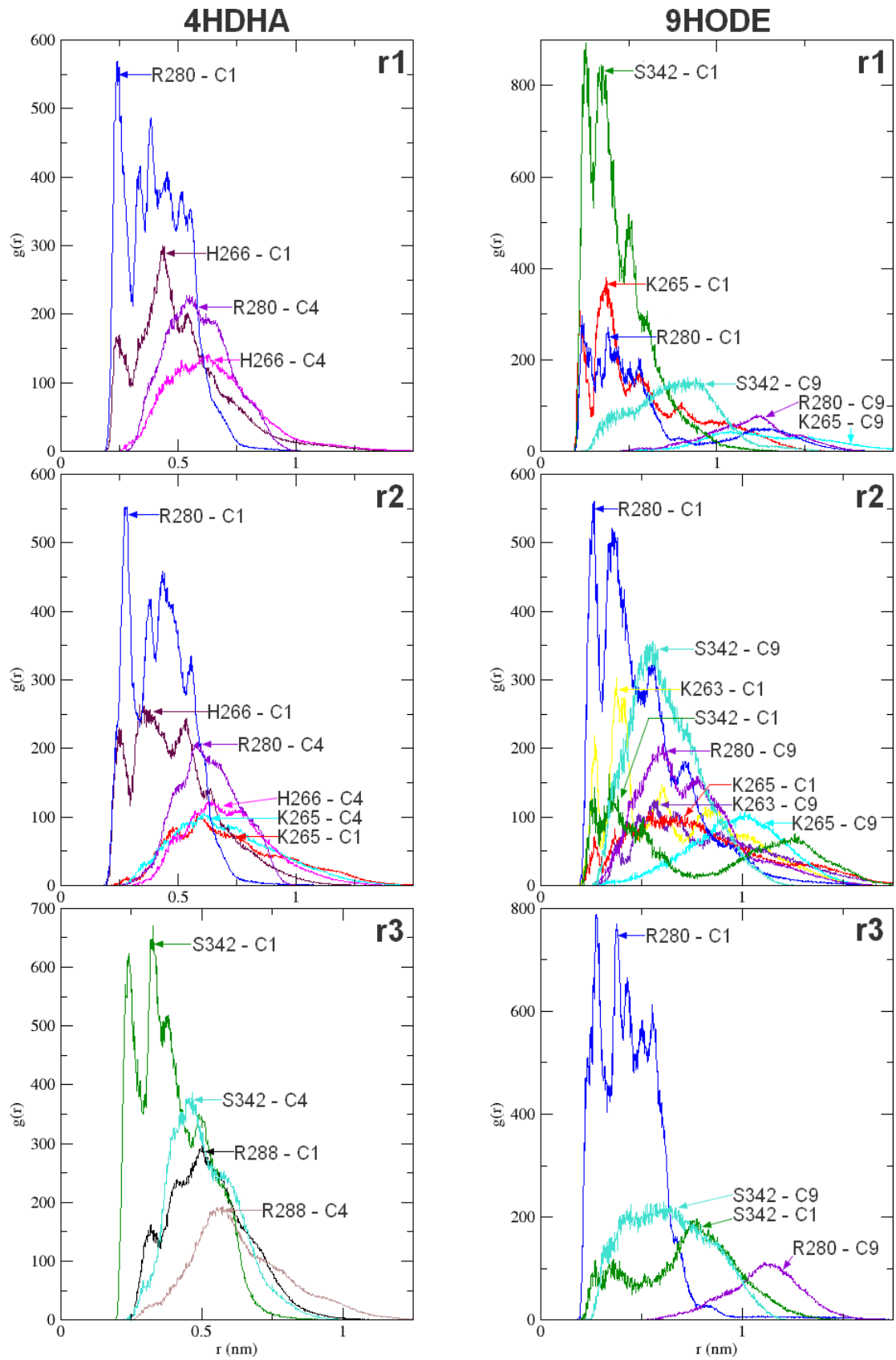


Figure 4. Average distances between the hydrogen bonded residues and carboxylate carbons (C1) and hydroxyl-attached carbons (C4 for 4HDHA and C9 for 9HODE) in the ligands.

Different positions of the organic groups in the hydrocarbon chains of modified fatty acid agonists such as 9HODE and 4HDHA may play a role in determining the specificity of the ligand that binds to PPAR γ . The RDF results indicated that K265, H266, R280, R288, and S342 were likely to form hydrogen bonds with both the carboxylate and hydroxyl groups of the 4HDHA and 9HODE ligands.

3.4 MM/PBSA and Per Residue Protein-Ligand Interactions

The interactions between the residues and ligands reveal how the chemical structures of the ligands affect their binding to PPAR γ . RDF analysis identified the key residues engaged in hydrogen bonding, whereas MM/PBSA calculations elucidated the energetic aspects, highlighting the significance of the positively charged residues.

MM/PBSA calculations revealed that positively charged residues exhibited the most negative total binding energies (Table S4, Supplementary Material), which could be attributed to their stronger electrostatic interactions with the anionic polar heads of lipids and/or ion–dipole interactions with hydroxyl radicals. The residues that displayed the more favorable binding energy (≤ -4.5 kcal/mol): R288 (H3); K263 (Ω -loop) and K265 (Ω -loop); K232 (H2), K261 (H2b) and R280 (H3); K275 (Ω -loop) and K457 (H10-H11); and K367 (H6-H7).

Although the electrically neutral residues did not exhibit energy values as favorable as those of the positive residues, many of them participated in extensive networks of hydrophobic and polar interactions with various natural and synthetic PPAR γ agonists, playing crucial roles in the affinity of fatty acids, especially those with long hydrocarbon tails that might extend deep into the receptor pocket.⁵⁴⁻⁵⁸ F264 and H266 from the Ω -loop, I281 and C285 from H3, Y327 and L330 from H4-H5, I341, and M348 from the β -sheets region, and M364 from H6-H7 showed the lowest total binding energy values (≤ -1 kcal/mol) among the noncharged residues in at least one simulation replica (Table S5, Supplementary material).

3.5 Comparative analysis of hydrogen bonding, RDF, and per residue MM/PBSA

Typical PPAR γ full agonists, such as TZDs, stabilize a critical protein surface for coregulator recognition, activation function 2 (AF-2), interacting with H12 via direct or water-mediated contact with the Y473 residue.⁵⁸⁻⁶¹ Conversely, many studies have shown that partial agonists from different chemical classes do not interact directly with H12 but differentially stabilize other regions of the binding pocket of PPAR γ , as the H3 and the β -sheets.⁶² Situated

at the entrance to the binding site, the highly flexible Ω -loop also plays a pivotal role in PPAR γ activation, by allowing ligands, particularly partial agonists, to enter without significantly changing the overall structure of the LBD.⁵²

In this study, most of the residues presenting stronger and more frequent interactions with the ligands belonged to these three regions (K263, F264, K265, H266, and K275 from the Ω -loop; R280, I281, C285, and R288 from H3; and I341, S342, E343, and M348 from the β -sheets). From hydrogen bonding and MM/PBSA analysis, together with the polar or nonpolar character of these residues, we can conclude that the Ω -loop interacted with the ligands primarily via electrostatic contacts and hydrogen bonds, and the β -sheet region primarily via hydrogen bonds and hydrophobic interactions, while H3 showed these three interaction types nearly equivalently.

The findings strongly corroborate with previous studies demonstrating that PPAR γ partial agonists, located between H3 and the β -sheets region, usually form a combination of hydrogen bonds with the backbone amide of S342 (β -sheet), electrostatic interactions with R288 (H3), and extensive van der Waals interactions with I341 (β -sheet) and C285 (H3).^{16,57} Residues from the H2, H2b, H4-H5, H6-H7, and H10-H11 regions, although fewer in number, also played crucial roles in interactions with our lipids. Fig. 5 shows the major apolar, polar, and charged residues involved in the most favorable contacts with the respective ligands within the PPAR γ binding site, according to MM/PBSA and hydrogen bonding analyses.

