

**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde**

**PEDRO GÓES MESQUITA**

**Avaliação de atividade antioxidante e atividade agonista em  
receptores nucleares PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$  de metabólitos de fungos  
endofíticos isolados de folhas da *Bauhinia variegata*.**

**Brasília – DF**

**Agosto/2015**

**PEDRO GÓES MESQUITA**

**Avaliação de atividade antioxidante e atividade agonista em receptores nucleares PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$  de metabólitos de fungos endofíticos isolados de folhas da *Bauhinia variegata*.**

**Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito parcial à obtenção de Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin**

**Brasília – DF**

**Agosto/2015**

# **PEDRO GÓES MESQUITA**

**Avaliação de atividade antioxidante e atividade agonista em receptores nucleares PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$  de metabólitos de fungos endofíticos isolados de folhas da *Bauhinia variegata*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito parcial à obtenção de Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

**Aprovado em 14 de Agosto de 2014.**

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Maria de Fátima Borin – (Presidente)**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dra. Angélica Amorim Amato**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dra. Carine Royer**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dr. Luís Alberto Simeoni (suplente)**  
**Universidade de Brasília**

**Brasília – DF**  
**Agosto/2015**

**Pesquisa para constatar,  
constatando intervenho,  
intervindo educo e me  
educos.**

**(Paulo Freire)**

**Às minhas amadas, Laura e  
Helena.**

**Aos meus pais Alcione e Ana, aos  
meus irmãos, Paulo e Luís.**

## AGRADECIMENTOS

À Laurinha, meu amor, com quem sempre posso contar em todas as horas.

À minha filha Helena que está por vir e que me passou serenidade e um jeito bem diferente de encarar a vida.

Aos meus pais Alcione e Ana pelo amor, carinho e apoio incondicional.

Aos meus irmãos Paulo e Luís pelo companherismo, força, amizade, cumplicidade e ajuda em todos os momentos da minha vida.

A toda minha família querida e a todos os meus amigos de quem sempre tive apoio.

À minha orientadora Fátima, pelos ensinamentos, amizade, compreensão e apoio que vem desde o início da minha vida na pesquisa e que continuam florescendo.

Aos professores Francisco, Luiz, Marie, Angélica, Michella, Carine e aos demais professores pelo apoio, colaboração, incentivo e docência.

À Cristina, à Rilva e ao Luciano pela atenção e ajuda em todos os momentos em que precisei.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (USP-RP) e, em especial, a todos os amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular (UnB) que acompanharam a trajetória de grandes experiências e conquistas ao meu lado.

A todos os funcionários da UnB.

Ao CNPq, ao MCT, à CAPES e à FAPDF pelo apoio financeiro a este trabalho. À CAPES pela bolsa de Doutorado recebida.

À sociedade brasileira.

Muito obrigado.

## RESUMO

MESQUITA, Pedro Góes. **Avaliação de atividade antioxidante e atividade agonista em receptores nucleares PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$  de metabólitos de fungos endofíticos isolados de folhas da *Bauhinia variegata***: Brasília, 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

O *diabetes mellitus* é uma desordem metabólica que acomete milhões de pessoas no Brasil e no mundo. As tiazolidinonas melhoram a sensibilização à insulina e a homeostase da glicose mediada pela ativação de receptores ativados por proliferadores peroxissomais  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) em indivíduos com diabetes tipo 2. Entretanto, efeitos adversos graves, como perda da massa óssea, retenção de fluidos corporais, problemas no fígado, no coração e aumento no risco de câncer de bexiga estão associados ao seu uso. Apesar de não haver esclarecimento completo do mecanismo relacionado ao efeito adverso, em parte, ele é atribuído à ativação exagerada do receptor. Agonistas parciais de PPAR $\gamma$  são capazes de promover os efeitos positivos das tiazolidinonas, mas com menor efeito adverso. Estudos prévios mostraram que extratos das folhas da *Bauhinia variegata* são capazes de ativar o PPAR $\gamma$  e que ligantes de PPAR podem interferir no estresse oxidativo relacionado a espécies reativas do oxigênio. Sabendo que fungos endofíticos são colonizadores dos tecidos de plantas e possuem um metabolismo particularmente ativo por causa dessa interação, levando à produção de produtos naturais com efeitos biológicos importantes e, muitas vezes similares aos da planta hospedeira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos metabólitos de fungos endofíticos isolados das folhas de *Bauhinia variegata* como fonte de moléculas antioxidantes e agonistas de receptores nucleares PPAR  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ . Sete extratos de culturas dos fungos endofíticos das folhas de *Bauhinia variegata* foram avaliados. Todos apresentaram atividade antioxidante no ensaio do sequestro do radical superóxido e seis deles foram capazes de inibir a peroxidação lipídica. Um dos extratos apresentou atividade pan-agonista sobre os PPAR e outro mostrou atividade nas isoformas PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta/\delta$ . Os extratos não foram capazes de estimular a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. O estudo conjunto da atividade agonista a receptores nucleares e da atividade antioxidante caminha na mesma direção dos achados recentes sobre a relação PPAR/espécies reativas do oxigênio nos processos patológicos do diabetes. A melhor compreensão desta relação poderia auxiliar no entendimento do mecanismo de ação dos antioxidantes no tratamento de diabetes e suas complicações. Além disso, novos compostos com ambas as atividades, antioxidante e agonista de PPAR $\gamma$ ,

poderiam ser bastante úteis no desenvolvimento de novos medicamentos para tratamento do diabetes.

**Palavras-Chave:** Receptores ativados por proliferadores peroxissomais, PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ; antioxidante; diabetes; fungos endofíticos; *Bauhinia variegata*.

## ABSTRACT

MESQUITA, Pedro Góes. **Evaluation of antioxidant activity and agonist activity in nuclear receptors PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$  of metabolites of endophytic fungi isolated from leaves of *Bauhinia variegata***: Brasília, 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

*Diabetes mellitus* is a metabolic disorder that affects millions of people in Brazil and worldwide. Tiazolidinediones (TZD) improve insulin sensitization and glucose homeostasis mediated by the activation of peroxisome proliferator activated receptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in patients with type 2 diabetes. However, severe adverse effects such as loss of bone mass, retention of body fluids, liver and heart problems and increased risk of bladder cancer are associated with their use. Although there is no complete explanation of the mechanism related to TZD side effects, in part, it is attributed to excessive activation of the receptor. Partial PPAR $\gamma$  agonists are capable of promoting the beneficial effects of tiazolidinediones with less adverse effects. Previous studies have shown that extracts of *Bauhinia variegata* leaves are able to activate the PPAR $\gamma$  and that PPAR ligands can interfere with the oxidative stress related to reactive oxygen species. Knowing that endophytic fungi colonize plant tissues and have a particularly active metabolism caused by this interaction, which lead to the production of natural products with important biological effects, and usually similar to that of the colonized plant, the objective of this study was to evaluate the potential of the metabolites of endophytic fungi isolated from *Bauhinia variegata* leaves as source of antioxidant molecules and agonists of nuclear receptors PPAR  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$ . Seven extracts produced by endophytic fungi from *Bauhinia variegata* leaves were evaluated; all of them showed antioxidant activity by scavenging superoxide radical and six of them were able to inhibit lipid peroxidation. One of extracts tested presented pan-agonist activity on PPAR and another one showed activity in PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$ . The extracts were not able to stimulate the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes cells. The complete study involving evaluation of agonism to nuclear receptors and antioxidant activity comply with the recent findings about the PPAR/reactive oxygen species relationship in pathological processes of diabetes. A better understanding of this relationship could help to comprehend the mechanism of action of antioxidants in the treatment of diabetes and its complications. In addition, novel compounds having both

activities, antioxidant and PPAR $\gamma$  agonist, could be quite useful in the development of new drugs for diabetes treatment.

**Keywords:** Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ; antioxidant; diabetes; endophytic fungi; *Bauhinia variegata*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. LBD do RXR $\alpha$  e estrutura do PPAR $\gamma$  com possíveis sítios de modificações pós-traducionais.
- Figura 2. Estrutura do heterodímero PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$  e sua ligação ao PPRE.
- Figura 3. Influência ambiental na regulação da expressão de metabólitos secundários em fungos.
- Figura 4. Esquema com vias de dano celular e resposta adaptativa ao estresse oxidativo na célula.
- Figura 5. Mecanismo proposto da falência da célula  $\beta$ .
- Figura 6. Gotículas de gordura formadas na diferenciação dos adipócitos.
- Figura 7. Eletroforese em gel de agarose das amostras dos produtos de PCR das regiões ITS1 e ITS2 dos fungos.
- Figura 8. Árvore filogenética.
- Figura 9. Avaliação da atividade agonista dos extratos de cultura dos fungos I e II sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa, beta e gama (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).
- Figura 10. Avaliação da atividade agonista dos extratos de cultura dos fungos III e V sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa, beta e gama (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).
- Figura 11. Avaliação da atividade agonista dos extratos de cultura dos fungos VII e VIII sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa, beta e gama (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).
- Figura 12. Avaliação da atividade agonista dos extratos de cultura do fungo IX sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa, beta e gama (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).
- Figura 13. Padrão de proteólise do LBD do PPAR $\gamma$  pela tripsina após tratamento com diferentes ligantes.
- Figura 14. Padrão de digestão da gelatina pela tripsina após incubação da enzima com os extratos dos fungos.
- Figura 15. Efeito dos extratos sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1 de camundongo.
- Figura 16. Eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade do RNA total extraído das amostras de células 3T3-L1 tratadas durante o ensaio de diferenciação celular.
- Figura 17. Curva padrão do gene FABP4 (aP2) e do Gene 18S do rRNA.
- Figura 18. Curva de *melting* utilizada para verificação da especificidade dos *primers*.
- Figura 19. Expressão do RNA mensageiro de aP2 (FABP4) após diferenciação de células 3T3-L1 submetidas a diferentes tratamentos.

Figura 20. Avaliação da expressão proteica do marcador adipogênico aP2 (FABP4) .

Figura 21. Avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica pelos extratos dos fungos.

Figura 22. Avaliação da capacidade sequestradora de ânion radical superóxido pelos extratos de fungos endofíticos.

Figura 23. Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo I nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.

Figura 24. Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo II nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.

Figura 25. Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo III nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.

Figura 26. Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo V nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.

Figura 27. Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo VII nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Países com maior número de pessoas de 20 a 79 anos com diabetes.

Tabela 2. Distribuição e função dos PPAR nos tecidos.

Tabela 3. Oxidantes endógenos e enzimas antioxidantes mais importantes.

Tabela 4. Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise por CLAE.

Tabela 5. Rendimento dos extratos dos fluidos de cultura.

Tabela 6. Cepas de fungos endofíticos isolados da *Bauhinia variegata*.

Tabela 7. Determinação da pureza do RNA total.

Tabela 8. Parâmetros de validação obtidos no teste de eficiência do *primer* da aP2.

Tabela 9. Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo I com compostos padrões.

Tabela 10. Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo II com compostos padrões. Não apresentou similaridade com nenhum padrão utilizado.

Tabela 11. Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo III com compostos padrões.

Tabela 12. Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo V com compostos padrões.

Tabela 13. Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo VII com compostos padrões.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
9-cis-RA	Ácido 9-cis retinoico
acil-CoA	Acil-coenzima A
AcOEt	Acetato de etila
AF-1	Função de ativação 1
AF-2	Função de ativação 2
AGE	Produtos finais da glicosilação avançada
AP-1	Ativador de proteína 1
ARE	Elemento responsivo antioxidante
ATF4	Fator de ativação transcricional 4
ATP	Adenosina trifosfato
Bach1	BTB e CBC <i>homology</i> 1
CAT	Catalase
CBC	Complexo de ligação a CCAAT
Cdk	Ciclina dependente de quinase
cDNA	DNA complementar
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMV	Citomegalovírus
CpcR1	Regulador 1 da cefalosporina C
Ct	<i>Cycle threshold</i> ou ciclo limiar
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH·	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
eNOS	Enzima óxido nítrico sintetase endotelial
ERE	Espécies reativas do enxofre
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
FABP4 ou aP2	<i>Adipocyte fatty acid binding protein 4</i>
Flav-O·	Radical aroxil flavonoide
FNDC5	<i>Fibronectin type III domain-containing protein 5</i>

FOXO1	<i>Forkhead box O</i>
GLUT4	Proteína transportadora de glicose tipo 4
GSH	Glutationa
HDAC	Enzima histona deacetilase
HSF1	Proteínas de choque térmico 1
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
I- $\kappa$ B $_{\alpha}$	Inibidor $\alpha$ do fator nuclear $\kappa$ B
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
ITS	<i>Internal transcribed spacers</i>
LaeA	Perda da expressão A do alfR
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LOO $\cdot$	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
Luc	Luciferase
Maf	Fator de transcrição <i>small Maf</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MARE	Elemento responsivo das Maf
MDA	Malondialdeído
MEK	quinase ativadora da MAP quinase
MeOH	Metanol
MnSOD	Enzima Manganês superóxido dismutase
MPT	Modificações pós-traducionais
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium</i>
NCoEx	Fatores nucleares de mudança nos correpressores
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
NRPS	Peptídeo não ribossomal sintetase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCP	Carreador de peptidil

PKS	Policetídeo sintetase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR
qPCR	PCR quantitativo
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rRNA 18S	RNA ribossômico 18S
RsmA	Restaurador do metabolismo secundário A
RT	Transcriptase reversa
RXR	Receptor do ácido retinoico X
SAGA–ADA	Complexo Spt–Ada–Gcn5–acetiltransferase–ADA
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Enzima superóxido dismutase
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral
TNF	Fator de necrose tumoral
UbcH5	Enzima de conjugação ubiquitina E2
UCP1	<i>Uncoupling protein-1</i>
VSMC	Células do músculo liso vascular
YPD	Extrato de levedura, peptona e dextrose
Zn-Cu SOD	Enzima Zinco-Cobre superóxido dismutase

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	ix
INTRODUÇÃO .....	1
1. <i>Diabetes mellitus</i> e a influência do tecido adiposo na síndrome metabólica. ....	1
2. Receptores Nucleares .....	4
3. Produtos naturais, fungos endofíticos e a <i>Bauhinia variegata</i> . ....	10
4. Estresse oxidativo, o diabetes e o PPAR.....	14
OBJETIVOS.....	22
Objetivo geral.....	22
Objetivos específicos.....	22
METODOLOGIA .....	23
1. Microrganismos.....	23
2. Identificação molecular dos fungos endofíticos.....	23
2.1. Extração do DNA genômico.....	23
2.2. PCR.....	23
2.3. Árvore filogenética .....	24
3. Condições de cultivo dos fungos para produção de esporos e preparo do inóculo. .	24
4. Fermentação em cultura líquida submersa. ....	24
5. Preparo dos extratos das culturas. ....	24
6. Atividade agonista dos receptores PPAR – ensaio de gene repórter.....	25
7. Ensaio de proteção do receptor nuclear PPAR $\gamma$ contra digestão de protease. ....	26
8. Avaliação da inibição da atividade proteolítica da tripsina pelos extratos. ....	26
9. Ensaio de diferenciação de adipócitos .....	27
9.1. Extração do RNA total das células.....	27
9.2. Avaliação quantitativa da expressão do gene que codifica FABP4 por RT-qPCR.	28
9.3. Ensaio de <i>Western Blotting</i> .....	29
10. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos. ....	29

10.1.	Avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica pelos extratos...	29
10.2.	Medida da atividade sequestradora do ânion radical superóxido pelos extratos usando o sistema xantina/xantina oxidase e determinação da habilidade do extrato em reduzir o substrato <i>nitro blue tetrazolium</i> (NBT).....	30
11.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos. ....	30
RESULTADOS .....		32
1.	Obtenção dos extratos. ....	32
2.	Identificação molecular dos fungos.....	32
2.1	Árvore filogenética .....	34
3.	Avaliação da atividade agonista dos metabólitos dos fungos em PPAR $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ – ensaio de gene repórter.....	35
4.	Ensaio de proteção contra digestão por protease .....	39
5.	Avaliação da inibição da atividade proteolítica da tripsina pelos extratos dos fungos II e VII.....	40
6.	Ensaio de diferenciação de adipócitos .....	41
6.1	Extração e avaliação do RNA total das células .....	42
6.2	Avaliação da expressão gênica relativa da <i>adipocyte protein 2</i> (aP2 ou FABP4) por PCR quantitativo. ....	43
6.3	Western Blotting.....	46
7.	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos. ....	47
7.1.	Ensaio de inibição da peroxidação lipídica. ....	47
7.2.	Sequestro do ânion radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·).....	49
8.	Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	50
DISCUSSÃO.....		56
CONCLUSÃO .....		65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		66

## INTRODUÇÃO

### 1. *Diabetes mellitus* e a influência do tecido adiposo na síndrome metabólica.

O *diabetes mellitus* é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbio no metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas, resultante da deficiência da secreção de insulina, da ação da insulina ou de ambas, fazendo com que não haja disponibilidade de glicose nos músculos e no tecido adiposo, além de aumentar a gliconeogênese no fígado (Alberti e Zimmet, 1998).

A hiperglicemia crônica causa complicações vasculares importantes e está envolvida no desenvolvimento de doenças cardíacas, de retinopatia, de doenças renais e de problemas circulatórios. O desenvolvimento do diabetes pode ocorrer pela destruição autoimune das células beta, levando à deficiência de produção de insulina, ou por outros fatores que podem resultar na resistência dos tecidos à ação da insulina. No diabetes tipo 2, normalmente, tanto a deficiência na secreção quanto na ação da insulina estão presentes no mesmo indivíduo, sendo essa a principal causa de hiperglicemia (Ada, 2014).

Os principais tipos de diabetes são o do tipo 1, que acomete cerca de 10% dos indivíduos portadores dessa doença, e o do tipo 2, que representa cerca de 90% do total de casos (Scully, 2012). O que preocupa é o número de casos e de mortes associadas ao diabetes. Em uma estimativa feita em 2014 pela IDF (*International Diabetes Federation*) foi considerado que uma pessoa morre de causas associadas ao diabetes a cada sete segundos no mundo, sendo que 50% têm menos de 60 anos. Além disso, o custo do tratamento é alto, e corresponde a cerca de 11% do que é gasto em cuidados com a saúde no mundo. No Brasil, a estimativa é de que existiam 11,9 milhões de casos em 2013, o que colocava o país no quarto lugar em número de casos, e de que esse número alcance 19,4 milhões de indivíduos em 2035 (Tabela 1) (Guariguata *et al.*, 2014).

**Tabela 1. Países com maior número de pessoas de 20 a 79 anos com diabetes.**

2013		2035		
País	Número de adultos diabéticos (milhões)	País	Número de adultos diabéticos (milhões)	
1	China	98,4	China	142,7
2	Índia	65,1	Índia	109
3	Estados Unidos	24,4	Estados Unidos	29,7
4	Brasil	11,9	Brasil	19,2
5	Rússia	10,9	México	15,7
6	México	8,7	Indonésia	14,1
7	Indonésia	8,5	Egito	13,1
8	Alemanha	7,6	Paquistão	12,8
9	Egito	7,5	Turquia	11,8
10	Japão	7,2	Rússia	11,1

Legenda: Estimativa do crescimento do número de pessoas diabéticas adultas (20 a 79 anos de idade) no mundo para o ano de 2035. Extraído de Guariguata et al. (2014).

No diabetes tipo 1, a insulina não é produzida pelo indivíduo devido à perda das células beta pancreáticas, que pode ocorrer de forma rápida, como acontece geralmente em crianças, ou lenta, como geralmente acontece em adultos. Nesses casos, o tratamento é a reposição hormonal com insulina com o intuito de mimetizar as concentrações fisiológicas de insulina no organismo e, conseqüentemente, normalizar os níveis normoglicêmicos do paciente. Indivíduos com esse tipo de diabetes precisam da insulina para sobreviver. No diabetes tipo 2, normalmente quando há manifestação clínica os indivíduos possuem resistência à insulina, deficiência dela ou ambos. As causas específicas da ocorrência do diabetes tipo 2 não são ainda definidas, entretanto, a maioria dos pacientes é obesa ou possui grande concentração de gordura abdominal. Além disso, a obesidade, o ganho recente de peso e a duração do tempo em que se está obeso influenciam o aumento do risco de resistência à insulina (Alberti e Zimmet, 1998; Ada, 2014). O tratamento é realizado com anti-hiperglicemiantes, normalmente utilizando-se das seguintes classes de fármacos: as *biguanidas*, que suprimem a produção de glicose no fígado; as *glitazonas*, que melhoram a sensibilidade à insulina ao se ligar no PPAR $\gamma$  e aumentar vias de sinalização da adiponectina; as *sulfoniluréias* e as *glinidas*, que estimulam a secreção de insulina; *agonistas do receptor GLP1* (peptídeo 1 semelhante ao glucagon), que mimetizam as incretinas potencializando a secreção da insulina estimulada por glicose, diminuindo a secreção de glucagon, promovendo sensação de saciedade e diminuindo o esvaziamento gástrico; as *gliptinas* que potencializam a

ação das incretinas e impedem a degradação de GLP1 ao inibir a DDP-4 (dipeptidil peptidase 4); e os *inibidores de alfa glucosidase* que diminuem a absorção de glicose no intestino (Zimmerman, 1997; Hundal e Inzucchi, 2003; Barnett, 2006; Melo *et al.*, 2006; Baggio e Drucker, 2007; Cariou *et al.*, 2012).

Na obesidade, o ganho de peso ocorre quando a ingestão de calorias excede o gasto energético, ou seja, quando não há um balanço energético, sendo que o excesso é armazenado no tecido adiposo em forma de gordura (lipídeos). A influência do tecido adiposo na síndrome metabólica é central. Primeiramente tido como um tecido de armazenamento de energia, hoje se sabe que o tecido adiposo tem papel fundamental como um órgão endócrino, capaz de secretar moléculas, como a leptina, e de influenciar a resistência à insulina, a inflamação, o comportamento alimentar e o gasto energético. Ele é capaz de se comunicar com outros tecidos do corpo, como o músculo, o fígado e o centro da fome no cérebro, e está localizado em depósitos viscerais e subcutâneos. O acúmulo do tecido adiposo visceral (TAV) está ligado, assim como ao diabetes tipo 2, a outras patologias, como doenças cardíacas, disfunções renais, pulmonares, no fígado, dislipidemia e hiperglicemia. No tecido adiposo subcutâneo (TAS) está associado ao baixo risco dessas doenças (Majka *et al.*, 2011).

Existem três tipos principais de células presentes no tecido adiposo. As células brancas (compõem o tecido adiposo branco, TAB), têm função principal de armazenamento de energia, podem ser encontradas em depósito subcutâneo, abdominal ou torácico e têm origem nas células precursoras que não expressam Myf5 (*Myogenic factor 5*; Myf5<sup>-</sup>). As células marrons (que compõem o tecido adiposo marrom, TAM) têm coloração mais escura porque possuem alta concentração de mitocôndrias. Esse tecido apresenta grande concentração de proteínas mitocondriais chamadas *uncoupling protein-1* (UCP1), que são capazes de desacoplar a respiração da produção de ATP e dissipam energia química na forma de calor, estimulando a oxidação de ácidos graxos. Esse processo é chamado de termogênese sem tremor e é dirigido pelo estresse oxidativo. O TAM tem origem em células precursoras que expressam Myf5 (Myf5<sup>+</sup>), está presente no feto, mas após o nascimento tende a desaparecer, ficando quase ausente em adultos (Majka, Barak *et al.*, 2011; Harms e Seale, 2013). O terceiro tipo de célula adiposa desenvolve-se a partir do mesmo precursor embrionário do TAB (Myf5<sup>-</sup>) e pode possuir características de TAM. Essa célula fica localizada em regiões do TAB em um estado basal preservando características de célula do TAB, com concentrações baixas de UCP1 e armazenando lipídeos. Entretanto, são capazes de aumentar de tamanho no frio, sob a ação de agonistas de receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos ou por outros

estímulos, produzindo uma resposta termogênica parecida com a apresentada pelo TAM (Wu *et al.*, 2013). Durante o exercício físico, o desenvolvimento da célula adiposa bege pode ser estimulado no TAB, quando uma miosina chamada irisina que deriva da clivagem da FNDC5 (*Fibronectin type III domain-containing protein 5*) estimula o aumento de UCP1 neste tecido (Bostrom *et al.*, 2012).

A inflamação sistêmica crônica no tecido adiposo está diretamente associada ao desenvolvimento da resistência à insulina e do diabetes tipo 2, uma vez que essa é uma característica do estado hiperglicêmico crônico (Xu *et al.*, 2003). A melhor compreensão de como este tecido endócrino influencia o desenvolvimento da síndrome metabólica ajudaria no desenvolvimento de tratamentos mais eficientes (Despres e Lemieux, 2006).

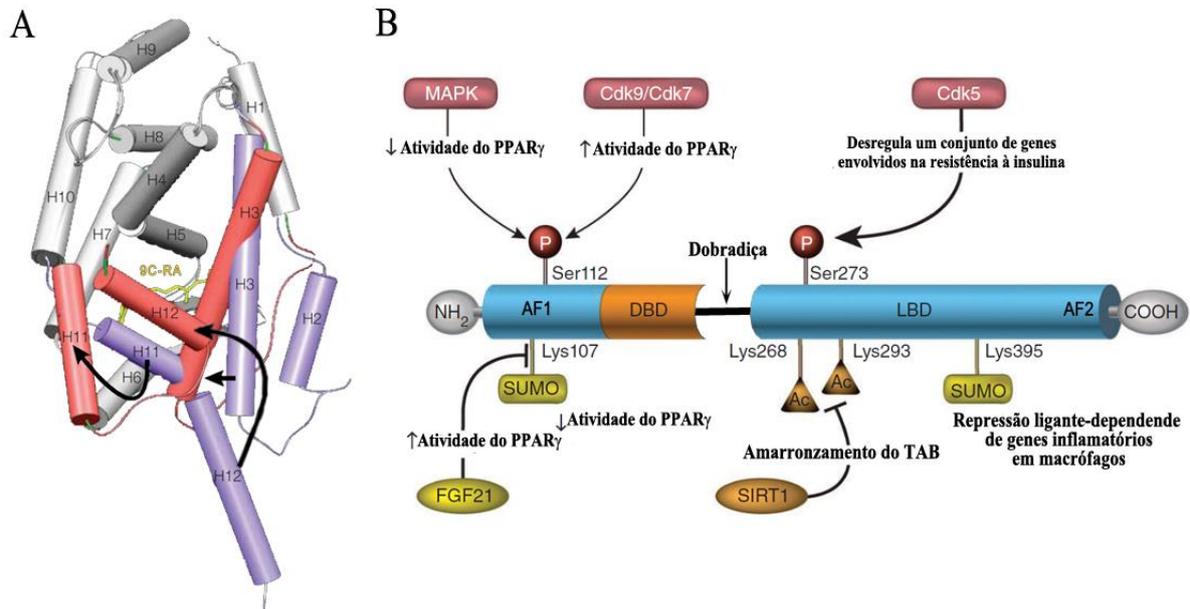
## **2. Receptores Nucleares**

Receptores nucleares são fatores de transcrição que podem ser ativados por ligantes e que controlam repostas fisiológicas importantes ao regular a transcrição gênica. Existem 48 tipos de receptores nucleares descritos e aproximadamente 50% deles não apresentam ligantes específicos. Com a clonagem e o isolamento do RXR em 1985 e o desenvolvimento da técnica de co-transfecção transiente foi possível verificar sua capacidade em formar heterodímero com outros receptores nucleares e ajudar na elucidação das vias de sinalização e vias metabólicas importantes em que está envolvido, abrindo caminho para o estudo de outros receptores nucleares (Evans e Mangelsdorf, 2014).

A ligação do ligante ao receptor nuclear é guiada por grande quantidade de proteínas que interagem com o receptor formando modificações alostéricas que governam a forma como a resposta biológica será dada (Berger e Moller, 2002).

