

ADRIANA MARIA PATARROYO VARGAS

**MODELAGEM MOLECULAR, ANÁLISES DE *DOCKING* DE SERINO-
PROTEASES INTESTINAIS DE *Anticarsia gemmatalis* E USO DE PEPTÍDEOS
SINTÉTICOS NA CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE INIBIÇÃO
ENZIMÁTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

ADRIANA MARIA PATARROYO VARGAS

**MODELAGEM MOLECULAR, ANÁLISES DE *DOCKING* DE SERINO-
PROTEASES INTESTINAIS DE *Anticarsia gemmatalis* E USO DE PEPTÍDEOS
SINTÉTICOS NA CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE INIBIÇÃO
ENZIMÁTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2015.

Prof^ª. Camila Rocha da Silva

Prof. Gustavo Costa Bressan

Prof. Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa

Prof. Wellington Garcia Campos

Prof^ª. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

Ao meu marido Emerson e ao meu filho Augusto Rafael

**"Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há também aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol."
(Pablo Picasso)**

Dedico.

Ao meu pai, Joaquin Patarroyo e a minha mãe, Marlene Vargas

**Minha força, minha inspiração
Luz no meu caminho que me guia e me dá direção.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar viver esse momento.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de engrandecer meus estudos.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, por permitir a realização do trabalho experimental.

À Fundacion Instituto de Immunologia de Colombia (FIDIC), em especial ao Dr. Manuel Alfonso Patarroyo, chefe do Departamento de Biologia Molecular e Immunologia, pela oportunidade de treinamento e realização do trabalho de modelagem molecular e estudo de *docking*.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCT-IPP) pelo apoio financeiro durante o trabalho.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, minha orientadora, pela confiança depositada em mim e principalmente pelo apoio na certeza de que eu conseguiria chegar até aqui. Sinto-me honrada em ser sua orientada.

Às minhas irmãs, Bel, Angi e Carol os meus alicerces. Somos “4ever”!!

À minha vó e meus sobrinhos Amanda e Luca por tornarem mais leves meus momentos difíceis.

Ao meu cunhado Fer pelo carinho e apoio. Por toda a sua história de vida desejo que você tenha a oportunidade dessa conquista. Você merece!

À professora Camila Rocha da Silva, pela amizade, por adotar de coração e alma seu “sobrinho” Augusto, por me apoiar nos momentos difíceis durante toda a minha trajetória e pelas sugestões e ideias que enriqueceram esse trabalho. “Tia Cacá” você já é parte dessa família!

Aos amigos Adriane Franco e Ricardo Zatti por sempre acreditarem em mim e me incentivarem ao longo dessa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do BIOAGRO pelos momentos de descontração e de apoio ao longo desse trabalho.

Ao Carlos Fernando Suárez Martínez por todos os ensinamentos e ajuda na modelagem molecular e nos estudos de *docking*.

Ao Fabrício Valente pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Eduardo Monteiro, pela amizade e pela prontidão em ajudar.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o sucesso desse trabalho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Adriana Maria Patarroyo Vargas, filha de Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo e Marlene Isabel Vargas Vilorio, nasceu no dia 12 de março de 1980 em Viçosa, Minas Gerais.

Em outubro de 2002 iniciou o curso de Farmácia na Universidade Federal de Minas Gerais graduando-se em julho de 2006. Em agosto de 2007 obteve a Habilitação em Farmácia Industrial pela mesma universidade.

Em agosto de 2009 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, defendendo dissertação em 31 de janeiro de 2011, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

No mesmo ano ingressou no Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em 27 de fevereiro de 2015, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	Xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	Xiv
RESUMO.....	Xv
ABSTRACT.....	Xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo Geral.....	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1. Soja.....	7
3.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae).....	8
3.3. Interação planta-inseto.....	11
3.4. Proteases.....	13
3.4.1. Serino-proteases.....	15
3.5. Inibidores de Proteases.....	18
3.6. Cinética Enzimática.....	24
3.7. Bioinformática estrutural aplicada ao estudo de enzimas.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO 1.....	41
RESUMO.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1. Obtenção das sequências das serino-proteases intestinais de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	44
2.2. Modelagem molecular por homologia.....	45
2.3. Estudos de <i>docking</i> com diferentes peptídeos ligantes.....	45

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1. Modelagem por homologia.....	47
3.2. Estudos de <i>docking</i> com os modelos preditos das serino-proteases intestinais de <i>A. gemmatalis</i>	55
a) Estudo de <i>docking</i> do ligante Gor 1 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3.....	56
b) Estudo de <i>docking</i> do ligante Gor 2 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3.....	61
c) Estudo de <i>docking</i> do ligante Gor 3 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3.....	65
d) Estudo de <i>docking</i> do ligante Gor 4 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3.....	67
e) Estudo de <i>docking</i> do ligante Gor 5 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3.....	71
f) Estudo de <i>docking</i> do ligante Gor K com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3.....	75
g) Estudo de <i>docking</i> do ligante Gor R com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3.....	78
4. CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
CAPÍTULO 2.....	86
RESUMO.....	87
1. INTRODUÇÃO.....	88
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.1. Criação da lagarta da soja.....	90
2.2. Preparo da dieta.....	91
2.3. Extração do intestino e obtenção do extrato proteico.....	91
2.4. Determinação da concentração de proteína e determinação das atividades enzimáticas.....	92
2.5. Cromatografia de afinidade.....	92
2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	93
2.7. Caracterização Cinética.....	93
2.7.1. Constante de Michaelis-Menten.....	93
2.7.2. Determinação das constantes de inibição.....	94
2.7.3. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	94

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
3.1. Purificação das serino-proteases do extrato solúvel intestinal de <i>A. gemmatalis</i>	96
3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.....	98
3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos das serino-proteases tripsina-like purificadas.....	100
3.4. Determinação das constantes de inibição utilizando peptídeos sintéticos.....	104
4. CONCLUSÃO.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
PERSPECTIVAS.....	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Anticarsia gemmatalis</i> , inseto adulto.	9
Figura 2: Estágio larval de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .	10
Figura 3: Mecanismo catalítico de serino-proteinases.	17
Figura 4: Modelo de Schechter e Berger (1967). Modelo utilizado para descrever a interação de uma protease com o substrato proteico.	18
Figura 5: Estrutura primária do inibidor de soja da família Bowman-Birk.	21
Figura 6: Estrutura do inibidor tipo Kunitz de <i>Delonix regia</i> .	22
Figura 7: Estrutura química da benzamidina, cadeia lateral da Lys, cadeia lateral da Arg e do berenil.	24
Figura 8: Representação esquemática do protocolo de predição de estrutura 3D e função de proteínas do programa I-TASSER.	29

CAPÍTULO 1

Figura 1: Gráficos do parâmetro <i>B-factor profile</i> (BPF) para a predição da estrutura secundária das sequências das serino-proteases intestinais de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .	49
Figura 2: Modelos 3D gerados pelo programa I-TASSER das serino-proteases intestinais de <i>A. gemmatalis</i> utilizando o visualizador VMD.	51

Figura 3: Modelos 3D da região predita para ligação na enzima Seq 1.	52
Figura 4: Modelos 3D da região predita para ligação na enzima Seq 2.	53
Figura 5: Modelos 3D da região predita para ligação na enzima Seq 3.	54
Figura 6: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 1 e a enzima Seq 1.	57
Figura 7: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 1 e a enzima Seq 2.	58
Figura 8: Modelo tridimensional da enzima Seq 2.	59
Figura 9: Representação dos principais pontos de interação na enzima Seq 3 prevista pelo I-TASSER.	60
Figura 10: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 1 e a enzima Seq 3.	61
Figura 11: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 2 e a enzima Seq 1.	62
Figura 12: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 2 e a enzima Seq 2.	63
Figura 13: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 2 e a enzima Seq 3.	64
Figura 14: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 3 e a enzima Seq 1.	65
Figura 15: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 3 e a enzima Seq 2.	66
Figura 16: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 3 e a enzima Seq 3.	67
Figura 17: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 4 e a enzima Seq 1.	68
Figura 18: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 4 e a enzima Seq 2.	69
Figura 19: Representação da cavidade situada entre o centro ativo e o sítio secundário da enzima Seq 2.	70
Figura 20: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 4 e a enzima Seq 3.	71

Figura 21: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 5 e a enzima Seq 1.	71
Figura 22: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 5 e a enzima Seq 2.	73
Figura 23: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 5 e a enzima Seq 3.	74
Figura 24: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor K e a enzima Seq 1.	76
Figura 25: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor K e a enzima Seq 2.	77
Figura 26: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor K e a enzima Seq 3.	78
Figura 27: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor R e a enzima Seq 1.	79
Figura 28: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor R e a enzima Seq 2.	80
Figura 29: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor R e a enzima Seq 3.	81

CAPÍTULO 2

Figura 1: Perfil cromatográfico do extrato solúvel de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em coluna de p-aminobenzamidina agarose (HiTrap®) equilibrada com Tris-HCl 0,05mol.L ⁻¹ , NaCl 0,5mol.L ⁻¹ , pH 7,5.	96
Figura 2: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12%) das serino-proteases solúveis do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .	99
Figura 3: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pelo peptídeo Gor 3 em presença do substrato L-BApNA.	105
Figura 4: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pelo peptídeo Gor 4 em presença do substrato L-BApNA.	105
Figura 5: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pelo peptídeo Gor 5 em presença do substrato L-BApNA.	106
Figura 6: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk <i>versus</i> concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-like purificadas	108

em presença do peptídeo Gor 3.

Figura 7: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-*like* purificadas em presença do peptídeo Gor 4. 109

Figura 8: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-*like* purificadas em presença do peptídeo Gor 5. 109

Figura 9: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-*like* intestinal de *A. gemmatalis* pelo peptídeo Gor 3 em presença do substrato L-BApNA. 110

Figura 10: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-*like* intestinal de *A. gemmatalis* pelo peptídeo Gor 4 em presença do substrato L-BApNA. 111

Figura 11: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-*like* intestinal de *A. gemmatalis* pelo peptídeo Gor 5 em presença do substrato L-BApNA. 111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Sequência dos peptídeos ligantes utilizados nos estudos de *docking* com as três estruturas 3D preditas das serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis*. 46

Tabela 2: Predição do número de Classificação da Enzima baseado no parâmetro C-score^{EC} para as sequências das serino-proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis* 55

Tabela 3: Energia de ligação do melhor modelo de *docking* predito pelo AutoDock Vina entre o peptídeo ligante e as serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis* 56

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Rendimento da purificação em coluna p-aminobenzamidina agarose 97

Tabela 2: Parâmetros cinéticos das serino-proteases semi-purificadas para a hidrólise dos substratos cromogênicos 101

Tabela 3: Constante de inibição para os diferentes peptídeos em presença do substrato cromogênico L-BApNA. 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs - absorvância
Arg - arginina
Asp - aspartato
Berenil - 4,4' - diazoamino-bis-benzamidina
BSA - albumina de soro bovino
E - enzima
ES - complexo binário enzima-substrato
EI - complexo enzima-inibidor
I - inibidor
IP - inibidor de protease
 K_{cat} - constante catalítica
kDa - kilodalton
 K_i - constante de inibição
 K_M - constante de Michaelis-Menten
 K_{cat}/K_M - constante de especificidade
L-BApNA - benzoil-L-arginina-p-nitroanilida
Lys - lisina
P - produto de reação enzimática
PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
PDB – Protein Data Bank
S - substrato enzimático
SBBI - inibidor de tripsina da soja tipo Bowman-Birk
SDS - dodecil sulfato de sódio
Ser - serina
SKTI - inibidor de tripsina da soja tipo Kunitz
Tris - Tris (hidroximetil) amino metano
V - velocidade
 $V_{máx}$ - velocidade máxima

RESUMO

VARGAS, Adriana Maria Patarroyo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Modelagem molecular, análises de *docking* de serino-proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis* e uso de peptídeos sintéticos na caracterização do modelo de inibição enzimática.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera), é considerada uma das principais pragas da sojicultura, causando enormes prejuízos devido ao seu ataque. As proteases digestivas desempenham papel importante na fisiologia das larvas e o estudo de inibidores de proteases como agentes de controle de pragas tem recebido atenção contínua. Para a utilização dessa estratégia de controle é necessário conhecer a estrutura dessas enzimas, além de entender as interações químicas com esses inibidores. O uso de programas computacionais são ferramentas úteis para contornarem os problemas relacionados às técnicas de elucidação estrutural e avaliam *in silico* as principais interações entre as enzimas e os ligantes. Após esse processo a caracterização cinética do complexo enzimático contribuem para a melhor compreensão dos centros ativos e dos mecanismos de ação da enzima. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo realizar a modelagem molecular por homologia das serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis*, avaliar as possíveis interações com peptídeos sintéticos utilizando estudos de *docking* e propôr um modelo de inibição enzimática das serino-proteases utilizando os peptídeos. As sequências obtidas foram utilizadas na modelagem molecular com o programa I-TASSER. Os três melhores modelos estruturais foram validados através dos parâmetros de *C-score* e *B-factor profile*. A análise do *C-score*^{EC} classificou as enzimas como serino-proteases. No estudo de *docking*, dos sete ligantes testados, somente Gor K, Gor R e Gor 5 apresentaram valores de energia livre de ligação para a formação de complexos estáveis. As principais interações observadas foram em regiões do centro ativo e sítio secundário das enzimas. Para a caracterização cinética utilizando diferentes

substratos peptídicos as enzimas foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando coluna de p-aminobenzamidina agarose em sistema FPLC. Pelas análises dos parâmetros cinéticos foi possível constatar que as serino-proteases intestinais tripsina-*like* de *Anticarsia gemmatalis* têm preferência na hidrólise de substratos contendo arginina na posição P₁. Nos estudos de cinética de inibição utilizando os peptídeos sintéticos Gor 3, Gor 4 e Gor 5 em presença do substrato cromogênico L-BApNA observou-se que a inibição é do tipo competitiva linear nas concentrações utilizadas. A melhor K_i foi observada para o peptídeo Gor 5 que apresentou uma inibição mais eficiente em comparação aos peptídeos Gor 3 e Gor 4. No geral, a eficiência na inibição da atividade enzimática está relacionada à capacidade de ligação ao centro ativo da enzima.

ABSTRACT

VARGAS, Adriana Maria Patarroyo, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Molecular modeling, docking analysis of intestinal serino-proteases from *Anticarsia gemmatalis* and use of synthetic peptides in the characterization enzymatic of inhibition model.** Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

The velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera), is considered the main pest of soybean culture, causing huge losses due to its attack. Digestive proteases play an important role in the physiology of the larvae and the study of protease inhibitors as pest control agents has received continuous attention. The use of this control strategy requires knowledge of the structure of these enzymes, besides understanding the chemical interactions with those inhibitors. Computer programs are useful tools to overcome problems related to structural elucidation techniques and also evaluate *in silico* the main interactions between enzymes and ligands. After this process the kinetic characterization of the enzyme complex contribute to a better understanding of the active centers of the enzyme and mechanisms of action. In this context, this study aimed to perform homology modeling of intestinal serine proteases *A. gemmatalis*, to evaluate possible interactions with synthetic peptides utilizing docking studies and to propose one enzyme inhibition model of serine proteases using peptides. The sequences obtained were used in molecular modeling with I-TASSER program. The top three structural models were validated through the C-score parameters and B-factor profile. Analysis of C-score^{EC} ranked enzymes like serine proteases. In the docking study of the seven tested ligands, only Gor K, Gor R and Gor 5 showed binding free energy values for the formation of stable complexes. The main interactions were observed in regions of the active site and secondary site of the enzyme. For kinetic characterization using different peptides substrates the crude extract were purified by affinity cromotography using p-aminobenzamidine agarose column FPLC system. From the analysis of the

kinetic parameters was noted that the trypsin-like serine proteases from *Anticarsia gemmatalis* prefer hydrolyse substrates containing arginine at position P₁. In inhibition kinetic studies using synthetic peptides Gor 3, Gor 4 and Gor 5 in the presence of chromogenic substrate L-BApNA was observed that the inhibition is linear competitive in the concentration range used. The best K_i was observed for Gor 5 peptide that showed more efficient inhibition compared to peptides Gor 3 and Gor 4. Overall, the efficient inhibition of enzyme activity is related to the binding capacity to the active center of the enzyme.

1. INTRODUÇÃO

Os insetos representam um dos mais importantes estresses bióticos da agricultura mundial. São responsáveis por grandes reduções nos rendimentos das safras, apesar do considerável uso de pesticidas químicos (TELANG et al., 2005). Estes não apenas provocam perdas diretas na produtividade devido ao ataque herbívoro, mas também indiretamente por atuarem como vetores de vários patógenos de plantas (HILDER & BOULTER, 1999; GATEHOUSE, 2002).

A cultura da soja (*Glycine max*) tem grande importância para o cenário econômico nacional, sendo um dos principais produtos do agronegócio brasileiro, ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país (SÁVIO et al., 2008; DALL'AGNOL et al., 2010). Dos principais países produtores de soja (Estados Unidos, Brasil e Argentina), o Brasil é o que tem maior potencial (terra, tecnologia e clima) para expandir consideravelmente a produção de soja para atender uma demanda mundial crescente. No Brasil, a soja é cultivada em praticamente todo o território nacional, destacando-se como fonte de proteína e de óleo vegetal, para consumo interno ou como gerador de divisas, através das exportações (SÁVIO et al., 2008; DALL'AGNOL et al., 2010).

A cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo, e os insetos, principalmente na fase larval, representam um importante prejuízo, pois afetam tanto a planta quanto a semente, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, causando perdas significativas do rendimento da cultura (ANDRADE et al., 2004).

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas que atacam a soja no Brasil, sendo encontrada em todos os locais de cultivo. Sua capacidade de consumo aumenta com o desenvolvimento

fisiológico. É uma praga desfolhadora, que mesmo em baixas densidades populacionais pode causar prejuízos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa das plantas (SILVA et al., 2002). A fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies de vegetais causando prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, vagem e trigo (BATISTA et al., 2005).

Na tentativa de controlar o ataque de insetos aos cultivares, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em agroquímicos. Embora atualmente os métodos de controle de pragas ainda se concentrem basicamente na utilização dessas substâncias (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002), o alto custo para o desenvolvimento de novos produtos cujas formulações devam se adequar às pragas cada vez mais resistentes ao seu uso, as consequências ambientais inaceitáveis e a própria pressão de consumidores contra essa prática, tem provocado uma revolução no controle de pragas na agricultura moderna.

A exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros é uma tendência, servindo de ferramenta para a aplicação nas estratégias alternativas de controle de pragas (GATEHOUSE, 2002; FERRY et al., 2006; SCOTT et al., 2010). Uma das principais formas diretas de defesa das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases, uma vez que por ela ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER & RYAN, 1992; SCOTT et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010). A ingestão de inibidores de proteases pelos insetos interfere no processo de degradação de proteínas no intestino médio. Assim sendo, os inibidores são considerados agentes anti-metabólicos, pois levam os insetos a uma deficiência proteica. Essa interferência na digestão diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução (SILVA-FIALHO &

FALCO, 2000; SCOTT et al., 2010; WIELKOPOLAN, et al., 2015). Outra hipótese é que os inibidores afetem o desenvolvimento dos insetos de forma indireta, via um mecanismo de “*feedback*”, que levaria a um aumento da produção de proteases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis. Os aminoácidos seriam deslocados para síntese de proteases em detrimento de outras proteínas essenciais (JONGSMA & BOLTER, 1997). Em contrapartida, como resultado da co-evolução das interações planta-inseto, estes também desenvolveram mecanismos para se defenderem dos efeitos deletérios provocados pelos inibidores de proteases produzidos pelas plantas, através do aumento da síntese enzimática, tanto da classe que está sendo inibida como de enzimas insensíveis aos inibidores, tentando burlar esse efeito inibitório (JONGSMA & BOULTER, 1997; SRINIVASAN et al., 2006; PILON et al., 2006; PILON et al., 2009; SCOTT et al., 2010).

Alguns estudos comprovam que, mesmo com os mecanismos adaptativos do inseto, a utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de pragas é uma estratégia promissora (FERRY et al., 2006). Entretanto, o sucesso dessa estratégia será obtido quando a planta for capaz de expressar uma combinação de inibidores que cubra o espectro total de proteases intestinais (JONGSMA & BOLTER, 1997). Dessa forma, deve ser considerada a fisiologia do inseto, a microbiota associada ao trato digestivo, à bioquímica da sua digestão e o conhecimento do sistema de proteases produzidas pela lagarta e ou pela microbiota associada (FRANCO et al., 2002; SRINIVASAN et al., 2006; PILON, 2008; VISÔTTO et al., 2009a,b).

Somente após o esclarecimento do complexo sistema de proteases secretadas no intestino do inseto a relação estrutura/função dessas macromoléculas poderá ser mais bem compreendida. O conhecimento da estrutura da enzima e os principais sítios de

interação é uma ferramenta útil nos estudos de química de proteínas. Diante deste conhecimento os centros ativos moleculares poderão ser mapeados, através de cinética enzimática, modelagem molecular e estudos de *docking*, podendo gerar implicações diretas no desenvolvimento de potentes inibidores orgânicos, peptídeos ou peptídeos miméticos para serem utilizados na defesa da planta como controle contra pragas agrícolas.

2. OBEJTIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a cinética de inibição das serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis* semi-purificadas utilizando diferentes inibidores peptídicos e diferentes substratos para mapeamento do centro ativo. Identificar, entre os inibidores peptídicos, um possível inibidor a ser utilizado no processo de defesa de plantas de soja contra a *A. gemmatalis*. Realizar modelagem molecular e estudos de *docking* das serino-proteases presentes no intestino da *Anticarsia gemmatalis* para melhor compreensão da interação dos inibidores com essas enzimas.

2.2. Objetivos Específicos

- Purificar as serino-proteases tripsina-like do intestino médio de *A. gemmatalis* em FPLC em coluna de p-aminobenzamidina agarose (HiTrap®).
- Realizar estudos cinéticos da hidrólise para os substratos tripeptídicos L-Val-Leu-Arg-p-Nitroanilida, L-Val-Leu-Lys-p-nitroanilida, N-(p-Tosil)-Gly-Pro-Arg-p-Nitroanilida, N-(p-Tosil)-Gly-Pro-Lys-p-Nitroanilida, N-benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida e L-Val-Gly-Arg-p-Nitroanilida catalisada pelas enzimas semi-purificadas, a fim de verificar se a cinética segue ou não o modelo proposto por Michaelis-Menten.
- Determinar os parâmetros cinéticos K_M , $V_{m\acute{a}x}$, $V_{m\acute{a}x}/[E]$ e $V_{m\acute{a}x}/[E]/K_M$ para a hidrólise dos substratos L-Val-Leu-Arg-p-Nitroanilida, L-Val-Leu-Lys-p-nitroanilida, N-(p-Tosil)-Gly-Pro-Arg-p-Nitroanilida, N-(p-Tosil)-Gly-Pro-Lys-p-Nitroanilida, N-benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida e L-Val-Gly-Arg-p-Nitroanilida catalisada pela tripsina-like.
- Realizar o mapeamento do centro ativo a partir dos parâmetros obtidos.

- Determinar a constante de inibição K_i para os diferentes peptídeos utilizando os substratos L-BApNA a fim de propor um modelo de inibição para as enzimas tripsina-*like* de *A. gemmatalis*.
- Realizar modelagem molecular por homologia das serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis* a partir de sequências obtidas por nosso grupo de pesquisa.
- Realizar estudo de *docking* das serino-proteases com os diferentes peptídeos sintéticos a fim de propor uma sequência promissora para utilização no controle da praga.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Soja

A cultura da soja (*Glycine max*) tem grande importância para o cenário econômico nacional e para o agronegócio brasileiro, sendo hoje, uma das culturas mais plantadas em território nacional (SÁVIO et al., 2008). Isto pode ser atribuído a diversos fatores, tais como: estruturação de um grande mercado internacional relacionado com o comércio de produtos do complexo soja, consolidação da oleaginosa como importante fonte de proteína vegetal, especialmente para atender demandas crescentes dos setores ligados à produção de produtos de origem animal e maior desenvolvimento e oferta de tecnologias, que viabilizaram a expansão da exploração sojícola para diversas regiões do mundo (DALL'AGNOL et al., 2010).

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram identificadas no Brasil. Esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (EMBRAPA, 2013).

A cultura da soja encontra-se sujeita ao ataque de insetos durante praticamente todo o seu ciclo. Logo após sua emergência, insetos como a lagarta rosca *Agrotis ipsilon* (Hüfnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), os percevejos castanhos *Scaptocoris castanea* (Perty) (Hemiptera: Cydnidae) e *Atarsocoris brachiariae* (Becker) (Hemiptera: Cydnidae) podem atacar as plântulas. Posteriormente a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta falsa-medideira

Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e na safra 2012/2013 a lagarta *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) atacam as plantas durante a fase vegetativa e, em alguns casos, até durante a floração. Embora esses insetos tenham suas populações reduzidas por predadores, parasitoides e doenças, em níveis dependentes das condições ambientais e do manejo de pragas que se pratica, quando atingem populações elevadas, capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura, necessitam ser controlados (EMBRAPA, 2013).

Apesar de os danos causados na cultura da soja serem, em alguns casos, alarmantes, não se indica a aplicação preventiva de produtos químicos, pois, além do grave problema de poluição ambiental, a aplicação desnecessária eleva os custos da lavoura e contribui para o desequilíbrio populacional dos insetos (EMBRAPA, 2013).

3.2. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)

As larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecidas como lagarta da soja, são consideradas pragas-chave da sojicultura, sendo economicamente importantes em função das grandes perdas que ocasionam a esta lavoura (GALLO et al., 2002). A lagarta é a principal desfolhadora da cultura da soja na América do Norte e do Sul (VIANNA et al., 2011). No Brasil é encontrada em todos os locais de produção de soja e representa um risco à produção e à qualidade dos cultivos brasileiros, exigindo atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (PRAÇA et al., 2006; SAVIO et al., 2008).

A lagarta da soja é uma praga desfolhadora, que mesmo em baixas densidades populacionais pode causar prejuízos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa das plantas. O desfolhamento compromete o enchimento das

vagens, com conseqüente redução da produção de grãos (SILVA et al., 2002). Uma única lagarta pode consumir cerca de 110 cm² de folhas de soja (VIANNA et al., 2011). Os maiores danos ocorrem na fase larval, quando as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja, causando prejuízos consideráveis à medida que crescem. Comem tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100% do desfolhamento até atingir seu desenvolvimento máximo, para tornarem-se pupa. Embora a preferência alimentar desta lagarta seja a soja, a fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies de vegetais causando prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, vagem e trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, no período de floração (BATISTA et al., 2005).

O desenvolvimento da *A. gemmatalis* é do tipo holometábolo e sua ocorrência varia de novembro a março, atingindo picos populacionais a partir de janeiro (ANDRADE et al., 2004). Seu ciclo biológico é de aproximadamente 30 dias, dependendo das condições ambientais, com a fase adulta durando cerca de 15 dias, com a mariposa medindo de 30 a 38 mm e apresentando coloração variando de cinza a marrom avermelhado ou amarelado, sem dimorfismo sexual (PRAÇA et al., 2006) (Figura 1).



Figura 1: *Anticarsia gemmatalis*, inseto adulto.

Fonte: [http:// www.discoverlife.org/](http://www.discoverlife.org/)

A oviposição ocorre na face inferior das folhas, embora em casos de infestações mais sérias os ovos possam ser encontrados na superfície superior das folhas, pecíolos e até mesmo hastes. O período de incubação geralmente dura de três a cinco dias (BÁRBARA, 2000).

As lagartas recém-eclodidas alimentam-se das folhas e dependendo das condições ambientais podem apresentar de cinco a seis instares larvais, chegando a medir de 40 a 50 mm de comprimento (Figura 2).



Figura 2: Estágio larval de *Anticarsia gemmatalis*.
Fonte: <http://www.dowagro.com/br/lorsban/pragas/lagartasoja.htm>

O uso de inseticidas químicos para o controle de pragas desfolhadoras causam prejuízos econômicos e ecológicos. O uso de produtos de amplo espectro pode selecionar o aparecimento de populações resistentes desta praga, exigindo o uso de produtos mais fortes ou doses elevadas. Dessa forma, pragas secundárias podem ser elevadas à categoria de pragas-chave causando o surgimento de novas pragas e pragas resistentes (VIANNA et al., 2011).

Uma tendência geral é experimentar métodos alternativos de controle em substituição aos inseticidas químicos que apresentem menor custo, sejam mais específicos e menos poluentes. A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável (BATISTA et al., 2005). No Brasil, destaca-se o programa de controle

da lagarta da soja desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que utiliza o Vírus da Poliedrose Nuclear Multicapsídeo *Baculovirus anticarsia* (AgMNPV). Este vírus é altamente específico e atua driblando de maneira eficiente os mecanismos de defesa da lagarta (SAVIO et al., 2008).

As enzimas digestivas podem ser um alvo promissor para os programas de controle de pragas. Foi demonstrado que sua inibição, na presença de inibidores de proteases causa retardo no crescimento e diminuição da taxa de sobrevivência dos insetos (PILON et al., 2006; PILON et al., 2009). Portanto, o conhecimento das enzimas digestivas da lagarta da soja e sua sensibilidade frente aos diferentes inibidores são peças fundamentais para o desenvolvimento de novos programas de controle desta praga.

3.3. Interação planta-inseto

Na natureza, insetos e plantas estão constantemente interagindo de forma complexa, nos mais diversos ecossistemas. Esta interação pode ser mutuamente benéfica, quando os insetos propiciam às plantas atividades como polinização e defesa e quando as plantas dão aos insetos abrigo, local para oviposição e alimentação. Entretanto, alguns insetos atacam as plantas e prejudicam seu desenvolvimento (JOSÉ, 2002; PILON, 2012).

Desta forma, ao longo da evolução, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa contra os insetos. Suas habilidades em resistir aos ataques envolvem mecanismos de defesa diretos e indiretos, dentre os quais se podem citar a produção de compostos tóxicos aos insetos e a liberação de compostos químicos voláteis que atraem predadores destes insetos. A ativação destas respostas específicas requer o reconhecimento e respostas apropriadas ao ataque inimigo e a maioria destes

eventos leva por fim à ativação de genes, por vias de sinalização celular, em poucos minutos (MAFFEI et al., 2007). Em resposta, os insetos desenvolveram estratégias para contornar esses mecanismos de defesa, as quais incluem a metabolização e o sequestro de compostos tóxicos, mecanismos de fuga e alteração nos padrões de expressão gênica (SILVA et al., 2001; OLIVEIRA, et al., 2013).

