

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE**  
**Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia**

**ERICA RENATA NOGUEIRA SÁ CAETANO**

**MIRACULINAS DE *Citrus sinensis*: MODELAGEM MOLECULAR DE  
ESTRUTURAS E PREDIÇÃO FUNCIONAL**

**CUITÉ - PB**  
**2016**

**ERICA RENATA NOGUEIRA SÁ CAETANO**

**MIRACULINAS DE *Citrus sinensis*: MODELAGEM MOLECULAR  
DE ESTRUTURAS E PREDIÇÃO FUNCIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Naturais e Biotecnologia.

**Orientador:**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Magnólia de Araújo Campos.

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Rafael Trindade Maia

**CUITÉ - PB**

**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

C128m Caetano, Erica Renata Nogueira Sá.

Miraculinas de *citrus sinensis*: modelagem molecular de estruturas e predição funcional. / Erica Renata Nogueira Sá Caetano. – Cuité: CES, 2016.

102 fl.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientadora: Magnólia de Araújo Campos.  
Coorientador: Rafael Trindade Maia.

1. Inibidor de tripsina Kunitz. 2. Modelagem por homologia.  
3. Locking. 4. Receptor de sabor doce. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 513.75

**ERICA RENATA NOGUEIRA SÁ CAETANO**

**MIRACULINAS DE *Citrus sinensis*: MODELAGEM MOLECULAR  
DE ESTRUTURAS E PREDIÇÃO FUNCIONAL**

Dissertação apresentado a  
Universidade Federal de Campina  
Grandes, como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências Naturais e Biotecnologia.

**Aprovado em: 14 / 07 / 2016**

---

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MAGNÓLIA DE ARAÚJO CAMPOS  
(ORIENTADORA)**

---

**PROF. DR. RAFAEL TRINDADE MAIA  
(COORIENTADOR – UFCG/CDSA)**

---

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. DANIELA NADVORNY  
(MEMBRO EXTERNO – UFPE)**

---

**PROF. DR. PLÍNIO DELATTORE  
(MEMBRO INTERNO – UFPB)**

## AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial agradeço pela chuva de bençãos derramadas sobre mim durante toda a minha existencia e principalmente durante a jornada acadêmica.

A Universidade Federal de Campina Grande – CES pela oportunidade de realização desse curso.

A CAPES pela concessão da bolsa durante o período de agosto de 2015 a julho de 2016.

A minha orientadora Magnólia Campos agradeço por ter acreditado que eu seria capaz! Tento ao máximo me espelhar na sua pessoa como educadora e cientista. Espero que no futuro eu seja uma professora acadêmica tao boa quanto à senhora. Obrigado!

Ao meu coorientador Rafael Trindade por todos os ensinamentos na área da Bioinformática. Sem a sua ajuda nada disso teria sido possível, obrigada pela atenção e dedicação.

Ao meu filho amado Davi, agradeço por ter me transformado como ser humano, a sua chegada foi de suma importância para que eu seguisse em frente e persistisse no meu sonho. Agradeço pelos seus sorrisos e carinhos, esses gestos me instigavam a sempre dar o meu melhor para a vida.

Aos meus pais heróis Ezequiel Junior e Ezi Nogueira, por sempre terem me apoiado em qualquer situação. Agradeço pela confiança dada e por todo o esforço feito. Hoje entendo completamente todo o amor e dedicação que vocês tiveram para comigo! Obrigada por estarem sempre de mãos dadas comigo.

As minhas irmãs Ellen e Emanuelle por terem sido as melhores irmãs que alguém poderia ter, por todas as risadas e brincadeiras, vocês com certeza deixam a minha vida mais divertida e aos meus cunhados Anderson e Robson.

A Braulio Caetano, meu marido e amigo e que sempre me encorajou a seguir a diante e acreditar nos meus sonhos. Que adiou seus planos, para me poder me acompanhar nessa missão cuiteense e assim formar nossa própria família. Obrigada por tudo, inclusive por fazer às vezes de babá para que eu pudesse

terminar essa etapa da minha vida. Te amo muito!

A família Nogueira, nas pessoas dos meus queridos avós José Nogueira e Terezinha, que sempre foram pessoas essenciais na minha formação como indivíduo e a recompensa eu dou em forma de diploma. Agradeço também a minha família Sá, na pessoa da minha querida avó paterna Socorro Sá, que também sempre caminhou junto comigo, dando todo suporte necessário para seguir a diante. Aos tios e primos das Famílias Nogueira e Sá, á vocês agradeço por terem acreditado na minha capacidade. Cada palavra e cada conselho foram ouvidos com atenção.

A todos os meus amigos e meus “irmãos” Eskineiros (Jéssica Nobre, Nancy, Zeno, Kakito e Jéssica Pereira) que aceitaram as distâncias impostas pela vida, mas sem perder a essência da amizade verdadeira!

E não poderia esquecer os amigos conquistados durante a minha jornada acadêmica: colegas do mestrado e do Lbiotec pelo agradável convívio durante todo esse tempo. Desejo-lhe muito sucesso!

Aos meu anjos que estão lá no céu intercedendo por mim junto ao Pai Celestial e a virgem Maria santíssima: Maria Daluz Sá, Arquecelina Maria Dantas, Antônio de Pádua Sà e meu amado paiô Ezequiel Jonas Neto. Agradeço!

*Dedico essa produção científica para o meu filho Davi. Tudo que faço é em prol da sua felicidade. O conhecimento e o amor incondicional que te dedico é a melhor herança que posso te deixar. Te amo muito! Você é a razão do meu viver!!!*

*“Você não sabe o quanto eu caminhei  
Pra chegar até aqui  
Percorri milhas e milhas antes de dormir  
Eu não cochilei  
Os mais belos montes escalei  
Nas noites escuras de frio chorei...”*

*(Cidade Negra).*



## RESUMO

Miraculina é uma glicoproteína que possui uma incrível propriedade de converter o sabor amargo em doce. Como a miraculina não apresenta sabor algum e tem um baixo teor calórico, esta proteína pode ser usada como adoçantes direcionados para pacientes com doenças relacionadas ao consumo excessivo de açúcar. Estudos comprovaram que membros da família de proteínas miraculinas também possuem atividade de inibidor de tripsina do tipo Kunitz, atuando como agentes naturais de defesa da planta contra pragas e predadores. Diante disso, proteínas do tipo miraculina são de grande relevância para aplicações biotecnológicas. Esse estudo teve como objetivo geral realizar a caracterização estrutural e funcional comparativa de duas miraculinas de *Citrus sinensis*, por meio de modelagem e *docking* molecular. Modelos 3D foram gerados e validados para as miraculinas CsMir1 e CsMir4, tripsina de *Acyrthosiphon pisum* e para os receptores de sabor doce mT1R2 e T1R3 de *Mus musculus*. Modelos homodiméricos foram gerados para CsMir1 e CsMir4 e modelo heterodimérico foi gerado para mT1R2-T1R3. Estudos da atividade de inibidor de tripsina foram feitos para CsMir1 e CsMir4 por interação com tripsina. Para analisar a atividade de modificação de sabor doce, foi realizada a interação das miraculinas com o receptor mT1R2-T1R3. Como resultados, os modelos dos monômeros e dímeros criados foram considerados bons modelos, válidos e confiáveis, com representações muito próximas das estruturas nativas dessas proteínas. A miraculina CsMir1, na forma monomérica ligou-se a tripsina de *A. pisum* e na sua forma dimérica ligou-se ao receptor heterodimérico mT1R2-T1R3 através do domínio ATD da subunidade T1R2, entretanto o potencial para as atividades de inibição de proteases e de indução ou inibição a modificação de sabor amargo/azedo em doce é menor do que para a CsMir4. A miraculina CsMir4, na sua forma monomérica ligou-se a tripsina de *A. pisum*, possivelmente apresentando atividade de inibição de proteases. CsMir4, na sua forma dimérica, ligou-se ao receptor heterodimérico mT1R2-T1R3, através do domínio ATD da subunidade T1R2, potencialmente apresentando atividade de indução ou inibição a modificação de sabor amargo/azedo em doce em *M. musculus*.

**Palavras-chave:** Inibidor de tripsina Kunitz; Modelagem por homologia; Docking; Receptor de sabor doce.

## ABSTRACT

Miraculins are glycoproteins that displays a remarkable property in bitter to sweet taste conversion. As miraculin does not have any taste and has a low calorie, this protein can be used as sweeteners targeted to patients with diseases related to excessive sugar consumption. Studies have shown that members of miraculins protein family also display inhibitor activity against the Kunitz trypsin, acting as natural agents of plant defense against pests and predators. In this context, miraculin proteins are of great relevance for biotechnological applications. The aim of this research was to characterize structurally and functionally two miraculins of *Citrus sinensis* using *in silico* tools. Tridimensional models were built and validated for CsMir1 and CsMir4 miraculins, *Acyrthosiphon pisum* trypsin and for *Mus musculus* mT1R2-T1R3 receptor. Homodimeric and heterodimeric models were generated for miraculins (CsMir1, CsMir4) and mT1R2-T1R3, respectively. Molecular docking simulations were performed to investigate the trypsin inhibitory activity and taste conversion activity of CsMir1 and CsMir4. The results showed that the predicted models were reliable and presented good quality parameters. The monomeric CsMir1 miraculin bound to *A. pisum* trypsin, while its dimeric form bound to ATD domain of the mT1R2-T1R3, although its potential as trypsin inhibitor and bitter/sweet taste modifier were minor than that presented by its homologous CsMir4. The dimeric form of CsMir4 bound to mT1R2-T1R3 receptor in the ATD domain, which strongly suggests bitter/sweet taste modifier activity in *M. musculus*.

Keywords: Kunitz Trypsin inhibitor , homology modeling, Docking, sweet taste receptor.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Técnica computacional de <i>Docking</i> molecular.....	36
Figura 2: Sequência de aminoácidos da proteína CsMir1.....	38
Figura 3: Sequência de aminoácidos da proteína CsMir4.....	38
Figura 4: Estruturas 3D das proteínas CsMir1 (A) e CsMir4 (B) construídas por meio de modelagem molecular por homologia. As estruturas secundárias estão representadas são alfa $3_{10}$ (em azul), folhas $\beta$ (em amarelo) e as alças (em ciano). Em C e D estão indicadas as sobreposições das miraculinas CsMir1 e CsMir4 respectivamente (em azul), os moldes EZC8 e 3IIR, respectivamente (em vermelho).....	44
Figura 5: Indicação das cisteínas formadoras das pontes dissulfeto que estão destacadas em amarelo nos modelos tridimensionais das proteínas CsMir1 (A) e CsMir4 (B). As pontes dissulfeto calculadas pelo servidor DiANNA 1.1 estão destacadas em vermelho para CsMir1 (C) e CsMir4(D).....	46
Figura 6: Validação da qualidade dos moldes 3D de CsMir1 (A) e CsMir4 (B). Nas análises <i>ANOLEA</i> e <i>GROMOS</i> , os resíduos satisfatórios, estão destacados em verde e as projeções em vermelho sinalizam as energias desfavoráveis. Na análise <i>QMEAN</i> as regiões de baixa energia estão representadas em azul e as de alta energia em vermelho.....	49
Figura 7: Comparações de score de <i>QMEAN6</i> obtidos para os modelos das proteínas CsMir1 (A) e CsMir4 (B) com <i>scores</i> de estruturas do mesmo tamanho depositadas no PDB.....	50
Figura 8: Gráficos de Ramachandran dos modelos das proteínas CsMir1 (A) e CsMir4 (B), indicando 85,9% dos resíduos em regiões favoráveis (vermelho) e 9% em regiões permitidas (amarelo) para CsMir1 e 83,9% dos resíduos em regiões favoráveis (vermelho) e 13,7% em regiões permitidas (amarelo) para CsMir4. (A).....	51
Figura 9: Imagem representativa das estruturas 3D da CsMir1 (A) e CsMir4 (B) indicando os prováveis sítios ativos (em vermelho) de acordo com o <i>cluster1</i> , previsto pelo servidor Ghecom.....	53
Figura 10: Resíduos que formam cavidades com potencial para ligação em	

CsMir1 (A) e para CsMir4 (B), de acordo com o servidor Ghecom (cluster1, em vermelho).....	54
Figura 11: Estrutura Tridimensional de <i>Acyrthosiphon pisum</i> modelada a partir da sequência de aminoácidos, usando 2JKH.pdb como moldes.....	56
Figura 12: Conformação dos compostos criados entre a tripsina de <i>A. pisum</i> (em verde) e as CsMir1 (A) e CsMir4 (B) em amarelo. Os resíduos chaves (Hotspot) das interações estão indicados pela conformação em bolas.....	57
Figura 13: Resíduos que formam cavidades com potencial para ligação, de acordo com o servidor Ghecom. Em vermelho, os resíduos que fazem parte do cluster1 para a tripsina de <i>A. pisum</i> .....	58
Figura 14: Estruturas 3D dos dímeros das proteínas CsMir1 (A) e CsMir4 (B) construídas por meio de modelagem molecular por homologia. As cisteínas formadoras de pontes dissulfeto estão indicadas em amarelo. Os resíduos que fazem parte da interação intracadeias estão destacados em vermelho. Detalhes da representação dos resíduos que fazem parte da homodimerização da CsMir4 (C).....	59
Figura 15: Estrutura 3D do receptor heterodimérico de sabor doce mT1R2/T1R3 de <i>M. musculus</i> geradas, usando 2E41.pdb como molde.....	61
Figura 16: Conformações frente e verso dos complexos mT1R2/T1R3-CsMir1 (A) e mT1R2/T1R3-CsMir4 (B), indicando em ciano os homodímeros das proteínas miraculinas e em vermelho o receptor heterodimérico de sabor doce. As bolas estão indicando os resíduos-chave, sendo em azul destaque para os resíduos do domínio ATD do receptor T1R2 potencialmente responsáveis pela resposta a miraculinas.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
ANOLEA	Avaliação Ambiental Atômica Não-Local
APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos agronegócios
ATD	Domínio amino terminal
BLAST	Do inglês, <i>Basic Alingnment Search Tool</i>
CAP	<i>Citrus sinensis</i> Annotation Project
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CES	Centro de Educação e Saúde
CitEST	Banco de dados de segmentos de sequencias expressas de citros
DTM	domínio transmembrana helicoidal
GroMos	Do inglês Groningen Molecular
kDa	kiloDalton
Lbiotec	Laboratório de Biotecnologia
mGluR	Receptor de glutamato metabotrópico
<i>Mir</i>	Gene Miraculina
CsMir	Proteína Miraculina de <i>Citrus sinensis</i>
MKMLP	<i>Murraya koenigii</i> proteína do tipo miraculina
MLP	Proteína do tipo miraculina
NCBI	Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
PDB	Do inglês, <i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
QMEAN	Do Inglês, <i>Server for Model Quality Estimation</i>
STI	Inibidores de proteinase tripsina de soja
TBM	Do inglês, <i>template based modeling</i>
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
VMD	Do inglês, Visual Molecular Dynamics