Os receptores nucleares possuem três domínios principais. O primeiro é uma região A/B, amino terminal, pouco conservada, que age com potente função de ativação da transcrição (AF-1) e provê sítios para a fosforilação do receptor ou interação com outros receptores ou proteínas regulatórias. O segundo é um domínio central de ligação ao DNA (DBD), extremamente conservado entre os diferentes receptores e que possui dois dedos de zinco separados por uma sequência de 15 a 17 aminoácidos. Os três primeiros aminoácidos do primeiro dedo (P-box ou caixa proximal) reconhecem onde cada receptor se ligará ao DNA (elemento responsivo) e, no segundo dedo, uma sequência de 5 aminoácidos (D box ou caixa distal) auxilia a dimerização do receptor (Evans, 2005). O terceiro é um domínio de ligação ao ligante (LBD), de caráter hidrofóbico, que realoca a hélice 12 em uma posição que promove o

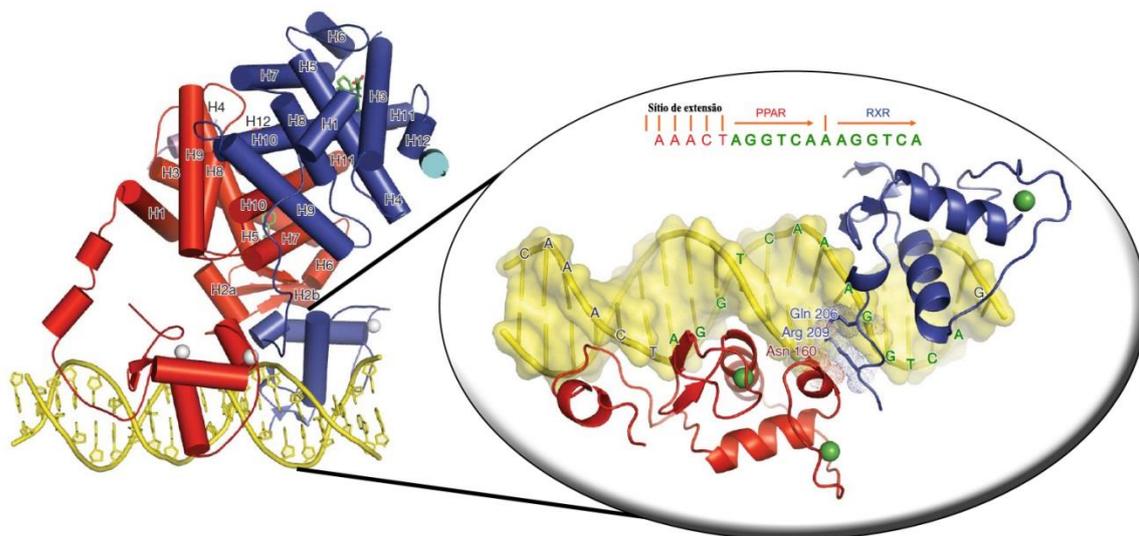
recrutamento de correguladores na presença do ligante (Figura 1), além de ser responsável pela dimerização do receptor e possuir uma região de ativação 2 (AF2), que favorece a ativação da transcrição (Chandra *et al.*, 2008).



**Figura 1. LBD do RXR $\alpha$  e estrutura do PPAR $\gamma$  com possíveis sítios de modificações pós-traducionais.**

(A) Modelo estrutural da porção LBD do RXR $\alpha$  mostrando a mudança conformacional das hélices 2 (H2), 3 (H3), 11 (H11) e 12 (H12) antes da ligação ao ácido 9-cis retinoico (9-cis-RA), em roxo, e após, em vermelho. A ligação do 9-cis-RA modifica a estrutura fazendo com que haja o fechamento da cavidade (*pocket*) onde o ligante está localizado, estabilizando a estrutura em uma conformação que facilita a dimerização com outro receptor nuclear, a interação do DBD com o elemento responsivo e o recrutamento de fatores de transcrição. Extraído de Gronemeyer *et al.* (2004). (B) Modelo estrutural de um receptor nuclear mostrando as diferentes regiões da proteína: domínio de ligação ao DNA (DBD); domínio de ligação ao ligante (LBD); função de ativação 1 (AF-1); região de dobradiça; função de ativação 2 (AF-2), região relacionada ao recrutamento de fatores transcricionais após a ligação do ligante ao receptor e as possíveis modificações pós-traducionais que o PPAR $\gamma$  pode sofrer. Extraído de Ahmadian *et al.* (2013).

Os PPAR, receptores ativados por proliferadores peroxissomais, possuem três isoformas, PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) e PPAR $\gamma$  (NR1C3). Apesar de apresentarem grande homologia, são fatores de transcrição expressos em tecidos diferentes e controlam a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (Chawla *et al.*, 2001).



**Figura 2. Estrutura do heterodímero PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$  e sua ligação ao PPRE.**

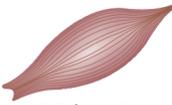
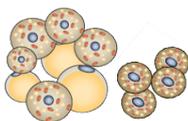
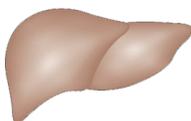
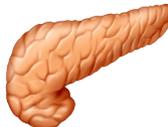
O PPAR $\gamma$  (vermelho) forma um heterodímero com o RXR $\alpha$  (azul) e esse complexo reconhece e se liga ao elemento responsivo do PPAR (PPRE), uma região de repetições diretas no DNA chamada DR1 (verde) (AGGTCAAAGGTCA). Na imagem ampliada é possível verificar a interação do domínio de ligação ao DNA dos dois receptores no PPRE. Extraído de Chandra et al.(2008).

A atividade transcricional clássica do PPAR pode ser realizada por três maneiras: pela transrepressão, ao antagonizar a ação de outro fator de transcrição na presença de um ligante; pela transrepressão, ao formar heterodímero com o receptor do ácido 9-cis retinoico (RXR), o que ocorre na ausência do ligante levando ao recrutamento de complexos correpressores que intermedeiam a repressão transcricional; ou com a ligação do ligante ao PPAR, quando há uma mudança na conformação do heterodímero, com consequente interação com proteínas corregulatórias e transcrição de genes que flanqueiam sequências específicas de DNA chamadas de elementos responsivos ao PPAR (PPRE), (Berger e Moller, 2002) como mostrado na Figura 2.

As três isoformas do PPAR são principalmente expressas em tecidos envolvidos no metabolismo energético e apresentam um padrão de distribuição e ação diferentes nesses tecidos. Suas ações influenciam a sensibilidade à insulina por regularem o metabolismo de lipídeos. O PPAR $\gamma$  tem papel chave em muitos processos fisiológicos, como adipogênese, diferenciação celular e metabolismo da glicose e de lipídeos, e é ainda importante durante a sinalização celular em alguns processos patológicos. O PPAR $\alpha$  está mais expresso no TAM, fígado, rins e coração e é grande responsável pelo metabolismo de ácidos graxos. O PPAR $\beta/\delta$  está expresso em todos os tecidos que participam do metabolismo oxidativo dos ácidos graxos

(Lehrke e Lazar, 2005; Poulsen *et al.*, 2012). A Tabela 2 traz a distribuição e função dos PPAR nos tecidos.

**Tabela 2. Distribuição e função dos PPAR nos tecidos.**

	 <b>Músculo esquelético</b>	 <b>Coração</b>	 <b>Tecido adiposo</b>	 <b>Fígado</b>	 <b>Pâncreas</b>
<b>PPAR<math>\beta/\delta</math></b>	↑ expresso; ↑ capacidade oxidativa; ↑ GLUT 4, armazena glicogênio.	↑ expresso; ↑ a oxidação de ácidos graxos; ↓ inflamação.	↓ expresso; envolvido na diferenciação de pré-adipócitos; ↑ oxidação de ácidos graxos.	↓ expresso; anti-inflamatório; normaliza hipotrigliceridemia e ↑ oxidação de ácidos graxos.	↑ expresso; regula estresse oxidativo; ↓ lipotoxicidade e ↑ secreção de insulina
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	↓ expresso; ↑ oxidação de ácidos graxos.	↓ expresso; ↓ captação de glicose.	↑ expresso no TAB e ↓ no TAM; ativa termogênese e ↑ oxidação de ácidos graxos.	↑ expresso; ↑ oxidação de ácidos graxos;	↓ expresso; regula estresse oxidativo.
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	↓ expresso; gasto energético.	↓ expresso; ↓ crescimento celular e da inflamação.	↑ expresso; adipogênico; ↑ ativação de célula adiposa bege.	↓ expresso; ↑ esteatose hepática; lipogênese.	↓↓ expresso mas possui papel central na célula beta; ↑ lipogênese.

Legenda: distribuição das diferentes isoformas dos PPAR e suas principais funções nos tecidos onde apresentam maior ação (Poulsen, Siersbæk *et al.*, 2012).

Por serem fatores de transcrição regulados por ligantes, os PPAR são extensivamente estudados como potencial alvo para o tratamento de doenças, incluindo a síndrome metabólica, diabetes tipo 2, inflamação, dislipidemia, hipertensão e câncer (Barger e Kelly, 2000; Segawa *et al.*, 2002; Lehrke e Lazar, 2005; Ahmadian, Suh *et al.*, 2013).

Tiazolidinadionas (TZD) são agonistas totais de PPAR $\gamma$  que são utilizadas para tratar a resistência à insulina associada ao diabetes tipo 2. Além de melhorar a captação de glicose mediada pela insulina no músculo, inibem a captação de glicose pelo fígado e induzem a diferenciação de adipócitos, especialmente em depósitos subcutâneos, aumentando a captação de ácidos graxos pelos adipócitos. Este efeito é baseado na hipótese do sequestro de ácidos graxos, em que é proposto que os ácidos graxos são sequestrados da corrente sanguínea e armazenados no tecido adiposo, fazendo com que haja diminuição de seus depósitos no fígado, no músculo esquelético e, assim, diminuição da lipotoxicidade e resistência à insulina,

causando o consequente aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos. Além disso, as TZD alteram o padrão de sinalização de algumas moléculas liberadas do tecido adiposo e, desta maneira, modificam a resposta metabólica em outros tecidos, como ocorre com a inibição da expressão de TNF- $\alpha$  e resistina, ou com o aumento da expressão de adiponectina, que, em ambos os casos, têm a diminuição da resistência à insulina como resultado. TZD também alteram favoravelmente a liberação de citocinas por macrófagos no tecido adiposo, melhorando a sensibilidade à insulina em outros tecidos (Evans *et al.*, 2004; Yki-Järvinen, 2004). Xu e colaboradores (2003) mostraram que, em modelo de camundongos obesos, existe aumento na transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e que o tratamento com rosiglitazona diminui a expressão desses genes, melhorando a sensibilidade à insulina.

Apesar do efeito positivo na melhora da sensibilidade à insulina, as TZD são também responsáveis por efeitos adversos importantes, como retenção hídrica, ganho de peso, perda óssea e aumento do risco de fraturas ósseas, aumento do risco de falha congestiva do coração e possibilidade de aparecimento de câncer de bexiga (Cariou, Charbonnel *et al.*, 2012). A possibilidade da descoberta e do desenvolvimento de novos ligantes de PPAR $\gamma$  que promovam a melhora na sensibilização à insulina e os efeitos antidiabéticos das TZD, mas que não apresentem os mesmos efeitos adversos, é respaldada por estudos recentes que indicam que os efeitos benéficos das TZD podem ser mediados pelo efeito destas glitazonas nas modificações pós-traducionais (MPT) do PPAR $\gamma$  (Figura 1) e não pelo efeito clássico de agonismo ao receptor. Por isso, é possível especular que ligantes que modulem MPT e que não possuem agonismo clássico possam manter o efeito antidiabético sem apresentar os efeitos adversos mediados pelo agonismo clássico (Beekun *et al.*, 2009; Ahmadian, Suh *et al.*, 2013).

Uma MPT descrita por Choi e colaboradores (2010) demonstrou que alguns efeitos positivos da ativação do PPAR $\gamma$  podem ser independentes do agonismo clássico, explicando o benefício similar do efeito da sensibilização à insulina de ambos os tipos de ativação do PPAR $\gamma$ , parcial ou total. Os autores mostraram que uma proteína quinase chamada Cdk5 é ativada pela sinalização inflamatória no tecido adiposo, estado característico na obesidade, e fosforila a serina 273 do PPAR $\gamma$ . Este processo não interfere na atividade transcricional geral do receptor, mas desregula a expressão de alguns genes levando à resistência à insulina. Esta fosforilação também pode ser realizada por outra quinase, a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) que, de maneira paradoxal, pode ser suprimida pela Cdk5 via ativação de

outra quinase, a quinase ativadora da MAP quinase (MEK) (Banks *et al.*, 2015). Isto sugere que há controle da função do PPAR $\gamma$  pelo eixo Cdk5/ERK e que compostos que inibam a ação do eixo MEK/ERK possam ser importantes para o tratamento do diabetes tipo 2.

Tanto agonistas totais quanto parciais são capazes de bloquear a fosforilação do PPAR $\gamma$  pela Cdk5 de maneira independente da atividade agonista desses ligantes, o que pode explicar a causa do efeito similar de ambos os tipos de agonista sobre a sensibilidade à insulina. Outro trabalho publicado pelo mesmo grupo (Choi *et al.*, 2011) demonstrou que o ligante SR1664, um não agonista de PPAR $\gamma$ , não tem efeito adipogênico em cultura de células, apesar de apresentar ação antidiabética *in vivo*. Este fato está relacionado à habilidade deste ligante em bloquear a fosforilação do PPAR $\gamma$  mediada pela Cdk5. Outro composto com atividade agonista parcial e ação antidiabética potente *in vivo*, o GQ16, também demonstrou capacidade de inibir a fosforilação da serina 273 do PPAR $\gamma$  (Amato *et al.*, 2012).

O PPAR $\gamma$  também pode ser fosforilado em outros resíduos por diferentes quinases. A fosforilação do PPAR $\gamma$  na região AF1 pode resultar em diferentes desfechos dependendo da quinase ou das circunstâncias em que a fosforilação ocorre. Em condições de estresse oxidativo induzido por radiação ultravioleta, a fosforilação pela MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) reduz a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ , enquanto que, durante a adipogênese, a fosforilação do PPAR $\gamma$  pela Cdk9 na serina 112 aumenta sua atividade. De modo adicional, a atividade do PPAR $\gamma$  também aumenta quando essa mesma serina é fosforilada por outra quinase, a Cdk7 (Beekun, Fleskens *et al.*, 2009).

Além disso, o PPAR $\gamma$  pode sofrer outras MPT, como sumoilação, acetilação e ubiquitinação, que são capazes de afetar sua atividade transcricional (Figura 1). Isto ocorre principalmente pela modificação de sua interação com corretores (Ahmadian, Suh *et al.*, 2013). *Small ubiquitin-like modifier* (SUMO) pertence a uma família de proteínas que são capazes de se ligar covalentemente ao PPAR $\gamma$  reprimindo sua ação. Essa MPT pode ocorrer na lisina 107 do PPAR $\gamma$ 2 ou na lisina 77 no PPAR $\gamma$ 1, resultando no recrutamento de co-repressores. PPAR $\gamma$  pode também ser sumoilado na lisina 395 em macrófagos levando à transrepressão da resposta de genes pró-inflamatórios (Beekun, Fleskens *et al.*, 2009; Ahmadian, Suh *et al.*, 2013).

Ligantes de receptores nucleares que têm atividades agonistas ou antagonistas em tecidos específicos são denominados moduladores seletivos. Ao ligarem-se ao LBD do receptor nuclear, esses ligantes são capazes de provocar modificações alostéricas

diferenciadas, que recrutam cofatores específicos fazendo com que a resposta farmacológica seja modificada, uma vez que a expressão gênica também é alterada. Para o PPAR $\gamma$ , eles têm sido buscados na tentativa de se alcançar melhores resultados na homeostase de lipídeos e da glicose. O objetivo é que produzam efeitos adversos reduzidos, por causa do seu perfil distinto sobre a ativação do receptor, e, assim, promovam um efeito de ligação diferencial e modulação da expressão gênica (Lehrke e Lazar, 2005). Foi mostrado que alguns moduladores seletivos não ativam o PPAR $\gamma$ , ou a ativação é muito branda, e ainda possuem baixo potencial para adipogênese com boa sensibilização à insulina (Choi, Banks *et al.*, 2011; Amato, Rajagopalan *et al.*, 2012).

Existem metabólitos secundários de plantas e microrganismos com capacidade de ativar o PPAR $\gamma$  de maneira parcial, o que sugere que são fontes promissoras para busca de novos ligantes. O kaempferol, por exemplo, um flavonoide encontrado em vários produtos naturais, mostrou ser capaz de ativar o PPAR $\gamma$  (Kang *et al.*, 2008). Vários metabólitos de plantas já foram testados com a finalidade de se encontrar novos ligantes de PPAR $\gamma$  (Garcia-Vallve *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), porém, pouco se explorou, até o momento, dos metabólitos de microrganismos na busca de novos ligantes e poucos trabalhos foram encontrados com descrição de fungos com metabólitos com atividade sobre o PPAR $\gamma$  (Sato *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2013).

### **3. Produtos naturais, fungos endofíticos e a *Bauhinia variegata*.**

Metabólitos secundários são substâncias produzidas por microrganismos e plantas que favorecem sua relação com o ambiente. A ausência desses metabólitos pode não causar a morte imediata do organismo que os produz, mas sua presença confere vantagem evolutiva para a sobrevivência e, dependendo do ambiente em que os organismos produtores se encontram, esses compostos podem se tornar cruciais. A produção de metabólitos secundários por plantas e microrganismos ocorre a partir de uma associação de equilíbrio complexa que pode ser diretamente ou indiretamente relacionada a sua interação com o ambiente em que estão inseridos (Kusari *et al.*, 2012). Acredita-se que esses metabólitos sejam importantes na mediação da comunicação desses organismos com o ambiente e, em alguns casos, entre si (Márquez *et al.*, 2007).

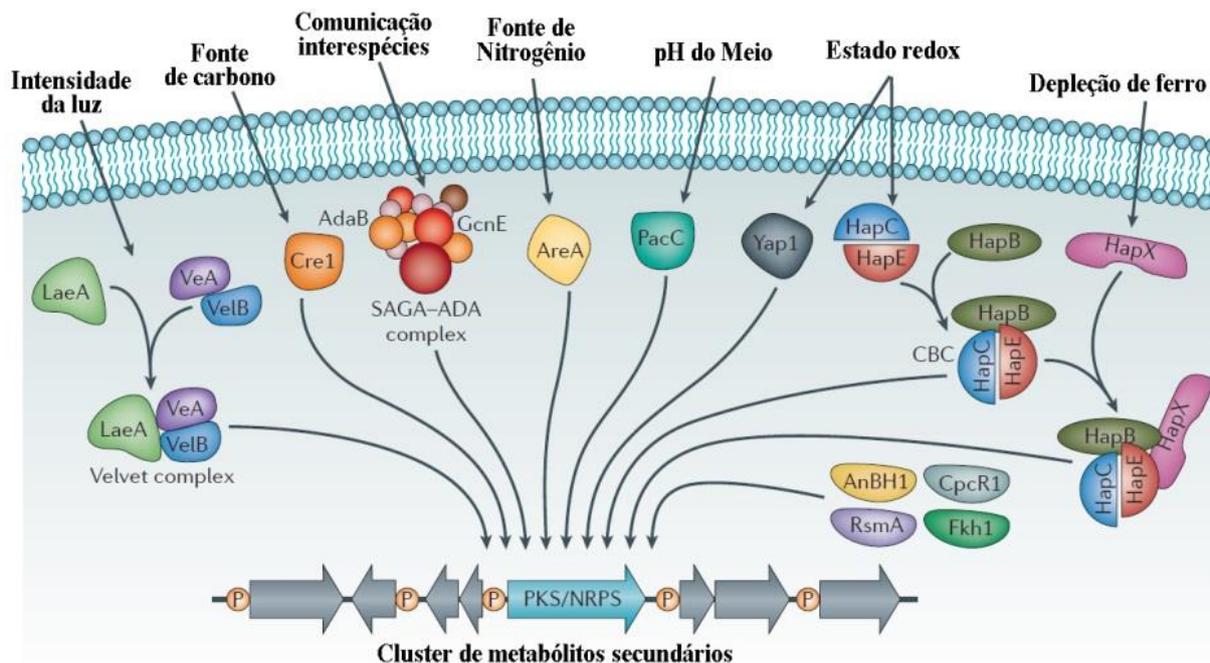
Plantas e microrganismos são responsáveis pela produção da grande maioria de produtos naturais importantes para o tratamento de várias doenças. A revisão mais recente de Newman e Cragg (2012) sobre produtos naturais como fonte de novos fármacos mostra que,

apesar do número de novas moléculas sintéticas aprovadas para uso no tratamento de doenças representar apenas 29% do total de compostos registrados entre 1981 e 2010, pouco é investido em programas de pesquisa e desenvolvimento na busca de produtos naturais pela indústria farmacêutica, quando se leva em conta a proporção do que se é gasto em desenvolvimento e descoberta de novos fármacos por via sintética (*high-throughput screening*). Uma vez que os produtos naturais ainda compõem a mais rica biblioteca de compostos e dominam a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos, os autores defendem uma abordagem multidisciplinar para a busca de novos compostos. Mesmo que não se incluam no grupo de produtos naturais os compostos que possuem ação mimética de produtos naturais e aqueles que são produzidos ou desenvolvidos a partir de grupos farmacofóricos de produtos naturais, estes ainda são considerados no processo de desenvolvimento e representam a maior parte de novos fármacos lançados no mercado (Newman e Cragg, 2012).

Produtos naturais derivados de microrganismos tiveram grande importância como fonte de compostos terapêuticos no último século (Fleming, 1929; Stierle *et al.*, 1993; Mousa e Raizada, 2013). Estima-se que, no mínimo, 1,5 milhão de espécies de fungos estejam presentes em nosso planeta, podendo chegar a até 3 milhões (Hawksworth, 2012). Desse número, sugere-se que até 2011 por volta de 99.000 espécies haviam sido descritas (Blackwell, 2011). Assim, esses microrganismos ainda representam uma fonte pouco explorada de novas moléculas bioativas, e os fungos endofíticos são microrganismos que se destacam na produção de produtos naturais (Kusari, Hertweck *et al.*, 2012). Após a publicação do trabalho de Stierle e colaboradores (1993) que mostrou que o taxol também era produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, e não somente por sua planta hospedeira, *Taxus brevifolia*, o interesse pelo estudo desse microrganismo cresceu vertiginosamente.

Os fungos endofíticos colonizam os tecidos vivos e internos de todas as plantas do planeta, a princípio, sem provocar nenhum dano aparente ao seu tecido (Strobel e Daisy, 2003). Eles são boas fontes de moléculas, pois suas estreitas interações metabólicas com seus hospedeiros resultam num metabolismo secundário particularmente ativo. O desenvolvimento desta interação fungo/planta hospedeira deu-se, provavelmente, ao longo de milhões de anos de evolução, e há casos descritos em que compostos que pareciam ser produzidos por uma planta eram, na verdade, produzidos pelo fungo endofítico desta planta (Cook *et al.*, 2013).

A biossíntese de metabólitos secundários em fungos é complexa e realizada em diferentes níveis, por grupos de fatores, durante a regulação transcricional. Um grupo consiste de fatores de transcrição específicos, que variam desde vias específicas até vias de amplo domínio transcricional. Outro grupo de fatores consiste de complexos heterodiméricos que participam da regulação global de múltiplos conjuntos de genes relacionados com outros processos de desenvolvimento do fungo (Yin e Keller, 2011). A produção desses metabólitos secundários em fungos dá-se, principalmente, a partir das enzimas poliketídeo sintetase (PKS) e peptídeo não ribossomal sintetase (NRPS). A primeira é uma enzima multidomínio que produz poliketídeos, que são um diverso grupo de metabólitos secundários produzidos por plantas e microrganismos, por condensação de acil-coenzima A (acil-CoA) (Schümann e Hertweck, 2006). A segunda sintetiza peptídeos por uma via independente de ácidos nucleicos e possui três domínios principais, um de condensação (C), um de adenilação (A) e um carreador de peptidil (PCP). O domínio A recruta e ativa os aminoácidos na presença de ATP, enquanto o PCP liga resíduos de serina do grupamento tiol do cofator com esses aminoácidos ativados. O domínio C faz a ligação peptídica entre o tioéster aminoacil ligado ao PCP com o produzido pelo complexo precedente, promovendo o alongamento da cadeia. As NRPS são responsáveis pela produção de metabólitos importantes, como antibióticos, antineoplásicos e imunossupressores (Challis e Naismith, 2004). Durante a transcrição gênica, a produção desses metabólitos pode ser regulada também pela interação do fungo com o ambiente e pode depender da fonte de nutrientes, ou seja, fonte de carbono e nitrogênio, do pH, da intensidade de luz, da temperatura, da interação interespecies, da concentração de espécies reativas do oxigênio (ERO) e da presença de ferro no meio. A Figura 3 mostra um esquema da influência desses fatores na transcrição das enzimas PKS e NRPS (Brakhage, 2013).



**Figura 3. Influência ambiental na regulação da expressão de metabólitos secundários em fungos.**

O ambiente é um dos principais fatores na influência da produção de metabólitos secundários por fungos. O estímulo causado a eles é capaz de modular a expressão gênica ao influenciar a ação de proteínas regulatórias que por sua vez irão influenciar a expressão do policetídeo sintetase (PKS), peptídeo não ribossomal sintetase (NRPS) ou uma enzima híbrida PKS–NRPS. CBC, complexo de ligação a CCAAT; CpcR1, regulador 1 da cefalosporina C; LaeA, perda da expressão A do *alfR*; RsmA, restaurador do metabolismo secundário A; SAGA–ADA, complexo Spt–Ada–Gcn5–acetiltransferase–ADA. Extraído de Brakhage (2013).

O que se busca, atualmente, é o domínio de técnicas que permitam o controle e a caracterização do mecanismo regulatório da produção dos metabólitos secundários produzidos por fungos. Mas isso só é possível com o conhecimento da função dessas substâncias e em qual via de produção específica elas ocorrem. Além deste desafio, ainda é necessário conhecer a gama completa de substâncias bioativas que os fungos endofíticos são capazes de produzir (Brakhage, 2013).

O bioma Cerrado, a maior e mais rica savana tropical do mundo, que abrange uma área de 2,1 milhões de km<sup>2</sup> (24,8% do território brasileiro), se destaca por ser área endêmica de inúmeras espécies (Klink e Machado, 2005) e por possuir características que contribuem para a existência de espécies adaptadas e produtoras de metabólitos secundários com atividades importantes, como esteroides, poliacetilenos e alcaloides (Gottlieb e Borin, 1999). Infelizmente, apesar do número de publicações a respeito deste bioma ter crescido nos últimos anos, ainda existem poucos estudos relatando a busca e desenvolvimento de novos produtos naturais originários do Cerrado brasileiro (Borges *et al.*, 2014). O trabalho de Borges e

colaboradores (2014) indica que a maioria dos trabalhos publicados encontra-se em revistas brasileiras e dizem respeito principalmente à biodiversidade de plantas. Neste sentido, a busca por compostos produzidos por microrganismos do Cerrado representa uma abordagem promissora na descoberta de novas substâncias bioativas.

*Bauhinia* é o nome do gênero de plantas que compreende aproximadamente 300 espécies da família Caesalpiniaceae. É encontrada em regiões de clima tropical, tem origem asiática e é conhecida por seu uso popular para a ornamentação e pelo uso de sua droga vegetal (folha, casca e raízes) no tratamento de doenças (Cechinel, 2009). A *Bauhinia variegata* é uma planta que se desenvolve bem em vários ambientes de clima quente por todo o mundo. Ela se adapta bem ao clima brasileiro e pode ser encontrada em todas as regiões do país. Em regiões subtropicais, apresenta maior quantidade de idioblastos com conteúdo fenólico, taninos e flavonoides (Duarte *et al.*, 2007). Essa planta apresenta atividades biológicas importantes como anti-inflamatória (Mohamed *et al.*, 2009), hepatoprotetora (Bodakhe e Ram, 2007), anti-hiperglicemiante (Azevedo *et al.*, 2006; Frankish *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012; Kulkarni e Garud, 2015), além de ativar o PPAR $\gamma$  (Silva, 2015). Por possuir atividade hipoglicemiante e ativadora do PPAR $\gamma$  e por existirem poucos trabalhos mostrando a avaliação destas atividades em seus fungos endofíticos, considerou-se que fungos endofíticos isolados da *Bauhinia variegata* poderiam ser fontes promissoras para a busca de novos compostos com tais atividades biológicas.

#### **4. Estresse oxidativo, o diabetes e o PPAR**

Radicais livres são moléculas, íons ou átomos que possuem um elétron desemparelhado, fazendo com que possuam capacidade aumentada de reagir com outras moléculas. Eles podem ser formados a partir do oxigênio, recebendo, assim, a denominação de espécies reativas do oxigênio (ERO), do nitrogênio, as espécies reativas do nitrogênio (ERN), ou do enxofre, espécies reativas do enxofre (ERE). Esses radicais podem ser produtos dos processos fisiológicos do organismo, como inflamação, fagocitose, exercício físico, respiração, entre outros, ou do ambiente, como poluentes do cigarro, radiação solar ou agentes tóxicos, e são capazes de reagir no organismo com açúcares, ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas e lipídeos (Carocho e Ferreira, 2013).

A oxidação faz parte do processo fisiológico natural em organismos multicelulares. Existe um equilíbrio muito frágil entre a produção de compostos radicalares e a sua neutralização por compostos antioxidantes. Essa proteção antioxidante do organismo provém

da dieta, de enzimas especializadas e de outras substâncias endógenas. Quando há excesso de produção de radicais e deficiência em sua neutralização, ocorre o desequilíbrio conhecido como estresse oxidativo, que geralmente acarreta em disfunção fisiológica (Halliwell, 2011).