Uma das principais formas diretas de defesa das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases, uma vez que por ela ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER & RYAN, 1992; SCOTT et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010; JAMAL et al., 2012). Os inibidores de proteases (IPs) são considerados agentes antimetabólicos levando a uma deficiência proteica nos insetos. Sua atividade antimetabólica é atribuída à interferência na digestão proteica que diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (SILVA-FIALHO & FALCO, 2000; PILON et al., 2006; PILON et al., 2009; SCOTT et al., 2010; JAMAL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Pesquisas sobre a aplicabilidade de IPs em programas de controle têm sido desenvolvidas visando, principalmente, à expressão dessas proteínas em plantas geneticamente modificadas (HAQ et al., 2004; DUNAEVSKY et al., 2005). Estudos sobre os mecanismos de resistência de insetos em resposta à defesa de plantas levaram a uma valorização da notável diversidade e plasticidade das proteases digestivas de insetos, além do papel de digerir proteínas dos alimentos essas proteases também desempenham um papel na defesa contra inibidores de proteases de plantas (ZHU-SALZMAN et al., 2008, JAMAL et al., 2012).

Estudos sobre as respostas de insetos a dietas contendo inibidores da protease de plantas (IPs) têm indicado uma resposta bifásica caracterizada por uma alta regulação

inicial de todas as proteases digestivas específicas que precede de uma baixa regulação simultânea de proteases sensíveis ao IP e uma alta regulação de proteases insensíveis ao IP, ou seja, no trato intestinal do inseto ocorrem mudanças quantitativas que incluem o aumento dos níveis de proteases específicas ou generalistas para alcançar a taxa ideal da digestão de proteínas e também ocorrem respostas qualitativas que incluem a síntese de isoformas de proteases “insensíveis” que não são capazes de ligar-se ao IP ou que tenha a possibilidade de se ligar e degradar o IP (BOWN et al., 2004; SRINIVASAN et al., 2006; ZHU-SALZMAN et al., 2008; JAMAL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Estudos sobre as respostas de insetos frente a inibidores de proteases são necessários para identificar moléculas fundamentais e que eventualmente ajudarão na compreensão de eventos complexos de sinalização que são responsáveis pelo acompanhamento e coordenação de absorção de nutrientes e atividade proteolíticas intestinal.

Verifica-se assim um importante mecanismo de adaptação por parte dos insetos, que deve ser detalhadamente estudado em nível molecular, a fim de se conseguir desenvolver uma estratégia de controle mais eficaz.

3.4. Proteases

As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas, agindo em ligações peptídicas. As proteases são classificadas de acordo com Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB dentro do grupo 3 (hidrolases), subgrupo 4. Elas também são classificadas com base em três critérios: (1) tipo de reação catalisada, (2) natureza química do sítio catalítico e (3) relação evolutiva de acordo com a estrutura (BARETT, 1994). Essas enzimas são subdivididas em dois grupos principais, o das exopeptidases e o das endopeptidases, dependendo do seu sítio de ação. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas

próximas ao grupamento amino ou carboxi terminal no substrato, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. Com base no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases são classificadas dentro de quatro grupos, serino-proteases, aspartil-proteases, cisteíno-proteases e metalo-proteases. As serino-proteases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspartil-proteases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteíno-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metalo-proteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico (RAO et al., 1998).

Proteases digestivas de insetos são caracterizadas em serino, cisteíno, aspartil e metalo-proteases (TERRA & FERREIRA, 1994). Uma espécie específica de inseto, muitas vezes possui múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanicista, embora normalmente utilize um tipo principal no seu papel digestivo (LIU et al., 2004; ZHU-SALZMAN et al., 2008; AHAN et al., 2009).

As serino-proteases são a principal classe de enzimas digestivas de proteínas presentes no intestino médio de muitas espécies de lepidópteras (TERRA & FERREIRA, 1994). Entre as serino-proteases de insetos, tripsina e quimiotripsina são as mais estudadas e participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos que incluem, além da digestão, ativação de proteínas específicas, como nas cascatas de coagulação, no sistema imune de insetos e plantas e desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos (GILL et al., 1996; KREM et al., 1999; HERRERO et al., 2005; PAGE & Di CERA, 2008; SHI et al., 2013).

3.4.1. Serino-proteases

As serino-proteases são as enzimas mais bem estudadas, tanto em eucariotos quanto em procariotos. Essas enzimas pertencem a uma das maiores famílias gênicas do reino animal, são amplamente distribuídas na natureza e encontradas em todos os reinos de vida celular, bem como em vários genomas virais, o que indica uma participação vital no metabolismo desses organismos (PAGE & Di CERA, 2008). Em insetos, um estudo com *Helicoverpa armigera* demonstrou a existência de pelo menos 28 genes diferentes pertencentes à família das serino-proteases cujos produtos são expressos no intestino (BOWN et al., 1997).

As serino-proteases são encontradas nos grupos de exopeptidase, endopeptidase, oligopeptidase e ômega peptidase. Com base em suas similaridades estruturais elas são reagrupadas em 20 famílias, as quais são redivididas em seis clãs de ancestrais comuns. Clãs são divididos em famílias baseados na identidade de sequência e similaridades (BARRETT & RAWLINGS, 2001).

RAO e colaboradores (1998) em um trabalho de revisão descreveram que as serino-proteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7,0 e 11,0. Elas têm uma ampla especificidade, incluindo atividades amidásica e esterásica. O ponto isoelétrico das serino-proteases está geralmente na faixa de pH 4,0 e 6,0.

A maioria das tripsinas de insetos possui entre 20 e 30 kDa (TERRA & FERREIRA, 1994). Entretanto, tripsinas com maior massa molecular também são encontradas, como o apresentado por Wagner et al. (2002) em estudos com proteases tripsina-like de *Melolontha melolontha* (Coleoptera) com massas moleculares de 56 e 63 kDa e por Ahmad et al. (1980) em estudos com tripsinas com massa de 53 kDa de

Spodoptera litura (Lepidoptera). Tripsinas com menor massa molecular também são relatadas na literatura, como a tripsina do epitélio de *Bombix mori* (Lepidoptera), de 13 kDa descrita por Eguchi e Kuriyama (1985) e a tripsina do intestino médio de *Heliothis virescens* (Lepidoptera), de 17 kDa descrita por Brito et al. (2001).

A função catalítica das serino-proteases é realizada por meio da ação da tríade catalítica - serina 195 reativa, histidina 57 e ácido aspártico 102 (numeração no quimotripsinogênio) - enquanto o grau e tipo de especificidade pelo substrato são determinados pela natureza da região do centro ativo. Quando resíduos na tríade catalítica são alterados, separada ou conjuntamente, ocorrem grandes mudanças na velocidade de *turnover* da enzima, o k_{cat} , conseqüentemente mudando o mecanismo enzimático, com pequeno efeito no K_M . Os resíduos da tríade atuam em perfeito sinergismo e contribuem para uma atividade catalítica otimizada (CARTER & WELLS, 1988; PERONA & CRAIK, 1995).

As serino-proteases geralmente atuam em uma reação de hidrólise de dois passos, onde um intermediário, acilenzima, covalentemente ligado é formado. Esta acilação é seguida pela deacilação, processo no qual ocorre o ataque nucleofílico intermediado pela água, resultando na hidrólise do peptídeo. O ataque nucleofílico do grupamento hidroxila da serina reativa sobre o átomo de carbono carboxílico da ligação peptídica, catalisada pelo resíduo de histidina, que funciona como uma base leva a formação de um intermediário tetraédrico e um íon imidazólico. O intermediário decompõe-se através da catálise ácido-base pela ação dos grupos polarizados do aspartato e da histidina em um intermediário acil-enzima, uma base imidazólica e uma amina. Este mecanismo implica num estreito contato entre o intermediário tetraédrico e o íon imidazólico, que inibe a liberação do próton para o meio solvente antes da catálise ácido-base, regenerando, assim, a enzima ativa e liberando o produto de degradação

(PÓLGAR & HALÁSZ, 1982; CRAIK et al., 1987). Cada etapa ocorre através da formação de um intermediário tetraédrico, cuja estrutura se assemelha a um estado de transição de alta energia em ambas as reações (Figura 3). Este mecanismo é capaz de acelerar a velocidade de hidrólise da ligação peptídica mais de 10^9 vezes em relação à reação não catalisada (PERONA & CRAIK, 1995; HEDSTROM, 2002; PAGE & Di CERA, 2008).

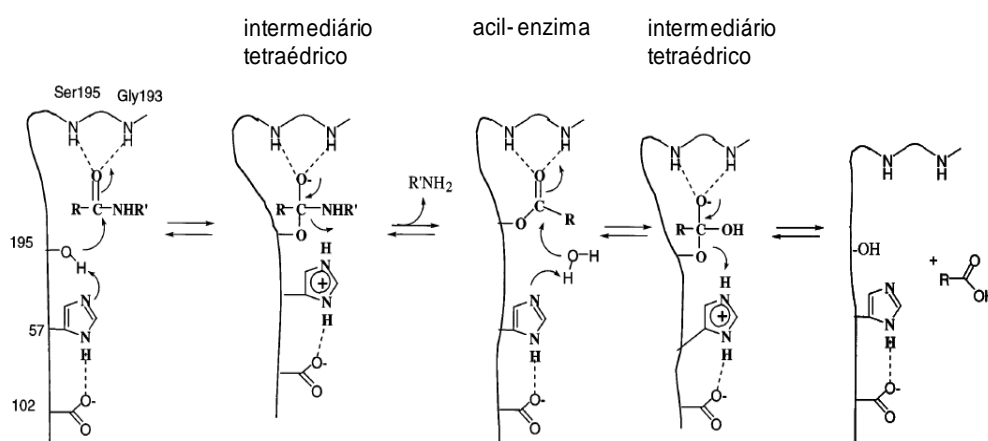


Figura 3: Mecanismo catalítico de serino-proteases. Fonte: (HEDSTROM, 2002).

Toda serino protease tripsina-*like* possui preferência por substratos com resíduo básico em P_1 , Lys ou Arg. Isso é principalmente causado pela presença de um aspartato carregado negativamente no fundo do bolso S_1 . A arquitetura do sítio S_1 entre essas proteases é altamente conservada. Uma diferença marcante é encontrada na posição 190, a qual pode ser uma Ser ou Ala, e serve como ponto de identificação para subfamílias. Os resíduos de aminoácidos nos substratos de proteases são numerados da ligação peptídica hidrolisada como $P_1, P_2, P_3, \dots, P_n$ na direção da região N-terminal e $P_1', P_2', P_3', \dots, P_n'$ na direção da região C-terminal, ao passo que os subsítios correspondentes na enzima são numerados como $S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$ e $S_1', S_2', S_3', \dots, S_n'$ (LOPES et al., 2004) (Figura 4).

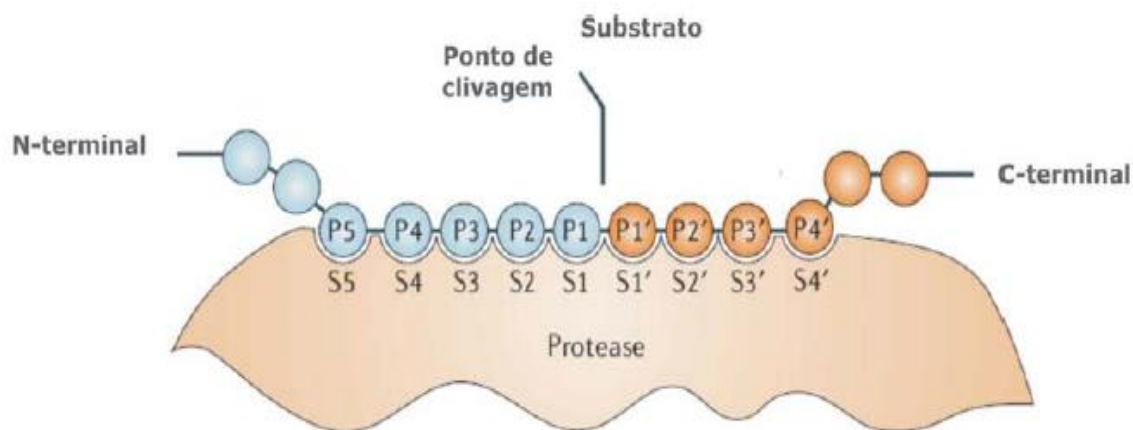


Figura 4: Modelo de Schechter e Berger (1967). Modelo utilizado para descrever a interação de uma protease com o substrato proteico.

As tripsinas de todos os insetos possuem especificidade primária semelhante, com exceção de Lepidópteras, hidrolisando mais eficientemente substratos que contenham Arg do que Lys na posição P_1 (LOPES et al., 2006). Os inibidores de proteases produzidos pelas plantas apresentam uma região chamada de sítio reativo, o qual interage com a sua enzima-alvo. A ligação do sítio reativo ocorre no sítio ativo da enzima. O alinhamento das sequências de vários inibidores de proteases de plantas indicou que os sítios reativos da maioria desses inibidores possuem um resíduo de Lys na posição P_1 (LOPES et al., 2006). A presença de uma Lys na posição P_1 no sítio reativo é uma estratégia de sobrevivência, pois esses inibidores atuam inibindo as tripsinas da maioria dos insetos que hidrolisam preferencialmente Arg nessa posição.

3.5. Inibidores de proteases

Estudos sobre inibidores de proteases (IPs) presentes em plantas iniciaram-se a partir da década de 40 quando Kneen e Sandstedt (1943) encontraram um inibidor de α -amilase em grãos de vários cereais e, posteriormente, Kunitz (1945) purificou uma proteína termoestável da soja capaz de inibir a tripsina.

Os inibidores das serino-proteases são o tipo mais abundante e amplamente distribuído nas plantas (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). O papel fisiológico desses inibidores nas plantas inclui (i) a regulação das proteinases endógenas durante a dormência das sementes, (ii) a imobilização das proteínas de reserva, (iii) a proteção contra as enzimas proteolíticas de parasitas e insetos e (iv) as proteínas de reserva (HAQ et al., 2004).

São proteínas relativamente pequenas (ou domínios de proteínas, no caso de inibidores multidomínios) de 29 a 190 resíduos de aminoácidos e podem ser agrupadas em famílias diferentes baseando-se na similaridade de sequência, similaridade topológica e mecanismo de ligação à enzima. Os IPs inibem as proteases do intestino do inseto, ligando fortemente ao centro ativo formando um complexo essencialmente irreversível. A incapacidade de utilizar a proteína ingerida e reciclar as enzimas digestivas resulta numa deficiência de aminoácido crítico, o que afeta o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do herbívoro (MACEDO et al., 2011).

O mecanismo de ação de um inibidor de protease de planta baseia-se na inibição competitiva de uma protease via bloqueio de sua atividade proteolítica (SILVA-FILHO & FALCO, 2000).

A especificidade é uma característica marcante nos estudos das interações entre enzima-inibidor, sendo determinada pela dinâmica das interações envolvidas e pela estrutura nativa do inibidor e da enzima.

A seletividade da inibição normalmente ocorre através da utilização de sítios de reconhecimento do substrato pela enzima. O complexo enzima-inibidor formado é termodinamicamente e cineticamente muito estável, apresentando constante de dissociação muito baixa (10^{-7} a 10^{-14} M), de maneira que a inibição estequiométrica da enzima é alcançada (BODE & HUBER, 1992; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002).

Os inibidores de serino-proteases presentes em plantas são classificados em sete famílias através de características de homologia da estrutura primária, massa molecular, conteúdo de cisteína e de pontes dissulfeto (RICHARDSON, 1991).

As duas famílias mais bem caracterizadas de inibidores de serino-proteases são os inibidores de tripsina da soja, dos tipos Kunitz (SKTI) e Bowman-Birk (SBBI). Nos grãos de soja, os inibidores de tripsina correspondem a 6% do total de proteína (BRANDON & FRIEDMAN, 2002), sendo que cerca de 80% da inibição da atividade trípica nos grãos é causada pela ação do KTI e 20% pela ação do BBI (BRANDON et al., 1989).

Os inibidores da família Bowman-Birk são proteínas globulares solúveis, caracterizadas por suas pequenas massas moleculares que variam de 8 a 10 kDa, com alto conteúdo de cisteína podendo apresentar sete pontes dissulfeto, o que confere grande estabilidade a sua estrutura, distribuídas em cerca de 70 a 90 resíduos de aminoácidos (RICHARDSON, 1991).

O primeiro inibidor pertencente à família Bowman-Birk (Figura 5), que deu origem a essa família, foi purificado de sementes de soja constituído de uma cadeia polipeptídica com dois sítios reativos, um para tripsina e outro para quimotripsina e formado de 71 resíduos de aminoácidos (ODANI & IKENAKA, 1973). No caso da tripsina há presença de Lys ou Arg na posição P₁ e para a quimotripsina há presença de um grupo aromático ou um grupo hidrofóbico de cadeia longa (LIN et al., 1993).

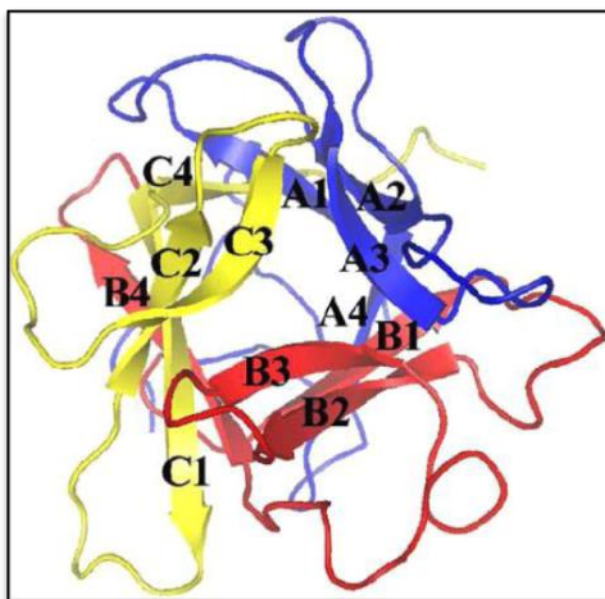


Figura 6: Estrutura do inibidor tipo Kunitz de *Delonix regia*. A proteína é formada de conformações beta com três repetições A-C, pintadas em azul, vermelho e amarelo, respectivamente (KRAUCHENCO et al., 2003).

A estabilidade da estrutura tridimensional de muitos inibidores da família tipo Kunitz é dada pela presença de inúmeras pontes de hidrogênio em conjunto com as pontes dissulfeto presentes na estrutura do inibidor (SONG & SUH, 1998). Os IPs da família tipo Kunitz apresentam estruturalmente uma alça de ligação exposta, que é conservada em todos os representantes. Essa estrutura é denominada de conformação canônica (BODE & HUBER, 1992). Esses inibidores que apresentam a conformação canônica formam complexos estáveis com a proteinase alvo, os quais se dissociam lentamente (RITONJA, et al., 1990). A alça de ligação, embora frequentemente hidrofóbica, é estabilizada por interações adicionais entre os resíduos que flanqueiam o local do sítio reativo e o núcleo do inibidor (GRÜTTER, et al., 1988).

Dentre os principais inibidores sintéticos de serino-proteases estão a benzamidina e a bis-benzamidina. A primeira é uma amina aromática (Figura 7), inibidor sintético competitivo da tripsina. Esta, quando presente no meio reacional em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S₁ da tripsina, onde é

estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e por interações eletrostáticas entre seu grupamento amidina e um resíduo carboxílico pertencente a um ácido aspártico localizado no fundo do bolso do sítio S₁, apresentando K_i de 16,6µM (MARES-GUIA & SHAW, 1965; MARES-GUIA et al., 1981, OLIVEIRA et al., 1993). A benzamidina é uma molécula modelo para os estudos de interações intermoleculares, por apresentar algumas características estruturais similares aos aminoácidos Arg e Lys (Figura 7). É totalmente protonada no pH fisiológico, também apresenta possibilidade de interações lipofílicas e um grupo amidina equivalente. Derivados da benzamidina são amplamente aplicados em estudos de afinidade de associações enzima-ligante, interações estéricas e principalmente eficiência catalítica. Por exemplo, é comprovada a influência de substituintes indutores de elétrons na posição *para* do anel benzênico, com os doadores incrementando a associação do inibidor à tripsina e os grupos atraentes agindo em sentido contrário. Um desses derivados da benzamidina é o berenil, uma bis-benzamidina (PEREIRA, 2005).

O berenil é uma molécula formada por duas moléculas de benzamidina ligadas por meio de uma ligação triazeno na posição 4 de cada anel (Figura 7). A ligação triazeno é susceptível à clivagem resultando na formação de 4-aminobenzamidina e um sal 4-amidinofenildiazônio (PEREIRA, 2005). O berenil comporta-se como um inibidor parcialmente competitivo parabólico da tripsina (JUNQUEIRA et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1993) apresentando K_i de 1,79 µM.

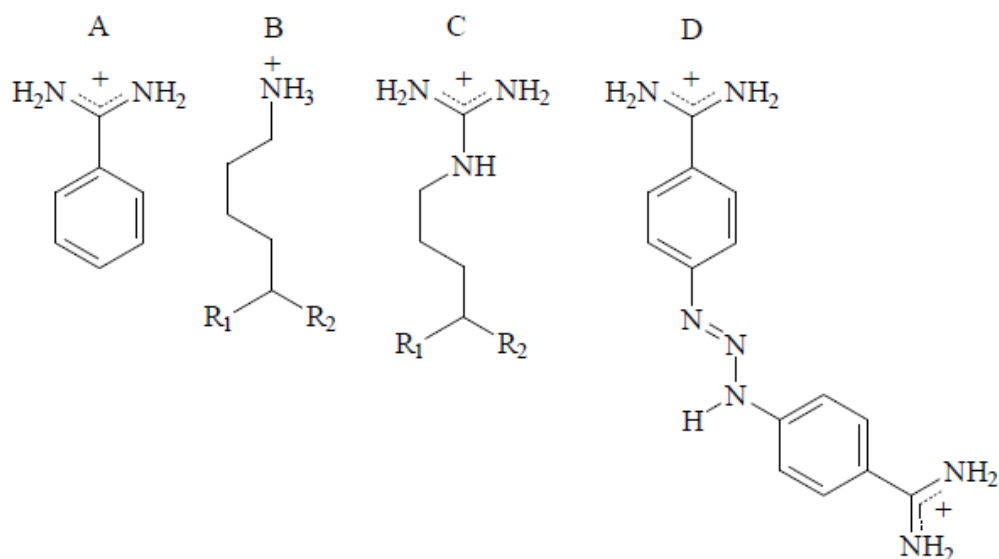


Figura 7: estrutura química da benzamidina (A), cadeia lateral da Lys (B), cadeia lateral da Arg (C) e estrutura química do berenil (D) (PEREIRA, 2005).

Outros tipos de inibidores de proteases foram descobertos em sementes, os quais são pequenos peptídeos cíclicos e foram denominados como “cyclic knottins”; eles pertencem a uma família diversa de peptídeos cíclicos que se encontram nas plantas das famílias Rubiaceae, Violaceae e Cucurbitaceae (CONNERS et al., 2007).

A sequência peptídica mais promissora é a denominada VhTI isolada a partir da *Veronica hederifolia*. Pelo trabalho de Connors et al. (2007), ela é um potente inibidor de tripsina e tem uma estrutura “helix-turn-helix” o que permitiria modificações para desenhar inibidores específicos de proteases. A sequência da parte ativa da VhTI é composta de 27 aminoácidos e contém quatro cisteínas o que permite rapidamente sua polimerização formando pontes de dissulfeto.

3.6. Cinética Enzimática

Para a caracterização cinética, uma das ferramentas mais utilizadas é a obtenção de parâmetros cinéticos da enzima a ser estudada (K_M , K_{cat} , K_{cat}/K_M) para substratos cromogênicos sintéticos.

A utilização de substratos sintéticos é justificada tendo em vista a alta dificuldade de se obter os substratos naturais em quantidades apreciáveis e graus de pureza aceitáveis. Gallimore & Friberger (1991) expôs em sua revisão sobre o uso de substratos peptídicos cromogênicos, tais como os peptidil-p-nitroanilidas, a superioridade do uso destes compostos sobre os substratos naturais e substratos sintéticos (ésteres de lisina e arginina). Os substratos cromogênicos do tipo peptidil-pNA mimetizam sequências curtas de aminoácidos dos substratos naturais e permitem o acompanhamento da hidrólise destas ligações peptídicas por leitura espectrofotométrica, em comprimento de onda de absorção máxima em 410 nm, facilitando a obtenção dos parâmetros cinéticos das enzimas que clivam estas ligações. Outra vantagem do uso destes substratos é a possibilidade de sintetizar sequências específicas de aminoácidos, permitindo verificar a influência da sequência peptídica do substrato na atividade catalítica da enzima, avaliando a especificidade de formação do complexo enzima-substrato (ES).

A obtenção dos parâmetros sem a interpretação adequada dos resultados pouco acrescenta aos trabalhos de cinética enzimática. Para melhor compreensão dos parâmetros cinéticos seguem os seus significados termodinâmicos, segundo Segel (1975):

Constante de Michaelis (K_M) – é uma constante que relaciona a velocidade de uma reação enzimática com a concentração do substrato. Ela estabelece um valor aproximado para o nível fisiológico do substrato. Valores de K_M muito elevados significa que a formação do complexo ES não é viável. Com este parâmetro cinético é possível comparar enzimas de diferentes organismos ou mesmo de um mesmo organismo em tecidos diferentes. Medindo-se os efeitos de diferentes compostos sobre K_M podemos identificar inibidores fisiologicamente importantes.

Constante catalítica (K_{cat}) – é uma constante que determina a velocidade de transformação do complexo ES em enzima e produto (E + P). O valor numérico de K_{cat} estabelece a quantidade de ciclos catalíticos que cada unidade de enzima ativa processa por unidade de tempo, geralmente expresso em s^{-1} . Assim como K_M , a K_{cat} depende da estrutura tridimensional e da natureza química dos substratos e do centro ativo da enzima.

Constante de especificidade (K_{cat}/K_M) - a razão K_{cat}/K_M conjuga os dois parâmetros anteriores e relaciona a eficiência catalítica de uma enzima pelo respectivo substrato. Quanto maior a razão K_{cat}/K_M maior será a adaptação do substrato ao centro ativo no estado de transição. Um substrato que se liga muito bem, mas tem um ciclo de catálise longo não apresentará uma boa relação K_{cat}/K_M . Da mesma forma ocorre com aquele substrato que é rapidamente processado, ou seja, tem um ciclo catalítico rápido, mas que não apresenta um grau de afinidade adequado com a enzima. Substratos que não se ligam bem e são lentamente processados apresentarão valores de K_{cat}/K_M ainda mais baixos, significando que a atividade da enzima sobre eles é baixa.

Em casos de sistemas semi-purificados ou extratos enzimáticos os parâmetros cinéticos também podem ser calculados. No entanto, como nesses sistemas a quantidade de enzima total não pode ser determinada com precisão trabalha-se com o parâmetro $V_{m\acute{a}x}$. Este não é uma constante, mas pode ser usado em cálculos cinéticos. No caso, a velocidade de transformação pode ser expressa como $V_{m\acute{a}x}/[E]$ e a constante de especificidade é dada por $V_{m\acute{a}x}/[E]/K_M$.

Desta forma, a obtenção destes parâmetros de uma determinada enzima para substratos que diferem em sua sequência de aminoácidos, pode revelar informações

importantes acerca da estrutura tridimensional do centro ativo da enzima, bem como de suas preferências com relação aos substratos naturais sobre os quais tal enzima age.

3.7. Bioinformática estrutural aplicada ao estudo de enzimas

Um dos grandes objetivos da bioinformática na era pós genômica é auxiliar no entendimento estrutural e funcional de proteínas e enzimas. Estudar a função, estrutura e modo de ação das proteínas em processos celulares são passos primordiais da biotecnologia (KUNDROTAS & ALEXOV, 2006).

Apesar das consideráveis inovações técnicas, sobretudo nas áreas de cristalografia de raios-X e difração de nêutrons e de ressonância magnética nuclear (RMN), muitos problemas básicos persistem. A obtenção de amostras em quantidade suficiente para os ensaios é, em muitos casos, difícil e os cristais obtidos nem sempre têm a qualidade necessária para o trabalho experimental, o que justifica o uso de ferramentas de bioinformática (FILHO & ALENCASTRO, 2003).

A diferença entre o número de proteínas com sequências conhecidas e o número de proteínas com estrutura e função experimentalmente caracterizadas continua aumentando. Uma forma de amenizar esta diferença é através do desenvolvimento de abordagens computacionais avançadas para prever a estrutura e função dessas sequências (YANG et al., 2015).

Existem muitas opções quanto ao método de cálculo a ser aplicado em uma determinada estratégia de modelagem molecular. Estes métodos basicamente diferem quanto à natureza do campo de força, ou seja, do conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados. Os campos podem ser totalmente empíricos, como os utilizados em mecânica molecular, ou, no outro extremo, puramente teóricos (métodos *ab initio*), passando pelos chamados métodos semi-empíricos. A aplicação de um ou

outro método é determinada pelo compromisso entre tempo e precisão dos resultados e pela complexidade do sistema a ser analisado (BARREIRO & RODRIGUES, 1997).

A ferramenta mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (*comparative protein modeling*). Esta abordagem baseia-se em alguns padrões gerais que têm sido observados, em nível molecular, no processo de evolução biológica: (a) homologia entre sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices- α e fitas- β); (c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças, que ligam os elementos de estruturas secundárias (FILHO & ALENCASTRO, 2003).

Um modelo construído por modelagem comparativa necessita que, pelo menos, uma estrutura 3D da família em questão, tenha sido elucidada por técnicas experimentais e que a sequência de aminoácidos da proteína que se quer modelar tenha sido elucidada. Entretanto, é necessário que entre ambas as sequências (problema-molde), haja certo grau de identidade. Geralmente se considera como significativo um valor acima de 25 % para a identidade sequencial entre a proteína-molde e a proteína-alvo (PACHECO, 2009).

Com essa crescente demanda por resultados rápidos e menores custos, o desenvolvimento de softwares para essa área, torna-se cada vez mais comum. Muitas dessas ferramentas são livres, podendo ser utilizadas por qualquer pesquisador sem que isso gere custos para ele. Para cada uma das etapas no processo de modelagem por homologia existe um grande número de métodos, programas e servidores (SOUZA, 2008).

Dentre os inúmeros programas de predição de estrutura de proteínas pode-se citar o I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*). É um algoritmo de computador avançado para predição da estrutura e função de proteínas. Os modelos estruturais são primeiro identificados a partir do PDB (*Protein Data Banking*) pelo programa LOMETS (*Local Meta-Threading -Server*) e depois construídos por meio de simulações de alinhamento de fragmentos interativos. Finalmente as possíveis funções da proteína-alvo são determinadas por comparação com os modelos 3D da base de dados BioLiP (Figura 8). I-TASSER (assim como o '*Zhang-Server*' – desenvolvido pela Universidade de Michigan) foi classificado como o melhor programa para a predição de estruturas de proteínas entre 2006-2012 pelo CASP (*Critical Assessment of protein Structure Prediction*), também foi classificado como o melhor para a previsão de função proteica pelo CASP9 (ZHANG, 2008; ROY et al., 2010; YANG et al., 2013; YANG et al., 2015).

