



**ARTUR GOMES NOGUEIRA**

**NOVOS ATIVADORES DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO  
PPARG PARA A QUALIDADE DA CARNE BOVINA POR  
MEIO DE MODELAGEM MOLECULAR**

**LAVRAS – MG**

**2023**

**ARTUR GOMES NOGUEIRA**

**NOVOS ATIVADORES DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO PPARG PARA A  
QUALIDADE DA CARNE BOVINA POR MEIO DE MODELAGEM MOLECULAR**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Química, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador

Profa. Dra. Daiana Teixeira Mancini  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2023**

**ARTUR GOMES NOGUEIRA**

**NOVOS ATIVADORES DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO PPARG PARA A  
QUALIDADE DA CARNE BOVINA POR MEIO DE MODELAGEM MOLECULAR**

**NEW ACTIVATORS OF THE TRANSCRIPTION FACTOR PPARG FOR BEEF  
QUALITY THROUGH MOLECULAR MODELING**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Química, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 27 de novembro de 2023  
Dr. Teodorico de Castro Ramalho UFLA  
Dr. Alexandre Alves de Castro UFABC  
Me. Leonardo Vinícius Francisco Ferreira UFLA

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho  
Orientador

Profa. Dra. Daiana Teixeira Mancini  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2023**

*Aos meus pais e meu irmão, por serem meu refúgio e me apoiarem em todos os dias dessa caminhada. À todas as crianças do ensino público que sonham com a carreira acadêmica.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida e pelo privilégio de fazer o que gosto ao lado de pessoas que amo.

Aos meus pais, Maurício e Vanilza, pelo apoio, confiança, carinho e amor ao longo de toda minha vida.

Ao meu irmão, Henrique, pelo apoio e pelas conversas diárias que ajudaram a amenizar a saudade de casa.

Aos meus tios e tias pelo apoio emocional e incentivo.

Aos meus professores e colegas de laboratório por todo aprendizado, conversas e por toda atenção em me ajudar, em especial ao meu orientador Teodorico e minha coorientadora Daiana.

Aos meus amigos de graduação por deixarem todos esses anos mais leves e divertidos, em especial Ana Flávia, Bruna, Guilherme, Henrique, Iury, Júlia, Jordany, Karina, Luiza, Mariana, Raphael, Rodrigo e Thiago.

Aos meus amigos de apartamento com quem tive o privilégio de morar e dividir várias cervejas e conversas, em especial João Paulo, Luan, Matheus e Rafael.

À UFLA por todos ensinamentos e oportunidade de cursar uma faculdade pública e de qualidade. Aos funcionários da Universidade pelos serviços muitas vezes invisíveis, mas indispensáveis para o pleno funcionamento de toda Universidade.

Muito obrigado!

"Desesperar, jamais  
Aprendemos muito nestes anos  
Afinal de contas, não tem cabimento  
Entregar o jogo no primeiro tempo  
Nada de correr da raia  
Nada de morrer na praia  
Nada, nada, nada de esquecer"

(Ivan Lins)

## RESUMO

A carne bovina tropical tem baixa marmorização e lipídios intramusculares variáveis, fazendo com que a carne apareça entre seca e succulenta devido à falta de gordura intramuscular. O objetivo deste trabalho é obter a estrutura 3D do PPARG bovino e descobrir novos compostos que o ativem. A sequência alvo utilizada mostrou uma elevada identidade de sequência com o modelo da proteína PPARG humana. Os parâmetros de ancoramento molecular foram validados através da Curva ROC e do *re-docking*, e uma triagem virtual resultou em 274 compostos para investigação posterior. Após a aplicação de filtros, 12 compostos apresentaram melhor afinidade com o PPARG e menor toxicidade em comparação com a ligante de referência. O composto 4 mostrou interações favoráveis com o PPARG em simulações de dinâmica molecular, aumentando as expectativas para a descoberta de novos ativadores.

Palavras-chave: docking molecular; lipogênese; PPAR; PPARG; carne bovina.

## **ABSTRACT**

Tropical beef has low marbling and variable intramuscular lipids, making the meat appear between dry and juicy due to the lack of intramuscular fat. The objective of this work is to obtain the 3D structure of bovine PPARG and discover new compounds that activate it. The target sequence used showed high sequence identity with the human PPARG protein model. The docking parameters were validated through ROC Curve and re-docking, and a virtual screening resulted in 274 compounds for further research. After applying filters, 12 compounds showed better affinity with PPARG and lower toxicity compared to the reference ligand. Compound 4 showed favorable interactions with PPARG in molecular dynamics simulations, raising expectations for the discovery of new activators.

Keywords: molecular docking; lipogenesis; PPAR; PPARG; bovine meat.



## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE -

Figura 1 - Panorama econômico do mercado de carnes. ....	13
Figura 2 – Características de sabor em lombos de novilhos cruzados Angus x Brahman. ....	16
Figura 3 - Quantificação de acúmulo lipídico. ....	19
Figura 4 - Troglitazona como agonista parcial da PPAR $\gamma$ . ....	19

### SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Figure 1. Value of Meat Production between 1961 and 2021 .....	33
Figure 2. Alignment template with the modelled transcription factor .....	38
Figure 3. Ramachandran plot and structure of the model.....	39
Figure 4. PPAR $\gamma$ – Rosiglitazone interactions on a 2D diagram.....	40
Figure 5. Pharmacophoric pattern of the Rosiglitazone .....	41
Figure 6. Receiver characteristics (ROC) and Re-docking .....	43
Figure 7. Scatter plot: Affinity and LD <sub>50</sub> .....	43
Figure 8. BOILED-Egg of top twelve compounds targeting PPAR $\gamma$ <i>Bos taurus indicus</i> .....	45
Figure 9. 2D Diagram interactions between PPAR $\gamma$ _model and Compound 4.....	46
Figure 10. RMSD values of PPAR $\gamma$ monitored over 150 ns in MD simulations .....	47
Figure 11. The average residual fluctuations over a 150 ns in MD simulations .....	47
Figure 12. Number of hydrogen bonds between the ligands and PPAR $\gamma$ .....	48
Figure 13. Protein-ligand interaction energies Molecular Dynamics.....	49
Figure 14. Interactions performed during 150 ns in the molecular dynamics (MD) simulation for (a) Rosiglitazone/PPAR $\gamma$ and (b) Compound 4/PPAR $\gamma$ . The diagrams were performed on frame 23.81 ns and 43.64 ns, respectively.....	50

## LISTA DE QUADROS

### PRIMEIRA PARTE

Quadro 1 - Distribuição e função dos PPARs nos tecidos. ....	17
--	----

### SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Table 1. Virual Screening results. ....	42
Table 2. Thioglitazones activity. ....	42
Table 3. Ranking by the Euclidean distance equation.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i>
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>PPAR</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
<b>MAB</b>	<i>Marbling</i>
<b>WBSF</b>	<i>Warner-Bratzler Shear Force</i>
<b>USDA</b>	<i>United States Department of Agriculture</i>
<b>TG</b>	Triglicerídeos
<b>AGL</b>	Ácidos graxos livres
<b>DM</b>	Dinâmica Molecular

## SUMÁRIO

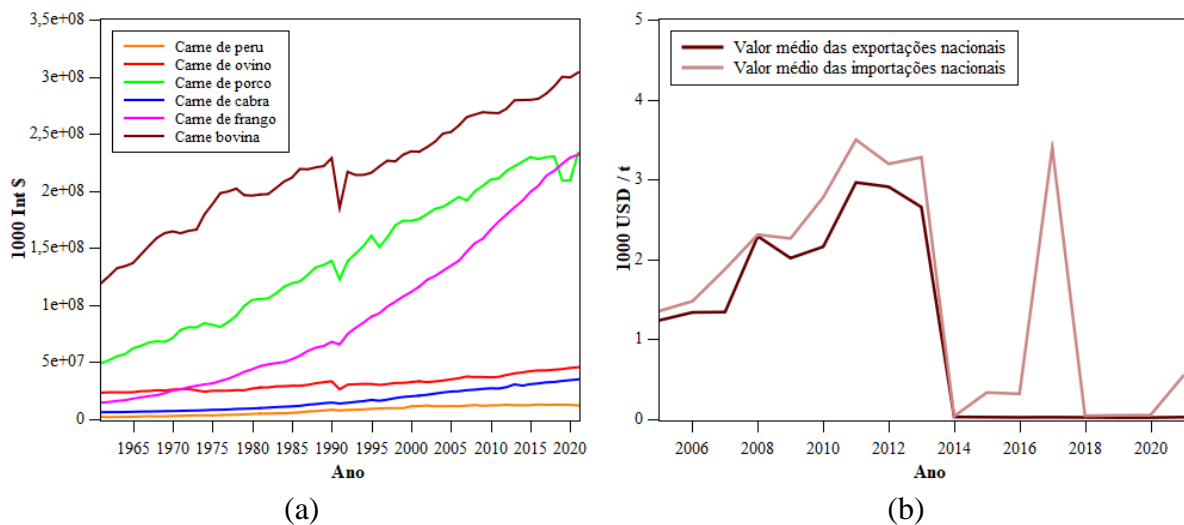
<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
2.1 Qualidade da carne bovina.....	15
2.2 Fatores de transcrição PPAR .....	16
2.3 PPAR $\gamma$ e o marmoreio da carne bovina .....	18
2.4 Métodos computacionais .....	20
2.5 Ancoramento Molecular .....	20
2.6 Dinâmica Molecular .....	23
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO.....</b>	<b>31</b>

## PRIMEIRA PARTE - MONOGRAFIA

### 1 INTRODUÇÃO

A indústria da carne tem um impacto significativo na economia, na alimentação, na cultura e no ambiente. O gado bovino tem sido consistentemente o principal produto de exportação em termos de valor desde 1961 (Figura 1a), destacando a sua popularidade entre os consumidores (FAO, 2021). A bovinocultura de corte possui um papel de extrema relevância dentro do cenário econômico do país. Estima-se que o plantel nacional esteja em torno de 234,4 milhões de cabeças, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Embora o Brasil seja o segundo maior produtor de carne bovina com osso, fresca ou resfriada (FAO, 2021), a qualidade da carne aqui produzida é considerada ainda regular pelo mercado internacional. Embora o preço seja atrativo (Figura 1b), não há vantagens em termos de qualidade (BRIDI; CONSTANTINO; TARSITANO, 2011).

Figura 1 - Panorama econômico do mercado de carnes.



Legenda: Os dados representados podem ser encontrados na plataforma FAOSTAT (FAO, 2021), para (a) na sessão *Value of Agricultural Production (Livestock)* e para (b) em *Crops and livestock products*, onde é representado os dados de exportações e importações nacionais exclusivamente da carne bovina.

Fonte: (FAO, 2021)

O conceito de qualidade da carne é amplo e inclui vários aspectos. O marmoreio refere-se à quantidade de gordura intramuscular e é considerado uma característica importante, pois está diretamente relacionado com as características sensoriais da carne, que podem ser

apreciadas pelo consumidor (COSTA et al., 2002). No entanto, o marmoreio é considerado uma das características mais importantes dentro dos parâmetros de qualidade da carne. A busca por incorporar o marmoreio na carcaça desses animais tem sido intensamente explorada para produzir um produto mais rentável para o produtor e que atenda às exigências do mercado consumidor atual (OLIVEIRA et al., 2017).

No Brasil, a maioria do rebanho é composta por bovinos zebuínos, principalmente da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). A carne desses animais geralmente é menos macia e apresenta menos gordura intramuscular em comparação com a carne do gado taurino, especialmente da raça Angus (*Bos taurus taurus*) (RODRIGUES et al., 2017; LAGE et al., 2012). Essa característica reduz a atratividade da carne zebuína, uma vez que a maciez e o marmoreio são considerados os principais atributos de palatabilidade pelos consumidores (FURNOLS; GUERRERO, 2014).