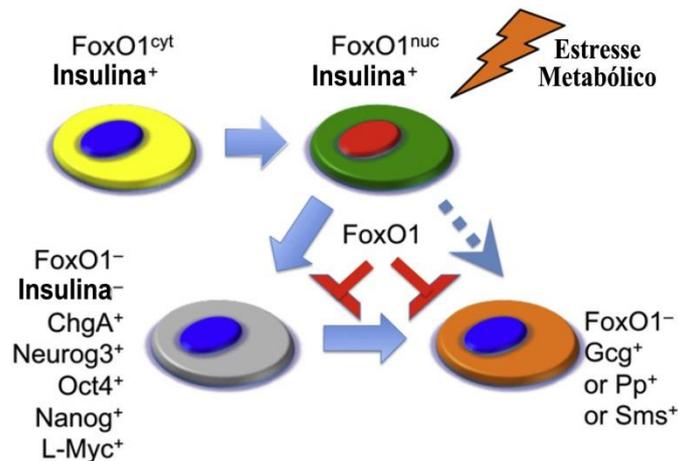
Proteínas podem ser modificadas pela clivagem específica de um aminoácido, ou de um peptídeo mediada por uma substância radicalar, o que aumenta a chance desta proteína sofrer proteólise por uma enzima, ou ainda pode ocorrer a formação de uma ligação cruzada (*cross-link*) da proteína com um produto da peroxidação lipídica. Como consequência do dano causado às proteínas, pode haver problemas na atividade de enzimas, receptores, no transporte de membrana e na transdução de sinal por causa dos grupamentos altamente reativos presentes nas substâncias radicalares (Lobo *et al.*, 2010).

Na peroxidação lipídica, os ácidos graxos poliinsaturados localizados na membrana celular são peroxidados de maneira não enzimática, processo que ocorre em três fases: *i*) a iniciação, quando ocorre o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, principalmente na presença do OH· (radical hidroxila), mas também pelo LO· (radical alcooxila), tendo como produto um radical lipídico (L·); *ii*) a propagação, fase em que o radical lipídico reage com oxigênio formando um radical peroxila (LOO·), que, por sua vez, reage com outro lipídeo, sequestrando o hidrogênio e formando um novo radical lipídico e um hidroperóxido lipídico (LOOH), levando à produção de outros radicais que se decompõem em produtos secundários; e *iii*) a terminação, em que os radicais L· e LOO· produzidos nas etapas anteriores se combinam e produzem uma espécie não radicalar. Entre os produtos da peroxidação lipídica, os que são produzidos em maior quantidade são o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE). Esses produtos são moléculas eletrofílicas capazes de formarem adutos de DNA e, em alguns casos, podem agir como segundos mensageiros (Guéraud *et al.*, 2010).

O DNA ou RNA também sofrem dano pelo estresse oxidativo. No câncer e no envelhecimento as ERO estão muito aumentadas e, nesses casos, é possível verificar maior dano ao DNA. A guanina oxidada (8-hidroxideoxiguanosina) é o produto de oxidação do DNA responsável pelo maior número de mutações, uma vez que a DNA polimerase incorpora a mutação ocorrida pela oxidação e não o faz quando a mutação ocorre por outro tipo de alteração (Barzilai e Yamamoto, 2004). Quando há algum estímulo, as espécies reativas podem ter origem intra ou extracelular e as consequências da resposta variam de acordo com o tipo de célula, com a duração e com a natureza do estresse (Fulda *et al.*, 2010).



Aumento excessivo de ERO e ERN modulam a expressão de fatores de transcrição como Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2), que é um fator de transcrição importante na resposta antioxidante e anti-inflamatória nas células; complexo AP-1 (ativador de proteína 1), que são fatores de transcrição da família de proteínas Jun que formam dímeros com outras proteínas Jun ou Fos e, além de outras funções, modulam a resposta antioxidante na célula; o NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B), que é importante em várias respostas fisiológicas na célula, como inflamação, proliferação celular e hiperglicemia, e, na presença de ERO, se dissocia de seu inibidor (I- $\kappa$ B $_{\alpha}$ ) no citosol e se desloca para o núcleo, favorecendo a expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante, cuja região promotora possui o elemento responsivo antioxidante (ARE); Bach1 (*BTB e CBC homology 1*), que são fatores de transcrição que formam heterodímeros com oncoproteínas *Maf* e, assim, reconhecem os elementos responsivos das *Maf* (MARE) no genoma, inibindo a transcrição gênica de genes relacionados à apoptose, ciclo celular e estresse oxidativo; o ATF4 (fator de ativação transcricional 4), que é induzido pelo estresse oxidativo e promove a biossíntese de proteínas, protegendo a célula contra o estresse oxidativo ao modular genes envolvidos na função mitocondrial, no transporte e no metabolismo de aminoácidos; HSF1 (proteínas de choque térmico 1) que funcionam como chaperonas e são ativadas na medida em que ocorrem danos às proteínas causados pelo calor, metais pesados, toxinas, infecção e estresse oxidativo; o HIF (fator induzido pela hipóxia), que é responsável pela regulação de genes responsáveis pela resposta da célula à hipóxia e fica desestabilizado na hiperglicemia; e o FOXO1 (*forkhead box O*), que é ativado no estresse oxidativo, principalmente pela presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induzindo a atividade de enzimas como manganês-superóxido dismutase (MnSOD) e catalase, responsáveis pela degradação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente (Rochette, Zeller *et al.*, 2014). Em trabalho recente, Talchai e colaboradores (2012) demonstraram que no estresse metabólico o FOXO1 fica hipoexpresso. Nesse caso, a célula pode tanto entrar em desdiferenciação quanto em um estado inativo em que a produção de insulina é diminuída (Figura 5) (Ameri e Harris, 2008; Åkerfelt *et al.*, 2010; Rochette, Zeller *et al.*, 2014).



### Figura 5. Mecanismo proposto da falência da célula $\beta$ .

Células  $\beta$  saudáveis produzem insulina e possuem FoxO1 no citoplasma (amarelo). Na fase inicial do estresse metabólico a produção de insulina é mantida, mas FoxO1 se dirige ao núcleo para que a célula  $\beta$  continue funcional (núcleo vermelho). Se o estresse persistir, a expressão do FoxO1 diminui (núcleo azul) e outros fatores como Neurog3, Oct4, Nanog e L-Myc são reativados fazendo com que a célula  $\beta$  seja incapaz de transmitir a diminuição da produção de insulina, levando a célula a regredir a uma célula de estágio progenitor, com incapacidade de função endócrina (cinza), ou a se modificar em outra célula produtora de hormônio (laranja). Extraído de Talchai e colaboradores (2012).

As citocinas inflamatórias também estão envolvidas no estresse oxidativo. Hasnain e colaboradores (2014) mostraram que a interleucina 22 (IL-22) é capaz de suprimir o estresse oxidativo no retículo endoplasmático em ilhotas pancreáticas e de normalizar os níveis glicêmicos em camundongos obesos com hiperglicemia induzida. As proteínas dos genes regulados pela IL-22 foram capazes de diminuir a produção de ERO. Estudos recentes relacionam os mecanismos regulatórios envolvidos nos processos patológicos do diabetes e da aterosclerose em uma correlação entre estresse oxidativo e ativação de receptores proliferadores peroxissomais (Devchand *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2009; Guellich *et al.*, 2013).

A peroxidação lipídica também influencia a apoptose. Cohen e colaboradores (2011) mostraram que o ácido linoleico e o ácido araquidônico, quando são oxidados na membrana celular, produzem uma ERO chamada 4-HNE que forma complexos (adutos com o DNA, proteínas e fosfolipídios), quando produzida de maneira excessiva, causando disfunção da célula beta, característica do diabetes tipo 2. O 4-HNE é ligante de PPAR $\beta/\delta$  e, quando está em concentrações não tóxicas, liga-se ao receptor e neutraliza a formação de adutos, favorecendo a secreção de insulina e impedindo a apoptose da célula beta.

Em outro trabalho, indivíduos tratados com agonista de PPAR $\beta/\delta$  por duas semanas apresentaram melhora em indicadores que estão alterados na síndrome metabólica ao aumentar a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético (Risérus *et al.*, 2008).

Oxidação, estresse oxidativo ou mesmo a produção de ERO não são necessariamente patogênicos. A  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, uma via largamente regulada por PPAR $\alpha$ , por exemplo, é uma etapa crítica para a utilização de energia. Da mesma maneira, a produção de ERO é importante para respostas do fator de crescimento, sinalização de células e função bactericida de macrófagos. Em contraste, estudos mostram que estas mesmas vias, por meio de ERO ou LDL oxidado, quando desreguladas, contribuem para as principais condições patológicas, como a aterosclerose (Devchand, Ziouzenkova *et al.*, 2004) ou a inflamação (Teissier *et al.*, 2004; Martin, 2009).

Hwang e colaboradores (2004) mostraram que ligantes de PPAR $\gamma$  são capazes de inibir a produção de O $_2^{\cdot-}$  mediada pelo NADPH oxidase e aumentar a expressão de cobre/zinco superóxido dismutase (Cu/Zn SOD). O mesmo grupo mostrou que três diferentes ligantes de PPAR $\gamma$ , apesar de ativar o receptor de maneira comparável, causavam o aumento da biodisponibilidade de NO de maneira diferente e, portanto, os autores propuseram que esses ligantes poderiam ser utilizados para modular a liberação de NO nas doenças vasculares (Polikandriotis *et al.*, 2005). Além disso, outro grupo demonstrou que a rosiglitazona reduz o estresse oxidativo e a expressão da NADPH oxidase em camundongos diabéticos, diminuindo a produção de O $_2^{\cdot-}$  (Hwang *et al.*, 2007).

Corroborando com a influência de ligantes de PPAR $\gamma$  no estresse oxidativo, Yuan e colaboradores (2011) mostraram que a pioglitazona inibe a proliferação de células do músculo liso vascular (VSMC) induzida por produtos finais da glicosilação avançada (AGE) e pela indução da parada da fase G0-G1 do crescimento celular. A proliferação e migração de VSMC são as etapas-chave no desenvolvimento de aterosclerose e formação neointimal depois do dano às artérias. Esse efeito pode ser mediado pela inibição, via regulação induzida por AGE, da expressão de PPAR $\gamma$ , geração de ERO e ativação da via redox-sensível a quinases reguladas por sinais extracelulares, culminando em complicações vasculares, como aterosclerose e infarto, que são causas primárias de mortalidade em diabetes. Em outro trabalho, Jiang e colaboradores (2009) mostraram que a presença de peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$ ) diminui a transcrição de PPAR $\beta$  e aumenta a apoptose em células endoteliais humanas que revestem o lúmen dos vasos sanguíneos de maneira dose-dependente, e que um ligante específico do PPAR $\beta$  (L-165041) foi capaz de inibir este processo. Portanto, além da busca

por novos fármacos, é importante o entendimento do mecanismo de ação dos compostos antioxidantes no tratamento de diabetes e suas complicações vasculares.

*In vivo*, a produção de espécies reativas pode ocorrer na fagocitose, no metabolismo de ácido araquidônico, na respiração, na ação das enzimas óxido nítrico sintetase e xantina oxidase, além de outras. A defesa do organismo contra o estresse oxidativo pode advir de defesas endógenas, como o ácido úrico ou a glutatona, e pode decorrer da dieta, como vitaminas E e C. Substâncias antioxidantes são aquelas capazes de inibir ou diminuir a oxidação de um substrato, ou prevenir o estresse oxidativo sofrido por uma molécula, pelo sequestro de um radical e formação de outro radical estável, e que podem, assim, evitar danos a moléculas vitais ao processo fisiológico do organismo (Halliwell, 2011). O organismo conta com defesas antioxidantes enzimáticas ou não enzimáticas. Entre as enzimas, pode-se destacar a SOD, que reduz o  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , a catalase (CAT), que catalisa a redução de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , e a glutatona peroxidase, que reduz  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . A Tabela 3 mostra as principais ERO e enzimas envolvidas no estresse oxidativo.

**Tabela 3. Oxidantes endógenos e enzimas antioxidantes mais importantes.**

Radical	Reação resumida	Enzima	Reação resumida
Radical Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot-} + H^+$ $2O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	SOD	$M(n+1)\text{-SOD} + O_2^{\cdot-} \rightarrow M(n)\text{-SOD} + H_2O_2$
Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )	$Hipoxantina + H_2O + O_2 \rightleftharpoons Xantina + H_2O_2$ $Xantina + H_2O + O_2 \rightleftharpoons \text{ácido úrico} + H_2O_2$	Catalase	$2H_2O_2 + Fe(IV) \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-E} + O_2$
Radical Hidroxila ( $\cdot OH$ )	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$	GTPx	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Ácido Hipoclorídrico (HOCl)	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$		
Radical Peroxila ( $ROO\cdot$ )	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$	PRX	$2 R'\text{-SH} + ROOH = R\text{-S-S-R}' + H_2O + ROH$
Radical Hidroperoxila ( $HOO\cdot$ )	$O_2 + H_2O \rightleftharpoons HOO\cdot + OH^-$	GST	$RX + GSH = HX + R\text{-S-GSH}$

Extraído de (Birben *et al.*, 2012).

Substâncias provenientes da dieta também são importantes na defesa contra o estresse oxidativo. A vitamina C é um antioxidante que não é produzido em humanos, mas tem atividade importante na neutralização do  $H_2O_2$ , assim como a vitamina E (tocoferol) é o mais importante antioxidante lipossolúvel e consegue proteger a membrana celular da oxidação (Lobo, Patil *et al.*, 2010).

Polifenóis são as substâncias antioxidantes mais abundantes na dieta e podem ser produzidas por plantas e fungos (Manach *et al.*, 2004). Flavonoides são polifenóis com atividades fisiológicas e farmacológicas diversificadas, como atividade estrogênica, antitumoral, antimicrobiana, antialérgica, anti-inflamatória e a bem conhecida atividade antioxidante e queladora de íons metálicos (Cotelle, 2001; Reiterer *et al.*, 2004; Das e Rosazza, 2006; Nazari *et al.*, 2011). Essas substâncias têm mostrado efeito benéfico em relação ao *diabetes mellitus*, agindo em várias vias, como na regulação das vias bioquímicas da glicose, na tolerância à glicose, perfil lipídico, biossíntese do glicogênio, captação de glicose e liberação de insulina (Volpato *et al.*, 2008; Da Cunha *et al.*, 2009). Além disso, uma metanálise publicada recentemente mostrou que a ingestão de flavonoides na dieta foi associada a uma diminuição de casos de diabetes tipo 2 (Liu *et al.*, 2013).

Em trabalho anterior, foram isolados nove fungos endofíticos de folhas de *B. variegata* e produzidos os extratos de seus metabólitos. Após avaliação desses extratos, foi mostrado que todos possuíam atividade antioxidante, uma vez que foram capazes de sequestrar o radical estável DPPH $\cdot$ , e que o extrato do fungo VII foi capaz de ativar o receptor nuclear quimérico PPAR $\gamma$ /Gal-4 (Mesquita, 2011). Neste trabalho, o objetivo foi avaliar duas atividades antioxidantes específicas e se os extratos eram capazes de ativar as isoformas  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$  do PPAR.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Avaliar o potencial dos metabólitos de fungos endofíticos isolados das folhas de *Bauhinia variegata* como fonte de moléculas antioxidantes e agonistas de receptores nucleares ativados por proliferadores peroxissomais.

### **Objetivos específicos**

Para alcançar o objetivo principal deste projeto, foram realizadas as seguintes etapas:

- Submeter os fungos endofíticos isolados da *B. variegata* à cultura líquida submersa para produção de metabólitos.
- Produzir os extratos por extração líquido-líquido dos fluidos de cultura obtidos.
- Identificar os fungos endofíticos isolados.
- Avaliar a atividade antioxidante dos diferentes extratos obtidos.
- Avaliar a atividade agonista dos extratos frente às diferentes isoformas dos receptores nucleares ativados por proliferadores peroxissomais.
- Avaliar a capacidade dos extratos de conferir proteção contra digestão por protease ao LBD do PPAR $\gamma$ .
- Verificar a propriedade dos extratos capazes de ativar o PPAR $\gamma$  em promover a diferenciação de células 3T3-L1 em adipócitos.

## METODOLOGIA

### 1. Microrganismos.

Os fungos endofíticos utilizados foram isolados de folhas de *Bauhinia variegata* coletadas em Brasília, DF, em julho de 2011, e as cepas isoladas mantidas em estoque com repiques realizados periodicamente.

### 2. Identificação molecular dos fungos endofíticos.

#### 2.1. Extração do DNA genômico

Os fungos isolados foram identificados com base em sequências de genes do RNA ribossomal amplificadas pela técnica de PCR. Para isso, os fungos foram cultivados em cultura submersa em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose) a 30°C por 48 horas em plataforma rotativa a 120 rpm.

Dois gramas (peso úmido) de micélios de cada fungo endofítico foram submersos em nitrogênio líquido e triturados com auxílio de almofariz e pistilo. Ao pó obtido pela trituração dos micélios dos fungos foram adicionados 500 µL de tampão TES (100 mM Tris, pH 8,0, contendo 10 mM EDTA e 2% SDS) e a mistura foi agitada vigorosamente com auxílio de um agitador de tubos do tipo vórtex. Em seguida, esta mistura foi submetida à partição líquido-líquido com fenol:clorofórmio (1:1) para purificação do DNA genômico. O DNA isolado foi solubilizado em água desionizada, quantificado por espectrofotometria e analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% (100 V, 30 min) (Möller *et al.*, 1992; Guimarães *et al.*, 2008).

#### 2.2. PCR

Para a identificação dos fungos foram amplificadas duas regiões que separam o 5,8S rDNA do 18S e 28S, chamadas *internal transcribed spacers* (ITS), localizadas no gene do RNA ribossômico e que são muito conservadas em fungos da mesma espécie. As regiões ITS1 e ITS2 foram amplificadas com os pares de oligonucleotídeos universais ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) - ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) e ITS3 (GCATCGATGAAGAACGCAGC) - ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), respectivamente. A reação para amplificação foi feita pela mistura de 1 µL de DNA genômico (50 ng.µL<sup>-1</sup>), 2,5 µL de dNTP (4 mM), 0,5 µL de Taq polimerase (Amplitaq platinum, 5 U.µL<sup>-1</sup>), 5,0 µL de tampão Tris/HCl (100 mM, pH 8,3), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) e 37,0 µL de água desionizada. A este meio reacional foram adicionados ainda 1,0 µL de ITS1 (21 pM) e 1,0 µL ITS2 (21

pM) ou 1,0 µL de ITS3 (21 pM) e 1,0 µL de ITS4 (21 pM). Os ciclos de incubação foram configurados da seguinte maneira: reação de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C, de 1 minuto cada, anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação (1,0 µg) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris/acetato, 0,04 M, pH 8,0, contendo 0,001 M de EDTA. A coloração do gel para evidenciação das bandas foi feita com solução de brometo de etídeo a 0,05%. Em seguida, os produtos de amplificação foram purificados por utilização de kit de purificação (QIAquick<sup>®</sup>, QUIAGEN<sup>®</sup>, Alemanha) e enviados para sequenciamento na Macrogen<sup>®</sup>, Coreia do Sul.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências descritas no GenBank (NCBI) e o alinhamento para comparação entre as sequências obtidas e as mais similares encontradas no NCBI foi realizado com auxílio do programa Clustal X 2.0 (Larkin *et al.*, 2007).

### **2.3. Árvore filogenética**

A análise filogenética das sequências gênicas do RNA ribossomal foi realizada por utilização do programa MEGA 5.2.1 baseado na análise *neighbor joining* da região ITS1-5,8S rDNA, com base em 1.000 réplicas de *bootstrap* (Tamura *et al.*, 2011).

## **3. Condições de cultivo dos fungos para produção de esporos e preparo do inóculo.**

O fungo estoque foi repicado em meio ágar Sabouraud dextrose. Após cinco dias de incubação a 30°C, os esporos produzidos foram recolhidos com auxílio de água destilada esterilizada.

## **4. Fermentação em cultura líquida submersa.**

Uma suspensão de conídios dos microrganismos foi inoculada em meio pré-fermentativo de Jackson (1993), que foi mantido a 30°C por 48 horas, sob agitação constante. Após este período, o micélio produzido foi separado por filtração e inoculado no meio fermentativo de Jackson (1993), que foi mantido, sob agitação constante, a 30°C por 5 dias.

## **5. Preparo dos extratos das culturas.**

Os micélios das culturas fermentativas foram separados dos fluidos de cultura por filtração a vácuo. Os fluidos de cultura foram submetidos à partição líquido-líquido com acetato de etila para extração dos metabólitos produzidos pelos fungos e secretados no meio.

Os extratos obtidos foram concentrados por evaporação sob vácuo, a 35°C, pesados e solubilizados em metanol.

## **6. Atividade agonista dos receptores PPAR – ensaio de gene repórter.**

O ensaio de gene repórter por meio de transfecção transiente foi utilizado na pesquisa e identificação de ligantes para receptores nucleares (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ ). Esse ensaio consistiu na transfecção por eletroporação de plasmídeos de expressão e repórter no interior do núcleo de células mesangiais humanas, seguido do tratamento das células com um ligante conhecido (controle positivo) ou com os extratos em estudo. Na presença de substâncias agonistas, o gene repórter (luciferase) teve sua transcrição aumentada e funcionou como indicador da atividade transcricional do receptor.

Para o ensaio de transfecção, as células foram coletadas por centrifugação, a 760,1 x g por 5 minutos, e ressuspensas em solução PBS contendo 0,1% de dextrose e 0,1% de cloreto de cálcio, para obtenção de uma suspensão contendo  $3 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>. A cada 500  $\mu$ L desta solução de células ressuspensas foram adicionados 1,5  $\mu$ g do vetor de expressão PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  ou PPAR $\gamma$  e 3  $\mu$ g do vetor do plasmídeo repórter PPRE. As células foram transferidas para cubetas e submetidas à eletroporação a 350 mV e 700  $\mu$ F, usando um gerador de pulso modelo Gene Pulser II, da Bio-Rad<sup>®</sup>. Após a eletroporação, as células foram transferidas para o meio de cultura, distribuídas em placas Corning<sup>®</sup> de 12 poços (1 mL por poço) e tratadas com veículo, controle positivo ou diferentes concentrações dos extratos, com base no ensaio de citotoxicidade realizado em trabalho anterior (Mesquita, 2011).

Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, as células foram separadas por centrifugação a 760,1 xg e lisadas com tampão de lise 1X (Promega<sup>®</sup>). Para a determinação da atividade da luciferase, foram adicionados 20  $\mu$ L de luciferina (Kit Promega Corp<sup>®</sup>) à 20  $\mu$ L de lisado celular. A emissão de luz gerada pela reação enzimática entre a luciferina e a luciferase foi quantificada em luminômetro GloMax<sup>®</sup> 20/20, e o resultado foi expresso em unidades relativas de luz. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Ribeiro *et al.*, 2001). Os dados foram expressos como média da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo (DMSO:MEOH, 1:3), de pelo menos quatro experimentos distintos. A rosiglitazona 10<sup>-5</sup> M, foi utilizada como controle positivo para os ensaios utilizando PPAR $\gamma$  e o bezafibrato na concentração de 3x10<sup>-4</sup> M, foi utilizado como controle positivo para os ensaios realizados com os receptores PPAR $\alpha$  e  $\beta$ . Os resultados obtidos foram submetidos à

análise de variância (teste *one-way* ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls.

### **7. Ensaio de proteção do receptor nuclear PPAR $\gamma$ contra digestão de protease.**

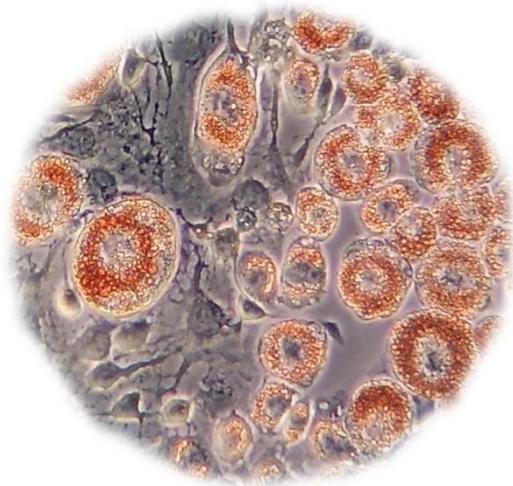
O domínio de ligação ao ligante (LBD) do PPAR $\gamma$  humano foi expresso em bactérias (*Echerichia coli*, cepa BL21) como uma proteína recombinante contendo cauda de polihistidina (His-LBD-PPAR $\gamma$ ), e purificado por cromatografia de afinidade por cobalto. A proteína recombinante foi incubada com rosiglitazona, com o extrato produzido pelo fungo II, com o extrato produzido pelo fungo VII ou com veículo (DMSO) em tampão PBS (0,01M, pH 7,4) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi incubada com água destilada ou solução de tripsina (100, 250 ou 350  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) durante 60 minutos, também à temperatura ambiente. A reação de digestão foi interrompida pela adição de tampão de amostra desnaturante (tampão Tris 100 mM, pH 6,8, contendo 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 4% de SDS, 4 mM de EDTA, 20% de glicerol e azul de bromofenol) e com aquecimento a 95°C durante 10 minutos. O padrão proteolítico do LBD da proteína foi então analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%, sob condições desnaturantes (Laemmli, 1970), seguido de coloração do gel pelo corante de proteínas azul de Comassie (*Comassie blue*) (Allan *et al.*, 1992).

### **8. Avaliação da inibição da atividade proteolítica da tripsina pelos extratos.**

Para avaliação da capacidade de inibição da atividade proteolítica da tripsina sobre a gelatina pelos extratos II e VII foi preparado um gel de poliacrilamida (12,5%) contendo 0,25% de gelatina. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de meio reacional com tripsina (200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e veículo (DMSO), extrato do fungo II (400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ou extrato do fungo VII (400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período de incubação, 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram adicionados a discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro que foram depositados sobre o gel e incubados por mais 60 minutos à temperatura ambiente. Os padrões proteolíticos foram determinados pela diferença de intensidade da coloração do gel por *Comassie blue*. Após a descoloração do gel, a intensidade das bandas foi medida com auxílio do programa Image J versão 1.46r (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, EUA) e expressas como taxa de inibição em relação à atividade da tripsina (Chiang *et al.*, 2012).

## 9. Ensaio de diferenciação de adipócitos

Para avaliar se os extratos produzidos pelos fungos II e VII eram capazes de promover a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 dependente de PPAR $\gamma$ , e se interferiam na diferenciação promovida pela ativação do PPAR $\gamma$  ou no acúmulo de lipídeos no interior das células após a diferenciação, fibroblastos embrionários de camundongos (NIH 3T3-L1) foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 50 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 50 U.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e incubados a 36°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o segundo dia de crescimento confluyente, as células foram induzidas à



**Figura 6. Gotículas de gordura formadas na diferenciação dos adipócitos.**

Imagem: Pedro Mesquita.

diferenciação por tratamento com DMEM suplementado com 10% de soro bovino neonatal, 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de insulina (Sigma, St Louis, EUA), 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma, St Louis, EUA) e 1 mM de dexametasona (Sigma, St Louis, EUA), por dois dias. Após este período, as células foram tratadas com DMEM suplementado com 10 % de soro bovino neonatal e com 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de insulina e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por mais 2 dias. Depois disso, as células foram

mantidas em cultivo com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e, após dois dias de incubação, as células foram coradas com Óleo Vermelho O como descrito por Janderová e colaboradores (2003), para observação da diferenciação. Veículo, 10<sup>-5</sup> M de rosiglitazona, extrato do fungo II ou extrato do fungo VII foram adicionados ao meio de cultura durante o período de indução da diferenciação para observação da interferência destes no processo de diferenciação das células.

### 9.1. Extração do RNA total das células.

Após o tratamento para a diferenciação dos adipócitos, o RNA total das células foi extraído por utilização do reagente TRIzol<sup>®</sup>, segundo protocolo do fabricante Invitrogen<sup>™</sup> (CA, EUA).