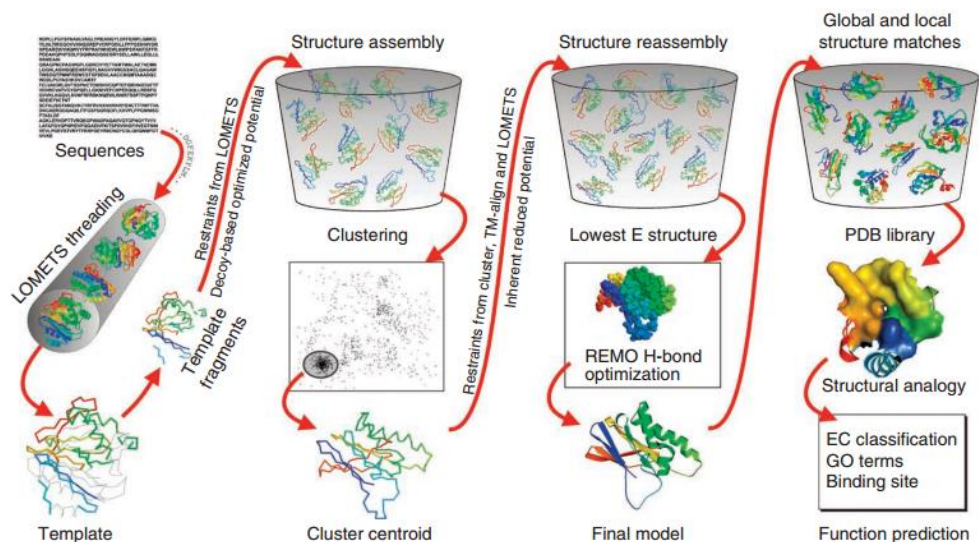


Figura 8: Representação esquemática do protocolo de predição de estrutura 3D e função de proteínas do programa I-TASSER (ROY et al., 2010).

A integração de métodos experimentais e computacionais tem enorme importância na identificação e no desenvolvimento de novas moléculas bioativas a partir de coleções de compostos reais ou virtuais (GUIDO et al., 2010).

Os métodos de predição da interação proteína-ligante se baseiam no conhecimento do arranjo topológico de alvos biológicos, logo, utilizam como pré-requisito dados 3D detalhados da macromolécula em estudo. Essa informação pode ser obtida mediante a análise de estruturas cristalográficas, de RMN ou de modelagem por homologia. O *docking* molecular é uma das principais estratégias e consiste na predição da conformação bioativa de uma pequena molécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula (proteína-alvo), seguido da avaliação e classificação do modo de ligação proposto (GUIDO et al., 2010; TROTT & OLSON, 2010).

As serino-proteases digestivas da *Anticarsia gemmatlis*, sendo um alvo promissor na estratégia de controle da praga, tornam-se essenciais nos estudos de *docking* com possíveis inibidores. A estratégia facilita a identificação de um inibidor mais potente poupando gastos em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z.; SALEEMUDDIN, M.; SIDDI, M. Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of armyworm *Spodoptera litura*. **Insect Biochem.**, 10: 667–673, 1980.

AHN, J.E. & ZHU-SALZMAN, K. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. **J. Insect Physiol.**, 55 :678–685. 2009.

ANDRADE, F.G.; NEGREIRO, M.C.C.; FALLEIROS, Â.M.F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner,1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). **Arq. Inst. Biol.**, 71:391-398, 2004.

BARBARA, K.A. Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepdoptera:Noctuidae), 2000. Disponível em: <<http://entnemdept.ifas.ufl.edu/creatures/field/velvetbean.htm> >, acessado em 04 de novembro de 2010.

BARREIRO, E. J. & RODRIGUES, C. R. modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Quim. Nova**, 20:1-11, 1997.

BARRETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods Enzymol.**, 244:1-15, 1994.

BARRETT, A.J. & RAWLINGS, N.D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **J. Biol. Chem.**, 382, 727–733. 2001.

BATISTA, A.C.; MELATTI, V.M.; DEMO,C.; MARTINI, E.S.; PRAÇA, L.B.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; BROD, C.S.; MONNERAT, R.G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatalis*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n.82, EMBRAPA,2005.

BODE, W. & HUBER, R. Natural protein inhibitors and their interactions with proteinases. **Eur. J. Biochem.**,204: 433-451, 1992.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 27:625-638, 1997.

BOWN, D. P.; WILKINSON; H. S.; GATEHOUSE, J. A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteinase in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary proteinase inhibitors. **Physiol. Entomol.**, 29:278–290, 2004.

BRANDON, D. L.; BATES, A. H.; FRIEDMAN, M. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay of the Bowman-Birk protease inhibitor of soybean. **J. Agr. Food Chem.**, 37: 1192-1196, 1989.

BRANDON, D. L. & FRIEDMAN, M. Immunoassays of soy proteins. **J. Agr. Food Chem.**, 50: 6635-6642, 2002.

BRITO, L. O.; LOPES, A. R.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W .R.; SILVA-FILHO, M. C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 128: 365-375, 2001.

CARTER, P. & WELLS, J.A. Dissecting the catalytic triad of serine protease. **Nature**, 332: 564-568, 1988.

CONNERS, R.; KONAREV, A.V.; FORSYTH, J.; LOVEGROVE, A.; MARSH, J.; JOSEPH-HORNE, T.; SHEWRY, P.; BRANDY, R.L. An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of *Veronica hederifolia* L.). **J. Biol. Chem.**, 282:27760-27768, 2007.

CRAIK, C.S.; ROCZNIAK, S.; LARGMAN, C.; RUTTER, W.J. The catalytic role of the site aspartic acid in serine proteases. **Science**, 237: 909-913, 1987.

DALL'AGNOL, A.; LAZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira, Circular Técnica 74 Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Abril 2010.

DUNAEVSKY, Y. E., ELPIDINA, E. N., VINOKUROV, K. S., BELOZERSKY, M. A. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. **Mol. Biol.**, 39:608–613, 2005.

EGUCHI, M. & KURIYAMA, K. Purification and characterization of membrane-bound alkaline proteases from the midgut tissue of the silk-worm *Bombyx mori*. **J. Biochem.**, 97: 1437–1445, 1985.

EMBRAPA, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, Sistemas de Produção/Embrapa Soja, n.16. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 265p, 2013.

FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, 4: 129-134, 1992.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. & GATEHOUSE, A.M.R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Transgenic Res.**, 15:13-19, 2006.

FILHO, O. A. S. & ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Quim. Nova**, 26: 253-259, 2003.

FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SA, M.F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: structure, function and potential for crop protection. **Eur. J. Biochem.**, 269:397-412, 2002.

GALLIMORE, M. J. & FRIBERGER, P. Chromogenic peptide substrate assays and their clinical applications. **Blood Rev.**, v.5, p.117-127, 1991.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Manual de Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ, 920p., 2002 .

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytol.**, 156: 145-169, 2002.

GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X.; VULFSON, E.N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. **Enz. Microbial Technol.**, 18:162-183, 1996.

GRÜTTER, M. G.; FENDRICH, G.; HUBER, R.; BODE, W. The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. **EMBO J.**, 7: 345-351, 1988.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicação em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, 24: 81-98, 2010.

HAQ, S. K., ATIF, S. M., KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Arch. Biochem. Biophys.**, 431:145-159, 2004.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Rev.**, 102:4501-4523, 2002.

HERRERO, S.; COMBES, E.; VAN OERS, M.M.; VLAK, J.M.; MAAGD, R.A.; BEEKWILDER, J. Identification and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 35:1073-1082, 2005.

HILDER, V.A. & BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance- a critical review. **Crop Protection**, 18:177-191, 1999.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; SINGH, D.; KHAN, M. Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. **Phytochem. Rev.**, published online: 04 may 2012.

JONGSMA, M.A. & BOLTER, C. The adaptations of insects to plant proteinase inhibitors. **J. Insect Physiol.**, 43:885-895, 1997.

JOSÉ, M. O. M. A. Inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk: evolução molecular, expressão na superfície de fagos filamentosos e seu papel na interação planta-inseto.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 108 p., 2002.

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Partial competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines: a general model for the trypsin-like family of proteases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 25: 873-887, 1992.

KRAUCHENCO, S.; PANDO, S. C.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 312: 1303-1308, 2003.

KREM, M.M.; ROSE, T.; DI CERA, E. The C-terminal sequence encodes function in serine proteases. **J. Biol. Chem.**, 274:28063-28066, 1999.

KUNDROTAS, P. J. & ALEXOV, E. Predicting 3D structures of transient protein-protein complexes by homology. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1764: 1498-1511, 2006.

LAWRENCE, P.K. & KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic J. Biotechnol.**, 5:93-109, 2002.

LIN, G.; BODE, W.; HUBER, R.; CHI, C.; ENGH, R. A. The 0.25nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. **Eur. J. Biochem.**, 212: 549-555, 1993.

LIU, Y.L., SALZMAN, R.A., PANKIW, T., ZHU-SALZMAN, K., Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 34:1069–1077, 2004.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; TERRA, W. R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 55: 140-152, 2004.

LOPES, A.R., JULIANO, M.A., MARANA, S.R., JULIANO, L., TERRA, W.R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 36:130-140, 2006.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; FRANCO, O. L.; MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, C. F. R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comp. Biochem. Physiol. (Part B)**, 158: 164-172, 2011.

MAFFEI, M.E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. **Phytochem.**, 68:2946-2959, 2007.

MAGRINI, E.A., BOTELHO, P.S.M., SILVEIRA NETO, S. Biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) in the soybean crop. **Sci. Agri.**, 56:547-555, 1999.

MARES-GUIA, M. & SHAW, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate said chain. **J. Biol. Chem.**, 240: 1579-1585, 1965.

MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A. F.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M. Kinetic evidence for a two-state, hydrid model for the trypsin activation by modifiers. **J. Biol. Chem.**, 256: 1661-1668, 1981.

ODANI, S. & IKENAKA, T. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. (VII)- Dissulfide bridges in Soybean Bowman-Birk Proteinase Inhibitor. **J. Biochem.**, 74: 697-715, 1973.

OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is parto f te substrate activation binding site of bovine trypsin. **J. Biol. Chem.**, 268: 26893-26903, 1993.

OLIVEIRA, C. F. R.; SOUZA, T. P.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; SILVA-FILHO, M. C.; MACEDO, M. L. R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comp. Biochem. Physiol. (Part B)**, 165: 19-25, 2013.

PACHECO, A. G. M. Modelagem molecular comparativa e estudos de acoplamento molecular da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora pernicioso*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, 93 p, 2009.

PAGE, M.J. & Di CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cell. Mol. Life Sci.**, 65:1220-1236, 2008.

PEREIRA, M. T. Avaliação termodinâmica completa da interação entre a β -tripsina e os inibidores benzamidina e berenil. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia), Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

PERONA, J.J. & CRAIK, C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Prot. Sci.**, 4:337-360, 1995.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pest. Biochem. Physiol.**, 86:23-29, 2006.

PILON, F.M. Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de serino e cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 115 p, 2008.

PILON, F. M. Clonagem e expressão de serino-proteases de *Anticarsia gemmatalis* e caracterização cinético-enzimática de tripsinas-like purificadas, produzidas por sua microbiota intestinal. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 131 p, 2012.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; PILON, F. M.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, J. A.; FAZOLLO, A. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. **Revista Ceres**, 56:744-748, 2009.

PÓLGAR, L. & HALÀSZ, P. Currents problems in mechanistic studies of serine and cisteyne proteases. **Biochem. J.**, 207: 1-10, 1982.

PRAÇA, L.B.; SILVA NETO, S.P.; MONNERAT, R.G. *Anticarsia gemmatalis*/Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae:). Biologia, amostragem e métodos de controle. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Série Documento, 196), 2006.

RAO, M.B.; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62: 597-635, 1998.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitor. In: Methods in plants Biochemistry. **New York Academic Press**, 5: 259-305, 1991.

RITONJA, A.; KRIZAL, I.; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKEL, J. B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J.; TURK, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Lett.**, 504: 41-44, 1990.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, 5: 725-738, 2010.

SAVIO, G. M. & PINOTTI, E. B. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) por *baculovirus anticarsia*. Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF). Ano VII – Nº 13 – Jun/Periódicos Semestral, 2008.

SCHECHTER, I. & BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem. Res. Commun.**, 27:157-162, 1967.

SCOTT, I. M.; THALER, J. S.; SCOTT, J.G. Response of a Generalist Herbivore *Trichoplusiani* to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato. **J. Chem. Ecol.**, 36:490–499, 2010.

SEGEL, I.H. Enzyme kinetics –behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: John Wiley, 1975.

SHI, M.; ZHU, N.; YI, Y.; CHEN, X. Four serine protease cDNAs from the midgut of *Plutella xylostella* and their proteinase activity are influenced by the endoparasitoid, *Cotesia vestalis*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 83:101-114, 2013.

SHIVAJI, R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J.H.; WILLIAMS, W.P.; WILKINSON, J.R.; LUTHE, D.S. Plants on Constant Alert:

Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. **J. Chem. Ecol.**, 36:179–191, 2010.

SILVA C. P.; TERRA W. R.; DE SÁ M. F. G.; SAMUELS R. I., ISEJIMA E. M., BIFANO T.D., ALMEIDA, J.S. Induction of digestive α - amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α - amylases inhibitor 1. **J. Insect Physiol.**, 47:1283- 1290, 2001.

SILVA, F.B.; OLIVEIRA, M. G. A.; BATISTA, R.B.; PIRES, C.V.; XAVIER, L. P. PIOVESAN, N.D.; OLIVEIRA, J.A.; JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M.A. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner.). **Arquivos do Instituto Biológico**, 69:67-74, 2002.

SILVA-FILHO, M.C. & FALCO, M.C. Interação planta inseto- Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. **Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento**, 12: 38-42, 2000.

SONG, H. K. & SUH, S. W. Kunitz type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interection between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue type plasminogen activator. **J. Mol. Biol.**, 275: 347-363, 1998.

SOUZA, M. L. Modelagem por homologia de estruturas proteicas do veneno de *Apis mellifera*. Monografia (Bacharel em Informática Biomédica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 72 p, 2008.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, 11:132-154, 2006.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109b:1-62, 1994.

TROTT, O. & OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J. Comput Chem.**, 31:455–461, 2010.

VIANNA, U.R.; PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J.C.; De ALENCAR, J.R.C.C.; ZINGER F.D. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arq. Inst. Biol.**, 78:81-87, 2011.

VISÔTTO, L. E.; OLIVEIRA , M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; RIBON , A.O.B.; GOOD-GOD, P.I.V. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **J. Insect Physiol.**, 55:185–191, 2009a.

VISÔTTO, L. E.; OLIVEIRA , M.G.A.; RIBON, A.O.B.; MARES-GUIA, T.R.; GUEDES, R.N.C. Characterization and Identification of Proteolytic Bacteria From the Gut of the Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Entomol. Ecol.**, 38:1078-1085,2009b.

WAGNER, W.; MÖHRLLEN, F.; SCHNETTER, W. Characterization of the proteoliticenzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera:Scarabaeidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 32:803-814, 2002.

WIELKOPOLAN, B.; WALCZAK, F.; PODLEŚNY, A.; NAWROT, R.; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. Identification and partial characterization of proteases in larval preparations of the cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*, Chrysomelidae, Coleoptera). **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, no Prelo, 2015.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Bioinformatics**, 29: 2588-2595, 2013.

YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; POISON, J.; ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, 12, 7-8, 2015.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, 9:40, 2008.

ZHU-SALZMAN, K.; LUTHE, D.S.; FELTON, G.W. Arthropod-inducible proteins, broad spectrum defenses against multiple herbivores. **Plant Physiol.**, 146: 852–858, 2008.

Capítulo 1

Modelagem molecular por homologia e estudos de *docking* com peptídeos sintéticos inibidores de serino-proteases digestivas tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis*

RESUMO

As serino proteases digestivas de *Anticarsia gemmatalis* são alvo de estudo como estratégia alternativa de controle da praga. Para o desenvolvimento de possíveis inibidores é necessário o conhecimento das estruturas das enzimas, além do estudo das interações com os possíveis inibidores. Diante disso, o objetivo do trabalho foi realizar a modelagem molecular por homologia das serino-proteases digestivas de *A. gemmatalis* e utilizar os modelos obtidos para o estudo de *docking* com os peptídeos ligantes. A partir do RNA total extraído do intestino médio da lagarta foram obtidas sequências utilizadas na modelagem molecular com o programa I-TASSER. Foram obtidos três modelos estruturais validados através dos parâmetros de *C-score* e *B-factor profile*. A análise do *C-score*^{EC} classificou as enzimas como serino-proteases. No estudo de *docking*, dos sete ligantes testados, somente Gor K, Gor R e Gor 5 apresentaram valores de energia livre de ligação para a formação de complexos estáveis. As principais interações observadas foram em regiões do centro ativo e sítio secundário das enzimas.

1. INTRODUÇÃO

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, é considerada uma das principais pragas da cultura da soja. Os danos causados pelo ataque desse inseto associado à relevância econômica do cultivo de soja para o Brasil e para o mundo fomentam a busca por alternativas no controle dessa praga (SAVIO et al., 2008; VIANNA et al., 2011). Estratégias de controle de insetos-pragas baseadas no uso de inibidores de proteases têm sido estudadas e o conhecimento das enzimas digestivas tem se mostrado fundamental.

Estudar a estrutura/função dessas proteínas possibilita o entendimento do mecanismo adaptativo de *A. gemmatalis*, já que a diversidade funcional das moléculas

expressas está diretamente correlacionada à adaptação dos herbívoros às defesas das plantas.

As interações moleculares do tipo proteína-proteína, enzima-substrato, proteína-ácido nucléico, entre outras, apresentam um papel importante nos processos biológicos geralmente pela formação de complexos estáveis. A estrutura terciária das proteínas é necessária para compreender o modo de ligação e a afinidade entre as moléculas (OGAWA, 2013).

Uma sequência de aminoácidos ao se enovelar resulta em estruturas tridimensionais. A estrutura terciária está intimamente relacionada à função das moléculas e, portanto, sua determinação é parte importante no estudo das proteínas. Essas estruturas podem ser obtidas por métodos experimentais como cristalografia de raios-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), mas esses métodos dependem muito tempo e recursos financeiros, além de que muitas estruturas são difíceis ou até mesmo impossíveis de serem determinadas por esses métodos. Surge assim a proposta da modelagem molecular comparativa ou por homologia (FILHO & ALENCASTRO, 2003; SOUZA, 2008, YANG et al., 2015).

Um modelo construído por modelagem comparativa necessita que, pelo menos, uma estrutura 3D da família em questão tenha sido elucidada por técnicas experimentais e que a sequência de aminoácidos da proteína que se quer modelar seja conhecida. Além disso, é necessário que entre ambas as sequências (problema-molde) haja certo grau de identidade (PACHECO, 2009).

Após a obtenção da estrutura tridimensional da proteína alvo, o *docking* molecular é considerado um abordagem importante para a compreensão das interações entre o complexo proteína-ligante (OGAWA, 2013). O *docking* molecular é um procedimento computacional de predição de interações não covalentes de

macromoléculas ou, mais frequentemente, de uma macromolécula (receptor) e uma molécula pequena (ligante) de forma eficiente. O objetivo é prever a conformação e a afinidade das ligações (TROTT & OLSON, 2010).

A previsão exata das formas de ligação entre o ligante e a proteína é essencial na concepção moderna de drogas baseadas na estrutura. A aplicação mais importante dos softwares de *docking* é a triagem virtual, em que as moléculas mais promissoras são selecionadas a partir de um banco de dados existente para futuras pesquisas. Outra aplicação é a pesquisa de complexos moleculares, sendo possível avaliar as interações da proteína com diferentes ligantes construídos para compreender as possíveis respostas biológicas (OGAWA, 2013).

Dentro desse contexto, o objetivo do trabalho foi realizar a modelagem molecular por homologia das serino-proteases do intestino de *A. gemmatalis* e realizar o estudo de *docking* com diferentes ligantes a fim de conhecer possíveis inibidores das proteases digestivas criando um método alternativo de controle de pragas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Sequências utilizadas das serino-proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis*

As sequências das serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis* foram obtidas no Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do BIOAGRO/UFV por Pilon (2012). O RNA total foi extraído do intestino médio de larvas do 5º instar criadas com dieta artificial. Em seguida foi realizada a síntese de cDNA e a amplificação dos fragmentos de interesse utilizando *primers* degenerados baseados em domínios conservados de serino-proteases de outros insetos da ordem Lepidoptera. Após sequenciamento foram realizadas análises dos resultados usando o programa BLASTX. Foram obtidas três sequências denominadas Agem 1, Agem 2 e Agem 3.

2.2. Modelagem molecular por homologia

Para a predição das estruturas 3D e da função das três sequências de serino-proteases foi utilizado o programa I-TASSER (ZHANG, 2008; ROY et al., 2010; YANG et al., 2013; YANG et al., 2015) com os parâmetros standard do programa. A predição é baseada na estrutura secundária da sequência através do perfil de alinhamento de segmentação (*PPA – Profile-Profile threading Alignment*). A sequência alvo inicialmente é fragmentada e é feito um alinhamento com as estruturas do PDB (*Protein Data Banking*) com similaridade superior a 70% para localizar os possíveis pontos de dobras da estrutura. É avaliado o ângulo de torção e as distâncias interatômicas. A resolução dos modelos apresentam RMSD (*Root Mean Square Deviation*) na faixa de 1-2 Å. A precisão dos modelos das estruturas obtidas pelo I-TASSER é estimada através do cálculo da pontuação de confiança (ou C-score) das simulações de montagem da estrutura. Esse parâmetro varia de -5 a 2 e quanto mais positivo o resultado maior a confiabilidade da estrutura predita. Os modelos gerados pelo programa foram visualizados e analisados no visualizador VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (HUMPHREY et al., 1996). A melhor estrutura obtida pelo I-TASSER para cada sequência foi utilizada nos estudos de *docking* com os ligantes.

2.3. Estudos de *docking* com diferentes peptídeos ligantes

Para os estudos do complexo enzima-ligante foram testados sete diferentes peptídeos. Para determinar qual conformação representa melhor a interação entre a enzima e o ligante é avaliado o valor da energia de ligação. Valores de energia liberada acima de -7,0 kcal/mol são consideradas satisfatórias e o complexo formado é dito como estável (TROTT & OLSON, 2010). As sequências de cada um dos ligantes estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos peptídeos ligantes utilizados nos estudos de *docking* com as três estruturas 3D previstas das serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis*

Denominação do peptídeo	Sequência
Gor 1	V-L-K
Gor 2	V-L-R
Gor 3	V-L-F
Gor 4	V-L-Y
Gor 5	V-L-W
Gor K	H-A-A-P-K
Gor R	H-A-A-P-R

Inicialmente foi utilizado o programa Avogadro (HANWELL et al., 2012) para desenhar a estrutura dos sete peptídeos ligantes testados. A estrutura foi mantida em sua forma linear para que todos os possíveis dobramentos para a interação com a enzima fossem avaliados. Para os estudos de *docking* foi utilizado o programa AutoDock Vina (TROTT & OLSON, 2010) que prediz com muito detalhe o *docking* da cadeia lateral do receptor com o ligante, sendo próprio para ligantes pequenos. Os ajustes nas estruturas das enzimas e dos ligantes foram feitos no programa AutoDock Tools. Foram realizados dois testes: a) avaliação das possíveis interações em toda a superfície de cada enzima com cada ligante; b) delimitação na estrutura de cada enzima dos sítios de ligação previstos pelo I-TASSER e avaliação dos possíveis pontos de interação nessa região.

O sucesso de algoritmos de *docking* em prever a posição de ligação é normalmente medido em termos do parâmetro RMSD entre as posições dos átomos pesados dos ligantes observadas experimentalmente e a prevista pelo algoritmo. Um bom desempenho é geralmente considerado quando o RMSD é inferior a 2 Å. O programa AutoDock Vina trabalha com 78% de precisão considerando o RMSD menor que 2 Å.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Modelagem por homologia

Para a modelagem molecular foram utilizadas três sequências de serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis* codificadas pelos genes Agem 1, Agem 2 e Agem 3. As sequências de aminoácidos foram denominadas Seq 1, Seq 2 e Seq 3 seguindo a mesma numeração dos respectivos genes. A Seq 1 é constituída de 157 resíduos de aminoácidos, Seq 2 constituída de 206 resíduos e Seq 3 constituída de 169 resíduos.

O uso do I-TASSER em comparação aos demais programas é vantajoso visto que a validação do modelo já é realizada no próprio servidor através da verificação de diferentes parâmetros de precisão e confiança do modelo gerado (ROY et al., 2010).

Os modelos foram gerados pelo I-TASSER que combina os métodos de segmentação, modelagem *ab initio* e refinamento estrutural. O procedimento foi totalmente automatizado. Para cada sequência analisada foi predita a estrutura secundária através de simulações de alinhamento de fragmentos da sequência alvo com os possíveis modelos. O programa selecionou os dez melhores modelos existentes no PDB de estruturas resolvidas por cristalografia para realizar o alinhamento. Para todas as sequências analisadas as proteínas moldes eram serino-proteases com o domínio de tripsina conservado. A identidade mínima de cada modelo com a sequência analisada, nos três casos, foi maior que 25%.

A precisão local dessa predição é definida como a distância de desvio (em Angstrom) entre as posições dos resíduos nos modelos e na estrutura nativa. O parâmetro que avalia se a predição é confiável é o *B-factor profile* (BFP). Resíduos de aminoácidos com valores de BFP maiores do que 2 são considerados menos estáveis na estrutura experimental. Na figura 1 estão os gráficos gerados pelo I-TASSER com os valores de BFP para cada resíduo na sequência analisada.

Observa-se que das três sequências avaliadas todas apresentaram valores satisfatórios de BPF para os resíduos de aminoácidos, garantindo uma maior precisão das estruturas secundárias preditas nos fragmentos analisados. Os valores de BPF para a sequência Seq 1 variaram de -1,09 a 1,21 sendo predominantes as estruturas de fitas β e “random coil”. Na sequência Seq 2 os valores de BPF variaram de -1,44 a 2,12, sendo que apenas um resíduo apresentou o valor de BPF maior que 2. As estruturas secundárias mais frequentes em Seq 2 foram fitas β e “random coil”. A variação de BPF para Seq 3 foi de -1,18 a 1,69 e as estruturas secundárias predominantes foram fitas β e “random coil”.

O arranjo característico das serino-proteases tripsina-*like* é constituído pela maior quantidade de estruturas tipo folhas β (HEDESTROM, 2002). Assim, as características das estruturas secundárias preditas pelo I-TASSER coincidem com aquelas comuns às proteínas da família da tripsina dando maior confiabilidade aos resultados.

Nas análises da composição de aminoácidos de cada enzima, realizadas com o programa ProtParam, foi observado para a sequência Seq 1 um alto conteúdo de resíduos de alanina (17), arginina (17) e glicina (15). Existe a predominância de resíduos carregados positivamente (Arg + Lys) em relação aos resíduos carregados negativamente (Asp + Glu): 20 e 13, respectivamente. Para a sequência Seq 2 os resíduos de alanina (21), glicina (19), serina (19) e treonina (19) foram os predominantes, sendo que o número de resíduos carregados negativamente (16) foi maior do que os resíduos carregados positivamente (14). Os resíduos de glicina (18), alanina (16) e valina (15) foram os frequentes na enzima Seq 3, sendo que a distribuição de resíduos carregados positivamente e negativamente foi mais uniforme (14 e 15 respectivamente).

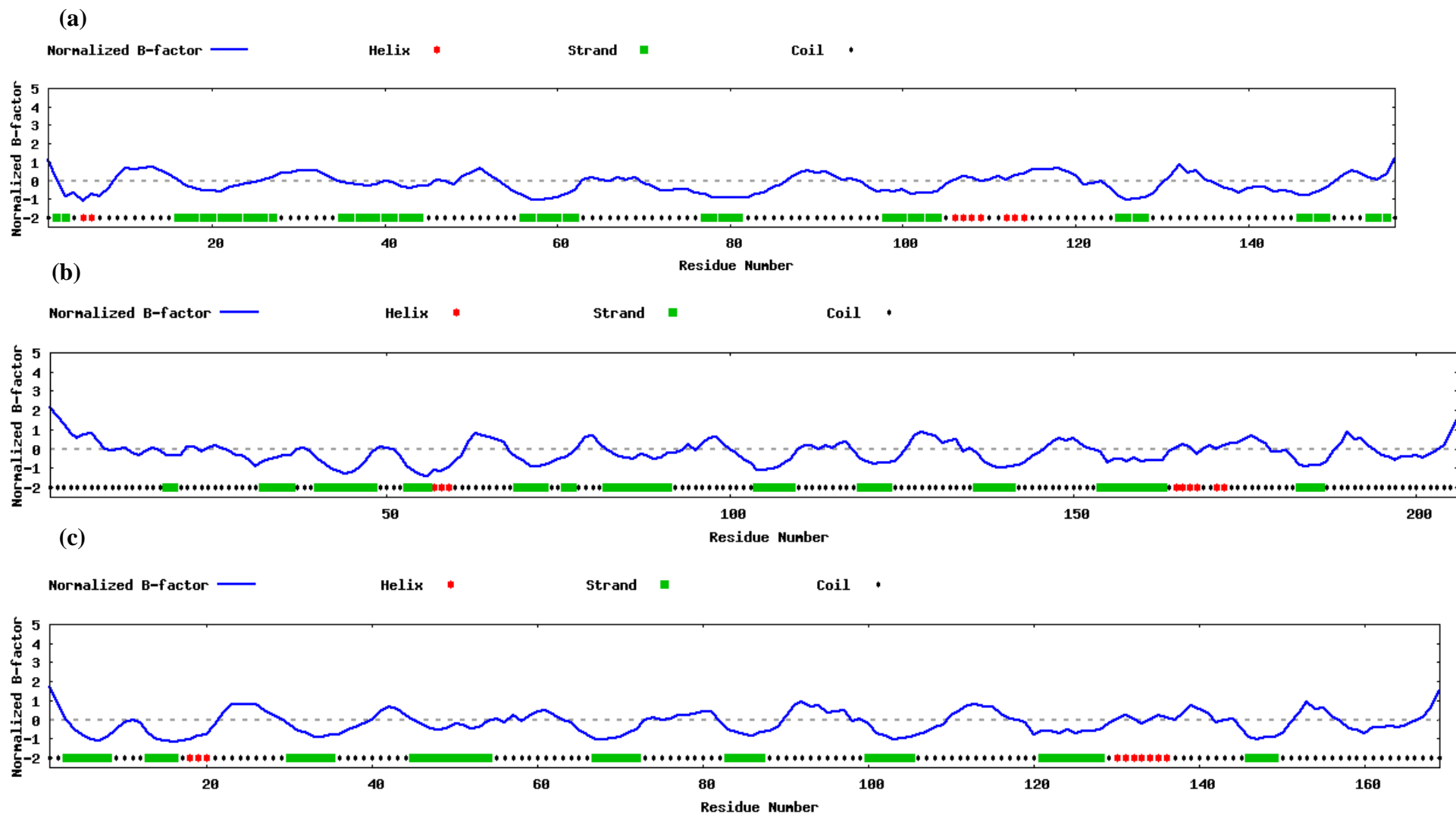


Figura 1: Gráficos do parâmetro *B-factor profile* (BPF) para a predição da estrutura secundária das sequências das serino-proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis*. (a) Sequência Seq 1. (b) Sequência Seq 2. (c) Sequência Seq 3.