Uma forma de compreender a regulação destes depósitos de gordura intramuscular é através dos fatores de transcrição PPAR (CALKIN et al., 2007). Estas proteínas têm o poder de regular a expressão de vários genes que afetam o metabolismo dos lipídios (TAJNŠEK et al., 2020).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

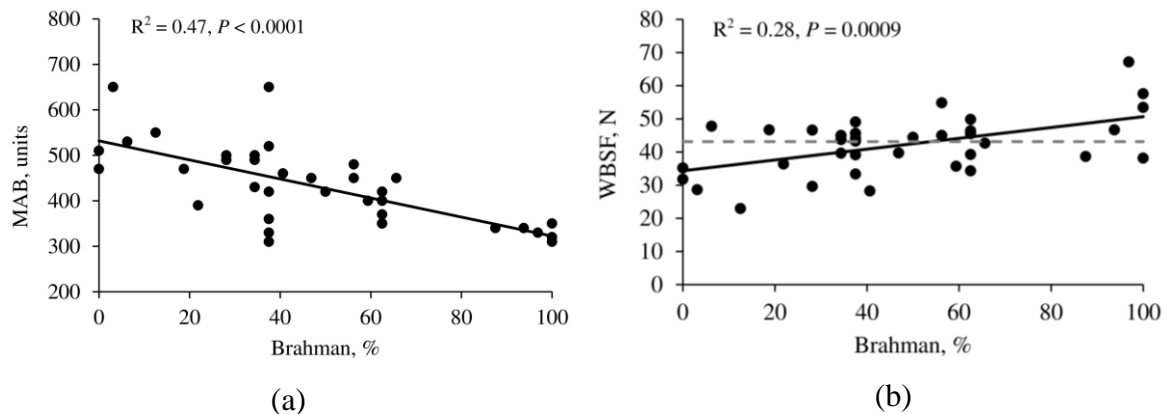
Este capítulo objetiva apresentar a teoria utilizada como base para a realização deste trabalho. Aqui é disposto o referencial teórico relacionado aos fatores bioquímicos referentes as proteínas PPAR, como sua função e estrutura, com enfoque à PPAR $\gamma$  e sua relação com o marmoreio da carne bovina. Também serão apresentados os métodos computacionais utilizados neste trabalho, com maior detalhe ao Ancoramento Molecular e Dinâmica Molecular.

### 2.1 Qualidade da carne bovina

Na indústria de carne bovina, em que raças de *Bos taurus* como Angus dominam, a raça *Bos indicus* Brahman conquistou um lugar distinto devido à sua adaptação ambiental (FRANKE, 1980; TURNER, 1980). O gado de influência Brahman e Brahman é amplamente utilizado nas regiões do Sudeste e Costa do Golfo dos Estados Unidos. Sua tolerância ao calor e resistência a parasitas, entre outras adaptações, fazem do Brahman parte integrante dos rebanhos bovinos em climas subtropicais (TURNER, 1980).

No estudo realizado por Shelby A. Wright e colaboradores, foram avaliados os escores de qualidade de cruzamentos entre Brahman e Angus. À medida que a influência de Brahman aumentou, observou-se um aumento na dureza da carne (WBSF) e uma diminuição na sensibilidade sensorial. Os bovinos com maior influência de Brahman apresentaram bifes mais resistentes e uma menor degradação proteica (WRIGHT et al., 2018).

Figura 2 – Características de sabor em lombos de novilhos cruzados Angus x Brahman.



Legenda: (a) Os escores de marmoreio (MAB) no lombo de carcaças de novilhos variando em composição racial de 0% Brahman (100% Angus) a 100% Brahman. (b) Sensibilidade objetiva avaliada pela WBSF (Força de Cisalhamento Warner Bratzler, do inglês: Warner-Bratzler Shear Force). A linha tracejada está em 43,1 N (4,4 kg), o limite entre resistente e tenro conforme descrito pelo USDA (ASTM, 2011).

Fonte: (WRIGHT et al., 2018).

Além disso, foi observado que o escore de marmoreio diminuiu com o aumento da porcentagem de Brahman (Figura 2a). À medida que a porcentagem de Brahman aumentou, a dureza da carne também aumentou (Figura 2b). De acordo com o Programa de Ternura do USDA, os bifes são considerados macios se tiverem um valor WBSF menor ou igual a 4,4 kg ou 43 N (USDA, 2011). Além disso, os escores sensoriais de suculência e tecido conjuntivo também diminuiram com o aumento da influência de Brahman, indicando que os bifes se tornaram menos suculentos e apresentaram mais tecido conjuntivo.

## 2.2 Fatores de transcrição PPAR

Os peroxissomas são organelas subcelulares encontradas nas células animais ou humanas. Eles desempenham um papel fundamental em processos metabólicos, como o metabolismo de ácidos graxos, colesterol e lipídios (MICHALIK, 2006), que melhoram a sensibilidade à insulina no corpo. Os PPARs (Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma, do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor*) atuam como fatores de transcrição que regulam a expressão de genes. Existem três tipos de PPARs: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e PPAR $\beta/\delta$  que são diferencialmente expressas entre os tecidos (TYAGI et al., 2011). As três isoformas dos



PPARs são predominantemente expressas nos tecidos relacionados ao metabolismo energético. Embora compartilhem uma grande homologia, as diversas isoformas dos PPARs apresentam padrões distintos de distribuição nos tecidos e desempenham funções fisiológicas diferentes (CIMINI et al., 2005).

O PPAR $\alpha$  é predominantemente expresso no fígado, coração, músculo esquelético e rim, promovendo o catabolismo de ácidos graxos e atuando como alvo molecular de medicamentos que atuam no controle dos níveis de colesterol. O PPAR $\beta$  desempenha um papel na regulação de diversos processos, como a diferenciação de queratinócitos, cicatrização de feridas, utilização de lipídios e glicose. O PPAR $\gamma$  é altamente expresso em adipócitos e macrófagos, sendo essencial na diferenciação de adipócitos, armazenamento de lipídios e regulação da inflamação. Além disso, o PPAR-gama é o alvo molecular das Tiazolidinedionas, que são medicamentos sensibilizadores à insulina utilizados no tratamento do diabetes tipo 2 (MATSUDA; KOBAYASHI; KITAGISHI, 2013; YOUSSEF; BADR, 2013). A Tabela 2.1 apresenta a distribuição e função dos PPARs nos tecidos metabólicos.

Quadro 1 - Distribuição e função dos PPARs nos tecidos.

Tecido	PPAR $\alpha$	PPAR $\beta$	PPAR $\gamma$
<b>Tecido adiposo marrom</b>	Oxidação de ácidos graxos e termogênese.	Oxidação de ácidos graxos e termogênese.	Diferenciação, armazenamento de lipídios.
<b>Fígado</b>	Oxidação de ácidos graxos, cetogênese, armazenamento de lipídios.	Oxidação de glicose, inflamação, captação de lipoproteínas.	Armazenamento de lipídios
<b>Tecido adiposo branco</b>	Oxidação de ácidos graxos.	Oxidação de ácidos graxos, oxidação de glicose e BCAA.	Adipogênese, armazenamento de lipídios.
<b>Células <math>\beta</math>-pancreáticas</b>	Oxidação de ácidos graxos, GSIS.	Oxidação de ácidos graxos, GSIS.	Lipogênese.
<b>Coração</b>	Oxidação de ácidos graxos, menor captação de glicose.	Oxidação de ácidos graxos, oxidação de glicose.	Supressão do crescimento e inflamação no coração.
<b>Músculo</b>	Oxidação de ácidos graxos, diminuição captação de glicose.	Oxidação de ácidos graxos, captação e armazenamento de glicose.	Gasto energético.

Legenda: O(s) subtipo(s) mais importante(s) de PPAR expresso(s) em níveis mais altos em cada tecido são indicados em negrito e preto, enquanto os subtipos expressos em níveis mais baixos são indicados em cinza.

Fonte: (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012).

### 2.3 PPAR $\gamma$ e o marmoreio da carne bovina

O PPAR $\gamma$  está localizado no cromossomo 3p25 e é principalmente expresso em adipócitos, onde estimula sua diferenciação e armazenamento de lipídios (SONG; LI; HE, 2022). Os agonistas PPAR $\gamma$ , como as Tiazolidinedionas, ativam o receptor e melhoram a sensibilidade à insulina em todo o corpo. Eles reduzem os níveis de ácidos graxos livres no sangue e alteram os níveis de adipocinas, reduzindo a síntese de glicose no fígado e aprimorando a entrada de glicose em músculos esqueléticos e tecidos adiposos, o que aumenta a liberação de insulina pancreática.

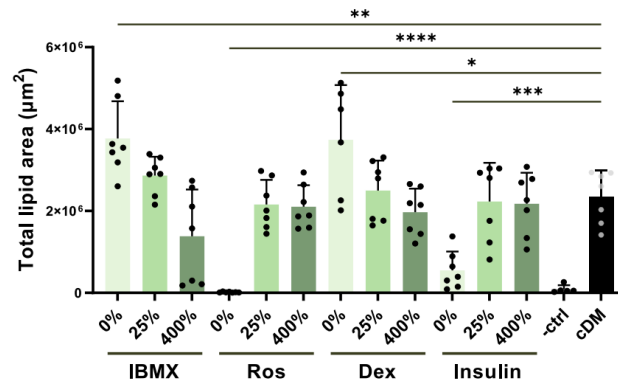
Os PPARs são alvos de medicamentos que possuem sobreposição e diferenças em suas funções biológicas. Alguns agonistas seletivos PPAR, moduladores PPAR duplos e pan são usados para tratar o metabolismo lipídico e diabetes (MUSTAFA et al., 2020). Entre eles, a Rosiglitazona - um dos principais compostos da classe das Tiazolidinedionas - diminui os níveis de triglicerídeos (TG) e ácidos graxos livres (AGL) (DEROSA; SAHEBKAR; MAFFIOLI, 2017), mas é relacionada à causa de efeitos adversos, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, fraturas ósseas, edema, insuficiência cardíaca e morte (CHEANG et al., 2015; LBOVITZ, 2019). Por outro lado, outros agonistas PPAR $\gamma$ , como os fibratos, são usados como tratamento para ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais há muitos anos (KHUCHUA et al., 2018), mostrando assim a importância e a amabilidade da PPAR $\gamma$  para doenças cardíacas.

Uma das principais estratégias utilizadas para a síntese de adipócitos *in vitro* é a suplementação por coquetel de diferenciação adipogênica (SCOTT et al., 2011) na tentativa de aumentar o marmoreio da carne bovina. Este protocolo consiste numa combinação de três ou quatro indutores adipogênicos que são normalmente adicionados ao meio em três fases: indução, progressão e manutenção (MITIC et al., 2023). Enquanto a insulina é uma proteína endógena, três dos indutores de diferenciação são sintéticos: Dexametasona, 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX) e Rosiglitazona.

Rada Mitić e colaboradores investigaram a exclusão completa e três concentrações diferentes de cada componente (Rosiglitazona, insulina, IBMX e Dexametasona). A remoção de insulina ou rosiglitazona do protocolo tradicional resultou em uma diferenciação significativamente diminuída em comparação com o controle, revelando sua necessidade (MITIC et al.,

2023), como mostra a Figura 2.2. No entanto, a Rosiglitazona é tóxica e, por conseguinte, não é compatível com os alimentos (NISSEN; WOLSKI, 2017).

Figura 3 - Quantificação de acúmulo lipídico.

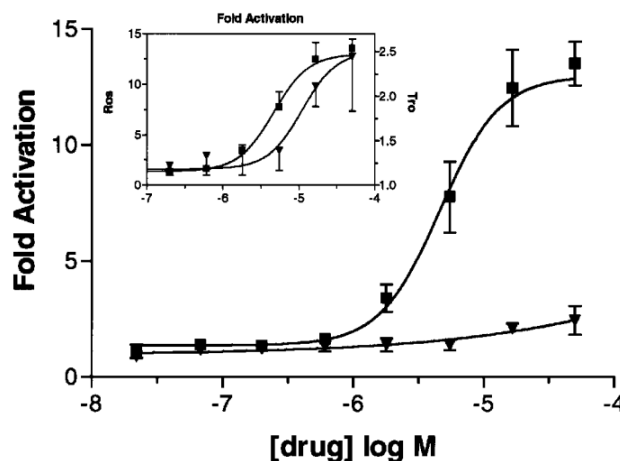


Legenda: Os gradientes de concentração dos componentes dos meios de diferenciação foram testados a 0, 25 e 400% de suas concentrações-padrão. IBMX: 3-Isobutil-1-metilxantina; Ros: Rosiglitazona; Dex: Dexametasona; -ctrl: controle negativo (do inglês: *negative control*); cDM: (do inglês: meio de controle de diferenciação (*control differentiation medium*)).

Fonte: (MITIC et al., 2023).

Alguns estudos utilizam a Rosiglitazona (EDVARDSSON et al., 1999) ou a Troglitazona (GRANT et al., 2008), que são Tiazolidinedionas ativadoras potentes do PPAR $\gamma$ , para promover a diferenciação adipogênica e o acúmulo de lipídios (PU; VEIGA-LOPEZ, 2017).