## 9.2. Avaliação quantitativa da expressão do gene que codifica FABP4 por RT-qPCR.

As amostras de RNA extraídas das culturas de adipócitos foram avaliadas para determinação quantitativa da expressão do gene que codifica a proteína *adipocyte fatty acid binding protein 4* (FABP4). Para o ensaio, a transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativo (RT-qPCR) foi realizada em um único passo utilizando o kit *Power SYBR<sup>®</sup> Green RNAt0-CT 1-Step* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O produto de amplificação de cada amostra foi determinado pelo sistema *SYBR<sup>®</sup> Green*, que utiliza fluoróforos que se intercalam na fita dupla de DNA e, ao serem excitados por luz, emitem fluorescência numa intensidade proporcional à quantidade do produto de amplificação. A fluorescência emitida é detectada e representada por meio do Ct (*cycle threshold* ou ciclo limiar), que corresponde ao número de ciclos de reação necessários para a amplificação tornar-se exponencial. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (MicroAmp Optical, Applied Biosystems) para um volume final de 10 µL e continham 0,08 µL de mix da enzima RT (125x), 5 µL de *Mix Power SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR* (2x), 0,2 µL (100 nM) de cada *primer* (aP2 - Direto: CCATCTAGGGTTATGCTCTCA e Reverso: ACACCGAGATTTCTTCAAACCTG; e 18S - Direto: CGGACAGGATTGAGAGATTG e Reverso: CAAATCGCTGCACCAACTAA) para obtenção de uma concentração inicial de 5 µM, e 1 a 5 ng de RNA das amostras. O volume foi completado com água livre de RNase e DNase. Uma reação sem amostra de RNA (controle negativo) foi feita para cada par de *primer*, para verificação de possíveis contaminações. As condições da reação foram as mesmas para todos os experimentos de RT-qPCR, 30 minutos a 48°C, para realização da reação de transcrição reversa; 10 minutos a 95°C, para ativação da enzima DNA polimerase; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, para desnaturação; 1 minuto a 60°C, para anelamento e extensão. Todos os experimentos de RT-qPCR foram realizados no equipamento *Applied Biosystems StepOnePlus<sup>TM</sup> Real-Time PCR Systems* e os dados obtidos foram analisados com o programa Software StepOne v2.1. A fim de se determinar o melhor método de quantificação relativa da expressão do gene que codifica o aP2 (FABP4), a análise de sua expressão foi precedida por um experimento de validação, necessário para demonstrar equivalência entre as eficiências de amplificação dos *primers* do gene alvo e do gene referência e para verificar a especificidade da reação de amplificação (Bustin *et al.*, 2009). A quantificação relativa da expressão do gene que codifica aP2 foi feita pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct$  representa a diferença entre  $\Delta Ct_{amostra}$  e  $\Delta Ct_{controle}$ , e  $\Delta Ct$  da amostra ou do controle expressam a diferença entre Ct do

gene que codifica a aP2 (FABP4) e o do gene de referência (18S) obtidos para as amostras. O teste estatístico aplicado foi a análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

### **9.3. Ensaio de *Western Blotting***

As células 3T3-L1 diferenciadas foram recolhidas das placas de cultura, ressuspendidas em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4, contendo 0,9% de NaCl (PBS) e centrifugadas a 760,1 x g por 5 min a 4°C. Os *pellets* foram homogeneizados em tampão de lise [tampão Tris 50 mM pH 7,5 com 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100 e um coquetel de inibidores de protease (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído 1:200] e lentamente agitados por uma hora a 4°C. A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay®). Para avaliar a expressão da proteína aP2 (FABP4), alíquotas com 12,5 µg de proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de PVDF em uma cuba semi seca (Bio-Rad, CA, EUA), incubadas com anticorpos apropriados e então imunodetectadas por quimioluminescência (kit ECL prime, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). A membrana foi incubada *overnight* a 4°C, com o anticorpo policlonal anti-aP2 (195657, Abcam, Cambridge, EUA) e o anticorpo policlonal anti-GAPDH (9483, Abcam, Cambridge, EUA) diluídos em água contendo 7% de leite em pó. As imunomarcações foram visualizadas por meio de anticorpo secundário conjugado à peroxidase *anti-goat IgG-horseradish peroxidase conjugate* (HRP) (sc-2354, Santa Cruz, CA, EUA), diluído 1:7000 em água contendo 7% de leite em pó. O marcador padrão utilizado foi o *BenchMark pre-stained protein Ladder* (Life Technologies, Grand Island, EUA) de acordo metodologia descrita por Burnette (1981). A quantificação das bandas foi realizada com o programa ImageJ versão 1.46r (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA) e expressas como unidades arbitrárias (UA/GAPDH).

## **10. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos.**

### **10.1. Avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica pelos extratos.**

Para avaliar a capacidade dos extratos em inibir a peroxidação lipídica foi utilizado o método modificado de Lingnert e colaboradores (1979). Resumidamente, o ácido linoleico emulsificado com Tween® 20 em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,0, 2 mL, foi adicionado de 100 µL da solução de extrato e a reação foi incubada por 8 horas a 37°C. Para

a leitura, 100 µL da emulsão foram solubilizados em 1 mL de metanol e 3 mL de solução de metanol a 60% e, após agitação, a absorção foi lida em espectrofotômetro a 234 nm.

### **10.2. Medida da atividade sequestradora do ânion radical superóxido pelos extratos usando o sistema xantina/xantina oxidase e determinação da habilidade do extrato em reduzir o substrato *nitro blue tetrazolium* (NBT).**

A atividade sequestradora do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pelos extratos e pela superóxido dismutase foi determinada pela razão de redução do NBT pelos ânions radicais superóxido (SOD), utilizando o sistema xantina/xantina oxidase como fonte do  $O_2^{\cdot-}$ . A reação foi monitorada por espectrofotometria a 560 nm durante 10 minutos, modificando o método descrito por Robak e Gryglewski (1988). Os resultados foram expressos em função da concentração de amostra [ $mg \cdot mL^{-1}$  para os extratos e unidades  $\cdot mL^{-1}$  ( $U \cdot mL^{-1}$ ) para a superóxido dismutase] capaz de reduzir em 50% a taxa de redução do NBT ( $IC_{50}$ ).

Como definição, uma unidade de superóxido dismutase é a quantidade de enzima capaz de reduzir em 50% a velocidade de redução do NBT utilizando o sistema xantina/xantina oxidase (pH 7,8 a 25°C) em 3 mL de meio reacional.

## **11. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos.**

Os extratos de acetato de etila secos foram diluídos em metanol e analisados utilizando o sistema de cromatografia líquida LaChrom Elite HPLC *system* (Hitachi, Tokyo, Japan) composto por uma bomba L2130, um injetor automático de amostras modelo L2200, acoplado a um forno de coluna modelo L2300, mantido a 25°C, e um detector DAD modelo L2455 (Hitachi, Tokyo, Japan). O detector foi ajustado para coletar dados na faixa de 254 nm e 354 nm, sendo extraído um cromatograma para cada comprimento de onda. A fase móvel foi constituída de solução de ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B), e o gradiente de eluição utilizado está apresentado na tabela 4. O fluxo de fase móvel foi 0,6  $mL \cdot min^{-1}$ . A coluna utilizada foi PurospherStar RP C18 e (150 x 4,6 mm, com partículas de 5 mm, Merck, Alemanha - Part. n°945681), acoplada a uma pré-coluna com as mesmas características (4 x 4 mm; com partículas de 5 mm, Merck, Alemanha). Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa EZChrom Elite *software* (versão 3.3.2 SP1 - Scientific Software. Inc.). Os picos obtidos pela eluição dos extratos foram comparados com os dados dos seguintes padrões obtidos comercialmente: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido

ferúlico, catequina hidratada, epicatequina, kaempferol, hesperidina, hesperitina, ácido rosmarínico, isoquercitrina, miricetina, rutina, kaempferol e quercetina, armazenados na biblioteca do programa.

**Tabela 4. Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise por CLAE.**

Tempo (min)	Bomba A	Bomba B
0	90%	10%
40	70%	30%
50	50%	50%
55	90%	10%

## RESULTADOS

### 1. Obtenção dos extratos.

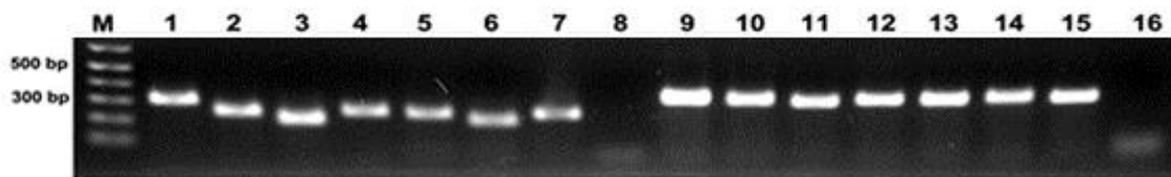
Nove fungos endofíticos isolados das folhas de *Bauhinia variegata* foram submetidos ao processo fermentativo para obtenção dos extratos. Porém, dois fungos foram perdidos por dificuldade de seus cultivos e descartados dos ensaios. Os micélios produzidos foram filtrados e suas massas úmidas determinadas (tabela 5). Os fluidos das culturas foram submetidos à partição líquido-líquido com acetato de etila e os extratos, após evaporação do solvente extrator, foram pesados. O rendimento com relação ao volume de meio extraído e massa micelial produzida estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5. Rendimento dos extratos dos fluidos de cultura.**

Fungo	Massa micelial - massa úmida (mg)	Extrato de acetato de etila - extraído do fluido de cultura (mg)	Rendimento do extrato com relação ao volume de meio fermentativo extraído (% , m/v)	Rendimento do extrato com relação à massa micelial úmida produzida (% , m/m)
I	84,83	182,7	0,02	0,002
II	30,67	240,3	0,02	0,008
III	40,96	143,5	0,01	0,004
V	24,30	548,6	0,05	0,023
VII	21,31	248	0,02	0,012
VIII	82,50	434,2	0,04	0,005
IX	24,66	1.031,2	0,10	0,042

### 2. Identificação molecular dos fungos.

Para a identificação molecular, regiões conservadas do gene do RNA ribossômico (ITS - *Internal transcribed spacer*) do DNA genômico dos fungos foram amplificadas. A Figura 7 mostra a análise dos produtos de PCR das regiões ITS1 (*primers* ITS1 e ITS2) com fragmentos por volta de 400 pares de bases e dos produtos de PCR da região ITS2 (*primers* ITS3 e ITS4) com fragmentos entre de 200 e 350 pares de bases dos fungos I, II, III, V, VII, VIII e IX. Nas linhas 8 e 16 foi aplicado um controle negativo, obtido pelo ensaio de PCR realizado na ausência de DNA para amplificação, mostrando assim, que a PCR ocorreu especificamente.



**Figura 7. Eletroforese em gel de agarose das amostras dos produtos de PCR das regiões ITS1 e ITS2 dos fungos.**

Gel de agarose a 1% com os produtos de amplificação de reação em cadeia da polimerase (PCR) de parte do gene do RNA ribossômico dos fungos na ausência de DNA (linhas 8 e 16) e na presença de DNA utilizando os *primers* ITS1/ITS2 (linhas 1 a 7) e ITS3/ITS4 (linhas 9 a 15). O marcador (M) utilizado foi o 1 *Kb plus DNA ladder* (100 pb a 12 Kb).

Os produtos de amplificação da reação em cadeia de polimerase (Figura 7) foram sequenciados e comparados com dados de seqüências de espécies descritas no GenBank (*National Institute of Health*). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

**Tabela 6. Cepas de fungos endofíticos isolados da *Bauhinia variegata*.**

Fungo	Primer	Cobertura de consulta	Identidade Máxima	E-Value	Espécie
I	ITS1 e 2	49%	99%	$9 \times 10^{-139}$	<i>Guignardia mangiferae</i>
II	ITS1 e 2	96%	99%	$1 \times 10^{-99}$	<i>Phomopsis sp.</i>
III	ITS1 e 2	98%	99%	$3 \times 10^{-85}$	<i>Phoma sp.</i>
V	ITS1 e 2	89%	100%	$8 \times 10^{-112}$	<i>Glomerella acutata</i>
VII	ITS1 e 2	95%	99%	$2 \times 10^{-102}$	<i>Phomopsis sp.</i>
VIII	ITS1 e 2	98%	99%	$1 \times 10^{-157}$	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
IX	ITS1 e 2	48%	98%	$4 \times 10^{-104}$	<i>Phomopsis sp.</i>

O alinhamento realizado no GenBank utilizando a ferramenta de Blast avançado mostrou identidade acima de 98% em todas as análises realizadas. O *e-value* (*expected value*) é a probabilidade de um alinhamento ocorrer ao acaso e é calculado com base na qualidade do alinhamento realizado. Quanto menor o *e-value*, maior é a qualidade do alinhamento realizado.

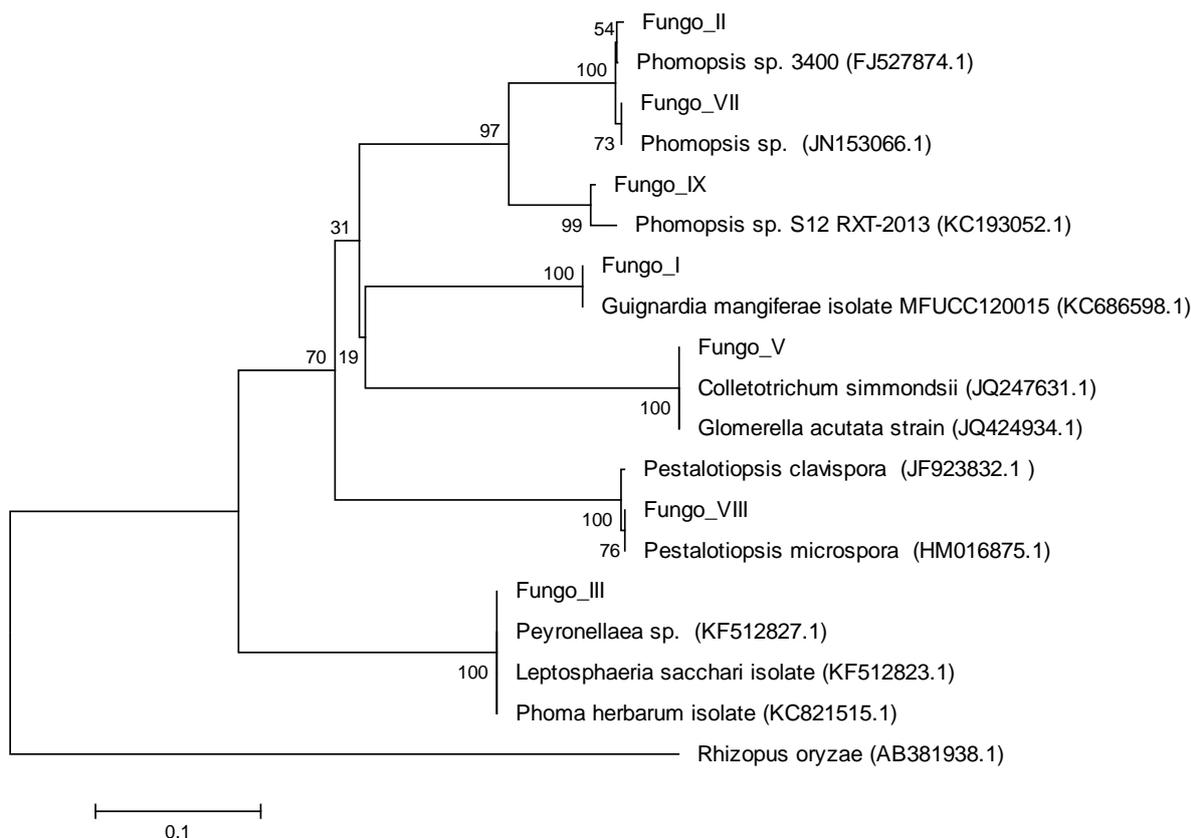
Como pode ser observado pelos resultados mostrados na tabela 6 os fungos II, VII e IX pertencem ao mesmo gênero, a *Phomopsis sp.*, mas as cepas foram mantidas separadamente por possuírem distintas características morfológicas (Mesquita, 2011) e perfis cromatográficos de seus metabólitos, como mostram as Figura 24 e Figura 27. O fungo I mostrou identidade máxima de 99% com *Guignardia mangiferae* no alinhamento realizado. O

fungo V, com identidade de 100% foi caracterizado como *Glomerela acutata*. O fungo III obteve maior identidade com os fungos da família *Phoma sp.*, com identidade máxima de 99%. O fungo VIII possui identidade máxima de 99% com *Pestalotiopsis microspora*.

## 2.1 Árvore filogenética

O dendograma (árvore filogenética) na Figura 8 mostra a similaridade das sequências obtidas para os fungos com as depositadas no GenBank. As sequências que mostraram maior similaridade após a aplicação da ferramenta de análise *Blast* foram submetidas ao alinhamento múltiplo no *Clustal X* e a árvore filogenética foi construída baseada na análise *neighbor joining* com 1.000 réplicas de *bootstrap*, utilizando o programa MEGA 5.0. O valor mostrado em cada ramificação é dado em porcentagem e se refere ao resultado do *bootstrap*. Esses valores são considerados confiáveis quando acima de 70%. Isso quer dizer que das 1.000 vezes em que as sequências foram rearranjadas e comparadas aleatoriamente com a formação de novas árvores, 700 apresentaram o mesmo resultado. Para o enraizamento da árvore o fungo *Rhizopus oryzae* foi utilizado.

Os fungos II, VII e IX apresentaram menor distância genética em relação à classificação de gênero, sendo suas sequências semelhantes às cepas dos fungos do gênero *Phomopsis sp.*. O fungo V foi classificado como *Glomerela acutata*, que é o telemorfo (forma sexuada) da espécie *Coletotrichum acutatum* e, por essa razão, aparecem no mesmo galho na análise filogenética, mostrando grande similaridade. O Fungo III mostrou grande semelhança com fungos da família *Phoma sp.* ou *Leptosphaeria sp.*, uma vez que, pela análise, foi colocado no mesmo galho filogenético que *Peyronellaea sp.*, *Phoma herbarium* e *Leptosphaeria sacchari*. O fungo I apresentou grande similaridade à espécie *Guignardia mangiferae*. O fungo VIII, por sua vez, apresentou maior similaridade com o fungo *Pestalotiopsis microspora*. Os códigos em parêntese fazem referência aos depósitos dos fungos identificados e utilizados na análise no GenBank.



### Figura 8. Árvore filogenética.

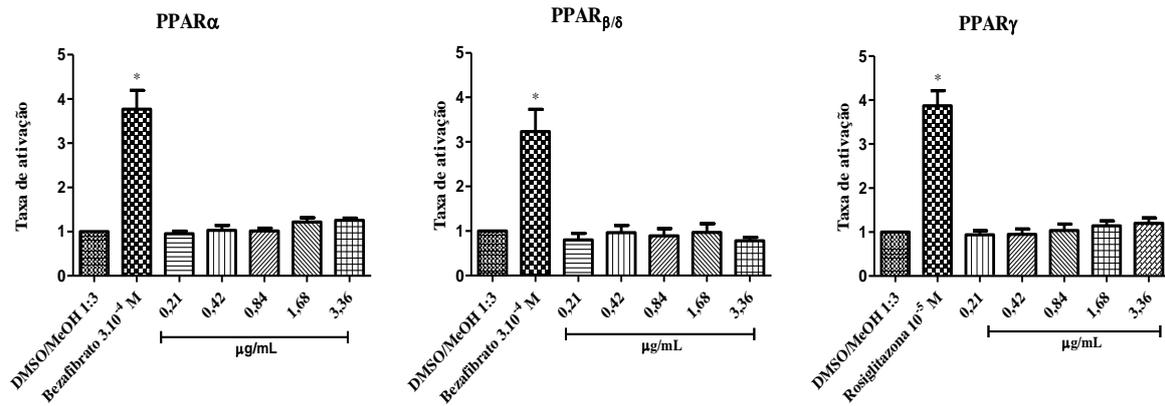
Dendrograma obtido pela análise de *neighbor joining* da região ITS1-5,8S do rDNA, utilizando o método com base em 1.000 réplicas de *bootstrap*. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap* (Tamura, Peterson *et al.*, 2011). A escala mostra a distância genética com o número de substituições de nucleotídeos por sítio (razão do número de substituições pelo comprimento da sequência).

### 3. Avaliação da atividade agonista dos metabólitos dos fungos em PPAR $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ – ensaio de gene repórter.

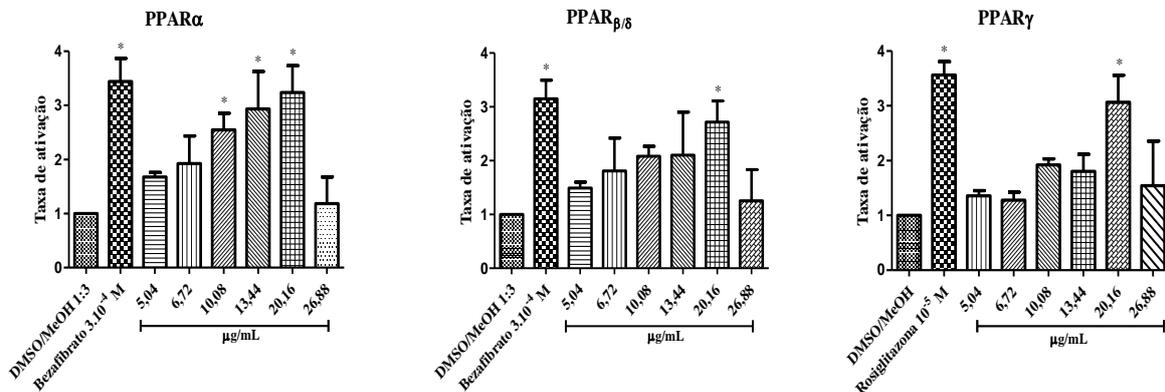
Os extratos de cultura foram submetidos à avaliação de sua capacidade agonista dos receptores do tipo PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  pelo emprego do ensaio de gene repórter. Os resultados obtidos estão apresentados da Figura 9 à Figura 12.

Pode-se observar que o extrato do fungo II foi capaz de ativar todas as isoformas de PPAR e essa ativação foi semelhante aos controles positivos na concentração de 20,16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 9B). O extrato dos metabólitos produzidos pelo fungo VII também apresentou atividade agonista, mas somente sobre os receptores PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta$  (Figura 11A).

A



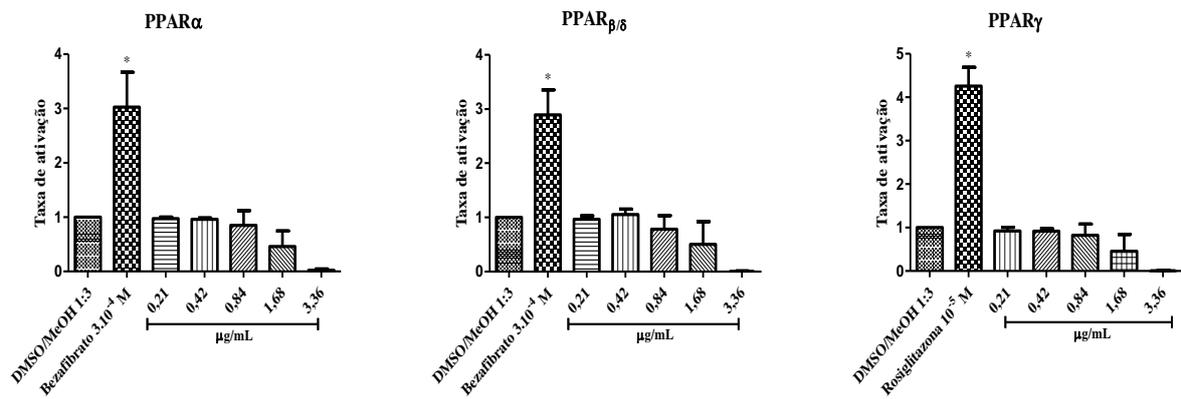
B



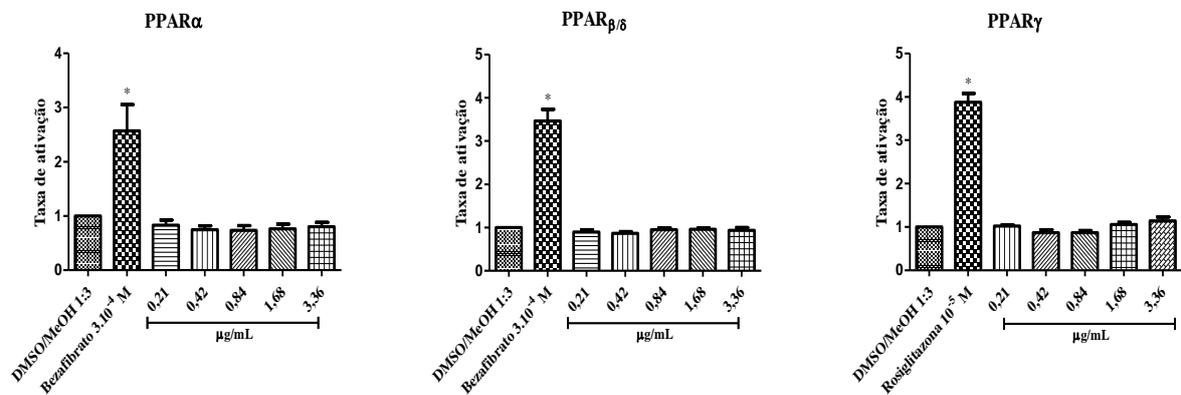
**Figura 9. Avaliação da atividade agonista dos extratos de cultura dos fungos I e II sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa, beta e gama (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com os vetores de expressão para PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  e o plasmídeo contendo o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 1:3), bezafibrato  $3.10^{-4}$  M para o PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  e rosiglitazona  $10^{-5}$  para o PPAR $\gamma$  (controles positivos) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila dos fluidos da cultura resultante do processo fermentativo dos fungos I (A) e II (B). Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da média da taxa de ativação do PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , \*, significativamente diferente,  $p < 0,01$  versus veículo.

A



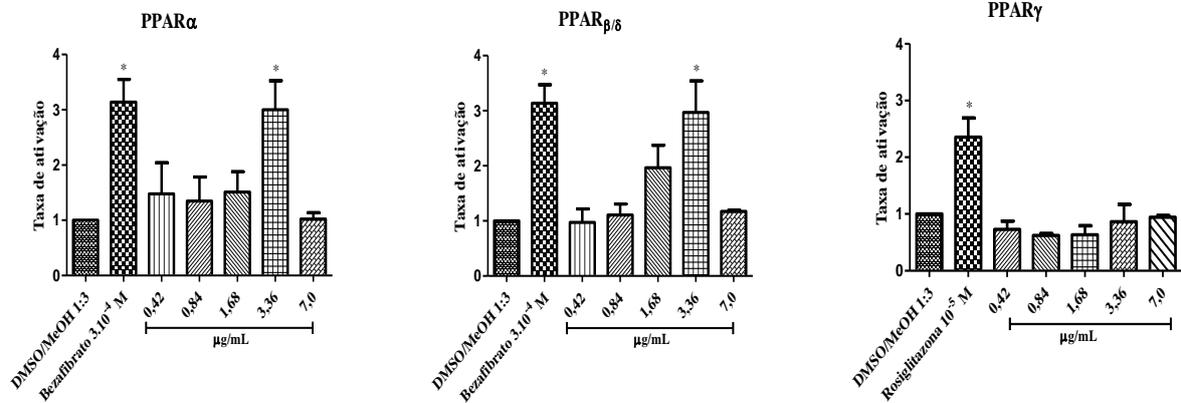
B



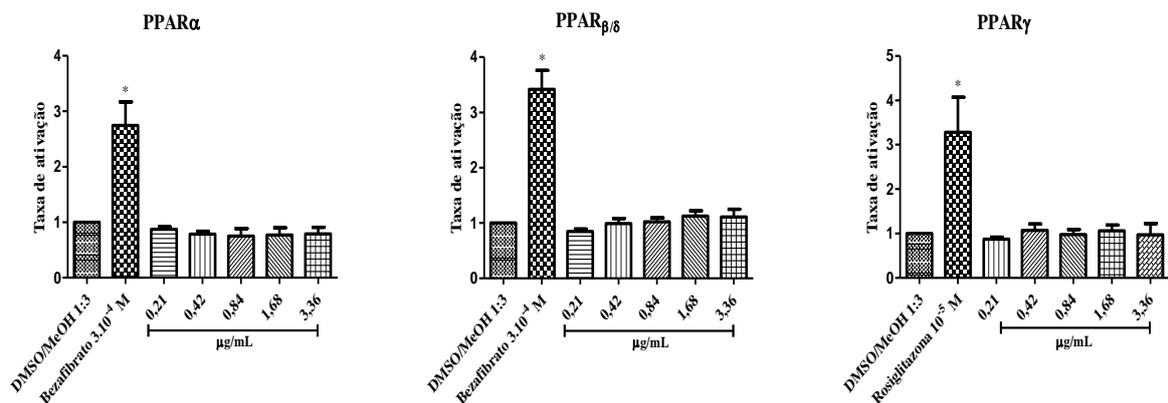
**Figura 10. Avaliação da atividade agonista dos extratos de cultura dos fungos III e V sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa, beta e gama (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com os vetores de expressão para PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  e o plasmídeo contendo o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 1:3), bezafibrato  $3.10^{-4}$  M para o PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  e rosiglitazona  $10^{-5}$  para o PPAR $\gamma$  (controles positivos) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila dos fluidos da cultura resultante do processo fermentativo dos fungos III (A) e V (B). Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da média da taxa de ativação do PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , \*, significativamente diferente,  $p < 0,01$  versus veículo.

