



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA FIALINA F COM O RECEPTOR DA VITAMINA D**

**VANESSA LIMA SOUZA VILAR**

**Salvador – Brasil**  
**2011**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA FIALINA F COM O RECEPTOR DA VITAMINA D**

**VANESSA LIMA SOUZA VILAR**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada como um dos pré-requisitos para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**Salvador – Brasil**  
**2011**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

V697e Vilar, Vanessa Lima Souza  
Estudo da interação da fisalina F com o receptor da vitamina D [manuscrito] / Vanessa  
Lima Souza Vilar. - 2010.  
66 f.; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo  
Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2010.  
Orientador: Prof.: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

1. Physalis angulata 2. Fisalina 3. Receptores nucleares 4. Receptor de vitamina D  
I. Título.

CDU 577.171.6

---

*A meus queridos pais – Ailton e Ivone, pelo eterno amor e cuidado;  
A meu irmão David, pelos sorrisos que sempre arranca de mim;  
A Joy, meu grande amor, minha metade, meu par;  
e a Deus.*

---

## AGRADECIMENTOS

---

Pela acolhida, pela orientação, por compartilhar comigo conhecimentos e experiência, pelo apoio muitas vezes pessoal e por ajudar-me a realizar um sonho, agradeço a Dr<sup>a</sup> Milena Soares.

Pela rica amizade, pelos ricos conselhos e pela ajuda na elaboração do projeto, agradeço a Dr<sup>a</sup> Simone Macambira.

Por cada sorriso; por cada dica crucial; por compartilharem comigo canetas, reagentes e conhecimentos; pelas respostas às minhas dúvidas e pela maravilhosa e inesquecível convivência, agradeço aos meus amigos do LETI-CPqGM e CBTC-São Rafael.

Por apoio direto em experimentos agradeço a Elivani de Jesus, Dr<sup>a</sup> Lenita Santos, Cristiane Pinheiro, Dr. Geraldo Gileno, Dr. Cristiano Villela, Dr<sup>a</sup>. Elisalva Guimarães, Dr. José Fernando, Marcos Maurício, Carine Azevedo, Bruno Solano, Dr. Renato Astorino, Michelline Magalhães, Alcemir Júnior, Aline Thomaz, Dr<sup>a</sup>. Fabiana Stolorowicz, Gisele Carvalho, Dr. Carlos Pirovani, Daniele Brustolim, Nanashara Carvalho, Marília Barbosa. Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido completar este trabalho.

Por apoio administrativo agradeço a Roberta Couto, Lucyvera Imbroinise e Hilda Marques.

Por permitirem-me desenvolver atividades cruciais em seus laboratórios agradeço ao Dr. Lain Carvalho (LPBI-CPqGM), ao Dr. Júlio Cascardo *in memoriam* (CBG-UESC) e ao Dr. Ricardo Ribeiro (LETI-CPqGM e CBTC-São Rafael).

Pelas sugestões que enriqueceram este trabalho, agradeço a Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia e Dr<sup>a</sup> Fernanda Grassi.

Pelo apoio financeiro e logístico agradeço ao CNPq, ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM-Fiocruz/BA), ao Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC-HSR).

---

---

*"A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a  
verdade."*

*Julio Verne*

---

## RESUMO

---

As fisalinas são seco-esteróides isolados de espécies do gênero *Physalis* que apresentam diversas atividades biológicas. Em estudos *in vitro* e em modelos de doenças mediadas pelo sistema imune, foi demonstrado que a fisalina F possui potente atividade imunossupressora, independente da ativação do receptor de glicocorticóide. Neste trabalho foi avaliado se a ação deste esteróide está relacionada à ativação do receptor de vitamina D (VDR), que é um fator de transcrição ativado pela vitamina D<sub>3</sub>. Inicialmente foi realizado um ensaio de translocação do VDR utilizando células COS-7 transfectadas com plasmídeo codificante para a proteína de fusão YFP-VDR, formada pelo VDR associado à proteína fluorescente amarela. As células transfectadas foram tratadas com 100 nM da fisalina F e também da fisalina D, que não possui atividade imunossupressora, dexametasona e vitamina D<sub>3</sub>. Observou-se por microscopia de fluorescência o mesmo padrão de translocação do VDR do citoplasma para o núcleo em células tratadas com a fisalina F e com a vitamina D<sub>3</sub>, mas não com dexametasona ou fisalina D. Para comprovar a atividade do VDR como fator de transcrição sob ação da fisalina F, células COS-7 foram transfectadas com pTA-LUC (plasmídeo controle) ou pVDR-LUC que codifica a proteína luciferase sob o controle de elementos responsivos ao VDR. Após a transfecção, as células foram incubadas com os mesmos estímulos e na mesma concentração do ensaio de translocação ou apenas com veículo. As atividades da luciferase nos grupos tratados com fisalina F e vitamina D<sub>3</sub> foram semelhantes e também superiores às do grupo tratado com veículo, fisalina D e dexametasona. Foi realizada a expressão do VDR em *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta utilizando o plasmídeo HS\_VDR\_EC1-pQE-T7, o qual codifica o VDR associado a uma cauda de 6 histidinas. Nas condições testadas, a proteína expressada encontrava-se em corpos de inclusão. Esta proteína purificada poderá ser utilizada em futuros estudos de interação entre VDR e fisalinas. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a fisalina F interage com o VDR e que as atividades destas fisalinas podem ser atribuídas, ao menos em parte, à ativação deste receptor nuclear.

**Palavras-chave:** *Physalis angulata*, Fisalina, Receptores nucleares, Receptor de vitamina D.

---

## ABSTRACT

---

Physalins are secosteroids isolated from species of the genus *Physalis* endowed with several biological activities. Studies *in vitro* and in models of immune-mediated diseases have shown that physalin F has potent immunosuppressive activity independent of the glucocorticoid receptor. In this study we evaluated whether the action of this steroid is related to activation of the vitamin D receptor (VDR), which is a transcription factor activated by vitamin D<sub>3</sub>. Initially we evaluated the translocation of the VDR using COS-7 cells transfected with plasmid encoding a fusion protein YFP-VDR formed by VDR associated with yellow fluorescent protein. The transfected cells were treated with 100 nM of physalins F and D, dexamethasone, and vitamin D<sub>3</sub>. We observed by fluorescence microscopy the translocation of VDR from the cytoplasm to the nucleus in cells treated with physalin F and with vitamin D<sub>3</sub>, but not with dexamethasone or physalin D. To prove the transcription factor activity of VDR under the action of physalin F, COS-7 cells were transfected with PTA-LUC (plasmid control) or pVDR-LUC that encodes the protein luciferase under the control of VDR responsive elements. After transfection, cells were incubated with vehicle or physalins F and D, dexamethasone and vitamin D<sub>3</sub> at the same concentration of translocation test. The luciferase activity of cells treated with vitamin D<sub>3</sub> and physalin F were similar, and higher than group treated with vehicle, dexamethasone or physalin D. The VDR expression was done in *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta. For this, we used the plasmid PQE-HS\_VDR\_EC1-T7, which encodes the VDR protein associated with a tail of 6 histidines. Under the conditions tested, the expressed protein was in inclusion bodies. This purified protein can be used in future studies of interaction between VDR and physalins. Our results suggest that physalin F interacts with the VDR and the activities of this physalin can be attributed at least in part to activation of this nuclear receptor.

Keywords: *Physalis angulata*, physalin, nuclear receptor for vitamin D.

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exemplos de entidades químicas oriundas de produtos naturais .....	18
Figura 2. <i>Physalis angulata</i> .....	19
Figura 3. Fruto da <i>Physalis angulata</i> .....	19
Figura 4. Fórmulas estruturais das fisalinas F e D isoladas a partir da <i>Physalis angulata</i> .....	21
Figura 5. Esquema da via de sinalização envolvendo receptores nucleares. ....	23
Figura 6. Representação esquemática dos receptores nucleares .....	25
Figura 7. Domínio de ligação ao DNA de receptor nuclear .....	26
Figura 8. Domínio de ligação do DNA e dedos de zinco .....	26
Figura 9. Desenho esquemático do domínio de ligação do ligante de receptores nucleares em duas conformações .....	27
Figura 10. Esquema de ativação transcricional pelos receptores nucleares .....	28
Figura 11. Vitamina D <sub>3</sub> na forma ativa e o domínio de ligação ao ligante do VDR .....	29
Figura 12. Modelo de vias de sinalização celulares relacionadas à ação do calcitriol .....	30

Figura 13. Estrutura molecular do VDR .....	31
Figura 14. O domínio de ligação ao DNA do VDR humano .....	32
Figura 15. Padrão de localização da proteína de fusão YFP-VDR (amarelo) em células COS-7 transfectadas .....	49
Figura 16. Padrão de localização da proteína de fusão YFP-VDR (amarelo) em células COS-7 transfectadas após tratamento com fisalinas F e D .....	50
Figura 17. Atividade relativa da luciferase em células COS-7 transfectadas com plasmídeo contendo o gene repórter (luciferase) sob o controle de elementos responsivos ao VDR .....	51
Figura 18. Padrão eletroforético da expressão do VDR recombinante em <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) Rosetta .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Usos da <i>Physalis angulata</i> na medicina popular brasileira .....	20
Tabela 2. Atividades biológicas das fisalinas isoladas a partir da <i>Physalis angulata</i> .....	22
Tabela 3. Receptores nucleares e seus ligantes .....	24
Tabela 4. Calcitriol e análogos em ensaios clínicos .....	33
Tabela 5. Aplicações clínicas para análogos da vitamina D .....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AF-1** – Região de ativação 1

**AF-2** – Região de ativação 2

**BFP** – Proteína Fluorescente Azul

**BP** – Pares de bases

**BSA** – Albumina do soro bovino

**CG** – Meio Circlegrow

**DBD** – Domínio de ligação do DNA

**DMEM** – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

**GR** – Receptor de glicocorticóide

**GR $\alpha$**  – Receptor de glicocorticóide  $\alpha$

**hVDR** – Receptor da vitamina D humano

**IFN- $\gamma$**  – Interferon  $\gamma$

**IL-1** – Interleucina 1

**IL-2** – Interleucina 2

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-12** – Interleucina 12

**IMAC** – Cromatografia de afinidade por íons metálicos

**LB** – Meio Luria-Bertani

**LBD** – Domínio de ligação do ligante

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**LUC** – Luciferase

**M/V** – Massa/volume

**MPLC** – Cromatografia líquida por pressão média

**NEQs** – Novas entidades químicas

**NF-AT** – Fator nuclear de células T ativadas

**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear  $\kappa$ B

**OD** – Densidade ótica

**PBS** – Salina tamponada com fosfato

**PFA** – Paraformaldeído

**PMSF** - Fluoreto de  $\alpha$ -fenilmetanosulfonila

**RN** – Receptor nuclear

**RXR** – Receptor de ácido retinóico

**SBF** - Soro bovino fetal

**SF-1** – Fator esteroidogênico -1

**TLC** – Cromatografia de camada fina

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**V/V** – Volume/volume

**VDR** – Receptor da vitamina D

**YFP** – Proteína fluorescente amarela

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 PRODUTOS NATURAIS E NOVAS ENTIDADES QUÍMICAS BIOATIVAS .....	17
1.2 <i>PHYSALIS ANGULATA</i> .....	18
1.3 AS FISALINAS ISOLADAS A PARTIR DA <i>PHYSALIS ANGULATA</i> .....	19
1.4 RECEPTORES NUCLEARES .....	23
1.4.1 Aspectos gerais dos receptores nucleares .....	23
1.4.2 Estrutura canônica dos receptores nucleares .....	25
1.4.3 Mecanismo de ação dos RNs .....	27
1.4.4 Importância farmacológica dos receptores nucleares .....	29
1.5 O RECEPTOR DA VITAMINA D .....	29
1.6 O RECEPTOR DA VITAMINA D E AS FISALINAS .....	34
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	37
3.1 OBJETIVO GERAL .....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37

<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
4.1 OBTENÇÃO DAS FISALINAS .....	38
4.2 PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO PEYFP-VDR .....	38
4.3 PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO pEYFP-VDR A PARTIR DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> TOP10F' .....	39
4.4 CULTURA DE CÉLULAS COS-7 .....	40
4.5 PROCEDIMENTOS DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS COS-7 .....	40
4.6 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO DO VDR SOB ESTIMULAÇÃO COM FISALINAS .....	40
4.7 EXPANSÃO DOS PLASMÍDEOS PTA-LUC E PVDR-LUC .....	41
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO RECEPTOR DE VITAMINA D SOB ESTIMULAÇÃO COM FISALINAS .....	41
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
4.10 EXPRESSÃO DO VDR .....	43
4.11 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DO VDR EXPRESSO EM BL21(DE3) ROSETTA .....	43
4.12 DESNATURAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA VDR INSOLÚVEL .....	44
4.13 RENATURAÇÃO DO VDR .....	45

4.14 DOSAGEM DE PROTEÍNAS – MÉTODO DE BRADFORD .....	45
4.15 RETIRADA DA CAUDA DE HISTIDINA E CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA PROTEÍNA .....	45
<b>4.15.1 Metodologia para digestão de proteínas em gel 2D .....</b>	<b>46</b>
<b>4.15.2 Espectrometria de massa .....</b>	<b>46</b>
<b>4.15.3 Pesquisa nos bancos de dados e identificação das proteínas .....</b>	<b>47</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
5.1 ENSAIO DE TRANSLOCAÇÃO .....	49
5.2 ENSAIO DE ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D .....	51
5.3 EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D .....	52
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

# 1. INTRODUÇÃO

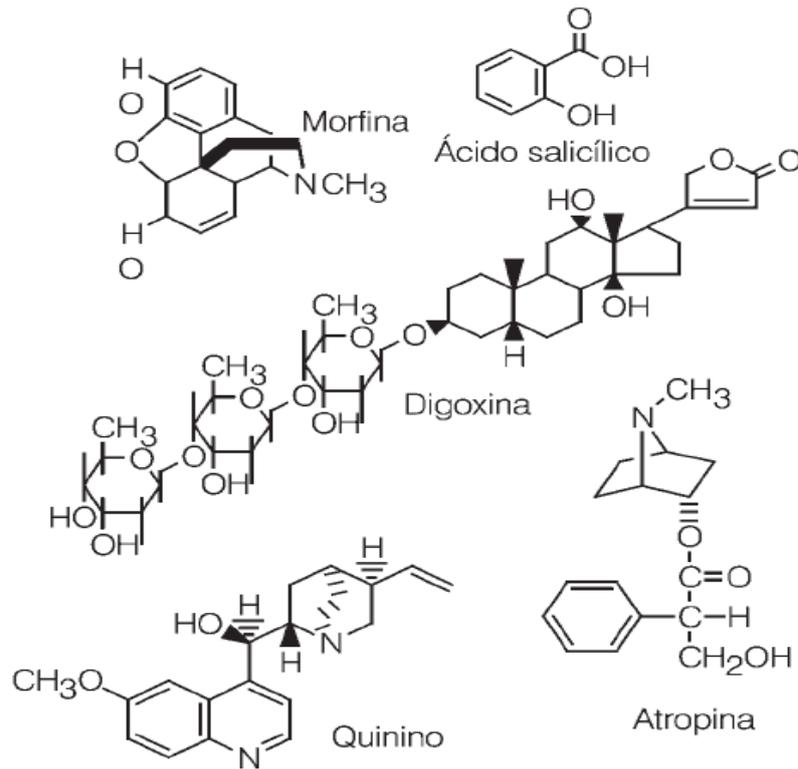
## 1.1 PRODUTOS NATURAIS E NOVAS ENTIDADES QUÍMICAS BIOATIVAS

Desde os primórdios da humanidade, os produtos naturais têm desempenhado um papel importante no tratamento e prevenção de doenças humanas (CHIN et al., 2006). As histórias das grandes civilizações (Greco-Romana, Chinesa e Egípcia) são ricas na utilização de produtos da natureza na cura de doenças e controle de pragas (JUNIOR et al., 2006).

No entanto, ao longo da história, a natureza tem se mostrado mais que uma fornecedora de alimento e tratamento, é também uma fonte de inspiração, aprendizagem e desenvolvimento. Um estudo realizado entre 1981 e 2002 mostrou que 28% das Novas Entidades Químicas (NEQs) são compostas por produtos naturais ou drogas derivadas de produtos naturais. Além disso, 24% das NEQs mimetizam grupos farmacóforos relacionados a produtos naturais (JUNIOR et al., 2006; NEWMAN et al., 2000; 2003).

O Brasil é detentor de uma das maiores biodiversidades do mundo. Estimativas apontam que existem neste país cerca de dois milhões de espécies distribuídas entre vegetais, animais e microorganismos. Além disso, o Brasil é considerado o país com a maior diversidade vegetal do planeta, com algo em torno de 350.000 a 550.000 espécies no total; sendo que delas, apenas cerca de 55.000 foram catalogadas (SANDES & Di BLASI, 2005).