Após os alinhamentos, o programa I-TASSER gerou os cinco melhores modelos 3D para cada sequência avaliada, os quais foram visualizados pelo programa VMD que é compatível com a extensão do arquivo .pdb gerado pelo software. O parâmetro utilizado para validar essa etapa foi o C-score que prevê a qualidade da modelagem ou seja, qual a distância entre as estruturas nativas e o modelo previsto (ROY et al., 2012).

Para Seq 1 o C-score dos cinco modelos variaram de -5 a 0,44. Considerando que quanto mais positivo o valor mais confiável é o resultado, o modelo selecionado para os estudos de *docking* foi o de C-score 0,44. O C-score dos cinco modelos de Seq 2 variaram de -2,49 a 0,22 sendo selecionado o modelo de C-score 0,22. A variação de C-score de -5 a 0,97 foi observado para Seq 3, sendo o modelo com o parâmetro de valor 0,97 selecionado para os estudos posteriores.

Na figura 2 estão representados os melhores modelos para cada uma das sequências estudadas. O padrão de enovelamento do domínio catalítico das serino-proteases é altamente conservado o que favorece um alinhamento com maior precisão para a predição da estrutura 3D (RUSSO, 2006). A atividade catalítica das serino-proteases da família da tripsina é fornecido por um sistema de “relé de carga” que envolve um resíduo de ácido aspártico, uma histidina e a serina reativa. As sequências na vizinhança do local dos resíduos de serina e histidina ativos são bem conservadas nesta família de proteases (PÓLGAR & HALÁSZ, 1982; CRAIK et al., 1987; HEDSTROM, 2002). Nos modelos preditos os resíduos da tríade catalítica estão representados em vermelho. Tanto em Seq 1 quanto em Seq 2 o resíduo de histidina encontra-se na estrutura da hélice. A serina reativa que caracteriza a família encontra-se no sítio catalítico em todas as três estruturas apresentadas.

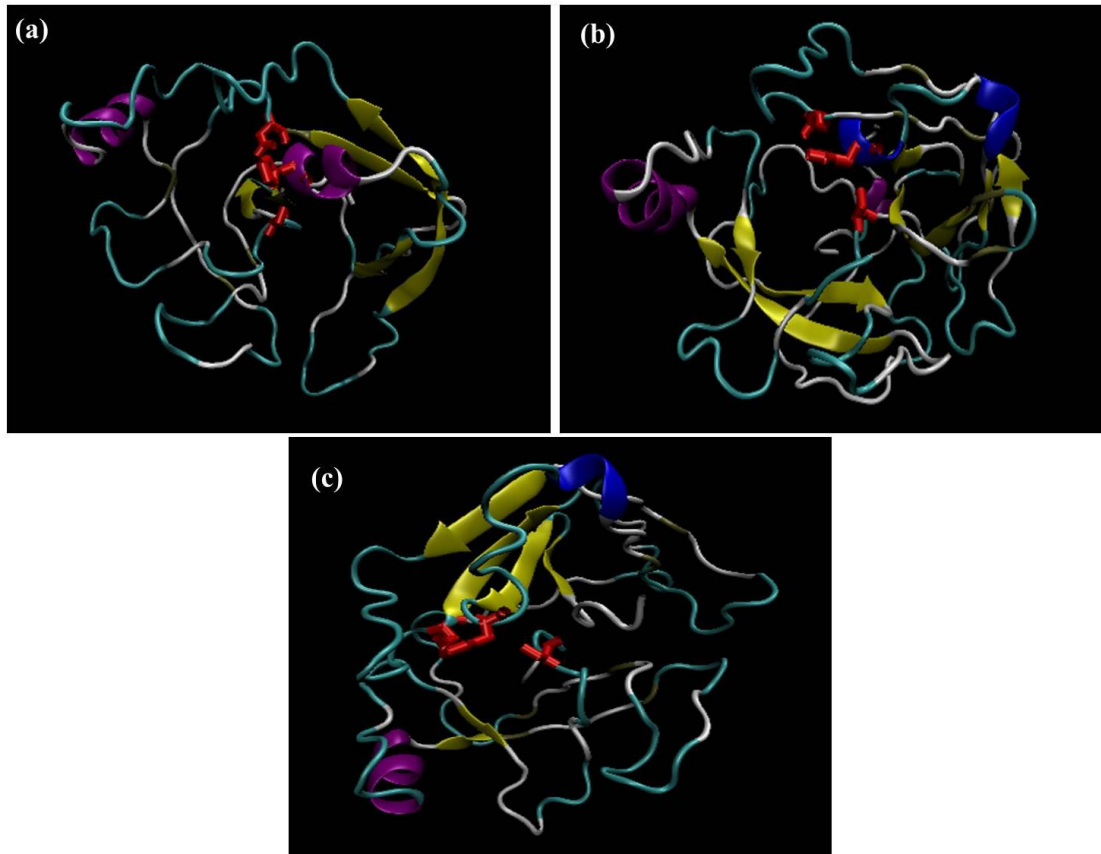
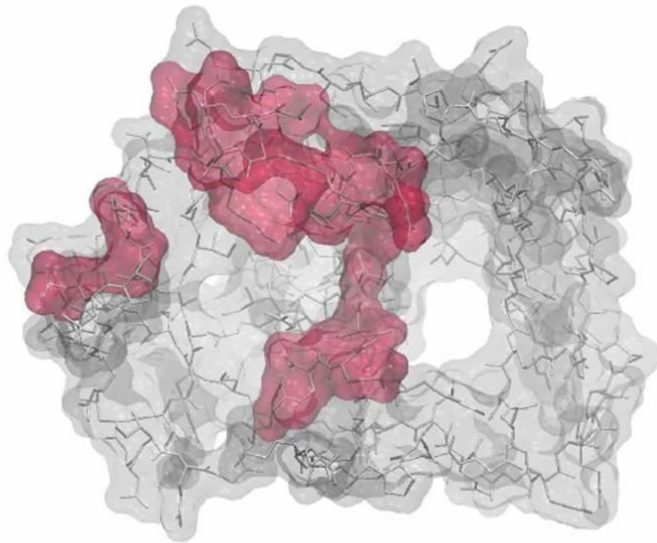


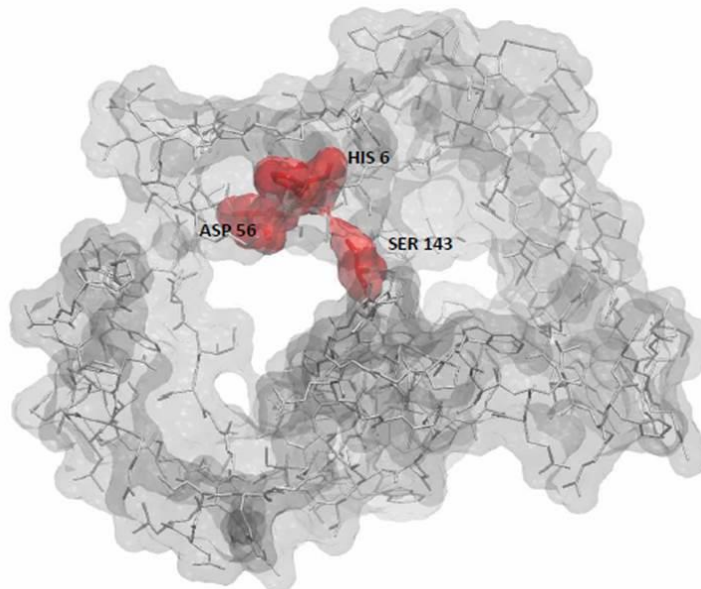
Figura 2: Modelos 3D gerados pelo programa I-TASSER das serino-proteases intestinais de *A. gemmatilis* utilizando o visualizador VMD. Vista através do sítio ativo. Em vermelho estão representados os resíduos da tríade catalítica, em roxo estão representadas as α -hélices, em amarelo as folhas- β e em azul os “random coil”. **(a)** Modelo de Seq 1 (H6, D56, S143). **(b)** Modelo de Seq 2 (H59, D103, S201). **(c)** Modelo de Seq 3 (H19, D66, S164).

A predição dos possíveis sítios de ligação gerados pelo I-TASSER contemplou os resíduos de aminoácidos da tríade catalítica para Seq 1. A figura 3 apresenta a região de ligação predita pelo programa e a localização da tríade catalítica na enzima.



Binding positions (ITASSER)

6 7 9 10 48 49 50 51 52 53 54 56 115 118
119 120 137 138 139 140 141 142 143



Catalytic triad

Figura 3: Modelos 3D da região predita para ligação na enzima Seq 1. No primeiro modelo na região em vermelho estão os resíduos que fazem parte do centro ativo predito pelo I-TASSER. No segundo modelo estão destacados em vermelho os resíduos da tríade catalítica.

Observa-se que os resíduos da tríade encontram-se na região predita como centro ativo da enzima caracterizado por uma cavidade profunda. Para Seq 2 o sítio de ligação predito pelo I-TASSER não contempla o resíduo de aspartato 103 da tríade catalítica. No entanto, é possível visualizar que o aminoácido está na região predita como centro

ativo em posição próxima aos outros dois resíduos que constituem a tríade catalítica desta enzima (Figura 4).

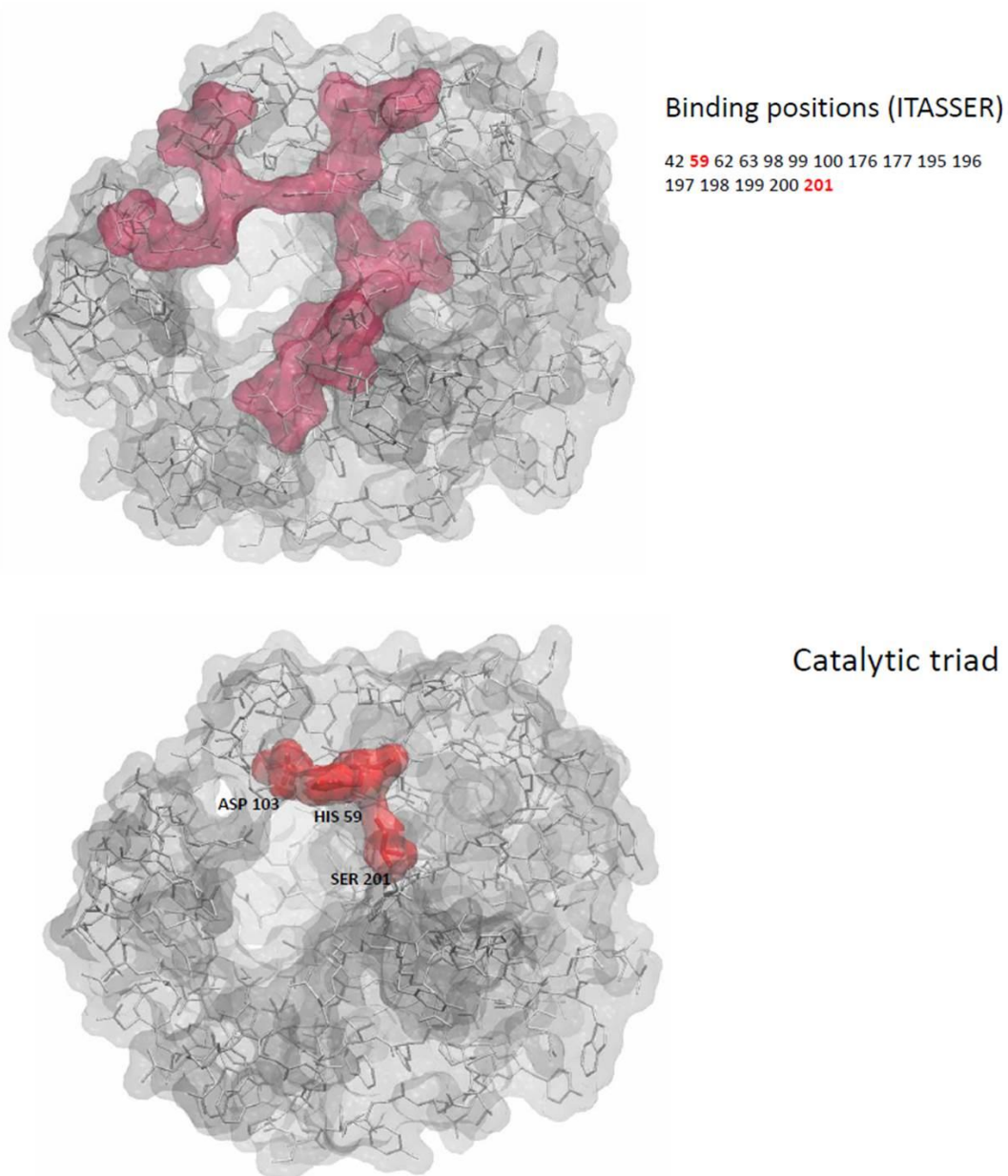


Figura 4: Modelos 3D da região predita para ligação na enzima Seq 2. No primeiro modelo na região em vermelho estão os resíduos que fazem parte do centro ativo predito pelo I-TASSER. No segundo modelo estão destacados em vermelho os resíduos da tríade catalítica.

Na estrutura de Seq 3 o resíduo de aspartato 66 não foi predito na região do centro ativo apesar dos resíduos da tríade se encontrarem nessa região (Figura 5). A ausência do resíduo de aspartato em Seq 2 e Seq 3 ocorreu apenas no modelo com maior

C-score. As posições foram contempladas entre os cinco melhores modelos para cada enzima. Nos estudo de *docking* com as enzimas, as interações ocorrem com a tríade como será discutido posteriormente.

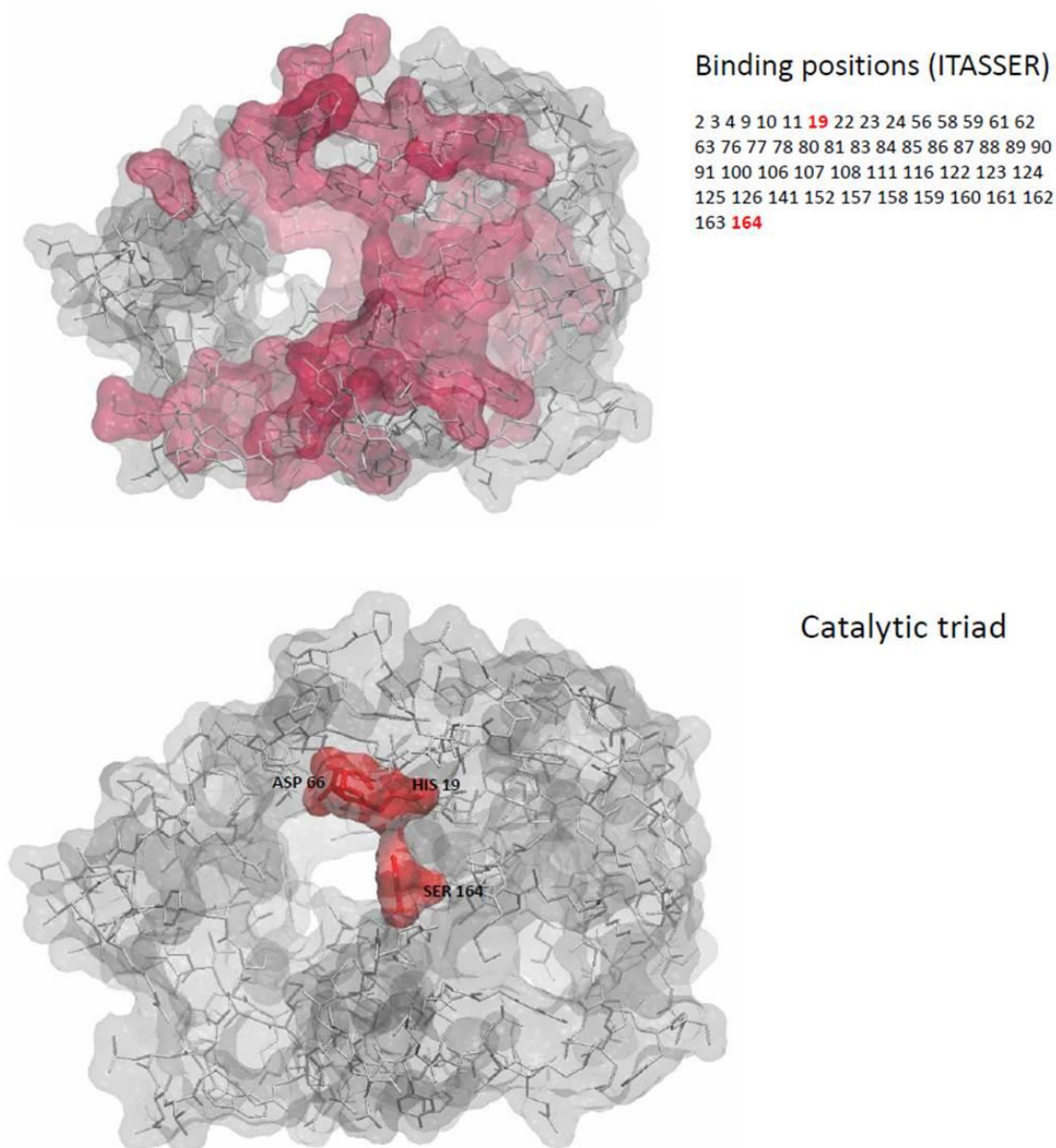


Figura 5: Modelos 3D da região predita para ligação na enzima Seq 3. No primeiro modelo na região em vermelho estão os resíduos que fazem parte do centro ativo predito pelo I-TASSER. No segundo modelo estão destacados em vermelho os resíduos da tríade catalítica.

Para a predição da função o I-TASSER selecionou para cada enzima os cinco melhores modelos avaliados pelo parâmetro C-score^{EC} que é a pontuação de confiança

para a predição do número de Classificação da Enzima (EC). Os valores de C-score^{EC} variam entre 0 e 1, onde uma pontuação mais alta indica uma previsão mais confiável do EC. A tabela 2 apresenta o maior valor de C-score^{EC} para cada enzima e o número de classificação da enzima predito.

Tabela 2: Predição do número de Classificação da Enzima baseado no parâmetro C-score^{EC} para as sequências das serino-proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis*

Sequência	C-score ^{EC}	EC number
Seq 1	0,576	3.4.21
Seq 2	0,561	3.4.21
Seq 3	0,625	3.4.21

A classificação EC para todas as três enzimas foi 3.4.21 que equivale a categoria serino endopeptidases. O número de classificação EC é baseado na reação química que a enzima catalisa. No caso as enzimas analisadas são da classe hidrolases, sub-classe peptidases e especificamente endopeptidases. Dentro desse grupo encontra-se a enzima tripsina, alvo do estudo dessa modelagem.

3.2. Estudos de *docking* com os modelos preditos das serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis*

Os modelos para as sequências das enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3 utilizados nos estudos de *docking* foram os apresentados na figura 3. Com a ferramenta AutoDock Tools foram determinados os parâmetros de flexibilidade, hidrogenação dos resíduos de aminoácidos e o tamanho da caixa com as coordenadas para as simulações realizadas no AutoDock Vina.

As serino-proteases tripsina-like têm preferência por clivar substratos que apresentam arginina ou lisina na posição P₁ (HEDESTROM, 2002). Por esse motivo foram criadas sequências de três e cinco resíduos contendo Arg ou Lys na posição P₁ para avaliar as possibilidades de interação e se elas ocorrem com energias favoráveis.

As demais sequências utilizadas foram tripeptídeos com modificações na posição P₁ apresentando resíduos aromáticos, sendo dois apolares (fenilalanina e triptofano) e um polar (tirosina) (Tabela 1).

Para as ligações entre os peptídeos e as enzimas, o programa AutoDock Vina gerou centenas de modelos e as energias de ligação mais favoráveis para cada complexo estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Energia de ligação do melhor modelo de *docking* predito pelo AutoDock Vina entre o peptídeo ligante e as serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis*

Peptídeo	Energia de Ligação (kcal/mol)		
	Seq 1	Seq 2	Seq 3
Gor 1	-6,0	-6,7	-7,0
Gor 2	-6,6	-6,9	-7,2
Gor 3	-7,1	-7,7	-8,3
Gor 4	-6,9	-7,6	-8,4
Gor 5	-7,5	-8,3	-8,9
Gor K	-7,5	-8,4	-8,3
Gor R	-7,7	-8,1	-8,5

a) Estudo de *docking* do ligante Gor 1 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3

Para a interação entre Gor 1 e Seq 1 o programa AutoDock Vina gerou 17410 modelos de possíveis interações. A frequência de ligação na região do centro ativo predita pelo I-TASSER foi de 75% entre todos os modelos gerados e apenas 25% em uma região identificada como sítio secundário (Figura 6). Esta é uma região de contato muito próxima ao centro ativo constituída pelos resíduos de Tyr 39, His 40 e Tyr 151 (numeração para o tripsinogênio) (ANDRADE et al., 1990). Oliveira e colaboradores (1993), quando fizeram a marcação dos resíduos de tirosina próximos ao centro ativo da β -tripsina bovina com cloreto de p-diazoniobenzamidina verificaram que o resíduo de Tyr 151, presente no subsítio S₂['], participa do fenômeno de ativação enzimática. Os autores consideraram que este fenômeno é caracterizado pela ligação de uma segunda

molécula de modificador químico que induz a mudança conformacional da enzima, proporcionando um melhor ajuste do substrato ao sítio catalítico.

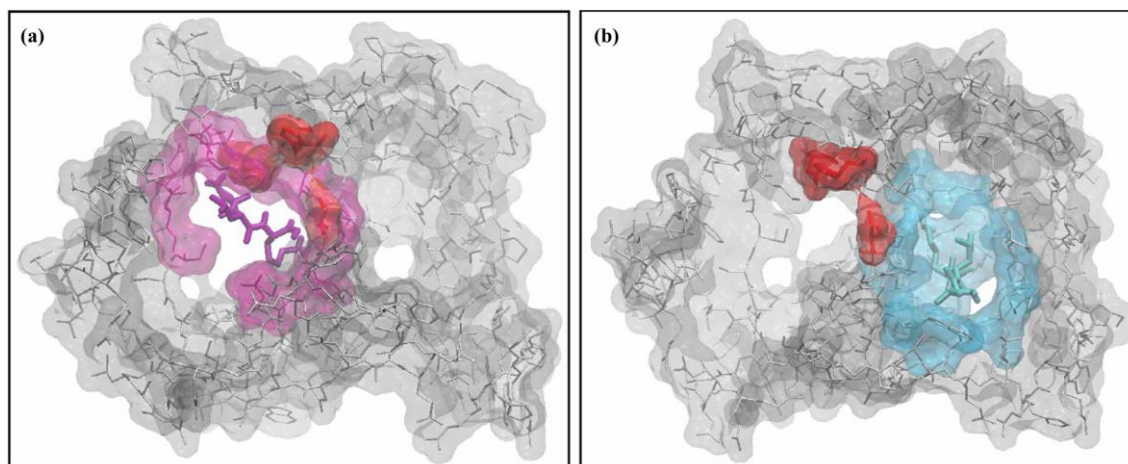


Figura 6: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 1 e a enzima Seq 1. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão os resíduos próximos ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

Na figura 6 estão os melhores modelos de interação de Gor 1 com Seq 1 considerando a distância de 6\AA , que é a máxima para as interações não covalentes entre proteínas. Observa-se que Gor 1 na região catalítica faz contato com os resíduos de aspartato 56 e serina 143 da tríade catalítica. Na região próxima ao sítio secundário observa-se a interação do peptídeo com o resíduo de tirosina 70 presente no subsítio S_2' que está relacionado ao fenômeno de ativação da enzima.

A maior energia de ligação entre os modelos gerados para a interação do peptídeo na região do centro ativo foi de $-6,0$ kcal/mol. No caso da interação com a região do sítio secundário a maior energia foi de $-5,9$ kcal/mol. Mesmo com menor frequência de ligação no domínio do sítio secundário, o valor de energia de ligação do melhor modelo gerado ficou muito próximo ao modelo de interação com o centro ativo da enzima.

A maior frequência de ligação do peptídeo Gor 1 ao domínio do centro ativo de Seq 1 pode ser explicado pelo tamanho da cavidade, já que a presença do resíduo volumoso no ligante (a cadeia lateral da lisina) torna sua acomodação mais propícia a essa região. Além disso, a carga positiva da lisina favorece a interação eletrostática com o aspartato carregado negativamente que está presente no fundo do bolso hidrofóbico (sítio aniônico) do centro ativo e que dita a especificidade das serino-proteases por Arg e Lys em P₁ (PERONA & CRAIK, 1995; SENA, 2006).

Para a interação de Gor 1 com Seq 2 foram gerados 5480 modelos de possíveis ligações entre o peptídeo e a enzima a uma distância de 6 Å. Seq 2 apresenta uma estrutura mais densa sem a presença de cavidades quando comparada a Seq 1. A avaliação da frequência de ligação do peptídeo a Seq 2 demonstra uma preferência de interação com a região do sítio secundário em 99,7% dos modelos gerados. Não há interação do peptídeo com o centro ativo da enzima. Na figura 7 estão representados os dois melhores modelos energeticamente favoráveis da interação do peptídeo Gor 1 com Seq 2.

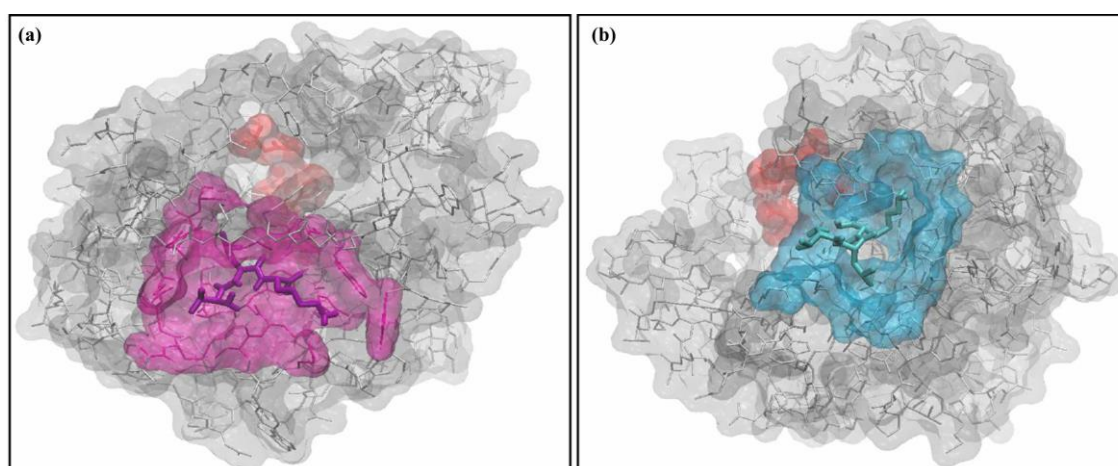


Figura 7: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 1 e a enzima Seq 2. (a) Em roxo e (b) em azul estão destacados os resíduos da região próxima ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

Os dois melhores modelos representados tiveram energia de ligação de -6,7 kcal/mol (Figura 7a) e -6,1 kcal/mol (Figura 7b). No modelo 7a ocorre interação com os resíduos de tirosina e histidina do sítio secundário o que justifica a maior energia de ligação na formação do complexo enzima-ligante. No modelo apresentado em 7b não há interações com resíduos de tirosina presentes na região do sítio secundário justificando a menor energia de ligação do complexo.

A predição do programa I-TASSER contempla os resíduos da tríade catalítica de Seq 2, no entanto não há nenhum modelo de interação com energia favorável para a ligação no centro ativo da enzima. Na figura 8 observa-se que a região preferencial de ligação do peptídeo encontra-se do lado oposto de onde está o centro ativo da enzima. Nota-se que na região marcada em azul há uma cavidade constituída na maior parte por resíduos de características hidrofóbicas. A estrutura mais densa da enzima e a conformação preferencial do ligante são as possíveis causas da ausência de interação com os resíduos da tríade catalítica.

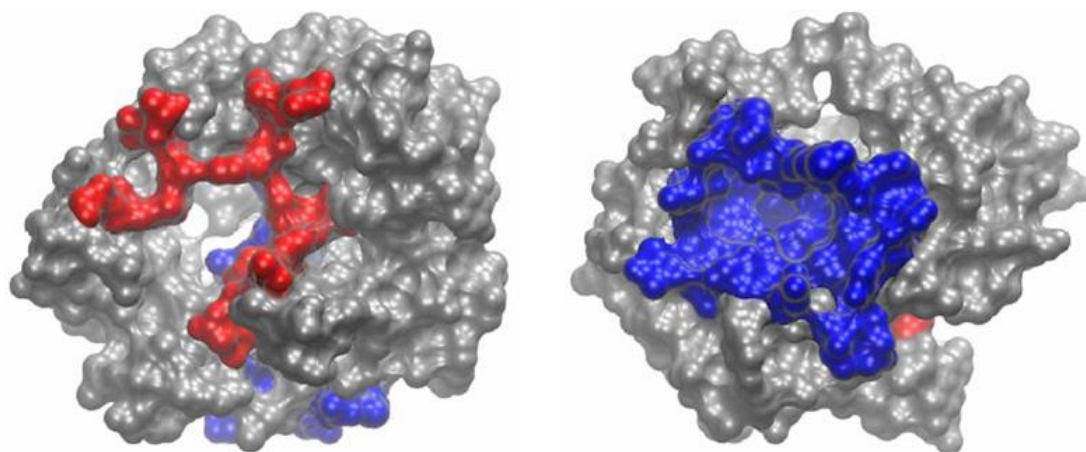


Figura 8: Modelo tridimensional da enzima Seq 2. Em vermelho estão destacados os resíduos do centro ativo preditos pelo I-TASSER e em azul a região do lado oposto do centro ativo onde ocorreu a preferência de interação do ligante Gor 1.

Para a ligação de Gor 1 e Seq 3 foram gerados 8210 modelos que apresentaram interação em uma única região da enzima com distância de 6 Å. A energia de ligação do

melhor modelo foi de -7,0 kcal/mol. A enzima Seq 3 foi a que apresentou o maior número de sítios de ligação preditos pelo I-TASSER. No entanto, apenas uma região encontrada fora do sítio catalítico teve preferência pelas ligações (Figura 9).