Figura 4 - Troglitazona como agonista parcial da PPAR $\gamma$ .



Legenda: Troglitazona (▼) e Rosiglitazona (■).

Fonte: (CAMP et al., 2000).

Porém, a Troglitazona foi relatada sendo um agonista parcial do PPAR $\gamma$  (CAMP et al., 2000), sendo um ligante que induz uma resposta submáxima mesmo com uma ocupação total do receptor, como mostra a Figura 2.3 do experimento conduzido nas pesquisas de H S Camp

e colaboradores. Foi referido que a ordem das potências de ligação ao PPAR $\gamma$  das Tiazolidinedonas conhecidas é a seguinte: Rosiglitazona > Pioglitazona > Troglitazona = Ciglitazona (WILSON et al., 1996).

Os métodos computacionais surgem como uma abordagem eficiente e promissora. Esses métodos permitem uma avaliação virtual de milhares de compostos, selecionando aqueles que possuem maior potencial de atividade e menor toxicidade, antes mesmo de qualquer síntese ou experimentação *in vitro*. Com isso, é possível otimizar o processo de descoberta de novos agonistas à PPAR $\gamma$  inspirados na estrutura do principal agonista, Rosiglitazona, garantindo atividade semelhante, porém, menos tóxico. Nesta seção, exploraremos detalhadamente como os métodos computacionais podem ser aplicados para acelerar a identificação de novos agonistas à PPAR $\gamma$ .

## 2.4 Métodos computacionais

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e o design de novos fármacos. Essas informações permitem uma análise rápida da estabilidade de moléculas complexadas frente às enzimas, bem como predição de propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse, especificamente neste trabalho, os compostos com o mesmo padrão farmacofórico da Rosiglitazona. Os modelos moleculares gerados pelo computador são resultantes de equações matemáticas que estimam uma nova perspectiva à química, estimando as posições que garantem maior afinidade entre duas estruturas, nesse caso entre a PPAR $\gamma$  e compostos potencialmente agonistas, entre o alvo molecular e pequenas moléculas, respectivamente. Dentre as inúmeras ferramentas computacionais, destacam-se o Ancoramento Molecular (do inglês: *Molecular Docking*) e simulações de Dinâmica Molecular (do inglês: *Molecular Dynamics*), métodos bem versáteis e práticos na estimativa de estabilidade uma molécula frente a cavidade de uma enzima.

## 2.5 Ancoramento Molecular

O Ancoramento Molecular é uma técnica computacional que visa prever a ligação não covalente entre macromoléculas, como receptores ou alvos moleculares, e uma pequena molécula, chamada de ligante. Seu principal objetivo é prever as conformações mais estáveis dos ligantes e calcular o valor de afinidade da interação com o receptor (JENSEN, 2017). Essa

afinidade depende da contribuição das interações intermoleculares e intramoleculares (TROTT; OLSON, 2009).

O *Molecular Docking* é uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, pois permite substituir virtualmente um ligante original por outros compostos na estrutura tridimensional cristalográfica da proteína com o ligante original. Essa substituição possibilita identificar moléculas com uma afinidade mais acentuada pelo receptor (JENSEN, 2017).

Uma etapa crucial do processo de *Molecular Docking* é definir a região no alvo molecular onde o ligante deve se posicionar para obter poses mais estáveis. *Softwares* de ancoramento utilizam diferentes abordagens para delimitar o sítio ativo das enzimas. Por exemplo, o *Molegro Virtual Docker* utiliza uma esfera chamada de *Binding Site* para determinar onde os ligantes devem se encontrar durante o processo de ancoramento. Já o *AutoDock Vina* usa um paralelepípedo – nomeado como *grid box* - que podem ser ajustadas as coordenadas e dimensões ideais para englobar a cavidade de interesse do alvo molecular em estudo (TROTT; OLSON, 2009).

O *Autodock Vina* é um programa de ancoragem molecular gratuito desenvolvido por Trott e Olson (TROTT; OLSON, 2009). Ele trabalha em conjunto com o *Autodock Tools* para ajustar e preparar as moléculas para o processo de *Molecular Docking*, além de definir o local de ligação entre elas. O software utiliza a Equação 2.1 para calcular os termos energéticos, somando as interações intramoleculares e intermoleculares.

$$c = c_{inter} + c_{intra} = \sum_{i < j} h_{t_i t_j}(d_{ij}) \quad (2.1)$$

Essas interações são representadas por variáveis que correspondem aos átomos do complexo proteína-ligante por meio dos índices  $i$  e  $j$ . Na equação acima, o termo  $d_{ij}$  representa a superfície de distância, que é dado pela diferença entre a distância interatômica ( $r_{ij}$ ) e o raio de Van der Waals ( $R_t$ ) para os átomos como mostrado na Equação 2.2, cálculo inspirado no trabalho de A N Jain (JAIN, 1996).

$$d_{ij} = r_{ij} - R_{t_i} - R_{t_j} \quad (2.2)$$

O programa também considera as interações estéricas pelo termo  $h_{t_i t_j}$ , pela soma ponderada das interações que consideram os pesos representados na Equação 2.3.

$$\begin{aligned} gauss_1(d) &= e^{-(d/0.5 \text{ \AA})^2} \\ gauss_2(d) &= e^{-[(d-3\text{\AA})/2\text{\AA}]^2} \\ repuls\tilde{a}o(d) &= \begin{cases} d^2, & \text{se } d < 0 \\ 0, & \text{se } d \geq 0 \end{cases} \end{aligned} \quad (2.3)$$

As interações hidrofóbicas são representadas por funções lineares, enquanto as ligações de hidrogênio são tratadas por uma equação específica. Os termos hidrofóbicos e de ligação de hidrogênio são calculados de acordo com as distâncias interatômicas e os raios de Van der Waals. Nesta implementação, as funções de interação são cortadas em uma distância de 8Å.

No programa Autodock Vina, as interações hidrofóbicas são representadas por funções lineares em pares. Quando ambos os átomos são hidrofóbicos, a equação *int. hidrofóbicas* é adicionada à soma das interações estéricas. Por outro lado, quando um par de átomos é formado por um doador de hidrogênio e um átomo receptor, a equação *Hbond* é utilizada.

$$\begin{aligned} int. \text{ hidrof\acute{o}bicas}(d) &= \begin{cases} 1, & \text{se } d < 0.5 \text{ \AA} \\ \text{interpolac\~{a}o linear se } 0.5 \text{ \AA} < d < 1.5 \text{ \AA} \\ 0, & \text{se } d > 1.5 \end{cases} \\ Hbond(d) &= \begin{cases} 1, & \text{se } d < -0.7 \text{ \AA} \\ \text{interplac\~{a}o linear se } -0.7 \text{ \AA} < d < 0 \\ 0, & \text{se } d > 0 \end{cases} \end{aligned} \quad (2.4)$$

O termo hidrofóbico é igual a 1 quando a distância  $d$  é inferior a 0,5 Å, 0 quando  $d$  é superior a 1,5 Å, e interpolado linearmente entre esses valores. O termo de ligação de hidrogênio é igual a 1 quando a distância  $d$  é inferior a -0,7 Å, 0 quando  $d$  é superior a 0, e interpolado linearmente no meio. Todas as funções de interação ( $h_{t_i t_j}$ ) são desprezadas em uma distância de 8 Å.

## 2.6 Previsão de toxicidade

Ao considerar um potencial composto, é crucial avaliar seu potencial tóxico. Uma medida padrão comum da toxicidade aguda é o valor da dose letal, ou LD50, que permite avaliar

a toxicidade relativa de diferentes moléculas. O LD50 representa a dose de um composto administrada de uma só vez, levando à morte de 50% de um grupo de animais de teste. O modelo utilizado pela plataforma pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>) desenvolvida por colaboração entre o Instituto René Rachou (Fiocruz Minas), University of Melbourne e University of Cambridge baseou-se na análise de mais de 10000 compostos em ratos e prevê o LD50 em mol/kg.

## 2.7 Dinâmica Molecular

Os átomos presentes nas biomoléculas estão sempre em movimento, e tanto a atividade molecular quanto as interações intermoleculares dependem dessa disposição das moléculas. Para observar as biomoléculas em ação, perturbá-las em nível atômico e analisar suas respostas, a técnica de Dinâmica Molecular (em inglês: *Molecular Dynamics*) é uma simulação computacional importante no estudo dos fenômenos experimentais relacionados às biomoléculas (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018). As simulações de Dinâmica Molecular (DM) permitem prever como cada átomo em uma proteína ou outro sistema molecular se moverá ao longo do tempo, com base em um modelo geral da física que governa as interações entre átomos (KARPLUS; MCCAMMON, 2002).

Essas simulações têm a capacidade de capturar uma ampla variedade de processos biomoleculares relevantes, como mudanças em conformações, interações energéticas entre ligantes e macromoléculas, e o dobramento de proteínas, revelando as posições de todos os átomos em uma resolução temporal de femtossegundos. É importante destacar que essas simulações também podem prever como as biomoléculas responderão, em nível atômico, a perturbações como mutações, fosforilação, protonação, adição ou remoção de um ligante, e sua estabilidade em relação ao alvo molecular (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

Na simulação, a molécula é tratada como um conjunto de átomos esféricos, e as ligações químicas são modeladas como molas. Os átomos no sistema são representados por esferas, onde a massa da partícula corresponde à massa atômica. A descrição dos átomos é feita apenas por meio das coordenadas do núcleo, seguindo a aproximação de Born-Oppenheimer. Essa abordagem pressupõe que, devido à grande diferença de massa, os elétrons se movem em uma escala de tempo muito mais rápida do que os núcleos, permitindo a separação de seus movimentos (HASSANALI et al., 2014; ADCOCK; MCCAMMON, 2006).

A execução da simulação envolve a resolução numérica das equações newtonianas do movimento para cada átomo. Isso é realizado através da evolução em intervalos de tempo de  $n$  a  $n + 1$ , onde uma sequência extensa desses passos resulta em uma trajetória no espaço. Para um átomo  $i$ , com massa  $m_i$ , a equação newtoniana do movimento é expressa pela equação 2.5.

$$\vec{F}_{x_i} = \frac{d^2 \vec{x}}{dt^2} m_i \quad (2.5)$$

Para expressar a variação da posição  $x$  de um átomo  $i$  em relação ao tempo, é necessário conhecer a força ( $\vec{F}_{x_i}$ ) atuando sobre o átomo  $i$  em uma posição  $x$  específica. A temperatura proporciona a energia que induz os átomos a acelerarem, alterando suas posições no espaço. No entanto, devido à ligação dos átomos em moléculas, que por sua vez interagem com outras moléculas, esses átomos estão sujeitos a forças interatômicas e intermoleculares. O cálculo dessas forças é realizado por meio de um conjunto de funções matemáticas que compõem o campo de força. Cada campo de força define um conjunto específico de equações matemáticas destinadas a replicar características do comportamento molecular, como a extensão de ligações químicas, a deformação de ângulos de ligação ou a torção de diedros. Essas equações são parametrizadas para reproduzir de maneira precisa o comportamento dos compostos de interesse (VERLI, 2014).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Propor um composto adipogênico por meio de técnicas computacionais, dada a substituição da rosiglitazona por um agonista PPAR $\gamma$ , sendo assim adequado para a produção de gordura cultivada.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Modelagem do fator de transcrição PPAR $\gamma$  bovino por homologia;
- Validação do *software* de Ancoramento Molecular mediante *ROC Curve* e cálculo de *RMSD*;
- Fazer a Triagem Virtual Baseada em Ligantes, inspirada na estrutura da Rosiglitazona, bem como a aplicação de sucessivos filtros;
- Realizar o cálculo de Ancoramento Molecular e previsão de LD<sub>50</sub> com os compostos oriundos da Triagem Virtual pelos parâmetros anteriormente validados;
- Estudo de propriedades farmacocinéticas dos compostos triados mais bem ranqueados;
- Execução do cálculo de Dinâmica Molecular com o composto mais promisso do conjunto e com o ligante de referência, Rosiglitazona.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chemical Reviews**, American Chemical Society (ACS), v. 106, n. 5, p. 1589–1615, fev. 2006.

ASTM. **Standard specification for tenderness marketing claims associated with meat cuts derived from beef**. [S.l.]: ASTM International West Conshohocken (PA), 2011.

BRIDI, A. M.; CONSTANTINO, C.; TARSITANO, M. A. Qualidade da carne de bovinos produzidos em pasto. **Simpósio de produção animal à pasto**, v. 1, p. 311–332, 2011.