Os vegetais terrestres têm sido verdadeiros mananciais de NEQs, fornecendo tratamento para as mais diversas doenças, a exemplo do ácido salicílico, da morfina e do quinino. (Figura 1) (ALVES, 2001).



**Figura 1. Exemplos de entidades químicas oriundas de produtos naturais.** Fonte: Alves, 2001.

Sendo assim, a busca de novos compostos isolados a partir de fontes naturais na biodiversidade brasileira poderá contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos. Além disso, este tipo de trabalho pode promover o desenvolvimento sustentável de comunidades através do cultivo das espécies de interesse econômico.

## 1.2 *PHYSALIS ANGULATA*

Entre as angiospermas destaca-se uma família complexa denominada Solanaceae, a qual inclui uma série de plantas interesse econômico e farmacológico. (SILVA & AGRA, 2005; TOMASSINI et al., 2000; DI STASI & LIMA, 2002; MATHIAS & MOSCHETTO, 2010).

Pertencente a esta família está o gênero *Physalis*. O nome do gênero vem do grego *physis* = "bexiga, bolha", referindo-se à forma do fruto, bem característica. O gênero *Physalis* possui cerca de 120 espécies distribuídas por todo o mundo, inclusive no Brasil. (TOMASSINI et al., 2000; SILVA & AGRA, 2005; DI STASI & LIMA, 2002).

A *Physalis angulata* (Figura 2) é conhecida popularmente como Camapu, Balãozinho, Juá-de-capote, Mulaca, entre outros nomes. Seu fruto é usado na culinária como ingrediente para molhos, compotas, doces, geléias, sorvetes e licores (Figura 3). Folhas, frutos e raízes são usados na medicina popular (Tabela 1). Diversos estudos com extratos e frações da planta já foram realizados, e sugerem o seu potencial farmacológico (SILVA & AGRA, 2005; DI STASI & LIMA, 2002; MATHIAS & MOSCHETTO, 2010).



**Figura 2.** *Physalis angulata*: Aspecto geral do ramo com flor e fruto. Fonte: Di Stasi e Lima, 2002.



**Figura 3.** Fruto da *Physalis angulata*. Fonte: Mathias & Moschetto, 2010.

Tabela 1. Usos da *Physalis angulata* na medicina popular brasileira

LOCAL	USO POPULAR	FONTES
Amazônia	Malária Afecções hepáticas Dores de Ouvido	Di Stasi & Lima, 2002; Schultes & Raffauf, 1990; Flore, 1984
Amazônia e Minas Gerais	Calmante Reumatismo Diurético	Corrêa, 1984; Gavillanis et al., 1982 apud Di Stasi & Lima, 2002; Duke & Vasquez, 1994
Pará	Afecções hepáticas Inflamações Tosse Dores no corpo	Amorozo & Gély, 1998
Paraíba	Problemas Renais	Agra, 1980
Brasil	Reumatismo Crônico Dermatites e outras Afecções da pele Febre Vômito Problemas hepáticos e de vesícula Problemas Renais	Almeida, 1993

Segue-se a descrição botânica da espécie *Physalis angulata* feita por Di Stasi e Lima (2002):

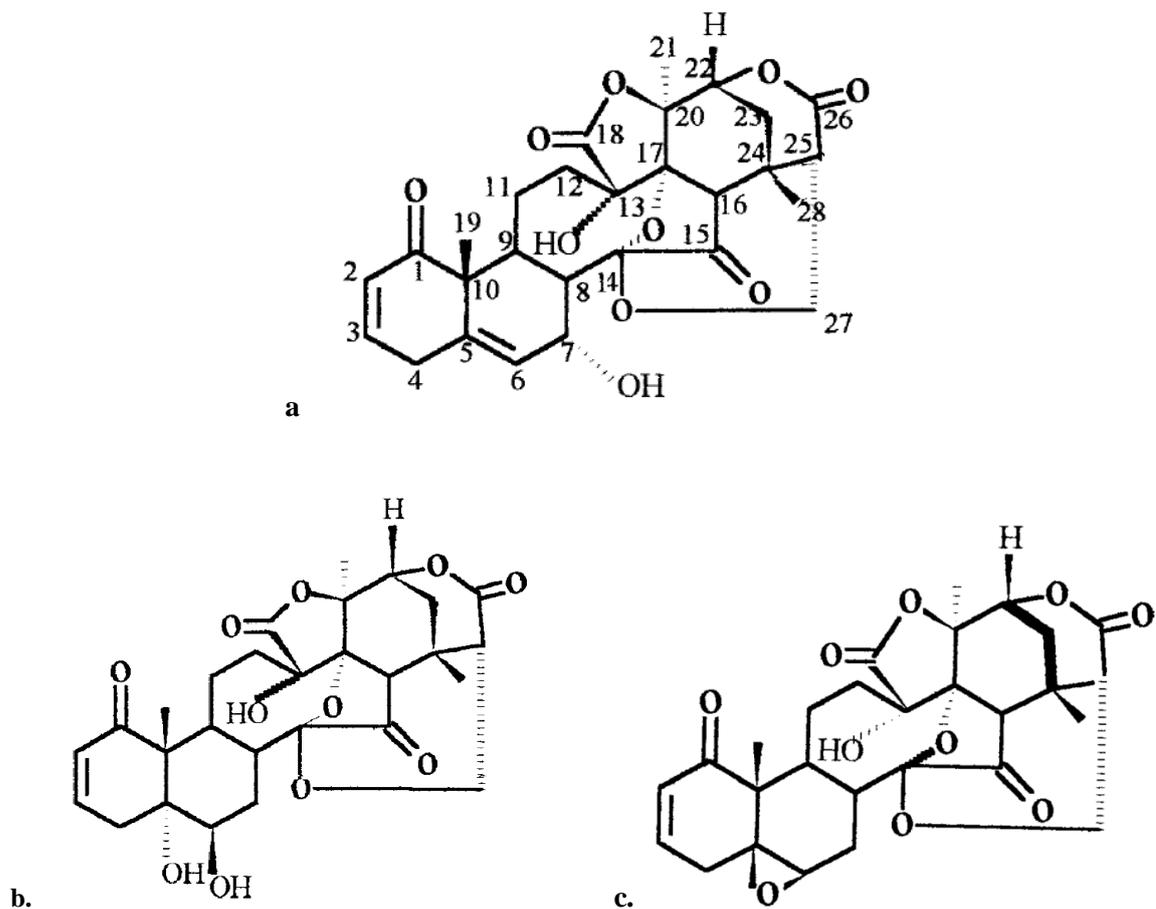
Erva com muitos ramos, glabra; caule verde, ereto e crasso; folhas inteiras, sem estipulas, agudas, longo-pecioladas; flores amarelas, pequenas, pentâmeras, diclamídeas, hermafroditas, com anteras azuladas; androceu com cinco estames; ovário bicarpelar, bilocular, súpero; fruto esverdeado do tipo baga. Possui semente rufescente.

Por ser usada na culinária e dotada de componentes que beneficiam a saúde, a *Physalis angulata* é considerada uma ótima alternativa de plantio, que pode render lucros ao pequeno e médio produtor (MATHIAS & MOSCHETTO, 2010).

### 1.3 AS FISALINAS ISOLADAS A PARTIR DA *PHYSALIS ANGULATA*

Estudos fitoquímicos realizados com a *P. angulata* descreveram vários tipos de entidades químicas bioativas, incluindo flavonóides, alcalóides e muitos tipos diferentes de esteróides (TAYLOR; 2005).

Dentre os esteróides obtidos a partir da purificação da *Physalis angulata* estão as fisalinas, vitaesteróides derivados do ergostano com modificações tipo 16-24-ciclo-13-14-seco, de estruturas bastante complexas (Figura 4) (TOMASSINI et al., 2000).



**Figura 4.** Fórmulas estruturais das fisalinas F e D isoladas a partir da *Physalis angulata*: a. Esqueleto básico das Fisalinas, b. Fisalina D, c. Fisalina F.

Diversos estudos vêm sendo realizados com as fisalinas isoladas da *Physalis angulata*, comprovando experimentalmente as suas ações biológicas (Tabela 2).

Tabela 2. Atividades biológicas das fisalinas isoladas a partir da *Physalis angulata*

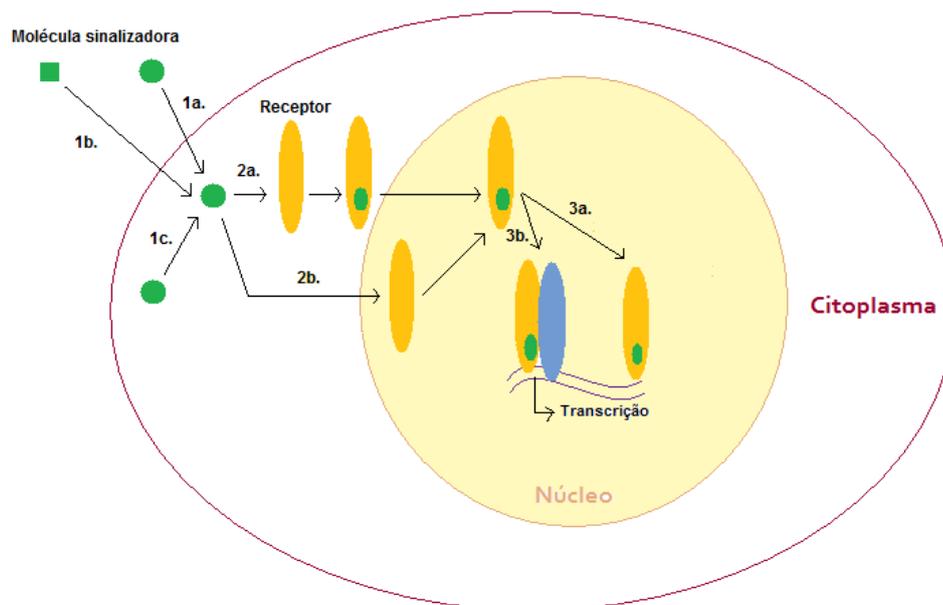
SUBSTÂNCIA(S) UTILIZADA(S)	ATIVIDADE	FONTES
Fisalina D	Ação contra linhagem de mielocarcinoma	Kawai et al., 1991 apud Tomassini et al., 2000
Fisalinas B, F	Ação contra tumor de cervix uterina	Sahai et al. 1982 apud Tomassini et al., 2000; Matsuura, 1970 apud Tomassini et al., 2000; Chiang et al., 1993
Fisalina F	Ação contra hepatoma; Efeito antitumoral <i>in vivo</i> na leucemia linfocítica em camundongos	Chiang et al., 1993
Fisalinas B, F e G	Ação imunomoduladora: <ul style="list-style-type: none"> <li>Inibição da ativação de macrófagos <i>in vitro</i> e produção de óxido nítrico, TNF-<math>\alpha</math>, IL-6 e IL-12.</li> <li>Inibição da produção de TNF-<math>\alpha</math> <i>in vivo</i> e da mortalidade induzidas pela injeção de dose letal de lipopolissacarídeo.</li> </ul>	Soares et al., 2003
Fisalinas B e F	Ação antiinflamatória: <ul style="list-style-type: none"> <li>Inibitória no aumento de permeabilidade vascular induzida por reperfusão</li> <li>Inibitória no recrutamento de neutrófilos para intestino e pulmão</li> <li>Inibitória sobre hemorragia intestinal</li> </ul>	Vieira et al., 2005
Fisalinas B, F e G	Ação imunomoduladora: <ul style="list-style-type: none"> <li>Inibitória na ativação de linfócitos <i>in vitro</i></li> <li>Inibitória da rejeição de alotransplantes <i>in vivo</i></li> </ul>	Soares et al., 2006
Fisalina F	Ação em artrite: <ul style="list-style-type: none"> <li>Inibição de edema</li> <li>Diminuição da inflamação em articulações</li> </ul>	Brustolim et al. 2009
Fisalina B, F e G	Atividade leishmanicida	Guimarães et al. 2010
Pool de fisalinas (Fisalinas B, F e D) e Fisalinas B e D	Atividade contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Januário et al. 2002
Pool de fisalinas (Fisalinas B, D, F, G)	Atividade contra cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Silva et al., 2005

## 1.4 RECEPTORES NUCLEARES

### 1.4.1 Aspectos gerais dos receptores nucleares

A superfamília de receptores nucleares (RNs) agrupa uma série de fatores de transcrição acionados por ligantes lipofílicos. Os RNs estão envolvidos em diversos eventos celulares e são a maior classe de reguladores transcripcionais dos metazoários (ROBYR et al., 2000; ROBINSON-RECHAVI et al., 2003).

Os ligantes relacionados aos RNs são moléculas sinalizadoras pequenas que conseguem romper a barreira plasmática das células alvo e interagir com seus receptores específicos (Figura 5). (OLEFSKY, 200; ARANDA & PASCUAL, 2001; ALBERTS et al., 2004).



**Figura 5. Esquema da via de sinalização envolvendo receptores nucleares:** O ligante pode romper a barreira plasmática da célula já em sua forma ativa (1a.), como um precursor (1b.), ou pode ser sintetizado na célula (1c.). Com certos tipos de receptores a interação ocorre no citoplasma (2a.) o que promove a translocação do receptor ativo para o núcleo; enquanto que em outros casos a molécula de sinal encontrará o receptor já no núcleo (2b.). O receptor nuclear ativado interage com elementos de resposta presentes no DNA da célula, na forma de monômero (3a.) ou dímero (3b.), promovendo a transcrição gênica.

Dentro da RNs estão os receptores ativados por hormônios tireoidianos, esteróides, retinóides, ácidos graxos, prostaglandinas e vitamina D, além dos receptores órfãos, alcunhados desta forma por ainda não terem sido descobertos os seus ligantes (Tabela 3). (GRONEMEYER et al., 2004; OLEFSKY, 2001).

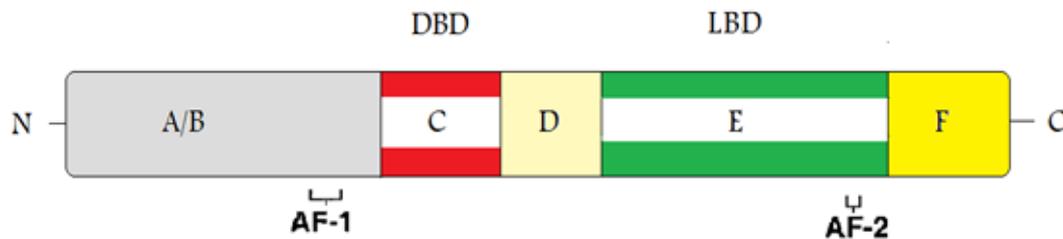
Tabela 3. Receptores nucleares e seus ligantes

NOME	ABREVIATURA	LIGANTE
Receptor dos hormônios tireoidianos	TR $\alpha$ e TR $\beta$	Hormônios tireoidianos
Receptor do ácido retinóico	RAR $\alpha$ ; RAR $\beta$ e RAR $\gamma$	Ácido retinóico
Receptor ativado por proliferadores peroxissomais	PPAR $\alpha$ PPAR $\beta$ PPAR $\gamma$	Ácidos graxos e Leucotrienos B4 Ácidos graxos Ácidos graxos e Prostaglandinas J2
ErbA Reversa	Rev-erba e Rev-erb $\beta$	Órfãos
Receptor órfãos relacionados a RARs	ROR $\alpha$ ROR $\beta$ e ROR $\gamma$	Colesterol e colesterol sulfato Ácido retinóico
Receptor hepático X	LXR $\alpha$ e LXR $\beta$	Oxiesteróis
Receptor farnesoide X	FXR $\alpha$ FXR $\beta$	Ácidos biliares, Fexaramina Lanosterol
Receptor da vitamina D	VDR	1 $\alpha$ ,25-dihidroxi vitamina D <sub>3</sub> e ácido litocólico
Receptor do pregnano X	PXR	Xenobióticos e PCN
Receptor constitutivo de Androstano	CAR	Xenobióticos e fenobarbital
Fator nuclear humano 4	HNF4 $\alpha$ e HNF4 $\beta$	Órfãos
Receptor retinoide X	RXR $\alpha$ ; RXR $\beta$ e RXR $\gamma$	Ácido retinóico
Receptor testicular	TR2 e TR4	Órfãos
<i>Talless</i>	TLL	Órfão
Receptor nuclear fotorreceptor específico	PNR	Órfão
Fator promotor de transcrição de ovo-albumina de galinha	COLP-TFI e COUP-TFII	Órfãos
Gen-2 relacionado a ErbA-2	EAR2	Órfão
Receptor de estrogênio	ER $\alpha$ ER $\beta$	17 $\beta$ - Estradiol, tamoxifeno raloxifeno 17 $\beta$ - Estradiol e vários compostos sintéticos
Receptor relacionado ao ER	ERR $\alpha$ ERR $\beta$ e ERR $\gamma$	Órfão DES e 4-OH-tamoxifeno
Receptor de glicocorticóide	GR	Cortisol, dexametasona e RU486
Receptor de mineralocorticóide	MR	Aldosterona e espirolactona
Receptor de progesterona	PR	Progesterona, acetato de medroxiprogesterona e RU486
Receptor de androgênio	AR	Testosterona, flutamida
Fator B induzido por NGF	NGFIB	Órfão
Fator 1 relacionado a Nur	NURR1	Órfão
Receptor órfão 1 neuro-derivado	NOR1	Órfão
Fator esteroidogênico 1	SF	Órfão
Receptor 1 homólogo ao receptor hepático	LRH1	Órfão
Fator nuclear da célula germinativa	GCNF	Órfão
Região crítica do cromossomo para DSS-AHC, gene 1	DAX1	Órfão
Parceiro heterodimérico curto	SHP	Órfão

DES, dietilestilbestrol; DSS-AHC, *dosage sensitive sex*-hipoplasia adrenal congênita; NGF, fator de crescimento nervoso; PCN, 16 $\alpha$ -carbonitrila pregnenolona. Fonte: Gronemeyer et al., 2004.