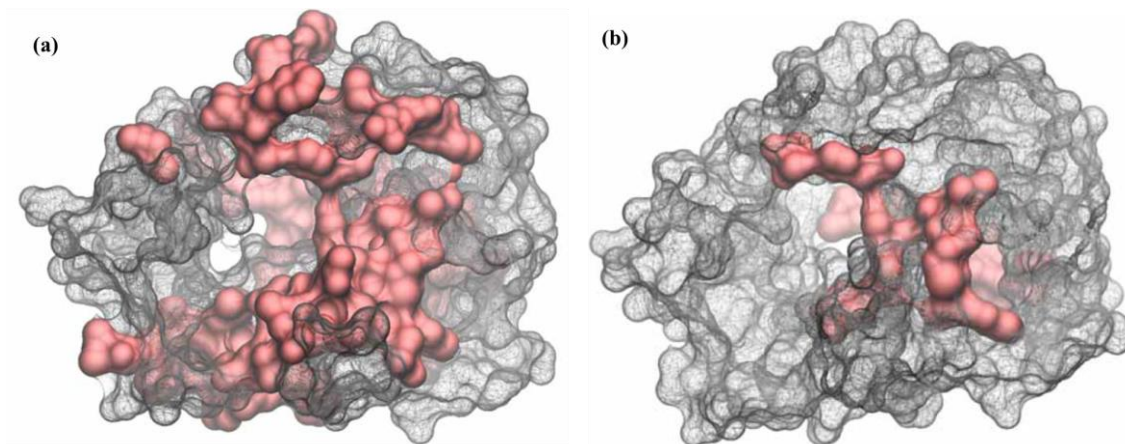


Figura 9: Representação dos principais pontos de interação na enzima Seq 3 prevista pelo I-TASSER. **(a)** Em vermelho estão destacados todos os possíveis pontos de interação na enzima preditos pelo programa I-TASSER. **(b)** Em vermelho estão destacadas a região da tríade catalítica (esquerda) e a região preferencial de interação do peptídeo Gor 1 (direita).

A análise dos resíduos que fazem contato com Gor 1 demonstrou que na região de interação a maioria dos resíduos tem características hidrofóbicas e a presença de uma serina na posição 37 seria responsável por estabilizar a carga positiva da lisina (Figura 10). Nos estudos de *docking* são avaliadas as energias dos ângulos de torção e as distâncias interatômicas do ligante para gerar a melhor conformação de encaixe na proteína (OGAWA, 2013). A conformação do peptídeo que apresentou energia livre favorável não seria a mais adequada para os encaixes na região do centro ativo o que justifica a ausência de modelos com boa energia de ligação na região do sítio catalítico.

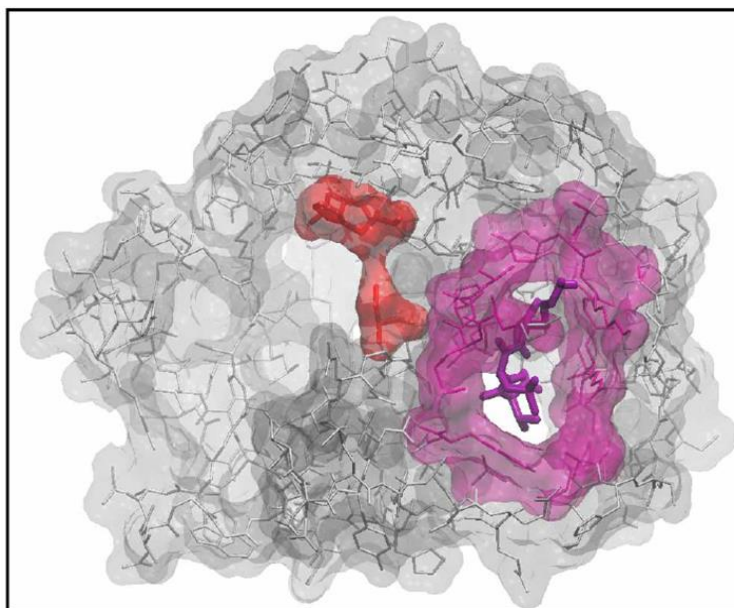


Figura 10: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 1 e a enzima Seq 3. Em roxo estão destacados os resíduos que fazem contato com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

b) Estudo de *docking* do ligante Gor 2 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3

Para a ligação de Gor 2 com Seq 1 foram gerados 25920 modelos de possíveis interações. A frequência de ligação na região do centro ativo (58%) e na região do sítio de especificidade (42%) apresentou uma distribuição mais uniforme se comparada ao peptídeo Gor 1.

Ao avaliar os resíduos de contato a uma distância de 6Å observou-se que Gor 2 interagiu com a região do centro ativo com energia de -6,6 kcal/mol, sendo que entre os resíduos de contato dois são da tríade catalítica: aspartato 56 e serina 143 (Figura 11). A projeção espacial do resíduo de histidina da tríade catalítica no melhor modelo de interação apresenta-se fora do plano da cavidade onde se encontra o peptídeo o que justificaria a ausência de interação entre eles.

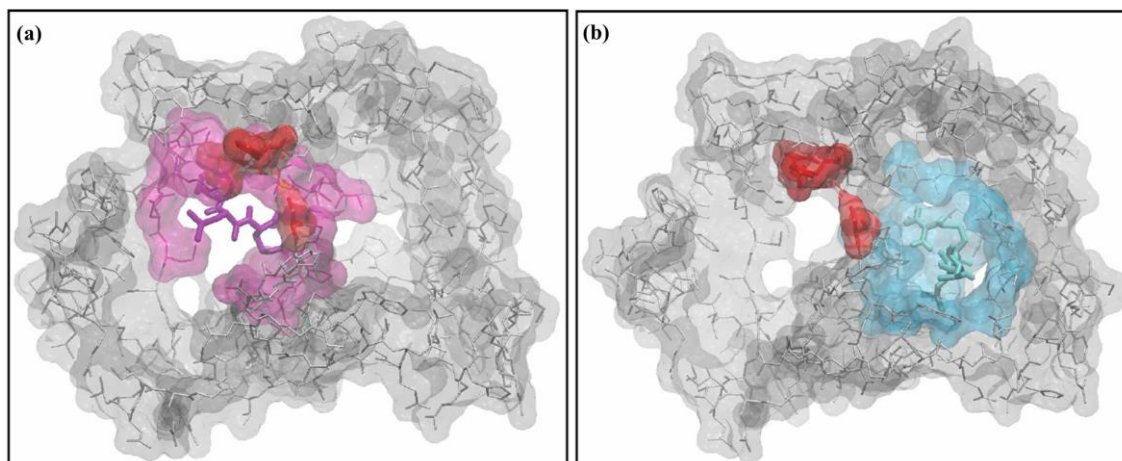


Figura 11: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 2 e a enzima Seq 1. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão os resíduos próximo ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A energia de interação do peptídeo com o sítio secundário foi de -6,2 kcal/mol. Observa-se interação com o resíduo de tirosina 70 presente no subsítio S_2' com valor de energia maior quando comparado a Gor 1.

Para a interação de Gor 2 com Seq 2 foram gerados pelo programa AutoDock Vina 6950 modelos de possíveis interações. A maior frequência de ligações (98,7%) foi na região da cavidade hidrofóbica com energia de -6,9 kcal/mol (Figura 12). A diferença da energia de ligação de Gor 1 e Gor 2 na cavidade hidrofóbica pode ser justificado pela conformação espacial do peptídeo e tamanho da cadeia lateral do resíduo em P_1 . A presença de dois átomos de nitrogênio a mais na cadeia lateral da arginina possibilitou maior contato com os resíduos da cavidade que não foram observados com Gor 1 tornando o complexo Seq 2-Gor 2 mais estável.

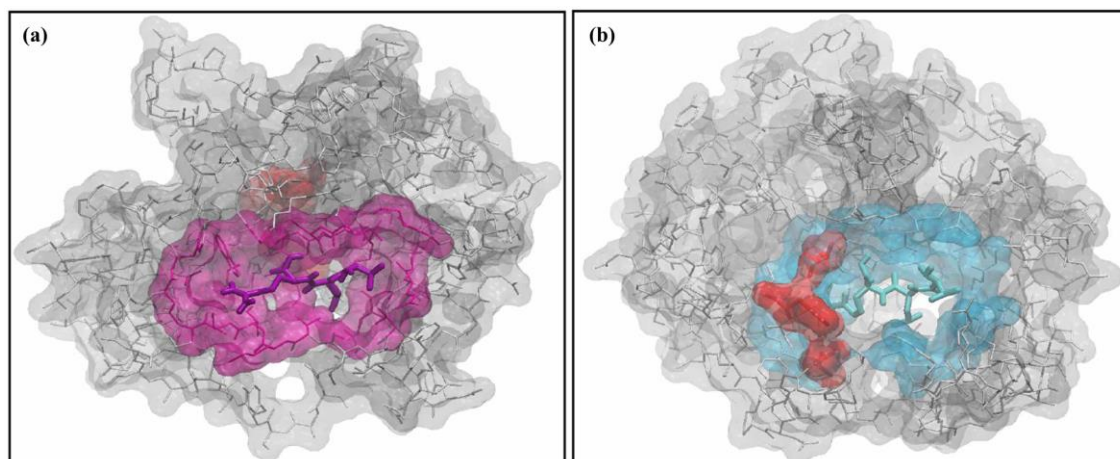


Figura 12: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 2 e a enzima Seq 2. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da cavidade hidrofóbica que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão os resíduos da região do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

Observa-se uma pequena frequência de interações no centro ativo da enzima (1,3%) que não foi observada para Gor 1 (Figura 12). A energia de ligação nessa região foi de -6,1 kcal/mol e o ligante faz contato com os resíduos de aspartato 103 e serina 201 da tríade catalítica.

Assim como observado com Gor 1, a interação de Gor 2 com Seq 3 não contemplou a região do centro ativo. Foram gerados 10220 modelos e a energia de ligação e a conformação favorável do ligante originaram modelos que não interagem com o centro ativo da enzima. A figura 13 mostra o melhor modelo para a interação com energia de -7,2 kcal/mol.

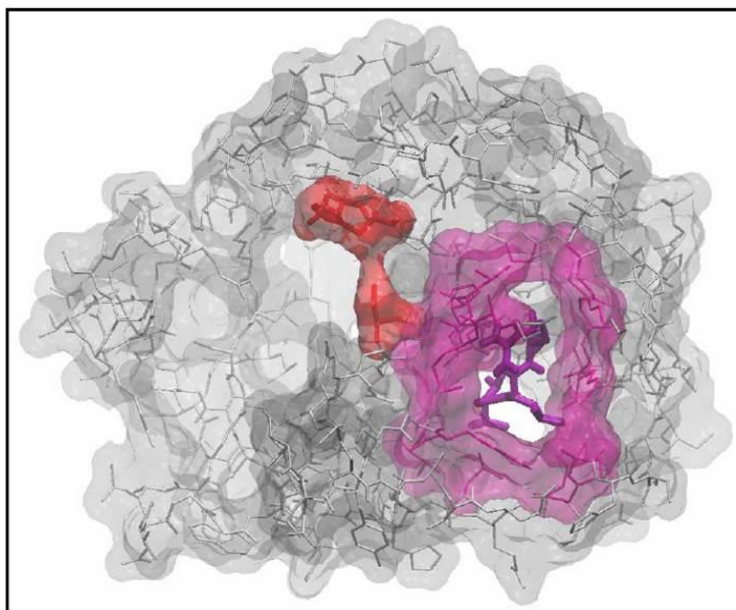


Figura 13: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 2 e a enzima Seq 3. Em roxo estão destacados os resíduos que fazem contato com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

Lopes e colaboradores (2006) avaliando os parâmetros cinéticos das tripsinas de diferentes insetos verificaram que para Lepidopteras não houve preferência para substratos contendo lisina ou arginina na posição P_1 . No entanto, considerando os valores das energias de ligação observa-se uma maior estabilidade do complexo enzima-ligante, tanto na interação com o centro ativo quanto na interação no sítio secundário, quando em P_1 encontra-se um resíduo de arginina. Isso pode ser explicado pelo tamanho da cadeia lateral, já que a arginina tem um radical maior, com dois átomos de nitrogênio a mais que a lisina. Outra hipótese é que a presença de dois átomos de nitrogênio a mais, não carregados, disponibiliza dois pares de elétrons na extremidade da cadeia lateral da Arg favorecendo a interação eletrostática (SENA, 2006; MAGALHÃES et al., 2007).

c) Estudo de *docking* do ligante Gor 3 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3

A interação do peptídeo Gor 3 com Seq 1 apresentou frequência de 30% de ligação próximo a região do centro ativo em comparação aos 70% em regiões diferentes para os 16800 modelos preditos (Figura 14). A substituição de resíduos polares carregados positivamente na posição P₁ por um resíduo apolar e aromático diminuiu a probabilidade de interações com o domínio do centro catalítico.

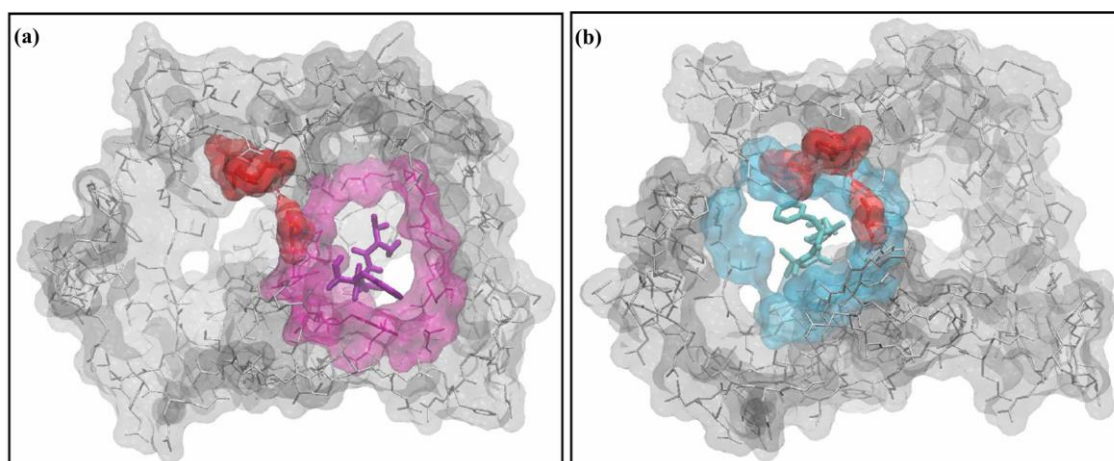


Figura 14: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 3 e a enzima Seq 1. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos próximos ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão os resíduos do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A energia de ligação para as interações com o centro ativo foi de -6,9 kcal/mol e a maior energia de ligação para o modelo das interações com a região próxima ao sítio secundário foi de -7,1 kcal/mol. A maior energia na interação do peptídeo apolar com a cavidade delimitada em roxo deve-se a natureza hidrofóbica dos resíduos da região. Não se observa ligação com nenhum resíduo de tirosina presente no sítio secundário.

Quando interage com o centro ativo, o peptídeo se liga aos resíduos de aspartato 56 e serina 143 da tríade catalítica. No entanto, a conformação do ligante e a análise do programa mostram que as principais interações na região deve-se a cadeia principal e não aos radicais dos resíduos de aminoácidos. As características polares dos resíduos do centro ativo pode ser a causa da menor frequência de ligação.

Na interação de Gor 3 e Seq 2 foram gerados 3260 modelos de possíveis ligações. A maior frequência de ligação foi na cavidade hidrofóbica da enzima (96,9%) com energia de -7,7 kcal/mol (Figura 15). A maior energia de interação de Gor 3 em comparação a Gor 1 e Gor 2 deve-se à natureza do ligante que é apolar, por isso as interações hidrofóbicas nessa região são maiores com o peptídeo Gor 3 tornando o complexo mais estável. No sítio secundário observa-se a interação com as tirosinas 18 e 28, sendo que há um grande contato do ligante com a tirosina 28.

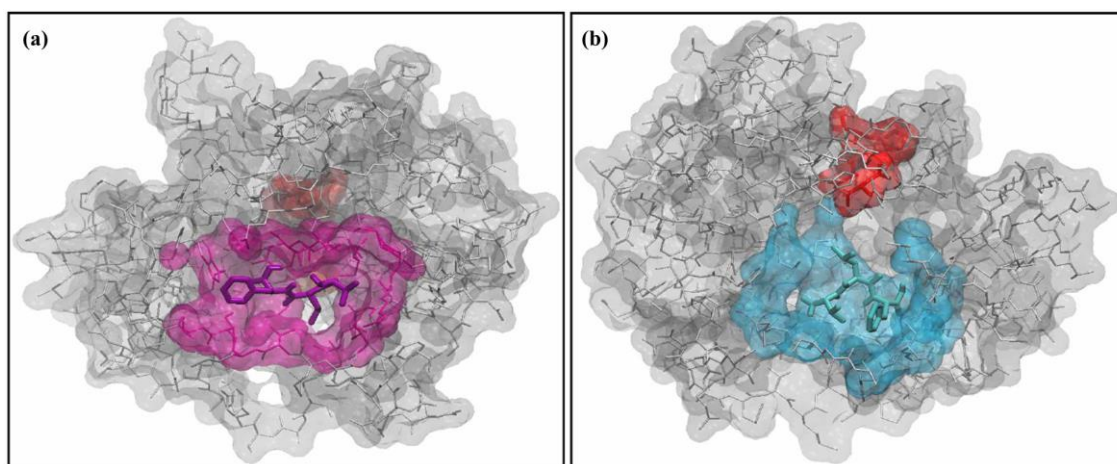


Figura 15: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 3 e a enzima Seq 2. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da cavidade hidrofóbica que fazem interação com o peptídeo. Ao fundo, em vermelho, está marcado um dos resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão os resíduos da região próxima ao centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A energia de ligação na região próxima ao centro ativo foi de -6,8 kcal/mol com uma frequência de 3,1% dos modelos gerados. Ocorre um ponto de contato do ligante com o aspartato 103 da tríade catalítica, mas não se observa o encaixe do peptídeo na cavidade da tríade catalítica.

Para a interação de Gor 3 e Seq 3 foram gerados 4190 modelos e não houve modelo de interação do peptídeo com os resíduos da tríade catalítica (Figura 16). A maior energia de ligação para os modelos gerados foi de -8,3 kcal/mol com os principais pontos de contato em resíduos hidrofóbicos.

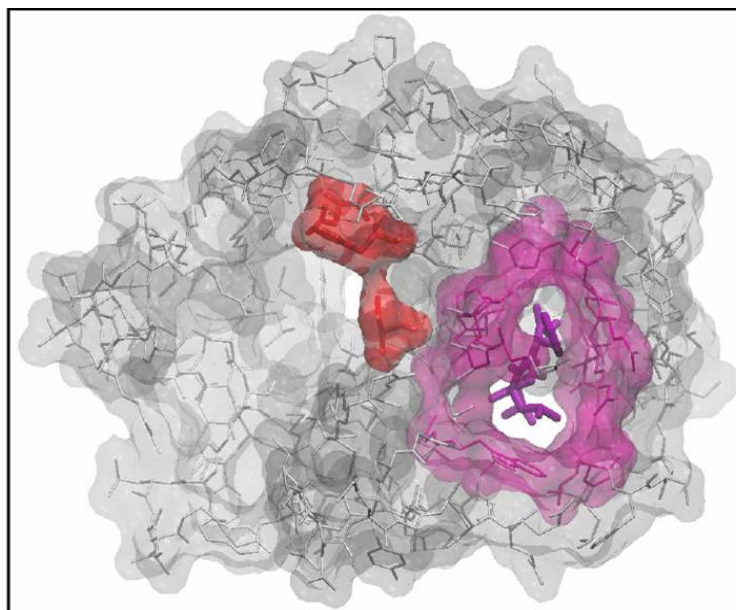


Figura 16: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 3 e a enzima Seq 3. Em roxo estão destacados os resíduos que fazem contato com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A conformação do peptídeo e a sua natureza hidrofóbica são as principais razões de não existirem modelos com boa energia de ligação para as interações com o centro ativo. Não foi observada interação com nenhum resíduo de tirosina do sítio secundário da enzima.

Devido ao alto valor energético das interações do peptídeo Gor 3 com Seq 3 deve ser feita uma avaliação da atividade enzimática em presença desse ligante. O complexo formado é estável e possivelmente sua ligação, mesmo que fora da região catalítica, pode interferir na capacidade de hidrólise da enzima por modificações conformacionais que diminuem a afinidade da enzima pelo substrato.

d) Estudo de *docking* do ligante Gor 4 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3

A presença de um resíduo polar na posição P₁ de Gor 4 aumentou a frequência de ligação na região do centro catalítico da enzima quando comparado a Gor 3. Observa-se uma distribuição homogênea da frequência, sendo 49% dos modelos com

interações na região do centro ativo e 51% em região próxima ao sítio secundário para os 15170 modelos gerados (Figura 17).

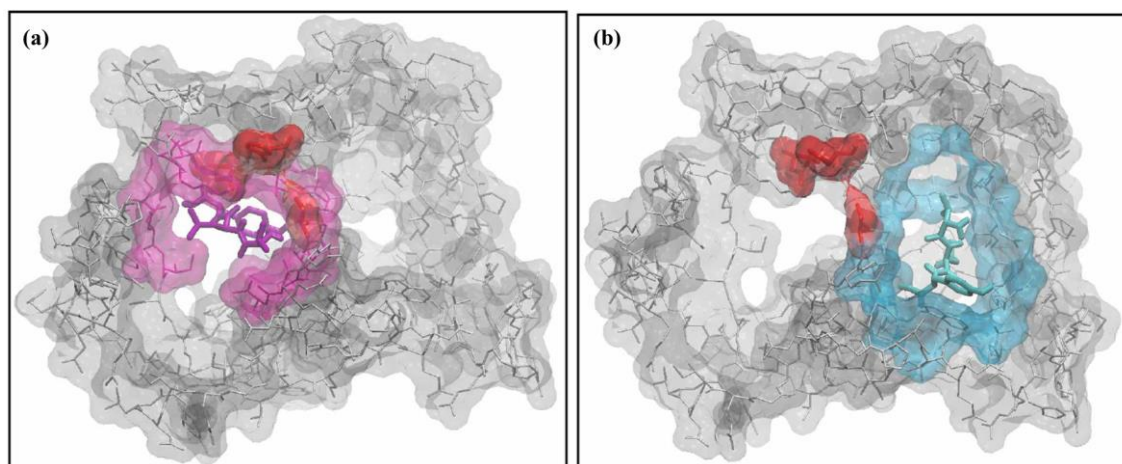


Figura 17: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 4 e a enzima Seq 1. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão destacados os resíduos próximos ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A energia de ligação na região do centro ativo para o melhor modelo foi de -6,9 kcal/mol. A natureza polar do resíduo de tirosina pode ser a principal explicação para o aumento da frequência das possíveis ligações no centro ativo da enzima. Nessa região ocorrem interações deste peptídeo com os resíduos de aspartato 56 e serina 143 da tríade catalítica. Na região delimitada de azul ocorre interação com a serina 143 da tríade catalítica, porém não ocorre nenhum contato com o resíduo de tirosina 70 que caracteriza o sítio secundário. Para as interações na região próxima ao sítio secundário a energia de ligação foi de -6,8 kcal/mol. A interação do ligante com a serina 143, tanto no centro catalítico como fora dele, pode justificar valores próximos de energia de formação do complexo para os dois modelos apresentados.

Para a interação de Gor 4 com Seq 2 foram gerados 2940 modelos de possíveis interações com frequência de 97,3% das interações ocorrendo na cavidade do sítio secundário da enzima (Figura 18). A energia de ligação do melhor modelo foi de -7,6 kcal/mol. Nenhum modelo com energia favorável foi gerado para a interação de Gor 4

com a região do centro ativo de Seq 2. Observa-se a interação com o resíduo de tirosina 28 presente no sítio secundário da enzima. A conformação mais estável do peptídeo favoreceu um grande número de pontos de contato da tirosina 28 com os grupamentos da cadeia lateral do ligante.

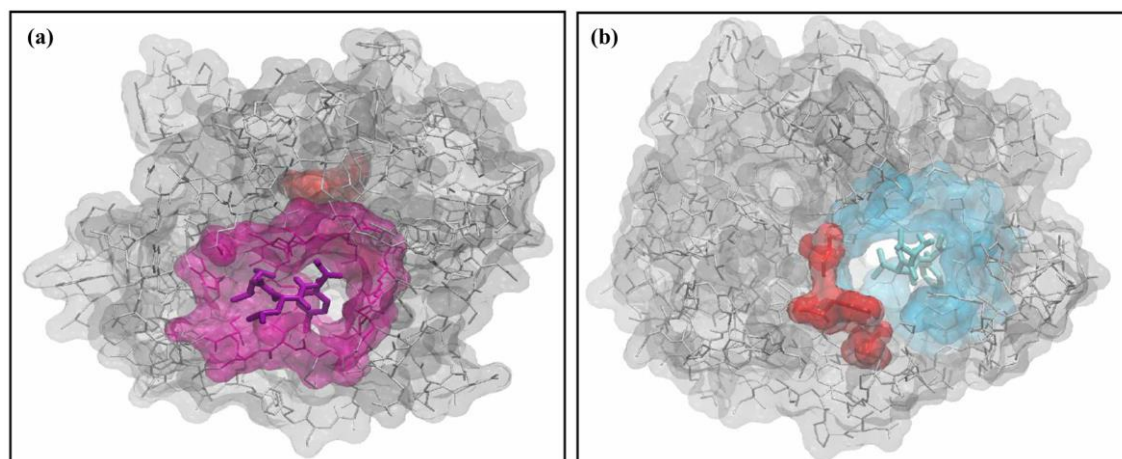


Figura 18: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 4 e a enzima Seq 2. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da cavidade hidrofóbica que fazem interação com o peptídeo. Ao fundo, em vermelho, está marcado um dos resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão os resíduos da cavidade entre o centro ativo e o sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A frequência de modelos com interações em uma cavidade entre o centro ativo e o sítio secundário foi de 2,7% e a energia do melhor modelo gerado foi de -6,9 kcal/mol (Figura 18 e 19). Na cavidade ocorrem interações com resíduos de serina, mas que não fazem parte da tríade catalítica da enzima. No geral, as interações de ligantes com as enzimas dependem do tamanho da cadeia polipeptídica. Os resíduos de aminoácidos presentes em P_2 , P_3 , P_4 , etc, bem como dos aminoácidos em P_1' , P_2 , P_3' , etc, são importantes para a efetiva formação do complexo enzima-ligante favorecendo ou inibindo a atividade catalítica (SENA, 2006). O tamanho do tripeptídeo Gor 4 pode ser a justificativa para a interação inespecífica na cavidade fora da região do centro ativo da enzima.

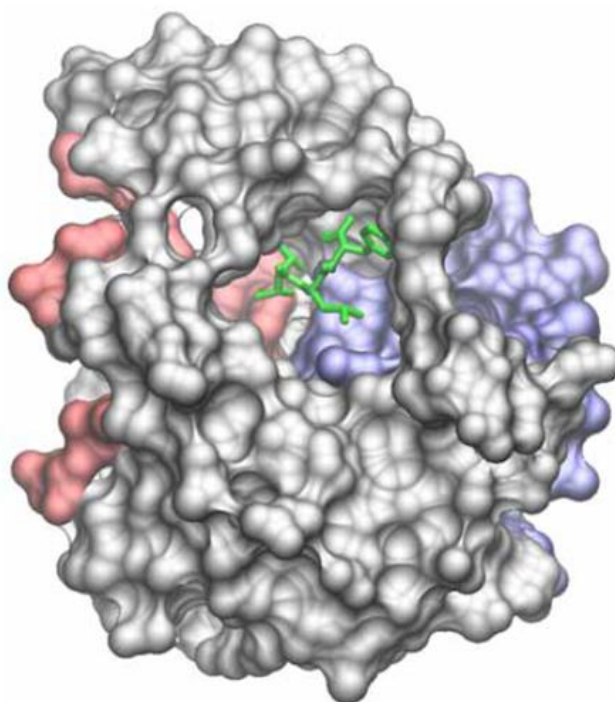


Figura 19: Representação da cavidade situada entre o centro ativo e o sítio secundário da enzima Seq 2. Em vermelho estão destacados resíduos do centro ativo da enzima, em azul os resíduos do sítio secundário e em verde está representado o peptídeo Gor 4 na conformação de maior energia.

Para a interação de Gor 4 com Seq 3 foram gerados 5060 modelos de possíveis ligações sendo que nenhum modelo apresentou energia favorável para a interação com o centro ativo da enzima. A energia de ligação do melhor modelo foi de $-8,4$ kcal/mol (Figura 20). A maioria dos resíduos que fazem contato com o ligante têm características hidrofóbicas, no entanto ocorre interação da serina 37 com o resíduo de tirosina do ligante devido a natureza polar desses aminoácidos. Não foi observada interação com nenhum resíduo de tirosina que caracteriza a região do sítio secundário.

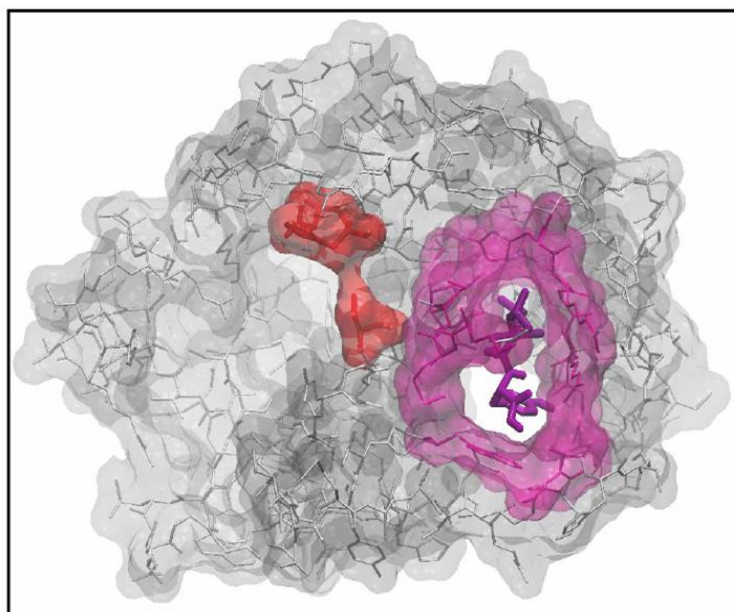


Figura 20: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 4 e a enzima Seq 3. Em roxo estão destacados os resíduos que fazem contato com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

e) Estudo de *docking* do ligante Gor 5 com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3

Para o peptídeo Gor 5 o programa AutoDock Vina gerou 15170 modelos de possíveis interações com a enzima Seq 1. Apenas 32% dos modelos apresentaram interações na região catalítica da enzima observando-se contato com os resíduos de aspartato 56 e serina 143 da tríade catalítica (Figura 21).