CALKIN, A. et al. PPARs and diabetes-associated atherosclerosis. **Current Pharmaceutical Design**, Bentham Science Publishers Ltd., v. 13, n. 26, p. 2736–2741, set. 2007.

CAMP, H. S. et al. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone and rosiglitazone. **Diabetes**, American Diabetes Association, v. 49, n. 4, p. 539–547, abr. 2000.

CHEANG, W. S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptors in cardiovascular diseases: experimental benefits and clinical challenges. **British Journal of Pharmacology**, Wiley, v. 172, n. 23, p. 5512–5522, jan. 2015.

CIMINI, A. et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. **Neuroscience**, Elsevier BV, v. 130, n. 2, p. 325–337, jan. 2005.

COSTA, E. C. da et al. Composição física da carcaça, qualidade da carne e conteúdo de colesterol no músculo longissimus dorsi de novilhos red angus superprecoce, terminados em confinamento e abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, FapUNIFESP (SciELO), v. 31, n. 1 suppl, p. 417–428, jan. 2002.

DEROSA, G.; SAHEBKAR, A.; MAFFIOLI, P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. **Journal of Cellular Physiology**, Wiley, v. 233, n. 1, p. 153–161, mar. 2017.

EDVARDSSON, U. et al. Rosiglitazone (BRL49653), a PPAR-selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. **Journal of Lipid Research**, Elsevier BV, v. 40, n. 7, p. 1177–1184, jul. 1999.

FAO. **FAOSTAT**. 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>.

FRANKE, D. E. Breed and heterosis effects of american zebu cattle. **Journal of Animal Science**, Oxford University Press (OUP), v. 50, n. 6, p. 1206–1214, jun.1980.

FURNOLS, M. F. i; GUERRERO, L. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. **Meat Science**, Elsevier BV, v. 98, n. 3, p. 361–371, nov. 2014.

GRANT, A. C. et al. Differentiation of bovine intramuscular and subcutaneous stromal-vascular cells exposed to dexamethasone and troglitazone1. **Journal of Animal Science**, Oxford University Press (OUP), v. 86, n. 10, p. 2531–2538, out. 2008.

HASSANALI, A. A. et al. Aqueous solutions: state of the art in ab initio/i molecular dynamics. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, The Royal Society, v. 372, n. 2011, p. 20120482, mar. 2014.

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular dynamics simulation for all. **Neuron**, Elsevier BV, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, set. 2018.

JAIN, A. N. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. **Journal of Computer Aided Molecular Design**, Springer Science and Business Media LLC, v. 10, n. 5, p. 427–440, out. 1996

JENSEN, F. **Introduction to computational chemistry**. [S.l.]: John wiley & sons, 2017.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 9, n. 9, p. 646–652, set. 2002.

KHUCHUA, Z. et al. Elucidating the beneficial role of PPAR agonists in cardiac diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, v. 19, n. 11, p. 3464, nov. 2018.

LAGE, J. et al. Influence of genetic type and level of concentrate in the finishing diet on carcass and meat quality traits in beef heifers. **Meat Science**, Elsevier BV, v. 90, n. 3, p. 770–774, mar. 2012.

LEBOVITZ, H. E. Thiazolidinediones: the forgotten diabetes medications. **Current Diabetes Reports**, Springer Science and Business Media LLC, v. 19, n. 12, nov. 2019.

MATSUDA, S.; KOBAYASHI, M.; KITAGISHI, Y. Expression and function of PPARs in placenta. **PPAR Research**, Hindawi Limited, v. 2013, p. 1–7, 2013.

MICHALIK, L. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. **Journal of Clinical Investigation**, American Society for Clinical Investigation, v. 116, n. 3, p. 598–606, mar. 2006.

MITIC, R. et al. A simplified and defined serum-free medium for cultivating fat across species. **iScience**, Elsevier BV, v. 26, n. 1, p. 105822, jan. 2023.

MUSTAFA, H. A. et al. Computational determination of human iPPARG/i gene: SNPs and prediction of their effect on protein functions of diabetic patients. **Clinical and Translational Medicine**, Wiley, v. 9, n. 1, jan. 2020.

NISSEN, S. E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts Medical Society, v. 356, n. 24, p. 2457–2471, jun. 2007.

OLIVEIRA, P. P. d. et al. Avaliação das características obtidas por ultrassom e a associação do uso de marcador molecular para o marmoreio em bovinos de raça de nelore. Florianópolis, SC, 2017.

POULSEN, L. la C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Elsevier BV, v. 23, n. 6, p. 631–639, ago. 2012.

PU, Y.; VEIGA-LOPEZ, A. PPAR agonist through the terminal differentiation phase is essential for adipogenic differentiation of fetal ovine preadipocytes. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Springer Science and Business Media LLC, v. 22, n. 1, mar. 2017.

RODRIGUES, R. T. de S. et al. Differences in beef quality between angus (*bos taurus taurus*) and nelore (*bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. **PLOS ONE**, Public Library of Science (PLoS), v. 12, n. 1, p. e0170294, jan. 2017.

SCOTT, M. A. et al. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, Mary Ann Liebert Inc, v. 20, n. 10, p. 1793–1804, out. 2011.

SONG, Y.; LI, S.; HE, C. PPAR gene polymorphisms, metabolic disorders, and coronary artery disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **Frontiers Media SA**, v. 9, mar. 2022.

TAJNŠEK, Š. et al. Association of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) with diabetic retinopathy in human and animal models: Analysis of the literature and genome browsers. **PPAR Research**, Hindawi Limited, v. 2020, p. 1–8, mar. 2020.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, Wiley, v. 31, n. 2, p. 455–461, jun. 2009.

TURNER, J. W. Genetic and biological aspects of zebu adaptability. **Journal of Animal Science**, Oxford University Press (OUP), v. 50, n. 6, p. 1201–1205, jun. 1980.

TYAGI, S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, Medknow, v. 2, n. 4, p. 236, 2011.

VERLI, H. Dinâmica molecular. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. Cap. 8, p. 173-187, 2014.

WILLSON, T. M. et al. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. **Journal of Medicinal Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 39, n. 3, p. 665–668, jan. 1996.

WRIGHT, S. A. et al. Brahman genetics influence muscle fiber properties, protein degradation, and tenderness in an angus-brahman multibreed herd. *Meat Science*, Elsevier BV, v. 135, p. 84–93, jan. 2018.

YOUSSEF, J. A.; BADR, M. Z. Tissue distribution and versatile functions of PPARs. In: **Peroxisome Proliferator-Activated Receptors**. Humana Press, 2013. p. 33–69.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

**Novel activators of the PPAR $\gamma$  for beef quality through molecular modelling**

(Artigo elaborado de acordo com o periódico científico Molecular Simulation)

**ABSTRACT**

Tropical beef has low marbling and variable intramuscular lipids, making the meat appear between dry and juicy due to the lack of intramuscular fat. The objective of this work is to obtain the 3D structure of bovine PPAR $\gamma$  and discover new compounds that activate it. The target sequence used showed high sequence identity with the human PPAR $\gamma$  protein model. Virtual screening and molecular docking identified compounds that activate human PPAR $\gamma$ . The docking parameters were validated through ROC Curve and re-docking, and a virtual screening resulted in 274 compounds for further research. After applying filters, 12 compounds showed better affinity with PPAR $\gamma$  and lower toxicity compared to the reference ligand. Compound 4 showed favorable interactions with PPAR $\gamma$  in molecular dynamics simulations, raising expectations for the discovery of new activators.

Keywords: molecular docking; lipogenesis; PPAR $\gamma$ ; bovine meat.



## 1. INTRODUCTION

The meat economy plays a significant role in several areas, including the economy, food, culture, and environmental issues. The bovine cattle have led the ranking of export values since 1961 (FAO, 2021) as shown Figure 1, certifying its preference to consumer tastes. According to de Felício (2000), tropical meat is practically devoid of marbling, where the results of hundreds of analyses reveal a range of 1.5 – 3.5% of intramuscular lipids in sirloin steaks. The juiciness of the meat varies from dry to succulent, due to the lack of intramuscular fat, which corroborates that tropical meat is treated as a regular commodity (de Felício, 2000; Lage et al., 2012; Rodrigues et al., 2017)

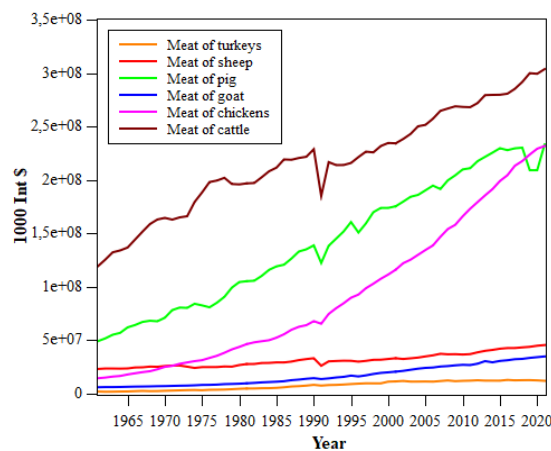


Figure 1. Value of Meat Production between 1961 and 2021.

The data represented can be found in the Value of Agricultural Production (Livestock) section on the FAOSTAT platform.

The animal body's lipid reserve is represented by a state of equilibrium between fat synthesis and catabolism. Once the balance is destroyed, fat deposition is increased or decreased (Liu et al., 2021) to re-establish the previous balance. According to Hausman (2009), subcutaneous, internal, seam and intramuscular adipose tissue deposits are all economically and physiologically important in meat animal production, where it is claimed that deciphering the regulation of each adipose deposit can lead to new animal production strategies (Hausman et al., 2009).

In Brazil, most of the herd is made up of zebu cattle, mainly of the Nelore breed (*Bos taurus indicus*). The meat from these animals is generally less tender and has less marbling compared to meat from taurine cattle, especially the Angus breed (*Bos taurus taurus*) (Lage et al., 2012; Rodrigues et al., 2017). This characteristic reduces the attractiveness of zebu meat since tenderness and marbling are considered the main attributes of palatability by consumers (Font-i-Furnols & Guerrero, 2014; Polkinghorne & Thompson, 2010). Marbling refers to the

amount of intramuscular fat and is considered an important characteristic because it is directly related to the sensory characteristics of the meat, which can be appreciated by the consumer (Costa et al., 2002).

One way of understanding the regulation of these deposits, as advocated by Hausman (2009), is through the PPAR (Calkin et al., 2007). These proteins have the power to regulate the expression of various genes affecting lipid and carbohydrate metabolism (Tajnšek et al., 2020). One of the main strategies used to synthesize adipocytes *in vitro* is supplementation with an adipogenic differentiation cocktail (Scott et al., 2011) to increase beef marbling. This protocol consists of a combination of three or four adipogenic inducers that are usually added to the medium in three phases: induction, progression, and maintenance (Mitić et al., 2023). Insulin is commonly used in combination with the synthetic differentiation inducers dexamethasone, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and rosiglitazone.

Rada Mitić and colleagues investigated the complete exclusion and three different concentrations of each component (rosiglitazone, insulin, IBMX and dexamethasone). Removing insulin or rosiglitazone from the traditional protocol resulted in significantly decreased differentiation compared to the control, revealing its necessity (Mitić et al., 2023). However, rosiglitazone is toxic and therefore not compatible with food (Nissen & Wolski, 2007).

The aim of our work, therefore, will be to propose an adipogenic compound, given the replacement of rosiglitazone by a PPAR $\gamma$  agonist to be less toxic and thus suitable to produce cultured fat.

## 2. METHODS

### *2.1 Transcription factor target selection and Modelling by homology*

Homology modelling was used to predict the three-dimensional structure of bovine PPAR $\gamma$ . For this purpose, a known and experimentally validated three-dimensional structure – human template was used as the base protein (or template) and experimentally validated three-dimensional structure - human PPAR $\gamma$  (Gampe et al., 2000), PDB ID: 1FM6 (resolution = 2.1 Å). The amino acid sequence of the bovine PPAR $\gamma$  used for modelling is present in the UniProt database (Bateman et al., 2023) with the code UniProtKB/SwissProt: A0A6P5DU68 of the organism *Bos taurus indicus*.

The SWISS-MODEL server (Bienert et al., 2017; Waterhouse et al., 2018) was used to perform homology modelling. The criteria for evaluation of the constructed model were: (1) Sequence Identity; (2) Ramachandram chart (Chen et al., 2010); (3) QMEANDiscCo (Studer et al., 2020).