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1 Proteínas do tipo miraculinas.....	17
3.1.1 Origem e caracterização de miraculinas.....	17
3.1.2 Atividades funcionais associadas às proteínas miraculinas.....	19
3.1.2.1 Atividade modificadora de sabor.....	19
3.1.2.2 Atividade de inibidor de protease.....	22
3.1.3. Aplicações biotecnológicas de proteínas miraculinas.....	24
3.1.3.1 Quanto à atividade de modificação de sabor.....	25
3.1.3.2 Quanto à atividade de inibidor de protease.....	26
3.2 Importância de estudar miraculinas de citros.....	29
3.2.1 Origem e aspectos gerais.....	29
3.3 Caracterização e estudos de estruturas de proteínas.....	30
3.3.1 Estudos experimentais de estruturas de proteínas.....	32
3.3.2 Estudos computacionais de estruturas de proteínas.....	33
3.3.2.1 Modelagem Molecular.....	34
3.3.2.1.1 Modelagem Molecular por homologia.....	35
3.3.2.2 <i>Docking</i> molecular.....	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1 Identificação das proteínas miraculinas.....	38
4.2 Modelagem e validação das formas monoméricas e diméricas da CsMir1 e CsMir4.....	38
4.2.1 Construção dos modelos monoméricos.....	99
4.2.2 Construção dos modelos Dímericos.....	40
4.3 Predição de sítios ativos.....	40
4.4 Simulação da interação dos monômeros das miraculinas com uma tripsina de inseto.....	40
4.5 Simulação da interação de dímeros das miraculinas com receptor de sabor doce.....	41

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
5.1 Caracterização estrutural das miraculinas.....	43
5.1.1 Determinação dos modelos tridimensionais dos monômeros das miraculinas.....	43
5.1.2 Confirmação cisteínas e das pontes dissulfetos.....	45
5.1.3 Qualidade dos modelos tridimensionais dos monômeros das miraculinas.....	47
5.2 Caracterização funcional das miraculinas.....	51
5.2.1 Identificação dos sítios ativos das proteínas CsMir1 e CsMir4.....	53
5.2.2 <i>Docking</i> molecular das miraculinas com protease tripsina.....	55
5.2.3 Estudo da atividade de modificação de sabor.....	59
5.2.4 <i>Docking</i> molecular do receptor de sabor doce com as miraculinas diméricas.....	60
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
<b>ANEXOS</b> .....	78
ANEXO – i.....	79
ANEXO – ii.....	82
ANEXO – iii.....	85
ANEXO – iv.....	95

## 1 INTRODUÇÃO

Miraculina é uma glicoproteína que foi inicialmente encontrada em frutos da planta *Richardella dulcifica* e recebeu este nome por ser o princípio ativo responsável pelo “milagre” de converter o sabor amargo em doce, após o contato desta proteína com a língua humana, o efeito que dura de 1 a 2 horas após o contato (THEERASILP e KURIHARA, 1988; HIRAI et al., 2011; INGLETT e CHEN, 2011; KOIZUMI et al., 2011). Embora a miraculina não apresente sabor algum, esta proteína pode ser usada como adoçantes direcionados pacientes com doenças relacionadas ao consumo excessivo de açúcar, justamente por apresentar a característica de ter um baixo teor calórico (GNANAVAL e PEDDHA, 2011).

Além da propriedade de modificadora de sabor, proteínas do tipo miraculina (MLP) estão classificadas na superfamília de inibidores de tripsina de soja (STI) do tipo Kunitz, com base na elevada identidade de sua estrutura primária com estes inibidores (TAKAI et al., 2013). Assim como os STIs do tipo Kunitz, estudos comprovaram que membros da família de proteínas miraculinas possuem atividade de inibidor de tripsina do tipo Kunitz, atuando como agentes naturais de defesa da planta contra pragas e predadores (GAHLOTH, 2011).

Portanto, proteínas do tipo miraculinas são de grande relevância para aplicações biotecnológicas, pois apresentam potencial bioinseticida para incorporação em culturas resistentes a pragas; na indústria de processamento de alimentos como intensificadores de sabor, na indústria farmacêutica e na melhora do paladar de pacientes em tratamento de quimioterapia (SUN et al., 2006; BACHCHU et al., 2011; WILKEN e SATIROFF, 2012). Neste contexto, a busca por novas proteínas do tipo miraculinas tem sido intensificada por pesquisadores do mundo inteiro.

Uma facilidade para encontrar novos genes que codificam novas proteínas miraculinas está em informações de genomas vegetais. Os sequenciamentos de genomas têm disponibilizado milhares de sequências gênicas, cujas funções precisam ser determinadas ou confirmadas, visando aplicações biotecnológicas. Dentre os bancos genômicos de grande importância econômica estão os bancos de dados de espécies e cultivares de citros, principal *commoditie* agrícola brasileira. Sequências da espécie *Citrus*



*sinensis* encontram-se disponíveis nos bancos de dados *C. sinensis* Annotation Project (CAP Database), da China, disponível em <http://citrus.hzau.edu.cn/orange>; e pelo genoma funcional e comparativo dos citros (CitEST Database), realizado pelo Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis SP, Brasil, acessível mediante senha autorizada por colaboração em pesquisas em <http://biotecnologia.centrodecitricultura.br>. Portanto, estudar miraculinas de citros representa uma fonte alternativa para a prospecção de proteínas miraculinas em plantas mais acessíveis do que a fruta-do-milagre e ainda pode trazer avanços científicos com potencial para aplicação na própria citricultura, entre outras.

Neste sentido, Souza (2015) recentemente identificou e caracterizou 04 genes do tipo miraculina a partir do genoma de *C. sinensis* que foram idênticos nas cultivares “Valência” (CAP Database) e “Pêra” (CitEST Database), usando as informações dos citados bancos de dados de citros. Entretanto, devido a referida duplicidade de funções de membros da superfamília de miraculinas, enquanto modificadora de sabor doce ou inibidora de proteinase, se faz necessária uma caracterização molecular estrutural mais detalhada que possa contribuir para apontar as respectivas funções das novas miraculinas.

Este estudo, portanto, pode levar a descoberta de novas estratégias para solucionar problemas agrícolas e relacionados a saúde humana, como, por exemplo, insetos-praga de culturas agronomicamente importantes e outros insetos vetores virais que afetam a saúde humana, bem como alternativas como adoçante.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização estrutural e funcional comparativa de duas miraculinas de *Citrus sinensis*, por meio de modelagem e *docking* molecular.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Simular modelos tridimensionais das formas monoméricas e diméricas de duas miraculina de *C. sinensis*, por meio de modelagem molecular comparativa;
- ✓ Validar modelos tridimensionais das formas monoméricas e diméricas de duas miraculinas de *C. sinensis*, por meio de modelagem molecular comparativa;
- ✓ Simular a interação de monômeros das miraculinas com protease tripsina/serina de inseto-praga, por meio de *docking* molecular.
- ✓ Simular a interação de dímeros das miraculina com receptor de sabor doce de humanos, por meio de *docking* molecular.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PROTEÍNAS DO TIPO MIRACULINAS

##### 3.1.1 Origem e caracterização de Miraculinas

A primeira proteína miraculina foi encontrada nos frutos de um arbusto denominado de *Synsepalum dulcificum* (DANIELL, 1852), mais tarde renomeado para *Richardella dulcifica* (BAENHI, 1965), pertencente à família Sapotaceae. Plantas dessa família são comumente encontradas em regiões tropicais e subtropicais na forma de arbustos ou árvores (DE MARQUI, 2007 THEERASILP e KURIHARA, 1988).

A fruta-do-milagre, como assim é conhecida pela cultura popular, tem esse nome porque após o consumo do fruto de *R. dulcifica*, uma sensação de doçura é exercida sobre as papilas gustativas, mesmo que sejam consumidas substâncias ácidas em seguida, durante um período de 1 a 2 horas após.

THEERASILP e KURIHARA (1989) determinaram a estrutura da cadeia polipeptídica desta miraculina nativa apresenta 191 resíduos, possui uma massa aproximada entre 24 a 28 kDa, que são funcionais como homodímero, ou seja, como duas cadeias polipeptídicas N-glicosiladas em 2 resíduos de asparagina (Asn-42 e Asn-186), as quais estão ligadas entre si por ponte dissulfeto. Já IGETA et al. (1991) demonstraram que a proteína miraculina nativa madura possui sete resíduos de cisteínas que são responsáveis pela formação de 3 pontes dissulfeto intracadeias, nas posições 47 e 92, 148 e 159, 152 e 155, sendo que o último resíduo de cisteína, na posição 138, forma uma ponte dissulfeto intercadeias com outra cisteína na mesma posição do outro monômero.

IGETA et al. (1991) demonstraram ainda que a miraculina nativa madura pode assumir a forma de tetrâmero com peso molecular de 47 kDa, e que assume a forma de dímero quando está desnaturada ou não-reduzida. A miraculina é desnaturada em valores muito baixos de pH, menor que 2,0 ou muito alto, acima de 12,0 (BROUWER et al., 1968). Proteínas do tipo Miraculina (MLPs) constituem um grupo de proteínas que exibem uma identidade de

sequências com uma boa margem de significância, que varia entre 39 a 55% para com a proteína miraculina nativa extraída da *R. dulcifica* (HIRAI et al., 2010). Diversas MLPs foram classificadas dentro da superfamília de inibidores de tripsina de soja (STI) do tipo Kunitz, devido à elevada homologia entre as suas sequências de aminoácidos e essa família de inibidores de proteinase. A família de proteínas STI do tipo Kunitz é composta por proteínas que evoluíram de forma acelerada, impulsionada pela duplicação de genes, neofuncionalização e pela seleção Darwiniana positiva, otimizando novas funções para combater o estresse biótico e abiótico local (SELVAKUMAR et al., 2011).

De modo geral, proteínas são sintetizadas em sua fonte natural acumulam em baixas concentrações, portanto a produção de miraculina em massa é limitada aos frutos de uma planta tropical. Neste sentido, o avanço das pesquisas levou a alternativas para produzir a miraculina de forma recombinante em vários sistemas de expressão heteróloga *in vitro* e *in planta*, como bactérias, leveduras e plantas, os quais contribuíram tanto para elucidar características funcionais de miraculinas, bem como aplicações para a sua produção em larga escala (JIN-SUN et al., 2006; HIRAI et al., 2011).

BACHCHU et al. (2011) demonstraram que a expressão de uma miraculina recombinante em folhas de planta *Citrus unshiu* levou ao acúmulo significativo da proteína nas folhas, onde a miraculina recombinante foi glicosilada e formou homodímeros ligados por pontes dissulfeto, apresentando atividade biológica suficiente. A miraculina recombinante glicosilada foi observada na expressão em alface (JIN-SUN et al., 2006) e também no fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* (ITO et al., 2007). Porém, sabe-se que a glicosilação não é essencial para a atividade de modificação de sabor (MATSUYAMA et al., 2009). Já HIRAI et al. (2011) relataram que o acúmulo de miraculina recombinante em tomates transgênicos ocorreu gradualmente ao longo do desenvolvimento dos frutos e atingiu o ápice na fase madura (HIRAI et al, 2011).

### **3.1.2 Atividades funcionais associadas às proteínas miraculinas**

Como já citado anteriormente, as funções mais conhecidas que proteínas miraculinas desempenham são duas: atividade modificadora de

sabor azedo/amargo em doce e atividade inibidora de proteinase tripsina do tipo Kunitz. Além dessas, estas proteínas podem estar envolvidas em inúmeras funções biológicas, tais como antifúngica, antioxidante, ação anticarcinogênese, agregação plaquetária e também na coagulação do sangue (RYAN 1978; KENNEDY, 1998; OLIVA et al., 2000). A miraculina também desempenha papel em plantas de regulação em diferentes tipos de morte celular por hipersensibilidade (XU et al., 2012; PODDA, 2014).

### 3.1.2.1 Atividade modificadora de sabor

De acordo com ITO et al. (2007), a atividade de modificação de sabor é atribuída a dois resíduos de histidinas (His30 e His60) que estão localizadas nas regiões expostas, segundo estudos de mutagênese. Além disso, a atividade acontece quando a miraculina assume a forma de homodímero (IGETA et al., 1991; MATSUYAMA et al., 2009; TAKAI et al., 2013).

Misaka (2013) sugeriu que a miraculina age como um agonista e um antagonista dependente de pH. Em pH ácido, a miraculina liga-se aos receptores de sabor doce, funcionando como agonista, porém em pH neutro a miraculina atua como antagonista inibindo a ação dos receptores de sabor doce. Durante o período de trinta minutos a duas horas, a miraculina reativa os receptores de sabor doce, sempre que um pH ácido for detectado. Mas, apesar dos avanços da ciência, esse mecanismo ainda não foi bem esclarecido.

O paladar humano é capaz de detectar e responder a estímulos a cinco tipos de sensações: doce, amargo, azedo, salgado e umami, que possui o sabor de glutamato monossódico, em referência a sentir um sabor delicioso. Essa propriedade de discriminação de sabor fornece estímulos sensoriais. A identificação de receptores gustativos gerou ferramentas moleculares para investigar não só a função de células receptoras de sabor, mas também a codificação dos gostos (KANT, 2005).

Os gostos sentidos pelos seres humanos são detectados por células receptoras de gostos, que quando agrupadas, são chamadas de papilas gustativas. Essas papilas estão presentes na língua humana, e cada uma possuem vários poros que se abrem, permitindo que moléculas e íons que

caiam dentro da boca possam alcançar o interior das células receptoras de gosto (KANT, 2005).

Duas novas famílias de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) foram descritas, os quais são expressos em células receptoras gustativas da língua e do palato: T1Rs e T2Rs. Essa classe de receptor T1R é composta por três domínios: um domínio amino terminal (ATD), um domínio rico em cisteína (CRD), e um domínio transmembrana helicoidal (DTM) (NELSON, 2001; MARGOLSKEE, 2001; PIN, GALVEZ, PREZEAU, 2003).

O T2R pertence a uma família de 30 genes diferentes, que incluem vários receptores de sabor amargo de mamíferos funcionalmente validados. Quase todos os genes do T2Rs estão agrupados em regiões do genoma que são responsáveis pela resposta a sabores amargos em mamíferos (ADLER et al., 2000). Os T2Rs são coexpressos no mesmo subconjunto de células receptoras gustativas, o que sugere que estas células são capazes de responder a uma grande variedade de compostos amargos (NELSON, 2001).

