



Análisis *in silico* del agonismo de ácidos hidroxicinámicos al Receptor Gamma Activado por Proliferador de Peroxisomas

Luis Francisco García-Manríquez¹, Juan Carlos Mateos-Díaz² y Hugo Esquivel-Solis^{*}

¹Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos, Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara, México.

²Biotecnología industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Zapopan, México.

*Autor de correspondencia: hesquivel@ciatej.mx

Resumen

Palabras clave:

ácido hidroxicinámico, agonistas parciales, farmacóforo, fibrosis, PPAR γ .

La activación dependiente de ligandos del Receptor Gamma Activado por Proliferador de Peroxisomas (PPAR γ) puede revertir un tejido fibrótico a su estado sano. El objetivo del presente trabajo fue analizar con métodos computacionales (in silico) el potencial agonismo del ácido cafeico, ferúlico y sinapínico de esta diana terapéutica. Se realizó el acoplamiento molecular con el sitio de unión de ligandos (LBD, por sus siglas en inglés) de la proteína, en el que se revelaron los aminoácidos con los cuales interactúan los ácidos antes mencionados y sus energías de interacción. El análisis mostró que el ácido cafeico interactúa con la hélice alfa 12 (H12), dentro de unos rangos de energía de -5.3 a -6.3 kcal/mol, el ácido ferúlico con la hélice alfa 3 (H3) dentro de unos rangos de energía entre -5.5 y -6.3 kcal/mol, el ácido sinapínico con la hélice alfa 3 (H3) dentro de un rango de energía de -5.6 a -5.7 kcal/mol, que corresponden al sitio de unión de ligandos (LBD) de activación parcial de la proteína. Basado en estos resultados, el ácido sinapínico



resultó ser el mejor candidato para ser evaluado como agonista selectivo para una activación parcial, algo que se busca en el diseño de fármacos, ya que una activación total de esta proteína conlleva efectos secundarios fisiológicos como osteoporosis, acumulación de lípidos en exceso, cáncer, entre otros.

Introducción

La fibrosis es un proceso de cicatrización crónica del tejido que comprende la transdiferenciación de las células epiteliales a miofibroblastos (MFB), células contráctiles que realizan la producción excesiva de proteínas de matriz extracelular (MEC), principalmente colágena, cuya acumulación a largo plazo desemboca en la degeneración y falla del órgano involucrado. El Factor de Crecimiento Transformante beta ($TGF\beta$) promueve el proceso de transdiferenciación a través de vías de señalización llamadas *mothers against decapentaplegic* (SMADs), cinasas extracelulares reguladas por cinasas (ERK), proteincinasas activadas por mitógenos (MAPK) y p38-MAPK. La unión de $TGF\beta$ a su receptor estimula la formación del heterodímero SMAD2/3 y el complejo con SMAD4 que se traslada al núcleo e inicia la transcripción de los genes profibróticos fibronectina, colágeno tipo 1 (Col-1) y alfa actina de músculo liso (α -SMA), biomarcadores específicos de un tejido fibrótico (Pellicoro, Ramachandran, Iredale, & Fallowfield, 2014).

Las fibras de estrés de α -SMA son responsables de la actividad contráctil del MFB, la cual es al menos dos veces mayor que los fibroblastos que no las expresan (Stopa *et al.*, 2000). La transdiferenciación del MFB requiere de cambios coordinados en la actividad de varios factores de transcripción, entre ellos el receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas ($PPAR\gamma$), cuya presencia y actividad en el MFB disminuye hasta desaparecer casi por completo. $PPAR\gamma$ es un factor de transcripción inducible por ligandos, miembro de la superfamilia de receptores nucleares PPAR que, al activarse, se dimerizan con el receptor retinoide X (RXR) y se trasladan al núcleo. El complejo RXR- $PPAR\gamma$ se une a los elementos regulatorios responsivos a PPAR (PRRE) del ADN, secuencias potenciadoras de la transcripción presentes en genes relacionados a la inmunomodulación y el metabolismo de lípidos, entre otros (Ahmadian *et al.*, 2013; Barish, Narkar, & Evans, 2006; Evans, Barish, & Wang, 2004).