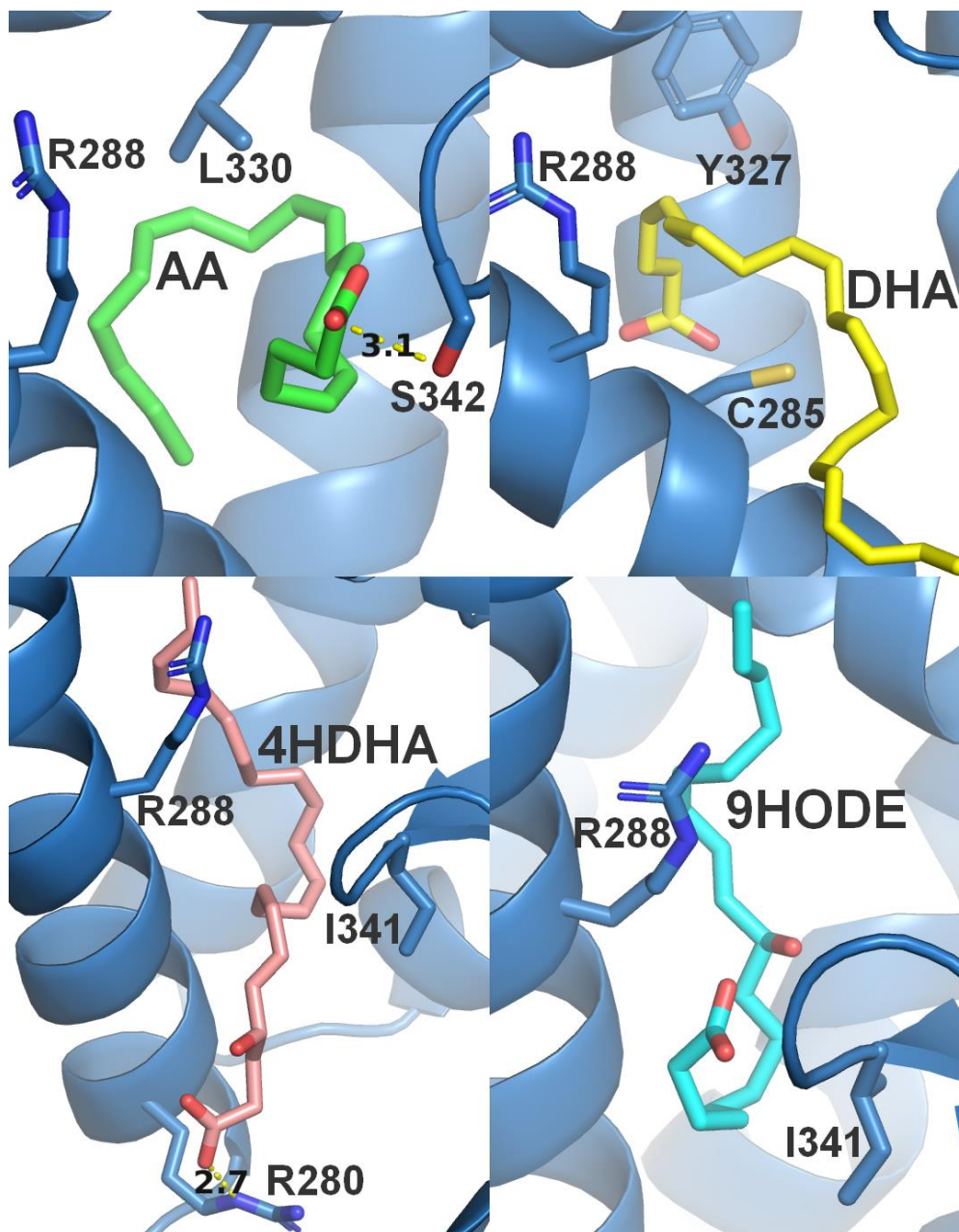


Figure 5. Ligands and interacting residues in PPAR γ binding site: MM/PBSA and hydrogen bonding analysis. S342 forms a hydrogen bond with AA carboxylate, while R280 interacts with 4HDHA carboxylate via a salt bridge (both interactions are represented by yellow dashed lines).

The R288 residue stood out prominently, exhibiting the lowest total binding energy across all three simulation replicates for AA and DHA and two of the three replicates for both 4HDHA (r2 and r3) and 9HODE (r1 and r3) (Table S4, Supplementary Material). This finding is consistent with that of a previous study that employed a similar approach.⁶³ Its location in H3, at the center of the ligand-binding site,⁶² allows the residue to establish both electrostatic

and extensive hydrophobic interactions with the ligands, facilitated by its long and flexible side chains.^{13,56,57,64-66}

Since R288 did not engage in any hydrogen bonds with 4HDHA and 9HODE within the 3.5 Å cut-off, a new RDF analysis was employed to further elucidate the relationship between the oxygenated groups of 4HDHA and 9HODE and R288 (Fig. 6). In simulations r1 and r2 with 4HDHA, the residue remained closer to the hydroxyl group than to the carboxylate group, albeit with subtle interaction patterns. In r3, where R288 exhibited the lowest binding energy in our study (-8.3 kcal/mol), shorter distances were observed to the carboxylate, yet prominent contacts were also established with the hydroxyl, indicating favorable interactions with both groups. For 9HODE, in r2, and especially in r3, R288 established significantly greater contact with the hydroxyl group than with the carboxylate group, whereas, in r1, the residue remained slightly closer to the carboxylate group, albeit with prominent peaks in both groups.

The side chain mobility of R288 is crucial for the adaptation of PPAR γ to different ligands.^{15,52} Furthermore, studies involving mutant receptors, where R288 is replaced by histidine (R288H), commonly found in colon cancers, demonstrated reduced affinity of PPAR γ for various fatty acid-derived agonists and increased movement of H3, both contributing to reduced receptor activity.^{17,31,67}

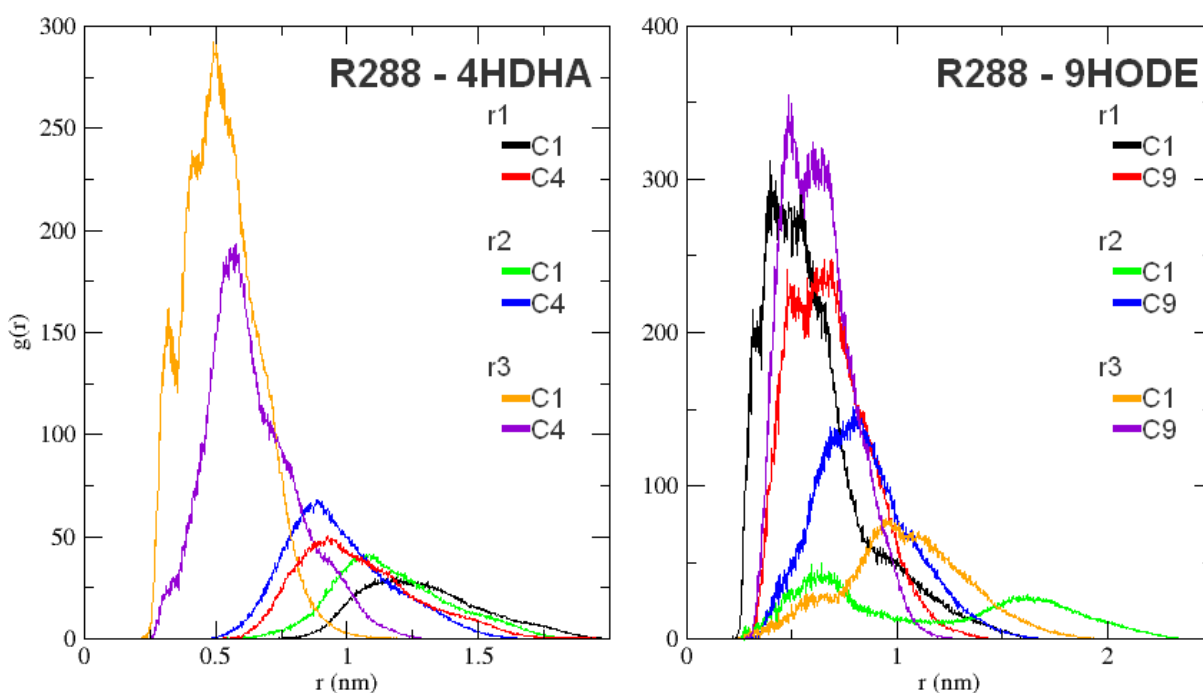


Figure 6. Proximity of the R288 residue to polar groups carboxylate and hydroxyl in 4HDHA and 9HODE ligands, according to RDF calculations.