Existe uma hipótese em que o receptor específico de sabor doce funciona com uma combinação de receptores doces heterodiméricos. A combinação de receptores T1R2-T1R3, reconhece a doçura natural e a sintética, já a combinação de receptores T1R1-T1R3 reconhece o gosto umami (LI et al., 2002; CONTE et al., 2002; KANT, 2005). Estes receptores T1R2-T1R3 são ortólogos, sendo encontrados em humanos, ratos, chimpanzés, entre outros, desempenhando funções similares.

A relação entre a miraculina e a interação de receptores de sabor doce ainda não está bem definida. Sabe-se que a miraculina atua através dos receptores T1R2-T1R3, porém nenhum experimento explicando essa interação não foi demonstrado. Existe uma hipótese de que a miraculina fica fortemente aderida aos receptores de sabor doce na língua humana, ou seja, ela fica ligada ao complexo dos receptores T1R2-T1R3, na membrana, ativando esses receptores constantemente. A modificação de sabor é causada pela ligação direta e contínua da miraculina com os T1R2-T1R3, podendo a mesma libertar-se rapidamente após o primeiro contato com substâncias ácidas, mudando a função do receptor para só reconhecer estímulos ácidos. Sabe-se também que o complexo de receptores T1R2-T1R3 possui múltiplos locais de ligação para diferentes sabores doces (KOIZUMI et al., 2011).

Adoçantes com a massa molecular baixa e as proteínas doces interagem com o mesmo receptor humano T1R2- T1R3. Estudos têm mostrado que a proteína do receptor T1R3, codificada pelo gene *Tas1r3*, está envolvida na transdução de sabor doce (TRANCREDI et al., 2004; INOUE et al., 2004; KANT, 2005). A parte do complexo de receptores T1R2-T1R3 que está envolvida com a resposta da miraculina na indução da doçura é o domínio Amino-terminal (ATD). A miraculina se liga como um antagonista ao receptor T1R2-T1R3 em pH neutro e muda sua funcionalidade em pH ácido, ou seja, torna-se agonista, e isso pode ocasionar a atividade de mudança de sabor (KOIZUMI et al., 2011).

O complexo heterodimérico dos receptores T1R2-T1R3 tem várias características semelhantes às do receptor de mGluR, mostrando apenas algumas pequenas diferenças na região do sítio ativo. Um trabalho estrutural desenvolvido sobre o receptor mGluR no domínio N-terminal revelou que existe uma mudança conformacional induzida pela complexação do glutamato, o que ajudou a elucidar a estrutura cristalina da região do N-terminal do sítio ativo (KUNISHIMA et al., 2000; KANT, 2005).

Sobre o mecanismo de ação dessa propriedade de modificação de sabor da miraculina com o complexo de receptores, a miraculina liga-se as microvilosidades da membrana plasmática das células do epitélio da língua humana, sem ativar o complexo de receptores T1R2-T1R3, pois a proteína não possui sabor algum (MISAKA, 2013; CUDINIK, 2014). Os receptores ficam inativados até serem submetidos a um pH ácido entre 3,0 e 6,0, durante um período até duas horas (KURIHARA, 1992; WONG E KERN, 2011; PALADINO et al, 2010).

Uma teoria proposta pela primeira vez por KURIHARA e BEIDLER (1969) sugeriu que cada vez que uma substância ácida é consumida após a ingestão prévia da miraculina, a membrana das células gustativas, quando fica perto do receptor de sabor doce, sofre uma mudança conformacional na presença de prótons H<sup>+</sup>, fazendo com que a miraculina ligue-se ao receptor doce, lembrando a uma forte sensação de doçura, ou seja, a indução do sabor doce da proteína miraculina é dependente do pH ácido. Essa teoria não é usual, devido ao descobrimento da identidade dos receptores de sabor doce como complexo T1R2-T1R3, verificando assim, que a viabilidade dessa

hipótese era impossível (LI et al, 2002; MISAKA, 2013). Além disso, mais tarde foi demonstrado que a atividade modificadora de sabor doce da miraculina não depende da glicosilação (MATSUYAMA et al., 2009).

### 3.1.2.2 Atividade de inibidor de proteinase

A atividade inibidora de proteinase tripsina do tipo Kunitz atribuída a proteínas miraculinas é devido à presença de um motivo dessa família de proteínas, a presença de um suposto peptídeo sinal na região N-terminal, quatro cisteínas conservadas formadoras de duas pontes dissulfeto e massa molecular de aproximadamente 20 kDa. Assim como outros membros da família STI do tipo Kunitz, miraculinas sofrem inúmeros processos pós-traducionais como, maturação, glicosilação, remoção do peptídeo sinal e a formação de pontes dissulfeto (TAKAI et al., 2013). Tanto a miraculina nativa, quanto as MLPs pertencem à superfamília de STI do tipo Kunitz, pois apresentam uma semelhança de aproximadamente 30% com a sequência de aminoácidos para os inibidores de tripsina de soja da família Kunitz, e 35% de identidade com a miraculina nativa, que também pertence à família STI do tipo Kunitz (RICHARDSON, 1991; TSUKUDA et al 2006; SHEE e SHARMA 2008; SELVAKUMAR et al., 2011).

A estrutura da maioria dos inibidores da família STI do tipo Kunitz apresenta uma dobra comum do tipo folha- $\beta$ , e é formada por 12 cadeias  $\beta$  antiparalelas, ligadas por longas alças. Estes inibidores possuem uma alça reativa em um local exposto, tendo uma formação canônica, com arginina/lisina no local de especificidade primária (SONG e SUN, 1998). Diferentemente da atividade de modificação de sabor, em que a miraculina assume a forma de homodímero, para exercer a função de inibidor de tripsina, a proteína assume a forma de monômero, como acontece com outros membros da família STI do tipo Kunitz (IGETA et al., 1991; MATSUYAMA et al., 2009; TAKAI et al., 2013).

Os inibidores de proteases STI da família Kunitz são um exemplo clássico de família multigênica. Esses inibidores evoluíram de forma acelerada ao longo do tempo de um ancestral comum, através de eventos de duplicação e conversão de genes, que se adaptaram a função de defesa em diferentes tipos de plantas, eles têm como característica a presença de uma sequência



assinatura do N-terminal conservada (TALYZINA e INGVARSSON, 2006; SELVAKUMAR et al., 2011).

Alguns estudos desenvolvidos relatam que os membros da família STI do tipo Kunitz foram submetidos a mudanças evolutivas, devido à variedade de pressões seletivas (TALYZINA e INGVARSSON 2006). No entanto, algumas variações foram relatadas entre estes inibidores em relação às estruturas cristais, onde alguns possuem uma ou nenhuma ponte dissulfeto (HANSEN et al., 2007).

A filogenia das MLPs e dos STI mostra que a miraculina nativa de *R. dulcifica* e as MLPs se agrupam juntas, porém separadas das STI, isso significa que elas diferiram muito do ancestral comum, ao longo o tempo. As MLPs constituem um tipo de família multigênica que evoluíram do ancestral comum por duplicação de genes, e com o passar do tempo ocorreu uma diversificação funcional, devido à especiação e a ambientes locais específicos, além da atividade de inibição de tripsina, novas funções foram atribuídas as MLPs como atividade antifúngica, porém a atividade de modificação de sabor não foi identificada nas MLPs (HIRAI et al., 2010; TSUKUDA et al., 2006; SHEE e SHARMA, 2007).

Apesar de desempenharem a mesma função de defesa de plantas, dentro da superfamília de Kunitz possuem grande divergências evolutivas (TSUKUDA et al., 2006; GAHLOTH et al., 2010), entretanto, os inibidores do tipo Kunitz mais típicos, inclusive os inibidores de tripsina de soja, são caracterizados como oriundo da família Leguminosae (OLIVA et al., 2010). Este fato só edifica a teoria de que as proteínas da superfamília de STI do tipo Kunitz evoluíram de tal maneira, que cada família possui um tipo diferente de defesa contra agentes patogênicos e predadores (SELVAKUMAR et al., 2011).

### **3.1.3 Aplicações biotecnológicas de proteínas miraculinas**

#### **3.1.3.1 Quanto à atividade de modificação de sabor**

Em meados do século 19, os povos indígenas nativos da África Ocidental usavam o fruto-do-milagre para melhorar o gosto de alguns alimentos e bebidas de fabricação artesanal, para melhorar o sabor e suprimir amargura.

Também com esse potencial de modificação de sabor, a miraculina tem sido utilizada como adoçante, intensificadora de sabor, suplementos, forragem para animais e na indústria alimentícia (JIN-SUN et al., 2006; DANILOVA e HELLEKANT, 2006).

A proteína miraculina pode ser utilizada em bebidas à base de fermentação, como vinhos. Também pode ser usada em bebidas à base de carboidratos como refrigerantes e tônicos; como moderadores do sabor amargo em produtos à base de leite como queijos, iogurtes (HOLLOWAY et al., 1996).

No mercado da confeitaria, devido ao seu baixo potencial calórico. A miraculina pode apresentar a propriedade de dar aroma e mascarar o gosto amargo em frutas, verduras e saladas verdes como, couve, espinafre. Ainda pode atuar no mercado farmacêutico, como xaropes, revestimento de pílulas, adoçantes e aromatizantes (HOLLOWAY et al, 1996).

Açúcares e adoçantes são ingredientes essenciais no processamento de alimentos saborosos. Nos dias atuais, a procura por alimentos que contenham adoçantes de baixas calorias só tende a crescer (FAUS, 2000). Aspartame, sacarina, ciclamato e acesulfame K são adoçantes artificiais de baixa caloria, com uso bem difundido, para pacientes com doenças relacionados ao consumo exagerado de açúcar, como diabetes, hiperlipidemia, obesidade, cáries. Mas assim como possui baixa quantidade de caloria, possuem efeitos colaterais comprovados, como distúrbios mentais, problemas psicológicos, distúrbios mentais, câncer da bexiga, insuficiência cardíaca e até tumores cerebrais (KANT, 2005).

Para substituir o uso de adoçantes artificiais, uma nova classe de adoçantes de proteínas de sabor doce e de modificação de sabor (como é o caso da miraculina), encontradas em plantas, pode ser uma forte ferramenta para a diminuição da ingestão calórica, agindo como adoçantes naturais de baixa caloria e não desencadeia uma alta demanda de insulina, as interações com os receptores de sabores são específicas e fortes (WITTY, 1998; JIN-SUN et al., 2006; HIRAI et al., 2011; NJOKU et al., 2015).

Outra aplicação da atividade de modificação de sabor de miraculinas tem sido relatada para pacientes com câncer. Devido a tratamentos de quimioterapias, os pacientes com câncer relataram com frequência alterações no paladar, como gosto amargo ou metálico na boca, perda de apetite,

desnutrição, percepção olfativa, depressão e perda da qualidade de vida e até diminuição da resposta ao tratamento (COMEAU, EPSTEIN, MIGAS, 2001; BERTERETCHE et al, 2004; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Nos Estados Unidos, segundo WILKEN e SATIROFF (2012), um estudo foi realizado para verificar o uso da miraculina na melhora da disgeusia em pacientes que estavam sob o tratamento de quimioterapia. Oito pacientes que participaram do estudo, que haviam recebido pelo menos três doses de quimioterapia e relataram alterações no paladar. Ao final do estudo, todas as alterações de sabor relatadas pelos pacientes anteriormente melhoraram com o consumo do fruto-do-milagre, o gosto metálico, por exemplo, segundo os pacientes, tinha desaparecido por completo, após a ingestão da fruta.

Portanto, miraculinas possuem um grande potencial como uma alternativa para adoçantes de baixo teor calóricos que possam ser adquiridos e usados por pacientes de doenças relacionados ao consumo excessivo de açúcar e pacientes em tratamento de cânceres, bem como na tecnologia de alimentos e bebidas.

### 3.1.3.2 Quanto à atividade de inibidor de protease

A importância da função de inibidor de proteinase das miraculinas está em sua potencial aplicação como bioinseticida, visto que muitos insetos são famosos por causarem problemas na agricultura e na saúde humana, tanto como pragas na agricultura quanto como vetores de vírus em vegetais, animais e humanos. Inibidores da superfamília STI do tipo Kunitz representam uma das ferramentas mais importantes em relação ao mecanismo de defesa das plantas. Essas proteínas têm a capacidade de inibir a atividade enzimática das proteases digestivas contra pragas e patógenos, assim como a maioria das MLPs (RYAN, 1990; TSUKUDA et al., 2006; SELVAKUMAR, et al., 2011).

Um estudo demonstrou o efeito biocida *in vitro* e *in vivo* da proteína do tipo miraculina de *Murraya koenigii* (MKMLP) sobre dois insetos causadores de pragas da ordem lepidoptera, o *Helicoverpa armigera* e o *Spodoptera litura*. A MKMLP é um inibidor de protease, que age como um potente inibidor de proteases intestinais (GAHLOTH et al., 2011). O uso de 25 a 200 mM de MKMLP na dieta dos insetos *Helicoverpa armigera* e em *Spodoptera litura*

revelou que proteína inibe enzimas dos intestinos de ambos os insetos, atividade que é semelhante a ação da tripsina, causando efeito contrário ao crescimento e desenvolvimento, pela diminuição do peso larval. Por outro lado, a atividade biocida *in vivo* da MKMLP contra *H. armigera* e *S. litura* levou a efeito deletério proporcional a dose em adultos oriundos das larvas alimentadas, os quais apresentaram fertilidade e fecundidade comprometidas, enquanto que a ingestão da MKMLP no estado larval dos insetos causou anomalias no desenvolvimento (GAHLOTH et al, 2011).

A expressão de proteínas miraculinas em tomate (BRENNER et al., 1998), limão rugoso (TSUKUDA et al., 2006) e café (MONDENGO et al., 2011) levaram estas plantas a aumentada função de defesa contra patógenos, predadores e ao estresse ambiental (TAKAI et al., 2013), sendo que MLPs encontradas nas folhas do limão rugoso apresentaram atividade de inibidor de tripsina (TSUKUDA et al., 2006).

Uma vez comprovada a atividade bioinseticida de proteínas miraculinas, estas representam candidatos potencialmente relevantes para utilização em estratégias biotecnológicas para solucionar problemas na agricultura e saúde humana. Na agricultura, uma das maiores dificuldades dos pequenos e grandes produtores rurais em todo o mundo são as pragas, que se alastram pelas lavouras causando um alto prejuízo financeiro. Essas pragas podem ser causadas por vírus, bactérias, insetos, fungos, vegetais e pequenos vermes. Dentre as principais pragas da agricultura brasileira estão: *Helicoverpa armigera* e broca do café, mosca branca e bicudo do algodoeiro (BRASIL, 2015). Outro exemplo relevante é o piolho-grande-da-ervilha, cujo nome científico é *Acyrtosiphon pisum*, um afídeo que constitui uma praga que ataca plantas agrícolas, entre elas diversas leguminosas, reduzindo substancialmente a sua produtividade através de danos diretos pela alimentação, sugando a seiva dos vasos do floema, como também pela vetorização de alguns vírus, gerando perdas de colheitas anuais em todo o mundo, estimada milhões de dólares (BLACKMAN E EASTOP, 2000; EISEN, 2010).