A

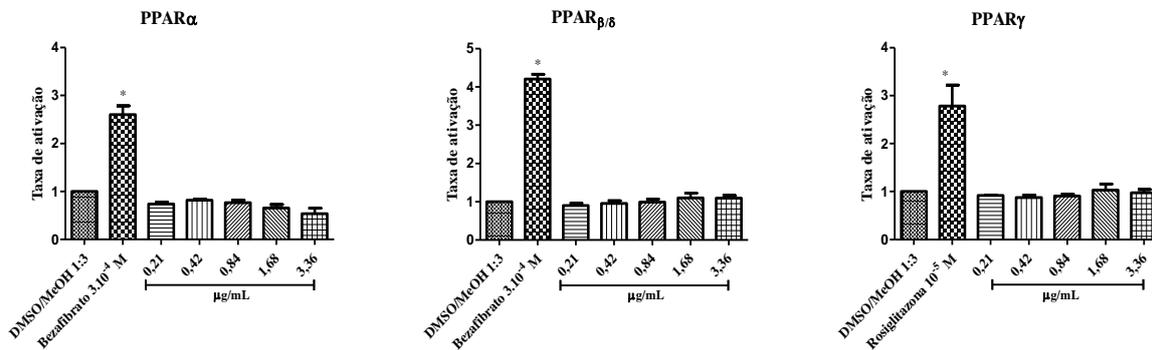


B



**Figura 11. Avaliação da atividade agonista dos extratos de cultura do fungos VII e VIII sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa, beta e gama (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com os vetores de expressão para PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  e o plasmídeo contendo o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 1:3), bezafibrato  $3.10^{-4}$  M para o PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  e rosiglitazona  $10^{-5}$  para o PPAR $\gamma$  (controles positivos) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila dos fluidos da cultura resultante do processo fermentativo dos fungos VII (A) e VIII (B). Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da média da taxa de ativação do PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , \*, significativamente diferente,  $p < 0,01$  versus veículo.

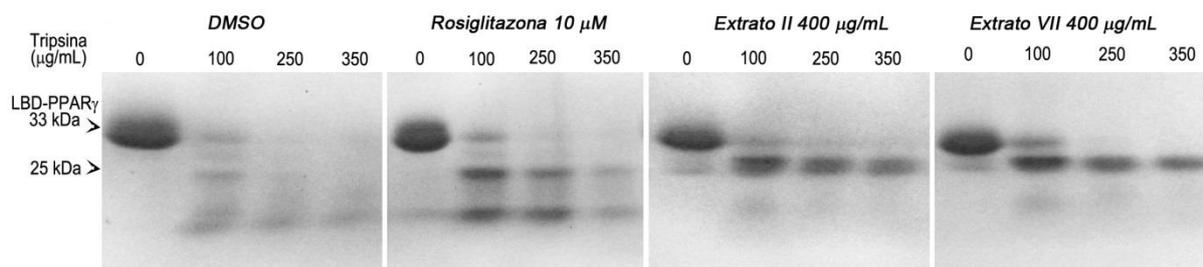


**Figura 12. Avaliação da atividade agonista dos extratos de cultura do fungo IX sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa, beta e gama (PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com os vetores de expressão para PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  e o plasmídeo contendo o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 1:3), bezafibrato  $3.10^{-4}$  M para o PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$  e rosiglitazona  $10^{-5}$  para o PPAR $\gamma$  (controles positivos) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila dos fluidos da cultura resultante do processo fermentativo do fungos IX. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da média da taxa de ativação do PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , \*, significativamente diferente,  $p < 0,01$  versus veículo.

#### 4. Ensaio de proteção contra digestão por protease

A ligação de agonistas ao LBD de receptores nucleares (RN) determina alterações conformacionais críticas para a ativação transcricional por esses receptores (Allan, Leng *et al.*, 1992). Essas alterações se refletem em modificação da acessibilidade de sítios proteolíticos na superfície do receptor e, com isso, em aumento da resistência do LBD do receptor à digestão por proteases. Assim, o ensaio de proteção contra digestão por proteases é um dos instrumentos utilizados para estudar alterações conformacionais do PPAR $\gamma$  na presença de ligantes. Pelos resultados obtidos, apresentados na Figura 13, é possível observar que houve proteção maior contra a digestão exercida pela tripsina tanto para as amostras tratadas com o extrato do fungo II quanto para as tratadas com extrato do fungo VII, quando comparadas ao tratamento com rosiglitazona, inclusive para a dose de tripsina de  $350 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

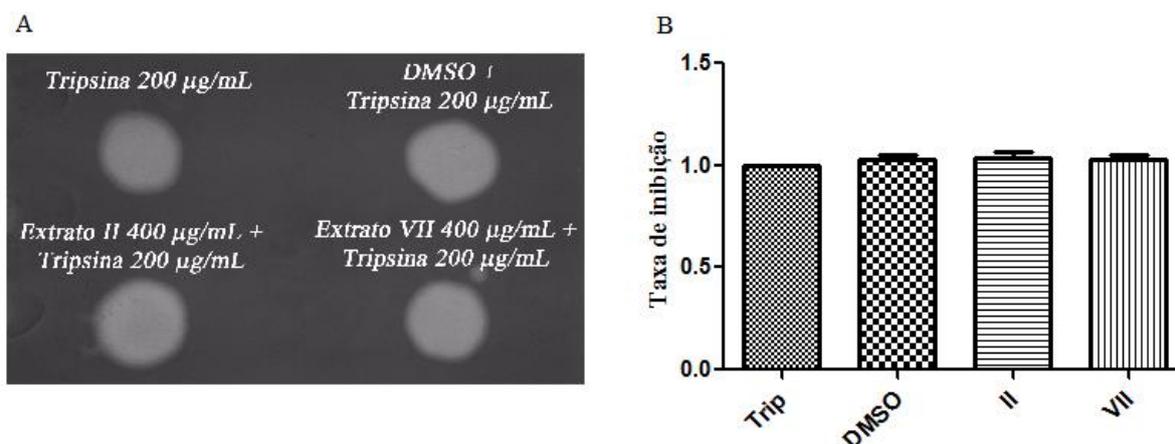


**Figura 13. Padrão de proteólise do LBD do PPAR $\gamma$  pela tripsina após tratamento com diferentes ligantes.**

A atividade da tripsina sobre o LBD do PPAR $\gamma$  foi avaliada pelo uso da proteína recombinante his-LBD-hPPAR $\gamma$ , que foi incubada com veículo (DMSO), rosiglitazona 10  $\mu$ M, extrato do fungo II ou extrato do fungo VII e, em seguida, com tripsina (0, 100, 250 e 350  $\mu$ g.mL $^{-1}$ ) durante 60 minutos. Os padrões proteolíticos do LBD do PPAR $\gamma$  foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes seguida de coloração do gel com *Comassie blue*. 0: ausência de tripsina; 100, 250 e 350  $\mu$ g.mL $^{-1}$  de tripsina.

### 5. Avaliação da inibição da atividade proteolítica da tripsina pelos extratos dos fungos II e VII.

Para avaliar se havia interferência do extrato sobre a atividade proteolítica da tripsina, 10  $\mu$ L do extrato do fungo II ou do fungo VII foram incubados com 10  $\mu$ L de tripsina (200  $\mu$ g.mL $^{-1}$ ) em 80  $\mu$ L de tampão PBS (0,01M, pH 7,4) por 1 h em temperatura ambiente (Figura 14). Como controle negativo, a tripsina foi incubada somente com DMSO. Após o período de incubação, 20  $\mu$ L de cada amostra foram embebidas em discos de papel de filtro, que foram colocados sobre um gel de poliacrilamida contendo 10% de gelatina e os géis foram incubados por 1 h em temperatura ambiente. Após este período, os discos foram retirados e o gel foi corado com *Comassie blue*. Os resultados sugerem que os extratos do fungo II (400  $\mu$ g.mL $^{-1}$ ) ou do fungo VII (400  $\mu$ g.mL $^{-1}$ ) não interferem na atividade proteolítica da tripsina sobre a gelatina.

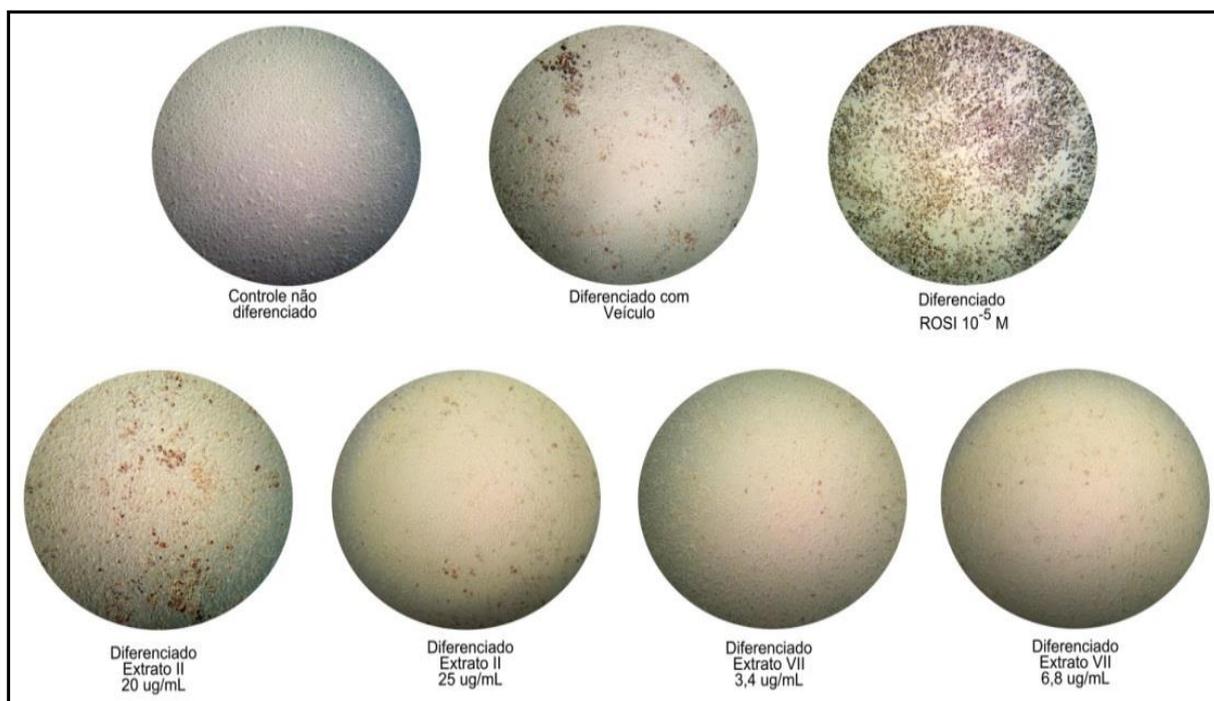


**Figura 14. Padrão de digestão da gelatina pela tripsina após incubação da enzima com os extratos dos fungos.**

(A) A atividade proteolítica da tripsina sobre a gelatina foi avaliada após incubação da enzima com veículo (DMSO) ou com os extratos do fungo II ( $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ou do fungo VII ( $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Gel de poliacrilamida com gelatina 0,25% foi deixado em contato com discos de papel de filtro embebidos com  $20 \mu\text{L}$  de solução de tripsina ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por 1h. Os padrões proteolíticos foram analisados por coloração do gel com *Comassie blue*. As áreas claras mostram a gelatina degradada. (B) Quantificação da taxa de inibição do veículo e dos extratos II e VII. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da média. O teste estatístico aplicado foi a análise de variância (*one-way ANOVA*) seguida de teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, sem diferença estatística significativa.

## 6. Ensaio de diferenciação de adipócitos

Como pode ser observado na Figura 15, os fibroblastos embrionários de camundongos (NIH 3T3L1) mostraram diferentes padrões de coloração com óleo vermelho O após a diferenciação. As células tratadas com rosiglitazona ( $10^{-5}$  M) foram as que mais apresentaram acúmulo de lipídeos. O extrato do fungo II, na concentração de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , também apresentou estímulo sobre a diferenciação dessas células, em grau um pouco maior que o apresentado pelo veículo e menor que o induzido pela rosiglitazona. Na concentração de  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  não houve alteração significativa na coloração das células com relação ao controle. O extrato do fungo VII não promoveu a diferenciação das células quando comparado ao veículo.

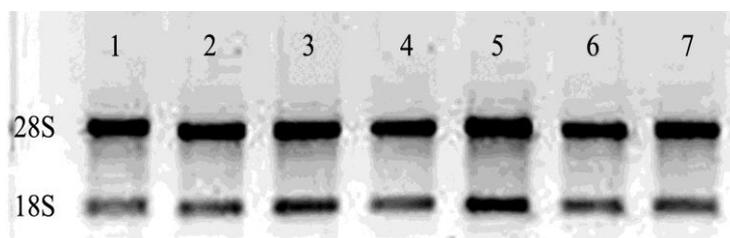


**Figura 15. Efeito dos extratos sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1 de camundongo.**

Acúmulo de lipídeo nos adipócitos corados com óleo vermelho O (aumento de 40x) após indução da adipogênese nas células NIH 3T3-L1 tratadas com veículo, rosiglitazona ou extratos dos fungos II ou VII, n=3.

### 6.1 Extração e avaliação do RNA total das células

A integridade do RNA total extraído das células foi avaliada, uma vez que isso pode interferir na expressão gênica durante a análise por PCR em tempo real. O gel de eletroforese (Figura 16) mostra as duas subunidades (28S e 18S) do RNA total extraído das culturas de um dos ensaios realizados (n=4).



**Figura 16. Eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade do RNA total extraído das amostras de células 3T3-L1 tratadas durante o ensaio de diferenciação celular.**

Visualização das bandas referentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossômico em eletroforese em gel de agarose a 1%. Para o ensaio 1 µg das amostras de RNA total extraídos das células tratadas foi aplicado em gel de agarose a 1% e a eletroforese foi conduzida em 100V por 30 minutos. Linha 1: células 3T3-L1 (pré-adipócitos) não diferenciadas; linha 2: células 3T3-L1 tratadas com veículo; linha 3: células 3T3-L1 tratadas com rosiglitazona a  $10^{-5}$  M; linhas 4 e 5: células 3T3-L1 tratadas com extratos do fungo II nas concentrações de 20 e 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente; Linhas 6 e 7: células 3T3-L1 tratadas com extrato do fungo VII nas concentrações de 3,4 e 6,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Sem presença de bandas maiores que a subunidade 28S.

A Tabela 7 mostra o grau de pureza de todas as amostras utilizadas no ensaio, determinado em espectrofotômetro por leitura das densidades ópticas nos comprimentos de 260 e 280 nm. A razão entre as absorvâncias das amostras nos comprimentos de 260 nm e 280 nm estava dentro do intervalo de 1,7 a 2,2, indicando bom grau de pureza.

**Tabela 7. Determinação da pureza do RNA total.**

Amostras	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>			
ND	1,75	1,82	1,75	1,78
DMSO	1,88	1,86	1,91	1,92
Rosiglitazona	1,85	1,77	1,91	1,94
II (20 µg.mL <sup>-1</sup> )	1,87	1,85	1,94	1,90
II (25 µg.mL <sup>-1</sup> )	1,71	1,84	1,87	1,73
VII (3,4 µg.mL <sup>-1</sup> )	1,73	1,80	1,82	1,85
VII (6,8 µg.mL <sup>-1</sup> )	1,89	1,85	1,83	1,87

Legenda: ND, não diferenciado; II, extrato produzido pelo fungo II; VII, extrato produzido pelo fungo VII.

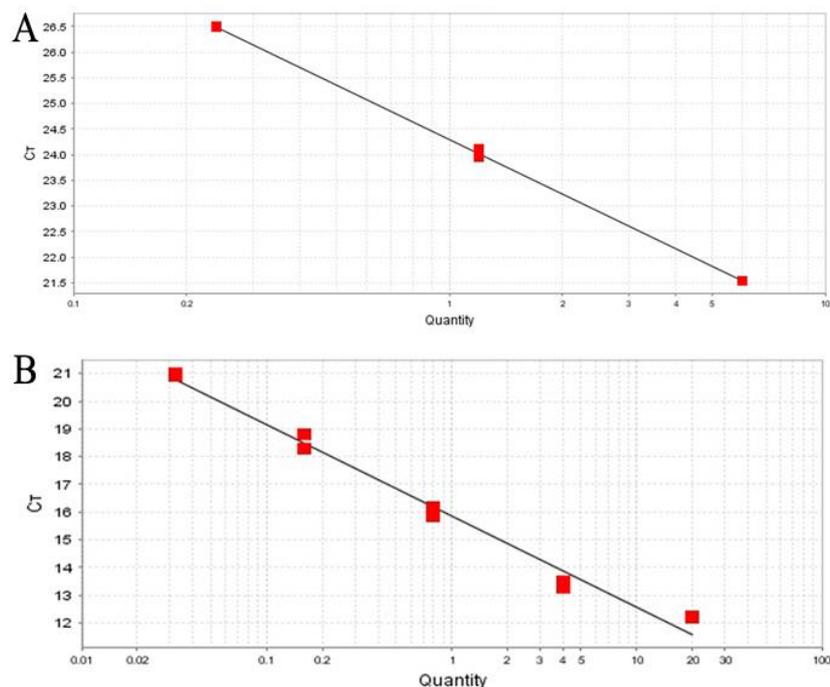
## 6.2 Avaliação da expressão gênica relativa da *adipocyte protein 2* (aP2 ou FABP4) por PCR quantitativo.

O PCR quantitativo permite a avaliação da expressão gênica em tempo real tornando possível a quantificação dessa expressão frente a diferentes tratamentos.

Para testar a eficiência dos *primers* usados, foi feita uma curva padrão por diluição seriada do RNA extraído da cultura de adipócitos. O *primer* do gene de referência usado foi o 18S. Os valores obtidos da inclinação angular da reta (x), do ponto de intersecção no eixo y (b), do coeficiente de correlação linear e da eficiência do gene em estudo e do gene de referência estão apresentados na Tabela 8. Os *primers* foram considerados eficientes, uma vez que a eficiência ficou entre 90 e 110%, o que corresponde a um valor de x entre -3,58 e -3,10.

**Tabela 8. Parâmetros de validação obtidos no teste de eficiência do *primer* da aP2.**

Parâmetros analisados ( $y = ax + b$ )	Genes	
	aP2	18S
Inclinação da reta (x)	-3,543	-3,297
<i>Y-intercept</i> (b)	24,298	15,852
Coefficiente de correlação linear (r)	0,999	0,992
Eficiência (%)	91,538	101,055

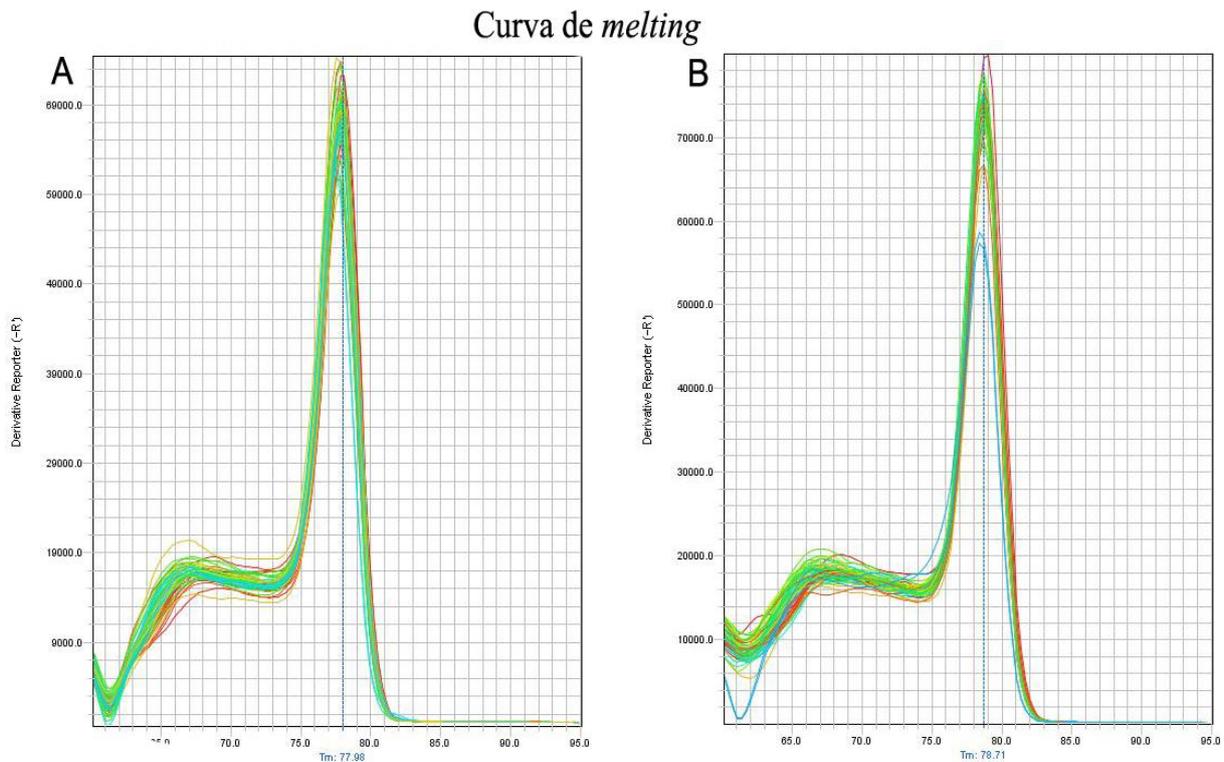


**Figura 17. Curva padrão do gene FABP4 (aP2) e do Gene 18S do rRNA.**

Curva padrão do gene FABP4 (A) e do gene 18S do RNA ribossômico, construídas a partir da diluição seriada de um *pool* de RNAt de pré-adipócito de camundongo 3T3-L1.

O fluoróforo presente no sistema *SYBR*<sup>®</sup> *Green* se liga a qualquer dupla fita de DNA. Assim, pode haver comprometimento da quantificação na presença de amplificação inespecífica. Por isso, para avaliar a especificidade de cada *primer*, ao final da reação foi produzida uma curva de dissociação dos produtos de amplificação (Figura 18). Neste procedimento a temperatura é aumentada fazendo com que a dupla fita de DNA dos produtos amplificados dissocie-se diminuindo a fluorescência. A partir da curva produzida é possível calcular a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) onde 50% dos produtos estão dissociados. Essa informação é importante para avaliar a especificidade porque cada produto apresenta uma  $T_m$

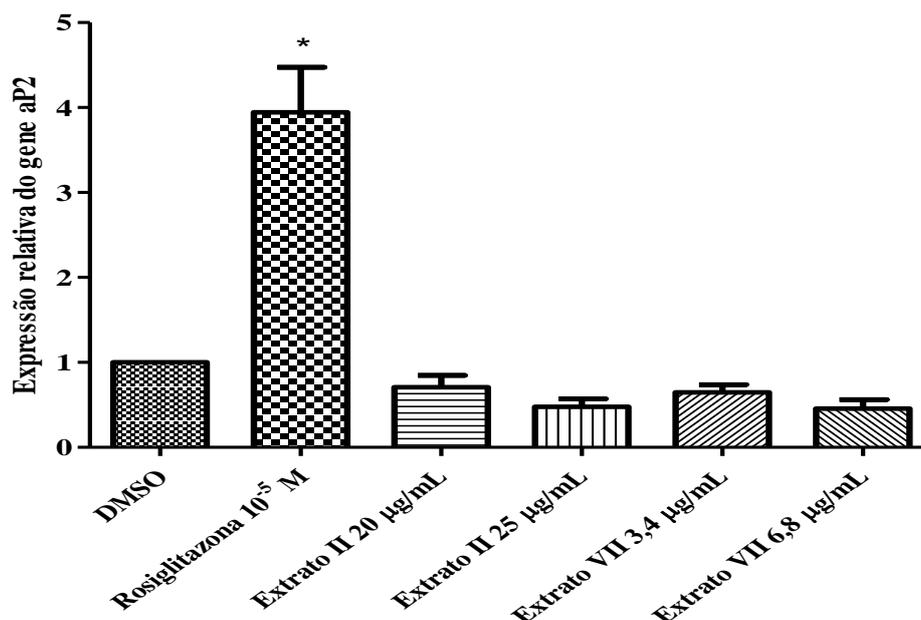
própria. Assim, as curvas de todas as amostras amplificadas possuem um pico único quando a amplificação é específica, o que pode ser observado na Figura 18.



**Figura 18. Curva de *melting* utilizada para verificação da especificidade dos *primers*.**

No fim da reação em cadeia a temperatura é aumentada até 95°C com o objetivo de determinar a temperatura em que 50% dos produtos de PCR estão dissociados (Tm). A) FABP4 (aP2); B) rRNA 18S.

As células 3T3-L1 foram diferenciadas por 8 dias com meio completo e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona ( $10^{-5}$  M), extrato do fungo II (20 ou 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ou extrato do fungo VII (3,4 ou 7,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante a diferenciação. A diferença da expressão gênica da proteína ap2 (FABP4) não foi significativa entre o veículo (DMSO) e os extratos dos fungos. Só houve diferença significativa entre a expressão da proteína nas células tratadas com rosiglitazona e os demais tratamentos (Figura 19).

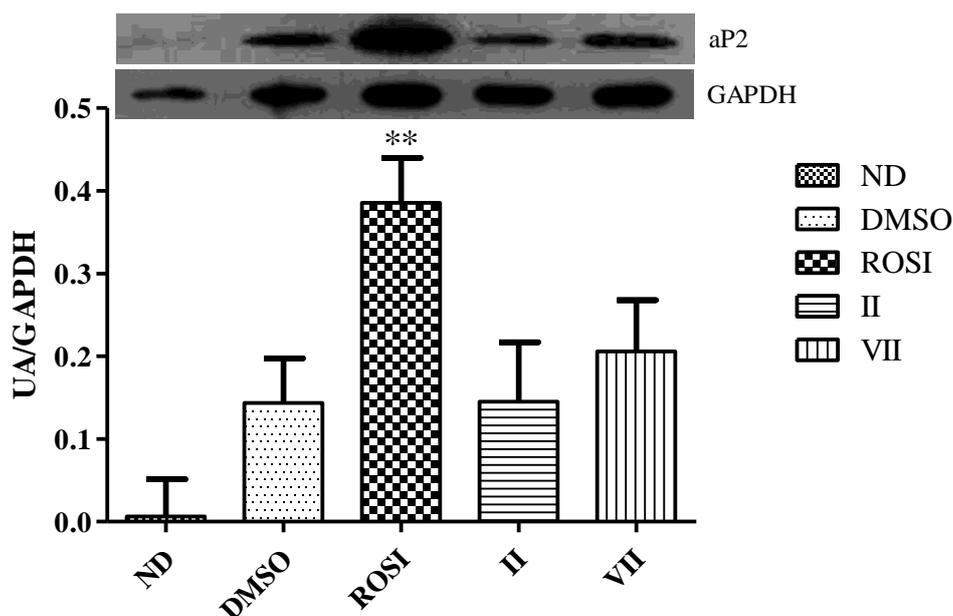


**Figura 19. Expressão do RNA mensageiro de aP2 (FABP4) após diferenciação de células 3T3-L1 submetidas a diferentes tratamentos.**

Células 3T3-L1 foram diferenciadas por 8 dias com meio completo em placas de 6 poços e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona ( $10^{-5}$  M), extrato do fungo II ou extrato do fungo VII durante a diferenciação. O RNA total dos grupos experimentais foi obtido e a expressão do gene que codifica o aP2 foi analisada por meio de RT-qPCR. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do nível de expressão de aP2 em relação aos diferentes tratamentos de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. O teste estatístico aplicado foi a análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. \*, significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) do veículo (DMSO) para o  $\Delta\text{CT}$  e os resultados mostrados como  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ .

### 6.3 Western Blotting

Para avaliar a influência dos extratos produzidos pelos fungos II e VII sobre a expressão de aP2 nas células 3T3-L1 diferenciadas, a proteína total das células foi extraída, quantificada e analisada por ensaio de *Western Blotting* (Figura 20). As concentrações de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato do fungo II e  $3,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato do fungo VII foram escolhidas para avaliação da expressão da proteína aP2 porque foram as que apresentaram maior ativação sobre a isoforma  $\gamma$  do PPAR no ensaio de gene repórter (Figura 9B) e em trabalho anterior (Mesquita, 2011).