### 1.4.2 Estrutura canônica dos receptores nucleares

Os RNs apresentam uma organização estrutural semelhante, composta por módulos com funções específicas que abrangem ligação ao DNA, interação com ligante, dimerização, etc. (Figura 6).

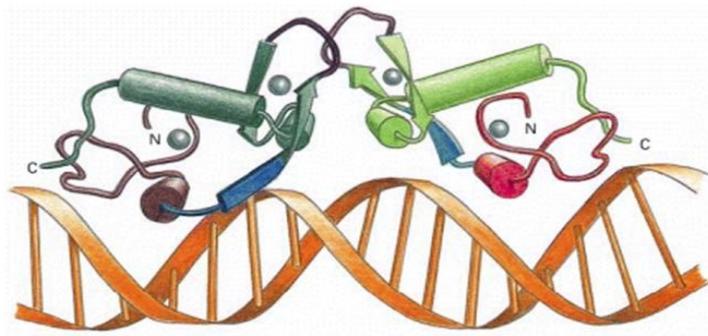


**Figura 6. Representação esquemática dos receptores nucleares:** N- Porção amino-terminal; C- Porção carboxi-terminal.

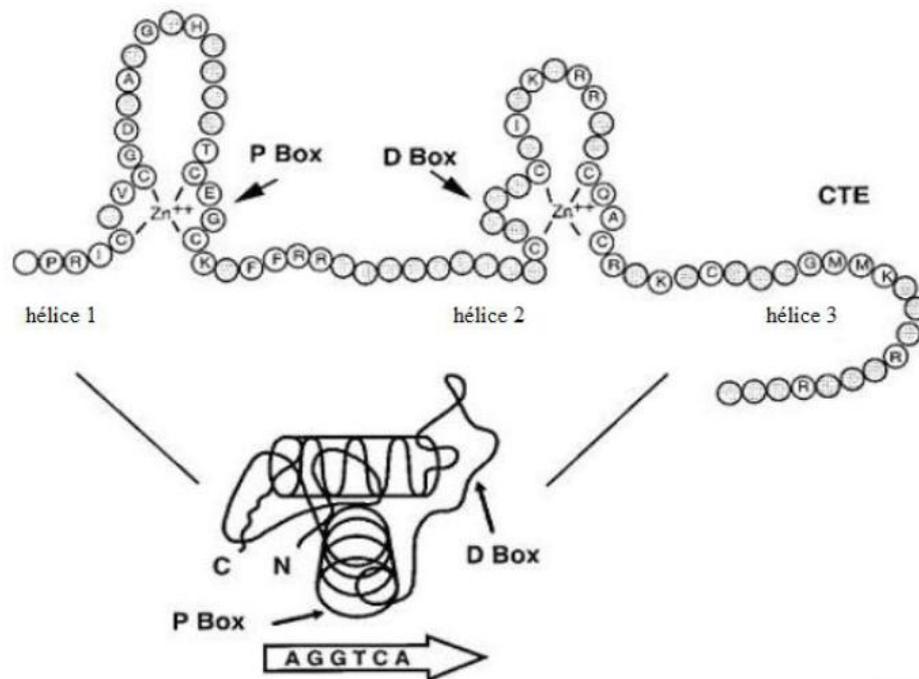
Devido às suas características, podemos dizer que os RNs atuam de forma direta tanto na transdução de sinal como também no controle transcricional (BOURGUET et al., 2000; OLEFSKY, 2001; ARANDA & PASCUAL, 2001; ALBERTS et al., 2006).

O domínio A/B é muito variável entre os receptores (pode ter de 50 a mais de 500 aminoácidos), sendo diferente, inclusive, para isoformas do mesmo receptor (ex: TR $\alpha$  e TR $\beta$ ). Este domínio possui uma região de ativação independente do ligante, chamada AF-1 (*activation function*) e vários domínios de transativação autônomos. Possui ainda atividade celular seletiva, bem como especificidade para promotor, sendo considerado importante para o reconhecimento dos coativadores e de outros fatores de transcrição. O domínio A/B pode ser alvo de fosforilação (ROBINSON-RECHAVI et al., 2003; ARANDA & PASCUAL, 2001).

O domínio de ligação do DNA (DBD) ou domínio C é a região mais conservada entre as estruturas dos receptores nucleares (Figura 7). É responsável pela ligação do receptor às seqüências específicas de nucleotídeos no promotor de genes-alvo regulados por ele, sendo também o efetor da ativação gênica. O DBD contém estruturas chamadas dedos de zinco (*zinc fingers*), importantes na interação com a molécula de DNA. Possui também estruturas chamadas *P-box* e *D-box*, sendo a primeira responsável pela ligação específica à seqüência de DNA contendo RGGTCA (R é uma purina), enquanto que a segunda age na dimerização dos receptores (Figura 8) (GRONEMEYER et al., 2004; ROBINSON-RECHAVI et al., 2003; ARANDA & PASCUAL, 2001).



**Figura 7. Domínio de ligação ao DNA de receptor nuclear:** Cada um dos dedos de zinco contém dois átomos de Zn (indicados pela pequenas esferas cinza); um deles estabiliza a hélice de reconhecimento do DNA (em marrom e em vermelho), e uma estabiliza um loop (mostrado em roxo) envolvidos na dimerização. O exemplo mostrado são os DBDs das duas subunidades do dímero de receptor de glicocorticóide. Fonte: Alberts et al., 2004.



**Figura 8. Domínio de ligação do DNA e dedos de zinco.** Diagrama apresenta dois dedos de zinco e a extensão COOH terminal (CTE). Nos dedos de zinco, quatro cisteínas conservadas coordenam um íon de zinco. Outros resíduos conservados são mostrados e designados pelas letras correspondentse. A hélice 1 contém resíduos de P box envolvidas na discriminação dos elementos de respostas. Resíduos no segundo dedo de zinco rotuladas como D box forma a interface de dimerização. O CTE contém a T e a A box, críticas para a ligação monomérica com o DNA. Conforme mostrado no painel inferior, as hélices 1 e 2 situam-se perpendicularmente para formar o núcleo do DBD que reconhece os semi-sítios para elementos de resposta. Fonte: Aranda & Pascual, 2001.

O domínio D é conhecido como dobradiça ou *hinge*, e localiza-se entre o DBD e o LBD (domínio de ligação do ligante), permitindo certa movimentação destes dois domínios um em relação ao outro. Não é muito conservado entre os receptores, mas mostra aparente

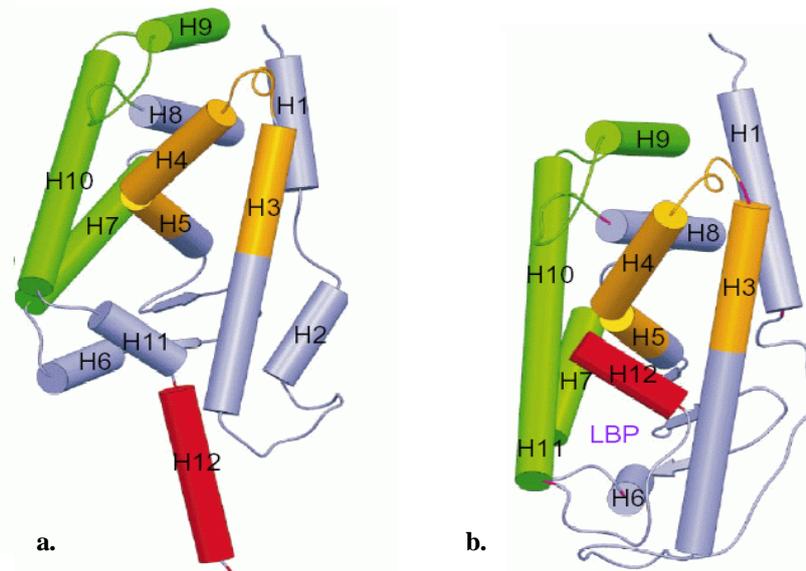
relação com a localização nuclear e com interação dos RNs e co-repressores (ARANDA & PASCUAL, 2001).

O domínio de ligação ao ligante (LBD) ou região E é um domínio polifuncional que permite a união dos receptores aos seus respectivos ligantes promovendo sua ativação e também media a formação de dímeros, ligação com co-repressores e co-ativadores. O LBD é um domínio bastante conservado entre os receptores, mas guarda variações suficientes para reconhecimento específico do ligante. Na sua porção carboxiterminal encontra-se uma região ativação dependente do ligante chamada AF-2, que é vital para a interação transcricional regulada (GRONEMEYER et al., 2004; ARANDA & PASCUAL, 2001; WURTZ et al., 1996).

A região F não está presente em todos os RNs, e sua função ainda é desconhecida (ROBINSON-RECHAVI et al., 2003).

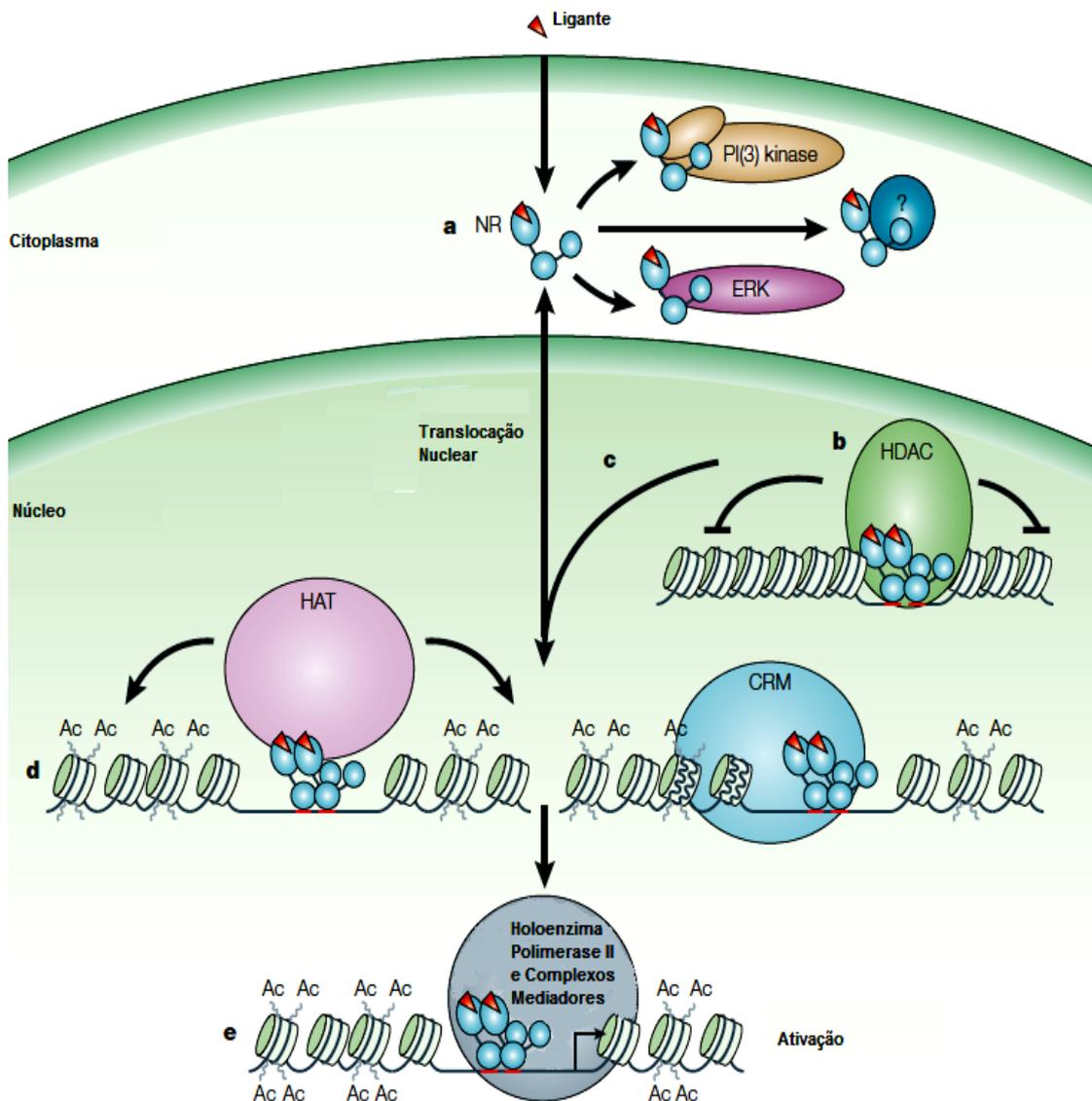
### 1.4.3 Mecanismo de ação dos RNs

O mecanismo de ação dos RNs começa com a interação do ligante com o LBD do receptor. Após esta interação ocorrem alterações conformacionais no LBD (Figura 9).



**Figura 9. Desenho esquemático do domínio de ligação do ligante de receptores nucleares em duas conformações: a.** LBD do receptor de ácido retinóico (RAR $\alpha$ ) não ligado (apo). **b.** LBD do receptor retinóide X (RXR $\alpha$ ) ligado (holo). A forma holo apresenta-se mais compacta que a forma apo, o que é evidente pelo posicionamento da hélice 12 (em vermelho). OBS.: A comparação entre os LBDs deste dois diferentes receptores é possível devido a similaridade de suas estruturas terciárias. Abreviatura: LBP- *ligand-binding pocket*. Fonte: Bourguet et al., 2000.

As alterações no LBD levam à liberação de co-repressores e interação com co-ativadores, além de promover uma maior estabilização do receptor. A depender do tipo do RN, a interação poderá ocorrer à nível de citoplasma ou núcleo, sendo que no primeiro caso após a interação com o ligante ocorre a migração do receptor em direção ao núcleo. A consequência deste processo é a interação do DBD com genes-alvo, resultando na regulação da transcrição gênica (Figura 5 e Figura 10) (GRONEMEYER et al., 2004).



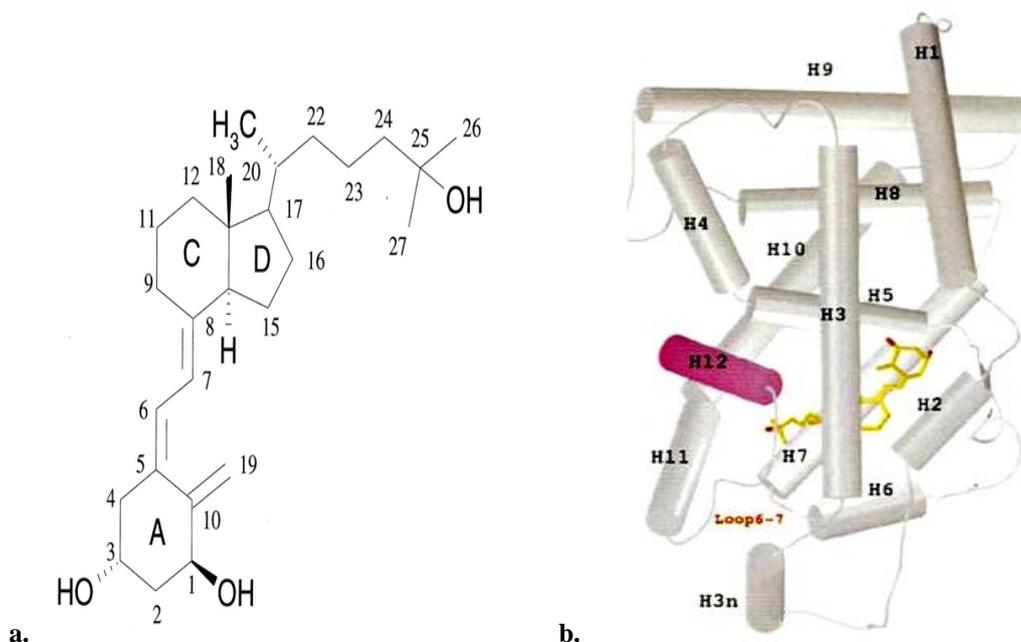
**Figura 10. Esquema de ativação transcricional pelos receptores nucleares:** (a). O complexo receptor ligante modula diversos fatores. Muitos RN em ausência dos ligantes podem apresentar-se ligados a regiões regulatórias dos genes-alvo atuando como co-repressor ou formando complexos de histonas desacetilases (HDAC) (b). Os HDACs são responsáveis pela condensação do DNA e consequentemente pelo silenciamento do gene, o que explica a ação repressora de alguns receptores quando na forma apo (não ligada). Com a ligação da molécula sinalizadora, ocorre liberação da HDAC (c) e o recrutamento de histonas acetiltransferases (HAT) e de complexos de remodelamento da cromatina (CRM). (d) Isto promove o estado ideal para a acepção do complexo ativador na região onde se encontra o RN. Por fim, a holoenzima polimerase II e complexos mediadores também são recrutados, o que aumenta a frequência da inicialização transcricional. Fonte: Gronemeyer et al., 2004.