Em relação à saúde humana, as pragas atuam por meio de insetos e pequenos animais como baratas, pernilongos, moscas, formigas, ratos entre outros. Uma doença viral bem conhecida causada por pragas urbanas é a dengue, transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* que é um vetor viral

(BRAGA E VALLE, 2007). A dengue, isoladamente, é uma doença que preocupa os órgãos de saúde do Brasil, pois está presente em praticamente 100% do território nacional. Atualmente, com a chegada de duas novas doenças transmitidas pelo mesmo vetor, o *Aedes aegypti*, a preocupação se redobra. Essas doenças são a Chikungunya e a Zika. Apesar de possuírem o vetor em comum, os vírus são distintos (CHAVES et al., 2014).

Métodos para o controle de pragas, doenças e inços nas lavouras foram desenvolvidos e evoluindo com o passar dos anos. Existem métodos mecânicos, físicos ou culturais, como, por exemplo, o tratamento térmico, capina ou roçagem de ervas daninhas, cultivo em ambientes protegidos (casas de vegetação, estufas); o melhoramento genético de plantas em busca de resistência a pragas ou doenças através de e técnicas de manipulação genética; e também o tratamento químico de plantas que consiste na utilização de inseticidas é o mais difundido, porém são prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. O controle biológico de pragas consiste na utilização de organismos que atuam como inimigos naturais daqueles considerados pragas das lavouras, no controle de sua população tem surgido como um método alternativo (PEREIRA, 2013).

Além desses, o uso de proteínas que interferem com o sistema digestivo de insetos tem sido bem-sucedido como uma estratégia da engenharia genética de plantas para resistência a inseto- praga da agricultura, por meio de plantas transgênicas através do *Bacillus thuringiensis*, como algodão (PERLAK et al., 1991), milho (USDA, 2008), tomate (MANDAOKAR et al., 2000), assim como plantas transgênicas com inibidor de proteinase (MACEDO et al., 2007).

Com o avanço cada vez mais rápido da ciência, a biotecnologia vegetal usa ferramentas para desenvolver plantas resistentes a determinadas pragas de insetos. Essa ferramenta envolve a expressão de inibidores de proteases contra enzimas presentes nos intestinos dos insetos que afetam as determinadas plantações. Os inibidores de proteases são acionados quando ocorrem ferimentos ou ataque ao tecido das plantas, a função deles é retardar o crescimento e o desenvolvimento de pragas de insetos, que foram previamente alimentados com dietas que incluam inibidores (SCHALLER e RYAN, 1995; BHATTACHARYA et al., 2007; POMPERMAYER et al., 2001; GAHLOTH et al., 2011).

## 3.2 IMPORTÂNCIA DE ESTUDAR MIRACULINAS DOS CITROS

### 3.2.1 Origem e aspectos gerais

O gênero *Citrus* inclui algumas das mais importantes árvores frutíferas cultivadas no mundo todo (CABALLERO et al., 2015). São plantas cítricas dicotiledôneas, pertencem à família biológica Rutaceae. Entretanto o sistema de classificação mais usual reconhece 16 espécies (SWINGLE e REECE, 1967; NICOLOSI, 2007; BRUGNARA, 2008).

Os citros são representados, por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces, como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (MATTOS JUNIOR et al, 2005).

As laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) estão entre as frutas cítricas de maior importância comercial, em países que praticam a citricultura, esse fruto corresponde a dois terços de todo o plantio. No Brasil, as principais cultivares das laranjas doces são 'Pêra', 'Valência', 'Natal' e 'Hamilin' (FÁVERO, 2010).

Devido à grande importância da citricultura, estudos genômicos de várias espécies classificadas como citros têm disponibilizado milhares de sequências gênicas funções precisam ser determinadas ou confirmadas, visando aplicações biotecnológicas. Como parte destes estudos, sequências da espécie *C. sinensis* encontram-se disponíveis nos bancos de dados *C. sinensis* Annotation Project (CAP Database), da China, disponível em <http://citrus.hzau.edu.cn/orange>; e pelo genoma funcional e comparativo dos citros (CitEST Database), realizado pelo Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis SP, Brasil, acessível mediante senha autorizada por colaboração em pesquisas em <http://biotecnologia.centrodecitricultura.br>.

Dentre os genes de *C. sinensis* de relevante interesse para aplicações biotecnologias estão os genes do tipo miraculina, pois apresentam potencial bioinseticida para incorporação em culturas resistentes a pragas; na indústria

de processamento de alimentos como intensificadores de sabor, na indústria farmacêutica e na melhora do paladar de pacientes em tratamento de quimioterapia (SUN et al., 2006; BACHCHU et al., 2011; WILKEN e SATIROFF, 2012). Por esta razão, a busca por novas proteínas do tipo miraculinas tem sido intensificada por pesquisadores do mundo inteiro. Portanto, estudar miraculinas de citros representa uma fonte alternativa para a prospecção de proteínas miraculinas em plantas mais acessíveis do que a fruta-do-milagre e ainda pode trazer avanços científicos com potencial para aplicação na própria citricultura, entre outras.

Neste sentido, Souza (2015) recentemente identificou e caracterizou 04 genes do tipo miraculina a partir do genoma de *C. sinensis* que foram idênticos nas cultivares “Valência” (CAP Database) e “Pêra” (CitEST Database), usando as informações dos citados bancos de dados de citros. Entretanto, devido à referida duplicidade de funções de membros da superfamília de miraculinas, enquanto modificadora de sabor doce ou inibidora de proteinase, se faz necessária uma caracterização molecular estrutural mais detalhada que possa contribuir para apontar as respectivas funções das novas miraculinas.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE ESTRUTURAS DE PROTEÍNAS

A realização de estudos sobre funções de proteínas está embasada no conhecimento dos constituintes e estruturas dessas biomoléculas. As proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, cuja ordem é determinada pela sequência dos seus genes, as quais são sintetizadas a partir dos RNAs mensageiros (VERLI, 2014). São longos polímeros com uma cadeia principal e uma cadeia lateral, são as cadeias laterais que conferem à proteína as características funcionais (LESK, 2008). Com relação as suas funções, existem proteínas estruturais, proteínas que catalisam reações químicas, proteínas de transporte e armazenamento, proteínas reguladoras e proteínas que controlam a transcrição gênica (LESK, 2008).

Cada proteína possui uma estrutura tridimensional (3D) que é diretamente ligada à sua função específica. Essas estruturas são estáveis pela ação de múltiplas interações fracas como, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, interações iônicas e ligações covalentes (LEHNINGER, 2006).

As estruturas das proteínas possuem uma natureza hierárquica em relação a suas arquiteturas: a princípio está a sequência de aminoácidos que em conjunto com ligações químicas primárias formam a estrutura primária; a presença de conformações hélices e folhas com pontes de hidrogênios da cadeia principal caracteriza a estrutura secundária; o agrupamento e as interações das folhas e das hélices dão origem a estrutura terciária (LINDERSTROM-LANG, 1952). Em 1958, BERNAL descreveu pela primeira vez as proteínas com estruturas quaternárias como as que possuem mais de uma subunidade (VOET, VOET, PRATT, 2008).

O primeiro nível organizacional das proteínas encontra na estrutura primária, que se trata de uma sequência de letras que representa uma determinada informação de aminoácidos em uma única dimensão da sua cadeia polipeptídica, essa estrutura primária apresenta-se na forma de monômeros e mostra informações sobre a forma nativa e suas funções (VERLI, 2014).

A estrutura secundária é o arranjo regular dos resíduos dos resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica, onde cada resíduo está



especialmente relacionado aos seus vizinhos de forma idêntica. As proteínas com estruturas secundárias incluem padrões regulares de dobramento de polipeptídios, como alças de várias conformações diferentes, as principais são  $\alpha$ -hélice, folhas  $\beta$  e voltas, o que garante a estrutura certa flexibilidade (LEHNINGER, 2006; VERLI, 2014).

A  $\alpha$ -hélice possui um padrão de ligações de hidrogênio é orientada para a direita e possui aproximadamente 4 resíduos por volta e um passo de 5,4 Å. Nas folhas  $\beta$  as pontes de hidrogênios ocorrem entre as cadeias polipeptídicas vizinhas, quanto a isso elas possuem duas variações: as folhas  $\beta$  paralelas que são cadeias polipeptídicas vizinhas unidas por ligações de hidrogênio que se estendem na mesma direção; as folhas  $\beta$  antiparalelas seguem em direções opostas (VOET, VOET, PRATT, 2008).

O terceiro nível organizacional das proteínas é o arranjo tridimensional de todos os átomos de uma proteína. Trata-se do dobramento das estruturas secundárias montadas e organizadas em um espaço tridimensional. A estrutura secundária passa por um processo de enovelamento ou dobramento (*fold*ing), onde existem forças que convergem para que a molécula assuma uma conformação mais estável, assim exercendo a função biológica. O enovelamento envolve a aproximação de resíduos hidrofóbicos, que ocasiona a expulsão à água na região central da proteína (VERLI, 2014). As proteínas com estrutura 3D podem assumir duas formas: a fibrosa, como, por exemplo, a queratina e o colágeno; e a globular, onde o dobramento gera uma estrutura bem compacta (PRODOSCIMI, 2007). Além disso, algumas proteínas podem ter suas estruturas terciárias ligadas formando homo- ou heterodímeros, trímeros ou tetrâmeros funcionais.

A estrutura quaternária é o último nível organizacional das proteínas, porém nem todas as proteínas apresentam essa conformação. A estrutura quaternária é composta de principalmente agregadores macromoleculares, assumindo a forma oligomérica (VERLI, 2014). São proteínas com massas moleculares superiores a 100 kD, constituído por mais de uma cadeia polipeptídica, que se arranjam-se de forma espacial específica (VOET, VOET, PRATT, 2008). Nesse estado de conformação, se houver perda da estrutura, podendo ser ocasionado por altas temperaturas e extremos pH, pode ocorrer a perda da função biológica (PRODOSCIMI, 2007).

A estrutura nativa funcional de uma proteína é estável sob condições fisiológicas, com estrutura flexível e movimentos específicos; apresentando baixa energia livre (CAPRILES et al., 2014). As estruturas de proteínas têm sido estudadas por métodos experimentais (ou *in vitro*) e por métodos computacionais (ou *in silico*), os quais podem determinar não apenas suas estruturas, mas também suas funções.

### 3.3.1 Estudos experimentais de estruturas de proteínas

Existem duas técnicas bastante difundidas usadas para a determinação experimental da estrutura tridimensional das proteínas que são a cristalografia por raios X e a ressonância magnética nuclear (CAPRILES et al., 2014).

A técnica de cristalografia por difração de raio X é uma técnica que gera a imagem de uma molécula, baseia-se na produção nativa em seu local de origem ou heteróloga; purificação por cromatografias; cristalização por difração de raio X, coleta e processamento dos dados e refinamento da estrutura. Já a técnica de ressonância magnética nuclear requer o conhecimento prévio da sequência de aminoácidos, a proteína não precisa ser cristalizada, a estrutura pode estar no estado de solução, porém requer grandes concentrações, é um processo para proteínas de pequenos a médio comprimento. Ela produz estruturas corretas, porém não tão precisas (BAIROCH et al., 2004; VOET, VOET, PRATT, 2008; LESK, 2008; CAPRILES et al., 2014).

Os modelos experimentais são depositados em bancos de dados acurados, como o *Protein data Bank* (PDB), o principal banco de dados do mundo que armazena estruturas de macromoléculas, que podem ser proteínas, ácidos nucleicos, vírus ou carboidratos, sendo referência em bioinformática estrutural, com relação a armazenagem, análise e visualização da informação ao nível atômico (PRODOSCIMI, 2007; PACHECO, 2009). No PDB, cada estrutura é registrada com um identificador exclusivo com quatro caracteres (VOET, VOET, PRATT, 2008). Nos dias atuais, o PDB comporta em torno de 76 mil estruturas depositadas, sendo 36 mil proteínas distintas, 30 mil sequências e humanos e 8 mil estruturas de ácidos nucleicos (PROTEIN DATA BANK, 2016).

Como alternativa ao alto custo das técnicas de ressonância e a cristalografia, além da demora em obter as estruturas, a predição de estruturas tridimensionais por métodos computacionais tornou-se uma boa alternativa e em alguns casos o único meio de obtenção da estrutura 3D.

### **3.3.2 Estudos computacionais de estruturas de proteínas**

Bioinformática é uma disciplina que se trata das crescentes informações relacionadas a sequências e estruturas moleculares. A bioinformática estrutural é a subdivisão que está relacionada com a representação de estruturas de macromoléculas e a comparação entre elas (VOET, VOET, PRATT, 2008).

É uma área da pesquisa científica que estuda interação da biologia com a informática, tendo como ferramenta, os computadores conectados ou não em rede, para auxiliar no armazenamento de dados e de novas descobertas ligadas ao campo da biologia. Devido a interdisciplinaridade envolve a matemática, computação, estatística, engenharia de softwares, biologia molecular, física, química, medicina, agronomia, entre outros (PRODOSCIMI et al., 2007; PACHECO, 2009).

Essa recente ramificação da ciência demonstra as funções gênicas e realiza as análises computacionais de sequências de DNA, RNA e proteínas (ALVES, 2013). Na era pós-genômica, a bioinformática tem ganhado cada vez mais espaço e um dos principais objetivos é entender a estrutura e funções das proteínas e enzimas; mecanismo de ação das proteínas em processos celulares; estudos científicos envolvendo genômica, transcriptômica e proteômica (LIFSCHITZ, 2006; KUNDROTAS, ALEXOV, 2006; PACHECO, 2009).

Ferramentas da bioinformática criam modelos de sistemas, baseados em proteínas-alvo, por uma área chamada de Modelagem Molecular. Já visando entender em nível molecular os mecanismos de reconhecimento e a interação entre as proteínas e as células, diferentes técnicas computacionais têm sido desenvolvidas, incluindo o Docking Molecular.

### 3.3.2.1 Modelagem molecular

A Modelagem Molecular é uma ramificação da Bioinformática, que estuda a predição da estrutura e da energia de um sistema molecular e suas variações dependentes das reações químicas (SANT'ANNA et al., 1995). A IUPAC define a Modelagem molecular como um processo de investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (CARVALHO, 2003).