Other positively charged residues, notably R280 and K367, and, to a lesser extent, K265, frequently showed highly negative vacuum potential energies, indicating their propensity to form hydrogen bonds. However, their total binding energies were less favorable than those observed for R288 (Table S6, Supplementary Material). This discrepancy in behavior among these positive residues can be attributed to the higher polar solvation energies typically exhibited by R280, K367, and K265.

Previous studies have shown that R280 plays a fundamental role in PPAR γ binding to many agonists via hydrogen bonds and electrostatic and hydrophobic interactions.^{65,68,69} The highly favorable contacts of arginine residues with anionic agonists may be better understood through quantum mechanical calculations, considering the resonance caused by electronic delocalization in the positively charged guanidinium moiety and the carboxylate groups of the ligands. Lysine residues, namely K263, K265, and K367, are also well-documented as pivotal participants in polar and electrostatic interactions with PPAR γ ligands.^{62,65,69,70} K263 and K265 might contribute significantly to the Ω -loop and H2b stabilization.^{58,64,65,71} In our simulations, K367 and Y327 were engaged in persistent hydrogen bonding with DHA. Previous structural and molecular docking studies have demonstrated the critical role of K367 in synergism with Y327 in establishing essential hydrogen bonds with hydroxy- and oxo-fatty acids derived from DHA and EPA and that the specific positioning of these amino acid side chains significantly affects ligand specificity to the receptor.^{16,17,31}

C285 stood out as the neutral residue with binding energy ≤ -1.3 kcal/mol in all the simulations with the four ligands (Table S5, Supplementary material). Several structural studies have demonstrated that the covalent coupling of C285 with modified lipids such as oxo- and nitro-fatty acids is crucial for PPAR γ activation.^{15,17,72} Noncovalent interactions with these lipids are associated with different conformations of the Ω -loop and distinct degrees of receptor activity (strong or weak). Moreover, the amino acid side chains around C285 rearranged to the active conformation after covalent linkage.^{64,73,74} This residue can also form a narrow hydrophobic tunnel for ligand binding, along with I326 and L330.^{75,76} A similar behavior might be the case here, since L330 and, to a lesser extent I341, also stood out with relatively favorable energies in all simulations, and I281 in all DHA, 4HDHA, and 9HODE simulations, indicating a likely synergism between C285 and these hydrophobic residues.

Residues F264, H266, Y327, M348, and M364 often exhibit ligand-specific and subtle energetic contributions. In the r1 and r2 simulations with DHA, Y327 displayed the lowest binding energy values (approx. -1.0 kcal/ mol), which is consistent with the hydrogen bond frequencies in these replicas. Interestingly, these were the same replicas, in which DHA showed the most favorable interaction energy with C285. The side chain of Y327 catalyzes the

formation of covalent bonds between C285 and oxo-fatty acids.¹⁵ In addition to the previously discussed role of Y327 with K267, our findings may further elucidate the synergistic behavior between Y327 and C285, by which persistent hydrogen bonds between Y327 and the ligand may partially restrict the latter movement, favoring its interaction with C285.

Although S342 did not exhibit any significant interaction energy in the MM/PBSA calculations, it emerged as a crucial hydrogen bond donor for AA, 4HDHA, and 9HODE. Previous structural studies have underscored the role of the hydrogen bonding of S342 with oxidized fatty acids, such as 13HODE (a 9HODE regioisomer).^{13,57,64} Docking and MD studies further demonstrated the bonding interactions of S342, extending its involvement to nonoxidized fatty acids within the ligand-binding pocket and emphasizing its significance in stabilizing PPAR γ partial agonists.^{27,77}

Molecular Dynamics calculations are applied to the models of ML-PPAR γ complexes in biological fluids and have advanced, allowing for the exploration of properties and characteristics that increasingly and closely resemble related experimental observations.^{11,78} However, one of the greatest challenges in obtaining structural information on the interaction of LMs with PPAR γ is the immense diversity and conformational freedom of ligands within the enormous binding site.^{16,52} Using a range of analytical methods, we detailed the specific interactions between PPAR γ residues. Our in-depth analysis of these interactions provided valuable insights into the molecular mechanisms underlying the pivotal connections between PPAR γ and these lipid mediators.

Collectively, these findings enhance the understanding of PPAR γ -ligand interactions, paving the way for future research endeavors and potential therapeutic developments targeting the essential residues for molecular recognition and affinity. As the intricate mechanisms governing these interactions are elucidated, the therapeutic potential of these insights may be harnessed more effectively.

4. Conclusions

In this study, Molecular dynamics calculations were employed to evaluate the interactions of PPAR γ protein with four of its natural, endogenous partial agonists from the n-3 and n-6 fatty acid series: AA, DHA, 4HDHA, and 9HODE. This comprehensive analysis sheds light on the intricate interplay between the receptor and its ligands. Specific amino acid residues, primarily from the protein's H3, Ω -loop, and β -sheet regions, and to a lesser extent from the H2a, H2b, H4-H5, H6-H7, H10-H11, and H12 regions, were found to be crucial for

ligand interactions. The analysis revealed variations in the number, strength, and preferences of hydrogen bonding between PPAR γ and the different ligands. Residues R280, Y327, S342, and K367 engage in high-frequency hydrogen bonding with particular ligands. The MM/PBSA approach highlighted positively charged residues, such as K263, K265, R280, and particularly R288, as most energetically favorable for ligand binding. Residues with more hydrophobic side chains, such as I281, L330, I341, and especially C285, also presented favorable energy values and played significant roles in the interactions with different ligands. RDF calculations showed that carboxylates in the anionic polar heads of lipids are most probably involved in more persistent and stronger contacts, particularly hydrogen bonds, with the highlighted residues. However, some residues, such as K265, and mainly R288 and S342, demonstrated a more balanced interaction profile between the carboxylate and hydroxyl groups during the simulations with the oxidized ligands.

The residues exhibiting the lowest binding energy and highest hydrogen bond frequencies in each complex were pivotal in the interaction between the PPAR γ receptor and its specific ligands. This underscores the importance of statistical analysis of various molecular dynamics studies with diverse lipid mediators to elucidate the agonistic mechanisms of this protein. The findings presented here may contribute to the development of new agonists with therapeutic potential for various health conditions, including metabolic disorders and inflammatory diseases related to the PPAR γ receptor. Consequently, targeting the key residues identified in this study may lead to the development of more specific therapeutic strategies with fewer adverse effects.

Supplementary Material

This work contains supplementary material available at: <https://rvq.s bq.org.br>

Acknowledgments

We extend our sincere appreciation to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU). Special thanks go to Laboratório de Química Computacional Medicinal (LQCM)/ Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) at Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) as

well as to Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) and Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais (IFMG).

Disclosure statement

The authors declare no competing interests.

References

1. Murakami, M.; Lipid Mediators in Life Science. *Experimental Animals* **2011**, 60, 7. [\[Crossref\]](#)
2. Marion-Letellier, R.; Savoye, G.; Ghosh, S.; Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *European Journal of Pharmacology* **2016**, 785, 44. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Berger, J.; Moller, D. E.; The mechanisms of action of PPARs. *Annual Review of Medicine* **2002**, 53, 409. [\[Crossref\]](#)
4. Kliewer, S. A.; Lenhard, J. M.; Willson, T. M.; Patel, L.; Morris, D. C.; Lehmann, J. M.; A Prostaglandin J2 Metabolite Binds Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Promotes Adipocyte Differentiation. *Cell* **1995**, 83, 813. [\[PubMed\]](#)
5. Fujita, T.; Sugiyama, Y.; Taketomi, S.; Sohda, T.; Kawamatsu, Y.; Iwatsuka, H.; Suzuoki, Z.; Reduction of Insulin Resistance in Obese and/or Diabetic Animals by 5-[4-(1-Methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, Ciglitazone), a New Antidiabetic Agent. *Diabetes* **1983**, 32, 804. [\[Crossref\]](#)
6. Jones, D. C.; Manning, B. M.; Daynes, R. A.; A role for the peroxisome proliferator-activated receptor α in T-cell physiology and ageing immunobiology. *Proceedings of the Nutrition Society* **2002**, 61, 363. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Glass, C. K.; Saijo, K.; Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nature Reviews Immunology* **2010**, 10, 365. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Wahli, W.; Michalik, L.; PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2012**, 23, 351. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Sheng, W.; Wang, Q.; Qin, H.; Cao, S.; Wei, Y.; Weng, J.; Yu, F.; Zeng, H.; Osteoarthritis: Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24, 1. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)