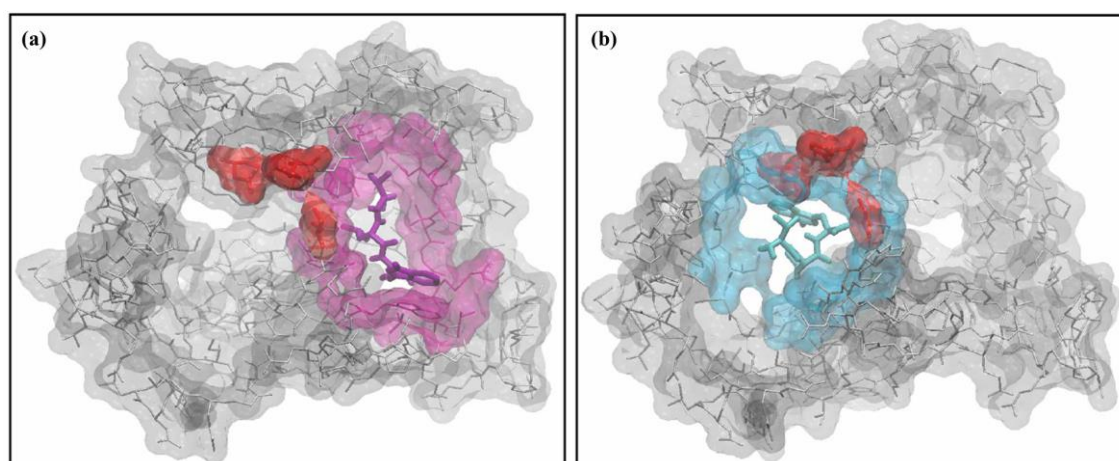


Figura 21: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 5 e a enzima Seq 1. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da região próxima ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão destacados os resíduos do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A energia de ligação para o melhor modelo que interage na região do centro ativo foi de -7,3 kcal/mol. A maior frequência observada foi para a região do sítio secundário com 68%, sendo a energia de ligação para o melhor modelo de -7,5 kcal/mol. Não foi observado a interação com o resíduo de tirosina 70 presente no subsítio S_2' , no entanto ocorre o contato com a serina 143 da tríade catalítica na região delimitada em roxo (Figura 21).

A predominância de resíduos hidrofóbicos nessa região pode ser a explicação para a maior frequência de modelos de interação, já que o peptídeo tem natureza hidrofóbica e não poderia interagir bem em regiões com alto conteúdo de resíduos polares. Nota-se que o peptídeo Gor 3, que também é hidrofóbico, apresentou uma frequência de ligação na região do sítio secundário (70%) muito próxima ao Gor 5 com uma energia de ligação de -7,1 kcal/mol. A maior energia de Gor 5 em relação a Gor 3 pode ser explicado pelo tamanho da cadeia lateral do resíduo de triptofano que favoreceria um contato mais íntimo com os resíduos hidrofóbicos da região.

Dos 2940 modelos gerados para as interações de Gor 5 com Seq 2, a maior frequência de ligação (93,5%) foi na região do sítio secundário (Figura 22). O melhor modelo apresentou valor de energia de ligação de -8,3 kcal/mol caracterizando a formação de um complexo estável. Observam-se vários pontos de contato do ligante com a tirosina 28 do sítio secundário da enzima. A fenda é caracterizada pela presença de inúmeros resíduos hidrofóbicos que fazem contato com o ligante e a característica apolar de Gor 5 justifica o alto valor energético para o melhor modelo de interação na região.

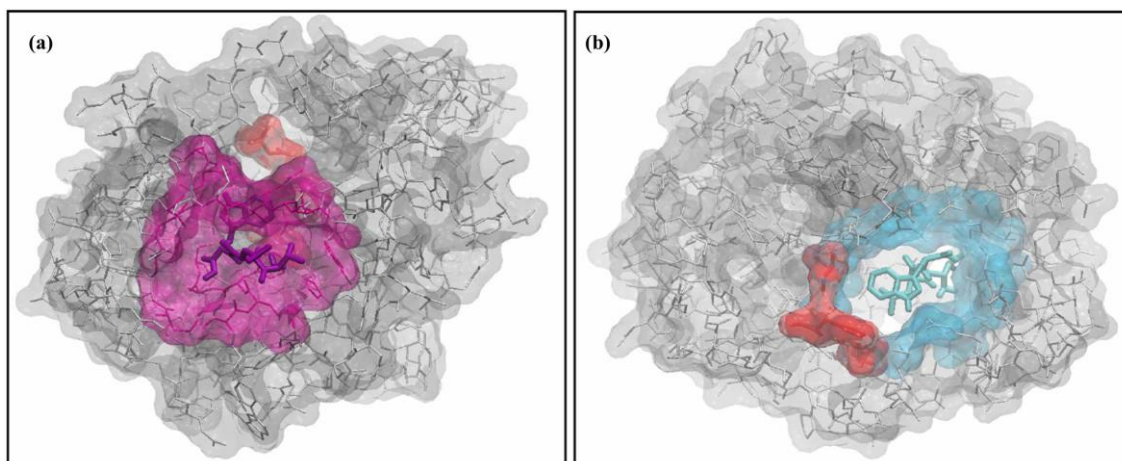


Figura 22: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 5 e a enzima Seq 2. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da região próxima ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Ao fundo, em vermelho, está marcado um dos resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão destacados os resíduos do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

Diferente de todos os tripeptídeos testados, Gor 5 faz interação com os três resíduos da tríade catalítica de Seq 2 (H59, D103 e S201). A frequência de interação com o centro ativo da enzima foi de 6,4% dos modelos gerados. O melhor modelo teve energia de ligação de -7,4 kcal/mol.

Com a característica apolar de Gor 5 seria pouco provável a interação com o sítio ativo da enzima devido às características polares dos resíduos da tríade. No entanto, os estudos de *docking* mais comuns são feitos considerando todas as conformações possíveis do ligante, a flexibilidade das cadeias laterais dos resíduos da enzima e a conformação preferencial da enzima (OGAWA, 2013). Possivelmente, a conformação preferencial assumida por Gor 5 favoreceu o contato da cadeia principal dos resíduos apolares do ligante com a cadeia lateral dos resíduos polares da tríade. Os dados gerados pelo programa AutoDock Vina confirmam a participação do carbono α , do oxigênio da carbonila e do nitrogênio da cadeia principal dos resíduos do peptídeo nas interações com os resíduos da tríade.

No caso de Gor 1 e Gor 2, a presença da carga positiva e da cadeia lateral longa do resíduo em P₁ diminuem as conformações possíveis assumidas por esses peptídeos devido ao impedimento estérico. Apenas Gor 2 apresentou modelos de interação com resíduos da tríade. Assim, considerando a conformação preferencial assumida pela enzima, os possíveis encaixes de Gor 2 com Seq 2 formam complexos menos estáveis quando comparado a Gor 5. Isso é evidenciado pela maior frequência de ligação ao centro ativo e pelos valores de energia de ligação do complexo formado entre Gor 5 e Seq 2.

Para as interações de Gor 5 e Seq 3 foram gerados 3870 modelos, sendo que não houve modelos de interação na região do centro ativo com energia favorável. A energia de ligação do melhor modelo gerado foi -8,9 kcal/mol (Figura 23).

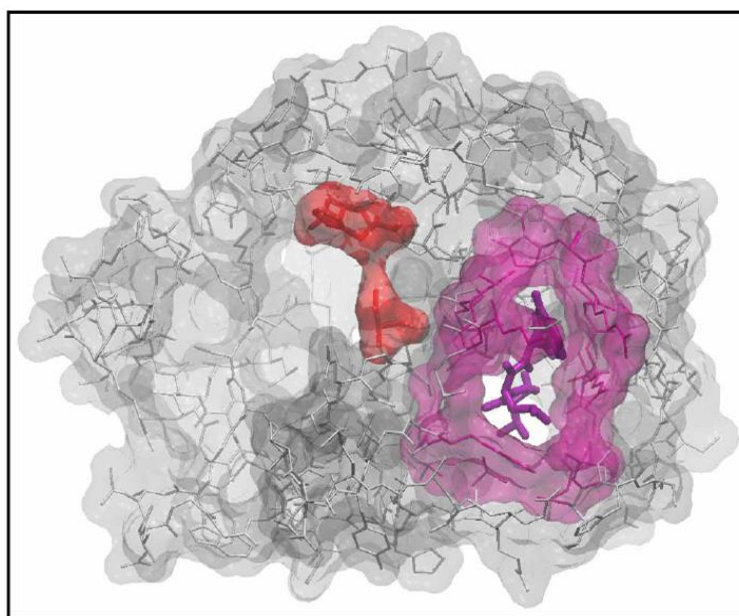


Figura 23: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor 5 e a enzima Seq 3. Em roxo estão destacados os resíduos que fazem contato com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A característica hidrofóbica dos resíduos da cavidade justifica a maior energia de ligação para Gor 5 quando comparado aos demais tripeptídeos. A diferença de energia entre os peptídeos apolares Gor 3 e Gor 5 deve-se a cadeia lateral do resíduo em P₁. O

triptofano apresenta uma cadeia lateral mais volumosa favorecendo o maior número de interações hidrofóbicas na cavidade da enzima formando um complexo mais estável.

Para todos os tripeptídeos estudados, as conformações preferenciais assumidas por eles não favoreceram as interações com os resíduos da tríade catalítica da enzima. Quando consideramos o tamanho do peptídeo ligante assumimos que quanto maior seu tamanho menores são as conformações estáveis assumidas, mas maiores são os pontos de contato nas interações com a enzima formando um complexo mais estável (OGAWA, 2013). Dessa forma, o tamanho dos tripeptídeos seria a principal causa da ausência de interações com o centro ativo. Observamos interações em regiões inespecíficas da enzima formando complexo com energia favorável o que não ocorre na região do centro ativo.

f) Estudo de *docking* do ligante Gor K com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3

O aumento da cadeia peptídica do ligante pode favorecer o contato com a enzima e dessa forma apresentar um complexo mais estável com energias de ligação maiores.

Para a interação de Gor K com Seq 1 foram gerados 14230 modelos sendo a frequência de interação no centro ativo da enzima de apenas 26% (Figura 24). As possibilidades de conformações favoráveis assumidas pelo peptídeo podem ter diminuído, devido a extensão da cadeia. Com um número menor de conformações possíveis que podem encaixar na região do centro ativo observa-se a diminuição da frequência. No entanto, quando esta interação acontece a energia de ligação de formação do complexo enzima-ligante é de -7,4 kcal/mol. Ocorre interação com o resíduo de aspartato 56 e serina 143 da tríade catalítica.

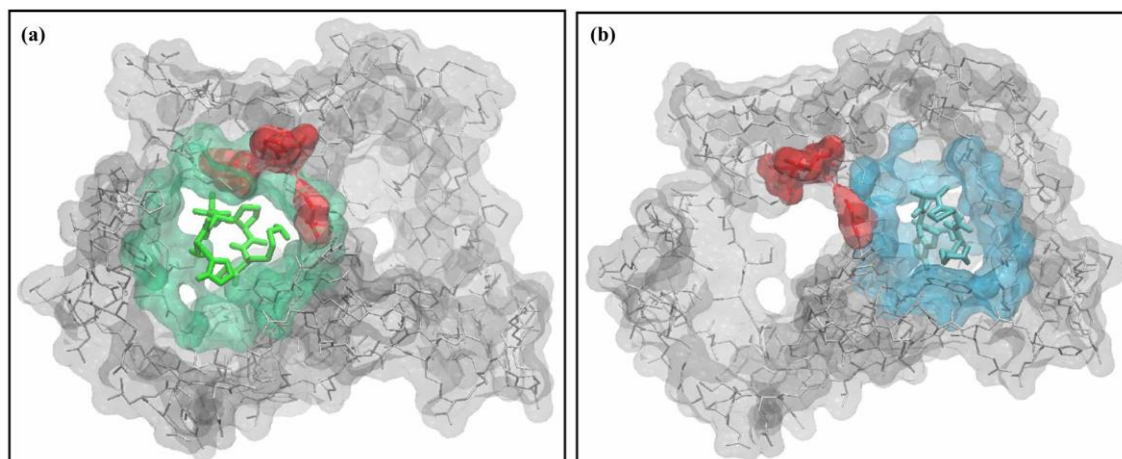


Figura 24: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor K e a enzima Seq 1. **(a)** Em verde estão destacados os resíduos da região próxima ao centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão destacados os resíduos da região próxima ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A frequência de interação no sítio secundário foi de 74% sendo que o melhor modelo apresentou energia de ligação de -7,5 kcal/mol. Não foi observado interação com a tirosina 70 do subsítio S_2' . A extensão da cadeia do ligante aumentou as interações na região comparado aos tripeptídeos Gor 1 e Gor 2. Isso é evidenciado pelos valores de energia de ligação na formação do complexo. A carga positiva do resíduo de lisina é estabilizada na interação com o aspartato 20 encontrado no fundo da cavidade delimitada em azul (Figura 24).

Para a interação de Gor K com Seq 2 foram gerados 5940 modelos com 90% dos modelos gerados apresentando interação na cavidade próxima ao sítio secundário (Figura 25). A energia de ligação do melhor modelo foi -8,4 kcal/mol. Observa-se interação com a tirosina 18 e 28 do sítio secundário da enzima. O aumento da cadeia do ligante aumentou o contato com os resíduos da cavidade o que justifica o maior valor energético da formação do complexo quando comparado aos tripeptídeos Gor 1, Gor 2 Gor 3 e Gor 4. Em relação a Gor 5 a energia de ligação foi semelhante a Gor K pela possibilidade de flexibilidade do tripeptídeo.

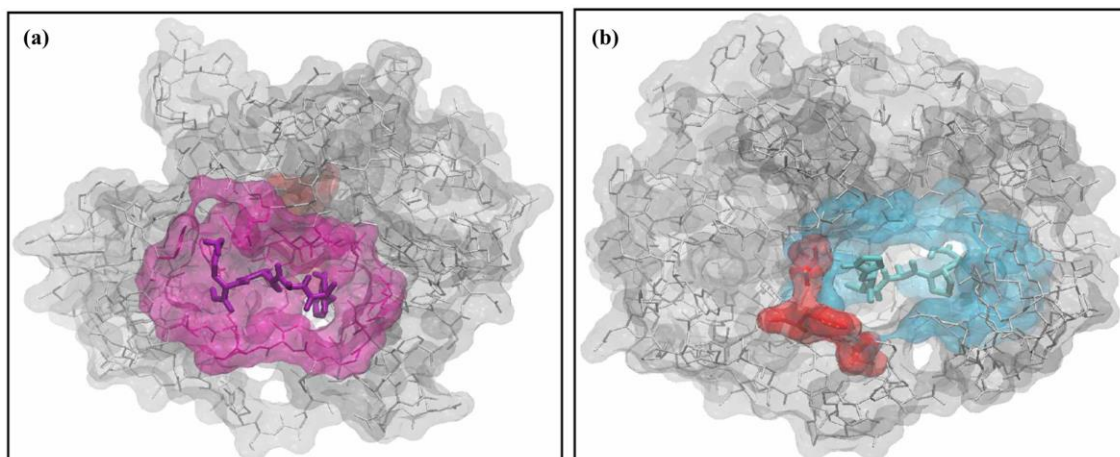


Figura 25: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor K e a enzima Seq 2. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da região próxima ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Ao fundo, em vermelho, está marcado um dos resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão destacados os resíduos do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

Diferente do tripeptídeo Gor 1 que também possui um resíduo de arginina em P₁, o peptídeo Gor K interage com o centro ativo da enzima Seq 2. A frequência de ligação para o centro ativo foi de 10% dos modelos gerados. A energia de ligação do melhor modelo foi -7,6 kcal/mol. Observa-se interação com os resíduos de aspartato 103 e serina 201 que compõem a tríade catalítica. A conformação assumida por Gor K e o tamanho da cadeia favoreceram o maior número de interações com os resíduos do centro ativo formando um complexo mais estável comparado ao complexo de Seq 2 com Gor 1.

Para a interação de Gor K e Seq 3 foram gerados 7660 modelos sendo que 99,87% foram modelos de interação com a região do sítio secundário (Figura 26). A maior energia de ligação foi de -8,3 kcal/mol. Observa-se interação com resíduos hidrofóbicos e a carga positiva da lisina é estabilizada pela ligação com a serina 37. Não houve interação com a tirosina do sítio secundário da enzima.

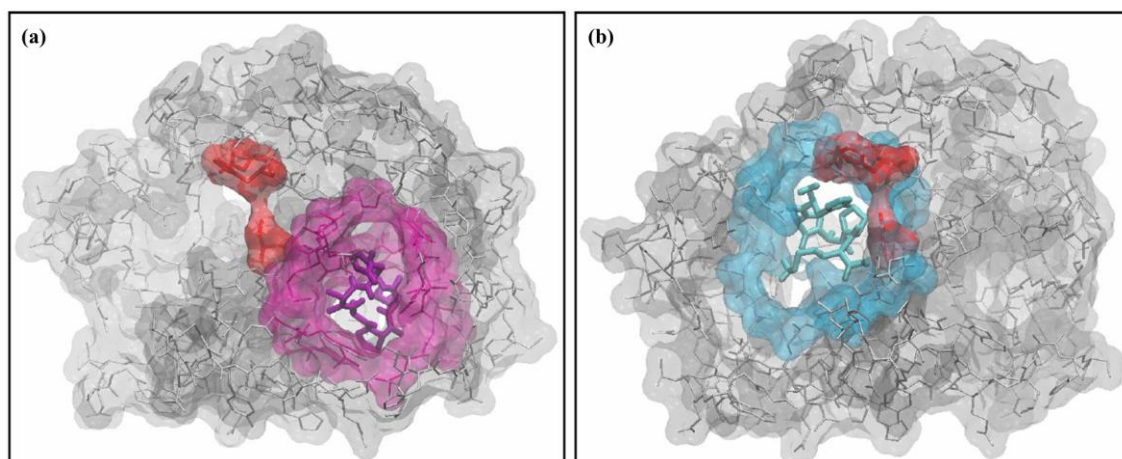


Figura 26: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor K e a enzima Seq 3. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da região próxima ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão destacados os resíduos do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

Para o peptídeo Gor K houve uma pequena frequência de ligação com o centro ativo da enzima (0,13%). A energia de ligação para o melhor modelo gerado foi de -7,3 kcal/mol sendo considerado estável o complexo formado. Observa-se as interações com os resíduos de histidina 19, aspartato 66 e serina 164. Nenhuma das interações no sítio catalítico da enzima Seq 3 ocorreram com os tripeptídeos testados, mesmo para Gor 1 que também apresenta um resíduo de lisina em P₁. A justificativa para essa interação deve-se ao tamanho do peptídeo Gor K que torna a ligação mais estável e favorece a permanência dele na cavidade do sítio ativo. As características dos resíduos do ligante em posições diferentes de P₁ é fundamental para a estabilidade do complexo formado entre enzima e ligante (SENA, 2006; MAGALHÃES et al., 2007).

g) Estudo de *docking* do ligante Gor R com as enzimas Seq 1, Seq 2 e Seq 3

Para as interações de Gor R e Seq 1 o programa AutoDock Vina gerou 13200 modelos de possíveis interações sendo 36% dos modelos com interações no centro ativo da enzima (Figura 27). A energia de ligação do melhor modelo gerado foi -7,7 kcal/mol.

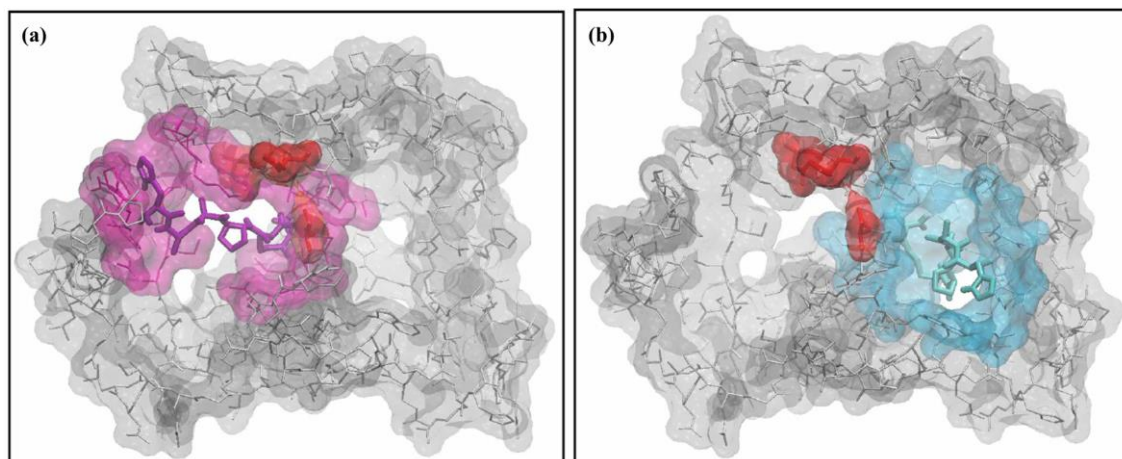


Figura 27: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor R e a enzima Seq 1. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da região do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão destacados os resíduos da região do sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

Observa-se interações com o resíduo de aspartato 56 e serina 143 da tríade catalítica. A ausência de interações com o resíduo de histidina 6 deve-se à conformação da enzima. A energia de ligação para a formação do complexo foi ligeiramente maior quando comparada a energia do complexo com Gor K. O tamanho da cadeia lateral do resíduo de arginina possibilita maior contato com a enzima tornando o complexo enzima-ligante mais estável.

A frequência de interação no sítio secundário foi de 64%. A energia de ligação do melhor modelo foi -7,4 kcal/mol. Observa-se ligação com o resíduo de tirosina presente no subsítio S_2' . A cavidade é caracterizada pelo alto conteúdo de resíduos com características hidrofóbicas, sendo o resíduo de aspartato 74 o responsável por estabilizar a carga positiva da arginina na conformação assumida pelo ligante.

Para as interações de Gor R e Seq 2 foram gerados 3710 modelos, sendo a frequência de interação na região do centro ativo de 10% (Figura 28). A energia de ligação do melhor modelo gerado foi de -8,0 kcal/mol.

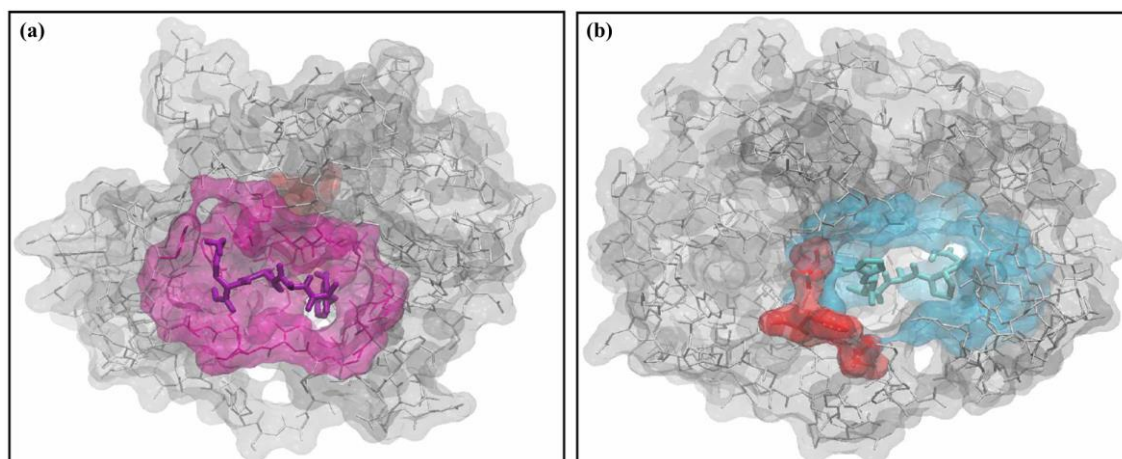


Figura 28: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor R e a enzima Seq 2. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da região próxima ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Ao fundo, em vermelho, está marcado um dos resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão destacados os resíduos da região do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

Observa-se a interação de Gor R com os três resíduos que constituem a tríade catalítica de Seq 2 (H59, D103, S201). Apesar da interação com todos os resíduos da tríade, a energia de formação do complexo foi menor quando comparada a interação de Gor K com o centro ativo de Seq 2 que não contemplou a ligação com o resíduo de histidina 59. A projeção espacial para fora do plano da cadeia lateral da histidina dificultou a interação do peptídeo Gor K. Além disso, a conformação assumida pelo ligante favoreceu a interação com resíduos mais profundos da cavidade do centro ativo que justifica a formação do complexo mais estável. No caso de Gor R, a conformação assumida pelo ligante favoreceu a interação com a histidina o que dificultou o encaixe na região mais profunda da cavidade justificando a diferença de energia para a ligação na mesma região da enzima.

A frequência de ligação no secundário foi de 90%. A energia do melhor modelo gerado foi de -8,1 kcal/mol. Ocorre interação com os resíduos de tirosina 18 e 28 do sítio secundário da enzima. Para a interação de Gor 2 com Seq 2 a energia de formação do complexo foi menor do que para o ligante Gor R. O aumento da cadeia do peptídeo

favoreceu o maior contato com os resíduos da cavidade formando um complexo mais estável e com maior energia livre de ligação.

A interação de Gor R com Seq 3 apresentou frequência de ligação na região próxima ao sítio secundário de 99,72% entre os 10710 modelos gerados pelo programa (Figura 29). A energia de ligação para o melhor modelo foi de -8,5 kcal/mol.

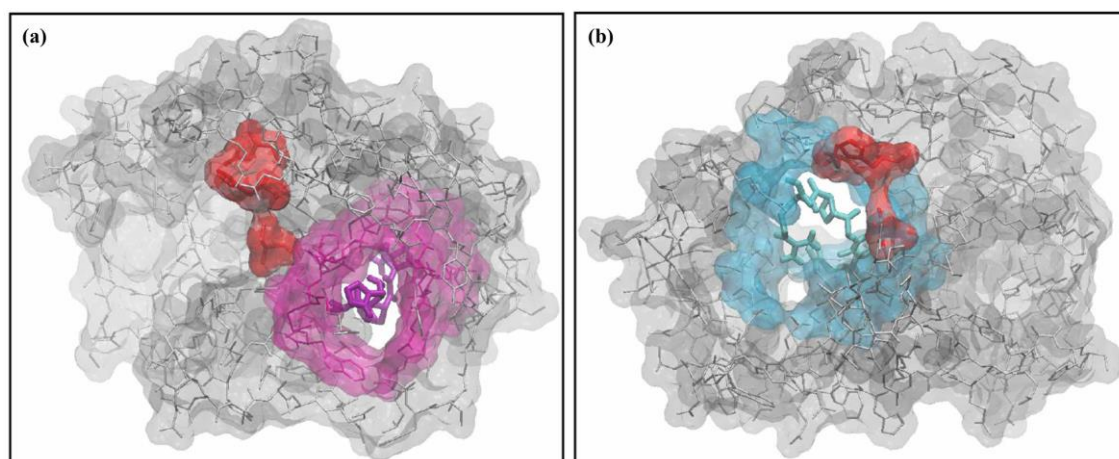


Figura 29: Modelo tridimensional das interações entre o ligante Gor R e a enzima Seq 3. **(a)** Em roxo estão destacados os resíduos da região próxima ao sítio secundário que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica. **(b)** Em azul estão destacados os resíduos do centro ativo que fazem interação com o peptídeo. Em vermelho estão marcados os resíduos da tríade catalítica.

A conformação e o tamanho do ligante favoreceu a formação do complexo mais estável quando comparado a Gor 2 que também apresenta um resíduo de arginina em P₁.

Observa-se uma pequena frequência de ligação com o centro ativo da enzima Seq 3 (0,28%), assim como ocorreu com Gor K. A energia de ligação do melhor modelo gerado foi -7,8 kcal/mol e ocorre interação com os três resíduos que compõem a tríade catalítica (H19, D66, S164). O complexo formado é mais estável em termos energéticos comparado ao complexo com Gor K justificado pela conformação do ligante e pelo tamanho da cadeia lateral da arginina que proporciona maior área de contato com a enzima.

4. CONCLUSÃO

O programa I-TASSER mostrou-se bastante eficiente na modelagem molecular das serino proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis*. Os parâmetros analisados mostraram que os modelos preditos foram validados dando confiabilidade aos resultados.

Com o estudo de *docking* foi possível analisar as interações de sequências promissoras para a confecção de inibidores de serino proteases digestivas. Dos sete peptídeos testados o que melhor interagiu com a enzima Seq 1 e Seq 3 foi o ligante Gor R. No caso de Seq 2 o ligante que interagiu com maior valor energético foi o Gor K. As interações com maior valor energético não ocorreram no centro ativo da enzima, mas a ligação de uma molécula à enzima, mesmo que fora do seu sítio ativo pode interferir na catálise enzimática. Entre os tripeptídeos avaliados o que melhor interagiu com as três enzimas foi Gor 5. As interações em regiões próximas ao sítio secundário foram preferenciais para esse ligante e que apresentaram maior energia livre de ligação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. H. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. A plausible identification of the secondary binding site in trypsin and trypsinogen. **Brazilian J. Med. Res.**, 23:1223-1231, 1990.

CRAIK, C.S.; ROCZNIAK, S.; LARGMAN, C.; RUTTER, W.J. The catalytic role of the site aspartic acid in serine proteases. **Science**, 237: 909-913, 1987.

FILHO, O. A. S. & ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Quim. Nova**, 26: 253-259, 2003.

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J. Cheminform.**, 4: 17, 2012.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Rev.**, 102:4501-4523, 2002.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics, **J. Molec. Graphics**, 14: 33-38, 1996.

LOPES, A.R., JULIANO, M.A., MARANA, S.R., JULIANO, L., TERRA, W.R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 36:130-140, 2006.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S. S.; FERREIRA, R. N.; ALMEIDA, A. P.; SANCHEZ, E. F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, 146:565-575, 2007.

OGAWA, T. Protein Engineering - Technology and Application. InTech, Croatia, 187p., 2013.

OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. **J. Biol. Chem.**, 268: 26893-26903, 1993.

PACHECO, A. G. M. Modelagem molecular comparativa e estudos de acoplamento molecular da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, 93 p, 2009.

PERONA, J.J. & CRAIK, C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Prot. Sci.**, 4:337-360, 1995.

PILON, F. M. Clonagem e expressão de serino-proteases de *Anticarsia gemmatilis* e caracterização cinético-enzimática de tripsinas-like purificadas, produzidas por sua microbiota intestinal. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade federal de Viçosa, MG, 131 p, 2012.

PÓLGAR, L. & HALÀSZ, P. Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteases. **Biochem. J.**, 207: 1-10, 1982.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, 5: 725-738, 2010.

ROY, A.; YANG, J.; ZHANG, Y. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. **Nucleic Acids Res.**, 40:471-477, 2012.

RUSSO, C. Modelagem de serino-proteases e inibidores com emprego de ferramentas de bioinformática estrutural. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 79p., 2006.

SAVIO, G. M. & PINOTTI, E. B. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) por *baculovirus anticarsia*. Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF). Ano VII – Nº 13 – Jun/Periódicos Semestral, 2008.

SENA, M. P. T. Caracterização cinética da protease trombica presente no veneno de *Bothrops leucurus*: leucurobina. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, 120p., 2006.

SOUZA, M. L. Modelagem por homologia de estruturas proteicas do veneno de *Apis mellifera*. Monografia (Bacharel em Informática Biomédica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 72 p, 2008.

TROTT, O. & OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J. Comput Chem.**, 31:455–461, 2010.

VIANNA, U.R.; PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J.C.; De ALENCAR, J.R.C.C.; ZINGER F.D. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arq. Inst. Biol.**, 78:81-87, 2011.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Bioinformatics**, 29: 2588-2595, 2013.

YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; POISON, J.; ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, 12, 7-8, 2015.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, 9:40, 2008.