### *2.2 Structure-based Virtual Screening*

The virtual screening of potential PPAR $\gamma$  activators was performed in the MolPort, Mcule and ZINC molecule banks, using the Pharmit Search Engine platform (<https://pharmit.csb.pitt.edu>) for the first two banks and the ZINCPharmer platform for the last one. The chemical structure of Rosiglitazone (RGZ) used during the virtual screening is the crystallised form together with human PPAR $\gamma$  (PDB ID: 1FM6) (Gampe et al., 2000). The set of hits obtained was initially submitted to the SwissADME (Daina et al., 2017), where a qualitative toxicological analysis was performed that consisted of separating only the hits that do not have violations of the rules and parameters of Lipinski (Lipinski et al., 2012), PAINS (Baell & Holloway, 2010) and Brenk (Brenk et al., 2008) simultaneously.

### *2.3 Molecular Docking Study and Analysis*

To validate the use of the proposed programme for molecular docking of the proposed ligands to PPAR $\gamma$ , AutoDock Vina (Eberhardt et al., 2021; Trott & Olson, 2009), the statistical means chosen were the area under curve the Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve and the molecular re-docking. For the construction of the ROC curve, five compounds active (Table 2) to the PPAR $\gamma$  with activity values recognised were chosen (Willson et al.,

1996) has been used to generate false-positive compounds, for aim to predict software's ability to distinguish between active compounds and false actives, which are referred to as decoys. For each of the active compounds, 50 decoys were generated using the DUD.E platform (Mysinger et al., 2012). The assessment of molecular re-docking involved the calculation of the root mean square deviation. This value was obtained from aligning the docked structure with the crystallographic structure (rosiglitazone) through superposition.

Following these validations, the sets of compounds associated accepted in the term toxicity (no alerts and violations to Lipinski, PAINS and Brenk) were docked within the active site using AutoDock Vina with total of 30 exchanges were executed. From the analysis of ligand-protein interactions, the conformation with the most affinity was chosen. Also, the set of screening compounds were assessed for their qualitative toxicity by means of the Oral Rat Acute Toxicity ( $LD_{50}$ ) via the pkCSM platform (Pires et al., 2015).

The group of the compounds has been ranked by the best affinity values simultaneously with the lowest  $LD_{50}$  values. The top compounds ranked was evaluated by BBB permeant and Pgp substrate, using the BOILED-Egg chart.

#### ***2.4 Molecular Dynamic (MD) simulation***

Molecular dynamics (MD) simulations elucidate the temporal interatomic interactions within a protein and other molecular systems, closely resembling their natural conditions. These simulations effectively capture a spectrum of biological processes, including ligand binding, complex stability, and protein folding (Hollingsworth & Dror, 2018; Karplus & McCammon, 2002). In this current investigation, molecular dynamics simulations were carried out using the software GROMACS-5.1.2 (Schmid et al., 2011), with the support of Laboratory of Molecular Modelling at the Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Brazil. This was carried out on the *Bos taurus indicus* PPAR $\gamma$ , as well as its complexes with the reference ligand Rosiglitazone, along with the highest-ranked compound MCULE-1323064686. The simulation procedure closely adhered to the protocol outlined in our previous publication (Gonçalves et al., 2022; Tavares et al., 2023). In brief, ATB Version 3.0 (<https://atb.uq.edu.au/>) was used to create topology files for the ligands. The simulation was carried out in an SPC water environment, along with counter ions ( $Na^+/Cl^-$ ) to neutralise the system.

The NVT/NPT ensemble was established at a temperature of 300 K and an atmospheric pressure of 1 bar. The simulation utilized the GROMOS54a7 force field. The simulation duration was defined as 150 ns. After carrying out the 150 ns molecular dynamics steps, as described in the methodology section, the Hydrogen Bond, Interaction Energy, RMSD (Root Mean Square Deviation) and RMSF (Root Mean Square Fluctuation) graphs were generated and analysed for each system.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Homology Modelling of PPAR $\gamma$

It is important to note that the absence of a crystallographic structure of bovine PPAR $\gamma$  is a significant limitation in understanding the structure and function of this important molecular target. Therefore, modelling the molecular target by homology becomes a valuable tool to fill this gap. Based on the crystallographic structure of another known PPAR $\gamma$ , homology modelling allows the creation of a three-dimensional representation of the target protein.

The homology modelling using the human PPAR $\gamma$  (PDB ID: 1FM6) and the primary sequence UniProtKB: A0A6P5DU68 of the organism *Bos taurus indicus* presented a coverage range equal to 54% (234-505). The 272 residues present in the model created presented equivalent sequence identity 98.90%, having only 3 residues (SER-296, PRO-301 and ASN-330) that differ from the template as shown in Figure 2 with the alignment between the sequences of the two structures, the three residues that differ are not present in the cavity of the protein to be molecular docking.

```

1FM6          206 PESADLRALAKHLYDSYIKSFPLTKAKARAILTGKTTDKSPFVIYDMNSL 255
PPAR $\gamma$ _MODEL 234 PESADLRALAKHLYDSYIKSFPLTKAKARAILTGKTTDKSPFVIYDMNSL 283
*****

1FM6          256 MMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPG 305
PPAR $\gamma$ _MODEL 284 MMGEDKIKFKHISPLQEPSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQEITEYAKNIPG 333
*****:*****

1FM6          306 FVNLDLNDQVTLKYGVHEIITYTMLASLMNKDGVLISEGQGFMTREFLKS 355
PPAR $\gamma$ _MODEL 334 FVNLDLNDQVTLKYGVHEIITYTMLASLMNKDGVLISEGQGFMTREFLKS 383
*****

1FM6          356 LRKPGDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFFIAVIILSGDRPGLLNPK 405
PPAR $\gamma$ _MODEL 384 LRKPGDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFFIAVIILSGDRPGLLNPK 433
*****

1FM6          406 IEDIQDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQV 455
PPAR $\gamma$ _MODEL 434 IEDIQDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQV 483
*****

1FM6          456 IKKTETDMSLHPLLQEIYKDL 477
PPAR $\gamma$ _MODEL 484 IKKTETDMSLHPLLQEIYKDL 505
*****

```

Figure 2. Alignment template with the modelled transcription factor.

Fully conserved residues are indicated with an asterisk (\*), while (:) and (.) indicate residues with

strongly similar and residues with weakly similar properties, respectively. Residues marked in red are present in the cavity and inside the docking grid box.

The platform SWISS-MODEL returned the value of Ramachandran Favoured equal to 92.22%. In the calculation of a Ramachandran plot (Fig. 3), the atoms are treated as hard spheres whose dimensions correspond to their van der Waals radii, if the combination of the angles  $\Phi$  and  $\Psi$  results in the collision of the spheres is considered sterically unfavourable, thus identified as outlier residues. The residues known as Ramachandran Outliers in the model created are: PRO-387; GLN-299; LEU-298; ASP-271; MET-491; SER-492; SER-296; ARG-385; PRO-297; PRO-301.

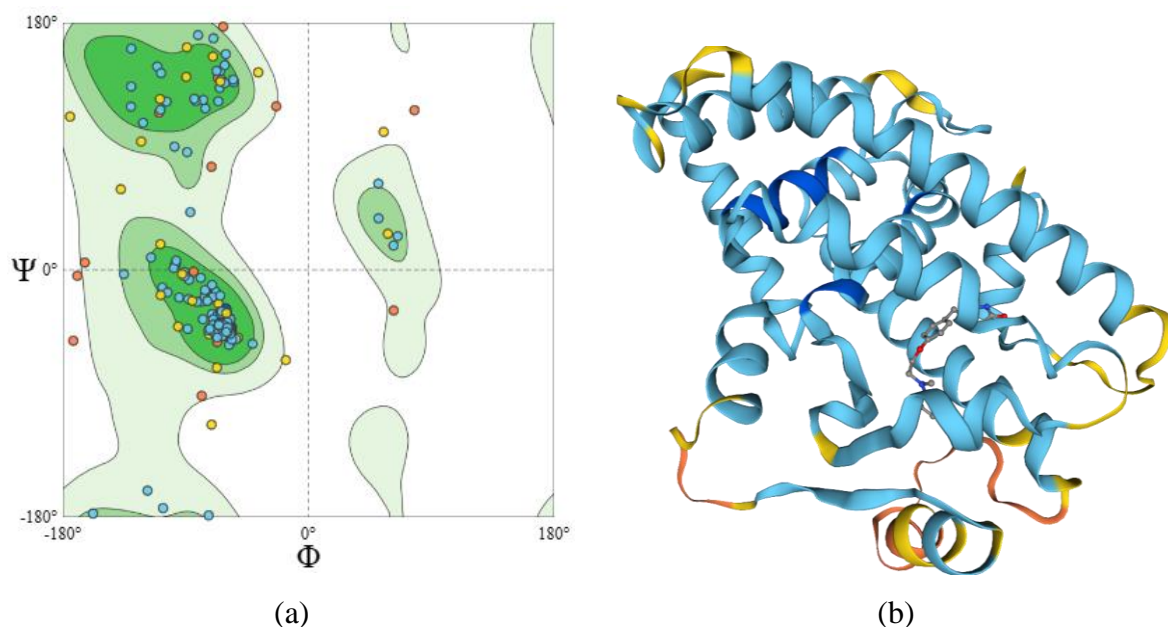


Figure 3. Ramachandran plot and structure of the model.

The residuals colored by the degree of confidence based on the QMEANDisCo metric, where navy blue represents very high confidence ( $\text{QMEANDisCo} > 0.9$ ), blue indicates confidence ( $0.7 < \text{QMEANDisCo} < 0.9$ ), yellow indicates low confidence ( $0.5 < \text{QMEANDisCo} < 0.7$ ) and orange indicates very very low confidence ( $\text{QMEANDisCo} < 0.5$ ).

Among the outlier residues, five belong to the cavity that contains the Rosiglitazone molecule in the human PPAR $\gamma$  used as template for the modelling, which are: SER-296, PRO-297, LEU-298, GLN-299 and MET-491. However, none of the outlier residues perform intermolecular interactions with Rosiglitazone, as shown in Figure 4b.

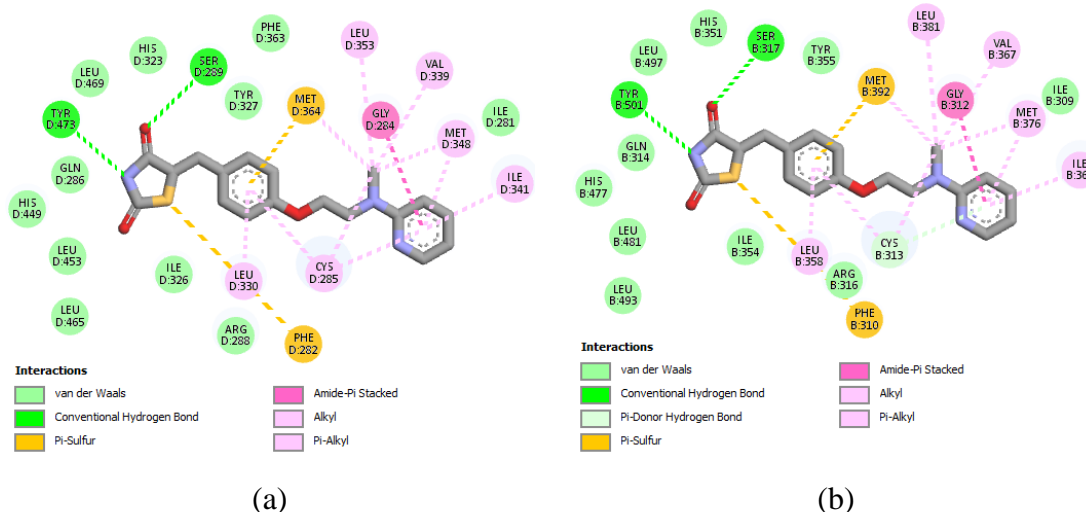


Figure 4. PPAR $\gamma$  – Rosiglitazone interactions on a 2D diagram.  
 (a) 1FM6 – Rosiglitazone interactions; (b) PPAR $\gamma$ \_model – Rosiglitazone interactions.

The cavity to be used in the docking was calculated using the Cavity tool (Yuan et al., 2013) present in the platform Cavity Plus (Wang et al., 2023). The cavity was chosen because of the location of Rosiglitazone (RGZ) crystallized in the human PPAR $\gamma$  (PDB ID: 1FM6). GMQE and QMEANDisCo provide an overall measurement of model quality between 0 and 1, with higher numbers indicating higher expected quality. The calculation of the GMQE parameter is coverage dependent, a model that covers only half of the primary sequence used is unlikely to score above 0.5. As expected, the GMQE found was equal to 0.44, since the coverage range was 54% (234-505). In contrast, QMEANDisCo evaluates the current model, without explicitly depending on the coverage range. After this consideration, the expectation that the QMEANDisCo value would be higher than the GMQE was fulfilled, with the QMEANDisCo value equal to  $0.77 \pm 0.05$ .