### 1.4.4 Importância farmacológica dos receptores nucleares

Os membros da superfamília de receptores nucleares estão relacionados ao desenvolvimento embrionário, metabolismo celular, processos de morte e manutenção fenotípica. Disfunções nestes receptores causam doenças proliferativas, metabólicas e reprodutivas. Em resumo, podemos dizer que a superfamília de receptores nucleares apresenta alta relevância para diversos aspectos da fisiologia humana; e, para muitas doenças, os RNs são alvos farmacológicos promissores. (LAUDET & GRONEMEYER, 2001; OLEFSKY, 2001; ARANDA & PASCUAL, 2001; ROBINSON-RECHAVI et al., 2003).

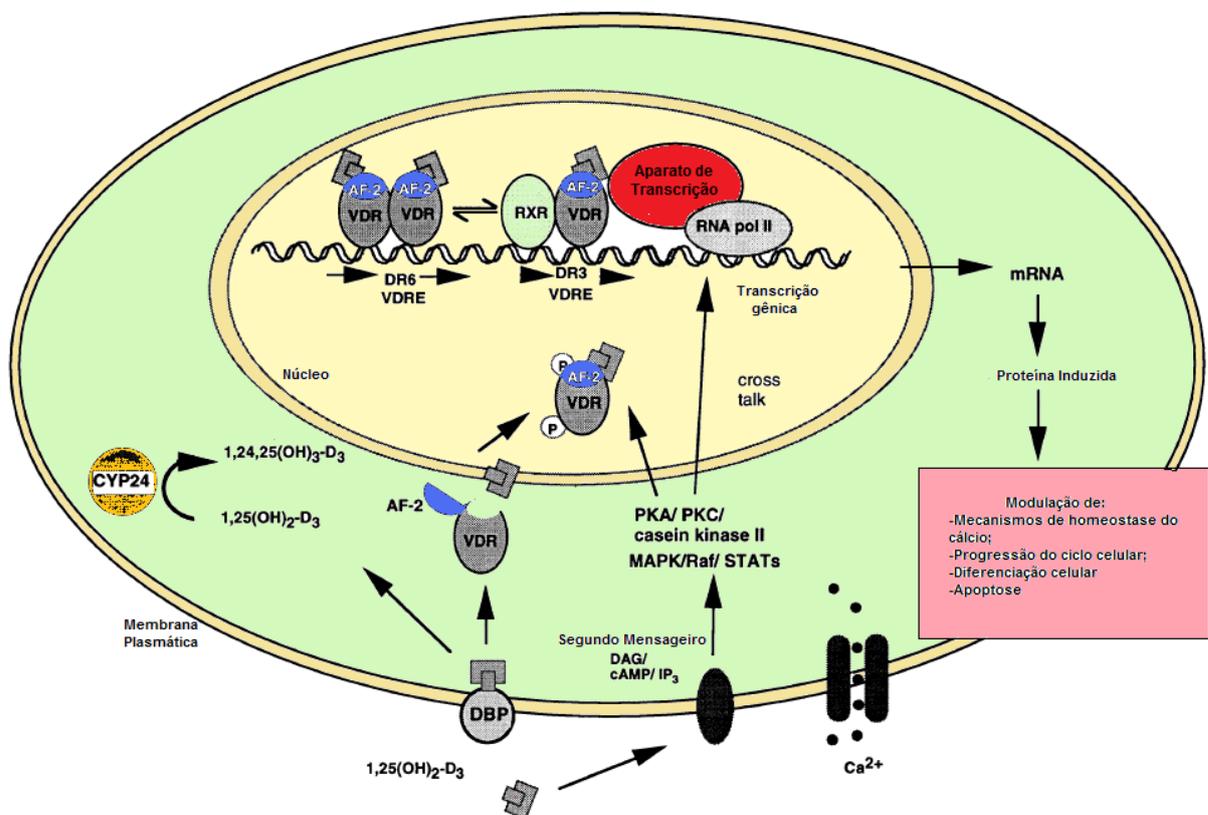
### 1.5 O RECEPTOR DA VITAMINA D

O receptor da vitamina D (VDR) é uma proteína de aproximadamente 50 kDa. Pertence a superfamília de receptores nucleares classe II e, como seu nome sugere, se liga à forma ativa da vitamina D<sub>3</sub> – 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, [1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] ou calcitriol – e seus análogos através do sítio de ligação no seu LBD (Figuras 11) (JIANG, 2004; BAKER et al., 1988; MIYAMOTO et al., 1997; TOCCHINI-VALENTINI, 2001).



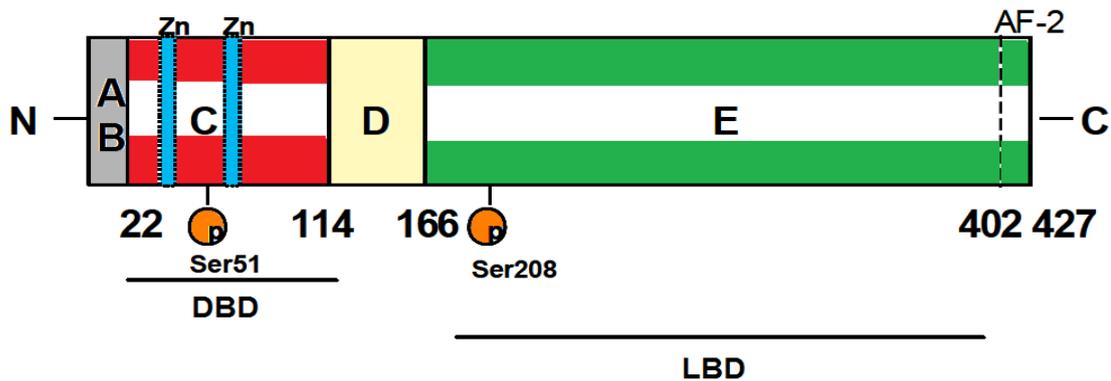
**Figura 11. Vitamina D<sub>3</sub> na forma ativa e o domínio de ligação ao ligante do VDR:** a. A vitamina D ativa apresenta uma estrutura esteróide com abertura no anel B entre os carbonos 9 e 10. b. Nesta representação a vitamina D<sub>3</sub> (em amarelo) está no domínio de ligação ao ligante do VDR. Fontes: Tocchini-Valentini, 2001; Rochel et al., 2000.

Quando ativado pelo seu ligante, o VDR transloca-se para o núcleo e interage com a região promotora do DNA com a qual apresenta afinidade (elementos responsivos). Nesta condição, o VDR atuará como fator de transcrição gênica, modulando-a e assim produzindo múltiplos efeitos biológicos (Figura 12) (ISSA et al., 1998; BAKER et al., 1988; RACZ & BARSON, 1999). A translocação é uma das primeiras formas de avaliação da atividade do VDR frente a um ligante homólogo à vitamina D, o que também pode ser feito a partir da avaliação da atividade transcricional (YASMIN et al., 2005; RACZ & BARSONY, 1999).



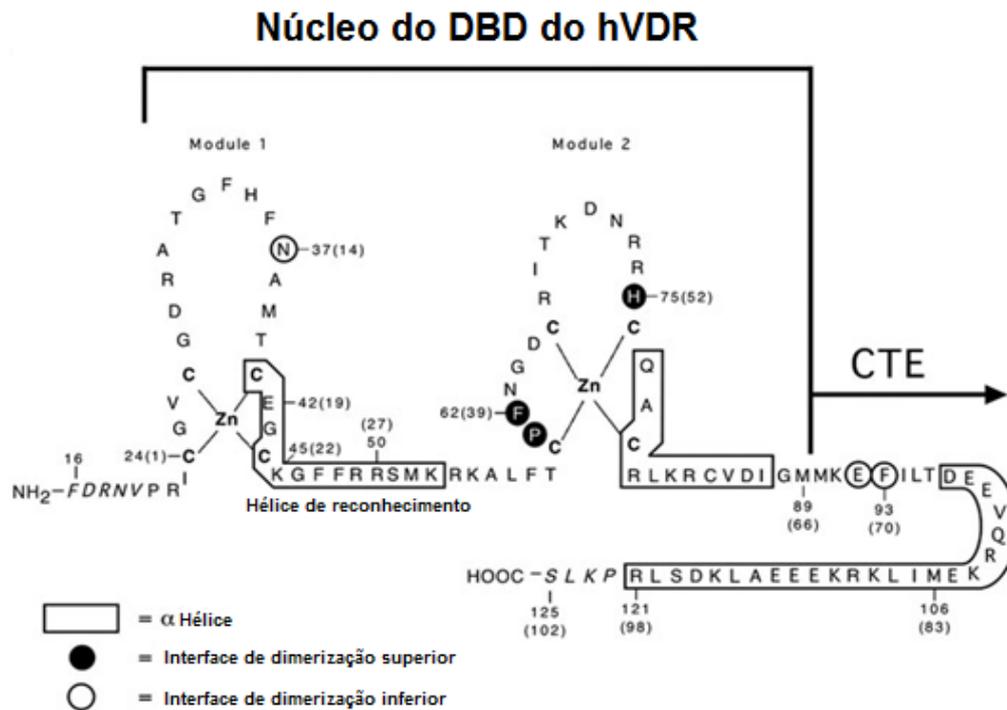
**Figura 12. Modelo de vias de sinalização celulares relacionadas a ação do calcitriol:** O calcitriol entra na célula após liberar-se da proteína de ligação da vitamina D (DBP). As ações rápidas não-genômicas do calcitriol incluem a abertura de canais  $\text{Ca}^{2+}$  e ativação das vias de segundo mensageiro que se envolvem em interação cruzada com a via ativada por ligante. A ativação mediada por ligante resulta na fosforilação e transporte do VDR para o núcleo. Os homodímeros de VDR ou heterodímeros com RXR interagem com elementos de resposta a vitamina D (VDREs) em promotores dos genes alvos. A interação com a maquinaria de transcrição é essencial para iniciar a transdução do sinal. O resultado deste processo é a regulação da expressão de proteínas envolvidas na resposta celular. Também é mostrada a via metabólica do calcitriol através 24-hidroxilase (CYP24). Fonte: Issa, 1998.

O VDR segue a estrutura canônica dos demais receptores nucleares, com algumas peculiaridades. Em comparação com outros RNs, o VDR não possui a região AF-1. Além disso, a remoção do domínio A/B (a qual se apresenta em pequeno tamanho neste receptor) não afeta suas funções. Outra questão interessante à respeito deste receptor é que ele possui sítios de fosforilação no DBD e no LBD (Figura 13) (JIANG, 2004).



**Figura 13. Estrutura molecular do VDR:** O DBD possui dois domínios dedos de zinco. O LBD contém interfaces de heterodimerização. O VDR apresenta dois sítios de fosforilação (Ser 51 e Ser 208).

No DBD-VDR destacam-se os dois domínios dedos de zinco, que são os motivos de ligação ao DNA marcantes dos RNs. A maioria das mutações naturais encontradas no VDR humano estão localizados no DBD (Figura 14), na região dos dedos de zinco, resultando no fenótipo clínico mais grave da resistência à vitamina D (HAUSSLER, 1998; JIANG, 2004).



**Figura 14. O domínio de ligação ao DNA do VDR humano:** Números fora dos parênteses indicam a ordem do resíduo na sequência completa do hVDR e aqueles entre parênteses referem-se à numeração esquemática comum dos DBDs de receptores de hormônios. CTE: extensão COOH terminal. Fonte: Shaffer & Gewirth, 2002.

O VDR atua na modulação gênica de diversas células, estimulando a transcrição ou inibindo-a através da sua ligação com os elementos de resposta à vitamina D. A sua principal ação é a homeostase do cálcio e do fósforo (ISSA et al. 1998; DUSSO et al., 2005); no entanto, a onipresença do VDR em tecidos diversos demonstra a sua participação em outros processos fisiológicos além da atividade específica sobre o metabolismo mineral. (ISSA et al. 1998, BARRAL et al., 2007; BOUILLON et al., 1995; DUSSO et al., 2005; NEGPAL et al., 2005).

Atividades imunomoduladoras, anti-proliferativas, pró-diferenciadoras e anti-neoplásicas vêm sendo associadas à vitamina D<sub>3</sub> ativa e seus análogos, sendo estas ações relacionadas à interação destes ligantes com o VDR (NEGPAL et al., 2005; KOCHUPILLAI, 2008). Muitos ensaios terapêuticos e testes em modelos animais utilizando ligantes do VDR têm demonstrado o potencial destes no tratamento de diversas doenças (Tabela 4).

Tabela 4. Calcitriol e análogos em ensaios clínicos

LIGANTE DO VDR	INDICAÇÃO	RESULTADO
Calcitriol	Osteoporose	Melhora do BMD
Calcitriol	Osteoporose	Redução da taxa de fratura vertebral
EB 1089	HCC	2 dos 33 pacientes responderam completamente 12 tiveram a doença estabilizada
Calcitriol oral	Psoríase	Melhora em 88% de 270 pacientes
Calcitriol tópico	Psoríase	Melhora em 79% de 155 pacientes
Calcipotriol	Psoríase	Melhora da doença
Tacalcitol	Psoríase	Melhora do escore PASI
Mexacalcitol	Psoríase	Melhora do escore PASI
ED-71	Osteoporose	Melhora do BMD (estudo de fase 2)
RS-980400	Osteoporose	Melhora do BMD (estudo de fase 2)
Paricalcitol	2HPT	Supressão do Ipth
OCT	2HPT	Supressão do Ipth
Alfacalcidol	MDS	Sobrevivência livre de leucemia
Alfacalcidol	Artrite	Melhora da doença
Calcitriol	PA	Melhora da doença
Calcitriol	Câncer de próstata	Diminuição de origem PSA
Calcitriol	Câncer de próstata	Sobrevivência e diminuição de origem PSA
Calcipotriol	KS	Regressão do tumor

BMD: densidade mineral óssea; EB 1089: Selcacitol; HCC: carcinoma hepatocelular; PASI: área da psoríase e índice de gravidade; ED-71: 2- $\beta$ -(3-hidroxipropoxi)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>; 2HPT: hiperparatireoidismo secundário; OCT: 22-oxacalcitrol; iPTH: hormônio paratireoideano intacto; MDS: síndromes mielodisplásicas; PA: artrite psoriática; PSA: antígeno específico da próstata. Fonte: Nagpal, 2005.

Os efeitos do calcitriol sobre o sistema imunológico incluem a supressão da ativação de células T, formação de padrões de secreção de citocinas, a modulação da proliferação e interferência na apoptose (MAY, E. et al, 2004). A 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> também influencia a maturação, diferenciação e migração de células apresentadoras de antígenos e exerce imunomodulação em células citotóxicas naturais e em células B pós-ativação. Em particular, esta regulação é mediada através da interferência com fatores de transcrição como NF-AT e NF- $\kappa$ B ou pela interação direta com os elementos responsivos à vitamina D nos promotores dos genes que codificam citocinas (ETTEN & MATHIEU, 2005; BERTOLINO & TZANNO-MARTINS, 2000; MAY, E. et al, 2004).

A potência imunomoduladora do calcitriol é comparável a outros imunossupressores, sem compartilhar seus típicos efeitos adversos (MAY, E. et al, 2004). A imunomodulação pela vitamina D<sub>3</sub> ativa e seus análogos *in vivo* tem sido demonstrada em diferentes modelos

de doenças autoimunes e transplantes. (ETTEN & MATHIEU, 2005; BERTOLINO & TZANNO-MARTINS, 2000). A disponibilidade de análogos do calcitriol com atividade imunomoduladora, em doses não hipercalcêmicas, pode permitir a exploração de seus efeitos em tratamentos clínicos de doenças auto-imunes tais como psoríase, esclerose múltipla, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e na prevenção da rejeição de enxertos (MAY, et al, 2004; ETTEN & MATHIEU, 2005; BERTOLINO & TZANNO-MARTINS, 2000) (Tabela 5).