Os métodos de modelagem molecular disponíveis na atualidade são *ab initio*, “*threading*” e modelagem por homologia ou comparativa (DORN, 2008; CAPRILES et al., 2014). A modelagem *ab initio* também chamada de predição por primeiros princípios tenta predizer a forma nativa de uma proteína, apenas a partir da sua sequência de aminoácidos. Conduz uma busca conformacional sob a orientação de energias, gerando múltiplas conformações possíveis de onde os modelos finais são selecionados, independentes de estruturas moldes (NICOLAU JUNIOR, 2013; CAPRILES et al., 2014). São calculadas as energias envolvidas no processo de enovelamento, baseada em hipóteses termodinâmicas na qual indica a estrutura com menor energia global livre (MURZIN et al., 1995). Esse método pode ser empregado para predição de estruturas, nas quais não se sabe detalhes de sua estrutura (OSGUTHORPE, 2000).

A modelagem do tipo *Threading* ou predição por enovelamento é uma metodologia que consiste na entrada de uma sequência de aminoácidos, sem estruturas caracterizadas, a partir da mesma um modelo é computado baseado em um banco existente, ou seja, é um método baseado em estruturas com moldes (*Template based*) (MURZIN et al., 1995; CAPRILES et al., 2014). Esta metodologia é frequentemente usada com intuito de descobrir homologias remotas que não podem ser descobertas por alinhamento de sequências padrão (GIBAS; JAMBECK, 2001).

### 3.3.2.1.1 Modelagem por homologia

A modelagem por homologia ou modelagem comparativa é feita através da sobreposição de uma proteína com a estrutura tridimensional previamente determinada experimentalmente e depositada no banco de dados PDB, que tenha uma alta similaridade, para que a modelagem *in silico* seja o mais próximo do real possível. É um método baseado em estruturas moldes (*Template based*). (MENETTI, 2006).

A modelagem por essa técnica é realizada utilizando uma proteína de interesse como molde, para obter a estrutura tridimensional de outra proteína, através de estruturas experimentalmente resolvidas de um banco de dados, como o PDB, que tenha uma identidade acima de 25% com a proteína a ser modelada. A escolha da proteína-molde (*template*) irá depender da identidade, similaridade e da resolução estrutural (DORN, 2008).

É o método mais empregado e possui cinco etapas: identificação de referências, ou seja, identificar as sequências que serão utilizadas como molde; seleção dos moldes; caso ocorra de selecionar mais de uma sequência, realiza-se o alinhamento das sequências; criação do modelo e a validação do modelo. Apesar de ser o método mais empregado, esse processo também possui limitações: nem sempre se encontra uma proteína molde; se o grau de similaridade for inferior a 30%, fica inviável o uso dessa técnica e baixa qualidade dos modelos criados (CAPRILES et al., 2014).

Predizer novas estruturas tridimensionais de proteínas, com base nas informações contidas nos genes específicos que são traduzidos em uma estrutura tridimensional, é uma atividade muito importante, pois pode garantir para a proteína uma aplicação prática com finalidade terapêutica e biotecnológica (CAPRILES et al., 2014).

### 3.3.2.2 Docking molecular

O *docking* molecular é uma técnica que visa a predição da interação entre uma proteína que funciona como receptor e seu ligante por meio de simulações computacionais otimizadas, buscando a melhor orientação do

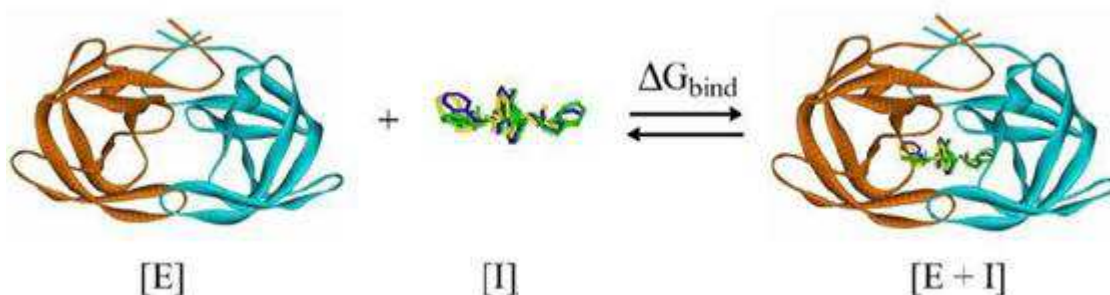
complexo proteína-ligante, proporcionando uma maior compreensão da função das enzimas (MORRIS et al., 1998).

*Docking* molecular, atracamento ou ancoramento molecular é técnica da modelagem molecular, que prediz a possíveis interações entre as moléculas, onde uma se liga preferencialmente a uma segunda molécula. Nos processos fisiológicos, as interações de moléculas podem ocorrer entre proteínas, carboidratos ou macromoléculas ou macromoléculas e uma proteína ligante, podem atuar como agonista/antagonista ou substrato/inibidor (FELTRIN et al., 2010; GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

Após a obtenção do modelo tridimensional de uma proteína, com a energia minimizada, um modelo para simular a interação com um ligante é criado, esse processo é denominado de acoplamento molecular. Essa técnica é usada para prever o modo de ligação e os detalhes da interação molecular proteína-proteína e receptor-ligante (EKINS, 2004; HILLISCH, et al., 2004; PACHECO, 2009; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

O *docking* envolve a busca de modos de interações entre duas moléculas, como, por exemplo, interações proteína-proteína, proteína-ligante ou proteína-DNA. Emil Fischer, em 1894, propôs que o *docking* proteína-ligante estava baseado no modelo chave-fechadura, onde a proteína desempenha o papel da fechadura e o ligante representa o papel da chave (Figura 1).

Figura 1. Técnica computacional de *Docking* molecular



Fonte: <http://dlab.cl/wp-content/uploads/2010/07/Docking-DeltaG.jpg?0cf197>.

Durante o processo de interação, o ligante e a proteína tentam encaixar-se da melhor conformação possível, sendo chamado assim de encaixe induzido, onde o ligante a proteína se adaptam um ao outro durante o processo

de reconhecimento molecular. As interações intermoleculares envolvidas nesse tipo de ancoramento incluem: ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, iônicas e hidrofóbicas (FELTRIN et al., 2010; GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014; BATISTA, 2015).

As características entre as proteínas e os ligantes possuem uma alta porcentagem de suas superfícies de contato moleculares; alta complementaridade de propriedades associadas a superfície de contato moleculares; o ligante possuem uma conformação favorável de ligação e as interações de repulsão entre o ligante e a proteína são minimizadas (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

Os ligantes são moléculas que interagem no sítio de ligação de uma macromolécula para formar um complexo, que induza ou bloqueie a determinada resposta biológica, que podem ser proteínas ou um carboidrato. O receptor é uma macromolécula que possui um sítio de ligação de interesse, que comumente é uma proteína (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho dá continuidade a um trabalho anterior do grupo de pesquisa Biotecnologia aplicada ao semiárido do Laboratório de Biotecnologia (LBiotec) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no Centro de Educação e Saúde (CES), Campus Cuité – PB.

### 4.1 Identificação das proteínas miraculinas

Duas miraculinas de *Citrus sinensis* estudadas nesse trabalho foram caracterizadas por SOUZA (2015), a partir sequências de gênicas identificadas a partir de buscas nos bancos de dados *Citrus sinensis Annotation Project* (CAP) e no *Citrus Expressed Sequence Tags* (CitEST). De acordo com SOUZA (2015), as proteínas selecionadas, nomeadas como CsMir1 e CsMir4, apresentam 185 e 195 aminoácidos de comprimento; com massa molecular de 20,39 e 21,27kDa; e pH teórico apresenta-se ácido, respectivamente. As sequências de aminoácidos madura deduzidas para CsMir1 e CsMir4 estão indicadas nas Figuras 2 e 3 (SOUZA, 2015).

Figura. 2. Sequência de aminoácidos da proteína CsMir1.

```
QLGTSESEPVLDVYGKVESNLEYKLEVKNGTSGGFSIHGGTSGECPLDVVQLSSPTERDHYVRLLPFD
NSTVVRESTDNLNLIIEPVWTVGNYNDSLKWFLLTGGIIGHPGAKTLLNWFKLEKVSVSIYNLVHCPVCD
SCVKLCNKVGIIFYVDGVRRLVLRDDDDQPLRLVLFPAFPNPSRSSM
```

Fonte: Bancos de dados de citros CitEST e CAP

Figura. 3. Sequência de aminoácidos da proteína CsMir4.

```
PEPLLDVNGNKVESTLQYYIVSAIWGAGGGVSLHGGRNGYCPDVDIQLPSDMQNGIKLTLSPYNNSTIV
RESTDNLNLRFSVLLSGRDCCNEQPLWKVDNYDAASGKWFITGGLDGHPGAETLLNWFKLEKIGNFPGTY
KIVHCPVCECSCVKLCNNVGRSFEDGVRRLVLRDDEPAFPVVLIPATERSTSV
```

Fonte: Bancos de dados de citros CitEST e CAP



## 4.2 Modelagem e validação de formas monoméricas e diméricas de CsMir1 e CsMir4

### 4.2.1 Construção de modelos monoméricos

Para a construção dos modelos tridimensionais das proteínas miraculinas CsMir1 e CsMir4 foi usada a técnica da modelagem molecular por homologia, que se baseia na similaridade sequencial e estrutural entre proteínas homólogas (GIBAS; JAMBERCK, 2001).

Para identificar os moldes homólogos (*templates*), as sequências de aminoácidos das proteínas CsMir1 e CsMir4 madura foram submetidas a alinhamentos no *Basic Local Alignment Search Tool*, usando a *Protein Query* (BLASTp), disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que realizou uma busca contra a base de dados PDB (ALTSCHUL et al., 1990). Após as análises dos *outputs*, foram escolhidos os *templates*. Assim, os modelos para CsMir1 e CsMir4 foram construídos tendo como *templates* as estruturas 3ZC8 e 3IIR, apresentando 46% e 59.36% de identidade, respectivamente, utilizando o servidor automático SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) (ARNOLD et al., 2006) e a ferramenta *Automated mode*. A visualização do modelo foi realizada através do programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPFREY et al., 1996).

O software DiANNA 1.1 web server, disponível em <http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>, foi utilizado para calcular as cisteínas envolvidas nas pontes dissulfetos presentes em proteínas, fornecendo apenas as sequências de aminoácidos (FERRE e CLOTE, 2006).

Após as construções dos modelos tridimensionais das proteínas, a qualidade local foi analisada através dos campos de forças: *Atomic Non-Local Environment Assessment* (ANOLEA) (MELO; FEYTMANS, 1998), *QMEAN* (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011) e *Groningen Molecular Simulation* (GROMOS) (GUNSTEREN e BERENDSEN, 1987).

A qualidade global das proteínas foi avaliada pelo *QMEAN6* (BENKERT et al., 2008). A qualidade estereoquímica foi acessada pelo diagrama de Ramachandran, que indica a distribuição dos ângulos de torção (Phi e Psi) dos

resíduos da estrutura com uma qualidade superior a 90%, que foi obtido através do *PROCHECK* (LASKOWSKI et al., 1994). Os refinamentos das estruturas dos modelos foram realizados pelo servidor GalaxyWEB, através da ferramenta *refine* (KO et al, 2012).

#### 4.2.2 Construção de modelos diméricos

Os modelos dos dímeros para CsMir1 e CsMir4 foram construídos utilizando o servidor automático GalaxyWEB através da ferramenta GalaxyGemini (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=GEMINI>) (KO et al., 2012; SHIN et al., 2014), através da junção das subunidades monoméricas que foram modeladas anteriormente. A visualização do modelo foi realizada através do servidor *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPFREY et al., 1996). Os modelos dos dímeros também tiveram as qualidades estruturais, globais e estereoquímicas.

### 4.3 Predição de sítios ativos

As regiões potencialmente interativas de todas as proteínas estudadas neste trabalho foram determinadas a partir dos modelos criados e analisadas através do servidor Ghecom (<http://strcomp.protein.osaka-u.ac.jp/ghecom/>) (KAWABATA, 2010). Este servidor detecta cavidades na superfície da estrutura proteica através de cálculos matemáticos da morfologia molecular. O *output* gera cinco possíveis clusters, sendo o cluster1 o mais provável a ser o sítio de ligação da proteína.

### 4.4 Simulação da interação dos monômeros das miraculina com uma tripsina de inseto

Para estudar a atividade de inibidor de tripsina do tipo Kunitz, a tripsina do tipo Kunitz de um inseto chamado *Acyrtosiphon pisum*, também conhecido como piolho-grande-da-ervilha, foi selecionada ao acaso no GenBank/NCBI identificada com o código de acesso XP\_008187031. A sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene foi analisada quanto à presença de

peptídeo sinal N-terminal usando o Programa SignalP, versão 3.0 (BENDTSEN et al., 2004) a tripsina madura do inseto foi obtida depois da retirada do, em seguida, modelada pelo servidor Galaxy Web, através da ferramenta TBM (*template based modeling*), na versão *veryslow* (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=TBM>) (KO et al., 2012; SHIN et al., 2014), usando a estrutura 2JKH.pdb como molde, que apresentou 37% de identidade.

O experimento de *docking* molecular foi realizado usando a tripsina de *A. pisum* recém-modelada como receptor e os monômeros das proteínas CsMir1 e CsMir4, como moléculas ligantes. As proteínas foram submetidas ao servidor ClusPro (<http://cluspro.bu.edu/home.php>) (COMEAU et al., 2004) para obtenção dos complexos. O melhor complexo do *ranking* (cluster1) foi submetido à ferramenta *HSPred* (*Protein-protein hotspot residue prediction*) do servidor (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/structure>) (MORROW, 2012) para identificação dos resíduos que participavam da interface proteína-proteína. As análises visuais foram feitas no VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (HUMPHREY, DALKE, SHULTEN, 1996).

#### **4.5 Simulação da interação de dímeros miraculinas-receptor de sabor doce**

Para estudar a atividade de modificação de sabor das miraculinas CsMir1 e CsMir4, um modelo heterodimérico do receptor de sabor doce T1R2-T1R3 de rato (*M. musculus*), denominado de mT1R2-T1R3, foi construído utilizando a ferramenta *SWISS-MODEL* do ExPasy no modo oligomérica e o molde 2E41, disponível no PDB, que apresentou 31,87% e 27,92% de identidade para T1R2 e T1R3, respectivamente.