10. Marciano, D. P.; Kuruvilla, D. S.; Boregowda, S. V.; Asteian, A.; Hughes, T. S.; Garcia-Ordonez, R.; Corzo, C. A.; Khan, T. M.; Novick, S. J.; Park, H.; Kojetin, D. J.; Phinney, D. G.; Bruning, J. B.; Kamenecka, T. M.; Griffin, P. R.; Pharmacological repression of PPAR γ promotes osteogenesis. *Nature Communications* **2015**, 6, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
11. Harmon, G. S.; Lam, M. T.; Glass, C. K.; PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. *Chemical Reviews* **2011**, 111, 6321. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
12. Brust, R.; Lin, H.; Fuhrmann, J.; Asteian, A.; Kamenecka, T. M.; Kojetin, D. J.; Modification of the Orthosteric PPAR γ Covalent Antagonist Scaffold Yields an Improved Dual-Site Allosteric Inhibitor. *ACS Chemical Biology* **2017**, 12, 969. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
13. Montanari, R.; Saccoccia, F.; Scotti, E.; Crestani, M.; Godio, C.; Gilardi, F.; Loiodice, F.; Fracchiolla, G.; Laghezza, A.; Tortorella, P.; Lavecchia, A.; Novellino, E.; Mazza, F.; Aschi, M.; Pochetti, G.; Crystal structure of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand binding domain complexed with a novel partial agonist: A new region of the hydrophobic pocket could be exploited for drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51, 7768. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
14. Ayza, M. A.; Zewdie, K. A.; Tesfaye, B. A.; Tesfamariam, S.; Gebrekirstos; Berhe, D. F.; Anti-diabetic effect of telmisartan through its partial ppar γ -agonistic activity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity* **2020**, 13, 3627. [[Crossref](#)]
15. Itoh, T.; Fairall, L.; Amin, K.; Inaba, Y.; Szanto, A.; Balint, B. L.; Nagy, L.; Yamamoto, K.; Schwabe, J. W. R.; Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. *Nature Structural and Molecular Biology* **2008**, 15, 924. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
16. Narala, V. R.; Subramani, P. A.; Narasimha, V. R.; Shaik, F. B.; Panati, K.; The role of nitrated fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in modulating inflammation. *International Immunopharmacology* **2014**, 23, 283. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
17. Egawa, D.; Itoh, T.; Yamamoto, K.; Characterization of covalent bond formation between PPAR γ and Oxo-fatty acids. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, 26, 690. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
18. Toborek, M.; Lee, Y. W.; Garrido, R.; Kaiser, S.; Hennig, B.; Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2002**, 75, 119. [[Crossref](#)]
19. James, M. J.; Cleland, L. G.; Dietary n-3 Fatty Acids and Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **1997**, 27, 85. [[Crossref](#)]
20. Kremer, J. M.; n-3 Fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *The American*

- Journal of Clinical Nutrition* **2000**, 71, 349S. [[Crossref](#)]
21. Hu, F. B.; Manson, J. A. E.; Willett, W. C.; Types of Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review. *Journal of the American College of Nutrition* **2001**, 20, 5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 22. Dalle, C.; Tournayre, J.; Mainka, M.; Basiak-Rasała, A.; Pétéra, M.; Lefèvre-Arbogast, S.; Dalloux-Chioccioli, J.; Deschasaux-Tanguy, M.; Lécuyer, L.; Kesse-Guyot, E.; Fezeu, L. K.; Hercberg, S.; Galan, P.; Samieri, C.; Zatońska, K.; Calder, P. C.; Hjorth, M. F.; Astrup, A.; Mazur, A.; Bertrand-Michel, J.; Schebb, N. H.; Szuba, A.; Touvier, M.; Newman, J. W.; Gladine, C.; The Plasma Oxylin Signature Provides a Deep Phenotyping of Metabolic Syndrome Complementary to the Clinical Criteria. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23, 1. [[Crossref](#)]
 23. Fratev, F.; Steinbrecher, T.; Jónsdóttir, S. Ó.; Prediction of Accurate Binding Modes Using Combination of Classical and Accelerated Molecular Dynamics and Free-Energy Perturbation Calculations: An Application to Toxicity Studies. *ACS Omega* **2018**, 3, 4357. [[Crossref](#)]
 24. Ju, Z.; Su, M.; Hong, J.; Ullah, S.; Kim, E. La; Zhao, C. H.; Moon, H. R.; Kim, S.; Jung, J. H.; Design of PPAR- γ agonist based on algal metabolites and the endogenous ligand 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 157, 1192. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 25. Lewis, S. N.; Bassaganya-Riera, J.; Bevan, D. R.; Virtual Screening as a Technique for PPAR Modulator Discovery. *PPAR Research* **2010**, 2010, 1. [[Crossref](#)]
 26. Azam, M. N. K.; Biswas, P.; Tareq, M. M. I.; Hossain, M. R.; Bibi, S.; Hoque, M. A.; Khandker, A.; Alam, M. A.; Zilani, M. N. H.; Rahman, M. S.; Albekairi, N. A.; Alshammari, A.; Hasan, M. N.; Identification of antidiabetic inhibitors from *Allophylus villosus* and *Mycetia sinensis* by targeting α -glucosidase and PPAR- γ : In-vitro, in-vivo, and computational evidence. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2024**, 32, 2. [[Crossref](#)]
 27. Musfiroh, I.; Megawati, G.; Herawati, D. M. D.; Ifaya, M.; Stability of omega-3 compounds complex with ppar- γ receptor as an anti-obesity using molecular dynamic simulation. *International Journal of Applied Pharmaceutics* **2022**, 14, 45. [[Crossref](#)]
 28. Shiraki, T.; Kodama, T. S.; Jingami, H.; Kamiya, N.; Rational discovery of a novel interface for a coactivator in the peroxisome proliferator-activated receptor γ : Theoretical implications of impairment in type diabetes mellitus. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **2005**, 58, 418. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 29. Zhang, T.; Chen, X.; Ju, X.; Yuan, J.; Zhou, J.; Zhang, Z.; Ju, G.; Xu, D.; PPARG is a potential target of Tanshinone IIA in prostate cancer treatment: a combination study of molecular docking and dynamic simulation based on transcriptomic bioinformatics.

- European Journal of Medical Research* **2023**, 28, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
30. Bull, A. W.; Steffensen, K. R.; Leers, J.; Rafter, J. J.; Activation of PPAR γ in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPAR γ . *Carcinogenesis* **2003**, 24, 1717. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 31. Li, Y.; Zhang, J.; Schopfer, F. J.; Martynowski, D.; Garcia-Barrio, M. T.; Kovach, A.; Suino-Powell, K.; Baker, P. R. S.; Freeman, B. A.; Chen, Y. E.; Xu, H. E.; Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR γ . *Nature Structural and Molecular Biology* **2008**, 15, 865. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 32. Sapieha, P.; Stahl, A.; Chen, J.; Seaward, M. R.; Willett, K. L.; Krah, N. M.; Dennison, R. J.; Connor, K. M.; Christopher, †; Aderman, M.; Licican, E.; Carughi, A.; Perelman, D.; Kanaoka, Y.; Sangiovanni, J. P.; Gronert, K.; Smith, L. E. H.; 5-Lipoxygenase Metabolite 4-HDHA Is a Mediator of the Antiangiogenic Effect of w-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Anti-Angiogenesis* **2011**, 3, 1. [[Crossref](#)]
 33. Eswar, N.; Webb, B.; Marti-Renom, M. A.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, D.; Shen, M.; Pieper, U.; Sali, A.; Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Protein Science* **2007**, 50, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 34. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.; The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, 235.[[Crossref](#)]
 35. Colovos, C.; Yeates, T. O.; Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interaction. *Protein Science* **1993**, 2, 1511. [[Crossref](#)]
 36. Schrödinger Release 2024-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2024. [[Link](#)]
 37. De Magalhães, C. S.; Almeida, D. M.; Barbosa, H. J. C.; Dardenne, L. E.; A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. *Information Sciences* **2014**, 289, 206. [[Crossref](#)]
 38. Guedes, I. A.; Barreto, A. M. S.; Marinho, D.; Krempser, E.; Kuenemann, M. A.; Sperandio, O.; Dardenne, L. E.; Miteva, M. A.; New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. *Scientific Reports* **2021**, 11, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 39. Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W.; CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry* **2008**, 29, 1859. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 40. Vanommeslaeghe, K.; Raman, E. P.; MacKerell, A. D.; Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2012**, 52, 3155. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