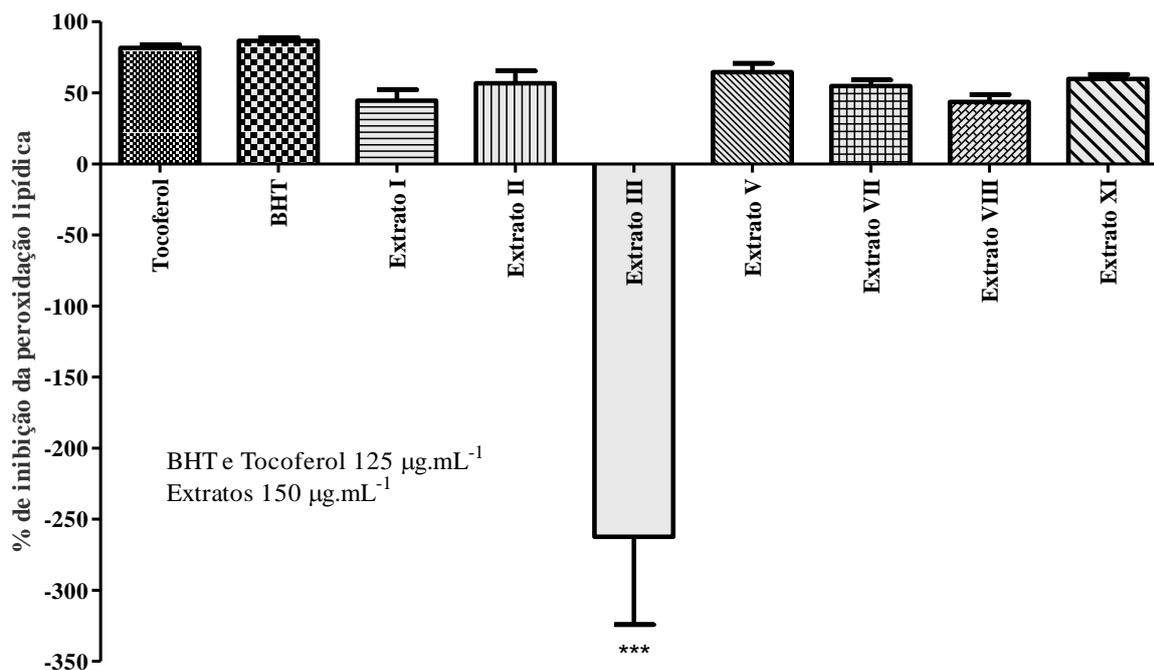
**Figura 20. Avaliação da expressão proteica do marcador adipogênico aP2 (FABP4) .**

Células 3T3-L1 foram diferenciadas e tratadas com veiculo (DMSO:MeOH, 1:3), rosiglitazona  $10^{-5}$  M e extrato acetato de etila dos fluidos da cultura resultante do processo fermentativo do fungo II ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e do fungo VII ( $3,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ou não diferenciadas (ND). Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da média de unidades arbitrárias normalizadas pela proteína GAPDH ( $n=3$ ). O teste estatístico aplicado foi a análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida de teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. \*\*, significativamente diferente ( $p < 0,01$ ) do veiculo (DMSO).

## 7. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos.

### 7.1. Ensaio de inibição da peroxidação lipídica.

O ácido linoleico é um ácido graxo poliinsaturado necessário para a produção do ácido araquidônico. Este está presente no fosfolipídio da membrana celular e está envolvido na sinalização como segundo mensageiro lipídico. Ambos os lipídeos são ligantes de PPAR (Forman *et al.*, 1997). Para avaliar a influência dos extratos dos fungos endofíticos sobre a peroxidação lipídica, uma emulsão de ácido linoleico (5 mM) e polissorbato 20 (Tween<sup>®</sup> 20) em tampão fosfato salino (0,1 M e pH 7,0) foi incubada por 8 horas a 37°C na presença ou ausência dos extratos e dos controles positivos tocoferol e BHT. Dessa maneira, o ácido linoleico sofre auto-oxidação e seu produto, o dieno conjugado, pode ser medido por espectrofotometria na absorvância de 234 nm. Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na Figura 21.



**Figura 21. Avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica pelos extratos dos fungos.**

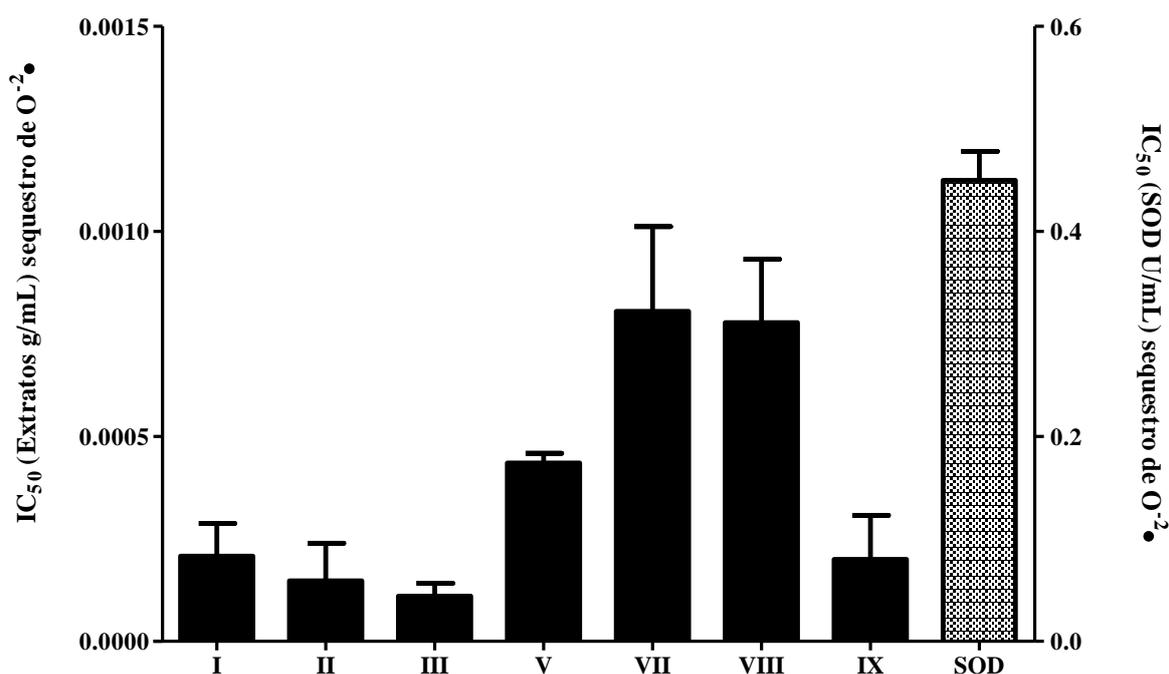
A emulsão de ácido linoleico com polissorbato 20 foi exposta ao ar a 37°C por 8 horas para que ocorresse o processo de oxidação (peroxidação lipídica), na presença e na ausência dos extratos (150 µg.mL<sup>-1</sup>) e de padrões com atividade antioxidante conhecida [tocoferol (125 µg.mL<sup>-1</sup>) e BHT (125 µg.mL<sup>-1</sup>)]. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do processo de peroxidação lipídica, como média ± desvio padrão de três ensaios distintos. O teste estatístico aplicado foi a análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida de teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, \*\*\*, significativamente diferente,  $p < 0,0001$  vs. todos compostos.

Com exceção do extrato III, todos os extratos apresentaram capacidade de inibir a peroxidação lipídica. O extrato que apresentou menor atividade foi o do fungo I, com 38% de inibição da peroxidação lipídica, e o que apresentou maior atividade foi o extrato do fungo V, com 56,1% de inibição do processo de oxidação. O BHT e o tocoferol foram utilizados como controles positivos e apresentaram atividade de 89,9% e 66,6% de inibição da peroxidação lipídica, respectivamente. Os extratos dos fungos II, VII, VIII e IX, apresentaram inibição de 48,8%, 54,6%, 45,9%, 53,2%, respectivamente. Os resultados sugerem ainda que o extrato do fungo III teve uma ação pró-oxidativa, pois aumentou a peroxidação lipídica em mais de duas vezes e meia (-262,4%).

## 7.2. Sequestro do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).

A capacidade de sequestro de  $O_2^{\cdot-}$  pelos extratos foi avaliada por emprego do sistema xantina/xantina oxidase (Robak e Gryglewski, 1988) como gerador do ânion radical superóxido. Nesse ensaio o radical  $O_2^{\cdot-}$  produzido por esse sistema reduz o NBT a formazan, o que pode ser mensurado por espectrofotometria a 560 nm. Os agentes antioxidantes capazes de sequestrar o  $O_2^{\cdot-}$  inibem esse processo e, assim, a produção do formazan.

Todos os extratos testados foram capazes de sequestrar o radical  $O_2^{\cdot-}$  (Figura 22). Os extratos dos fungos VII ( $IC_{50}$  de  $0,80 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), VIII ( $IC_{50}$  de  $0,147 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e V ( $IC_{50}$  de  $0,083 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram os que apresentaram menor capacidade em sequestrar o radical superóxido. Os extratos I ( $IC_{50}$  de  $0,208 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e IX ( $IC_{50}$  de  $0,199 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) apresentaram atividades semelhantes e intermediárias. O extrato II e III com  $IC_{50}$  de  $0,147 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,083 \text{ mg.mL}^{-1}$ , respectivamente, foram os que apresentaram atividades mais altas. A enzima superóxido dismutase foi utilizada como controle positivo e apresentou  $IC_{50}$  de  $0,45 \text{ U.mL}^{-1}$ .

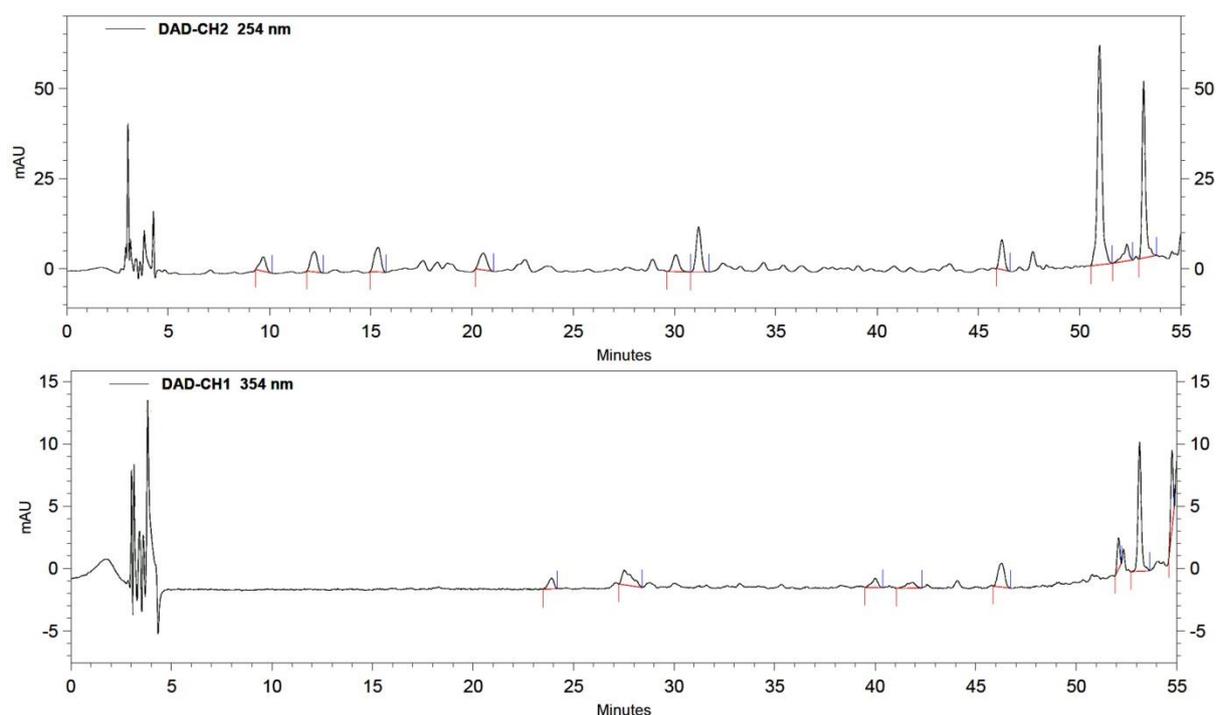


**Figura 22. Avaliação da capacidade sequestradora de ânion radical superóxido pelos extratos de fungos endofíticos.**

Porcentagem de diminuição da absorbância a 560 nm na presença dos extratos indicando o consumo de ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Valores de  $IC_{50}$  ( $\text{g.mL}^{-1}$  para os extratos e  $\text{U.mL}^{-1}$  para a superóxido dismutase) do sequestro de radical superóxido.

## **8. Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência.**

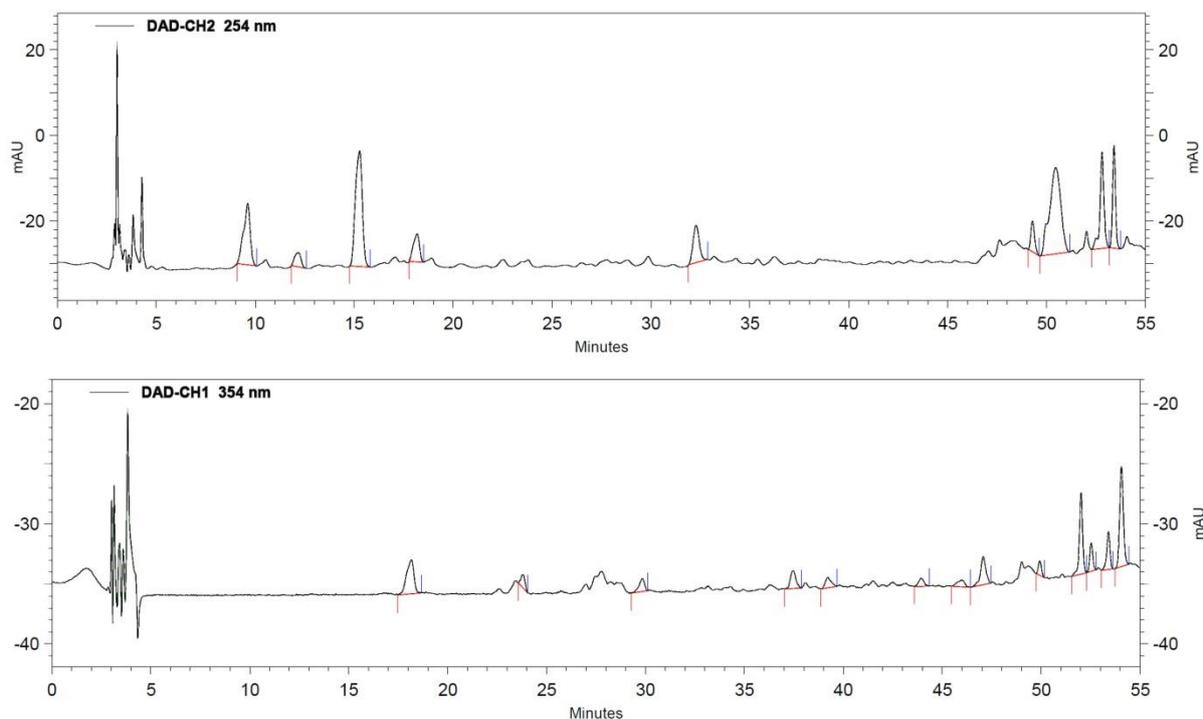
Os extratos dos metabólitos dos fungos endofíticos produzidos foram diluídos em metanol e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, usando um detector DAD, ajustado para coletar dados na faixa de 254 nm e 354 nm. O ensaio foi feito com todos os extratos cujas concentrações permitiram a detecção dos compostos no DAD. O perfil de eluição dos extratos foi comparado com os dados dos padrões analíticos ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, catequina hidratada, epicatequina, kaempferol, hesperidina, hesperitina, ácido rosmarínico, isoquercitrina, miricetina, rutina, kaempferol e quercetina. Os cromatogramas obtidos estão apresentados abaixo e mostram que a maioria dos extratos possui grande quantidade de compostos. As tabelas 9 a 13 mostram a probabilidade de semelhança dos compostos eluídos com os padrões utilizados na análise. Foram usados os seguintes símbolos para a análise de similaridade: “+”, quando o valor de similaridade estava entre 50 e 70%; “++”, se valor de similaridade estivesse entre 70 e 90%; e “+++”, para valores de similaridade acima de 90%.



**Figura 23.** Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo I nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.

**Tabela 9.** Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo I com compostos padrões.

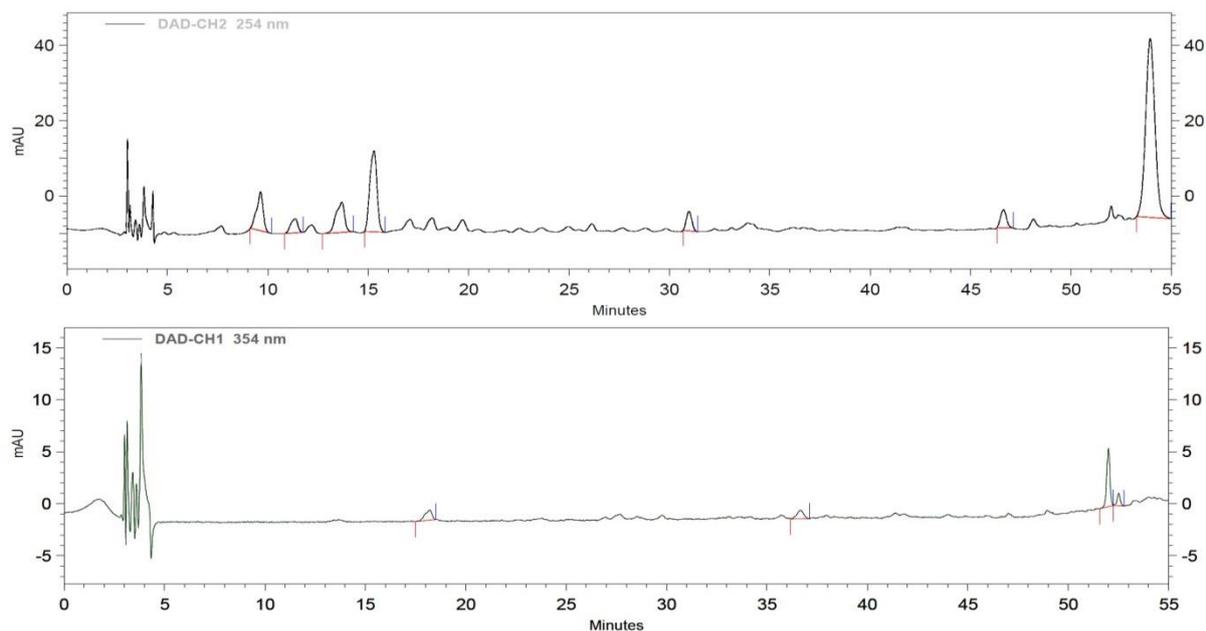
254 nm			354 nm		
Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)	Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)
20,55 minutos	Ácido caféico	+	46,29 minutos	Ácido caféico	+++
	Ácido ferúlico	+		Ácido clorogênico	+++
30,06 minutos	Epicatequina	++		Ácido ferúlico	+++
	Catequina hidratada	++	52,1 minutos	Ácido Rosmarínico	+++
46,16 minutos	Ácido caféico	+++		Isoquercitrina	+++
	Ácido ferúlico	+++		Ácido caféico	+++
	Ácido clorogênico	+++	53,15 minutos	Isoquercitrina	+++
50,98 minutos	Ácido caféico	+		Miricetina	++
	Ácido ferúlico	+		Rutina	++
	Ácido clorogênico	+	54,77 minutos	Kaempferol	+++
52,33 minutos	Ácido caféico	++		Miricetina	+++
	Ácido ferúlico	++		Quercetina	+++
	Ácido clorogênico	++	53,15 minutos	Kaempferol	++
53,15 minutos	Ácido caféico	++		Ácido caféico	++
	Ácido ferúlico	++		Ácido ferúlico	++



**Figura 24. Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo II nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.**

**Tabela 10. Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo II com compostos padrões. Não apresentou similaridade com nenhum padrão utilizado.**

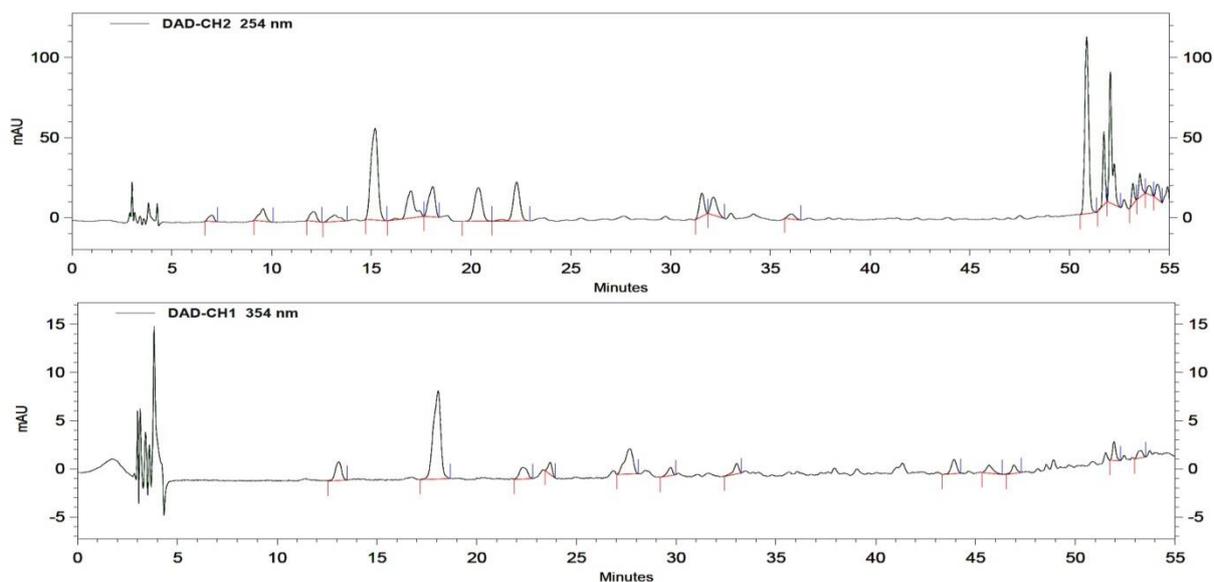
254 nm			354 nm		
Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)	Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)
Não houve similaridade			Não houve similaridade		



**Figura 25. Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo III nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.**

**Tabela 11. Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo III com compostos padrões.**

254 nm			354 nm		
Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)	Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)
13,69 minutos	Ácido caféico	+	51,99 minutos	Ácido Rosmarínico	++
	Ácido ferúlico	+		Ácido clorogênico	++
	Ácido clorogênico	+		Ácido caféico	++
53,94 minutos	Ácido caféico	++			
	Ácido ferúlico	++			
	Ácido clorogênico	+++			

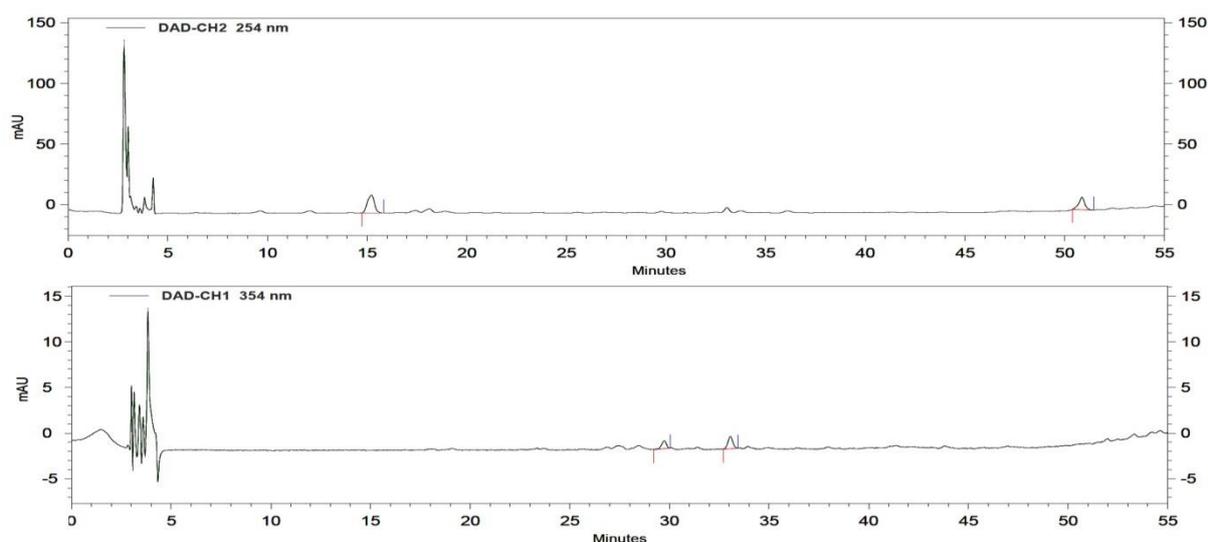


**Figura 26.** Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo **V** nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.

**Tabela 12.** Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo **V** com compostos padrões.

254 nm			354 nm		
Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)	Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)
13,16 minutos	Epicatequina	+	18,07 minutos	Ácido caféico	+++
	Catequina hidratada	+		Ácido ferúlico	+++
18,08 minutos	Ácido caféico	+++		Ácido Rosmarínico	+++
	Ácido ferúlico	+++	22,31 minutos	Isoquercitrina	+
	Ácido clorogênico	+++		Miricetina	+
20,36 minutos	Ácido caféico	+	Rutina	+	
	Ácido ferúlico	+	51,94 minutos	Isoquercitrina	+
	Epicatequina	+		Rutina	+
50,85 minutos	Ácido caféico	+		Miricetina	+
	Ácido ferúlico	+	53,31 minutos	Hesperitina	+++
	Ácido clorogênico	+		Hesperidina	+++
51,71 minutos	Epicatequina	+		Ácido caféico	++
	Catequina hidratada	+			
	Kaempferol	+			
52,04 minutos	Kaempferol	+			
	Epicatequina	+			
	Catequina	+			

	hidratada	
53,16 minutos	Kaempferol	+
	Epicatequina	+
	Catequina hidratada	+
53,52 minutos	Ácido caféico	++
	Ácido ferúlico	++
	Ácido clorogênico	++
53,97 minutos	Ácido caféico	++
	Ácido ferúlico	++
	Ácido clorogênico	++
54,4 minutos	Ácido caféico	++
	Ácido ferúlico	++
	Ácido clorogênico	++



**Figura 27.** Perfil Cromatográfico em CLAE/DAD do extrato AcOEt do fungo VII nos comprimentos de 245 e 354 nanômetros.

**Tabela 13.** Comparação dos picos obtidos do extrato AcOEt do fungo VII com compostos padrões.

254 nm			354 nm		
Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)	Tempo do pico	Composto	Similaridade (%)
50,86 minutos	Ácido caféico	+	Não houve similaridade		
	Ácido ferúlico	+			
	Ácido clorogênico	+			

## DISCUSSÃO

O potencial de fármacos oriundos da microbiota do bioma Cerrado é pouco explorado e inúmeros trabalhos têm mostrado que fungos, principalmente os fungos endofíticos, surgem como uma nova perspectiva de fonte de produtos naturais com atividade biológica (Strobel *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Arnold, 2007; Rodriguez *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010; Blackwell, 2011; Mousa e Raizada, 2013).

A *Bauhinia variegata* é uma planta bem adaptada no cerrado e produtora de compostos fenólicos, como taninos e flavonoides (Duarte, Silva *et al.*, 2007), e com atividade anti-inflamatória (Mohamed, Mammoud *et al.*, 2009), hepatoprotetora (Bodakhe e Ram, 2007), anti-hiperglicemiante (Azevedo, Maciel *et al.*, 2006; Frankish, De Sousa *et al.*, 2010; Kumar, Baraiya *et al.*, 2012; Kulkarni e Garud, 2015) comprovadas, além de ativar o PPAR $\gamma$  (Silva, 2015).

Após a publicação do trabalho onde é descrita a capacidade de um fungo endofítico em produzir o mesmo metabólito ativo de sua planta hospedeira (Stierle, Strobel *et al.*, 1993), abriu-se a perspectiva de que produtos naturais encontrados em plantas medicinais pudessem ser produzidos por fungos endofíticos que as colonizam (Newman e Cragg, 2015).

Nesse sentido, por produzir substâncias com atividade hipoglicemiante (Azevedo, Maciel *et al.*, 2006; Frankish, De Sousa *et al.*, 2010; Kumar, Baraiya *et al.*, 2012; Kulkarni e Garud, 2015) e substâncias que ativam o PPAR $\gamma$  (Costa, 2005; Silva, 2015), a *Bauhinia variegata* foi escolhida para o isolamento de fungos endofíticos que a colonizam, para avaliação da capacidade desses fungos de produzir metabólitos que pudessem ativar o PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ ) e que apresentassem atividade antioxidante, com intuito de buscar novos compostos bioativos que pudessem ser utilizados no tratamento de diabetes. Em estudo preliminar, nove fungos endofíticos foram isolados das folhas de *B. variegata* e todos os extratos produzidos mostraram atividade antioxidante quando avaliados pelo método do DPPH $\cdot$  e o extrato do fungo VII foi capaz de ativar o receptor nuclear quimérico PPAR $\gamma$ /Gal-4 (Mesquita, 2011). Com base nesses resultados prévios, no presente trabalho foi investigado se os extratos desses fungos eram capazes de ativar outras isoformas do PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ ) e novos ensaios para avançar no estudo de atividade antioxidante foram realizados.