Para simular a interação receptor-miraculinas, o *docking* molecular foi realizado usando o modelo do receptor heterodimérico mT1R2-T1R3 e os homodímeros das proteínas CsMir1 e CsMir4, como ligantes. As proteínas foram submetidas ao servidor ClusPro (<http://cluspro.bu.edu/home.php>) (COMEAU et al., 2004) para obtenção dos complexos. O melhor complexo do *ranking* (cluster1) foi submetido à ferramenta *HSPred* (*Protein-protein hotspot residue prediction*) do servidor (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/structure>) (MORROW, 2012) para identificação dos resíduos que participavam da interface proteína-

proteína. As análises visuais foram feitas no VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (HUMPHREY, DALKE, SHULTEN, 1996). A identificação de domínios transmembrana foi através do servidor TMHMM Server, versão 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph-sw\\_request?tmhmm](http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph-sw_request?tmhmm)).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

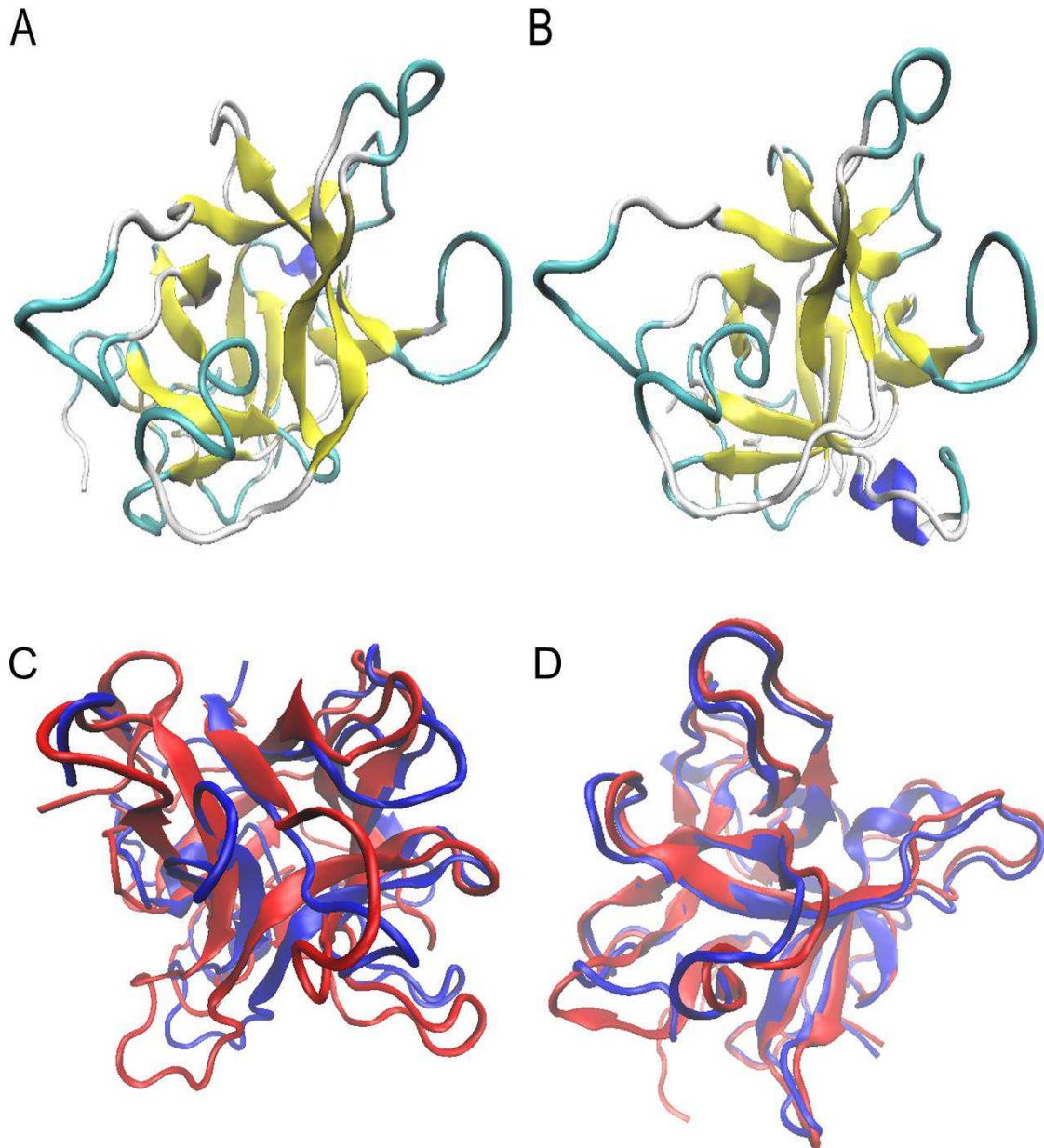
Este trabalho descreve pela primeira vez a caracterização estrutural e funcional comparativa de duas miraculinas de *Citrus sinensis*, identificadas como CsMir1 e CsMir4, por meio de ferramentas de modelagem e *docking* molecular.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS MIRACULINAS CsMir1 e CsMir4

#### 5.1.1 Determinação dos modelos tridimensionais dos monômeros das miraculinas

Os modelos tridimensionais *in silico* para as proteínas CsMir1 e CsMir4 foram propostos usando a estratégia de modelagem comparativa, por meio do servidor *SWISS-MODEL* (ARNOLD et al., 2006). Os monômeros foram construídos de acordo com os moldes de maiores similaridades encontrados no PDB, o molde 3ZC8 com 46% de identidade e 3IIR com 59.36% de identidade para CsMir1 e CsMir4 respectivamente. Ambas as proteínas apresentaram a característica típica dos inibidores que é a presença de 12 folhas- $\beta$  antiparalelas ligadas por alças (Figura 4). Entretanto, enquanto a CsMir4 apresenta apenas 01 estrutura  $\alpha$ -3<sub>10</sub> curta, representada na Figura 4B em roxo, CsMir1 possui 02 estruturas  $\alpha$ -3<sub>10</sub> (Figura 4A). As sobreposições das proteínas com seus moldes foram essenciais para demonstrar as qualidades globais e as estabilidades das estruturas (Figura 4C e D).

Figura 4. Estruturas 3D das proteínas CsMir1 (A) e CsMir4 (B) construídas por meio de modelagem molecular por homologia. As estruturas secundárias estão representadas são alfas  $3_{10}$  (em azul), folhas  $\beta$  (em amarelo) e alças (em ciano). Em C e D estão indicadas as sobreposições das miraculinas CsMir1 e CsMir4, respectivamente (em azul), com os moldes 3ZC8 e 3IIR, respectivamente (em vermelho).



Fonte: Dados da Pesquisa

A presença de estruturas secundárias do tipo  $\beta$  conservadas e a pouca frequência ou nenhuma presença de estruturas helicoidais são característicos da família de inibidores de tripsina do tipo Kunitz (ITO et al., 2007; GAHLOTH et al., 2010). Neste sentido, a miraculina CsMir1 apresentou mais estruturas

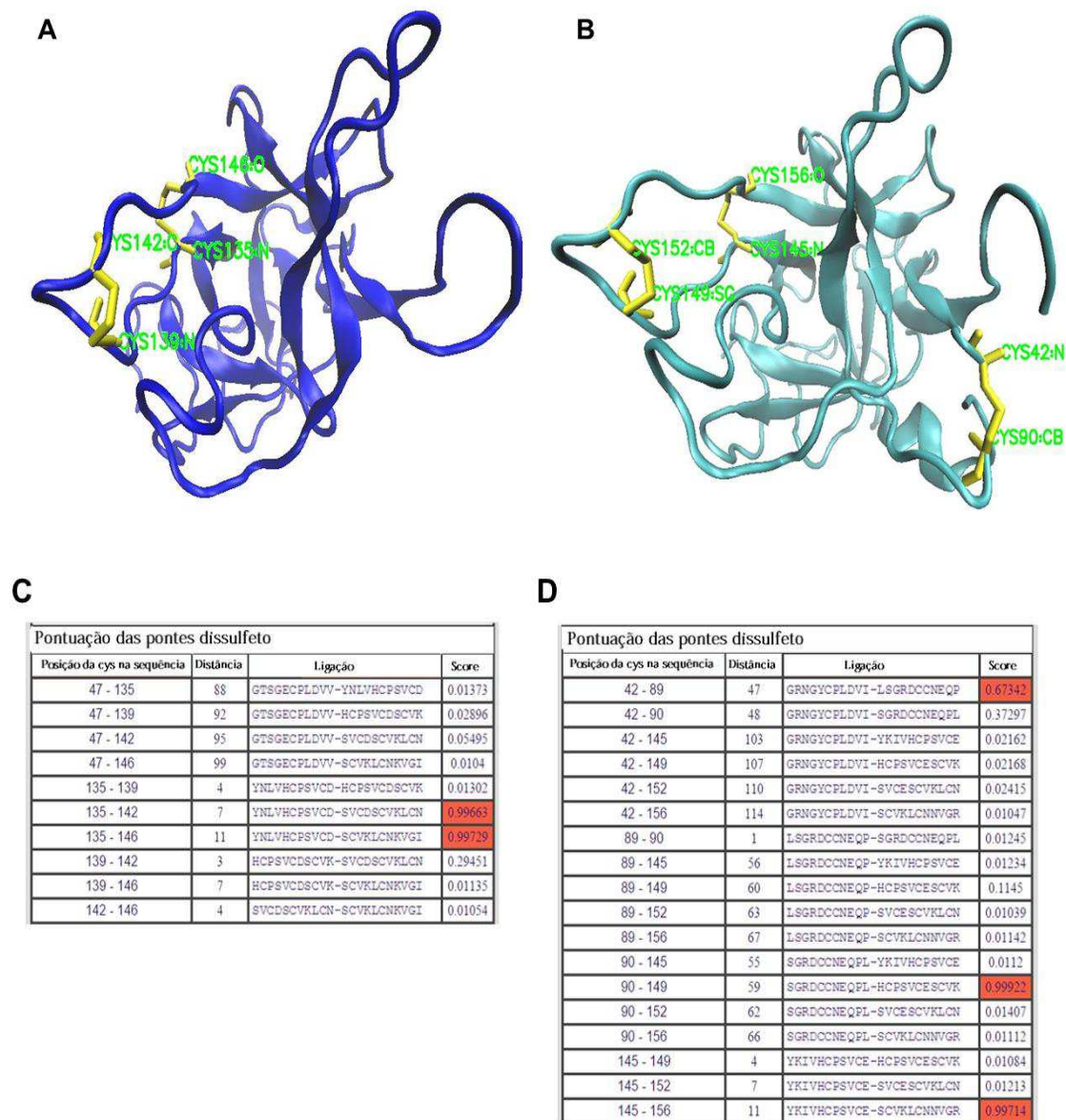
helicoidais do que a CsMir4. SONG e SUN (1998) dão suporte as estruturas construídas quando afirma que a maioria dos inibidores de tripsina do tipo Kunitz apresenta uma dobra comum do tipo folha- $\beta$  e é formada por 12 cadeias  $\beta$  ligadas por longas alças. Esses inibidores possuem uma alça reativa em um local exposto, tendo uma formação canônica.

A energia *Dfire* gerada pela sobreposição das miraculinas estudadas com os seus respectivos moldes foi de -241.71 para ambas as proteínas, o que é conceituado por MURZIN et al. (1995) como ótimo, pois apresenta uma alta energia negativa, indicando que as proteínas necessitam de baixa energia para manter-se ativas (RANGWALA et al., 2011). Entretanto, apesar do ajuste ótimo de CsMir1 e CsMir4 aos moldes, bem como a presença de características típicas da família de inibidores de tripsina do tipo Kunitz, se ambos os modelos dos monômeros de CsMir1 e CsMir4 apresentam atividade de inibidor de protease tripsina precisa ser demonstrado.

### **5.1.2 Confirmação da presença das cisteínas e das pontes dissulfetos**

Para um dobramento correto das proteínas, com a conservação de suas funções específicas é necessário à presença de resíduos de cisteínas conservados de acordo com a família das proteínas. Quanto a isso, a proteína CsMir1 apresentou cinco resíduos de cisteínas conservadas, sendo quatro cisteínas formadoras de duas pontes dissulfeto (Cys135 – 146 e Cys139 – 142). Essas pontes estão apresentadas em uma alça bastante evidente na Figura 5A. Já o monômero da proteína CsMir4 apresentou sete resíduos de cisteínas conservados, sendo seis resíduos envolvidos em três pontes dissulfeto (Cys42 – 90, Cys149 – 152, Cys145 – 156) (Figura 5B). As cisteínas envolvidas nas pontes dissulfeto de ambos os monômeros foram previstas pelo servidor DiANNA 1.1, como as mais bem pontuadas para CsMir1 (Figura 5C) e para CsMir4 (Figura 5D).

Figura 5. Indicação das cisteínas formadoras das pontes dissulfeto que estão destacadas em amarelo nos modelos tridimensionais das proteínas CsMir1 (A) e CsMir4 (B). As pontes dissulfetos calculadas pelo servidor DiANNA 1.1 estão destacadas em vermelho para CsMir1 (C) e CsMir4 (D).



Fonte: Dados da Pesquisa

Esse resultado corrobora com os dados de alinhamento de sequências de miraculinas de *C. sinensis* realizados por SOUZA (2015), que predisse essas mesmas posições para as pontes dissulfeto para ambas as estudadas proteínas miraculinas. Entretanto, enquanto a predição determinada pelo servidor DiANNA (FERRE e CLOTE, 2006) confirmou as duas pontes dissulfeto indicadas por alinhamento de sequência primária para CsMir1 nas posições das cisteínas formadoras de pontes compatíveis com as do modelo criado,



para a proteína CsMir4, apenas duas das três pontes se ajustaram a predição, visto que a formação da terceira ponte predita pelo programa não é viável, pois as cisteínas 90 e 149 estavam posicionadas distantes e não podiam estar envolvidas na ligação dissulfeto. Como está demonstrando a partir da Figura 5B, a terceira ponte foi formada pelas cisteínas 149 e 152 comprovada pela gráfica do modelo, onde essas cisteínas estavam localizadas em uma região que favorecia a formação dessa ponte dissulfeto.

Neste sentido, a existência de três pontes dissulfeto conservadas estão presentes no monômero da miraculina extraída da *R. dulcifica*, oferecendo maior estabilidade estrutural (IGETA et al., 1991; ITO et al., 2007; PALADINO et al., 2008; SELVAKUMAR et al., 2011). Por outro lado, tanto a miraculina nativa quanto as MLPs pertencentes à superfamília de STI do tipo Kunitz possuem apenas quatro resíduos de cisteínas conservados, arrumados em duas pontes de dissulfeto (RICHARDSON, 1991; TSUKUDA et al., 2006; SHEE e SHARMA, 2008; GAHLOTH et al., 2010; SELVAKUMAR et al., 2011). Portanto, estes são indicativos de que os modelos criados para CsMir1 e CsMir4 devem ser funcionais.