**Tabela 5. Aplicações clínicas para análogos da vitamina D**

<b>ÓRGÃO OU ÁREA DE APLICAÇÃO</b>	<b>APLICAÇÃO CLÍNICA</b>
Osso	Osteoporose, osteodistrofia renal, raquitismo
Pele	Psoríase, doenças cutâneas hiperproliferativas, prevenção de alopecia por radiação
Sistema imune	Prevenção de doenças auto-imunes, de rejeição em transplantes, drogas substitutivas ao uso de corticóides
Câncer	Leucemia, cânceres de cólon, próstata e mama, melanoma, osteosarcoma Promoção da diferenciação celular e indução de apoptose seletiva

Fonte: Bertolino & Tzanno-Martins, 2000.

## 1.6 O RECEPTOR DA VITAMINA D E AS FISALINAS

O mecanismo de ação das fisalinas tem sido alvo de investigação. Vieira e colaboradores (2005) relatam em um de seus trabalhos relação do receptor de glicocorticóide (GR) com as fisalinas na ação antiinflamatória em experimentos de reperfusão. Porém, estudos realizados em 2003 e 2006, por Soares e associados e mais recentemente em 2010, demonstraram que as fisalinas apresentam atividades imunomoduladoras não associadas ao GR. Os autores propõem a possibilidade de algumas ações das fisalinas serem mediadas por outros receptores celulares que não o GR (SOARES et al., 2006; BRUSTOLIM et AL., 2010).

Algumas das atividades não clássicas do VDR associadas ao seu ligante vitamínico, citadas anteriormente, coincidem com atividades das fisalinas. Além disso, tanto as fisalinas como a vitamina D<sub>3</sub> em sua forma ativa podem ser classificadas quimicamente como seco-esteróides.

Nos ensaios feitos em nosso laboratório, a fisalina F tem se mostrado como a fisalina de maior atividade imunomoduladora; no outro extremo encontra-se a fisalina D que não

apresenta esta atividade (SOARES et al., 2003, 2006; GUIMARÃES et al., 2010). Estudos preliminares de *docking*, também realizado por nosso grupo e colaboradores, indicaram que a fialina F se liga ao VDR, em células de mamíferos (SOARES et al., dados não publicados). Estas informações sugerem um possível mecanismo de ação para a fialina F através da ativação do VDR.

## 2. JUSTIFICATIVA

A identificação de novas drogas para inibir a rejeição de enxertos, combater doenças auto-imunes, doenças infecciosas e câncer é uma busca de muitos. Os vegetais têm se mostrado como fontes promissoras de novas entidades químicas que servem como base para novos medicamentos. O objetivo das pesquisas neste campo é desenvolver drogas que apresentem baixo custo, fácil disponibilidade, comprovada eficiência e reduzidos efeitos colaterais quando comparados àqueles presentes no mercado.

As fisalinas - entidades químicas bioativas extraídas da *Physalis angulata* – têm se mostrado como candidatas promissoras no combate de diversas doenças, que vão desde infecções por patógenos até o câncer. Devido ao seu destaque, as fisalinas – ou moléculas que às mimetizam, podem muito brevemente tornar-se o princípio ativo de medicamentos. Sendo assim, o mecanismo de ação das fisalinas deve ser estudado.

Os conhecimentos advindos de estudos relacionados à mecânica celular envolvida na já comprovada atividade das fisalinas poderão complementar o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, química e fisicamente estável, reproduzível industrialmente. Se comprovada a interação do VDR com as fisalinas (proposta deste trabalho), tal conhecimento poderá fornecer fundamentação de cunho teórico para o entendimento aprofundado da ação do VDR ativado. Além disso, novas propostas de pesquisa de cunho terapêutico poderão surgir para as fisalinas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a fisalina F interage com o receptor da vitamina D (VDR)

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o tratamento *in vitro* com a fisalina F ativa a translocação do VDR do citoplasma para o núcleo;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade reguladora transcricional do VDR sob ação da fisalina F;
- Comparar os resultados do tratamento com a fisalina F com os obtidos com a fisalina D, que não possui atividade imunomoduladora;
- Expressar e purificar o VDR para estudos de ligação deste com as fisalinas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DAS FISALINAS

O processo de obtenção das fisalinas foi efetuado no Laboratório de Produtos Naturais – Farmanguinhos (FIOCRU/RJ) pela equipe da Dr<sup>a</sup> Therezinha Tomassini. A partir do caule de *P. angulata* provenientes do estado do Pará foi realizado um procedimento de extração etanólica. Aproximadamente 15 g do extrato resultante foram dissolvidos em metanol. Adicionou-se em seguida, solução de acetato de chumbo quente.

A mistura foi submetida à agitação por 2 horas, e subsequentemente, foram adicionados 20 g de carvão ativado. Foi realizada uma filtração, seguida por etapa de separação das frações orgânica e aquosa, realizada com tripla adição de clorofórmio à mistura, em funil de separação; o que resultou em 770 mg de fase clorofórmica.

Esta fração foi submetida à cromatografia por MPLC (cromatografia líquida por pressão média) utilizando, para eluição, o sistema de gradiente hexano/acetato de etila inicialmente na proporção 70/30 e ao final do processo a 100% do último solvente. Após a evaporação do solvente as frações foram secas e submetidas à TLC (cromatografia de camada fina), bem como aos métodos espectroscópicos. Como resultado final obteve-se 75mg de fisalina D com grau de pureza 95,6% e 56 mg de fisalina F com grau de pureza de 97,8%. As fisalinas foram então diluídas em DMSO sendo estocadas na concentração de 10 mg/mL à uma temperatura de -20°C.

### 4.2 PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO PEYFP-VDR

A subclonagem do VDR em um plasmídeo pEYFP foi feita a partir dos plasmídeos de expressão eucarióticas pEBFP-VDR e pEYFP-hGR $\alpha$ , doados respectivamente pela Dr<sup>a</sup> Noa Noy (Department of Pharmacology, Case Western Reserve University, Ohio, Estados Unidos) pelo Dr. John A. Cidlowski (Laboratory of Signal Transduction, National Institute of Environmental Health Sciences at the National Institutes of Health, Carolina do Norte, Estados Unidos). Esta etapa foi realizada pelo Dr. Geraldo Gileno e equipe (Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, FIOCRUZ/BA, Salvador, Brasil)

Os vetores pEBFP-VDR e pEYFP-hGR $\alpha$  foram digeridos separadamente com a enzima de restrição BamHI (Fermentas, Canadá) e posteriormente redigeridos com XhoI (Fermentas, Canadá) seguindo instruções do fabricante das enzimas, com o objetivo de criar extremidades coesivas que na presença de DNA ligase dessem origem ao vetor contendo o gene para o VDR associado à proteína fluorescente amarela.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (tris acetato/EDTA) contendo 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio e posteriormente analisado em luz ultravioleta (UV).

Fatias do gel contendo os produtos da digestão de tamanhos 1281 pb e 4660 pb correspondendo à hVDR (BAKER,1988) e pEYFP (OAKLEY, 1996) respectivamente, foram retiradas do gel e purificadas usando o kit da Qiagen “DNA QIAquick” (Qiagen, Duesseldorf, Alemanha).

O inserto VDR purificado e o plasmídeo pEYFP duplamente digerido e purificado foram ligados utilizando T4 ligase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) conforme instruções do fabricante. O plasmídeo resultante foi utilizado para transformar bactérias *Escherichia coli* TOP10F' eletrocompetentes.

As bactérias transformadas foram cultivadas em meio LB/ágar estéril (LB = Meio Luria-Bertani), os clones foram avaliados quanto à presença de plasmídeos com insertos compatíveis ao VDR ( $\approx$ 1.281 pb). Os clones de 1 a 8 e 10 apresentaram o plasmídeo de tamanho esperado.

#### 4.3 PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO pEYFP-VDR A PARTIR DE *ESCHERICHIA COLI* TOP10F'

A partir da placa LB/ágar seletivas (contendo kanamicina 50  $\mu$ g/mL e tetraciclina 10  $\mu$ g/mL), semeada com bactérias TOP10F' (clone 6), transformadas com pEYFP-VDR, foi coletada uma colônia, a qual se utilizou para inoculação de 5 mL de meio LB seletivo. O meio inoculado foi submetido à agitação de 250 rpm à 37°C (condição de agitação padrão) por 8 horas.

100 mL de meio LB/kanamicina/tetraciclina foi inoculado com 250  $\mu$ L da cultura inicial e foi incubado overnight sob agitação padrão. As células foram peletizadas e em seguida foi procedido a purificação do plasmídeo pYFP-VDR utilizando o kit para purificação plasmidial livre de endotoxina EndoFree Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Duesseldorf,

Alemanha), segundo os procedimentos indicados no seu manual. Ao fim dos procedimentos o DNA purificado foi quantificado espectrofotometricamente sob comprimento de onda de 260nm.

#### 4.4 CULTURA DE CÉLULAS COS-7

Células imortalizadas das linhagens COS-7 foram mantidas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF - Hyclone, Logan, EUA), 2 mM de L-glutamina (SBF - Hyclone, Logan, EUA) e gentamicina a 50 µg/mL (Sigma, St. Louis, EUA).

As células foram expandidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% sob temperatura de 37°C (condição de incubação padrão).

#### 4.5 PROCEDIMENTOS DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS COS-7

O método de transfecção escolhido foi o mediado por lipossomo utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os procedimentos foram realizados de acordo com as especificações do fabricante adaptando-as para placas de 35 mm.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO DO VDR SOB ESTIMULAÇÃO COM FISALINAS

Para avaliar se as fisalinas D e F estimulam a translocação do VDR em direção ao núcleo, foi realizado um ensaio de localização do VDR através de microscopia de fluorescência.

Células COS-7 foram transfectadas com plasmídeo pEYFP-VDR segundo tópico 4.5. Imediatamente após a transfecção, as células foram cultivadas com DMEM contendo 100 nM de calcitriol (controle positivo), dexametasona (controle negativo), Fisalinas D ou Fisalina F (YASMIN et al., 2005; RACZ & BARSONY, 1999).

As células de uma das placas não foram tratadas para que fossem representativas da condição celular antes da estimulação. As células foram mantidas em estufa na condição de incubação padrão por 30 minutos (YASMIN et al, 2005; RACZ & BARSONY, 1999) para translocação do VDR. Após estimulação, as células foram lavadas com PBS (pH 7,2), fixadas com PFA 4% e tiveram seus núcleos marcados com corante Hoechst 33258, o qual apresenta fluorescência azul. As células foram observadas por microscopia de fluorescência.

#### 4.7 EXPANSÃO DOS PLASMÍDEOS pTA-LUC E pVDR-LUC

Duas alíquotas de células competentes de *E. coli* TOP10F' foram transformadas com os plasmídeos pTA-LUC (Panomics, Redwood City, EUA) ou pVDR-LUC (Panomics, Redwood City, EUA)

As bactérias transformadas foram semeadas em placas LB/ágar contendo ampicilina (50 µg/mL) e tetraciclina (10 µg/mL). 5 mL de meio LB/ampicilina/tetraciclina foi inoculado com uma colônia de bactérias TOP10F' transformadas com pTA-LUC ou pVDR-LUC. Os meios inoculados foram agitados sob condição padrão por 8 horas.

100 mL de meio LB/ampicilina/tetraciclina foram inoculados com 250 µL da cultura inicial e incubados overnight em agitação padrão. As células foram peletizadas e em seguida foi procedida a purificação de cada plasmídeo utilizando o kit para purificação plasmidial livre de endotoxina fornecido pela Qiagen, segundo os procedimentos indicados no seu manual. Ao fim dos procedimentos, o DNA purificado foi quantificado espectrofotometricamente sob  $\lambda = 260$  nm.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO RECEPTOR DE VITAMINA D SOB ESTIMULAÇÃO COM FISALINAS

Pode-se avaliar a ativação transcricional utilizando um vetor contendo uma seqüência *reporter*. Neste estudo utilizou-se um vetor cujo promotor possuía a seqüência de bases pela qual o VDR ativado possui afinidade (elementos responsivos); enquanto que a seqüência *reporter* codificava a luciferase de vagalume, a qual em presença de oxigênio, ATP e luciferina produz bioluminescência. Desta forma, foi possível medir a atividade transcricional do VDR sob ação das fisalinas, indiretamente, pela atividade da luciferase.

Células COS-7 foram transfectadas com plasmídeo pTA-LUC ou pVDR-LUC segundo tópico 4.5. Imediatamente após a transfecção, as células foram cultivadas com DMEM contendo 100 nM de calcitriol (controle positivo), dexametasona (controle negativo), Fisalinas D, Fisalina F ou apenas o veículo (DMSO) (YASMIN et al., 2005; RACZ & BARSONY, 1999).

As células foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas (YASMIN et al., 2005; RACZ & BARSONY, 1999) para ocorrência da expressão gênica da luciferase mediada por VDR e seu acúmulo no espaço intracelular.

Todos os procedimentos desta etapa seguiram as indicações do fabricante do kit utilizado no ensaio, *Luciferase Assay System* (Promega, Wisconsin, EUA). Transcorridas as 24 horas de estimulação, as células foram submetidas a sucessivas lavagens com PBS (pH 7,2) e lisadas utilizando o tampão de lise fornecido no kit. Os lisados foram então centrifugados; os sobrenadantes resultantes foram coletados e submetidos à dosagem da luciferase por luminescência, utilizando-se luminômetro GloMax-20/20 (Promega, Wisconsin, EUA) e o substrato para este fim, também fornecido no kit.

Neste ensaio, a atividade relativa da luciferase fornece uma estimativa da atividade do VDR. Ela foi calculada a partir da razão entre a luminescência obtida dos lisados provenientes das células transfectadas com pVDR-LUC e a luminescência obtida a partir dos lisados contendo células transfectadas com pTA-LUC.

$$\text{Atividade relativa da luciferase} = \frac{\text{Luminescência com Elementos Responsivos suscetíveis a VDR}}{\text{Luminescência sem Elementos Responsivos suscetíveis a VDR}}$$

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores da atividade da luciferase são apresentados em média ± desvio padrão. Os dados foram analisados pelo teste de avaliação de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. Um p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

#### 4.10 EXPRESSÃO DO VDR

A fim de realizar futuros ensaios de ligação do receptor de vitamina D com as fisalinas e outras drogas, foi necessária a obtenção do VDR. Os procedimentos foram desenvolvidos em parceria com o laboratório de proteômica do Centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz (CBG/UESC).

Células competentes de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta foram transformadas com o plasmídeo HIS\_VDR\_EC1-pQET7 (Qiagen, Duesseldorf, Alemanha) e plaqueadas em meio CG/Ágar (CG = Circlegrow – MP Biomedicals, Califórnia, EUA) contendo cloranfenicol (25 µg/mL) e kanamicina (50 µg/mL). As bactérias foram incubadas a 37°C por 16 horas.

5 mL de meio CG/kanamicina/cloranfenicol foram inoculados com colônias de BL21(DE3) Rosetta transformadas com plasmídeo HIS\_VDR\_EC1-PQE-T7. As bactérias foram incubadas por 18 horas sob condições de agitação padrão.

As células foram peletizadas, foi descartado o sobrenadante e o pellet ressuspense em 200 mL de CG/kanamicina/cloranfenicol, sendo então incubadas sob agitação padrão até alcançar OD<sub>600nm</sub> entre 0,6 e 1,0.

Foram adicionados ao meio contendo as bactérias concentrações de IPTG que variaram de 0,01 mM a 1 mM para induzir a expressão de VDR, novamente incubou-se as células por 4 horas com temperaturas que variaram de 25°C a 37°C sob agitação, em presença e também em ausência de 0,1 mM de ZnCl<sub>2</sub>. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 2, 3 e 4 h para confirmação de expressão do VDR em gel eletroforético e avaliação da solubilidade da proteína expressa.

Após a indução de expressão as bactérias foram coletadas por centrifugação a 12.000 g por 5 minutos e o pellet congelado a -20°C para purificação posterior.

#### 4.11 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DO VDR EXPRESSO EM BL21(DE3) ROSETTA

As alíquotas coletadas durante a expressão do VDR foram submetidas à centrifugação. As células foram ressuspensas em 400 µL de tampão de lise (500 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 7,9), Nonidet a 0,5%, imidazol a 5 mM) contendo lisozima a 100 µg/mL. Em seguida foram sonicadas em banho de gelo.

À 30 µL dos extratos totais foram acrescentados 90 µL água e 30 µL tampão de amostra de proteína para gel de acrilamida 5X (Tris-HCl a 200 mM e pH 6,8; SDS a 5%, β-mercaptoetanol a 12,5%, glicerol a 30% e azul de bromofenol a 0,025%).