La activación de $PPAR\gamma$ suprime la síntesis de Col-1 y α -SMA y la activación, proliferación y migración de los MFBs al inhibir la unión del complejo SMAD2/3/4 a sus sitios de unión en el ADN (Wang *et al.*, 2011). SMAD2/3/4 se une a los Elementos de Unión a SMAD (SBEs) y Elementos de Inhibición por $TGF\beta$ (TIEs), presentes en el promotor del gen de $PPAR\gamma$, bloqueando recíprocamente su ex-



presión y actividad en el MFB (Lakshmi, Reddy, & Reddy, 2017). De tal forma que la activación de PPAR γ resulta ser una estrategia prometedora para el diseño de terapias antifibróticas. Aunado a lo anterior, dentro de la estructura de PPAR γ existen sitios alostéricos que se pretenden evitar para lograr cierto perfil de activación; la hélice alfa 12 (H12) es el principal de ellos (Capelli *et al.*, 2016a), ya que este sitio induce una activación total de esta proteína, cuyos efectos secundarios se discuten más adelante. Por esta razón, un análisis estructural de interacción por medio de acoplamiento molecular resulta prominente para realizar un cribado y así guiar el posible trabajo posterior de evaluarlos en células.

Los ácidos hidroxicinámicos

Al ser PPAR γ una proteína diana terapéutica, la búsqueda de moléculas agonistas de este factor ha suscitado gran interés. Las tiazolidinedionas (TZD) son fármacos que se comportan como agonistas totales de PPAR γ , lo cual conlleva efectos secundarios como acumulación de lípidos, hipertensión y osteoporosis (Capelli *et al.*, 2016a). Por esta razón, la comercialización de las TZD se ha visto restringida. El enfoque actual pretende encontrar agonistas parciales de PPAR γ , que realicen su activación, pero sin mostrar los efectos indeseados, mediante la interacción con sitios alostéricos del blanco terapéutico.

Los ácidos hidroxicinámicos (HACs) son una familia de compuestos fenólicos de origen vegetal, cuyos beneficios reportados principalmente para la salud son de naturaleza antioxidante (De Felipe., 2023). Dentro de esta familia el ácido ferúlico (AF), el ácido sinapínico (AS), así como el fenetil éster del ácido cafeico (CAPE) han despertado interés por haber mostrado activación de PPAR γ y actividad antifibrótica (Balupillai *et al.*, 2015b; Kanagalakshmi *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2018; Özyurt *et al.*, 2004; Raish *et al.*, 2018; Senthil *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2023). Los HACs son compuestos polifenólicos presentes naturalmente en una gran variedad de especies vegetales y su estructura ha servido de base para el diseño de moléculas sintéticas. El objetivo del presente trabajo fue realizar el análisis computacional (in silico) del farmacóforo de PPAR γ con estos compuestos, para determinar los residuos de aminoácidos con los que interaccionan y determinar la fuerza de activación de PPAR γ (parcial o completa) y predecir su efecto agonista no tóxico.



Materiales y Métodos

El análisis de acoplamiento molecular se llevó a cabo usando el programa PyMol 1.3 y los complementos Autodock/Vina 2.1.1:0.9.2. Las moléculas usadas como ligandos fueron: ácido ferúlico (PubChem ID: 445858, Fig. 1A); ácido cafeico (PubChem ID: 689043, Fig. 1B) y ácido sinapínico (PubChem ID: 637775, Fig. 1C). El modelo de PPAR γ empleado (resolución 2.00 Angstroms, Å) fue la estructura del cristal de la proteína del Protein Data Bank 5YCP (Fig.2). Las coordenadas del sitio de unión de ligandos de PPAR γ para el acoplamiento fueron: X=22.96, Y=-22.91, Z=-0.94, mismas que se obtuvieron al identificar la ubicación espacial de la molécula rosiglitazona dentro del archivo PDB de PPAR γ usado. Posteriormente se eliminó esta molécula y se delimitó una cuadrícula cúbica de 40 Å por lado como área para realizar el acoplamiento. El rango estándar de diferencia en la energía de activación se consideró en 4 kcal/mol, mientras que el de exhaustividad de 8. Se decidió utilizar este último valor debido a que es el valor estándar por defecto y el incremento de la exhaustividad, si bien está relacionado con resultados más consistentes, no garantiza resultados más exactos, y el costo de recursos computacionales también incrementa proporcionalmente (Forli *et al.*, 2016). De igual manera se agregaron las cargas de Kollman e hidrógenos polares, mientras que se removieron las moléculas de agua presentes en el archivo de la proteína 3D.