Sete dos nove fungos endofíticos isolados continuaram viáveis e foram molecularmente identificados. Duas regiões que são muito conservadas em fungos da mesma espécie, localizadas no gene do RNA ribossômico, ITS, foram amplificadas e sequenciadas

para que pudessem ser comparadas com as sequências descritas no GenBank (NCBI) e foi feito o alinhamento para comparação entre as sequências obtidas e as depositadas no banco de dados (Larkin, Blackshields *et al.*, 2007).

Foi possível identificar o gênero dos fungos II, VII e IX como *Phomopsis*. Esse gênero corresponde à forma assexuada (anamorfo) do ascomiceto *Diaporthe*, que engloba mais de 900 espécies de fungos, e é caracterizado como grande produtor de metabólitos secundários (Bunyapaiboonsri *et al.*, 2009; Udayanga *et al.*, 2011). Tal fato pode explicar o grande número de substâncias detectadas na análise cromatográfica realizada com o extrato do fungo II (Figura 24). O fungo I foi identificado como *Guignardia mangiferae*. Este gênero, *Guignardia* (sinônimo: *Phyllosticta*), é descrito como fungo endofítico/fitopatogênico. Algumas espécies do gênero *Guignardia*, como *Guignardia citricarpa* e *Guignardia psidii* causam doenças como a mancha-preta dos citros e a podridão dos frutos de goiabeira. Outras espécies como *Guignardia mangiferae*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* são consideradas endofíticos por terem sido extraídas de plantas sem sinais de infecção (Miles *et al.*, 2013). O *Guignardia mangiferae* é importante produtor de substâncias bioativas, como, por exemplo, terpenos (Yuan *et al.*, 2010) e inibidores de acetilcolinesterases (Rodrigues *et al.*, 2005). Além disso, fungos do mesmo gênero produziram compostos com ação antifúngica e citotóxica (Wang, 2012).

O fungo III foi caracterizado como *Phoma sp.*. Esse gênero é conhecido como um importante patógeno de plantas e também por ser encontrado em ambiente marinho, é produtor de centenas de metabólitos secundários já descritos (Osterhage *et al.*, 2000). Substâncias com ação antifúngica e ação citotóxica contra linhagens de células tumorais já foram descritas (Li *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012). O fungo V foi identificado como *Glomerella acutata*, também um fungo classificado como endofítico. O gênero telemorfo do *Glomerella* está relacionado a doenças de plantas chamadas de antracnoses (Sutton *et al.*, 1992). Em artigo publicado por Tianpanich e colaboradores (2010), foram caracterizadas seis substâncias com atividade antioxidante, das quais quatro apresentaram atividade citotóxica. Essas informações corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, que mostram a atividade antioxidante dos metabólitos desses fungos (Figura 21 e Figura 22), e em trabalho anterior (Mesquita, 2011).

O número de casos de diabetes no mundo cresce de maneira vertiginosa, causando a morte de uma pessoa a cada 7 segundos (IDF, 2014). O Brasil, hoje com mais de 11,9 milhões de casos, terá 19,4 milhões de indivíduos com diabetes no ano de 2035 (Tabela 1), segundo

estimativas publicadas recentemente (Guariguata, Whiting *et al.*, 2014). Tratamentos mais eficazes e políticas públicas voltadas para a solução deste problema de saúde podem melhorar a qualidade de vida da população atingida por essa enfermidade.

Os anti-hiperglicemiantes orais tiazolidinadionas favorecem a sensibilização à insulina mediada pela ativação do PPAR $\gamma$ . Elas foram muito utilizadas para o tratamento do diabetes tipo 2, porém vários efeitos adversos graves, como perda da densidade óssea, retenção de fluidos corporais, problemas no fígado relacionados à troglitazona (Watkins e Whitcomb, 1998), problemas cardíacos relacionados ao consumo de rosiglitazona (Singh *et al.*, 2007) e, mais recentemente, aumento no risco de câncer de bexiga relacionado ao uso de pioglitazona (Lewis *et al.*, 2011), fizeram com que esta terapia fosse repensada. Entretanto, ligantes de PPAR $\gamma$  se mantêm como uma opção efetiva no tratamento do diabetes tipo 2. Eles possuem a capacidade de melhorar a sensibilidade da insulina em todos os tecidos produzindo aumento da captação de glicose nos tecidos periféricos (Tiikkainen *et al.*, 2004). Além disso, recentemente estudos mostraram que a sensibilidade à insulina pode ser afetada por outro mecanismo de ação, onde há modulação do PPAR $\gamma$  por MPT. Quando o PPAR $\gamma$  é fosforilado pela quinase 5 dependente de ciclina (Cdk5), a atividade transcricional de alguns genes específicos, como a sensibilizadora da insulina adiponectina, ficam alterados. Tanto ligantes agonistas parciais como agonistas totais são capazes de impedir a fosforilação do PPAR $\gamma$  pela Cdk5 e normalizar a expressão de genes alterados na condição de resistência à insulina. Esses achados sugerem que agonistas parciais podem ter efeitos mais positivos como ligantes de PPAR $\gamma$  no diabetes, por diminuírem efeitos adversos causados pela ativação da transcrição indesejada de alguns genes, favorecida pela ligação de agonistas totais, e impedirem a fosforilação do PPAR $\gamma$  mediada pela Cdk5, melhorando a sensibilidade à insulina (Choi, Banks *et al.*, 2010; Choi, Banks *et al.*, 2011; Amato, Rajagopalan *et al.*, 2012). A ERK também pode fosforilar a serina 273 do PPAR $\gamma$  e pode ser suprimida pela Cdk5 via ativação da MEK (Banks, Mcallister *et al.*, 2015) e, dessa maneira, o PPAR $\gamma$  tem sua função controlada. Assim, o tratamento do diabetes tipo 2 com inibidores do eixo ERK/MEK poderiam ser utilizados para a melhora da resistência à insulina.

Para avaliar se os extratos apresentavam atividade agonista sobre as diferentes isoformas do PPAR, foram realizados ensaios de co-transfecção transiente em células mesangiais humanas com o plasmídeo para expressão do receptor e com o plasmídeo com um gene repórter da luciferase, seguidos de tratamento com os diferentes extratos nas concentrações máximas estabelecidas pelos resultados do ensaio de citotoxicidade realizado

anteriormente (Mesquita, 2011). Dentre os extratos testados, dois deles, os extratos II e VII, mostraram atividade agonista ao PPAR. O extrato II na concentração de 20,16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 9B) ativou todas as três isoformas do PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ ), mostrando ser pan-agonista. Por sua vez, o extrato VII ativou somente os PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta$ , mas apresentou baixa ativação sobre o PPAR $\gamma$  quimérico (LBD-PPAR $\gamma$ /DBD-GAL4) em estudo prévio (Mesquita, 2011).

Em seguida, foi avaliado se os extratos dos fungos II e VII eram capazes de modificar a estrutura do LBD do PPAR $\gamma$ . Para isso, realizamos o ensaio de proteção contra protease. Os LBD dos PPAR possuem um bolso de ligação grande, o maior em relação aos outros receptores nucleares. Isso explica porque esses receptores são capazes de se ligarem a vários compostos (Xu *et al.*, 2001). Ao ligar-se ao agonista, o LBD sofre modificações importantes em sua estrutura, refletindo na dificuldade de acesso a sítios proteolíticos na sua superfície e, com isso, em aumento de sua resistência à digestão por proteases. Nesse caso, quando analisado por SDS-PAGE, apresenta um padrão de corrida típico no gel de poliacrilamida, com evidencição de uma banda de aproximadamente 25 kDa que, na presença de um agonista, é resistente à degradação por proteases (Berger *et al.*, 1996). Por isso, com o ensaio de proteção contra digestão por proteases é possível investigar alterações conformacionais do PPAR $\gamma$  na presença de ligantes (Allan, Leng *et al.*, 1992). O resultado apresentado para este ensaio (Figura 13) mostra que, quando na presença dos extratos dos fungos II e VII, o LBD do PPAR $\gamma$  apresenta padrões eletroforéticos parecidos entre si, e sugerindo que esses extratos protegeram o receptor com mais eficiência que a rosiglitazona, nos ensaios feitos com as três concentrações diferentes de tripsina utilizadas. Isso fica claro, uma vez que a banda de aproximadamente 25 kDa parece mais protegida. Berger e colaboradores (2003) descrevem um agonista parcial que apresentou um padrão de proteção contra a atividade da tripsina semelhante ao apresentado nestes resultados.

Para descartar a hipótese de que alguma substância presente nos extratos estivesse impedindo a função proteolítica da tripsina, uma vez que existem trabalhos que descrevem a produção de proteases por fungos (Souza *et al.*, 2015), foi realizado um ensaio para avaliar a atividade proteolítica da tripsina na presença dos extratos. Os resultados mostraram que não houve diferença entre o padrão de degradação da gelatina na presença ou ausência dos extratos e do veículo (DMSO) (Figura 14). Isso sugere que o efeito dos extratos no ensaio de proteção contra digestão por protease foi pela ligação direta ao PPAR $\gamma$ .

Até o momento, alguns trabalhos mostraram a atividade agonista de metabólitos provenientes de fungos sobre o PPAR $\gamma$  (Sato, Tai *et al.*, 2002; Lee, Lee *et al.*, 2008; Lee, Hsu *et al.*, 2012; Hsu, Lee *et al.*, 2013) e outro em inibir sua expressão (Lee *et al.*, 2013), mas nenhum com atividade sobre as outras isoformas do receptor  $\alpha$  e  $\beta/\delta$ . Entretanto, existem vários trabalhos mostrando a atividade agonista de produtos naturais provenientes de plantas sobre o PPAR $\gamma$  (Wang, Waltenberger *et al.*, 2014) e as outras isoformas do PPAR ( $\alpha$  e  $\beta/\delta$ ) também são ativadas por produtos naturais. Martin e colaboradores (2013) mostraram quatro isoflavonas (compostos polifenólicos) com atividade agonista sobre os PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ , caracterizando essas substâncias como pan-agonistas. Em outro trabalho foi mostrado que o extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* possui atividade pan-agonista sobre os PPAR (Pereira, 2008). Também foi demonstrado que o PPAR $\alpha$  pode ser ativado por um composto isolado do tomate, o ácido 9-oxo-10(E),12(E)-octadecadienoico (Kim *et al.*, 2011) e outro isolado da *Canabis sativa* (Sun *et al.*, 2006). O extrato de chá verde, por sua vez, foi capaz de ativar o PPAR $\beta/\delta$  (Danesi *et al.*, 2009), enquanto o extrato de café inibiu o PPAR $\gamma$  (Aoyagi *et al.*, 2014).

As TZD são capazes de promover a diferenciação de pré-adipócitos causando efeitos desfavoráveis de ganho de peso em pacientes que fazem seu uso (Cariou, Charbonnel *et al.*, 2012). A ativação do PPAR $\alpha$  também promove a diferenciação de pré-adipócitos (Goto *et al.*, 2011). Para avaliar se este efeito também poderia ser provocado pelos extratos dos fungos II e VII, pré-adipócitos 3T3-L1 foram induzidos à diferenciação na presença ou ausência dos extratos, rosiglitazona ou veículo (DMSO) (Figura 15).

Os extratos dos fungos II e VII estimularam acúmulo discreto de lipídeos nas células, visivelmente menor que o promovido pela rosiglitazona na concentração de  $10^{-5}$  M. Este resultado foi inesperado, uma vez que agonistas totais de PPAR $\gamma$  são reconhecidamente capazes de induzir a adipogênese em células 3T3-L1 (Rosen e Spiegelman, 2014) e agonistas de PPAR $\alpha$  influenciam a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 (Goto, Lee *et al.*, 2011).

Portanto, fez-se interessante avaliar qual era a influência dos extratos dos fungos II e VII sobre a transcrição gênica da proteína FABP4 (aP2), investigando se esses extratos modificavam sua expressão gênica e proteica. A proteína FABP4 (aP2) é uma chaperona de lipídeos que se situa no citoplasma celular, é regulada pelo PPAR $\gamma$  em adipócitos, onde é muito expressa, e está envolvida no armazenamento de lipídeos (Tontonoz *et al.*, 1994). No ensaio de PCR em tempo real (Figura 19) e no ensaio de *Western Blotting* (Figura 20), foi observado que os extratos dos fungos II e VII não apresentaram influência sobre a expressão

gênica e proteica da FABP4 (aP2), confirmando o resultado observado no ensaio de diferenciação de adipócitos e evidênciação de lipídeos por coloração por óleo vermelho O (Figura 15).

Para explicar a baixa indução da adipogênese pelos extratos, mesmo com atividade agonista positiva e sugestão de ligação ao receptor, uma hipótese seria a de que os extratos estivessem dificultando a ação da aP2 de alguma maneira. O gene da aP2 é flanqueado pelo elemento responsivo do PPAR $\gamma$  e a aP2 não funcional diminui o efeito adipogênico (Garin-Shkolnik *et al.*, 2014). Entretanto, para confirmar esta hipótese, outros experimentos são necessários.

Estes achados podem contribuir para a descoberta de moléculas agonistas que podem ser testadas para uso como anti-hiperglicemiantes em tratamento do diabetes tipo 2 e dislipidemia. Com a identificação molecular e a análise filogenética dos fungos foi possível verificar que os fungos VII e II, do gênero *Phomopsis*, são os que apresentaram maior grau de parentesco (Figura 8). Esse resultado pode ser um indício de que outros fungos de mesmo gênero podem produzir metabólitos com atividade agonista sobre os receptores nucleares PPAR.

O estresse oxidativo na célula resulta do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante, que fica diminuído, e a produção de espécies reativas do oxigênio, que fica aumentada. Esse desequilíbrio está envolvido na etiologia de várias doenças mediada, entre outras vias, pelo dano ao DNA, lipídeos, proteínas, além da sinalização para a transcrição gênica desregulada (Ray *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos em um trabalho realizado anteriormente (Mesquita, 2011) mostram que os extratos produzidos pela fermentação em cultura líquida submersa dos fungos endofíticos estudados apresentaram teores elevados de polifenóis e flavonoides, substâncias que possuem atividade antioxidante reconhecida.

Vários flavonoides também já foram descritos como agonistas de diferentes isoformas de PPAR (Nakagawa *et al.*, 2004; Salam *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2010; Goldwasser *et al.*, 2010; Silva, 2015). Porém, flavonoides também possuem atividade antioxidante e pró-oxidante, dependendo de sua concentração no meio reacional e do pH do meio. O efeito pró-oxidante dos flavonoides é, via de regra, diretamente proporcional ao número total de grupos hidroxila, e é responsável pelos efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos dos flavonoides isolados de diversas plantas medicinais (Heim *et al.*, 2002).

Estas características dos flavonoides concordam com os resultados obtidos por Mesquita (2011), em que extratos com menor teor de polifenóis foram os que mostraram a menor citotoxicidade e os únicos com atividade agonista ao PPAR $\gamma$ , apesar de terem mostrado a maior atividade antioxidante quando ensaiados com o radical estável DPPH. Esses resultados, aparentemente descontraídos, são de fácil compreensão após análise de que a atividade pró-oxidante dos fenóis, entre eles, os flavonoides, está relacionada à sua capacidade de quelar ou reduzir metais (Behling *et al.*, 2004), e que o ensaio de atividade antioxidante que utiliza o DPPH· não é um ensaio dependente da presença de metais como catalisadores de reação.

Em revisão escrita por Hamilton e colaboradores (2012) foi discutido que a produção de substâncias antioxidantes pelos fungos endofíticos é importante na relação de simbiose que existe entre eles e as plantas hospedeiras, e o crescimento da hifa ocorre com maior facilidade em folhas que estão em crescimento. Inicialmente, ao interagir com a planta, é necessário que o fungo produza espécies reativas de oxigênio (ERO), impedindo assim que as defesas da planta atuem. Não se sabe ao certo o que define a relação de simbiose ou parasitismo, mas, em seguida da infecção, ocorre um equilíbrio na produção de ERO e substâncias antioxidantes tanto pela planta quanto pelo fungo e essa relação é, em alguns casos, espécie-específica (Tanaka *et al.*, 2006).

Para avançar mais na compreensão do mecanismo de ação antioxidante dos extratos, os mesmos foram avaliados quanto a sua capacidade em impedir a peroxidação lipídica e em sequestrar o ânion radical superóxido.

O processo de peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados depende da presença de oxigênio. Esses ácidos graxos podem ativar os receptores ativados por proliferadores peroxissomais  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$  (Berger e Moller, 2002). Os agentes antioxidantes podem atuar evitando a oxidação desses ácidos graxos, e assim, a ação do agente pró-oxidante, ou inativando as substâncias radicalares. Altas concentrações de glicose aumentam a concentração de espécies reativas do oxigênio (ERO) e também a ativação de uma enzima chamada fosfolipase A2 (PLA2), que é capaz de induzir a fosforilação de duas serinas (505 e 515) (Pavicevic *et al.*, 2008) e a liberação de ácido araquidônico e do ácido linoleico do fosfolípido da membrana celular. Após a liberação, esses ácidos graxos são oxidados (peroxidação lipídica) pelas ERO produzindo, além de outros produtos, o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) que se liga ao PPAR $\beta/\delta$  aumentando a secreção de insulina. Quando ocorre hiperglicemia crônica, o 4-HNE é produzido em excesso e há a formação de adutos com

proteínas, DNA e fosfolípidos, com consequente apoptose da célula- $\beta$  no pâncreas (Cohen, Riahi *et al.*, 2011).

No ensaio realizado, foi avaliado se os extratos eram capazes de impedir o início do processo da peroxidação lipídica. Como a reação ocorre em uma emulsão óleo-em-água é necessário levar em conta a polaridade do agente antioxidante, uma vez que as substâncias não polares podem apresentar maior atividade por ficarem retidas nas gotículas de óleo, onde o ácido graxo está localizado, no caso do ensaio, o ácido linoleico (McClements e Decker, 2000). Tanto o BHT (2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol) quanto o tocoferol são substâncias apolares e foram utilizadas como controles positivos no ensaio. Com exceção do extrato do fungo III, todos os extratos testados foram capazes de impedir a peroxidação do ácido linoleico (Figura 21). O fato dos extratos dos fungos II e VII apresentarem atividade agonista em PPAR $\beta/\delta$  e, além disso, serem antioxidantes, pode representar uma atividade interessante quando pensamos que isso poderia impedir a apoptose das células- $\beta$  e, assim, impedir o desenvolvimento do diabetes tipo 2. A presença de substâncias antioxidantes pouco polares, que se situaram na interfase da emulsão, ou apolares miscíveis na fase oleosa, pode ter sido responsável pela boa atividade na inibição da peroxidação lipídica. Como mostrado em estudo preliminar, os extratos possuem grande quantidade de flavonoides (Mesquita, 2011). Essa classe de substâncias possui caráter lipofílico e pode ser a responsável pela ação antioxidante. Em relação ao extrato do fungo III, uma hipótese que explique sua atividade pró-oxidante é a de que a concentração de substância ativa esteja muito alta e isso tenha sido a causa da atividade pró-oxidativa, que resultou na oxidação do ácido linoleico. Sabe-se, ainda, que o flavonoide pode ter caráter antioxidante ou pró-oxidante, dependente do pH do meio ou da presença de um metal de transição no meio reacional, como o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ou o ferro, além de oxigênio (Cao *et al.*, 1997).

Para avaliar a capacidade de sequestro do ânion radical superóxido,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , pelos extratos foi utilizado o sistema xantina/xantina oxidase como produtor da ERO (Robak e Gryglewski, 1988). Sabe-se que o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) está presente em células aeróbicas, possui importante papel nas reações de oxidação e interferem na sinalização celular, juntamente com outras espécies reativas do oxigênio. Além disso, está envolvido na patogênese de várias doenças (Ray, Huang *et al.*, 2012).

Assim como no ensaio da peroxidação lipídica, a presença de flavonoides nos extratos pode explicar a capacidade em sequestrar o radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , dando destaque para o extrato do fungo III (Figura 22), que conseguiu fazê-lo na baixa concentração de  $0,083 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para se

ter uma ideia da relevância desse resultado, em trabalho publicado recentemente, Dong e colaboradores (2013) encontraram a melhor atividade em extrato de mel de abelha na concentração de 28 mg.mL<sup>-1</sup>. Com isso, é possível perceber que todos os extratos obtiveram ótima atividade quando comparados ao trabalho citado.

Ainda são necessários mais estudos para melhor compreensão das vias metabólicas e efeitos integrados do sequestro de espécies reativas de oxigênio e ativação dos receptores nucleares, mas os resultados obtidos podem ser considerados promissores, uma vez que os mesmos extratos mostraram capacidade de ativar PPAR $\gamma$ , sem grande interferência na diferenciação de adipócitos, e ainda foram capazes de inibir a etapa de iniciação da peroxidação lipídica e sequestrar o ânion radical superóxido. Essas atividades biológicas são promissoras na busca de candidatos a novos anti-hiperglicemiantes, pois permitiria o desenvolvimento de medicamentos com atividades específicas, com menos incidência de efeitos adversos.

## CONCLUSÃO

- O fungo I foi identificado como *Guignardia mangiferae*; os fungos II, VII e IX foram identificados como *Phomopsis sp.*; o fungo III foi identificado como *Phoma sp.*; o fungo V foi identificado como *Glomerella acutata*; e o fungo VIII foi identificado como *Pestalotiopsis microspora*.
- O extrato do fungo II induziu a atividade transcricional das três isoformas do PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ ).
- O extrato do fungo VII induziu a atividade transcricional das isoformas do PPAR $\alpha$  e do PPAR $\beta/\delta$ .
- Os extratos dos fungos II e VII protegeram o LBD do PPAR $\gamma$  contra a ação de protease.
- Os extratos dos fungos II e VII não promoveram a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1.
- Os extratos dos fungos II e VII não induziram o aumento da expressão de FABP4 (aP2).
- Todos os extratos testados apresentaram atividade antioxidante, com capacidade de sequestro do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).
- Com exceção do extrato do fungo III, os extratos de todos os outros fungos inibiram a etapa de iniciação da peroxidação lipídica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA, A. D. A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. Supplement 1, p. S81-S90, 2014. ISSN 0149-5992.

AHMADIAN, M.; SUH, J. M.; HAH, N.; LIDDLE, C.; ATKINS, A. R.; DOWNES, M.; EVANS, R. M. PPAR [gamma] signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature Medicine**, v. 99, n. 5, p. 557-566, 2013. ISSN 1078-8956.

ÅKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 8, p. 545-555, 2010. ISSN 1471-0072.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. F. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, n. 7, p. 539-553, 1998. ISSN 1096-9136.

ALLAN, G. F.; LENG, X.; TSAI, S. Y.; WEIGEL, N. L.; EDWARDS, D. P.; TSAI, M. J.; O'MALLEY, B. W. Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 27, p. 19513-20, September 25, 1992. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/267/27/19513.abstract>>.

AMATO, A. A.; RAJAGOPALAN, S.; LIN, J. Z.; CARVALHO, B. M.; FIGUEIRA, A. C.; LU, J.; AYERS, S. D.; MOTTIN, M.; SILVEIRA, R. L.; SOUZA, P. C. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 33, p. 28169-28179, 2012. ISSN 0021-9258.

AMERI, K.; HARRIS, A. L. Activating transcription factor 4. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 1, p. 14-21, 2008. ISSN 1357-2725.

AOYAGI, R.; FUNAKOSHI-TAGO, M.; FUJIWARA, Y.; TAMURA, H. Coffee Inhibits Adipocyte Differentiation *via* Inactivation of PPAR $\gamma$ . **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 11, p. 1820-1825, 2014.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007. ISSN 1749-4613.

AZEVEDO, C.; MACIEL, F.; SILVA, L.; FERREIRA, A.; DA CUNHA, M.; MACHADO, O.; FERNANDES, K.; OLIVEIRA, A.; XAVIER-FILHO, J. Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of *Bauhinia variegata*. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 39, n. 11, p. 1435-1444, 2006. ISSN 0100-879X.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131-2157, 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001650850700580X>>.

BANKS, A. S.; MCALLISTER, F. E.; CAMPOREZ, J. P. G.; ZUSHIN, P.-J. H.; JURCZAK, M. J.; LAZNIK-BOGOSLAVSKI, D.; SHULMAN, G. I.; GYGI, S. P.; SPIEGELMAN, B. M. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR[ $\alpha$ ]. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 391-395, 2015. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature13887> >.

BARGER, P. M.; KELLY, D. P. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 10, n. 6, p. 238-245, 2000. ISSN 1050-1738.

BARNETT, A. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. **International journal of clinical practice**, v. 60, n. 11, p. 1454-1470, 2006. ISSN 1742-1241.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K.-I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA repair**, v. 3, n. 8, p. 1109-1115, 2004. ISSN 1568-7864.

BEEKUM, O.; FLESKENS, V.; KALKHOVEN, E. Posttranslational Modifications of PPAR- $\gamma$ : Fine-tuning the Metabolic Master Regulator. **Obesity**, v. 17, n. 2, p. 213-219, 2009. ISSN 1930-739X.

BEHLING, E. B.; SEDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, L. P. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004. ISSN 2179-4448.

BERGER, J.; BAILEY, P.; BISWAS, C.; CULLINAN, C. A.; DOEBBER, T. W.; HAYES, N. S.; SAPERSTEIN, R.; SMITH, R. G.; LEIBOWITZ, M. D. Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. **Endocrinology**, v. 137, n. 10, p. 4189-4195, 1996. Disponível em: < <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo.137.10.8828476> >.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 409-35, 2002. ISSN 0066-4219 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11818483](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11818483) >.

BERGER, J. P.; PETRO, A. E.; MACNAUL, K. L.; KELLY, L. J.; ZHANG, B. B.; RICHARDS, K.; ELBRECHT, A.; JOHNSON, B. A.; ZHOU, G.; DOEBBER, T. W.; BISWAS, C.; PARIKH, M.; SHARMA, N.; TANEN, M. R.; THOMPSON, G. M.; VENTRE, J.; ADAMS, A. D.; MOSLEY, R.; SURWIT, R. S.; MOLLER, D. E. Distinct Properties and Advantages of a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Protein  $\gamma$  Selective Modulator. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 4, p. 662-676, 2003. Disponível em: < <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2002-0217> >.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012. ISSN 1939-4551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488923/> >.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, March 1, 2011. Disponível em: < <http://www.amjbot.org/content/98/3/426.abstract> >.

BODAKHE, S. H.; RAM, A. Hepatoprotective properties of Bauhinia variegata bark extract. **Yakugaku zasshi**, v. 127, n. 9, p. 1503-1507, 2007. ISSN 0031-6903.

BORGES, P. P.; DE ANDRADE OLIVEIRA, K. A. F.; MACHADO, K. B.; VAZ, Ú. L.; DA CUNHA, H. F.; NABOUT, J. C. Trends and gaps of the scientific literature on the Cerrado biome: A scientometric analysis. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 10, n. 1, p. 2-8, 2014. ISSN 2236-3777.

BOSTROM, P.; WU, J.; JEDRYCHOWSKI, M. P.; KORDE, A.; YE, L.; LO, J. C.; RASBACH, K. A.; BOSTROM, E. A.; CHOI, J. H.; LONG, J. Z.; KAJIMURA, S.; ZINGARETTI, M. C.; VIND, B. F.; TU, H.; CINTI, S.; HOJLUND, K.; GYGI, S. P.; SPIEGELMAN, B. M. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463-468, 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature10777> >.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nat Rev Micro**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2916> >.

BUNYAPAIBOONSRI, T.; YOIPROMMARAT, S.; SRIKITIKULCHAI, P.; SRICHOMTHONG, K.; LUMYONG, S. Oblongolides from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. BCC 9789. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 1, p. 55-59, 2009. ISSN 0163-3864.

BURNETTE, W. N. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269781902815> >.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, April 1, 2009. Disponível em: < <http://www.clinchem.org/content/55/4/611.abstract> >.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584996003516> >.

CARIOU, B.; CHARBONNEL, B.; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPAR $\gamma$  agonists: time for a reassessment. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 205-215, 2012. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276012000379> >.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013. ISSN 0278-6915.

CECHINEL, V. F. Chemical composition and biological potential of plants from the genus Bauhinia. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1347-1354, 2009. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2756> >.

CHALLIS, G. L.; NAISMITH, J. H. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 6, p. 748-756, 2004. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X04001812> >.

CHANDRA, V.; HUANG, P.; HAMURO, Y.; RAGHURAM, S.; WANG, Y.; BURRIS, T. P.; RASTINEJAD, F. Structure of the intact PPAR- $\gamma$ -RXR- $\alpha$  nuclear receptor complex on DNA. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 350-356, 2008. ISSN 0028-0836.

CHANG-CHEN, K. J.; MULLUR, R.; BERNAL-MIZRACHI, E. Beta-cell failure as a complication of diabetes. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 9, n. 4, p. 329-43, Dec 2008. ISSN 1389-9155 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18777097](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18777097) >.