O restante dos lisados foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a fim de separar as frações solúveis das frações insolúveis. Aos sobrenadantes (frações solúveis) foram acrescentados 92,5 µL de tampão de amostra de proteína para gel de acrilamida 5X. Os pellets (fração insolúvel) foram ressuspensos em 200 µL de tampão de amostra de proteína para gel de acrilamida 1X e aquecido a 80°C.

As análises eletroforéticas das alíquotas retiradas durante a expressão da proteína recombinante foram feitas como descrito por Laemmli (1970) em gel de poliacrilamida a 10% sob condição desnaturante, usando sistema de minigéis. A corrida foi realizada a 100 V, durante 3 horas, utilizando-se uma cuba específica. O gel foi corado com solução de azul de Coomassie 0,05%, e descorado com solução de metanol (30% v/v) e ácido acético (10% v/v).

#### 4.12 DESNATURAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA VDR INSOLÚVEL

O plasmídeo HIS\_VDR\_EC1-pQET7 foi escolhido por codificar o VDR associado a uma cauda de 6 histidinas na porção amino-terminal a qual permite uma fácil purificação por IMAC (cromatografia de afinidade por íons metálicos). Após a expressão, o pellet de bactérias foi ressuspenso em 20 mL de tampão de lise contendo lisozima a 100 µg/mL e incubado a 30 °C por 30 minutos; em seguida, foi sonicado em banho de gelo até clareamento e diminuição da viscosidade.

O lisado celular foi centrifugado por 15 min. a 12.000 x g. O pellet foi ressuspenso em 40 mL tampão de ligação pH 7,4 (20 mM de fosfato de sódio, 20mM de imidazol e 0,5 M de NaCl) contendo uréia à 6 M.

A purificação da proteína foi realizada por IMAC. Os procedimentos de preparação da coluna, bem como o preparo dos tampões e purificação da proteína quimérica foram realizados de acordo com o manual do fabricante da resina utilizada: *Chelating Sepharose Fast Flow* (Amersham Biosciences/GE, Reino Unido).

#### 4.13 RENATURAÇÃO DO VDR

Foram acrescentados 0,5 mM de fluoreto de  $\alpha$ -fenilmetanosulfonila (PMSF) à HIS-hVDR purificada. A proteína foi então submetida a diálises sucessivas para remoção do agente caotrópico (uréia). Foi utilizada solução de renaturação pH 8,0 (Tris a 50 mM, DTT a 1 mM, glicerol a 10 % , 0,1 mM de  $ZnCl_2$ ) com concentrações de uréia decrescentes ao longo do procedimento de diálise. Nas ocasiões onde ocorreram formações de precipitados foram realizadas centrifugações da proteína para retirada dos mesmos. Todos os procedimentos foram realizados à temperatura de 4°C.

#### 4.14 DOSAGEM DE PROTEÍNAS – MÉTODO DE BRADFORD

A dosagem de proteína foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), baseado na formação de complexos entre o corante Azul de Coomassie e cadeias polipeptídicas.

4  $\mu$ L da amostra de VDR foram diluídas em 46  $\mu$ L de água (em triplicata). A cada uma destas diluições foram adicionados 200  $\mu$ L de reativo de Bradford. A concentração de proteína foi estimada utilizando-se avaliação espectrofotométrica no comprimento de onda de 595 nm sob padronização por curva de diluição com soro de albumina bovina (BSA). Ao fim dos procedimentos foi obtido 1,05 mg de proteína, dissolvido em 21 mL de solução de renaturação pH 8,0.

#### 4.15 RETIRADA DA CAUDA DE HISTIDINA E CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA PROTEÍNA

Para a retirada de cauda de histidina o HIS-hVDR foi concentrado a 1 mg/mL. Após isto, à proteína purificada foi acrescido 5 unidades de trombina por mL de proteína. Esta mistura foi incubada durante 16 horas à 18°C e então submetida à análise por eletroforese em gel de SDS-PAGE comum e bidimensional.

A confirmação da identidade da proteína foi desenvolvida por espectrometria de massas (MS) conforme descrito por Shevchenko e colaboradores (SHEVCHENKO et al.,

1996). Os *spots* de interesse foram excisados manualmente do gel SDS-PAGE 2D corados por Coomassie coloidal.

#### 4.15.1 Metodologia para digestão de proteínas em gel 2D

Os tubos contendo os “spots” de interesse foram lavados com a solução “A” (25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8) e Água Milli Q. Adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de acetonitrila 100% e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram levadas para a centrífuga Speed-vac (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) para secagem.

Foi realizada a reação de digestão enzimática. Para tanto foi utilizada de 5-7  $\mu\text{g/mL}$  da tripsina “Gold” (Promega, Wisconsin, EUA), a qual foi solubilizada anteriormente na solução A, as amostras foram incubadas à 4°C para reidratação. Foi adicionado às mesmas um volume necessário da solução “A” de modo que cobrisse os pedaços de gel. As amostras foram então incubadas à 37 °C por 16 h em banho-maria.

Após o tempo de incubação, a solução contida nas amostras foi passada para novos tubos onde se encontravam os digestos trípticos de interesse. Foram adicionados 25–50  $\mu\text{l}$  da solução “C” (50% Acetonitrila, 5% de Ácido Fórmico) nos tubos contendo os pedaços de gel, as amostras foram submetidas à suave agitação por 30 minutos. Para a finalização da metodologia de extração, os tubos contendo apenas os digestos trípticos foram levados para a centrífuga Speed-Vac a fim de diminuir o volume das amostras para 10-15  $\mu\text{L}$ .

#### 4.15.2 Espectrometria de massa

Após a extração dos peptídeos em gel, esses foram analisados pela técnica de nanocromatografia aplicada ao espectrômetro de massas (nanoLC/MS/MS). Para tanto foi utilizado o sistema de cromatografia UPLC nanoAcquity (Waters, Milford, EUA) acoplado ao espectrômetro ortogonal Micromass Q-TOFmicro (Waters, Milford, EUA).

Para as análises cromatográficas foram utilizadas duas fases móveis, a fase móvel A: 100% água ultra-pura e a fase B: 100% acetonitrila, sendo ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Para a dessalinização dos digestos trípticos foi utilizada uma pré-coluna Symmetry (Waters, Milford, EUA) C18, 180  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno x 20 mm de comprimento. Para separação foi utilizada coluna analítica de 1,7  $\mu\text{m}$  BEH300-C18 100  $\mu\text{m}$  x 100 mm.

A eluição seqüencial dos peptídeos foi realizada utilizando-se um gradiente de 1-50% de acetonitrila por 23 minutos, chegando até 85% com 27 minutos. A duração da corrida para cada “spot” foi de 30 minutos com um fluxo de 0,6 µL/min. Os peptídeos foram introduzidos ao quadrupolo do espectrômetro de massas Q-TOFmicro após ionização pela sonda de “eletrospray” do mesmo. As análises no espectrômetro foram feitas através do software Masslynx V4.1, o qual possui o método dependente de dados (DDA) onde os íons mais abundantes, observados no espectro de MS, foram escolhidos automaticamente para a fragmentação induzida por colisão (CID), gerando os espectros de MS/MS. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação, e argônio como gás de colisão. O equipamento foi operado no modo íon positivo com voltagem do capilar de 3000 V e voltagem do cone de 35 V.

#### **4.15.3 Pesquisa nos bancos de dados e identificação das proteínas**

Os espectros gerados foram processados pelo algoritmo MaxEnt3 do software Masslynx V4.1, os quais resultaram em uma lista de massas que foi resolvida pelo software ProteinLynx Global Server (PLGS) V2.3 (Waters, Milford, EUA) e posteriormente pesquisada contra os bancos de dados SWISSPROT e NCBI. Os critérios de busca utilizados pelo software foram as massas moleculares, perda do sítio de clivagem, pontos isoelétricos, cisteínas modificadas por carboxamidometilação e as possíveis modificações, como oxidação de metionina. Os resultados das identificações foram observados pelo software Proteinlynx Global Server 2.3, sendo consideradas identificações confiáveis apenas as que apresentaram probabilidade entre 80-100%.

## 5. RESULTADOS

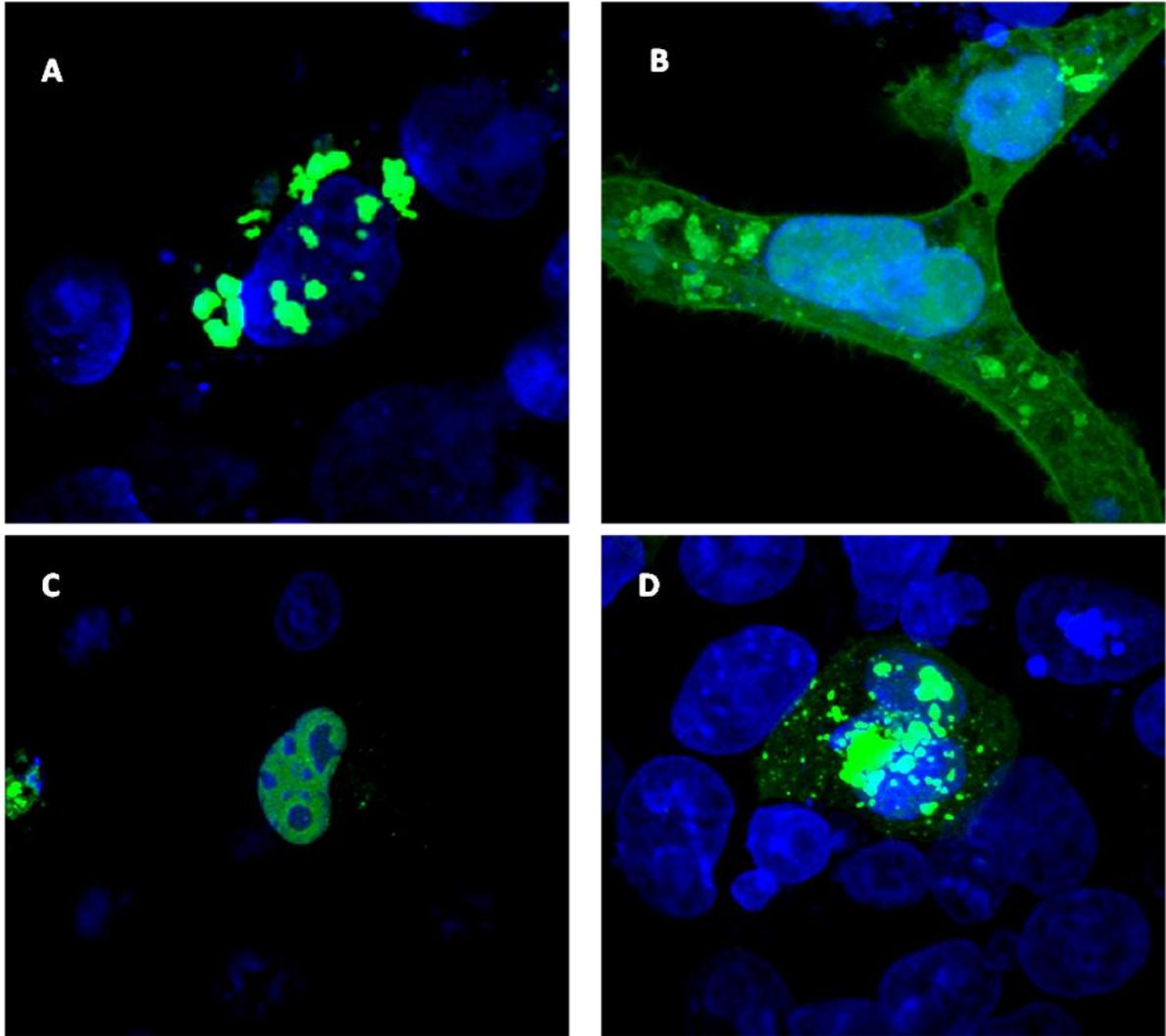
### 5.1 ENSAIO DE TRANSLOCAÇÃO

Inicialmente foi verificada a distribuição do VDR em células COS-7 transfectadas com o plasmídeo codificante para a proteína de fusão YFP-VDR, a fim de testar a construção produzida e padronizar o ensaio de translocação do receptor para o núcleo.

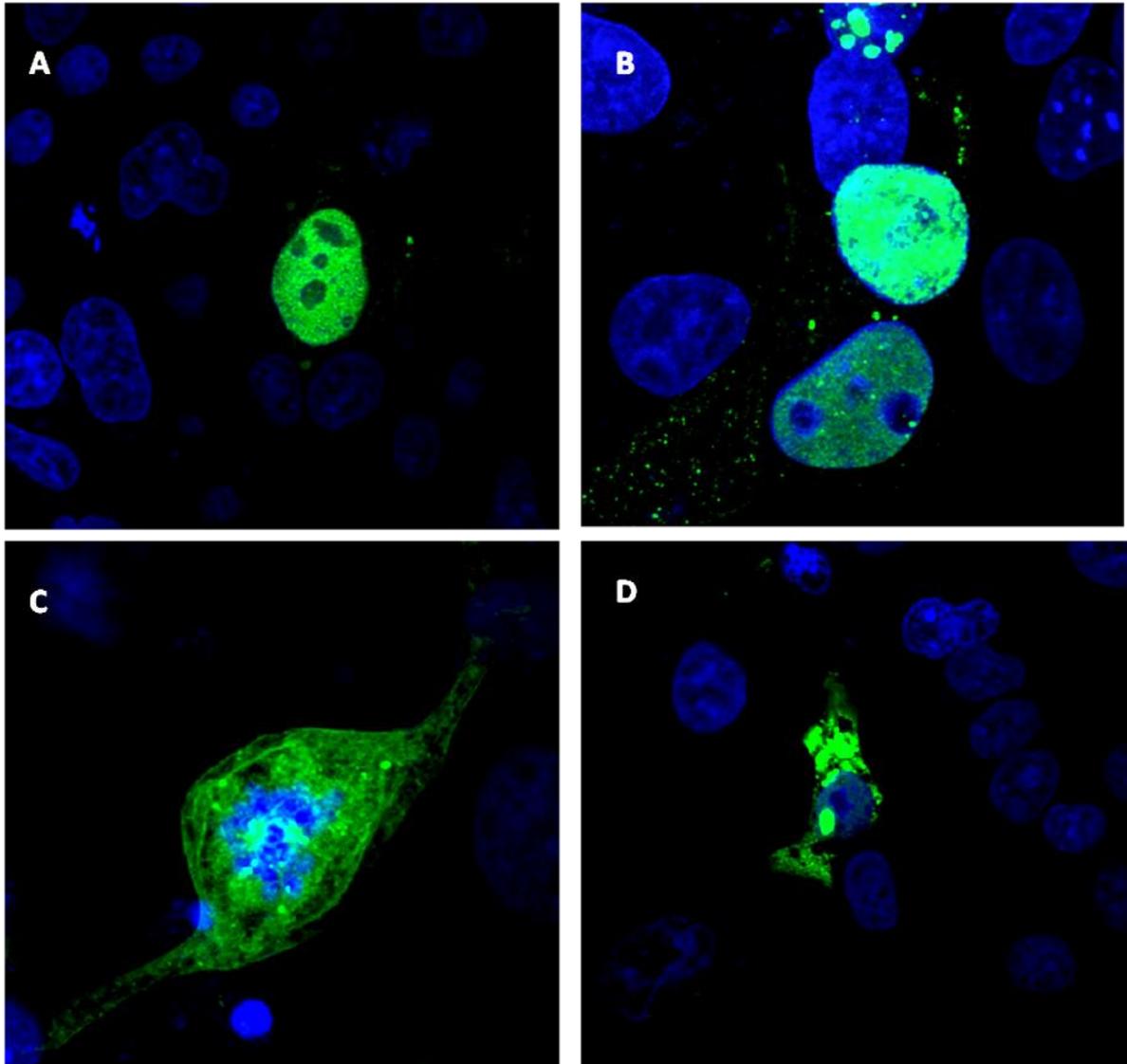
Células COS-7 transfectadas foram analisadas por microscopia de fluorescência confocal antes e após estimulação com vitamina D<sub>3</sub> (controle positivo) ou dexametasona (controle negativo). A distribuição da YFP em células não-tratadas (T 0) foi predominantemente citoplasmática (Figura 15A), embora também tenha sido observada expressão do receptor na membrana plasmática (Figura 15B).

A expressão de YFP em células tratadas com vitamina D<sub>3</sub> foi predominantemente nuclear (Figura 15C). O tratamento com dexametasona – hormônio esteróide que interage com outro receptor nuclear (GR), não induziu a translocação da proteína de fusão do citoplasma para o núcleo (Figura 15D).