Capítulo 2

Caracterização cinética de enzimas tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis* utilizando diferentes substratos tripeptídil e determinação do modelo de inibição frente aos peptídeos sintéticos inibidores

RESUMO

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas que atacam a soja no Brasil, sendo encontrada em todos os locais de cultivo. Na tentativa de controlar o ataque de insetos aos cultivares, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em agroquímicos. As proteases digestivas desempenham papel importante na fisiologia das larvas e o estudo de inibidores de proteases como agentes de controle de pragas tem recebido atenção contínua. Para utilizar a estratégia de controle via inibição das enzimas digestivas é necessário o esclarecimento sob o ponto de vista estrutura/função dessas macromoléculas. Uma forma de abordar esse aspecto implica no conhecimento sobre a cinética enzimática, assim como a caracterização da cinética de inibição destas proteases, o que permite uma melhor compreensão dos centros ativos e dos mecanismos de ação da enzima. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi a caracterização cinética dos serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis* utilizando diferentes substratos tripeptidil e propor um modelo de inibição enzimática utilizando peptídeos sintéticos como inibidores. Para isso, o extrato bruto intestinal foi purificado em coluna de afinidade de p-aminobenzamidina agarose utilizando sistema FPLC. Foram realizados os ensaios com os substratos cromogênicos e pelas análises dos parâmetros cinéticos foi possível constatar que as serino-proteases intestinais tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis* têm preferência na hidrólise de substratos contendo arginina na posição P₁. Nos estudos de cinética de inibição observou-se que a inibição é do tipo competitiva linear nas concentrações utilizadas. A melhor K_i foi observada para o peptídeo Gor 5 associando a eficiência na inibição da atividade enzimática com a capacidade de ligação ao centro ativo da enzima.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos-praga, sendo a *Anticarsia gemmatalis* uma das principais pragas da sojicultura (EMBRAPA, 2013). Esta espécie causa perdas consideráveis na produção e requer atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (VIANNA et al., 2011).

O controle de insetos-praga como a lagarta da soja, tem sido realizado essencialmente mediante a aplicação de inseticidas químicos. Considerando os problemas relacionados ao uso desses produtos em organismos não alvos torna-se necessário a busca por estratégias alternativas para o controle que sejam menos prejudiciais (MILLS & KEAN, 2010).

As características da planta que são importantes para a resistência ao ataque de herbívoros são complexas envolvendo defesa direta e indireta (TELANG et al., 2005). No entanto, a exploração desses mecanismos de defesa endógenos das plantas é uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle de pragas (TELANG et al., 2005; SCOTT et al., 2010; JAMAL et al., 2012). Uma das principais formas diretas de defesa das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases, uma vez que por ela ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER & RYAN, 1992; SCOTT et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010; JAMAL et al., 2012).

Os inibidores de proteases são proteínas ou pequenos polipeptídeos que podem interferir na digestão dos alimentos no intestino do inseto o suficiente para controlá-los. As plantas transgênicas expressando inibidores de proteases podem matar a praga. Estes inibidores podem se ligar com as proteases digestivas dominantes de insetos que se alimentam da planta hospedeira prejudicando sua digestão e retardando o crescimento e

desenvolvimento larval em algumas espécies de insetos incluindo as lepidópteras (GATEHOUSE, 2002; CHITGAR et al., 2013).

As proteases são enzimas muito importantes em insetos, pois hidrolisam as ligações peptídicas em proteínas dietéticas para liberar os aminoácidos necessários para o crescimento, sobrevivência e reprodução, e porque elas degradam as proteínas tóxicas ingeridas como uma consequência da alimentação da planta pelo patógeno (MAHDAVI et al., 2013; SHI et al., 2013). As serino-proteases são conhecidas por predominar no intestino larval e contribuir com cerca de 95% do total de atividade digestiva (SRINIVASAN et al., 2006).

O estudo da cinética enzimática é uma ferramenta promissora para o entendimento da estrutura e função das serino-proteases digestivas do inseto. Os parâmetros cinéticos permitem uma melhor compreensão dos centros ativos e dos mecanismos de ação destas enzimas, desvendando quais tipos de inibidores deverão ser produzidos pela planta ou aplicados a ela para serem inibidores do complexo sistema de proteases digestivas do inseto.

O uso de substratos cromogênicos do tipo peptidil-p-nitrianiilida é útil para o estudo cinético de enzimas, uma vez que a mudança de apenas um resíduo de aminoácido na sequência do substrato pode alterar os parâmetros cinéticos enzimáticos. A avaliação desses parâmetros verifica a influência da sequência peptídica do substrato na atividade catalítica da enzima, avaliando a especificidade de formação do complexo enzima-substrato (ES). A partir do estudo das sequências de aminoácidos do substrato e das características químicas desses resíduos podemos mapear o centro ativo da enzima (GALLIMORE & FRIBERGER 1991).

Portanto, neste estudo foram caracterizadas as propriedades cinéticas de serino-proteases digestivas de *A. gemmatalis* utilizando diferentes substratos cromogênicos

tripeptidil. Além disso, baseado em estudos de *docking* molecular foram avaliados os efeitos de diversos peptídeos sintéticos, previamente selecionados, na atividade enzimática a fim de proporcionar novas oportunidades de manejo sustentável de pragas através do desenvolvimento de inibidores de proteases.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Criação da lagarta da soja

Ovos de *A. gemmatalis* foram mantidos no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa. A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas. Para a obtenção dos insetos adultos, as pupas foram colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de 50 x 50cm revestida internamente com folhas de papel sulfite A4. Após eclosão, os adultos alimentavam-se com solução nutritiva composta de mel (10,5g), cerveja (350mL), sacarose (60g), ácido ascórbico (1,05g), nipagin (1,05g) e água (1050mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri. As posturas de *A. gemmatalis* ocorreram, geralmente, após três dias na superfície das folhas de papel que revestiam internamente a gaiola. Estas foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5cm de largura x 10cm de comprimento, colocadas em copos plásticos (500mL) com um orifício circular na tampa de, aproximadamente, 2cm, onde foi acoplada uma tela de filó. Esses copos foram transferidos para uma câmara climatizada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e o fotoperíodo de 14 horas. Após a eclosão dos ovos iniciou-se a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* com dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO et al., 1985) colocando-se um cubo de dieta artificial em cada copo plástico.

2.2. Preparo da dieta

A dieta artificial foi composta de feijão mulatinho cozido, levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água. Ágar e água foram autoclavados por 15 min à pressão de 1,5 kgf/cm². A essa mistura adicionaram-se os outros ingredientes e misturados, com o auxílio de um liquidificador industrial. Em seguida será adicionado ácido ascórbico (6g), ácido sórbico (3g), nipagin (metilparabeno) (5g), formol 40% (6mL) e 10mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1mg), pantotenato de cálcio (1mg), tiamina (0,25mg), riboflavina (0,50mg), piridoxina (0,25mg), ácido fólico (0,25mg), biotina (0,02mg), inositol (20mg), água (1L) até formar uma pasta homogênea que foi transferida, ainda quente, para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida foi resfriada em câmara germicida sob luz ultravioleta e conservada a 4°C.

2.3. Extração do intestino e obtenção do extrato proteico

O intestino médio foi extraído após dissecação de 50 larvas *A. gemmatilis* entre 4º e 5º instar. Os intestinos foram colocados em 10 ml de solução de HCl 10⁻³ M a 4 °C, mantendo sempre a proporção de 5 intestinos por 1 ml de solução. O extrato enzimático foi obtido por maceração em cadinho com presença de nitrogênio líquido. A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 g por 45 minutos a 4°C e o sobrenadante foi separado, aliquotado e conservado a -20°C para análises futuras.

2.4. Determinação da concentração de proteína e determinação das atividades enzimáticas

O teor proteico das amostras analisadas foi determinado pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA na faixa de concentração de 0-0,2 mg/mL como padrão.

As atividades das serino-proteases foram determinadas no extrato bruto e no purificado utilizando o método de ERLANGER et al. (1961). Foi utilizado tampão Tris-HCl 0,1mol.L⁻¹, CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹, pH 8,2 e o substrato cromogênico L-BApNA na concentração de 1,2 mM. As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorção a 410nm em função do tempo (150s). Os cálculos foram realizados utilizando o coeficiente de extinção molar específico de 8800 M⁻¹.cm⁻¹ para o produto. Os experimentos serão realizados em triplicatas.

2.5. Cromatografia de afinidade

O extrato bruto obtido foi submetido à cromatografia de afinidade em uma coluna de p-aminobenzamidina agarose (HiTrap® GE) equilibrada com tampão Tris - HCl 0,05mol.L⁻¹, NaCl 0,5mol.L⁻¹, pH 7,5. A eluição das proteínas foi realizada com tampão glicina 0,05mol.L⁻¹, pH 3,0, com fluxo contínuo de 1 mL/min e coletadas em frações de 1,5mL. As frações eluídas foram monitoradas pela determinação da Abs₂₈₀ e a determinação da atividade tripsina-like utilizando L-BApNA como substrato. As frações correspondentes ao pico de eluição foram reunidas e conservadas a -20°C para uso posterior nos ensaios de cinética enzimática. O procedimento foi realizado em Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).

2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Após a purificação a eletroforese foi realizada com as amostras utilizando-se o método descrito por LAEMMLI (1970) com gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS (0,1%), o experimento foi feito com voltagem constante de 100 V por 1h20, à temperatura ambiente. A revelação dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por BLUM et al., (1987).

2.7. Caracterização Cinética

2.7.1. Constante de Michaelis-Menten

Para o ensaio de determinação da constante de Michaelis-Menten foram feitas reações contendo tampão Tris-HCl $0,1\text{mol.L}^{-1}$, CaCl_2 20mmol.L^{-1} , pH 8,2, enzima na concentração final de $10\mu\text{g/mL}$ e os seguintes substratos tripeptídicos: L-Val-Leu-Arg-p-Nitroanilida, L-Val-Leu-Lys-p-nitroanilida, N-(p-Tosil)-Gly-Pro-Arg-p-Nitroanilida, N-(p-Tosil)-Gly-Pro-Lys-p-Nitroanilida, N-benzoil-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida e L-Val-Gly-Arg -p-Nitroanilida, todos da Sigma®, na faixa de concentração de $20\mu\text{M}$ a $320\mu\text{M}$. Para o substrato L-BApNA a faixa de concentração foi de $0,1\text{mM}$ a $1,8\text{mM}$. As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilina, pela medida da absorção a 410nm em função do tempo (150s) utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar específico de $8800\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para o produto. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.7.2. Determinação das constantes de inibição

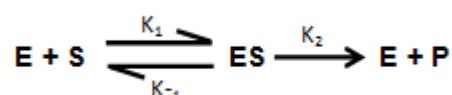
Para a determinação das constantes de inibição foi utilizado tampão Tris-HCl 0,1mol.L⁻¹, CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹, pH 8,2 em presença do substrato cromógeno L-BApNA e dos peptídeos Gor 3, Gor 4 e Gor 5. Os peptídeos foram sintetizados pelo Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafe no Instituto Helmholtz para Doenças Infecciosas, em Braunschweig, Alemanha.

As seguintes concentrações foram utilizadas para os estudos de inibição das tripsinas-*like*: as concentrações do substrato L-BApNA foram 0,1 mM; 0,2 mM e 0,4 mM; as concentrações para todos os inibidores foram 1,0μM; 2,0μM; 4,0μM e 8,0μM utilizando como controle a reação sem presença de inibidor. A concentração final da enzima em todas as reações foi 10μg/mL.

As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorção a 410nm em função do tempo (150s) utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar específico de 8800 M⁻¹.cm⁻¹ para o produto. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.7.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram calculados por regressão não-linear utilizando o programa Sigma Plot 12.0. Para as baixas concentrações dos substratos foi utilizado o modelo cinético unirreacional simples:



A equação geral da velocidade para esse modelo é:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

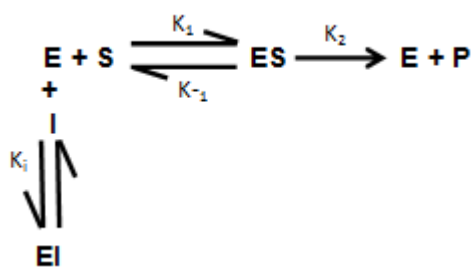
O método linear utilizado foi o gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk. Este gráfico é baseado no rearranjo da equação 1 numa forma linear. A equação 2 representa esta linearização:

$$\frac{1}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (2)$$

As constantes de inibição (K_i) para os diferentes inibidores foram obtidas pela intercessão das linhas correspondentes as concentrações do substrato de acordo com o método de Dixon et al. (1979). A equação 3 é do gráfico de Dixon.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x} \cdot K_i \cdot [S]} \cdot [I] + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{[S]} \right) \quad (3)$$

De acordo com Cornish-Bowden (1981), o mecanismo mais simples para a inibição do tipo competitiva é aquele em que o inibidor, I, liga-se à enzima livre, E, com uma constante de inibição K_i , para formar o complexo enzima-inibidor, EI, que é incapaz de formar um produto. Neste tipo de inibição, o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação. O modelo pode ser ilustrado da seguinte forma:



Para verificar o modelo de inibição foram utilizados o gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk e o gráfico das inclinações obtido a partir dos dados dos gráficos dos recíprocos versus a concentração do inibidor. As equações 4 e 5 representam respectivamente os modelos gráficos do duplo recíproco e o gráfico das inclinações.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

$$\text{Inclinação}_{\frac{1}{S}} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x} \cdot K_i} \cdot [I] + \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \quad (5)$$

A utilização de mais de um tipo de gráfico se deve ao fato que podemos ter modelos cinéticos diferentes apresentando o mesmo perfil de um dado gráfico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação das serino-proteases do extrato solúvel intestinal de *A. gemmatalis*

Para o propósito deste trabalho foi utilizada purificação parcial do extrato enzimático, pois a caracterização cinética e caracterização do modelo de inibição são do conjunto de proteases intestinais tripsina-like, assim o uso de uma família de enzima ao invés de uma única enzima isolada apresenta resultados semelhantes ao do sistema biológico.

O perfil cromatográfico da purificação é apresentado na Figura 1.

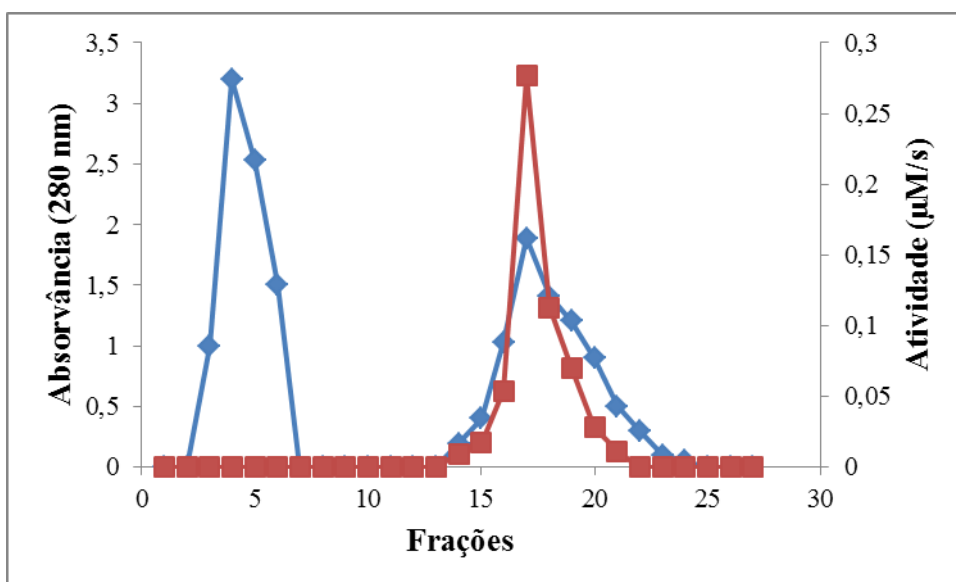


Figura 1: Perfil cromatográfico do extrato solúvel de *Anticarsia gemmatalis* em coluna de p-aminobenzamidina agarose (HiTrap®) equilibrada com Tris-HCl 0,05mol.L⁻¹, NaCl 0,5mol.L⁻¹, pH 7,5. As proteínas foram eluídas com tampão glicina 0,05mol.L⁻¹, pH 3,0. Substrato usado: L-BApNA. Absorvância 280nm (◆), atividade µM.s⁻¹ (■).

O primeiro e maior pico de absorvância corresponde às proteínas que não possuem afinidade pela p-aminobenzamidina após lavagem exaustiva com tampão de equilíbrio e que não foram capazes de hidrolisar o substrato L-BApNA. A benzamidina é um potente inibidor competitivo de tripsina-*like* que ocupa o subsítio S₁ da enzima, ou seja, o sítio de especificidade (MARES-GUIA et al., 1981). Quando presente no meio reacional em baixas concentrações posiciona-se no sítio de especificidade da tripsina onde é estabilizado por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e por interações eletrostáticas entre seu grupamento amidina e o grupo carboxila pertencente a um resíduo de ácido aspártico presente no fundo do bolso do sítio S₁ (MARES-GUIA & SHAW, 1965; MARES-GUIA et al., 1981; OLIVEIRA et al., 1993).

O segundo pico de absorvância corresponde às proteínas obtidas após eluição com tampão glicina. Este pico representa as serino-proteases tripsina-*like* contidas no extrato solúvel que possuem afinidade pela p-aminobenzamidina e com capacidade proteolítica frente ao substrato L-BApNA devido a presença do pico de atividade enzimática. Esses dados são compatíveis com o esperado considerando que as serino-proteases são capazes de hidrolisar o substrato L-BApNA. Este substrato mimetiza a ligação peptídica, enquanto que a p-aminobenzamidina mimetiza este substrato, ocupando o sítio S₁ da enzima. As frações correspondentes ao pico de eluição foram reunidas para a realização dos ensaios de cinética enzimática.

O rendimento da purificação foi de 87,66% conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Rendimento da purificação em coluna p-aminobenzamidina agarose

Material	Proteína total (mg)	Atividade total ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)	Atividade específica ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$)	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	2,85	0,316	0,111	1	100
Purificado	0,208	0,277	1,332	12	87,66

A purificação de serino-proteases de bactérias presentes no intestino de *Anticarsia gemmatalis* utilizando coluna de p-aminobenzamidina realizada por Pilon (2012) apresentou resultados de rendimento inferiores ao encontrado nesse trabalho. Além disso, em trabalho anterior realizado por Patarroyo-Vargas (2011) a purificação manual em coluna p-aminobenzamidina agarose apresentou atividade específica menor ($0,546 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$), o que justifica o uso de sistema de FPLC para melhora do rendimento da purificação.

Oliveira e colaboradores (2005) também realizaram purificação parcial do extrato bruto do intestino médio de *A. gemmatalis*, no entanto, a coluna de afinidade utilizada foi de aprotinina-agarose. A purificação em coluna de p-aminobenzamidina agarose realizada por nós apresentou um melhor rendimento (87,66%) quando comparada a coluna de aprotinina-agarose (66,7%) utilizada por Oliveira et al. (2005).

3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes

Amostras de enzimas purificadas e do extrato bruto foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS. O perfil da migração das proteínas está representado na figura 2.

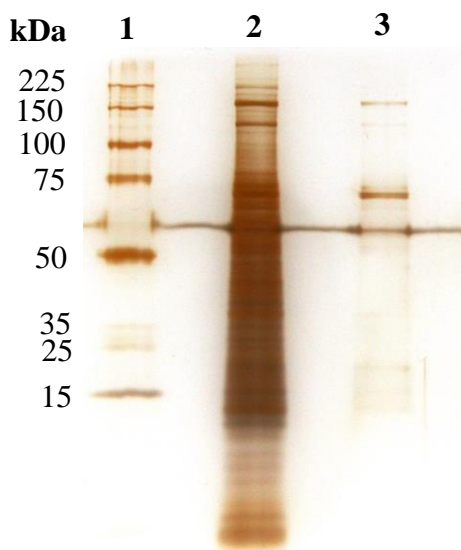


Figura 2: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12%) das serino-proteases solúveis do intestino de *Anticarsia gemmatalis*. **1-** Padrão de massa molecular (Promega®). **2-** Extrato bruto fração solúvel. **3-** Fração enzimática correspondente ao pico com atividade após purificação em coluna de afinidade p-aminobenzamidina agarose.

A cromatografia em coluna de afinidade se mostrou eficiente na separação das serino-proteases tripsina-*like* do extrato bruto, já que no gel se observa redução das espécies proteicas na amostra purificada. São visualizadas várias bandas na coluna 3 que corresponde ao purificado. A banda com massa próxima de 25 kDa da enzima solúvel tripsina-*like* de *A. gemmatalis* está em concordância com as massas de tripsinas observadas na maioria dos insetos, que variam entre 20 kDa e 35 kDa (TERRA & FERREIRA, 1994), bem como as tripsinas isoladas de outras espécies de lepidópteros: 27 kDa e 24 kDa em *Sesamia nonagroides* (NOVILLO et al., 1999); 26 kDa e 29 kDa em *Helicoverpa armigera* (TELANG et al., 2005) e 28,7 kDa em *Diatrea saccharalis* (LOPES et al., 2006). A banda com massa apresentando cerca de 75 kDa é compatível com as massas moleculares maiores de 67 kDa e 70 kDa que foram observadas em *Heliothis virescens* (BRITO et al., 2001) e está de acordo com os achados de Oliveira et al. (2005) e Patarroyo-Vargas (2011) que encontraram massas variando de 66 kDa a 73 kDa. Essas massas moleculares foram explicadas pelos autores como resultado da

aglomeração de tripsinas-*like*, uma vez que a tripsina apresenta massa molecular em torno de 23 kDa.

Brito et al. (2001) demonstraram que a oligomerização de tripsinas de *H. virescens* é uma forma de adaptação do inseto à presença de inibidores de proteases. A formação dos oligômeros favorece a ligação ao substrato, demonstrado pelos baixos valores de K_M , e dificulta a ligação dos inibidores de proteases por impedimento estérico.

A ocorrência de múltiplas tripsinas no intestino de lepidópteras é comumente relatada na literatura, estando normalmente relacionada à capacidade de adaptação do inseto à presença de inibidores de proteases de plantas (BRITO et al., 2001; VOLPICELLA et al., 2003; BUDATHA et al., 2008).

3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos das serino-proteases tripsina-*like* purificadas

Os parâmetros cinéticos estimados para as serino-proteases do intestino médio da *A. gemmatalis* utilizando os substratos cromogênicos foram aparentes, considerando que o sistema é semi-purificado, sendo apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos das serino-proteases semi-purificadas para a hidrólise dos substratos cromogênicos

Substrato	V_{max}	K_M	V_{max}/[E]	V_{max}/[E]/K_M
	($\mu\text{M/s}$)	(mM)	($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}$)	($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{mM}^{-1}$)
L-BApNA	0,2550	0,3422	0,0255	0,0745
Val-Leu-Arg-pNA	0,2880	0,0629	0,0288	0,4579
Val-Leu-Lys-pNA	0,1129	0,0851	0,0113	0,1328
Gly-Pro-Arg-pNA	1,5842	0,3156	0,1584	0,5019
Gly-Pro-Lys-pNA	0,9163	0,2112	0,0916	0,4337
Val-Gly-Arg-pNA	0,1254	0,0270	0,0125	0,4630
Phe-Val-Arg-pNA	0,3053	0,1834	0,0305	0,1663

As tripsinas da maioria dos insetos hidrolisam mais eficientemente substratos que contenham Arg do que Lys na posição P₁, com exceção das lepidópteras que possuem especificidade primária igual para Arg ou Lys em P₁ (LOPES et al., 2006). Os resultados apresentados indicam forte preferência por arginina em P₁ em detrimento de lisina. Pode-se afirmar que para o inseto lepidóptera *Anticarsia gemmatalis* a preferência de hidrólise das tripsinas-like intestinais é por substratos que contenham Arg em P₁.

Avaliando os valores de K_M observa-se maior afinidade do substrato Val-Gly-Arg-pNA pelo centro ativo da enzima. A modificação de um resíduo de glicina por um resíduo de leucina na posição P₂ (substrato Val-Leu-Arg-pNA) aumentou o K_M cerca de 2,3 vezes. Ambos os resíduos são apolares, no entanto o volume da cadeia lateral da leucina prejudicou a ligação enzima-substrato reduzindo a afinidade. Nota-se uma melhor adaptação ao sítio S₂ de resíduos menos volumosos. No entanto, apesar da maior afinidade de Val-Gly-Arg-pNA observa-se maior velocidade de hidrólise para o

substrato Val-Leu-Arg-pNA, como pode ser verificado pelo maior valor da constante catalítica. Os valores da constante de especificidade para os substratos foram próximos indicando que ambos possuem adaptação semelhante ao centro ativo da enzima no estado de transição.

A preferência de serino proteases por arginina ou lisina na posição P_1 é o que caracteriza a família da tripsina. Entre os pares de substratos que apenas modificaram o resíduo de arginina por lisina em P_1 observa-se uma afinidade do substrato Val-Leu-Arg-pNA ao centro ativo da enzima cerca de 1,5 vezes maior do que Val-Leu-Lys-pNA. No entanto, para o substrato Gly-Pro-Arg-pNA a afinidade foi cerca de 1,5 vezes menor quando comparado ao substrato Gly-Pro-Lys-pNA. Avaliando a eficiência catalítica, a constante de especificidade do substrato Val-Leu-Arg-pNA foi cerca de 3,5 vezes maior do que para o substrato Val-Leu-Lys-pNA e para o substrato Gly-Pro-Arg-pNA foi cerca de 1,2 vezes maior do que para Gly-Pro-Lys-pNA. Isso mostra que não é apenas a afinidade de uma enzima pelo seu substrato que governa a atividade enzimática.

Tal fato se deve provavelmente à cadeia lateral destes aminoácidos. Apesar da Arg e Lys serem resíduos com cadeia lateral básica, a natureza química destes aminoácidos é diferente. A Arg tem um radical maior, com dois átomos de nitrogênio a mais que a Lys. Ambos contém uma carga positiva em pH 8,0, o que leva à interação eletrostática com o resíduo de aspartato 86 carregado negativamente presente em S_1 do centro ativo de serino-proteases e dita a especificidade desta família de enzimas por Arg e Lys em P_1 (PERONA & CRAIK, 1995). Portanto, percebe-se que as interações destes aminoácidos em P_1 com S_1 não dependem apenas da carga positiva de suas cadeias laterais. Podem ser razões para a preferência por Arg em P_1 a sua conformação espacial, tamanho ou a presença de dois átomos de nitrogênio a mais, não carregados, disponibilizando dois pares de elétrons na extremidade da cadeia lateral. Isso não é

observado para a lisina, uma vez que o átomo de nitrogênio está carregado. A Lys em P₁ interage com o Asp 86 provavelmente através de uma molécula de água como ponte, o que também pode ser importante (SENA, 2006; MAGALHÃES et al., 2007).

A menor afinidade dos substratos contendo prolina em P₂, comparado aos substratos com leucina na mesma posição, deve-se às suas características químicas. Por apresentar um anel fechado, no qual estão contidos o carbono α e o grupo amino, a prolina caracteriza-se pela rigidez, já que a ligação covalente entre o nitrogênio do grupo amino e o carbono α é impossibilitada de girar sobre seu eixo. Além da rigidez, deve-se salientar a natureza apolar da cadeia lateral deste aminoácido, uma vez que só contém grupos metileno (LEHNINGER, 2000). Essas duas características parecem resultar numa conformação tridimensional do substrato menos favorável à interação e encaixe do substrato com a enzima, daí os altos valores de K_M apresentados por estes substratos.

Apesar da menor afinidade, a maior eficiência catalítica foi observada para o substrato Gly-Pro-Arg-pNA. A presença de prolina em P₂ diminui a afinidade pela enzima, mas quando há a interação, o caráter rígido do aminoácido leva a um ajuste tridimensional mais adequado do complexo ES no estado de transição, o que permite ciclos catalíticos mais rápidos.

O substrato Phe-Val-Arg-pNA possui um resíduo aromático volumoso em P₃ que aumentou o K_M quando comparado aos substratos Val-Leu-Arg-pNA e Val-Gly-Arg-pNA. No entanto, o valor de K_M para o substrato Gly-Pro-Arg-pNA foi maior do que para Phe-Val-Arg-pNA. O sítio S₃ possui boa interação com resíduos apolares, mas a presença de um aminoácido aromático volumoso em P₃ diminuiu a interação com S₃ da enzima diminuindo a afinidade do substrato ao centro ativo da enzima. A presença da

glicina em P₃ pode ter diminuído os pontos de contato das interações hidrofóbicas em S₃ visualizado pela menor afinidade ao centro ativo da enzima.

Comparado aos outros substratos, a menor afinidade de L-BApNA ao centro ativo da enzima e menor eficiência catalítica na hidrólise do substrato pode ser justificado pelo seu tamanho. A presença de Arg em P₁ aumentou a especificidade das tripsinas-*like* por um determinado substrato, quando comparada à presença de Lys. No entanto, a especificidade catalítica depende também dos aminoácidos presentes em P₂ e P₃. No caso de substratos que são cadeias polipeptídicas mais longas, como é o caso dos substratos naturais, a atividade enzimática também depende das interações que porventura existam entre aminoácidos da cadeia polipeptídica do substrato que estão mais distantes da ligação clivada e regiões da enzima mais distantes do centro ativo (PERONA & CRAIK, 1995; LOPES et al., 2004; LOPES et al., 2006).

3.4. Determinação das constantes de inibição utilizando peptídeos sintéticos

Após os estudos de *docking* realizados com diferentes peptídeos ligantes foram realizados os primeiros ensaios *in vitro* com os peptídeos Gor 3, Gor 4 e Gor 5. O objetivo inicial foi utilizar o tripeptídeo que apresentou melhor resultado no estudo de *docking*. Sendo assim, o peptídeo Gor 5 foi o primeiro a ser testado e o uso de Gor 3 e Gor 4 serviram como parâmetro de comparação, já que nenhum deles possuem em P₁ os resíduos preferenciais para as tripsinas. As interações preferenciais para esses peptídeos, analisadas por *docking*, ocorreram fora da região do centro ativo das enzimas.

Após a realização dos ensaios utilizando concentrações variáveis dos diferentes peptídeos e do substrato cromogênico L-BApNA foram construídos gráficos do duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Figuras 3, 4 e 5) com o objetivo de determinar o modelo de inibição das serino-proteases tripsina-*like* purificadas.