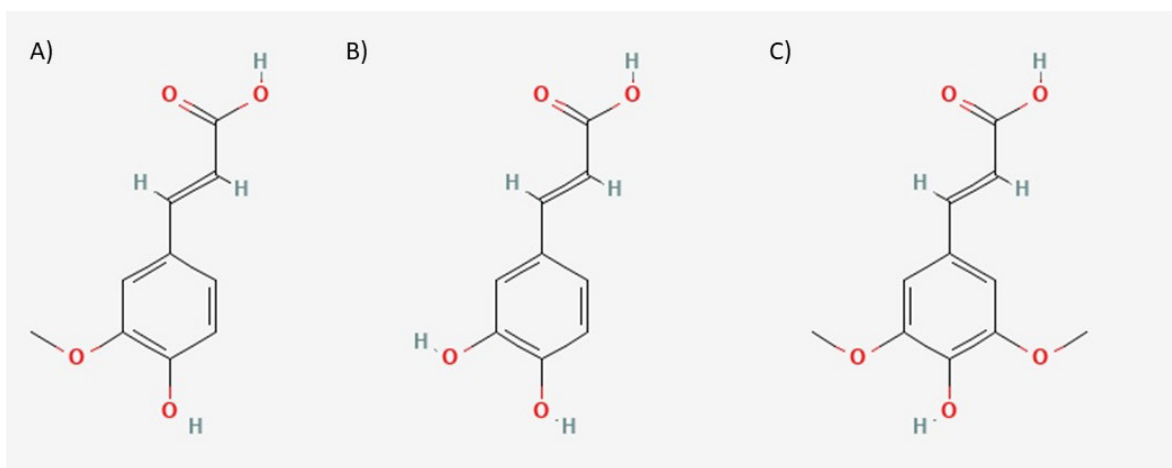


Figura 1. Moléculas empleadas en el análisis de acoplamiento molecular. A) Ácido Ferúlico. B) Ácido Cafeico. C) Ácido Sinapínico

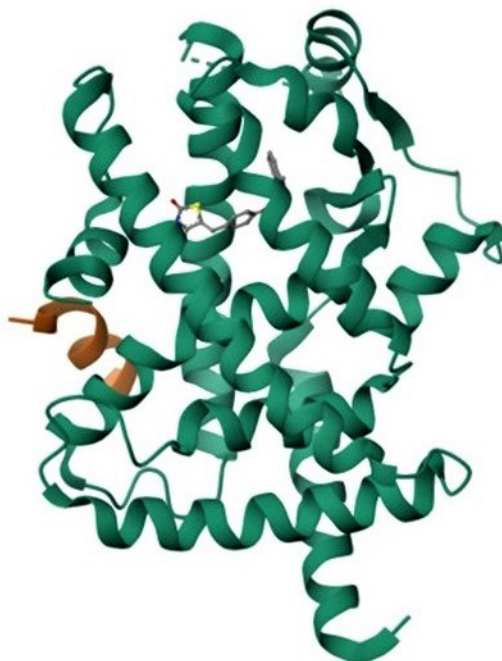


Figura 2. PPAR γ co-cristalizado con rosiglitazona, entrada 5YCP del Protein Data Bank

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestra el resumen de los residuos de interacción en el sitio de unión de ligandos, la distancia de interacción entre el ligando y el residuo en Å y las energías (fuerza) de interacción (kcal/mol). Se consideraron uniones las distancias menores a 4 Å(cita). Se obtuvieron varios modelos de interacción proteína - ligando, denominadas poses (outputs), de las cuales se muestran solamente las primeras tres. Las interacciones de los tres compuestos se dan principalmente por puentes de hidrógeno, en específico a través de los grupos hidroxilo (OH) y metilo (CH₃) en las partes externas de los compuestos.