Para avaliar se a fialina F ativa a translocação da proteína de fusão YFP-VDR, as células COS-7 transfectadas foram estimuladas com 100 nM da fialina F por 30 minutos. O tratamento com a fialina D foi também avaliado. As células tratadas com a fialina F apresentaram uma distribuição da proteína de fusão YFP-VDR predominantemente nuclear (Figura 16A e B), enquanto que uma distribuição citoplasmática foi observada nas células tratadas com fialina D (Figura 16C e D).



**Figura 15. Padrão de localização da proteína de fusão YFP-VDR (amarelo) em células COS-7 transfectadas: A e B, Controles não-tratados. C, Células tratadas com vitamina D<sub>3</sub>. D, Células tratadas com dexametasona. Núcleos marcados com HOECHST 33258 (azul). Aumentos: A, B e D - 120 vezes; C - 60 vezes**

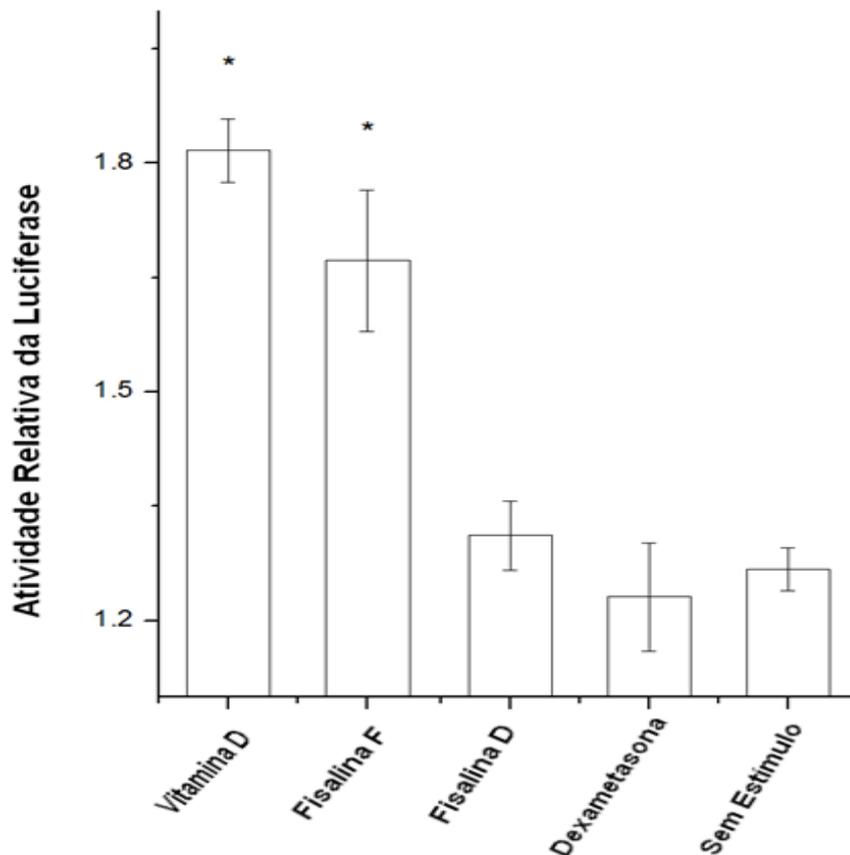


**Figura 16. Padrão de localização da proteína de fusão YFP-VDR (amarelo) em células COS-7 transfectadas após tratamento com fialinas F e D. A e B:** Células tratadas com fialina F. **C e D,** Células tratadas com fialina D. Núcleos marcados com HOECHST 33258 (azul). Aumentos: **A e D** - 60 vezes e **B e C** - 120 vezes

## 5.2 ENSAIO DE ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D

Para comprovar a ativação transcricional do VDR sob ação das fisalinas, foi realizado um ensaio utilizando um gene repórter (luciferase) sob o controle de elementos responsivos associados à atividade do VDR como fator de transcrição. Células COS-7 foram transfectadas com o plasmídeo contendo a construção da luciferase, e posteriormente foram submetidas a diferentes tratamentos.

As células tratadas com a vitamina D e com fisalina F apresentaram atividade relativa da luciferase maior em relação à do grupo tratado apenas com veículo, enquanto que as células tratadas com a fisalina D e dexametasona apresentaram valores estatisticamente iguais aos das células tratadas apenas com veículo (Figura 17).

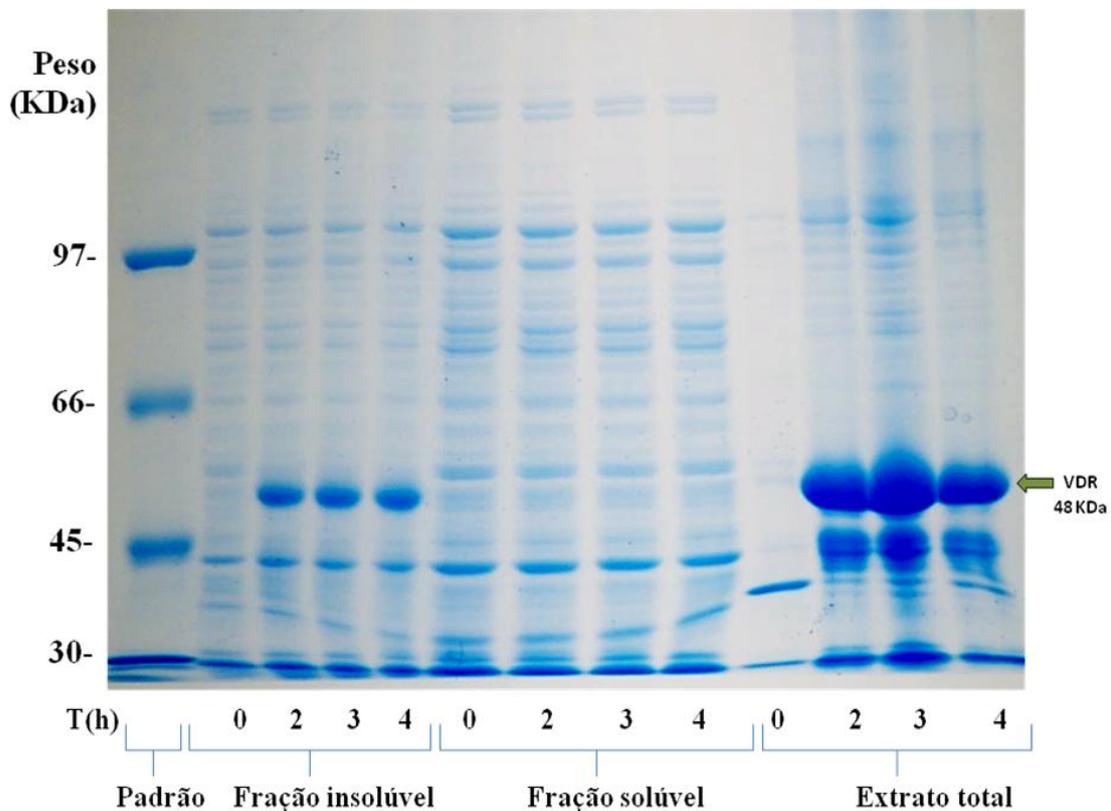


**Figura 17.** Atividade relativa da luciferase em células COS-7 transfectadas com plasmídeo contendo o gene repórter (luciferase) sob o controle de elementos responsivos ao VDR. As barras representam a média da atividade relativa  $\pm$  desvio padrão das triplicatas. \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo sem estímulo (tratado apenas com veículo).

### 5.3 EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D

A fim de realizar futuros estudos que confirmem a ligação do VDR com as fisalinas por estudos de cristalografia e difração de raios-X, foi realizada a expressão da proteína (VDR) em *E. coli*.

Em todas as condições testadas, a expressão da proteína foi alcançada, exceto à 25°C com indução por 0,01 mM de IPTG. No entanto, em todas as condições positivas para a expressão do VDR, a proteína foi produzida de forma insolúvel (Figura 18).



**Figura 18. Padrão eletroforético da expressão do VDR recombinante em *Escherichia coli* BL21(DE3) Rosetta:** Este gel corresponde à expressão de His\_hVDR sob indução com 0,4 mM de IPTG à 37°C sem cloreto de zinco. Padrões semelhantes foram encontrados nas outras condições testadas, exceto à 25°C com indução por 0,01 mM de IPTG a qual não apresentou expressão da proteína recombinante observável.

A proteína produzida foi solubilizada com uréia e purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC), sendo a cauda de histidina removida posteriormente. A sequência da proteína foi analisada por espectrometria de massas, que confirmou a sequência do receptor de vitamina D humano.

## 6. DISCUSSÃO

O mundo natural tem sido fonte inesgotável de entidades químicas bioativas. (CHIN et al., 2006). As fisalinas extraídas da *Physalis angulata* são um exemplo disto, sendo elas potenciais candidatas ao desenvolvimento de drogas (TOMASSINI et al., 2000). Dentre estas substâncias destaca-se a fisalina F, que entre outras atividades apresenta potente ação imunossupressora (SOARES et al., 2003 e 2006).

No entanto, poucos estudos têm sido feitos com o objetivo de desvendar o seu mecanismo de ação celular. Uma hipótese proposta foi a da interação das fisalinas com o receptor de glicocorticóide (VIEIRA et al., 2005). No entanto, outros estudos realizados pela nossa equipe têm descartado esta via (SOARES et al., 2003 e 2006; BRUSTOLIM et al., 2010).

O receptor da vitamina D (VDR) é um membro da superfamília esteróide/tireóide dos fatores de transcrição que media a expressão gênica de modo dependente de calcitriol (RACZ & BARSONY, 1999). Após a interação do VDR com seu ligante ocorre uma cascata de eventos moleculares que culminam com alterações na taxa de transcrição de genes específicos ou cadeia de genes (DOWD & MACDONALD, 2010).

Estudos preliminares de *docking* indicaram que a fisalina F se liga ao LBD do VDR (SOARES, dados não publicados) assim como a vitamina D<sub>3</sub> ativa. Além disso, tanto as fisalinas como a vitamina D<sub>3</sub> na forma ativa são quimicamente semelhantes, sendo classificadas como seco-esteróides.

Dados da literatura mostram que a fisalina F e o calcitriol, juntamente com seus análogos, apresentam atividades coincidentes, tais como: efeito antineoplásico inclusive em leucemias, câncer coloretal e hepatocarcinoma celular (CHIANG et al. 1993; RYUTARO et al. 2005; CROSS & PETERLIK, 2010; DALHOFF et al. 2003); atividades imunossupressoras e antiinflamatórias como inibição de rejeição de transplantes (SOARES et al., 2006; MATHIEU et al., 1994; JORDAN et al. 1988a, 1988b; VEYRON et al. 1993), melhora no quadro de artrite (BRUSTOLIM et al., 2010; ANDJELKOVIC et al., 1999, TSUJI et al., 1998; LARSSON et al., 1998; CANTORNA et al., 1994), redução da ativação e proliferação de linfócitos em respostas inflamatórias (SOARES et al. 2006, RIGBY et al., 1987; BHALLA et al., 1984) além da inibição da secreção de IL-12 por macrófagos (SOARES et al. 2003; BERTOLINO & TZANNO-MARTINS, 2000).

Todas estas evidências levaram ao desenvolvimento deste trabalho, onde o seu principal objetivo foi testar a hipótese da existência de interação da fisalina F com o VDR, promovendo sua translocação até o núcleo celular e modulando a transcrição gênica, como ocorre quando o receptor é exposto ao seu ligante padrão: a vitamina D<sub>3</sub> ativa ou calcitriol.

As primeiras tentativas de avaliação da translocação do VDR foram feitas com o plasmídeo BFP-VDR (YASMIN et al., 2005). A fluorescência azul produzida por esta proteína quimérica é de difícil visualização nos equipamentos disponíveis, por isto fez-se necessário produzir um novo plasmídeo codificando uma quimera de visualização mais fácil, para este fim foi produzido pYFP-VDR. O plasmídeo pYFP-VDR purificado foi usado para transfectar células COS-7, a fim de avaliar a disposição do receptor no espaço intracelular sob exposição às fisalinas F e D.

Observou-se neste trabalho que células COS-7 expostas a 100 nM de fisalina F apresentaram um padrão de distribuição celular semelhante ao padrão observado em células expostas a 100 nM de calcitriol. Tal distribuição foi caracterizada por uma forte concentração do receptor no núcleo em grande parte das células positivas para a expressão da proteína de fusão YFP-VDR. Para a vitamina D<sub>3</sub> ativa este era o padrão esperado tendo em vista que o calcitriol é o principal ligante do VDR e devido sua alta especificidade foi escolhido como controle positivo (DOWD & MACDONALD, 2010). No caso da fisalina F este resultado foi o primeiro indício da sua interação com o VDR.

As células COS-7 sob o tratamento com 100 nM de fisalina D ou dexametasona apresentaram uma distribuição do VDR na célula igual à distribuição antes da estimulação, ou seja, o receptor concentrado principalmente no citoplasma. O que sugere que a fisalina D não apresenta interação com o VDR.

Um achado interessante deste trabalho, anteriormente relatado (KIM et al., 2006; RACZ & BARSONY, 1999; CAPIATI et al., 2004) foi a localização do VDR na membrana plasmática. Esta observação foi feita em poucas células, porém sob todas as condições observadas (incluindo antes da estimulação) o que sugere que o VDR possui outras atividades relacionadas à membrana plasmática.

A presença do VDR na membrana e a função disto foram anteriormente questionadas (BARSONY et al.; 1997; RACZ & BARSONY, 1999). Foi sugerida a existência de um VDR de membrana diferente do VDR associado à atividade nuclear (BARAN et al., 2000). No entanto pesquisas recentes têm indicado que o VDR nuclear também pode localizar-se na membrana plasmática, por exemplo, em regiões enriquecidas de caveolina (HUHTAKANGAS et al., 2004), que são associadas à transdução de sinal. Outra observação

realizada em nosso estudo é a presença de focos do VDR no citoplasma, o que parece estar de acordo com a proposta de associação do VDR com organelas citoplasmáticas feita por Barsony e colaboradores (1997).

A movimentação do VDR do citoplasma para o núcleo não indica necessariamente que o receptor estará ativo no que se refere à atividade transcricional. Para demonstrar que a fisalina F ativa a função moduladora de transcrição gênica atribuída ao VDR, realizamos um ensaio utilizando *gene reporter*.

O ensaio de *gene reporter* é utilizado na pesquisa e identificação de ligantes para receptores nucleares. Nesta técnica, uma sequência promotora responsiva a um receptor nuclear em estudo é associado a um gene que permite a visualização do evento de transformação genética por expressar uma enzima ou proteína detectável por testes específicos. Em nosso estudo foi utilizado um plasmídeo codificando a enzima luciferase sob o controle de elementos responsivos a VDR.

Os resultados obtidos no ensaio utilizado *gene reporter* foram compatíveis com aqueles observados no ensaio de translocação. As células COS-7 tratadas com a fisalinas F apresentaram atividade relativa da luciferase estatisticamente diferente dos grupos tratados com veículo e similar àqueles tratados com calcitriol. As células tratadas com a fisalina D bem como com a dexametasona não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo.

A partir dos resultados do ensaio de translocação e de atividade do VDR foi possível concluir que a fisalina F interage com o VDR, promovendo sua translocação para o núcleo celular bem como sua ativação como fator regulador de transcrição gênica. Já para a fisalina D, não foi encontrado nenhum resultado que indique a sua interação com o VDR.

A princípio, seria possível inferir que, sendo a fisalina F e D tão similares em suas moléculas, ambas teriam a mesma ação sobre o VDR, no entanto isto não foi observado neste trabalho. Vários estudos têm mostrado que estas fisalinas são diferentes em suas ações biológicas, sendo, por exemplo, a fisalina F um potente imunomodulador e possuidor de atividade antitumoral contra leucemia linfocítica P388 em camundongos, o que não ocorre com a fisalina D (SOARES et al., 2003; 2006; CHIANG et al., 1993). Em conjunto com tais pesquisas, os nossos resultados indicam que atividades da fisalina F, podem estar associadas à ativação do VDR; sendo possível que a inexistência de interação da fisalina D com este receptor explique o fato da mesma não exercer semelhantes ações biológicas.

O plasmídeo HS\_VDR\_EC1-PQE T7 (Qiagen, Duesseldorf, Alemanha) foi utilizado neste trabalho com o objetivo de expressar o VDR em bactérias para futuros ensaios de

ligação. A expressão da proteína é controlada fortemente pelo sinal de transcrição e translação de bacteriófago T7. Para que haja a expressão é necessária uma fonte de RNA polimerase T7 na célula hospedeira, encontrada em linhagens B de *E. coli*. Nestas bactérias a expressão desta RNA polimerase pode ser induzida pela adição de IPTG ou lactose (QIAGEN, 2005).