CHAWLA, A.; REPA, J. J.; EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866-1870, 2001. ISSN 0036-8075.

CHIANG, H.-M.; CHEN, H.-C.; LIN, T.-J.; SHIH, I. C.; WEN, K.-C. Michelia alba extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4260-4269, 2012. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512005820> >.

CHOI, J. H.; BANKS, A. S.; ESTALL, J. L.; KAJIMURA, S.; BOSTROM, P.; LAZNIK, D.; RUAS, J. L.; CHALMERS, M. J.; KAMENECKA, T. M.; BLUHER, M.; GRIFFIN, P. R.; SPIEGELMAN, B. M. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by Cdk5. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 451-456, 2010. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature09291> >.

CHOI, J. H.; BANKS, A. S.; KAMENECKA, T. M.; BUSBY, S. A.; CHALMERS, M. J.; KUMAR, N.; KURUVILLA, D. S.; SHIN, Y.; HE, Y.; BRUNING, J. B. Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR $\gamma$  ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 477-481, 2011. ISSN 0028-0836.

COHEN, G.; RIAHI, Y.; SHAMNI, O.; GUICHARDANT, M.; CHATGILIALOGLU, C.; FERRERI, C.; KAISER, N.; SASSON, S. Role of lipid peroxidation and PPAR- $\delta$  in amplifying glucose-stimulated insulin secretion. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2830-2842, 2011. ISSN 0012-1797.

COOK, D.; BEAULIEU, W. T.; MOTT, I. W.; RIET-CORREA, F.; GARDNER, D. R.; GRUM, D.; PFISTER, J. A.; CLAY, K.; MARCOLONGO-PEREIRA, C. Production of the Alkaloid Swainsonine by a Fungal Endosymbiont of the Ascomycete Order Chaetothyriales in the Host *Ipomoea carnea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 16, p. 3797-3803, 2013/04/24 2013. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf4008423> >.

COSTA, M. **Extrato de Bauhinia variegata sobre a Atividade Transcricional Mediada pelo Receptor dos Proliferadores Peroxissomais-gama (PPAR $\gamma$ )**. . 2005. 52 (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília., Brasília.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. **Curr Top Med Chem**, v. 1, n. 6, p. 569-90, Dec 2001. ISSN 1568-0266 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11895132](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11895132) >.

DA CUNHA, A. M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. In Press, Corrected Proof, 2009. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7GVW-4WNPDH9-F/2/53dbe79c8a535564c1479c7120009aa6> >.

DANESI, F.; DI NUNZIO, M.; BOSCHETTI, E.; BORDONI, A. Green tea extract selectively activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  in cultured cardiomyocytes. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 12, p. 1736-1739, 2009. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114508145871> >. Acesso em: 2009.

DAS, S.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial and Enzymatic Transformations of Flavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 499-508, 2006. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np0504659> >.

DESPRES, J.-P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881-887, 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature05488> >.

DEVCHAND, P. R.; ZIOUZENKOVA, O.; PLUTZKY, J. Oxidative Stress and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Reversing the Curse? **Circ Res**, v. 95, n. 12, p. 1137-1139, December 10, 2004 2004. Disponível em: < <http://circres.ahajournals.org> >.

DING, L.; JIN, D.; CHEN, X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR $\gamma$  transcriptional activity in adipocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 10, p. 941-947, 2010. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286309001697> >.

DONG, R.; ZHENG, Y.; XU, B. Phenolic Profiles and Antioxidant Capacities of Chinese Unifloral Honeys from Different Botanical and Geographical Sources. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 762-770, 2013/03/01 2013. ISSN 1935-5130. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0726-0> >.

DUARTE, M. R.; SILVA, A. G.; COSTA, R. E.; FARIA, L. T. Bauhinia variegata: diagnose morfoanatómica e análise comparativa entre exemplares de regiões climáticas distintas. **LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY**, v. 26, n. 6, p. 837, 2007. ISSN 0326-2383.

EVANS, J. L.; MADDUX, B. A.; GOLDFINE, I. D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 7-8, p. 1040-52, Jul-Aug 2005. ISSN 1523-0864 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15998259](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15998259) >.

EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 6, p. 1429-38, Jun 2005. ISSN 0888-8809 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15914712](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15914712) >.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y.-X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nat Med**, v. 10, n. 4, p. 355-361, 2004. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm1025> >.

EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear receptors, RXR, and the big bang. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 255-266, 2014. ISSN 0092-8674.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929. ISSN 0007-1021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/> >.

FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\delta$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 9, p. 4312-4317, April 29, 1997. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/94/9/4312.abstract> >.

FRANKISH, N.; DE SOUSA, M. F.; MILLS, C.; SHERIDAN, H. Enhancement of insulin release from the beta-cell line INS-1 by an ethanolic extract of Bauhinia variegata and its major constituent roseoside. **Planta Medica**, v. 76, n. 10, p. 995-997, 2010. ISSN 0032-0943.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 23, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2010/214074> >.

GARCIA-VALLVE, S.; GUASCH, L.; MULERO, M. Discovery of Natural Products that Modulate the Activity of PPAR $\gamma$ : A Source for New Antidiabetics. In: MARTINEZ-MAYORGA, K. e MEDINA-FRANCO, J. L. (Ed.). **Foodinformatics**: Springer International Publishing, 2014. cap. 6, p.151-176. ISBN 978-3-319-10225-2.

GARIN-SHKOLNIK, T.; RUDICH, A.; HOTAMISLIGIL, G. S.; RUBINSTEIN, M. FABP4 attenuates PPAR $\gamma$  and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR $\gamma$  in adipose tissues. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 900-911, 2014. ISSN 0012-1797.

GOLDWASSER, J.; COHEN, P. Y.; YANG, E.; BALAGUER, P.; YARMUSH, M. L.; NAHMIAS, Y. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha$ . **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12399, 2010. ISSN 1932-6203.

GOTO, T.; LEE, J.-Y.; TERAMINAMI, A.; KIM, Y.-I.; HIRAI, S.; UEMURA, T.; INOUE, H.; TAKAHASHI, N.; KAWADA, T. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. **Journal of lipid research**, v. 52, n. 5, p. 873-884, May 1, 2011. Disponível em: < <http://www.jlr.org/content/52/5/873.abstract> >.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. Bioconnectivity: a blueprint for biodiversity? **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 9, p. 1635-1642, 1999. ISSN 0033-4545.

GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J.-Å.; LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 950-964, 2004. ISSN 1474-1776.

GUARIGUATA, L.; WHITING, D.; HAMBLETON, I.; BEAGLEY, J.; LINNENKAMP, U.; SHAW, J. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 2, p. 137-149, 2014. ISSN 0168-8227.

GUELLICH, A.; DAMY, T.; CONTI, M.; CLAES, V.; SAMUEL, J.-L.; PINEAU, T.; LECARPENTIER, Y.; COIRAULT, C. Tempol prevents cardiac oxidative damage and left ventricular dysfunction in the PPAR- $\alpha$  KO mouse. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, n. 11, p. H1505-H1512, 2013. ISSN 0363-6135.

GUÉRAUD, F.; ATALAY, M.; BRESGEN, N.; CIPAK, A.; ECKL, P. M.; HUC, L.; JOUANIN, I.; SIEMS, W.; UCHIDA, K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free radical research**, v. 44, n. 10, p. 1098-1124, 2010. ISSN 1071-5762.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 134-144, 2008. ISSN 1574-695X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00354.x> >.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614710002142> >.

HAMILTON, C. E.; GUNDEL, P. E.; HELANDER, M.; SAIKKONEN, K. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2012. ISSN 1560-2745.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252-1263, 2013. ISSN 1078-8956.

HASNAIN, S. Z.; BORG, D. J.; HARCOURT, B. E.; TONG, H.; SHENG, Y. H.; NG, C. P.; DAS, I.; WANG, R.; CHEN, A. C. H.; LOUDOVARIS, T.; KAY, T. W.; THOMAS, H. E.; WHITEHEAD, J. P.; FORBES, J. M.; PRINS, J. B.; MCGUCKIN, M. A. Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. **Nat Med**, v. 20, n. 12, p. 1417-1426, 2014. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3705> >.

HAWKSWORTH, D. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2425-2433, 2012. ISSN 0960-3115. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-012-0335-x> >.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286302002085> >.

HSU, W.-H.; LEE, B.-H.; CHANG, Y.-Y.; HSU, Y.-W.; PAN, T.-M. A novel natural Nrf2 activator with PPAR $\gamma$ -agonist (monascin) attenuates the toxicity of methylglyoxal and hyperglycemia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 3, p. 842-851, 2013. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X13003074> >.

HUNDAL, R.; INZUCCHI, S. Metformin. **Drugs**, v. 63, n. 18, p. 1879-1894, 2003/09/01 2003. ISSN 0012-6667. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-200363180-00001> >.

HWANG, J.; KLEINHENZ, D. J.; LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K. K.; DIKALOV, S.; HART, C. M. Peroxisome proliferator-activated receptor- ligands regulate endothelial membrane superoxide production. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 4, p. C899, 2004. ISSN 0363-6143.

HWANG, J.; KLEINHENZ, D. J.; RUPNOW, H. L.; CAMPBELL, A. G.; THULÉ, P. M.; SUTLIFF, R. L.; HART, C. M. The PPAR $\gamma$  ligand, rosiglitazone, reduces vascular oxidative stress and NADPH oxidase expression in diabetic mice. **Vascular pharmacology**, v. 46, n. 6, p. 456-462, 2007. ISSN 1537-1891.

IDF, I. D. F. IDF DIABETES ATLAS Sixth edition. **Diabetes atlas**, 2014. Disponível em: < [https://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014\\_EN.pdf](https://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_EN.pdf) >.

JANDEROVÁ, L.; MCNEIL, M.; MURRELL, A. N.; MYNATT, R. L.; SMITH, S. R. Human Mesenchymal Stem Cells as an in Vitro Model for Human Adipogenesis. **Obesity Research**, v. 11, n. 1, p. 65-74, 2003. ISSN 1550-8528. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2003.11> >.

JIANG, B.; LIANG, P.; ZHANG, B.; SONG, J.; HUANG, X.; XIAO, X. Role of PPAR-beta in hydrogen peroxide-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 2, p. 353-358, 2009. ISSN 0021-9150.

KANG, B. Y.; KIM, S.; LEE, K.-H.; LEE, Y. S.; HONG, I.; LEE, M.-O.; MIN, D.; CHANG, I.; HWANG, J. S.; PARK, J. S. Transcriptional profiling in human HaCaT keratinocytes in response to kaempferol and identification of potential transcription factors for regulating differential gene expression. **Experimental & molecular medicine**, v. 40, n. 2, p. 208-219, 2008. ISSN 1226-3613.

KIM, Y.-I.; HIRAI, S.; TAKAHASHI, H.; GOTO, T.; OHYANE, C.; TSUGANE, T.; KONISHI, C.; FUJII, T.; INAI, S.; IJIMA, Y.; AOKI, K.; SHIBATA, D.; TAKAHASHI, N.; KAWADA, T. 9-oxo-10(E),12(E)-octadecadienoic acid derived from tomato is a potent PPAR  $\alpha$  agonist to decrease triglyceride accumulation in mouse primary hepatocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 4, p. 585-593, 2011. ISSN 1613-4133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201000264> >.

KING, G. L.; LOEKEN, M. R. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 333-8, Oct 2004. ISSN 0948-6143 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15257460](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15257460) >.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005. ISSN 1523-1739.

KULKARNI, Y. A.; GARUD, M. S. Effect of Bauhinia variegata Linn.(Caesalpiniaceae) extract in streptozotocin induced type I diabetic rats. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, p. 1-8, 2015. ISSN 1598-2386.

KUMAR, P.; BARAIYA, S.; GAIDHANI, S.; GUPTA, M.; WANJARI, M. M. Antidiabetic activity of stem bark of Bauhinia variegata in alloxan-induced hyperglycemic rats. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 1, p. 64, 2012.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004> >. Acesso em: 2015/06/23.

LAEMMLI, U. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARKIN, M.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007. ISSN 1367-4803.

LEE, B.-H.; HSU, W.-H.; CHANG, Y.-Y.; KUO, H.-F.; HSU, Y.-W.; PAN, T.-M. Ankaflavin: a natural novel PPAR $\gamma$  agonist upregulates Nrf2 to attenuate methylglyoxal-induced diabetes in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 11, p. 2008-2016, 2012. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584912011501> >.

LEE, C.-L.; WEN, J.-Y.; HSU, Y.-W.; PAN, T.-M. Monascus-Fermented Yellow Pigments Monascin and Ankaflavin Showed Antiobesity Effect via the Suppression of Differentiation and Lipogenesis in Obese Rats Fed a High-Fat Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 7, p. 1493-1500, 2013/02/20 2013. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf304015z> >.

LEE, I.-K.; LEE, J.-H.; YUN, B.-S. Polychlorinated compounds with PPAR- $\gamma$  agonistic effect from the medicinal fungus *Phellinus ribis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 16, p. 4566-4568, 2008. ISSN 0960-894X.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The Many Faces of PPAR $\gamma$ . **Cell**, v. 123, n. 6, p. 993-999, 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867405012778> >.

LEWIS, J. D.; FERRARA, A.; PENG, T.; HEDDERSON, M.; BILKER, W. B.; QUESENBERRY, C. P.; VAUGHN, D. J.; NESSEL, L.; SELBY, J.; STROM, B. L. Risk of Bladder Cancer Among Diabetic Patients Treated With Pioglitazone Interim report of a longitudinal cohort study. **Diabetes Care**, v. 34, n. 4, p. 916-922, 2011. ISSN 0149-5992.

LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. Screening for Endophytic Fungi with Antitumour and Antifungal Activities from Chinese Medicinal Plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1515-1519, 2005/12/01 2005. ISSN 0959-3993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-7381-4> >.

LINGNERT, H.; VALLENTIN, K.; ERIKSSON, C. E. Measurement of antioxidative effect in model system. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 3, n. 2, p. 87-103, 1979. ISSN 1745-4549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4549.1979.tb00574.x> >.

LIU, Y.-J.; ZHAN, J.; LIU, X.-L.; WANG, Y.; JI, J.; HE, Q.-Q. Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis of prospective cohort studies. **Clinical Nutrition**, n. 0, 2013. ISSN 0261-5614. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561413000897> >.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, India, v. 4, n. 8, p. 118-126, Jul-Dec 2010. ISSN 0973-7847 0976-2787. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/> >.

LUPI, R.; DEL GUERRA, S.; MANCARELLA, R.; NOVELLI, M.; VALGIMIGLI, L.; PEDULLI, G. F.; PAOLINI, M.; SOLETI, A.; FILIPPONI, F.; MOSCA, F.; BOGGI, U.; DEL PRATO, S.; MASIELLO, P.; MARCHETTI, P. Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger. **Diabetes Metab**, v. 33, n. 5, p. 340-5, Nov 2007. ISSN 1262-3636 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17616474](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17616474) >.

MAJKA, S. M.; BARAK, Y.; KLEMM, D. J. Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. **Stem Cells**, v. 29, n. 7, p. 1034-1040, 2011. ISSN 1549-4918.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 1, 2004 2004. Disponível em: < <http://www.ajcn.org/content/79/5/727.abstract> >.

MÁRQUEZ, L. M.; REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J.; ROOSSINCK, M. J. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, v. 315, n. 5811, p. 513, 2007. ISSN 0036-8075.

MARTIN, H. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 669, n. 1-2, p. 1-7, 2009. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510709002115> >.

MATIN, A.; DODDAREDDY, M. R.; GAVANDE, N.; NAMMI, S.; GROUNDWATER, P. W.; ROUBIN, R. H.; HIBBS, D. E. The discovery of novel isoflavone pan peroxisome proliferator-activated receptor agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 766-778, 2013. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089612009339> >.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. **Journal of food science**, v. 65, n. 8, p. 1270-1282, 2000. ISSN 1750-3841. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x> >.

MELO, E. B. D.; DA SILVEIRA GOMES, A.; CARVALHO, I.  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277-10302, 2006. ISSN 0040-4020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402006013421> >.

MESQUITA, P. G. Bioprospecção de fungos endofíticos de Bauhinia variegata: busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes. 2011.

MILES, A.; TAN, Y.; TAN, M.; DONOVAN, N.; GHALAYINI, A.; DRENTH, A. Phyllosticta spp. on cultivated Citrus in Australia. **Australasian Plant Pathology**, p. 1-7, 2013. ISSN 0815-3191.

MOHAMED, M. A.; MAMMOUD, M. R.; HAYEN, H. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of a new triterpene saponin from Bauhinia variegata leaves. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 11-12, p. 798-808, 2009. ISSN 1865-7125.

MÖLLER, E.; BAHNWEIG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 22, p. 6115, 1992.

MOUSA, W. K.; RAIZADA, M. N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in microbiology**, v. 4, 2013.

NAKAGAWA, K.; KISHIDA, H.; ARAI, N.; NISHIYAMA, T.; MAE, T. Licorice flavonoids suppress abdominal fat accumulation and increase in blood glucose level in obese diabetic KK-A y mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1775-1778, 2004. ISSN 0918-6158.

NAZARI, M.; GHORBANI, A.; HEKMAT-DOOST, A.; JEDDI-TEHRANI, M.; ZAND, H. Inactivation of Nuclear Factor- $\kappa$ B by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 2-3, p. 526-533, 2011. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299910010800> >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012. ISSN 0163-3864.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Endophytic and Epiphytic Microbes as “Sources” of Bioactive Agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, 2015-May-22 2015. ISSN 2296-2646. Disponível em: < [http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1208&name=plant\\_metabolism\\_and\\_chemodiversity&ART\\_DOI=10.3389/fchem.2015.00034](http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1208&name=plant_metabolism_and_chemodiversity&ART_DOI=10.3389/fchem.2015.00034) >.

OSTERHAGE, C.; SCHWIBBE, M.; KÖNIG, G.; WRIGHT, A. Differences between marine and terrestrial Phoma species as determined by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical analysis**, v. 11, n. 5, p. 288-294, 2000. ISSN 1099-1565.

PAVICEVIC, Z.; LESLIE, C. C.; MALIK, K. U. cPLA2 phosphorylation at serine-515 and serine-505 is required for arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 4, p. 724-737, 2008. ISSN 0022-2275.

PEREIRA, V. C. Atividade agonista do extrato de *Tabebuia heptaphylla* sobre os receptores proliferadores peroxissomais Alfa (PPAR $\alpha$ ), Beta/Delta (PPAR $\beta/\delta$ ) e Gama (PPAR $\gamma$ ). **Pós-Graduação em Ciências da Saúde**, Brasília, v. Mestre, 2008.

POLIKANDRIOTIS, J. A.; MAZZELLA, L. J.; RUPNOW, H. L.; HART, C. M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Ligands Stimulate Endothelial Nitric Oxide Production Through Distinct Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ -Dependent Mechanisms. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 9, p. 1810-1816, 2005. ISSN 1079-5642.

POULSEN, L. L. C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2012. Elsevier. p.631-639.

RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656812000137> >.

REITERER, G.; TOBOREK, M.; HENNIG, B. Quercetin Protects Against Linoleic Acid-Induced Porcine Endothelial Cell Dysfunction. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p.

771-775, April 1, 2004 2004. Disponível em: <  
<http://jn.nutrition.org/content/134/4/771.abstract>>.

RIBEIRO, R. C. J.; FENG, W.; WAGNER, R. L.; COSTA, C. U. H. R. M.; PEREIRA, A. C.; APRILETTI, J. W.; FLETTERICK, R. J.; BAXTER, J. D. Definition of the Surface in the Thyroid Hormone Receptor Ligand Binding Domain for Association as Homodimers and Heterodimers with Retinoid X Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14987-14995, May 4, 2001 2001. Disponível em: <  
<http://www.jbc.org/content/276/18/14987.abstract>>.

RISÉRUS, U.; SPRECHER, D.; JOHNSON, T.; OLSON, E.; HIRSCHBERG, S.; LIU, A.; FANG, Z.; HEGDE, P.; RICHARDS, D.; SAROV-BLAT, L. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\delta$  promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 332-339, 2008. ISSN 0012-1797.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 837-841, 1988. ISSN 0006-2952. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006295288901694>>.

ROCHETTE, L.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 9, p. 2709-2729, 2014. ISSN 0304-4165.

RODRIGUES, K. F.; COSTA, G. L.; CARVALHO, M. P.; EPIFANIO, R. N. D. A. Evaluation of extracts produced by some tropical fungi as potential cholinesterase inhibitors. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1617-1621, 2005. ISSN 0959-3993.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F., JR.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytol**, v. 182, n. 2, p. 314-30, 2009. ISSN 1469-8137 (Electronic). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19236579](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19236579)>.

ROSEN, EVAN D.; SPIEGELMAN, BRUCE M. What We Talk About When We Talk About Fat. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 20-44, 2014. ISSN 0092-8674. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867413015468>>.

SALAM, N. K.; HUANG, T. H. W.; KOTA, B. P.; KIM, M. S.; LI, Y.; HIBBS, D. E. Novel PPAR-gamma Agonists Identified from a Natural Product Library: A Virtual Screening, Induced-Fit Docking and Biological Assay Study. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 71, n. 1, p. 57-70, 2008. ISSN 1747-0285. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00606.x>>.

SATO, M.; TAI, T.; NUNOURA, Y.; YAJIMA, Y.; KAWASHIMA, S.; TANAKA, K. Dehydrotrametenolic Acid Induces Preadipocyte Differentiation and Sensitizes Animal Models of Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus to Insulin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 81-86, 2002.

SCHÜMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of biotechnology**, v. 124, n. 4, p. 690-703, 2006. ISSN 0168-1656.

SCULLY, T. Diabetes in numbers. **Nature**, v. 485, n. 7398, p. S2-S3, 2012. ISSN 0028-0836.

SEGAWA, Y.; YOSHIMURA, R.; HASE, T.; NAKATANI, T.; WADA, S.; KAWAHITO, Y.; KISHIMOTO, T.; SANO, H. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. **The Prostate**, v. 51, n. 2, p. 108-116, 2002. ISSN 1097-0045.

SILVA, C. A. D. M. Estudo químico biomonitorado de extratos das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. para a identificação de agonista do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais-gama (PPAR $\gamma$ ). 2015.

SINGH, S.; LOKE, Y. K.; FURBERG, C. D. Long-term Risk of Cardiovascular Events With Rosiglitazone. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 10, p. 1189-1195, September 12, 2007. Disponível em: < <http://jama.ama-assn.org/content/298/10/1189.abstract> >.

SOUZA, P. M. D.; BITTENCOURT, M. L. D. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M. D.; ALMEIDA, R. P. C. D.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FERREIRA FILHO, E. X.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337-346, 2015. ISSN 1517-8382. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822015000200337&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000200337&nrm=iso) >.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, April 9, 1993. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/260/5105/214.abstract> >.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 4, p. 491-502, December 1, 2003. Disponível em: < <http://mmb.asm.org/cgi/content/abstract/67/4/491> >.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/np030397v> >.

SUN, Y.; ALEXANDER, S.; KENDALL, D.; BENNETT, A. Cannabinoids and PPAR $\alpha$  signalling. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 6, p. 1095, 2006. ISSN 0300-5127.

SUTTON, B.; BAILEY, J.; JEGER, M. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. **Colletotrichum: biology, pathology and control**, p. 1-26, 1992. ISSN 0851987567.

TALCHAI, C.; XUAN, S.; LIN, HUA V.; SUSSEL, L.; ACCILI, D. Pancreatic  $\beta$  Cell Dedifferentiation as a Mechanism of Diabetic  $\beta$  Cell Failure. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1223-1234,

2012. ISSN 0092-8674. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412009403>>.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, October 1, 2011. Disponível em: <  
<http://mbe.oxfordjournals.org/content/28/10/2731.abstract>>.

TANAKA, A.; CHRISTENSEN, M. J.; TAKEMOTO, D.; PARK, P.; SCOTT, B. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus–perennial ryegrass mutualistic interaction. **The Plant Cell Online**, v. 18, n. 4, p. 1052-1066, 2006. ISSN 1040-4651.

TEISSIER, E.; NOHARA, A.; CHINETTI, G.; PAUMELLE, R.; CARIOU, B.; FRUCHART, J. C.; BRANDES, R. P.; SHAH, A.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptor {alpha} induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-{alpha} activation properties. **Circulation research**, v. 95, n. 12, p. 1174, 2004.

TIANPANICH, K.; PRACHYA, S.; WIYAKRUTTA, S.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Isocoumarins and a Phthalide from the Endophytic Fungus *Colletotrichum* sp. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 1, p. 79-81, 2011/01/28 2010. ISSN 0163-3864. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1021/np1003752>>. Acesso em: 2013/11/20.

TIKKAINEN, M.; HÄKKINEN, A.-M.; KORSHENINNIKOVA, E.; NYMAN, T.; MÄKIMATTILA, S.; YKI-JÄRVINEN, H. Effects of Rosiglitazone and Metformin on Liver Fat Content, Hepatic Insulin Resistance, Insulin Clearance, and Gene Expression in Adipose Tissue in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 8, p. 2169-2176, August 1, 2004 2004. Disponível em: <  
<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/53/8/2169.abstract>>.

TONTONOZ, P.; GRAVES, R. A.; BUDAVARI, A. I.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; LUI, M.; HU, E.; TEMPST, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR7 and RXRa. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 25, p. 5628-5634, January 1, 1994 1994. Disponível em: <  
<http://nar.oxfordjournals.org/content/22/25/5628.abstract>>.

UDAYANGA, D.; LIU, X.; MCKENZIE, E. H.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 189-225, 2011. ISSN 1560-2745.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; RUDGE, M. V.; PADOVANI, C. R.; CALDERON, I. M. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 116, n. 1, p. 131-7, Feb 28 2008. ISSN 0378-8741 (Print). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18155864](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18155864)>.

WANG, F.-W. Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 1, p. 72-76, 2012.

ISSN 1875-5364. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875536412600168>>.

WANG, L.-W.; XU, B.-G.; WANG, J.-Y.; SU, Z.-Z.; LIN, F.-C.; ZHANG, C.-L.; KUBICEK, C. P. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1231-1239, 2012. ISSN 0175-7598.

WANG, L.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-M.; BLUNDER, M.; LIU, X.; MALAINER, C.; BLAZEVIC, T.; SCHWAIGER, S.; ROLLINGER, J. M.; HEISS, E. H.; SCHUSTER, D.; KOPP, B.; BAUER, R.; STUPPNER, H.; DIRSCH, V. M.; ATANASOV, A. G. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ): a review. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 73-89, 2014. ISSN 0006-2952. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295214004249>>.

WATKINS, P. B.; WHITCOMB, R. W. Hepatic dysfunction associated with troglitazone. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 916-917, 1998. ISSN 0028-4793.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? **Genes & development**, v. 27, n. 3, p. 234-250, 2013. ISSN 0890-9369.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: <  
<http://www.jci.org/articles/view/19451>>.

XU, H. E.; LAMBERT, M. H.; MONTANA, V. G.; PLUNKET, K. D.; MOORE, L. B.; COLLINS, J. L.; OPLINGER, J. A.; KLIEWER, S. A.; GAMPE, R. T.; MCKEE, D. D.; MOORE, J. T.; WILLSON, T. M. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13919-13924, November 20, 2001 2001. Disponível em: <  
<http://www.pnas.org/content/98/24/13919.abstract>>.

YIN, W.; KELLER, N. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 329-339, 2011/06/01 2011. ISSN 1225-8873. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12275-011-1009-1>>.

YKI-JÄRVINEN, H. Thiazolidinediones. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 11, p. 1106-1118, 2004. Disponível em: <  
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra041001>>.

YUAN, W. H.; LIU, M.; JIANG, N.; GUO, Z. K.; MA, J.; ZHANG, J.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Guignardones A–C: Three meroterpenes from *Guignardia mangiferae*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2010, n. 33, p. 6348-6353, 2010. ISSN 1099-0690.

YUAN, X.; ZHANG, Z.; GONG, K.; ZHAO, P.; QIN, J.; LIU, N. Inhibition of Reactive Oxygen Species/Extracellular Signal-Regulated Kinases Pathway by Pioglitazone Attenuates

Advanced Glycation End Products-Induced Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells in Rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 5, p. 618-623, 2011. ISSN 0918-6158.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Nat Prod Rep**, v. 23, n. 5, p. 753-71, Oct 2006. ISSN 0265-0568 (Print) 0265-0568 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17003908](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17003908)>.

ZHOU, X.; ZHU, H.; LIU, L.; LIN, J.; TANG, K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1707-1717, 2010. ISSN 0175-7598.

ZIMMERMAN, B. R. Sulfonylureas. **Endocrinology & Metabolism Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 511-522, 1997. ISSN 0889-8529. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889852905702644>>.

ZUNINO, S. Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products. **J Nutr**, v. 139, n. 9, p. 1794S-800S, Sep 2009. ISSN 1541-6100 (Electronic). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19625702](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19625702)>.