41. Yu, W.; He, X.; Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D.; Extension of the CHARMM general force field to sulfonyl-containing compounds and its utility in biomolecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* **2012**, *33*, 2451. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
42. Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D.; CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 671. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
43. Evans, D. J.; Holian, B. L.; The Nose-Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics* **1985**, *83*, 4069. [[Crossref](#)]
44. Parrinello, M.; Rahman, A.; Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics* **1981**, *52*, 7182. [[Crossref](#)]
45. Kolafa, J.; Perram, J. W.; Cutoff Errors in the Ewald Summation Formulae for Point Charge Systems. *Molecular Simulation* **1992**, *9*, 351. [[Crossref](#)]
46. Berendsen, H. J. C.; Van Der Spoel, D.; Van Drunen, R.; GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* **1995**, *91*, 43. [[Crossref](#)]
47. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K.; VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **1996**, *14*, 33. [[Crossref](#)]
48. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson Jr, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 5179. [[Crossref](#)]
49. Kumari, R.; Kumar, R.; Lynn, A.; G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2014**, *54*, 1951. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
50. Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; Andrew McCammon, J.; Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *PNAS* **2001**, *98*, 10037. [[Crossref](#)]
51. Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Brown, P. J.; Sternbach, D. D.; Rgen, J.; Lehmann, M.; Wisely, G. B.; Willson, T. M.; Klierer, S. A.; Milburn, M. V; Molecular Recognition of Fatty Acids by Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Molecular Cell* **1999**, *3*, 397. [[Crossref](#)]
52. Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin, O.; Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2007**, *1771*, 915.

- [Crossref] [PubMed]
53. Ricci, C. G.; Silveira, R. L.; Rivalta, I.; Batista, V. S.; Skaf, M. S.; Allosteric Pathways in the PPAR γ -RXR α nuclear receptor complex. *Scientific Reports* **2016**, 6, 1. [Crossref] [PubMed]
 54. Mahindroo, N.; Peng, Y. H.; Lin, C. H.; Tan, U. K.; Prakash, E.; Lien, T. W.; Lu, I. L.; Lee, H. J.; Hsu, J. T. A.; Chen, X.; Liao, C. C.; Lyu, P. C.; Chao, Y. S.; Wu, S. Y.; Hsieh, H. P.; Structural basis for the structure-activity relationships of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 6421. [Crossref] [PubMed]
 55. Bruning, J. B.; Chalmers, M. J.; Prasad, S.; Busby, S. A.; Kamenecka, T. M.; He, Y.; Nettles, K. W.; Griffin, P. R.; Partial Agonists Activate PPAR γ Using a Helix 12 Independent Mechanism. *Structure* **2007**, 15, 1258. [Crossref] [PubMed]
 56. Van Marrewijk, L. M.; Polyak, S. W.; Hijnen, M.; Kuruvilla, D.; Chang, M. R.; Shin, Y.; Kamenecka, T. M.; Griffin, P. R.; Bruning, J. B.; SR2067 Reveals a Unique Kinetic and Structural Signature for PPAR γ Partial Agonism. *ACS Chemical Biology* **2016**, 11, 273. [Crossref] [PubMed]
 57. Capelli, D.; Cerchia, C.; Montanari, R.; Loiodice, F.; Tortorella, P.; Laghezza, A.; Cervoni, L.; Pochetti, G.; Lavecchia, A.; Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Scientific Reports* **2016**, 6, 1. [Crossref] [PubMed]
 58. Brust, R.; Shang, J.; Fuhrmann, J.; Mosure, S. A.; Bass, J.; Cano, A.; Heidari, Z.; Chrisman, I. M.; Nemetchek, M. D.; Blayo, A. L.; Griffin, P. R.; Kamenecka, T. M.; Hughes, T. S.; Kojetin, D. J.; A structural mechanism for directing corepressor-selective inverse agonism of PPAR γ . *Nature Communications* **2018**, 9, 1. [Crossref] [PubMed]
 59. Yu, C.; Chen, L.; Luo, H.; Chen, J.; Cheng, F.; Gui, C.; Zhang, R.; Shen, J.; Chen, K.; Jiang, H.; Shen, X.; Binding analyses between Human PPAR γ -LBD and ligands: Surface plasmon resonance biosensor assay correlating with circular dichroic spectroscopy determination and molecular docking. *European Journal of Biochemistry* **2004**, 271, 386. [Crossref] [PubMed]
 60. Malapaka, R. R. V.; Khoo, S. K.; Zhang, J.; Choi, J. H.; Zhou, X. E.; Xu, Y.; Gong, Y.; Li, J.; Yong, E. L.; Chalmers, M. J.; Chang, L.; Resau, J. H.; Griffin, P. R.; Chen, Y. E.; Xu, H. E.; Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, 287, 183. [Crossref] [PubMed]
 61. Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Plunket, K. D.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Oplinger, J. A.; Kliwer, S. A.; Gampe, R. T.; Mckee, D. D.; Moore, J. T.; Willson, T.

- M.; Rosenfeld, M. G.; Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *PNAS* **2001**, *98*, 13919. [[Crossref](#)]
62. Hanke, T.; Cheung, S. Y.; Kilu, W.; Heering, J.; Ni, X.; Planz, V.; Schierle, S.; Faudone, G.; Friedrich, M.; Wanior, M.; Werz, O.; Windbergs, M.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Merk, D.; A selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor γ with an unprecedented binding mode. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 4555. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
63. Álvarez-Almazán, S.; Bello, M.; Tamay-Cach, F.; Martínez-Archundia, M.; Alemán-González-Duhart, D.; Correa-Basurto, J.; Mendieta-Wejebe, J. E.; Study of new interactions of glitazone's stereoisomers and the endogenous ligand 15d-PGJ2 on six different PPAR gamma proteins. *Biochemical Pharmacology* **2017**, *142*, 168. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
64. Waku, T.; Shiraki, T.; Oyama, T.; Morikawa, K.; Atomic structure of mutant PPAR γ LBD complexed with 15d-PGJ2: Novel modulation mechanism of PPAR γ /RXR α function by covalently bound ligands. *FEBS Letters* **2008**, *583*, 320. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
65. Puhl, A. C.; Bernardes, A.; Silveira, R. L.; Yuan, J.; Campos, J. L. O.; Saidemberg, D. M.; Palma, M. S.; Cvaro, A.; Ayers, S. D.; Webb, P.; Reinach, P. S.; Skaf, M. S.; Polikarpov, I.; Mode of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by luteolin. *Molecular Pharmacology* **2012**, *81*, 788. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
66. Puhl, A. C.; Milton, F. A.; Cvaro, A.; Sieglaff, D. H.; Campos, J. C. L.; Bernardes, A.; Filgueira, C. S.; Lindemann, J. L.; Deng, T.; Neves, F. A. R.; Polikarpov, I.; Webb, P.; Mechanisms of peroxisome proliferator activated receptor γ regulation by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nuclear receptor signaling* **2015**, *13*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
67. Egawa, D.; Ogiso, T.; Nishikata, K.; Yamamoto, K.; Itoh, T.; Structural Insights into the Loss-of-Function R288H Mutant of Human PPAR γ . *Biol. Pharm. Bull* **2021**, *44*, 1196. [[Crossref](#)]
68. Jang, J. Y.; Bae, H.; Lee, Y. J.; Choi, Y. Il; Kim, H. J.; Park, S. B.; Suh, S. W.; Kim, S. W.; Han, B. W.; Structural Basis for the Enhanced Anti-Diabetic Efficacy of Lobeglitazone on PPAR γ . *Scientific Reports* **2018**, *8*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
69. Lokhande, K. B.; Ballav, S.; Yadav, R. S.; Swamy, K. V.; Basu, S.; Probing intermolecular interactions and binding stability of kaempferol, quercetin and resveratrol derivatives with PPAR- γ : docking, molecular dynamics and MM/GBSA approach to reveal potent PPAR- γ agonist against cancer. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2022**, *40*, 971. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
70. Nolte, R. T.; Wisely, G. B.; Westin, S.; Cobb, J. E.; Lambert, M. H.; Kurokawa, R.; Rosenfeldk, M. G.; Willson, T. M.; Glass, C. K.; Milburn, M. V; Ligand binding and co-

- activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Nature* **1998**, 395, 137. [[Crossref](#)]
71. Stalin, A.; Lin, D.; Josephine Princy, J.; Feng, Y.; Xiang, H.; Ignacimuthu, S.; Chen, Y.; Computational analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in PPAR gamma associated with obesity, diabetes and cancer. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2022**, 40, 1843. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 72. Cipollina, C.; Salvatore, S. R.; Muldoon, M. F.; Freeman, B. A.; Schopfer, F. J.; Generation and Dietary Modulation of Anti-Inflammatory Electrophilic Omega-3 Fatty Acid Derivatives. *PLoS ONE* **2014**, 9, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 73. Waku, T.; Shiraki, T.; Oyama, T.; Maebara, K.; Nakamori, R.; Morikawa, K.; The nuclear receptor PPAR γ individually responds to serotonin-and fatty acid-metabolites. *The European Molecular Biology Organization Journal* **2010**, 29, 3395. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 74. Waku, T.; Shiraki, T.; Oyama, T.; Fujimoto, Y.; Maebara, K.; Kamiya, N.; Jingami, H.; Morikawa, K.; Structural Insight into PPAR γ Activation Through Covalent Modification with Endogenous Fatty Acids. *Journal of Molecular Biology* **2009**, 385, 188. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 75. Yamamoto, K.; Itoh, T.; Abe, D.; Shimizu, M.; Kanda, T.; Koyama, T.; Nishikawa, M.; Tamai, T.; Ooizumi, H.; Yamada, S.; Identification of putative metabolites of docosahexaenoic acid as potent PPAR γ agonists and antidiabetic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15, 517. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 76. Useini, A.; Engelberger, F.; Künze, G.; Sträter, N.; Structural basis of the activation of PPAR γ by the plasticizer metabolites MEHP and MINCH. *Environment International* **2023**, 173, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 77. Jian, Y.; He, Y.; Yang, J.; Han, W.; Zhai, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Molecular modeling study for the design of novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists using 3D-QSAR and molecular docking. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 78. Alexander, R. L.; Wright, M. W.; Gorczynski, M. J.; Smitherman, P. K.; Akiyama, T. E.; Wood, H. B.; Berger, J. P.; King, S. B.; Morrow, C. S.; Differential Potencies of Naturally Occurring Regioisomers of Nitrolinoleic Acid in PPAR γ Activation. *Biochemistry* **2008**, 48, 492. [[Crossref](#)]

APÊNDICE B – Material suplementar do artigo

Supplementary Material

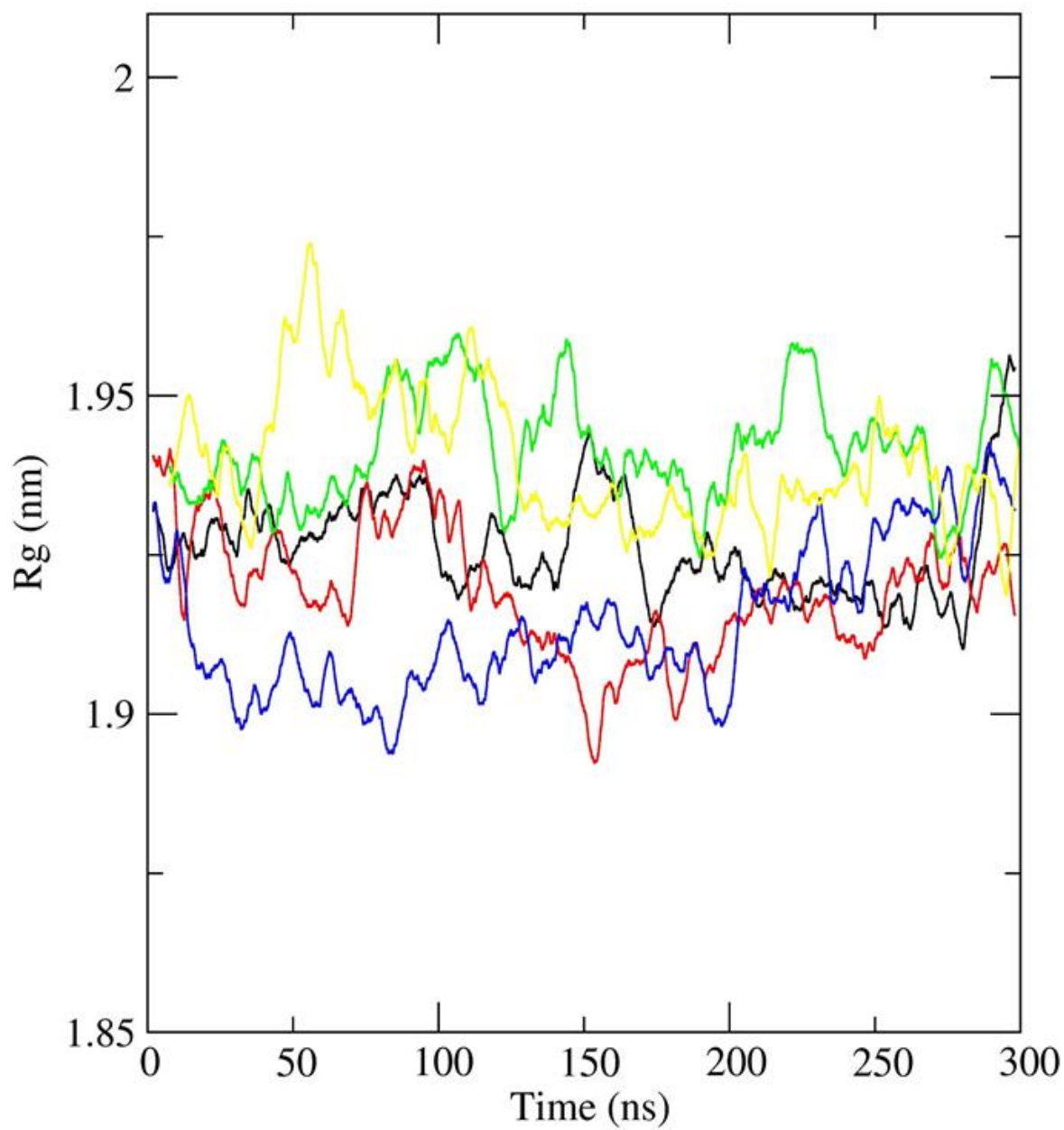


Figure S1. Radius of gyration (RG) analysis of apo-PPAR γ and PPAR γ -ligand complexes (average of the 3 replicas).