Entretanto, Souza (2015) demonstrou, a partir de alinhamento de sequências de aminoácidos de miraculinas de citros, que CsMir1 apresenta dois *gaps* evolucionários largos (13 e 12 aminoácidos de comprimentos), onde duas cisteínas foram eliminadas provavelmente por deleção gênica, o que acarretou na ausência de 01 ponte dissulfeto, que soltou uma alça funcional da proteína, conforme está demonstrando na Figura 5A.

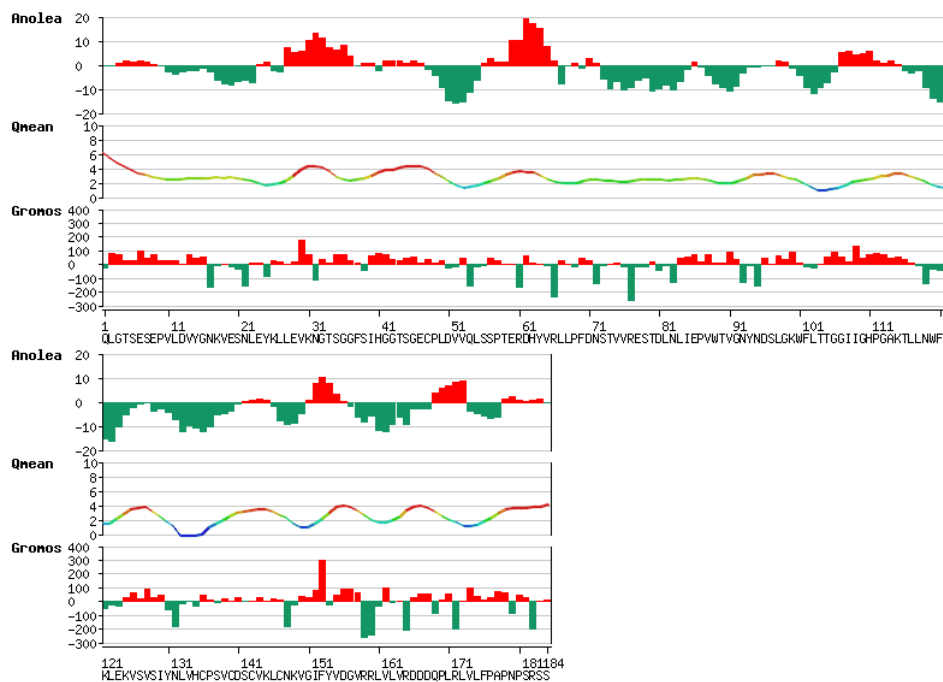
### **5.1.3 Qualidade dos modelos tridimensionais dos monômeros das miraculinas**

As análises dos dados obtidos a partir dos gráficos do ANOLEA mostrou que o modelo 3D da CsMir1 apresentou regiões com energia positiva, indicadas em vermelho, que representam locais desfavoráveis. Porém, a grande maioria das projeções está em verde (Figura 6A), o que significa que os valores de energia são satisfatórios, pois quanto mais negativa a energia, melhor o modelo (MELO e FEYTMANS, 1998).

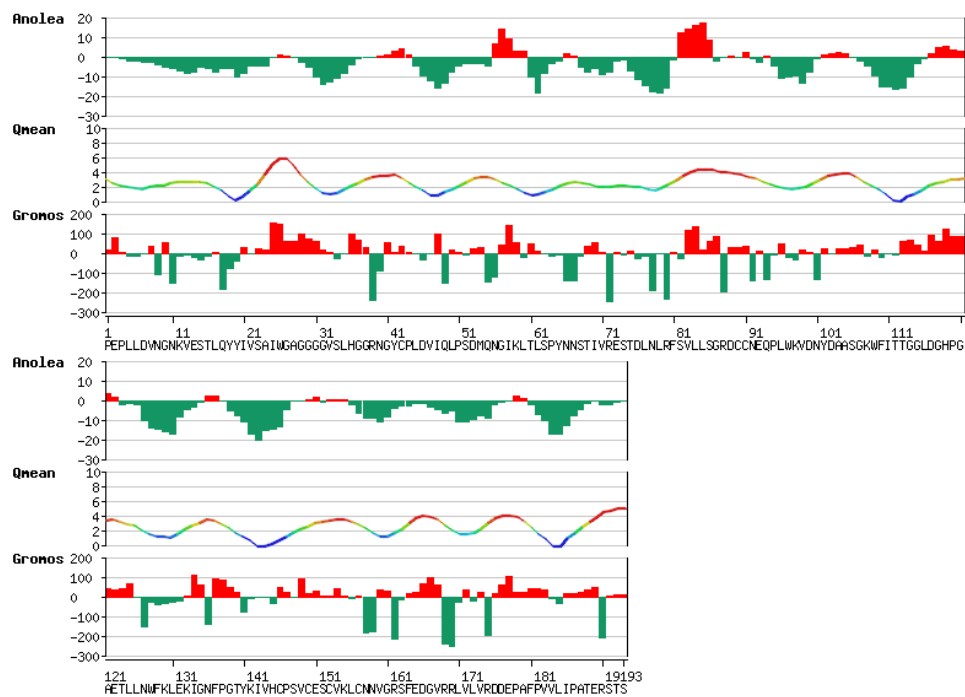
A análise do modelo tridimensional da proteína CsMir4, segundo o *ANOLEA*, também se mostrou um modelo favorável por apresentar grande parte das projeções favoráveis (Figura 6B). Essas validações foram confirmadas pelos outros programas de validação os QMEAN e GROMOS. Portanto, estes são indicativos de que os modelos criados para CsMir1 e CsMir4 devem ser funcionais.

Figura 6. Validação da qualidade dos modelos 3D de CsMir1 (A) e CsMir4 (B). Nas análises de *ANOLEA* e *GROMOS*, os resíduos satisfatórios estão destacados em verde e as projeções em vermelho sinalizam as energias desfavoráveis. Na análise de *QMEAN*, as regiões de baixa energia estão representadas em azul e as regiões de alta energia em vermelho.

A



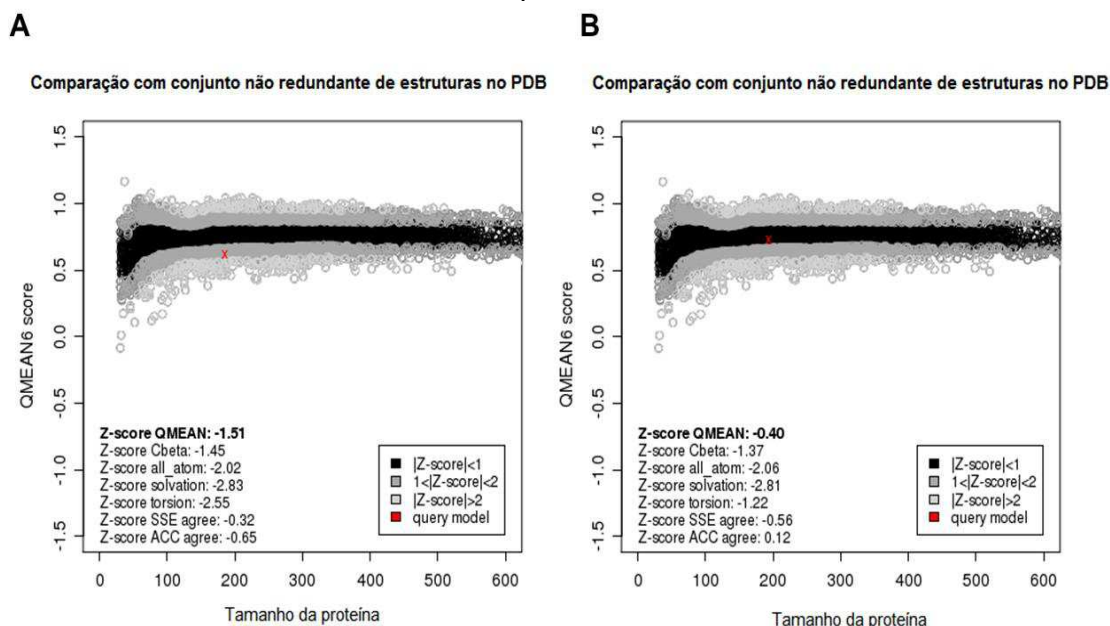
B



Fonte: Dados da Pesquisa.

Os dados dos gráficos de *QMEAN* revelaram que as qualidades globais das estruturas propostas foram satisfatórias, revelando um valor de *score* de 0,621 e um *Z-score* de -1,51 para a estrutura da proteína CsMir1 (Figura 7A); enquanto que para a estrutura da proteína CsMir4 o *score* foi de 0,729 e um *Z-score* de -0,40 (Figura 7B). Portanto, com base na avaliação dos gráficos de *QMEAN*, os modelos das proteínas CsMir1 e CsMir4 foram considerados bons em relação a termodinâmica e a qualidade estrutural, pois apresentaram valores de *score* que se encontram de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1 o modelo estiver, mais confiável será a estrutura. Já o *Z-score* corresponde à comparação do modelo com outras estruturas já depositadas no PDB (BENKERT, SCHWEDE E TOSATTO, 2009; UFRGS, 2011).

Figura 7. Comparações de *scores* de *QMEAN6* obtidos para os modelos das proteínas CsMir1 (A) e da CsMir4 (B) com os *scores* de estruturas do mesmo tamanho depositadas no PDB.

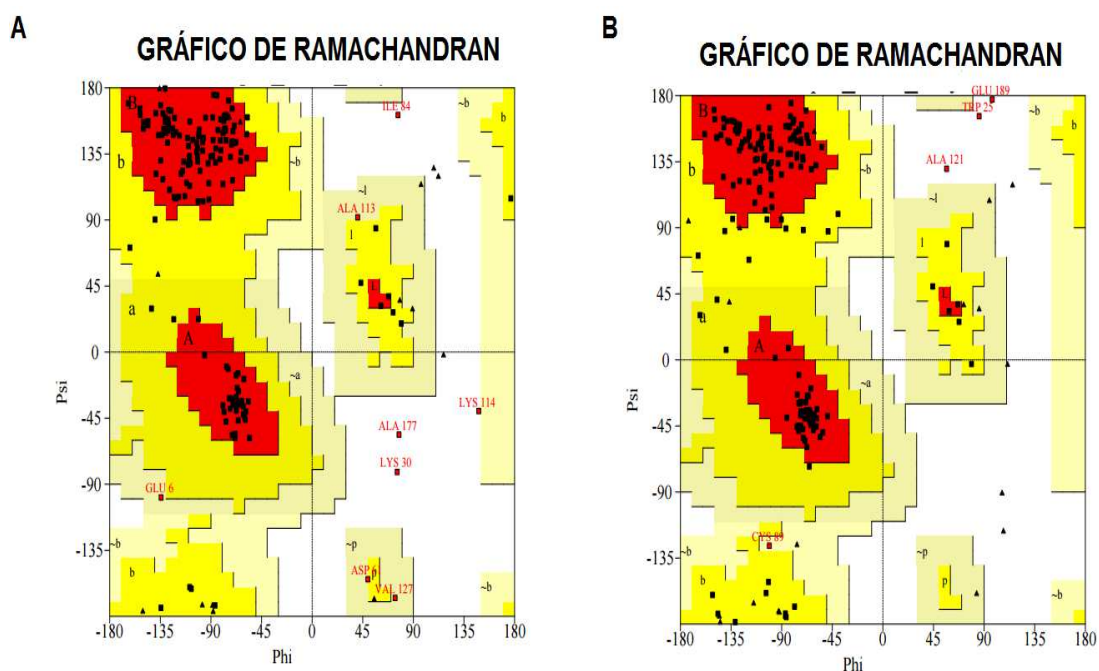


Fonte: Dados da pesquisa

A qualidade estereoquímica dos modelos previstos das proteínas CsMir1 e CsMir4 foi avaliada pelo programa PROCHECK 3.0, por meio dos gráficos de Ramachandran. Foi verificado que 85,9% dos aminoácidos da proteína CsMir1 encontram-se energeticamente em regiões favoráveis, indicando que não apresentaram impedimento na sua conformação estereoquímica; enquanto que somente 9% encontram-se em regiões permitidas (Figura 8A).

A análise estereoquímica da estrutura da proteína CsMir4 revelou que 83,9% dos aminoácidos estão em regiões energeticamente favoráveis e 13,7% em regiões permitidas (Figura 8B). O gráfico de Ramachandran representa a conformação do esqueleto da cadeia polipeptídica e determina o quanto a molécula em estudo pode se conformar sem que haja formação de regiões desfavoráveis, pela enumeração dos valores dos ângulos de torção de  $\Phi$  (phi), entre o carbono alfa e o grupo amina de um peptídeo, e  $\psi$  (psi), entre o carbono  $\alpha$  e o carbono  $\beta$ , para cada resíduo (LASKOWSKI et al., 1993).

Figura 8. Gráficos de Ramachandran dos modelos das proteínas CsMir1 (A) e CsMir4 (B), indicando 85,9% dos resíduos em regiões favoráveis (vermelho) e 9% em regiões permitidas (amarelo) para CsMir1 e 83,9% dos resíduos em regiões favoráveis (vermelho) e 13,7% em regiões permitidas (amarelo) para CsMir4.



Fonte: Dados da pesquisa.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, os modelos dos monômeros das proteínas CsMir1 e CsMir4 são válidos e confiáveis, estando dentro dos padrões e sendo considerados bons modelos, com representações muito próximas das estruturas reais das proteínas.

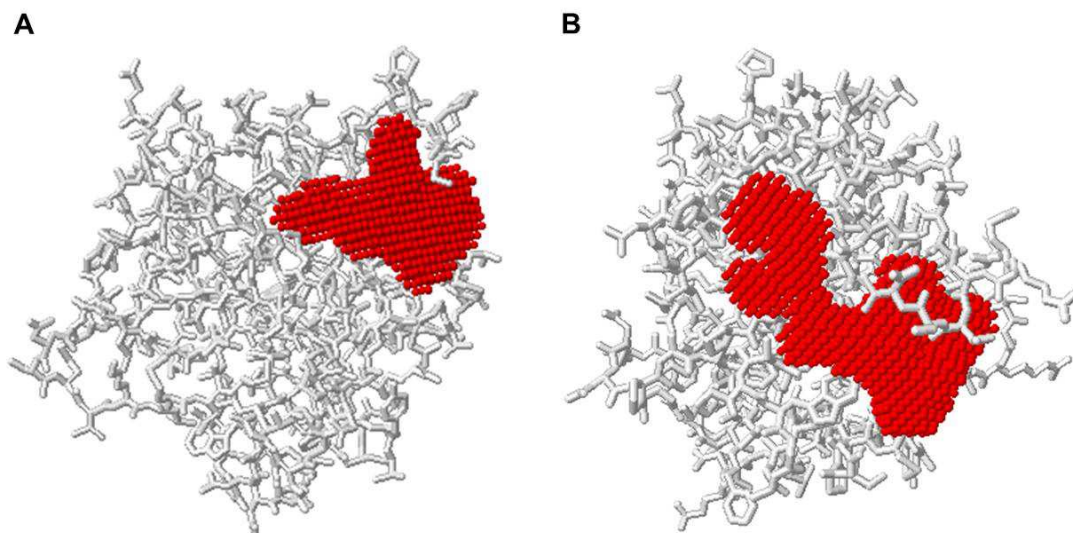
## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MIRACULINAS

Com base na literatura, a miraculina nativa apresenta dentre várias atividades a propriedade de modificação de gosto amargo/ácido em um sabor doce (KURIHARA e BEIDLER, 1969) e atividade de inibição de proteinases no mecanismo de defesa das plantas contra pragas e patógenos (RYAN, 1990; TSUKUDA et al., 2006; SELVAKUMAR, et al., 2011). Para especular se as miraculinas Csmir1 e Csmir4 possuíam alguma destas atividades observou-se que os estudos funcionais *in silico* com esta família de proteínas eram determinadas para inibição de proteases na forma de monômeros e para a modificação de sabor na forma de dímeros. Para fornecer maior embasamento aos dados, estudos sobre o sítio ativo das proteínas foram realizados.