### 3.2 Virtual Screening

Virtual Ligand-Based Screening (TVBL) is a strategy that employs compounds with known biological activity as a starting point, regardless of the structure of a molecular target. This approach aims to identify molecules that have certain structural similarity and thus similar activity when interacting with the molecular target (Geppert et al., 2010). One strand belonging to the set of TVBL approaches is the search by determining the pharmacophoric pattern.

The construction of the pharmacophore pattern used was done considering the atoms and regions of Rosiglitazone that interact with PPAR $\gamma$  (Fig. 4) and by the pharmacophores



considered by Justin et al., 2020 and Nanjan et al., 2018. The pharmacophore pattern was designed considering the thiazolidinedione ring as the acid polar head of Rosiglitazone and selected only the pharmacophores that performed interactions with PPAR $\gamma$  (Fig. 4), being: (1) Oxygen of the amide as Hydrogen Acceptor; (2) Nitrogen of the amide as Hydrogen Donor and (3) the Sulfur atom as Hydrophobic group, for not having options in the platforms that best described it. Justin et al., 2020 presents the disubstituted benzene ring of the structure as an aromatic spacer, complementing the positioning, Nanjan et al., 2018 presents the same ring as a hydrophobic connector, thus the pharmacophores (4) Aromatic and (5) Hydrophobic were used to describe this region of the Rosiglitazone molecule.

To describe the other hydrophobic end effectively the pharmacophore (6) Hydrophobic was chosen, having its sphere located on the pyridine ring. On the same ring is also located the pharmacophore (7) Aromatic, due to the vast number of interactions of Pi nature identified in this region. As the methyl radical located as one of the substituents of the tertiary amine performs several Alky interactions, this region was described by the pharmacophore (8) Hydrophobic.

The libraries of molecules chosen (Table 1) under the action of the pharmacophore pattern (Fig. 5) and the Lipinski Rule returned 274 hits, of which 24 are repeated molecules, thus leaving 250 hits. Among the 250 hits, only 209 were submitted to the Molecular Docking and LD<sub>50</sub> calculations, as they did not present alerts (PAINS and Brenk) and violations (Lipinski) following the SwissADME system.

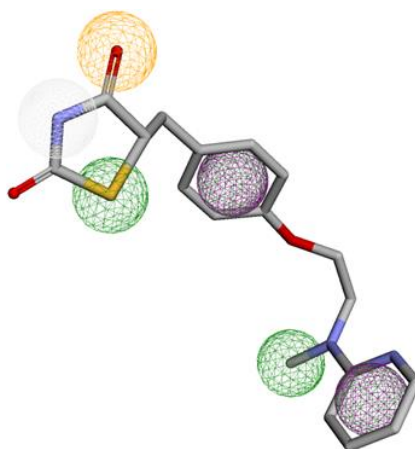


Figure 5. Pharmacophoric pattern of the Rosiglitazone.

Table 1. Virtual Screening results.

Web server	Libraries	Updated	Hits
Pharmit Search Engine	MolPort	2023-May-13	103
	MCULE	2023-Jun-13	164
ZINCPharmer	ZINC Purchasable	2014-Dec-20	7

### 3.3 Validation Data

Prior to conducting the docking calculations using the 209 selected compounds, the AutoDock Vina program was validated. The structures Ciglitazone, Englitazone, Pioglitazone, Rosiglitazone and Didehydro rosiglitazone, (5Z)- were chosen. In the context of Molecular Docking software validation, the AUC metric was used to summarize the overall model performance across all possible cut-off points (Maia et al., 2020). The AUC ranges between 0 and 1, where 0.5 represents a randomly performing model, while 1 indicates a perfect model. In our experiment, an AUC value of 0.8408 was obtained, as shown in Figure 6a. This score suggests that the Molecular Docking parameters used in AutoDock Vina software have a good ability to distinguish between the classes of true positives (Table 2) and false positives (50 decoys), indicating a promising performance.

Table 2. Thioglitazones activity.

Active compound	Affinity (kcal mol <sup>-1</sup> )
Ciglitazone	-8.0
Englitazone	-9.1
Pioglitazone	-8.7
Rosiglitazone	-8.5
Didehydro rosiglitazone, (5Z)-	-8.7

In this study, the DockRMSD (Bell & Zhang, 2019) structural superposition algorithm has been used to align the structures and calculate the RMSD. The RMSD value obtained for the two structures was 1.703 Å, indicating considerable structural similarity (Fig. 6b). This value suggests that the two structures are highly overlapping, with minor variations in atom positions. This low discrepancy between the structures is indicative of a possible functional and structural conservation of both Rosiglitazone molecules.

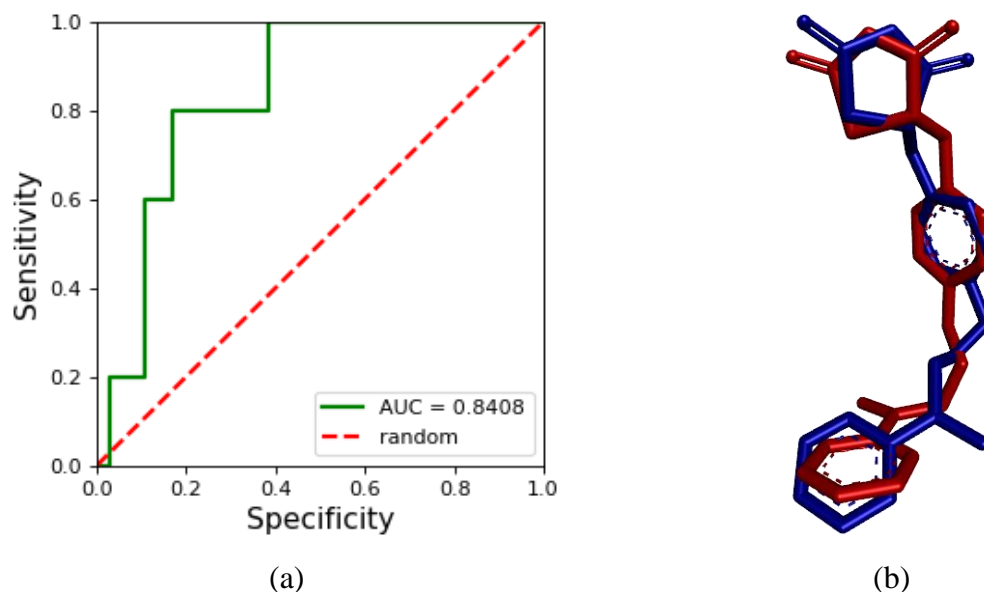


Figure 6. Receiver characteristics (ROC) and Re-docking. Rosiglitazone crystallised (red) and Rosiglitazone pose docking (blue).

### 3.4 Molecular Docking, $LD_{50}$ , BOILED-Egg

After selecting the Virtual Screening, the 209 compounds that did not show alerts (PAINS and Brenk) and violations (Lipinski) according to the SwissADME system were evaluated. This evaluation was carried out using the scatter plot (Fig. 7), where the Affinity and  $LD_{50}$  values were plotted and analysed. Hits that are in the quadrant formed by the limits established by the Affinity ( $\leq -8.5$  kcal mol<sup>-1</sup>) and  $LD_{50}$  ( $\geq 2.713$  mol kg<sup>-1</sup>) values of Rosiglitazone are promising to consider a prosperous affinity with bovine PPAR $\gamma$  and safety by the calculated toxicity value. The molecules belonging to the quadrant were submitted to the first ranking by Euclidean distance (Equation 1), where it was established that the molecules with the greatest potential are in the region with a high  $LD_{50}$  value and a large Affinity modulus.

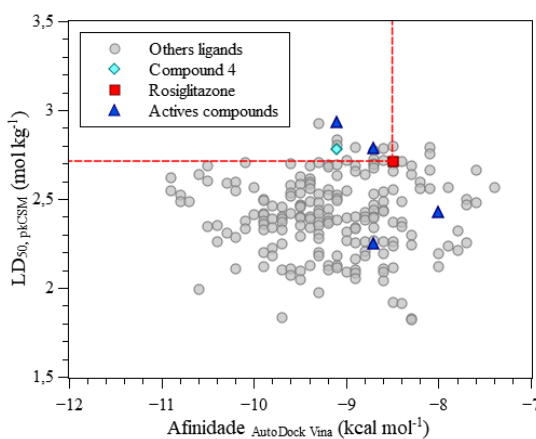


Figure 7. Scatter plot: Affinity and  $LD_{50}$ .

The  $Affinity_{min}$  and  $LD_{50, max}$  values correspond to the most favourable affinity and toxicity results, respectively, among the 209 compounds that passed the qualitative toxicology test. The  $Affinity_{min}$  and  $LD_{50, max}$  coordinates represent the values of a hypothetical ideal compound within this set, where Equation 1 is used to calculate the distance to this hypothetical point with the best affinity and toxicity values.

$$dist_i = \sqrt{(Affinity_i - Affinity_{min})^2 + (LD_{50} - LD_{50,max})^2}$$

The value of  $Affinity_{min}$  used was  $-11.1 \text{ kcal mol}^{-1}$  in reference to compounds MCULE-3391486348 and MCULE-5173208549, while the value of  $LD_{50, max}$  used was  $2.924 \text{ mol kg}^{-1}$ , value belonging to compound MCULE-9385738471. The 12 molecules located within the quadrant are sorted in ascending order (Table 3) by the distance values calculated by Equation 1.

Table 3. Ranking by the Euclidean distance equation.

Ranking	MCULE	Affinity (kcal mol <sup>-1</sup> )	LD <sub>50</sub> (mol kg <sup>-1</sup> )	BOILED-Egg region	P-gp substrate
RGZ	8293284864	-8.5	2.713	HIA	-
1	9385738471	-9.3	2.924	Out	-
2	2321610882	-9.1	2.838	BBB	+
3	2772386084	-9.1	2.805	HIA	-
4	1323064686	-9.1	2.781	HIA	+
5	1362639167	-9.0	2.721	BBB	+
6	5835167846	-9.0	2.717	Out	+
7	1302121223	-8.9	2.795	BBB	-
8	1468861772	-8.7	2.774	BBB	-
9	7373425071	-8.7	2.723	Out	-
10	9059019223	-8.6	2.785	BBB	-
11	7585853459	-8.6	2.721	HIA	-
12	8688852980	-8.5	2.796	BBB	-

The analysis of the ranking exposed in Table 3 was performed with the aid of the BOILED-Egg graph (Fig. 8), where all hits belonging to the quadrant limited by Rosiglita-

zone (Fig. 7) were submitted to the calculation of pharmacokinetic properties prediction (WLogP and TPSA) for plotting the BOILED-Egg graph (Fig. 8). The area in yellow corresponds to penetration into the BBB (Blood-Brain Barrier), the region in white corresponds to the HIA (passively absorbed by the gastrointestinal tract), while the hits located in the grey territory are predicted to be very low absorbed into the gastrointestinal tract and non-brain penetrative. To obtain an absorption like that of rosiglitazone and which is biologically available to carry out its function, the molecule chosen for the continuation of the methodology was Compound **4**.

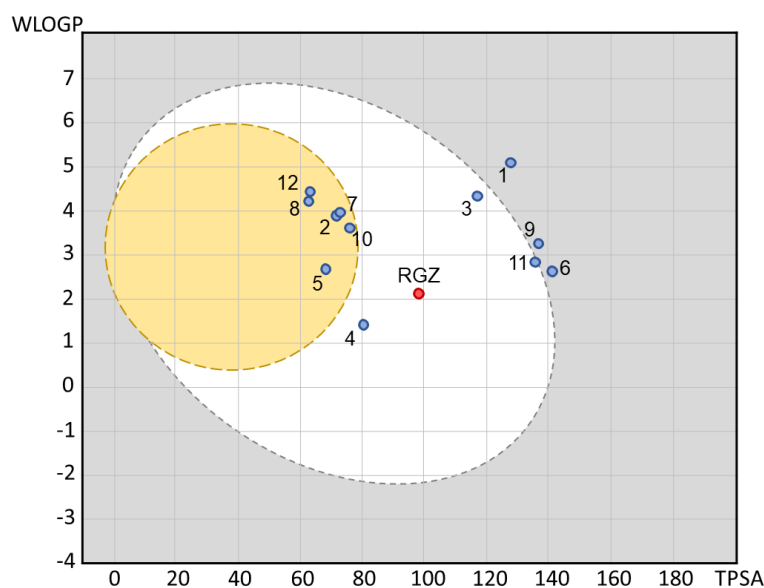


Figure 8. BOILED-Egg of top twelve compounds targeting PPAR $\gamma$  *Bos taurus indicus*.