En las figuras 3, 4 y 5 se muestran las imágenes de la mejor pose (output 1) de los acoplamientos para los tres compuestos. Para el caso del ácido ferúlico (AF) (Fig. 3) se resalta la interacción con los residuos Ser289, Cys285 y Arg288. Estos pertenecen a la región de la hélice 3 (H3), cuya estabilización mediante la interacción con los residuos Arg288 y Ser342 ha sido identificada como crucial para obtener un perfil de agonismo parcial de PPAR γ (Capelli *et al.*, 2016b). Se observa también que el AF interacciona con Tyr327. Análisis estructurales han mencionado que para evitar una activación total se debe evitar la hélice 12 (H12) (Brust *et al.*, 2018; Capelli *et al.*, 2016b; Itoh *et al.*, 2008).



Maralikumar *et al.* (2017) mencionan a Ser289 en la H3 y Tyr327 en la H4 como importantes al momento de estabilizar la H12 y su intervención en un perfil de agonismo total. Sin embargo, Guasch *et al.* (2013) reportaron compuestos de agonismo parcial que incluyen estos dos aminoácidos, por lo que se sugiere que su papel no es determinante para inducir una activación total de PPAR γ . Esta actividad del ácido ferúlico es consistente también con lo reportado por Senthil *et al.* (2021) y Ballav *et al.* (2022), donde se le reporta como agonista parcial de PPAR γ .

En cuanto al ácido cafeico (AC) (Fig.4), se resalta su interacción con residuos, principalmente de la H3: Cys285 y Ser289; de la H4: Lys319 y Tyr327. No obstante, se observa una interacción con la Glu471 que corresponde a la H12 (Frkic, *et al.*, 2018), la cual, como ya se mencionó, se pretende evitar. Para el ácido sinapínico (AS) (Fig. 5) se resalta que interacciona, en su mayoría, con residuos de la H3, Ser289 y Arg288, así como Tyr327 de la H4. De igual manera, se observa que es la única molécula de las tres que arroja una posible interacción con estos tres aminoácidos de forma simultánea en el output 2 con la misma energía de interacción que con el output 1 (-5.7 kcal/mol), por lo cual resulta el más prometedor para una evaluación *in vitro* como un agonista parcial de PPAR γ .

Tabla 1. Resultados de interacción de ácidos hidroxicinámicos con PPAR γ

Ácido Ferúlico			
Output	Residuo	Distancia (Angstroms)	Energía (kcal/mol)
1	Cys285/Arg288	3.1/2.5/3.2	-6.3
2	Tyr327/Arg288	3.0/2.8/3.2	-5.7
3	Tyr327/Ser289	2.0/3.2	-5.5
Ácido Cafeico			
Output	Residuo	Distancia (Angstroms)	Energía (kcal/mol)
1	Ser289/Cys285	2.5-2.8/2.1	-6.0
2	Lys319/Glu471	1.9/2.0	-5.4
3	Tyr327	2.2/2.5	-5.3
Ácido Sinapínico			
Output	Residuo	Distancia (Angstroms)	Energía (kcal/mol)
1	Tyr327/Ser289	2.0/2.3	-5.7
2	Tyr327/Ser289/Arg288	2.2/2.3/2.1	-5.7
3	Tyr327/Ser289	2.2/2.2	-5.6