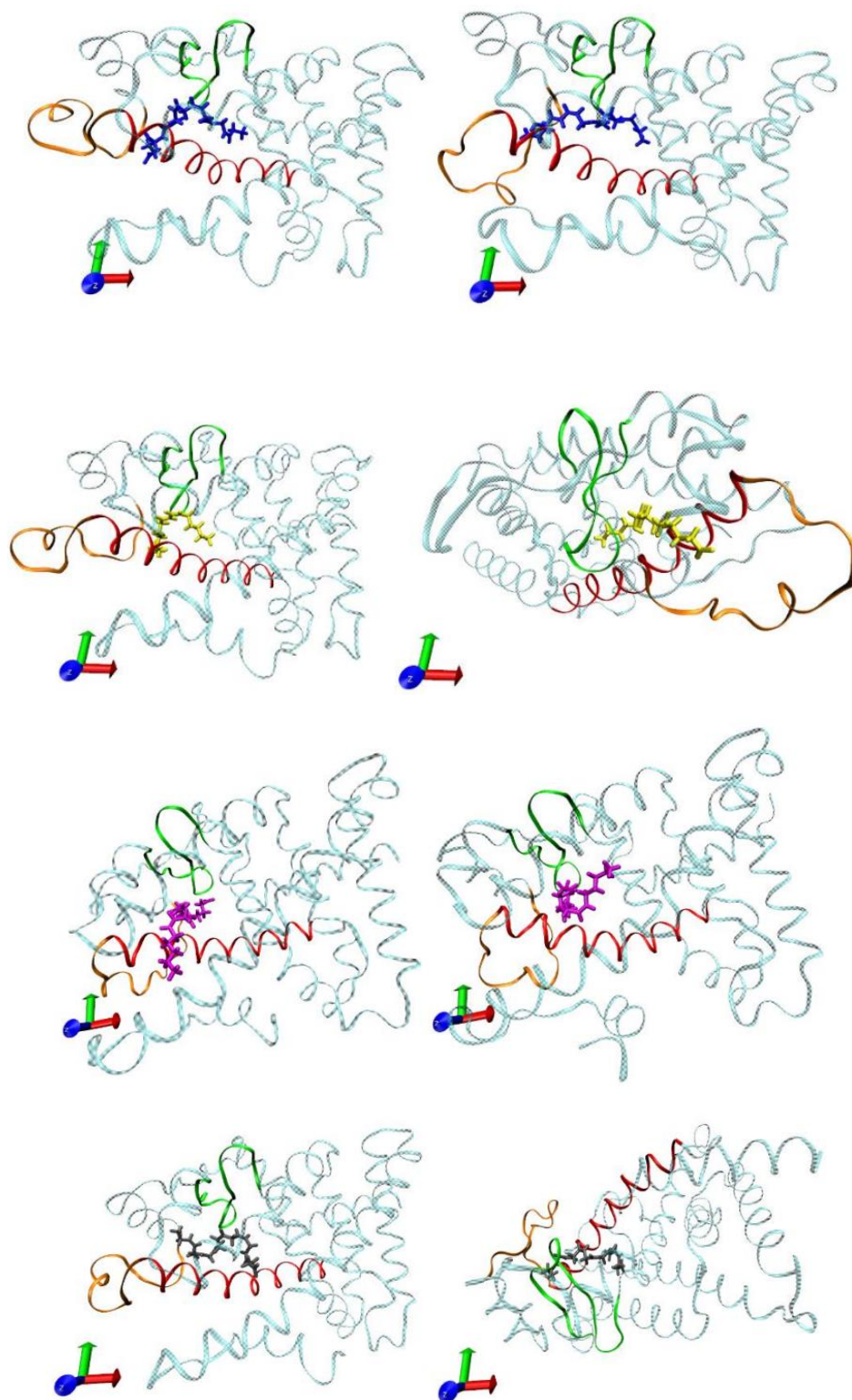


Figure S2. Snapshots of the initial and final states of the simulations. On the left are the frames at the initial time, and on the right are the frames at the final time of the simulations. The ligand is shown in licorice representation, with secondary structure elements of the protein colored as follows: helix 3 in red, the loop in orange, and beta sheets in green. The ligands are colored according to the molecule they represent: blue for 4HDHA, yellow for 9HODE, purple for arachidonic acid, and gray for DHA.

Table S1. Ligands' top 10 docking poses ranked by the total energy, which is composed of the torsional energy of the ligand (not shown) and the intermolecular and intramolecular interactions according to the electrostatic and vdW potentials.

Pose	Total Energy	Interaction Energy	vdW	Coul
9HODE-1	-36.302	-54.113	-21.242	-32.871
9HODE-2	-34.843	-55.258	-19.212	-36.046
9HODE-3	-34.660	-53.362	-19.082	-34.280
9HODE-4	-34.426	-53.101	-19.268	-33.833
9HODE-5	-33.974	-54.711	-23.566	-31.145
AA-1	-32.712	-54.517	-22.343	-32.174
9HODE-6	-31.437	-51.238	-18.395	-32.843
AA-2	-31.401	-54.281	-26.721	-27.560
AA-3	-30.236	-54.764	-17.559	-37.205
4HDHA-1	-30.228	-57.966	-27.571	-30.395
AA-4	-30.208	-54.717	-23.745	-30.972
AA-5	-30.189	-52.359	-9.816	-42.543
AA-6	-29.691	-52.182	-11.590	-40.592
AA-7	-29.423	-52.215	-17.513	-34.702
4HDHA-2	-29.330	-59.440	-29.561	-29.879
AA-8	-29.023	-52.647	-14.579	-38.068
4HDHA-3	-28.986	-57.550	-25.617	-31.933
AA-9	-28.891	-53.256	-20.461	-32.795
DHA-1	-28.775	-55.384	-25.753	-29.631
AA-10	-28.609	-53.366	-16.956	-36.410
DHA-2	-28.592	-56.794	-19.769	-37.025
4HDHA-4	-28.532	-53.968	-21.126	-32.842
4HDHA-5	-28.419	-55.397	-25.128	-30.269
9HODE-7	-28.333	-52.658	-20.591	-32.067

4HDHA-6	-28.155	-54.269	-19.601	-34.668
9HODE-8	-27.861	-50.385	-15.043	-35.342
DHA-3	-27.790	-53.527	-24.465	-29.062
4HDHA-7	-27.683	-57.594	-22.835	-34.759
4HDHA-8	-27.569	-58.888	-29.482	-29.406
4HDHA-9	-27.545	-60.650	-25.592	-35.058
4HDHA-10	-27.345	-54.149	-23.172	-30.977
DHA-4	-26.992	-53.050	-23.058	-29.992
9HODE-9	-26.626	-46.415	-18.349	-28.066
DHA-5	-26.489	-52.660	-23.973	-28.687
9HODE-10	-26.234	-53.198	-19.117	-34.081
DHA-6	-25.978	-53.774	-24.057	-29.717
DHA-7	-25.676	-55.281	-16.105	-39.176
DHA-8	-25.428	-54.799	-24.364	-30.435
DHA-9	-25.350	-53.862	-22.281	-31.581
DHA-10	-24.794	-51.309	-21.514	-29.795

Table S2. Root mean square deviation (RMSD) values of apo-PPAR γ and PPAR γ -ligand complexes.

		Simulation time (ns)	RMSD value per replica (nm)	RMSD (replicas average) (nm)
Apo	-	500	0.25	0.25
	r1	500	0.26	
AA	r2	500	0.27	0.26
	r3	500	0.23	
	r1	300	0.25	
DHA	r2	300	0.26	0.26
	r3	300	0.27	
4HDHA	r1	500	0.26	
	r2	500	0.24	0.24

	r3	500	0.24	
	r1	300	0.27	
9HODE	r2	300	0.29	0.28
	r3	300	0.27	

Table S3. Hydrogen bond frequencies in the protein-ligand complexes simulations, according to VMD and AMBER calculations.

Ligand	Simulation Replica	Residues	Hydrogen Bonds	
			VMD Frequency	AMBER Frequency
AA^a	r1	K265	0.23	0.25
		R288	0.15	0.16
		S342	0.49	0.59
		E343	0.11	-
	r2	R288	0.48	0.50
		S342	0.34	0.48
	r3	R288	0.38	0.38
		S342	0.77	0.86
DHA^b	r1	Y327	0.86	0.92
		K367	0.68	0.83
	r2	Y327	0.77	0.82
		K367	0.73	0.89
	r3	Y327	0.58	0.63
		K367	0.56	0.72
4HDHA^c	r1	H266	0.43	0.32
		R280	0.93	0.95
	r2	K265	0.10	-
		H266	0.48	0.48
		R280	0.91	0.96
	r3	K265	0.56	0.43
		S342	0.82	0.88

9HODE^d	r1	E343	0.11	-
		K265	0.32	0.36
		R280	0.29	0.30
		S342	0.60	0.57
	r2	K263	0.21	-
		K265	-	0.26
		R280	0.62	0.68
		S342	-	0.14
	r3	R280	0.83	0.88
		S342	0.14	0.20

^aArachidonic acid; ^bdocosahexaenoic acid; ^c4-hydroxydocosahexaenoic acid; ^d9-hydroxyoctadecadienoic acid. Minor differences observed in the residues list and frequencies values are attributed to the distinct donor–acceptor (D–A) distance and angles cut-offs used as pattern by each tool. VMD uses a D–A distance and a hydrogen–donor–acceptor (H–D–A) angle cut-off of 3.5 Å and 30°, respectively, whereas AMBER uses a D–A distance and a donor–hydrogen–acceptor (D–H–A) angle cut-off of 3.0 Å and 135°, respectively.

Table S4. Positively charged residues that showed binding energy ≤ -1 kcal/mol from MMPBSA calculations in at least one simulation replica. Energy values ≤ -4.5 kcal/mol are highlighted.