A expressão da proteína VDR foi induzida em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta com IPTG em concentrações variadas (0,01 mM a 1 mM), sob diferentes condições de temperatura (25°, 30° e 37°C), em presença e também em ausência de 0,1mM de ZnCl<sub>2</sub>. A utilização de íons de zinco neste trabalho é explicada pelo fato do VDR ser um receptor nuclear e por isso possuir as estruturas chamadas dedos de zinco. Em tese, a presença dos tais íons aumentaria a chance de obtenção do VDR em condição solúvel (NAKAJIMA, 1997). Ao fim destes ensaios, expressão de grande quantidade de VDR foi atingida com sucesso – 1,05 mg sob indução com 0,4 mM de IPTG a 37° C sem ZnCl<sub>2</sub>.

Este estudo é o primeiro a relatar a interação de uma fisalina com o VDR. Ele representa um passo importante em direção a descoberta dos mecanismos celulares por trás das atividades biológicas da fisalina F. Estudos realizados com análogos do calcitriol têm revelado diferentes mecanismos de ligação destes ao LBD do VDR. Tais diferenças podem ocasionar atividades biológicas seletivas, o que futuramente poderá ser explorado para a fisalina F. (YAMADA et al., 2003; TAKEYAMA et al., 1999).

Como perspectivas futuras, estudos de ligação do VDR com a fisalina F poderão também ser realizados. Para comprovar a interação da fisalina F com o VDR e avaliar como esta ligação ocorre, ensaios co-cristalização e análise por difração de raios-x são o próximo passo. Estes estudos serão capazes de mostrar como se dá a ligação do VDR e da fisalina F, elucidando a conformação assumida pelo receptor e permitindo a comparação desta com a forma do VDR sob ação do calcitriol.

Outra proposta para futuras pesquisas seria a avaliação da interação de outras fisalinas com o VDR. Além disto, devido à ubiquidade do VDR nos variados tecidos do corpo humano e sua associação com processos biológicos que vão além da regulação mineral, os resultados deste estudo também servem como fundamento para novas propostas de pesquisas terapêuticas para a fisalina F, baseadas em sua relação com o VDR como no tratamento de psoríase, alopecia causada por radiação, câncer de próstata e esclerose múltipla.

Apesar das muitas conquistas, este trabalho possui algumas limitações e pontos onde são necessários ajustes. Com relação aos ensaios de translocação e de atividade do VDR um problema ainda a ser resolvido é a transfecção, a qual se apresentou em taxas não superiores a

35%, o que demonstra a necessidade de otimização das condições utilizadas. Ainda nestes ensaios, outra limitação foi a utilização de linhagem estabelecida de células. A substituição por ensaios *ex vivo* seria uma proposta para estudos futuros, aproximando o experimento das condições reais onde as fisalinas seriam utilizadas como tratamento.

Outro problema a ser superado está relacionado à expressão do VDR. As várias condições de indução foram testadas a fim de obter VDR solúvel, sem sucesso. A expressão da proteína em corpos de inclusão apresenta uma vantagem: a proteção da mesma contra proteases. No entanto, a insolubilidade obriga a realização de procedimentos de desnaturação para purificação da proteína. Desnaturar e renaturar a proteína expõe a sua estrutura terciária a uma perda conformacional, podendo inviabilizar ensaios de ligação como a cristalografia, por exemplo. Sendo assim, se faz necessária a continuação de estudos para melhorar a condição de expressão com objetivo final de obter a proteína na condição solúvel, o que é possível, tendo em vista que esta proteína possui boa solubilidade naturalmente (DOWD & MACDONALD, 2010).

## 7. CONCLUSÕES

A fisalina F, mas não a D, ativa a translocação do VDR para o núcleo e sua atividade como fator de transcrição gênica em células COS-7 transfectadas.

É possível obter-se HIS-VDR através de expressão em cepa BL21 DE3 Rosetta de *E. coli* transformadas; e purificá-la por IMAC em condição desnaturante; no entanto, nas condições testadas a proteína apresentou-se em corpos de inclusão o que inviabiliza sua utilização para estudos de ligação.

## 8. REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.. **Contribuição ao estudo de plantas medicinais da Paraíba.** Fortaleza: VI Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Resumos, p. 64-66, 1980.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula.** Tradução Ana Beatriz gorini da Veiga et al. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALMEIDA, E. R., **Plantas medicinais brasileiras:** Conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993.

ALVES, H. M. A diversidade Química das plantas como fonte de fitofármacos. **Quím. Nov. na Esc.** São Paulo, Cadernos Temáticos, n. 3, 2001.

AMOROZO, M. C, GÉLY, A. L. Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas. Barcarena, PA, Brasil. **Bol. do Mus. Par. Emílio Goeldi., Sér. Bot.** Belém, v.4, n. 1, p.47-131, 1988.

ANDJELKOVIC, Z. et al. Disease modifying and immunomodulatory effect of high dose  $1\alpha(\text{OH})_2\text{D}_3$  in rheumatoid arthritis patients. **Clin. Exp. Rheum.,** [S.l.], v.17, p. 452–456, 1999.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. **Phys. Rew.,** [S.l.], v. 81, n. 3, p. 1269-1304, 2001.

BAKER, A. R. et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. **Proc. Nat. Acad. Sci.,** [S.l.], v. 85, n. 10, p. 3294-3298, 1988.

BARAN, D. T. et al. T 2000 Binding of 1,25-dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  to annexin II: effect of vitamin D metabolites and calcium. **J. Cell Biochem.,** [S.l.], v. 80, p. 259–265, 2000.

BARRAL, D. et al. Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.,** [S.l.], v. 7, n. 3, p. 309-315, 2007.

BARSONY, J. et al. Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. Studies with a novel fluorescent ligand. **J. Biol. Chem.,** USA, n. 272, p. 5774–82, 1997.

BERTOLINO, D. L.; TZANNO-MARTINS, C. Revisão: Efeitos imunomoduladores da vitamina D. **J. Bras. Nefrol.**, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 157-161, 2000.

BHALLA, A. K. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. **J. Immunol.** v. 133, p.1748–1754, 1984

BOUILLON, R. et al. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. **Endocr. Rev.**, [S.l.], v. 16, n. 2, p. 200-257, 1995.

BOURGUET, W. et al. Nuclear receptor ligand-binding domains: 3D structures, molecular interactions and pharmacological implications. **Trends Pharmacol. Sci.** [S.l.], v. 21, n. 10, p. 381–388, 2000.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Bioch.**, [S.l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRUSTOLIM, D. et al. Activity of Physalin F in a Collagen-Induced Arthritis Model. **J. Nat. Prod.**, [S.l.], v. 73, n.8, p. 1323–1326, 2009.

CANTORNA, M. T. et al. 1,25-dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. **J. Nutr.** v. 128, p. 68–72, 1998.

CAPIATI, D. et al. 1, 25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle cells. **J. Cel. Bioch.**, [S.l.], v. 86, n.1, p. 128–135, 2004.

CHIANG, H.C. et al. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. **Anticancer Res.**, [S.l.], v. 12, n.3, p. 837-844, 1993.

CHIN, Y. et al. Drug Discovery From Natural Sources. **The AAPS Journal**, [S.l.], v.8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: IBDF, Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional, v. I a IV, 1984.

CROSS, H. S.; PETERLIK, M. Vitamin D e colon cancer. In: HOLICK, M. F. **Nutrition and Health Series - Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications.** [S.l.]: Humana Press, p. 311-323, 2010.

DALHOFF, K. et al., A phase II study of the vitamin D analogue seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. **Br. J. Cancer.**, [S.l.], v. 89, n. 2, p. 252–257, 2003.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: UNESP, 2002.

DOWD, D. R.; MACDONALD, P. N. The molecular biology of the vitamin D receptor. In: HOLICK, M. F. **Nutrition and Health Series - Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications**. [S.l.]: Humana Press, p. 135-137, 2010.

DUKE, J. A., VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1994.

DUSSO, A. et al. Vitamin D **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, [S.l.], v. 289, p. 8-28, 2005.

ETTEN, E. V.; MATHIEU, C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: basic concepts. **J Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, [S.l.], v. 97, p. 93–101, 2005.

FLORE, F. A. Notes on Some Medicinal and Poisonous Plants of Amazonian Peru. pp. 1-8 in Advances in Economic Botany. **Adv. in Econ. Bot.**, [S.l.], v.1, p. 1-8, 1984.

GRONEMEYER, H. et al. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, [S.l.], v. 3, n. 11, p. 950-64, Nov. 2004.

GUIMARÃES, E. T. et al. Effects of seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., Solanaceae, on the viability of *Leishmania* sp. In: Rev. Bras. Farmacogn. **Base de Dados Scielo**, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/2010nahead/aop3510.pdf>> Acesso em 24 novembro 2010.

HAUSSLER, M. R. et al. The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. **Jour. B. Min. Res.**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 325-349, 1998.

HUHTAKANGAS, J. A. et al. The Vitamin D Receptor Is Present in Caveolae-Enriched Plasma Membranes and Binds 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub> *in Vivo* and *in Vitro*. **Mol. Endoc.** [S.l.], v. 18, n. 11, p. 2660-2671, 2004.

INVITROGEN. **Lipofectamine™ 2000 Reagent manual**. Rev. Date 11 July 2006.

ISSA, L. L. et al. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. **Inflamm. Res.**, [S.l.], v. 47, n. 12, p.451-75, 1998.

JANUÁRIO, A. H. et al. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Phytother. Res.**, [S.l.], v. 16, n. 5: 445-448, 2002.

JIANG, F. **Molecular Mechanism of Vitamin D Action and its Implications in Ovarian Cancer Prevention and Therapy**. Dissertation (Doctor of Philosophy) – University of South Florida, Florida, May, 2004.

JORDAN, S.C. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> prolongs skin graft survival in mice. In: NORMAN, A. W. et al. **Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology**. Berlin: Walter de Gruyter, p. 346-347, 1988a.

JORDAN, S.C. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> prolongs rat cardiac allograft survival. In: NORMAN, A. W. et al. **Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology**. Berlin: Walter de Gruyter, p. 334-335, 1988b.

JUNIOR, C. V. et al. Os Produtos Naturais e a Química Moderna. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

KIM, Y. S. et al. Association of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-occupied vitamin D receptors with cellular membrane acceptance sites. **Endocr.**, [S.l.], v. 137, p. 3649-3658, 1996.

KOCHUPILLAI, N.. The physiology of vitamin D : Current concepts. **Indian J. Med. Res.**, [S.l.], v. 127, p. 256-262, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. [S.l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LARSSON, P. et al. A vitamin D analogue (MC1288) has immunomodulatory properties and suppresses collagen-induced arthritis (CIA) without causing hypercalcaemia. **Clin. Exp. Immunol.** v. 114, p. 277–283, 1998.

LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. **The Nuclear Receptors Factbooks**. London/San Diego: Academic Press, 2001.

MATHIAS, J.; MOSCHETTO, A. *Physalis*. In: **Revista Globo Rural**. 22 maio 2010. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI149243-18293,00-PHYSALIS.html>>

MATHIEU, C. et al. Prevention of autoimmune destruction of transplanted islets in spontaneously diabetic NOD mice by KH 1060, a 20-epi analogue of vitamin D: synergy with cyclosporin A. **Transp. Proc.**, [S.l.], v. 26, p. 3128-3129, 1994.

MAY, E. et al. Immunoregulation through 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogs. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**. [S.l.], v. 3, n. 4, p. 377-393, 2004.

MIYAMOTO, K. et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. **Mol. Endocrinol.** [S.l.], v. 11, n. 8, p. 1165-1179, 1997.

NAGPAL, S. et al. VDR Noncalcemic Actions of Vitamin D Receptor Ligands. **Endoc. Rev.**, [S.l.], v. 26, n. 5, p. 662-687, 2005.

NAKAJIMA, S. et al. A 65-Kilodalton Nuclear Protein Binds to the Human Vitamin D Receptor: A Bacterial-Expressed Histidine-Tagged Receptor Study. **Biochem. Bioph. Res. Com.**, [S.l.], v. 232, p. 806-809, 1997.

NEWMAN, D. J. et al. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod. Rep.**, [S.l.], v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J. et al. The influence of natural products upon drug discovery. **J. Nat. Prod. Rep.**, [S.l.], v. 17, p. 215-234, 2000.

OAKLEY, R. H. et al. The Human Glucocorticoid Receptor  $\beta$  Isoform: expression, biochemical properties, and putative function. **J. Bio. Chem.**, USA, v. 271, n. 16, p. 9550-9559, 1996.

OLEFSKY, M. J. Nuclear Receptor: Minireview Series. **J. Bio. Chem.**, USA, v. 276, n. 40, p. 36863-36864, 2001.

PROMEGA CORPORATION. **Technical Bulletin No. 281: Luciferase Assay System**. USA. Revised 2002.

QIAGEN. **EndoFree Plasmid Purification Handbook: EndoFree Plasmid Maxi, Mega, Giga Kits For purification of advanced transfection grade plasmid DNA**. Nov. 2005

RACZ, A.; BARSONY, J. Hormone-dependent translocation of vitamin d receptors is linked to transactivation. **J. Bio. Chem.**, USA, v. 274, n. 27, p. 19352–19360, 1999.

RIGBY, W. F. et al. Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Specific inhibition at the level of messenger RNA. **J. Clin. Invest.** v. 79, p.1659–1664, 1987.

ROBINSON-RECHAVI, M. et al. The nuclear receptor superfamily. **J. Cell Sc.**, [S.l.], v. 116, p. 585-586, 2003.

ROBYR, D. et al. Nuclear Hormone Receptor Coregulators In Action: Diversity For Shared Tasks. **Mol. Endocrinol.**, [S.l.], v. 14, p. 329-347, 2000.

ROCHEL, N. et al. The Crystal Structure of the Nuclear Receptor for Vitamin D Bound to Its Natural Ligand. **Mol. Cell**, [S.l.], v. 5, p. 173–179, 2000.

RYUTARO, A. et al. Selective activation of vitamin D receptor by lithocholic acid acetate, a bile acid derivative. **J. Lip. Res.**, [S.l.], v. 46, p. 46-57, 2005.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotec. C. & Des.**, [S.l.], n. 13, p.28–32, 2005.

SCHULTES, R. E., RAFFAUF, R. F. **The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia.** Historical, Ethno- & Economic Botany Series. Vol 2. Portland: Dioscorides Press, 1990.

SHAFFER, P. L.; GEWIRTH, D. T. Structural basis of VDR–DNA interactions on direct repeat response elements. **EMBO J.**, [S.l.], v. 21, p. 2242 – 2252, 2002.

SHEVCHENKO, A. et al. Mann Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Anal. Chem.**, [S.l.], v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.

SILVA, K. N.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 344-351, 2005.

SILVA, M. T. G.; et al. Studies on antimicrobial activity, *in vitro*, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 779-782, 2005.

SOARES, M. B. et al. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata*. **L. Eur. J. Pharmacol.**, [S.l.], v. 459, n. 1, p. 107-112, 2003.

SOARES, M. B. et al. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **Int. Immunopharmacol.**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 408-414, 2006.

TAKEYAMA, K., Y. et al. Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. **Mol. Cell. Biol.** [S.l.], v. 19, n. 2, p. 1049–1055, 1999.

TAYLOR, L. The Healing Power of Rainforest Herbs. **Raintree Nutrition**, Carson City. c. 2005. Disponível em: <<http://www.raintreenutrition.com/mullaca.htm>> Acesso em: 20 set. 2010

TOCCHINI-VALENTINI, G. et al. Crystal structures of the vitamin D receptor complexed to superagonist 20-epi ligands. **PNAS**, [S.l.], v. 98, n. 10, p. 5491–5496, 2001.

TOMASSINI, T. C. B. et al. Gênero *Physalis* – Uma Revisão Sobre Vitaesteróides. **Rev. Quím. Nova**, [S.l.], v. 23, n. 1, p. 47 – 57, 2000.

TSUJI, M. et al. 1-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits type II collagen-induced arthritis in rats. **FEBS Lett.** v. 337, p. 248–250, 1994

VEYRON, P. et al. Two novel vitamin analogues, KH 1060 and CB 966, prolong skin allograft survival in mice. **Transp. Immunol.**, v. 1, p. 72-76, 1993.

VIEIRA, A.T. et al. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.** [S.l.], v. 146, n. 2, p. 244-251, 2005.

WURTZ, J. M. et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. **Nat. Struct. Biol.** [S.l.], v. 3, p. 87–94, 1996.

YASMIN R. et al. Nuclear import of the retinoid X receptor, the vitamin D receptor, and their mutual heterodimer. **J. Biol. Chem.** USA, v. 280, n. 48, p. 40152-40160, 2005.

YAMADA, S. et al. Structure-function relationships of vitamin D including ligand recognition by the vitamin D receptor. **Med. Res. Rev.** [S.l.], v. 23, n. 1, p. 89–115, 2003.