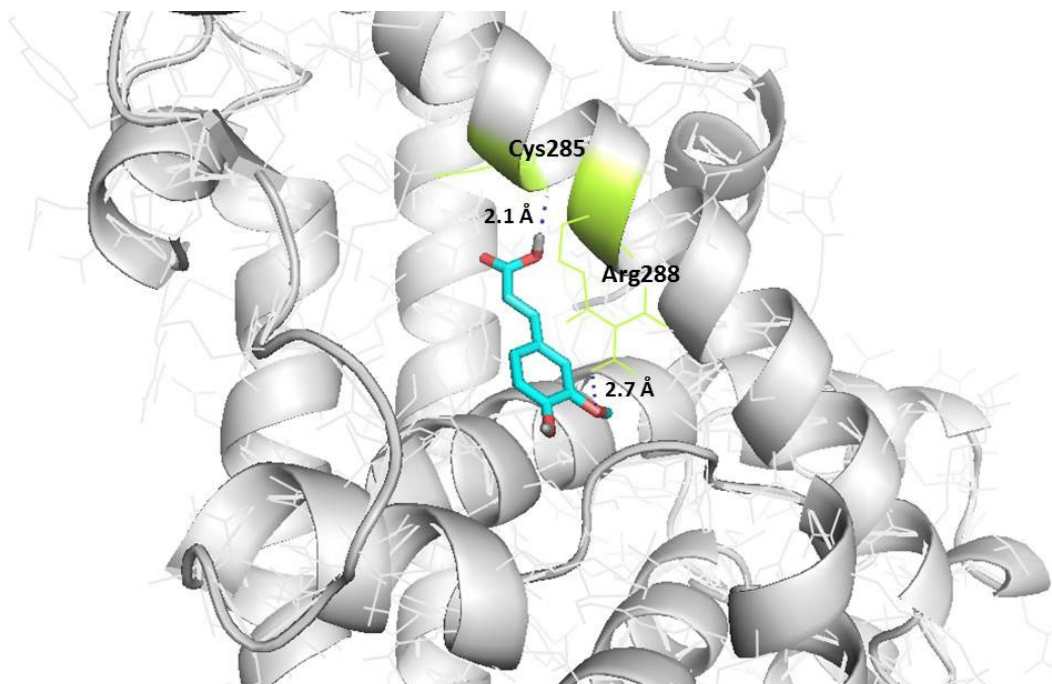


Figura 3. Output 1 del ácido ferúlico interactuando con el sitio de unión de ligandos (LBD) de PPAR γ

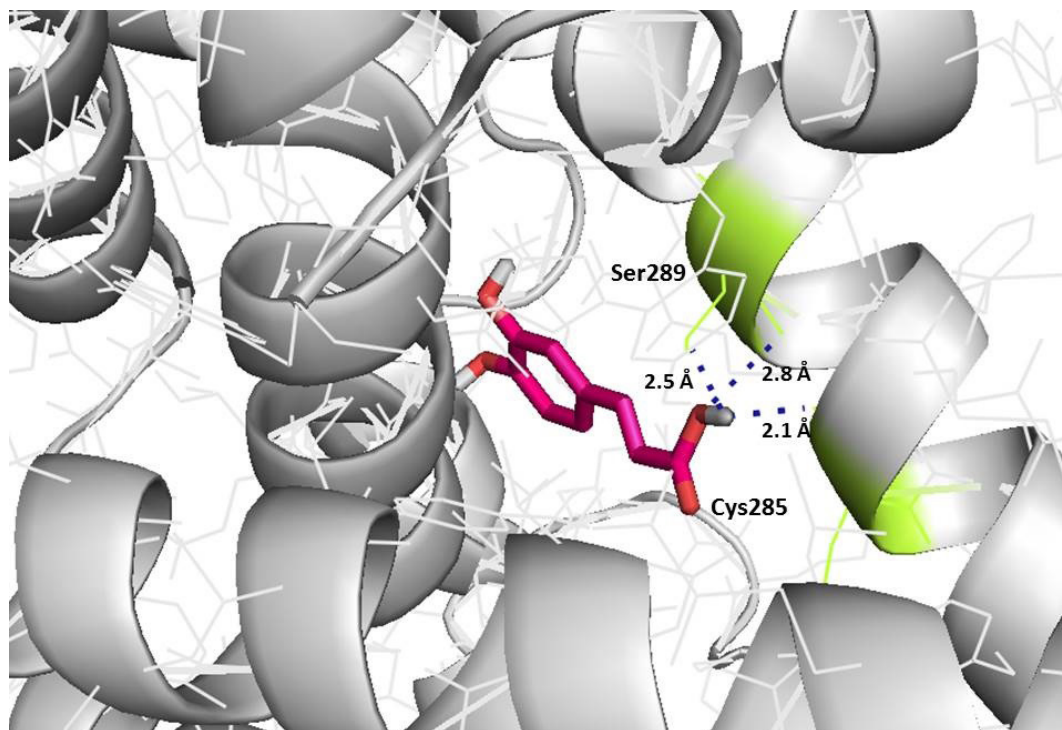


Figura 4. Output 1 del ácido caféico interactuando con el sitio de unión de ligandos (LBD) de PPAR γ