Res	AA			DHA			4HDHA			9HODE		
	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3
R212	-2.6	-2.5	-2.4	-2.2	-2.2	-2.3	-1.8	-1.8	-2.3	-2.3	-1.8	-1.9
K216	-2.7	-2.7	-2.6	-2.3	-2.3	-2.3	-2.0	-2.1	-2.8	-2.5	-2.0	-2.2
K224	-3.6	-3.4	-3.4	-2.7	-2.7	-2.7	-2.5	-2.6	-3.6	-3.2	-2.5	-2.8
K230	-4.1	-4.3	-4.0	-3.3	-4.1	-3.2	-2.9	-2.9	0.0	-3.6	-2.8	-3.1

K232	-4.8	-5.0	-4.7	-3.1	-3.0	-3.1	-3.2	-3.5	-5.1	-4.4	-3.3	-3.6
R234	-4.0	-4.0	-3.6	-3.1	-3.5	-3.3	-2.8	-2.9	-3.7	-3.5	-2.7	-3.0
K240	-3.2	-3.5	-3.1	-2.5	-2.7	-2.6	-2.5	-2.6	-3.3	-3.1	-2.5	-2.7
244	-4.2	-3.7	-4.0	-2.5	-2.5	-2.6	-3.6	-3.7	-4.2	-4.3	-3.8	-4.0
K261	-4.0	-4.0	-4.0	-2.9	-2.9	-2.9	-4.8	-4.5	-4.0	-4.6	-4.9	-4.3
K263	-5.3	-5.5	-4.8	-3.1	-3.0	-3.0	-4.9	-5.5	-4.9	-6.0	-5.5	-5.7
K265	-5.6	-4.8	-5.6	-3.5	-3.3	-4.0	-5.5	-5.7	-4.9	-4.6	-5.3	-5.4
K275	-3.4	-3.5	-3.9	-3.6	-3.6	-3.7	-5.2	-4.6	-3.5	-3.7	-6.4	-4.4
R280	-4.2	-4.4	-4.6	-3.5	-3.8	-4.1	-4.3	-5.7	-3.9	-4.8	-4.7	-4.3
R288	-7.7	-6.6	-7.2	-5.9	-5.9	-6.1	-4.8	-6.2	-8.3	-7.6	-5.1	-6.6
K301	-3.4	-3.4	-3.3	-3.2	-3.3	-3.2	-2.7	-2.8	-3.6	-3.5	-2.7	-3.0
K319	-3.1	-2.9	-3.0	-3.7	-3.7	-3.7	-2.7	-2.8	-3.0	-3.0	-2.6	-2.8
K336	-3.4	-3.4	-3.5	-3.3	-3.3	-3.3	-2.8	-3.0	-3.5	-3.3	-2.8	-3.0
R350	-3.6	-3.3	-3.5	-3.7	-3.9	-3.7	-3.1	-3.2	-3.4	-3.4	-3.0	-3.2
K354	-3.4	-3.2	-3.5	-3.9	-4.0	-3.8	0.0	-3.3	-3.3	-3.4	-3.2	-3.3
R357	-3.4	-3.3	-3.6	-3.8	-3.8	-3.7	-4.2	-4.0	-3.2	-3.5	-4.1	-3.9

K358	-3.0	-2.9	-3.1	-4.3	-4.2	-4.2	-3.3	-3.2	-2.9	-3.0	-3.0	-3.1
K367	-3.8	-3.5	-3.9	-4.6	-5.5	-4.4	-3.3	-3.5	-3.7	-3.8	-3.2	-2.8
K373	-3.1	-3.0	-3.1	-3.8	-3.8	-3.7	-2.5	-2.6	-2.9	-2.9	-2.4	-2.6
R397	-3.4	-3.2	-3.2	-4.0	-4.1	-4.0	-2.5	-2.6	-3.0	-2.9	-2.5	-2.7
K404	-2.1	-2.1	-2.0	-2.4	-2.4	-2.4	-1.7	-1.7	-1.9	-1.9	-1.6	-1.7
K422	-2.3	-2.2	-2.2	-2.2	-2.3	-2.3	-1.7	-1.7	0.0	0.0	0.0	-1.8
K434	-2.7	-2.6	-2.6	-2.9	-2.9	-2.9	-2.0	-2.1	-2.4	-2.3	-1.9	-2.1
K438	-3.2	-3.1	-3.0	-3.4	-3.5	-3.4	-2.4	-2.5	-2.8	-2.7	-2.3	-2.5
R443	-3.1	-3.0	-2.9	-3.7	-3.7	-3.7	-2.4	-2.4	-2.8	-2.7	-2.2	-2.5
K457	-3.2	-3.4	-3.5	-5.3	-5.1	-4.7	-3.4	-3.4	-3.1	-3.2	-3.2	-3.3
K458	-2.8	-2.8	-2.9	-4.1	-4.1	-4.0	-2.9	-2.9	-2.6	-2.7	-2.8	-2.8
K474	-2.8	-2.8	-2.9	-3.8	-3.8	-4.0	-2.8	-2.7	-2.8	-2.9	-2.5	-2.7

Table S5. Neutral residues that showed total binding energy ≤ -1 kcal/mol from MMPBSA calculations in at least one simulation replica. The most favorable energy values from each replica are highlighted.

Res	AA			DHA			4HDHA			9HODE		
	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3

F264	-	-	-	-1.0	-0.8	0.0	-0.7	-1.2	-1.6	-0.4	-1.1	-0.7
H266	-	-	-	-	-	-	-0.6	-1.5	-0.1	-	-	-
I281	-	-	-	-1.0	-0.8	-1.1	-1.1	-0.7	-1.9	-0.4	-1.0	-0.8
C285	-1.4	-1.3	-1.7	-1.8	-1.8	-1.7	-1.8	-1.5	-1.4	-1.4	-1.3	-1.4
Y327				-0.9	-1.0	-0.7						
L330	-2.0	-1.6	-1.2	-1.3	-1.5	-1.3	-1.0	-0.4	-0.8	-1.6	-0.8	-1.3
I341	-1.0	-1.2	-1.3	-1.4	-1.3	-1.4	-1.5	-1.4	-1.9	-1.6	-1.3	-1.3
M348	-	-	-	-	-	-	-1.1	-0.9	-0.9	-	-	-
M364	-1.2	-0.7	-0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table S6. Comparison between vacuum potential energy and total binding energy of some positively charged residues. Residues' polar solvation energy values ≥ 15.0 kcal/mol are displayed.

Ligand	Simulation replica	Residues	Per residue MM/PBSA energy values (kcal/mol)		
			Vacuum energy	Polar solvation energy	Total binding energy
AA	r1	K265	-14.4	-	-5.6
		R288	-14.5	-	-7.7
	r2	K263	-7.2	-	-5.5
		R288	-18.9	-	-6.6
	r3	K265	-10.9	-	-5.6

		R288	-18.3	-	-7.2
		R288	-8.3	-	-5.9
	r1	K367	-24.5	19.9	-4.6
		K457	-6.5	-	-5.3
		R288	-8.2	-	-5.9
DHA	r2	K367	-25.0	19.5	-5.5
		K457	-6.4	-	-5.1
		R288	-8.4	-	-6.1
	r3	K367	-24.1	19.8	-4.4
		K457	-6.2	-	-4.7
		K263	-5.6	-	-4.9
		K265	-9.0	-	-5.5
	r1	K275	-6.7	-	-5.2
		R280	-25.6	21.5	-4.3
		R288	-7.2	-	-4.8
		K263	-6.6	-	-5.5
4HDHA	r2	K265	-8.7	-	-5.7
		R280	-23.6	18.1	-5.7
		R288	-9.3	-	-6.2
		K232	-5.8	-	-5.1
		K263	-5.3	-	-4.9
	r3	K265	-20.2	15.4	-4.9
		R288	-15.5	-	-8.3
		K263	-11.3	-	-6.0
		K265	-15.1	-	-4.6
	r1	R280	-11.3	-	-4.8
9HODE		R288	-14.0	-	-7.6
		K263	-13.0	-	-5.5
	r2	K265	-8.4	-	-5.3
		K275	-9.1	-	-6.4

	R280	-20.4	15.9	-4.7
	K263	-7.6	-	-5.7
	K265	-7.3	-	-5.4
r3	R280	-22.5	18.3	-4.3
	R288	-9.2	-	-6.6

APÊNDICE C – Comprovante de submissão do artigo

 ^a Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Laboratório de Química Computacional Medicinal, Praça Manoel Terra 330, CEP 38015-050, Uberaba-MG, Brasil	Article http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20250002 Molecular Dynamics Simulations of Omega-3 and Omega-6 Lipid Mediators as Partial Agonists of PPARγ <i>Simulações de Dinâmica Molecular de Mediadores Lipídicos Ômega-3 e Ômega-6 como Agonistas Parciais do PPARγ</i> Fernando Freitas Siqueira Silva,^a Roberto Ribeiro Faria,^{a,b} Vinicius Schmitz Nunes,^{a,c} Odonório Abrahão Júnior^{a,*}
---	---