As part of the analysis of the interactions between Compound **4** and the PPAR $\gamma$  receptor (Fig. 9), the 2D Diagram visualises the molecular interactions between the two entities in detail. H-Bonds with residues ARG-316 and GLU-319, Pi-Sigma with residue ILE-369 and the various van der Waals interactions along the structure of Compound **4** stand out.

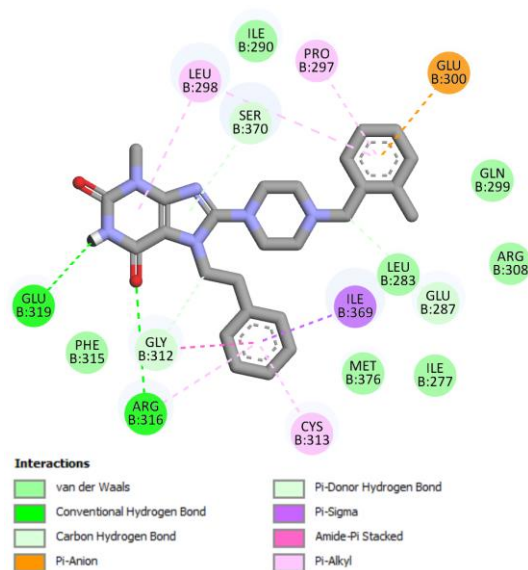


Figure 9. 2D Diagram interactions between PPAR $\gamma$ \_model and Compound **4**.  
The diagram was made using the best pose of Compound **4** in Molecular Docking.

To analyse the stability of the interactions of Compound **4** (Fig. 9) and Rosiglitazone (Fig. 4b) with the PPAR $\gamma$  receptor over time, a study of Molecular Dynamics simulation has been performed. In this line, our findings revealed a detailed analysis of the fluctuations and behaviour of the residues over an extended period. Understanding how these interactions can influence the activity of the receptor and its biological effects is crucial for the development of effective pharmaceutical compounds that modulate PPAR $\gamma$  activity.

### 3.5 Molecular Dynamics Simulations

#### 3.5.1 Root-mean-square deviation (RMSD)

RMSD calculations were carried out between the PPAR $\gamma$  structure with its backbone when it is complexed to the Rosiglitazone structure and Compound **4**. The main objective was to assess whether there was any substantial change in the initial structure during the simulation. Figure 10 shows the RMSD results for PPAR complexed to the respective activators. Based on the analysis of the RMSD graphs, it was found that PPAR $\gamma$ , when coupled to Compound **4**, showed greater stability than when complexed with Rosiglitazone, corroborating the relative difference in affinity that the two ligands showed in the Molecular Docking calculation. In Figure 10, the structure of PPAR $\gamma$  underwent constant conformational changes during the initial nanoseconds of the simulation. This allowed rapid and simultaneous interactions with the ligands, since at the beginning of the simulation the structures already undergo a ma-

for structural change, reaching RMSD values that remain practically unchanged throughout the rest of the simulation.

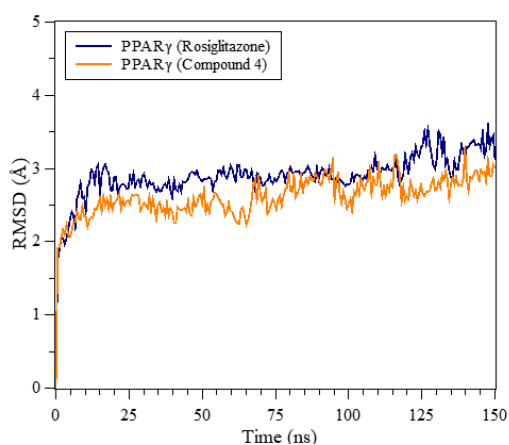


Figure 10. RMSD values of PPAR $\gamma$  monitored over 150 ns in MD simulations.

### 3.5.2 Root mean square fluctuation (RMSF)

To assess structural stabilisation in the simulation environment, the root mean square fluctuation (RMSF) was calculated based on the average position of each amino acid residue in PPAR $\gamma$ . Figure 11 shows the RMSF graphs for the Rosiglitazone/PPAR $\gamma$  and Compound 4/PPAR $\gamma$  systems.

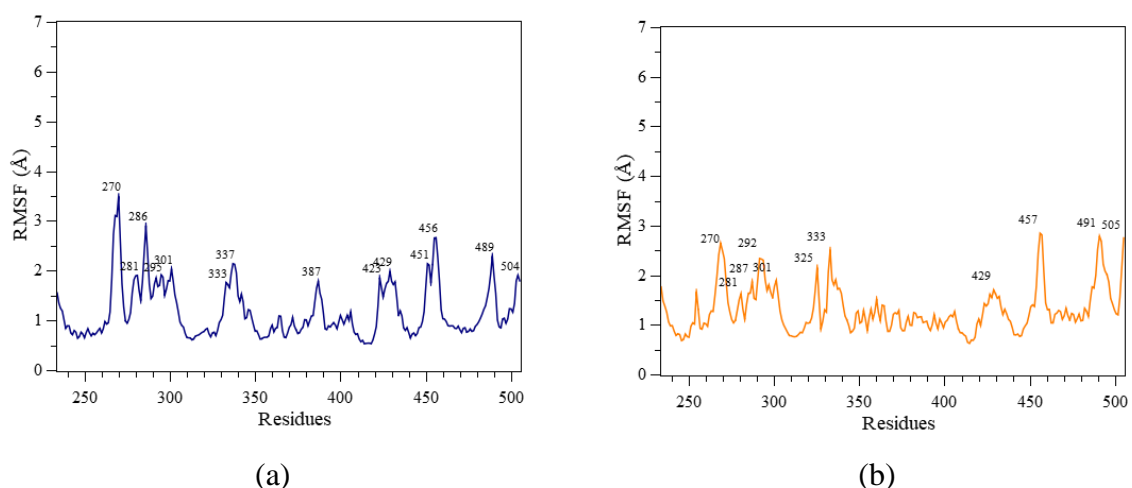


Figure 11. The average residual fluctuations over a 150 ns in MD simulations. RMSF values (a) Rosiglitazone/PPAR $\gamma$  and (b) Compound 4/PPAR $\gamma$ . The analysis was specifically performed for the backbone.

From Figure 11, the higher RMSF values indicate residues that showed greater oscillation in relation to their initial positions. In the Rosiglitazone system, these residues were THR-270, ASN-281, GLY-286, ILE-295, PRO-301, GLY-333, LEU-337, PRO-387, GLY-

423, LEU-429, LEU-451, SER-456, THR-489 and LEU-504. In the Compound **4** system, the waste was THR-270, ASN-281, GLU-287, PHE-292, PRO-301, THR-325, GLY-333, LEU-429, SER-457, MET-491, THR-505. Among the residues with the highest fluctuations, the only one present in the interaction diagram of the Compound **4**/PPAR $\gamma$  complex was GLU-287, which has a favourable non-classical H-Bond interaction called Carbon H-Bond. Most of the residues with the greatest fluctuation are part of protein loops, which are regions characterized by flexibility. Furthermore, although both systems were made up of the same protein and the same simulation criteria, fluctuations were observed in different amino acids, possibly due to interactions with different inhibitors.

Among the residues that showed greater flexibility, the only residue close to the site that was interacting with one of the compounds was GLU-287, as shown in Figure 9. The presence of residue GLU-287 among the residues with the greatest fluctuation can be explained by the fact that it does not interact strongly with Compound **4** and is also part of a protein loop.

### 3.5.3 Analysis of interactions in the PPAR $\gamma$ active site

In our analysis, the hydrogen bonds formed between PPAR $\gamma$  and the chosen ligands have been studied. A maximum donor-acceptor distance of 3.5 Å in Gromacs has been adjusted. The number of hydrogen bonds formed during the simulation was plotted in Figure 12.

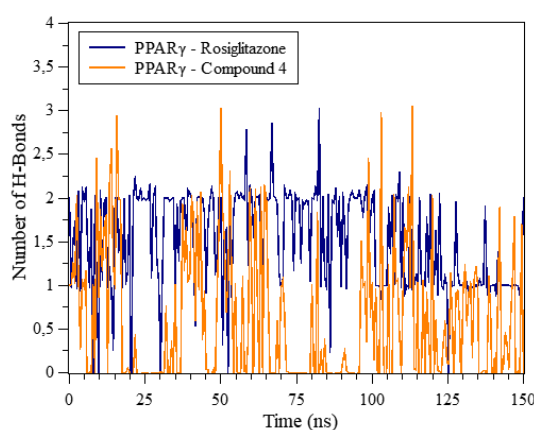


Figure 12. Number of hydrogen bonds between the ligands and PPAR $\gamma$ .  
(a) Rosiglitazone and PPAR $\gamma$ , (b) Compound **4** and PPAR $\gamma$  during the simulation period.

From the graphs, the reference ligand Rosiglitazone (Fig. 12a) had the most consistent hydrogen bond interactions throughout the simulation period, varying between one and two



interactions throughout the simulation. Compound **4**, on the other hand, reached three hydrogen bonds during the simulation at sporadic moments, but more recurrently than the reference ligand, corroborating the docking results shown in Figure 4b and Figure 9.

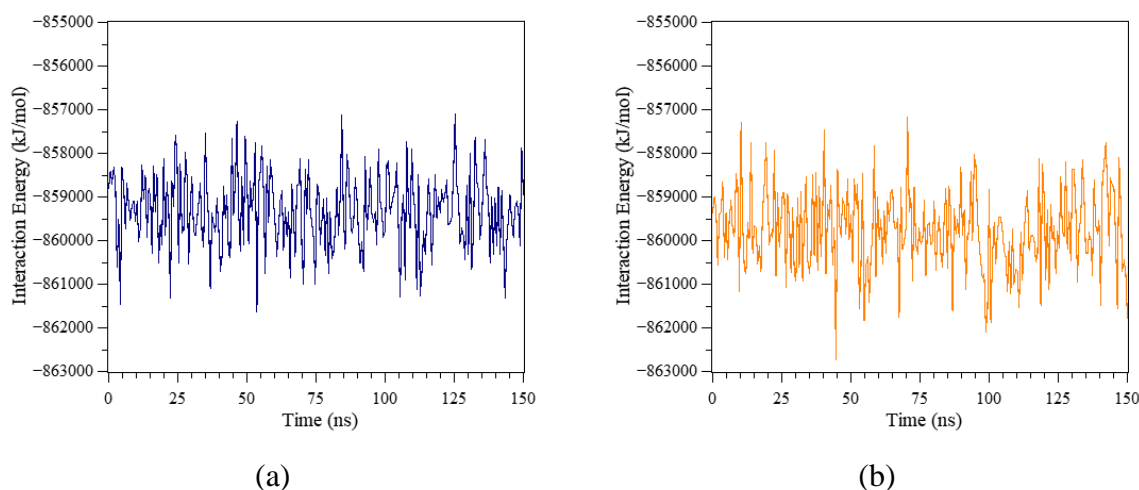


Figure 13. Protein-ligand interaction energies Molecular Dynamics. (a) Rosiglitazone/PPAR $\gamma$  and (b) Compound **4**/PPAR $\gamma$ .

To better evaluate protein-ligand interactions, GROMACS MD simulation trajectories were used to extract two crucial energy terms: short-range Coulomb energies (Coul-SR) and short-range Lennard-Jones energies (LJ-SR). For both ligands, negative values were observed for Coul-SR, but positive values for LJ-SR, as shown in the supplementary material. Considering the short-range Lennard-Jones and short-range Coulomb potential energy calculations between the protein and the ligands, it was observed that Compound **4** interacts in a similar way to Rosiglitazone within the PPAR $\gamma$  active site (Fig. 13).

During the 150 ns simulation period, the mean values ( $\pm$  standard deviation) of the sum of the Coul-SR and LJ-SR energies were  $-858589.2 (\pm 23634.7)$  and  $-859268.4 (\pm 21366.0)$  kJ/mol for the Rosiglitazone (Fig. 13a) and Compound **4** (Fig. 13b) ligands, respectively. These findings suggest that Compound **4** can form a thermodynamically stable complex with bovine PPAR $\gamma$ .