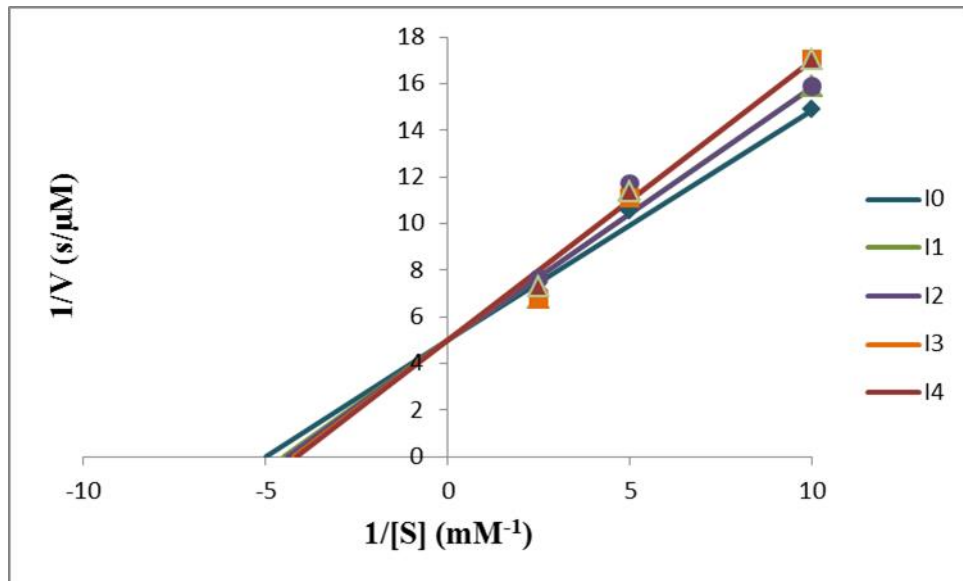


Figura 3: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pelo peptídeo Gor 3 em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração dos inibidores: I0 (ausência de inibidor); I1 (1,0 μ M); I2 (2,0 μ M); I3 (4,0 μ M); I4 (8,0 μ M). Os pontos são experimentais.

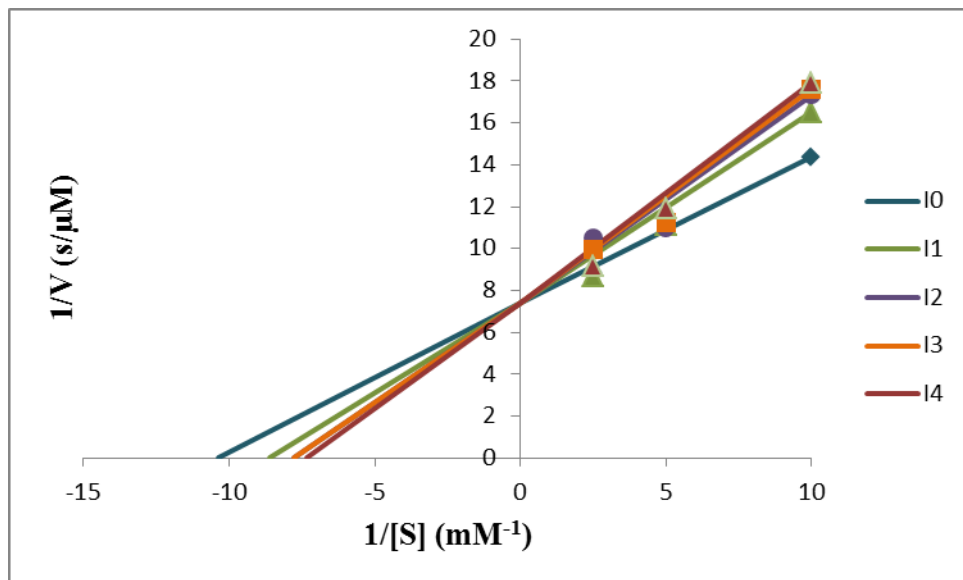


Figura 4: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pelo peptídeo Gor 4 em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração dos inibidores: I0 (ausência de inibidor); I1 (1,0 μ M); I2 (2,0 μ M); I3 (4,0 μ M); I4 (8,0 μ M). Os pontos são experimentais.

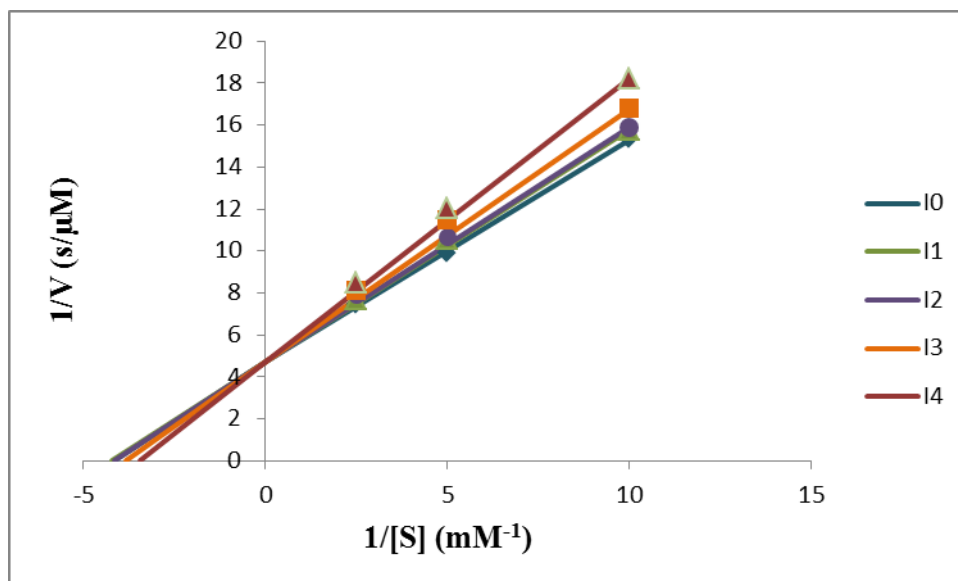


Figura 5: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pelo peptídeo Gor 5 em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração dos inibidores: I0 (ausência de inibidor); I1 (1,0 μM); I2 (2,0 μM); I3 (4,0 μM); I4 (8,0 μM). Os pontos são experimentais.

A análise dos gráficos de Lineweaver-Burk mostrou que o mecanismo de inibição é do tipo competitivo. Como princípio geral, um inibidor competitivo é aquele que se combina com uma enzima livre de forma que impede a ligação do substrato, isto é, o inibidor (I) e o substrato (S) são mutuamente exclusivos.

No modelo clássico, S e I competem pelo mesmo sítio de ligação, geralmente o centro ativo da enzima. No entanto, no estudo de *docking* a ligação preferencial dos peptídeos é no sítio secundário. Neste caso, a inibição competitiva caracteriza-se pela ligação de I a um sítio distinto de inibição causando uma mudança conformacional na enzima que dificulta a interação de S ao sítio de ligação do substrato (SEGEL, 1975).

No modelo de inibição competitiva, com o crescente aumento da concentração de inibidor, tendo a concentração fixa de substrato, a velocidade enzimática tende a ser nula. O inibidor competitivo age apenas aumentando a K_M aparente do substrato, ou seja, sugere que é necessária uma concentração maior de substrato para a enzima atingir qualquer fração de V_{max} .

Na equação 4, o fator $\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ pode ser considerado como um fator estatístico dependente de [I] que descreve a distribuição da enzima na forma livre (E) e na forma enzima-inibidor (EI). Na medida em que a concentração do inibidor cresce a K_M aparente aumenta, produzindo um aumento na inclinação da reta pelo fator $\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$, ou seja, a enzima está distribuída em maior quantidade na forma EI. Neste caso, a interseção da reta no eixo $1/[S]$ se aproxima da origem com o aumento de [I] indicando o aumento do K_M aparente (SEGEL,1975).

Geralmente, quando utilizam-se concentrações crescentes e proporcionais de inibidor o aumento na inclinação das retas é evidente. Para os gráficos com os peptídeos Gor 3, Gor 4 e Gor 5 observou-se um pequeno aumento das inclinações das retas em relação à reta controle, sendo que em alguns casos as retas de concentrações diferente de inibidor se coincidem. No caso de Gor 3, as retas I1 e I2, assim como I3 e I4 não apresentaram variação na inclinação. Isso sugere que a inibição fora do centro ativo da enzima, nas concentrações utilizadas, não interfere de forma eficiente na catálise enzimática.

Patarroyo Vargas (2011) em estudo realizado com os inibidores proteicos SKTI e SBBI, e com inibidores sintéticos benzamidina e berenil, demonstrou que as serino-proteases tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis* possuem um modelo de inibição competitiva linear. Os inibidores testados ligam-se ao centro ativo da enzima bloqueando a ligação do substrato. O K_i calculado para o inibidor berenil foi maior do que para o inibidor benzamidina. O berenil liga-se à enzima ocupando o sítio S_1 e o S_2' , dessa forma esperava-se uma inibição mais eficiente.

Oliveira e colaboradores (1993) demonstraram que a tirosina 151 presente no sítio secundário tem papel importante no fenômeno de ativação enzimática. Os autores

constatarem que a hidrólise enzimática foi mais eficiente quando um modificador químico interagia nessa região. No entanto, a ligação era preferencial nessa região quando em altas concentrações do modificador.

As Figuras 6, 7 e 8 representam os gráficos das inclinações obtidos a partir dos dados dos gráficos dos recíprocos. Os resultados obtidos mostram uma curva linear estatisticamente significativa sendo verificado pelos valores de R^2 . Portanto, o modelo de inibição da atividade amidásica das enzimas semi-purificadas pelos peptídeos Gor 3, Gor 4 e Gor 5 se mostra do tipo competitiva puro, com modelo linear na faixa de concentração utilizada. Nesse modelo de inibição competitiva pura uma molécula de inibidor se liga a uma molécula de enzima formando um complexo binário do tipo EI.

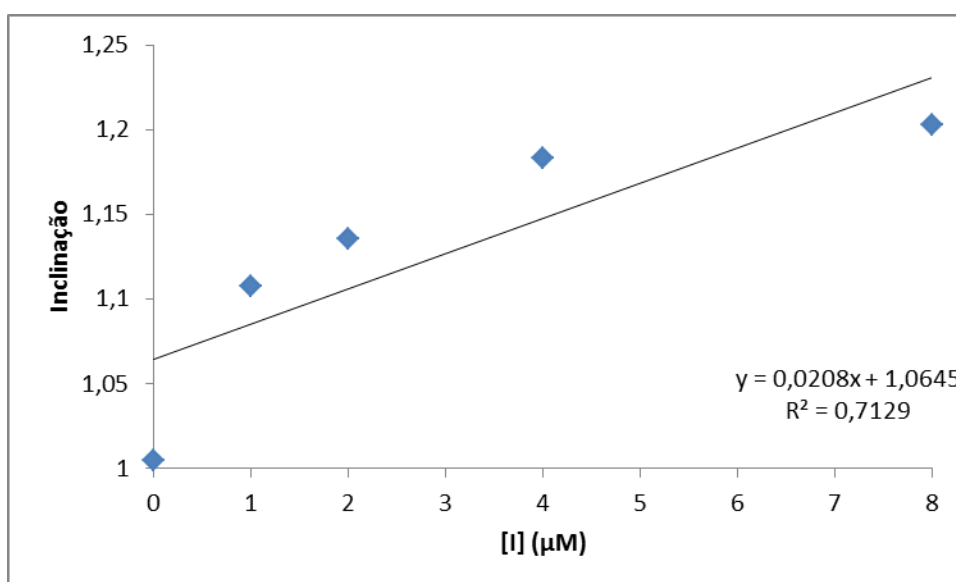


Figura 6: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-like purificadas em presença do peptídeo Gor 3.

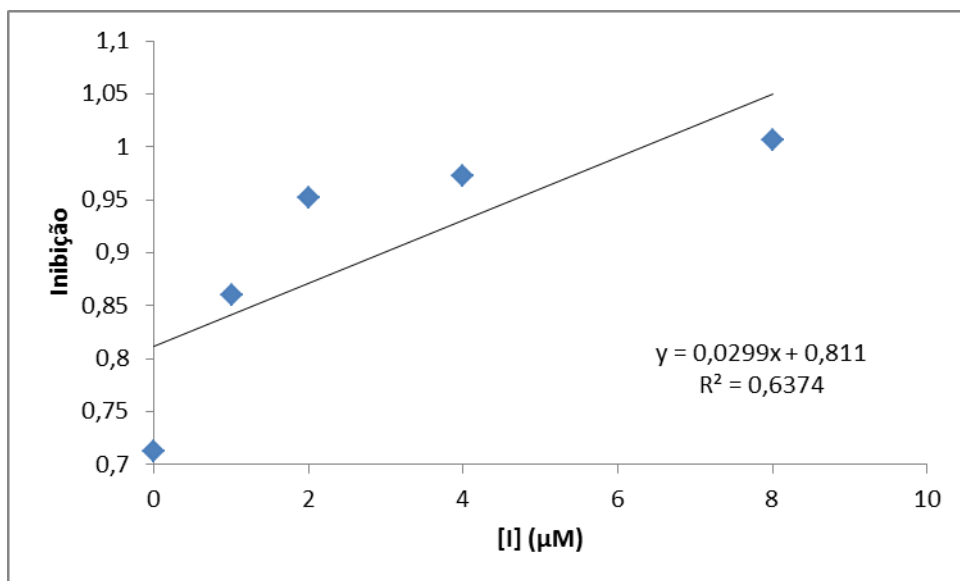


Figura 7: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-like purificadas em presença do peptídeo Gor 4.

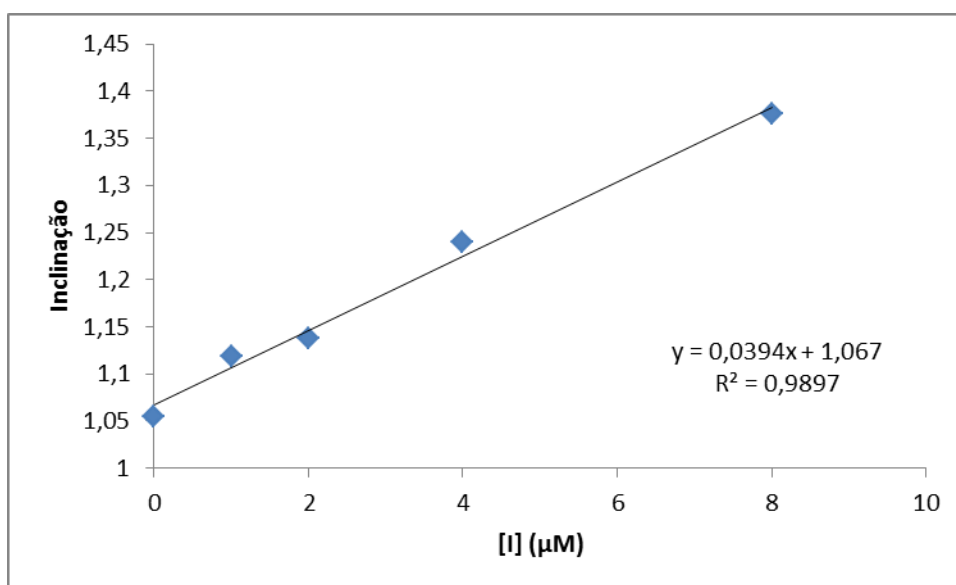


Figura 8: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-like purificadas em presença do peptídeo Gor 5.

O perfil do gráfico das inclinações das retas do duplo recíproco confirma a pequena variação na resposta de inibição induzida pelo peptídeo Gor 3 (Figura 6). Para Gor 4 e Gor 5 a reta gerada no gráfico das inclinações mostram uma resposta mais eficiente de inibição (Figura 7 e 8).

No estudo de *docking* de Gor 3 e Seq 3 o complexo formado teve uma alta energia de ligação sendo promissor para a realização dos ensaios *in vitro*. No entanto, não foi observado uma boa inibição. O ensaio foi realizado com um conjunto de enzimas tripsina-like, possivelmente a quantidade da enzima Seq 3 presente no purificado foi baixa em comparação à Seq 1 e Seq 2 que não apresentaram bons resultados de inibição com Gor 3 nos estudos de *docking*.

Foram plotados os gráficos de Dixon para os peptídeos Gor 3, Gor 4 e Gor 5 (Figura 9, 10 e 11).

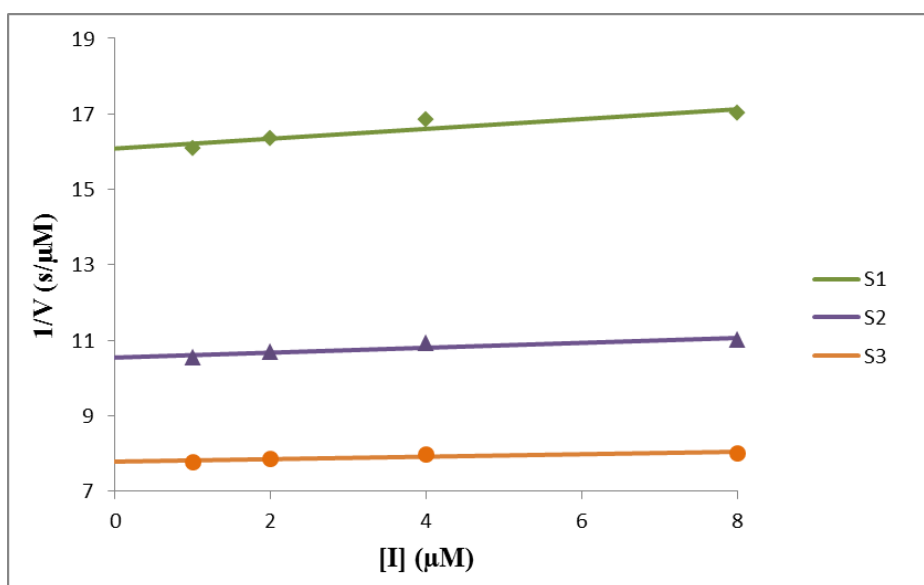


Figura 9: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pelo peptídeo Gor 3 em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (1,0 μM); I2 (2,0 μM); I3 (4,0 μM); I4 (8,0 μM). Os pontos são experimentais.

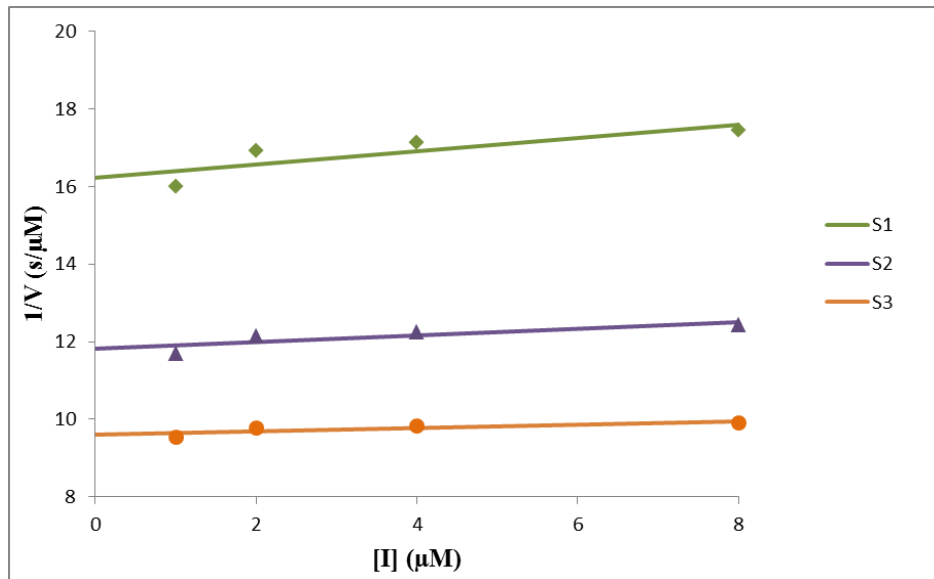


Figura 10: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pelo peptídeo Gor 4 em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (1,0 μM); I2 (2,0 μM); I3 (4,0 μM); I4 (8,0 μM). Os pontos são experimentais.

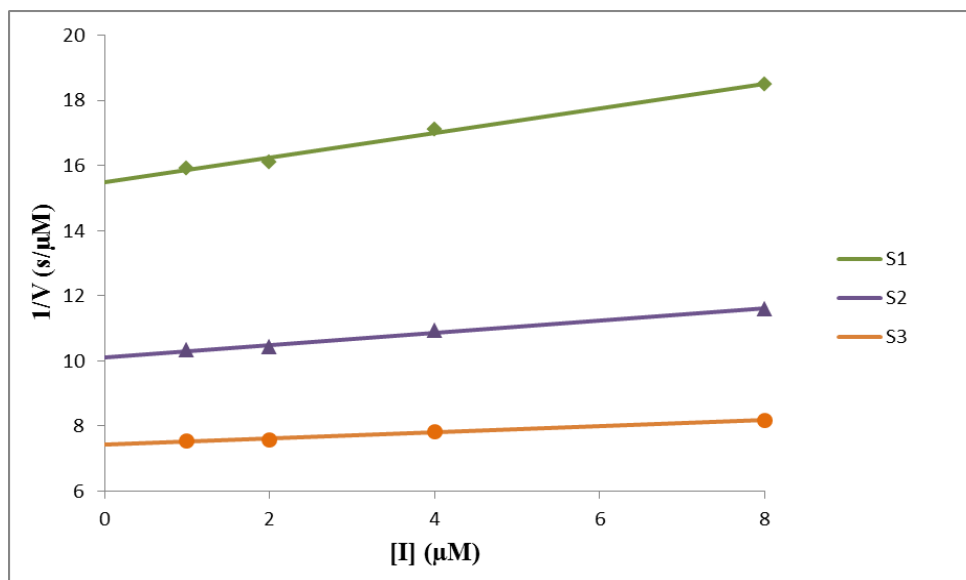


Figura 11: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pelo peptídeo Gor 5 em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (1,0 μM); I2 (2,0 μM); I3 (4,0 μM); I4 (8,0 μM). Os pontos são experimentais.

Nos gráficos observa-se que o aumento na concentração do substrato, com concentração fixa de inibidor, diminui o grau de inibição e um aumento na concentração do inibidor, com concentração de substrato fixa, aumenta o grau de inibição. Para Gor 3

e Gor 4 as constantes de inibição calculadas pelo método de Dixon (1979) foram maiores do que para Gor 5 (Tabela 3).

Tabela 3: Constante de inibição para os diferentes peptídeos em presença do substrato cromogênico L-BApNA

Peptídeo	K_i (μM)
Gor 3	85,1
Gor 4	51,7
Gor 5	28,5

Após a caracterização por três tipos de perfis diferentes de gráficos é possível verificar que o modelo de inibição das enzimas tripsina-*like* para os peptídeos testados é do tipo competitiva linear, na faixa de concentração de inibidores e substratos analisados. No entanto, pelos perfis dos gráficos, assim como pelos resultados de *docking*, observa-se que a inibição ocorreu devido a interação dos peptídeos no sítio secundário S_2' na cavidade hidrofóbica das três enzimas analisadas.

Observa-se que entre os três peptídeos analisados, o Gor 5 apresentou menor constante de inibição e portanto, o mais potente entre os testados. A predominância de resíduos hidrofóbicos na região do sítio secundário das enzimas favoreceu a interação do peptídeo. Esses resultados foram confirmados pelos altos valores de energia de ligação na formação do complexo enzima-ligante obtidos no estudo de *docking*. Apesar de Gor 3 também ser hidrofóbico, a maior energia de ligação de Gor 5 em relação a Gor 3 pode ser explicado pelo tamanho da cadeia lateral do resíduo de triptofano que favorece um contato mais íntimo com os resíduos hidrofóbicos da região tornando a inibição mais efetiva. Além disso, Gor 5 foi o único peptídeo que fez interação com os três resíduos da tríade catalítica de Seq 2 (H59, D103 e S201) com energia de ligação de -7,4 kcal/mol.

A conformação do peptídeo Gor 3 e a sua natureza hidrofóbica são as principais razões para não ocorrerem interações com o centro ativo da enzima. A presença de um

resíduo polar na posição P₁ de Gor 4 melhora a interação na região do centro catalítico da enzima quando comparado a Gor 3. Isso justifica uma K_i menor para Gor 4. No entanto, não foi observada boa interação no centro ativo da enzima, já que nos estudos de *docking* nenhum modelo com energia favorável foi gerado para a interação de Gor 4 com a região do centro ativo da enzima Seq 2 e Seq 3. Isso justifica a menor K_i para o peptídeo Gor 5. A inibição no sítio de ligação do substrato parece diminuir a atividade catalítica mais efetivamente do que as interações em outras regiões.

Para o desenvolvimento de um inibidor para o conjunto de enzimas digestivas do inseto muitos estudos serão necessários. O fato é que as ferramentas de bioinformática facilitam o trabalho, pois é possível avaliar, mesmo que de forma empírica, o que ocorre a nível molecular. Os resultados obtidos com o estudo da cinética de inibição comprovam experimentalmente o que foi observado nas análises *in silico*. Para a produção efetiva de um inibidor peptídico deve-se levar em consideração os mecanismos adaptativos do inseto.

4. CONCLUSÃO

A purificação do extrato bruto por cromatografia de afinidade em coluna HiTrap® utilizando o sistema FPLC foi mais eficiente quando comparada a purificação utilizando coluna manual.

Nos estudos de cinética utilizando diferentes substratos peptídicos foi possível constatar que as serino-proteases intestinais tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis* têm preferência na hidrólise de substratos contendo arginina na posição P₁.

Nos estudos de cinética de inibição utilizando os peptídeos sintéticos Gor 3, Gor 4 e Gor 5 em presença do substrato cromogênico L-BApNA observou-se que a inibição é do tipo competitiva linear nas concentrações utilizadas.

A melhor K_i foi observada para o peptídeo Gor 5 que apresentou uma inibição mais eficiente em comparação aos peptídeos Gor 3 e Gor 4. No geral, a eficiência na inibição da atividade enzimática está relacionada à capacidade de ligação ao centro ativo da enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8:93-99, 1987.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248– 254, 1976.

BRITO, L. O.; LOPES, A. R.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W .R.; SILVA-FILHO, M. C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 128: 365-375, 2001.

BUDATHA, M.; MEUR, G.; DUTTA-GUPTA. Identification and characterization of midgut proteases in *Achaea janata* and their implications. **Biotechnol. Lett.**, 30: 305-310, 2008.

CHITGAR, M. G.; GHADAMYARI, M.; SHARIFI, M. Identification and characterization of gut proteases in the fig tree skeletoniser moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae). **Plant Protect. Sci.**, 49:19-26, 2013.

CORNISH-BOWDEN, A. Inhibitors and activators. In: CORNISH-BOWDEN, A. Fundamentals of enzyme kinetics. 2a Edition. London: Butterworths, Cap. 5., p. 73-98, 1981.

DIXON, M.; WEBBER, R. C.; THERONE, C. J. R.; TRIPTON, K. F. Inhibition and activation in enzymes. **Acad. Press, New York**, 332-381, 1979.

EMBRAPA, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, Sistemas de Produção/Embrapa Soja, n.16. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 265p, 2013.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.**, 95: 271–278, 1961.

FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, 4: 129-134, 1992.

GALLIMORE, M. J. & FRIBERGER, P. Chromogenic peptide substrate assays and their clinical applications. **Blood Rev.**, v.5, p.117-127, 1991.

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytol.**, 156: 145-169, 2002.

HOFFMAN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. Criação massal de lagarta da soja (*Anitcarsia gemmatalis*). Londrina, **EMBRAPA-CNPSO**, 10, Documentos, 23p, 1985.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; SINGH, D.; KHAN, M. Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. **Phytochem. Rev.**, published online: 04 may 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York, 3 Ed., 2000.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; TERRA, W. R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 55: 140-152, 2004.

LOPES, A.R., JULIANO, M.A., MARANA, S.R., JULIANO, L., TERRA, W.R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 36:130-140, 2006.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S. S.; FERREIRA, R. N.; ALMEIDA, A. P.; SANCHEZ, E. F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, 146:565-575, 2007.

MAHDAVI, A.; GHADAMYARI, M.; SAJEDI, R. H.; SHARIFI, M.; KOUCHAKI, B. Identification and partial characterization of midgut proteases in the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*. **J. Insect Sci.**, 13:81, 2013.

MARES-GUIA, M. & SHAW, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate said chain. **J. Biol. Chem.**, 240: 1579-1585, 1965.

MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A. F.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M. Kinetic evidence for a two-state, hydrid model for the trypsin activation by modifiers. **J. Biol. Chem.**, 256: 1661-1668, 1981.

MILLS, N. J. & KEAN, J. M. Behavioral studies, molecular approaches and modeling: Methodological contributions to biological control success. **Biol. Control**, 52:255-262, 2010.

NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P., ORTEGO, F. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagroides*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 29: 177-184, 1999.

OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is parto f te substrate activation binding site of bovine trypsin. **J. Biol. Chem.**, 268: 26893-26903, 1993.

OLIVEIRA, M. G. A.; De SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 140: 369-380, 2005.

PATARROYO VARGAS, A. M. Purificação parcial e caracterização cinética da inibição de proteases intestinais tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 93p., 2011.

PERONA, J.J. & CRAIK, C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Prot. Sci.**, 4:337-360, 1995.

SCOTT, I. M.; THALER, J. S.; SCOTT, J.G. Response of a Generalist Herbivore Trichoplusiani to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato. **J. Chem. Ecol.**, 36:490–499, 2010.

SEGEL, I.H. Enzyme kinetics –behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: John Wiley, 1975.

SENA, M. P. T. Caracterização cinética da protease trombica presente no veneno de *Bothrops leucurus*: leucurobina. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, 120p., 2006.

SHI, M.; ZHU, N.; YI, Y.; CHEN, X. Four serine protease Cdnas from the midgut of *Plutella xylostella* and their proteinase activity are influenced by the endoparasitoid, *Cotesia vestalis*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 83:101-114, 2013.

SHIVAJI, R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J.H.; WILLIAMS, W.P.; WILKINSON, J.R.; LUTHE, D.S. Plants on Constant Alert: Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. **J. Chem. Ecol.**, 36:179–191, 2010.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, 11:132-154, 2006.

TELANG, M. A.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. Characterization of two midgut proteinases of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. **J. Insect Physiol.**, 51: 513-522, 2005.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109b:1-62, 1994.

VIANNA, U.R.; PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J.C.; De ALENCAR, J.R.C.C.; ZINGER F.D. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arq. Inst. Biol.**, 78:81-87, 2011.

VOLPICELLA, M.; CECI, L. R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M. A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **Eur. J. Biochem.**, 270: 10-19, 2003.

PERSPECTIVAS

Nosso grupo de pesquisa objetiva o controle de pragas agrícolas utilizando métodos alternativos aos agroquímicos, sendo o alvo principal as proteínas digestivas do inseto. Para isso, a modelagem molecular se tornou uma ferramenta útil para conhecer as características estruturais das proteínas estudadas, além de ser uma alternativa para contornar os problemas enfrentados na determinação estrutural de proteínas.

Com as estruturas elucidadas *in silico*, os estudos de *docking* iniciais nos possibilitou compreender as interações que ocorrem entre os ligantes e as enzimas. O próximo passo dos nossos estudos será avaliar quais são os tipos de interações que ocorrem e como elas interferem na conformação da enzima. Nesse caso serão utilizadas técnicas de simulação que partem do conhecimento das interações energéticas efetivas em nível atômico e molecular utilizando dinâmica molecular e Monte Carlo.

Os próximos ensaios *in vitro* serão realizados utilizando os peptídeos Gor R e Gor K que foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Departamento de Biologia Molecular e Imunologia da Fundacion Instituto de Immunologia de Colombia (FIDIC). Essas análises servirão para avaliar os parâmetros cinéticos e verificar se ocorre inibição da catálise em presença dos peptídeos que apresentaram os melhores resultados nos estudos de *docking*.