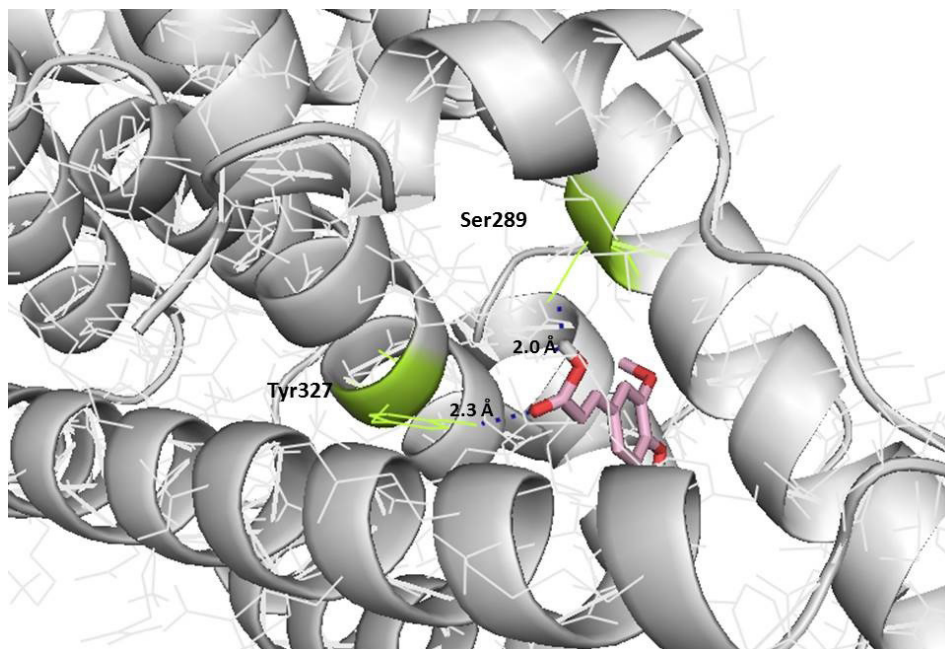


Figura 5. Output 1 del ácido sinapínico interactuando con el sitio de unión de ligandos (LBD) de PPAR γ

Conclusiones

El ácido ferúlico es una molécula que ha sido reportada con potenciales antifibróticos y como una posible agonista parcial de PPAR γ . En el presente trabajo se observó su interacción con la hélice 3 y no con la hélice 12, algo deseable en los agonistas parciales. Por otro lado, el ácido cafeico presentó interacciones con este último sitio que se pretende evitar y que está asociado al agonismo total. El ácido sinapínico resultó ser el mejor candidato para ser evaluado como agonista parcial, ya que no interactúa con la H12, sino simultáneamente con tres aminoácidos cruciales de la H3, a diferencia del ácido ferúlico que solo lo hace con dos.

La importancia de esto dentro de un contexto social es el potencial de contribuir a la reducción de enfermedades crónicas que tienen en el centro un aspecto como la desregulación de PPAR γ : como la fibrosis hepática, renal, entre otras.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un potencial conflicto de interés.



Referencias

- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). Ppar γ signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nature Medicine*, *19*(5), 557–566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>
- Ballav, S., Biswas, B., Sahu, V. K., Ranjan, A., & Basu, S. (2022). PPAR- γ partial agonists in disease-fate decision with special reference to cancer. *Cells (Basel, Switzerland)*, *11*(20), 3215. <https://doi.org/10.3390/cells11203215>
- Balupillai, A., Prasad, R. N., Ramasamy, K., Muthusamy, G., Shanmugham, M., Govindasamy, K., & Gunaseelan, S. (2015a). Caffeic Acid Inhibits UVB-induced Inflammation and Photocarcinogenesis Through Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ in Mouse Skin. *Photochemistry and Photobiology*, *91*(6), 1458–1468. <https://doi.org/10.1111/php.12522>
- Barish, G. D., Narkar, V. A., & Evans, R. M. (2006). PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, *116*(3), 590–597. <https://doi.org/10.1172/JCI27955>
- Brust, R., Shang, J., Fuhrmann, J., Mosure, S. A., Bass, J., Cano, A., Heidari, Z., Chrisman, I. M., Nemetchek, M. D., Blayo, A.-L., Griffin, P. R., Kamenecka, T. M., Hughes, T. S., & Kojetin, D. J. (2018). A structural mechanism for directing corepressor-selective inverse agonism of PPAR γ . *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07133-w>
- Capelli, D., Cerchia, C., Montanari, R., Loiodice, F., Tortorella, P., Laghezza, A., Cervoni, L., Pochetti, G., & Lavecchia, A. (2016). Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep34792>
- De Felipe, F. L. (2023). Revised aspects into the molecular bases of hydroxycinnamic acid metabolism in lactobacilli. *Antioxidants*, *12*(6), 1294. <https://doi.org/10.3390/antiox12061294>
- Evans, R. M., Barish, G. D., & Wang, Y. X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine*, *10*(4), 355–361. <https://doi.org/10.1038/nm1025>
- Itoh, T., Fairall, L., Amin, K., Inaba, Y., Szanto, A., Balint, B. L., Nagy, L., Yamamoto, K., & Schwabe, J. W. R. (2008). Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(9), 924–931. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1474>



- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein–Ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock Suite. *Nature Protocols*, *11*(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>
- Frkic, R. L., Marshall, A. C., Blayo, A.-L., Pukala, T. L., Kamenecka, T. M., Griffin, P. R., & Bruning, J. B. (2018). PPAR γ in complex with an antagonist and inverse agonist: A tumble and trap mechanism of the activation helix. *iScience*, *5*, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.06.012>
- Guasch, L., Sala, E., Valls, C., Blay, M., Mulero, M., Arola, L., Pujadas, G., & Garcia-Vallvé, S. (2011). Structural insights for the design of new PPAR-gamma partial agonists with high binding affinity and low transactivation activity. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *25*(8), 717–728. <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9446-9>
- Kanagalakshmi A, Agilan B, Mohana S, Ananthakrishnan D, Velmurugan D, Karthikeyan R, Ganesan M, Srithar G and Rajendra Prasad N. Ferulic acid modulates ultraviolet-B radiation mediated inflammatory signaling in human dermal fibroblasts. *Journal of Research in Biology* (2014) *4*(8):1505-1515.
- Lakshmi, S. P., Reddy, A. T., & Reddy, R. C. (2017). Transforming growth factor β suppresses peroxisome proliferator-activated receptor γ expression via both SMAD binding and novel TGF- β inhibitory elements. *Biochemical Journal*, *474*(9), 1531–1546. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160943>
- Mu, M., Zuo, S., Wu, R.-M., Deng, K.-S., Lu, S., Zhu, J.-J., Zou, G.-L., Yang, J., Cheng, M.-L., & Zhao, X.-K. (2018). Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation via inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, *12*, 4107–4115. <https://doi.org/10.2147/dddt.s186726>
- Muralikumar, S., Vetrivel, U., Narayanasamy, A., & N. Das, U. (2017). Probing the intermolecular interactions of PPAR γ -LBD with polyunsaturated fatty acids and their anti-inflammatory metabolites to infer most potential binding moieties. *Lipids in Health and Disease*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0404-3>
- Özyurt, H., Söğüt, S., Yıldırım, Z., Kart, L., Iraz, M., Armutçu, F., Temel, İ., Özen, S., Uzun, A., & Akyol, Ö. (2004). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *339*(1–2), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.09.015>
- Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P., & Fallowfield, J. A. (2014). Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature Reviews Immunology*, *14*(3), 181–194. <https://doi.org/10.1038/nri3623>



- Raish, M., Ahmad, A., Ahmad Ansari, M., Ahad, A., Al-Jenoobi, F. I., Al-Mohizea, A. M., Khan, A., & Ali, N. (2018). Sinapic acid ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, *108*, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.032>
- Senthil, R., Sakthivel, M., & Usha, S. (2021). Structure-based drug design of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibitors: ferulic acid and derivatives. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, *39*(4), 1295–1311. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1740790>
- Shi, Y., Shi, L., Liu, Q., Wang, W., & Liu, Y. (2023). Molecular mechanism and research progress on pharmacology of ferulic acid in liver diseases. *Frontiers in pharmacology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1207999>
- Stopa, M., Anhufer, D., Terstegen, L., Gatsios, P., Gressner, A. M., & Dooley, S. (2000). Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor β (TGF- β)-induced activation of Smad7: The TGF- β response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(38), 29308–29317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003282200>
- Wang, Z., Xu, J. P., Zheng, Y. C., Chen, W., Sun, Y. W., Wu, Z. Y., & Luo, M. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits hepatic fibrosis in rats. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, *10*(1), 64–71. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(11\)60009-X](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(11)60009-X)