During the simulation analysis, the distribution of average interactions was examined using pharmacophore maps (Fig. 14), plotted at the points of minimum Interaction Energy between the ligands and PPAR $\gamma$ . Remarkably, the H-bond interactions involving residues SER-317 and TYR-501 predicted in the molecular docking calculation were maintained throughout the molecular dynamics, as were the interactions with residues GLY-312, LEU-

358, MET-392 and other residues present in both interaction diagrams of the Rosiglitazone/PPAR $\gamma$  system (Fig. 14a).

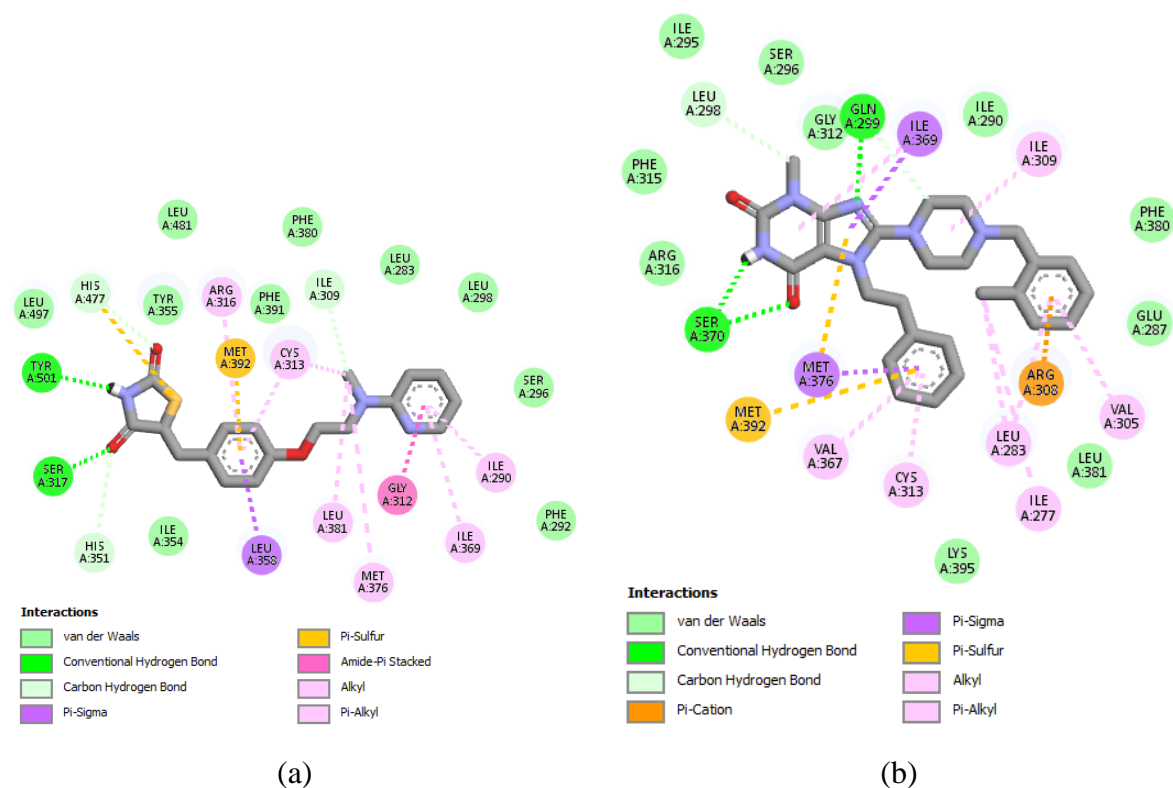


Figure 14. Interactions performed during 150 ns in the molecular dynamics (MD) simulation for (a) Rosiglitazone/PPAR $\gamma$  and (b) Compound 4/PPAR $\gamma$ . The diagrams were performed on frame 23.81 ns and 43.64 ns, respectively.

In the case of the Compound 4/PPAR $\gamma$  complex (Fig. 14b), the residues responsible for the H-bonds in the Molecular Docking calculation were ARG-316 and GLU-319, while in molecular dynamics they were GLN-299 and SER-370. The simulation results suggest that other intermolecular interactions, such as Alkyl and Pi-Alkyl interactions, and hydrophobic interactions involving several residues, including ILE-295, SER-296, PHE-380, LEU-381, LYS-395 contribute significantly to the stabilisation of Compound 4 in the PPAR $\gamma$  active site.

## CONCLUSION

In conclusion, Compound 4 as an alternative PPAR $\gamma$  activator showed similar predicted activity to the reference compound, Rosiglitazone, as well as exhibiting a higher theoretical LD<sub>50</sub> value, raising expectations for new PPAR $\gamma$  activators that are safer than those currently on the market. Bovine PPAR, derived from homology modelling, exhibited remarkable similarity to the three-dimensional structure of human PPAR $\gamma$ . Therefore, a logical inference would suggest that Compound 4 could be considered a potential activator of PPAR $\gamma$  in hu-

mans. This approach aims to modulate apoptosis in diseases such as cancer by exploiting the activation of this transcription factor.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior). We thank the Federal University of Lavras (UFLA) for their support. The authors are grateful to all of them.

## **DECLARATION OF INTEREST STATEMENT**

The authors of this manuscript do not have any affiliations or financial associations with organizations or entities that have a financial interest in or a financial conflict with the subject matter or materials discussed in this paper. This encompasses employment, consultancy arrangements, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants, patents (received or pending), or royalties.

## REFERENCES

- Baell, J. B., & Holloway, G. A. (2010). New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(7). <https://doi.org/10.1021/jm901137j>
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., ... Zhang, J. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Bell, E. W., & Zhang, Y. (2019). DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *Journal of Cheminformatics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>
- Bienert, S., Waterhouse, A., De Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 45(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I. H., Frearson, J., & Wyatt, P. G. (2008). Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem*, 3(3). <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>
- Calkin, A. C., Jandeleit-Dahm, K. A., Sebekova, E., Allen, T. J., Mizrahi, J., Cooper, M. E., & Tikellis, C. (2007). PPARs and Diabetes-Associated Atherosclerosis. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 13).
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1). <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- Costa, E. C. da, Restle, J., Brondani, I. L., Perottoni, J., Faturi, C., & Menezes, L. F. G. de. (2002). Composição Física da Carcaça, Qualidade da Carne e Conteúdo de Colesterol no Músculo Longissimus dorsi de Novilhos Red Angus Superprecoces, Terminados em Con-

finamento e Abatidos com Diferentes Pesos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(1 suppl), 417–428. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000200017>

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

de Felício, P. E. (2000). Qualidade da carne Nelore e o mercado mundial. IX Seminário Do PMGRN: Comemoração Dos, 32.

Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8). <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>

Font-i-Furnols, M., & Guerrero, L. (2014). Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Science*, 98(3), 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.025>

Gampe, R. T., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., Kliewer, S. A., Willson, T. M., & Xu, H. E. (2000). Asymmetry in the PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Molecular Cell*, 5(3). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80448-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80448-7)

Geppert, H., Vogt, M., & Bajorath, J. (2010). Current trends in ligand-based virtual screening: molecular representations, data mining methods, new application areas, and performance evaluation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(2). <https://doi.org/10.1021/ci900419k>

Gonçalves, M. A., Gonçalves, A. S., Franca, T. C. C., Santana, M. S., da Cunha, E. F. F., & Ramalho, T. C. (2022). Improved Protocol for the Selection of Structures from Molecular Dynamics of Organic Systems in Solution: The Value of Investigating Different Wavelet Families. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 18(10), 5810–5818. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c00593>

Hausman, G. J., Dodson, M. V., Ajuwon, K., Azain, M., Barnes, K. M., Guan, L. L., Jiang, Z., Poulos, S. P., Sainz, R. D., Smith, S., Spurlock, M., Novakofski, J., Fernyhough, M. E., &

Bergen, W. G. (2009). Board-invited review: The biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. In *Journal of Animal Science* (Vol. 87, Issue 4, pp. 1218–1246). <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1427>

Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. In *Neuron* (Vol. 99, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>

Justin, A., Mandal, S., Prabitha, P., Dhivya, S., Yuvaraj, S., Kabadi, P., Sekhar, S. J., Sandhya, C. H., Wadhvani, A. D., Divakar, S., Bharathi, J. J., Durai, P., & Prashantha Kumar, B. R. (2020). Rational Design, Synthesis, and In Vitro Neuroprotective Evaluation of Novel Glitazones for PGC-1 $\alpha$  Activation via PPAR- $\gamma$ : a New Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Disorders. *Neurotoxicity Research*, 37(3). <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00132-9>

Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. In *Nature Structural Biology* (Vol. 9, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>

Lage, J. F., Paulino, P. V. R., Filho, S. C. V., Souza, E. J. O., Duarte, M. S., Benedeti, P. D. B., Souza, N. K. P., & Cox, R. B. (2012). Influence of genetic type and level of concentrate in the finishing diet on carcass and meat quality traits in beef heifers. *Meat Science*, 90(3), 770–774. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.11.012>

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 64, Issue SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>

Liu, R., Liu, X., Bai, X., Xiao, C., & Dong, Y. (2021). A Study of the Regulatory Mechanism of the CB1/PPAR $\gamma$ 2/PLIN1/HSL Pathway for Fat Metabolism in Cattle. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.631187>

Maia, E. H. B., Assis, L. C., de Oliveira, T. A., da Silva, A. M., & Taranto, A. G. (2020). Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00343>

Mitić, R., Cantoni, F., Börlin, C. S., Post, M. J., & Jackisch, L. (2023). A simplified and defined serum-free medium for cultivating fat across species. *IScience*, 26(1), 105822. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105822>

Mysinger, M. M., Carchia, M., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2012). Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): Better ligands and decoys for better benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(14), 6582–6594. <https://doi.org/10.1021/jm300687e>

Nanjan, M. J., Mohammed, M., Prashantha Kumar, B. R., & Chandrasekar, M. J. N. (2018). Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. In *Bioorganic Chemistry* (Vol. 77). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.02.009>

Nissen, S. E., & Wolski, K. (2007). Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. *New England Journal of Medicine*, 356(24), 2457–2471. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa072761>

Pires, D. E. V., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

Polkinghorne, R. J., & Thompson, J. M. (2010). Meat standards and grading. *Meat Science*, 86(1), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.010>

Rodrigues, R. T. de S., Chizzotti, M. L., Vital, C. E., Baracat-Pereira, M. C., Barros, E., Busato, K. C., Gomes, R. A., Ladeira, M. M., & Martins, T. da S. (2017). Differences in Beef Quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) Cattle through a Proteomic and Phosphoproteomic Approach. *PLOS ONE*, 12(1), e0170294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170294>

Schmid, N., Eichenberger, A. P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A. E., & Van Gunsteren, W. F. (2011). Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal*, 40(7). <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>

Scott, M. A., Nguyen, V. T., Levi, B., & James, A. W. (2011). Current Methods of Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 20(10), 1793–1804. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0040>

Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36(6). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>

Tajněšek, Š., Petrovič, D., Petrovič, M. G., & Kunej, T. (2020). Association of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) with Diabetic Retinopathy in Human and Animal Models: Analysis of the Literature and Genome Browsers. In *PPAR Research* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/1783564>

Tavares, C. A., Santos, T. M. R., da Cunha, E. F. F., & Ramalho, T. C. (2023). Molecular Dynamics-Assisted Interaction of Vanadium Complex–AMPK: From Force Field Development to Biological Application for Alzheimer's Treatment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 127(2), 495–504. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c07147>

Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

Wang, S., Xie, J., Pei, J., & Lai, L. (2023). CavityPlus 2022 Update: An Integrated Platform for Comprehensive Protein Cavity Detection and Property Analyses with User-friendly Tools and Cavity Databases. *Journal of Molecular Biology*, 435(14). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168141>

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

Willson, T. M., Cobb, J. E., Cowan, D. J., Wiethe, R. W., Correa, I. D., Prakash, S. R., Beck, K. D., Moore, L. B., Kliwer, S. A., & Lehmann, J. M. (1996). The structure - Activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(3). <https://doi.org/10.1021/jm950395a>



Yuan, Y., Pei, J., & Lai, L. (2013). Binding Site Detection and Druggability Prediction of Protein Targets for Structure- Based Drug Design. *Current Pharmaceutical Design*, 19(12). <https://doi.org/10.2174/1381612811319120019>