### 5.2.1 Identificação dos sítios ativos das proteínas CsMir1 e CsMir4

A busca pelos sítios ativos das CsMir1 e CsMir4 tem importância quanto a caracterização das potenciais atividades para essas proteínas, por isso as predições dos sítios ativos dos modelos criados foram realizadas do servidor Ghecom, que procura regiões na proteína com potencial para receber um ligante, analisando sua morfologia e composição (KAWABATA, 2010). Como resultado das análises do Ghecom para predição de sítio ativo, cinco *clusters* foram gerados para cada miraculina estudada, com possíveis cavidades na superfície da estrutura. Os *clusters1* para CsMir1 e CsMir4 apontaram os sítios catalíticos dessas proteínas, que podem ser vistos na Figura 9.

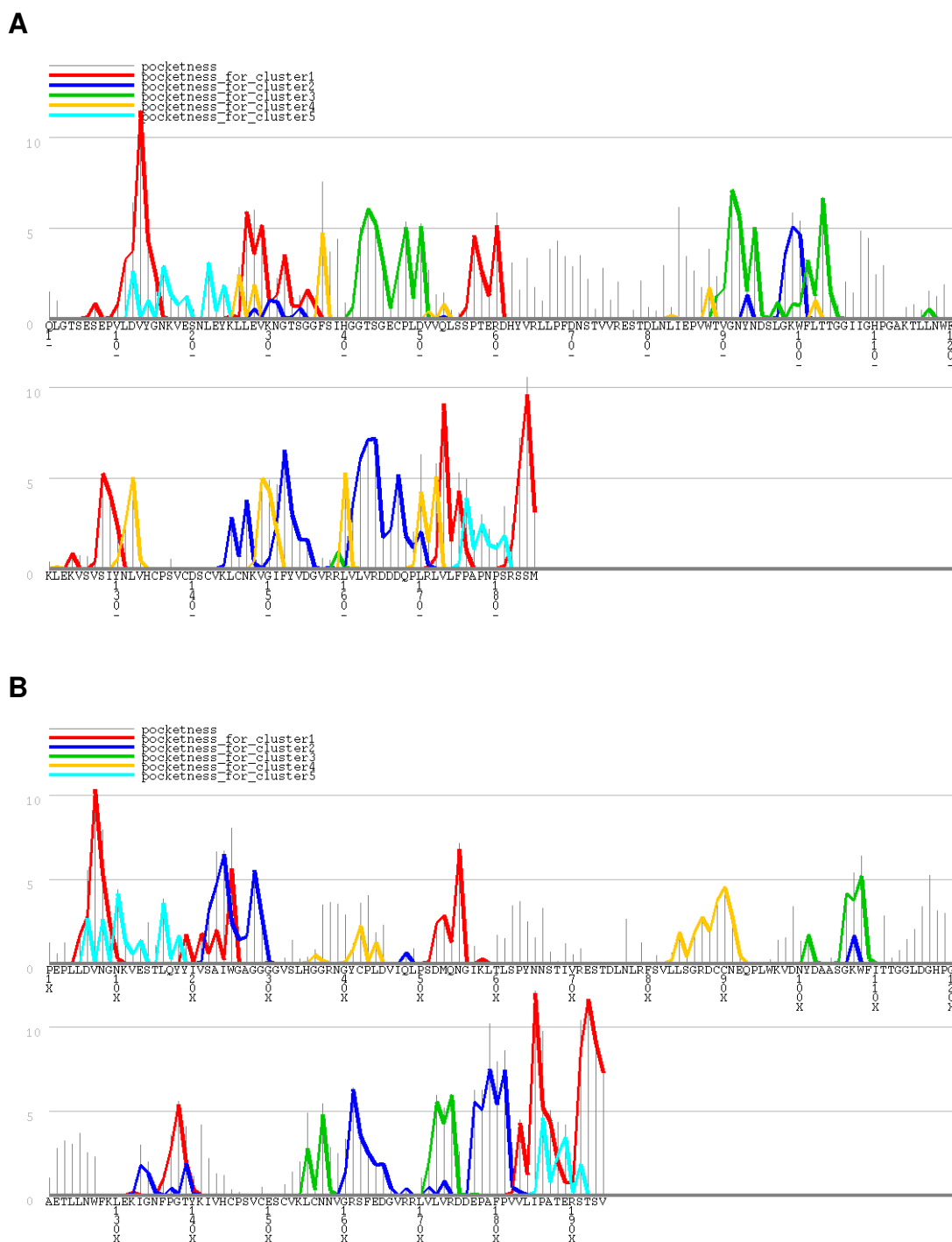
Figura 9. Imagem representativa das estruturas 3D da CsMir1 (A) e da CsMir4 (B), indicando os prováveis sítios ativos (em vermelho) de acordo com o *cluster1*, previsto pelo servidor Ghecom.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dos cinco *clusters* gerados para Csmir1 (Figura 10A) e para Csmir4 (Figura 10B), os aminoácidos de convergência do *cluster1* foram aqueles que mais apresentaram capacidade de formar possíveis cavidades de ligação, indicados na figura 10 como picos em vermelho.

Figura 10. Resíduos que formam cavidades com potencial para ligação em CsMir1 (A) e para CsMir4 (B), de acordo com o servidor Ghecom (cluster1, em vermelho).



Fonte: Dados da pesquisa.



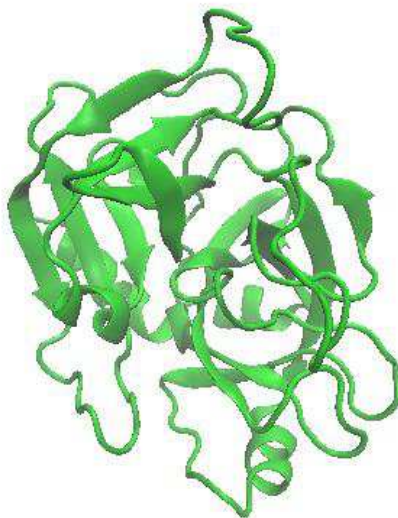
Uma vez que o programa Ghecom procura regiões na proteína com capacidade de receber um ligante, geralmente pequenos ligantes, através da análise de sua morfologia e composição, as regiões eletronegativas das CsMir1 e CsMir4 representam uma evidência *in silico* de que as proteínas provavelmente apresentam atividade de modificação de sabor ou inibição de protease por ligação a outras moléculas.

Com base nos *Cluster 1* (Figura 10A e B, em vermelho), os aminoácidos responsáveis pela formação da fenda do sítio ativo e que possuem capacidade de ligação de CsMir1 a outras moléculas são: Ser7, Leu12, Val14, Leu27, Val29, Gly32, Gly35, Pro57, Arg60, Lys124, Ser128, Val173, Phe175, Ser184. Já para CsMir4 são destacados os seguintes aminoácidos: Val7, Tyr19, Val21, Ala23, Trp25, Met53, Met55, Arg57, Arg132, Gly138, Val183, Ile185, Ala187, Thr192.

### **5.2.2 Docking molecular das miraculinas com protease tripsina**

Com o intuito de caracterizar a atividade biológica de inibição de protease dos monômeros das Csmir1 e da CsMir4, nesse trabalho foi modelada uma tripsina de *Acyrtosiphon pisum* (Figura 11), isolada de um inseto conhecido como piolho-grande-da-ervilha, que se alimenta da seiva de várias leguminosas de importância agrícola (EISEN, 2010).

Figura 11. Estrutura 3D da tripsina de *Acyrtosiphon pisum* modelada a partir da sequência de aminoácidos, usando 2JKH.pdb como molde.

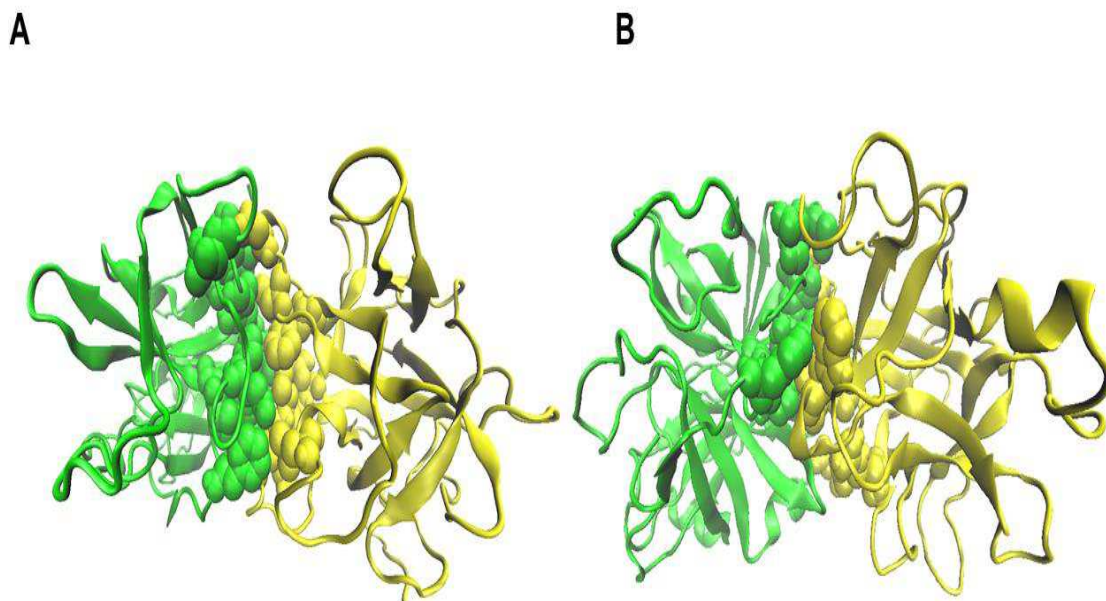


Fonte: Dados da pesquisa.

O modelo 3D para a tripsina de *A. pisum* foi validado pelos mesmos métodos e critérios descritos para os modelos das proteínas CsMir1 e CsMir4 e resultou em um bom modelo (Dados não mostrados).

Por isso, a interação entre as miraculinas e a tripsina foi analisada usando CsMir1 e CsMir4 como ligantes e a tripsina de *A. pisum* como receptor, por meio de *docking* molecular. A análise visual dos dois complexos gerados revelou que as miraculinas CsMir1 e CsMir4 se ligam a tripsina de *A. pisum* de modo favorável, sugerindo uma possível atividade de inibidor de proteinase tripsina (Figura 12).

Figura 12. Conformação dos complexos criados entre a tripsina de *A. pisum* (em verde) e a CsMir1 (A) e CsMir4 (B) em amarelo. Os resíduos-chave (*hotspot*) das interações estão indicados pela conformação de bolas.



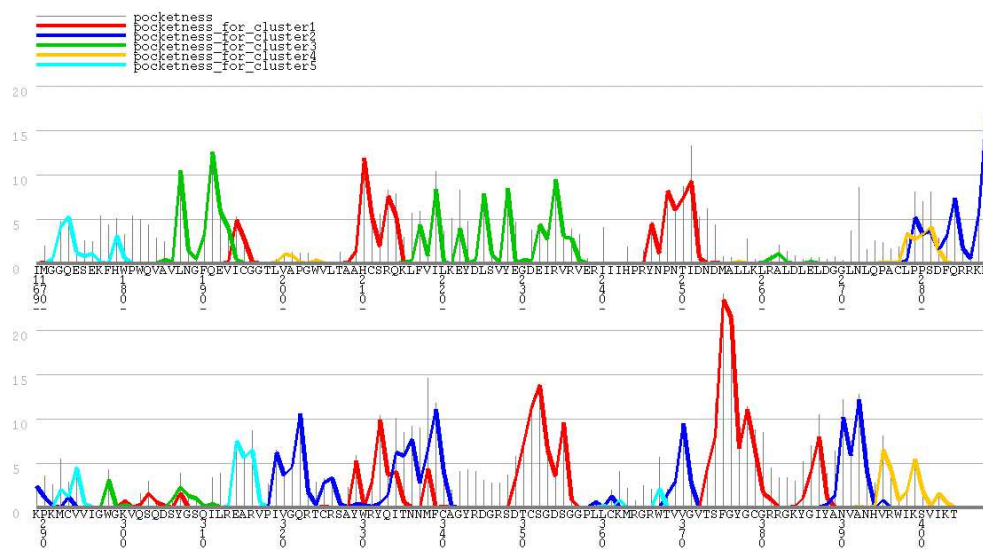
Fonte: Dados da pesquisa.

No Anexo I estão listados os 60 aminoácidos presentes na interface do complexo tripsina-CsMir1, sendo 36 na tripsina (cadeia A) e 26 resíduos na CsMir1 (cadeia B). Destes, os 12 resíduos-chave indicados como *hotspots* na cadeia A foram: Phe178, Pro181, Trp182, Val200, Ala201, Pro275, Cys277, Leu278 e Arg366. Os 10 resíduos-chave na cadeia B foram: Tyr93, Asp95, Trp100, Leu116, Val143, Lys144, Leu145, Cys146, Asn147 e Arg164. Estes resíduos na CsMir1 não participam do principal sítio ativo desta proteína, mas de um possível segundo sítio ativo, indicado na cor azul na Figura 10A.

Com relação ao complexo tripsina-CsMir4, um total de 77 resíduos estão envolvidos na interface, sendo 41 da tripsina e 36 da CsMir4. Dentre estes, os resíduos-chave na tripsina (cadeia A) foram: Phe178, Trp182, Ala201, Pro202, Leu265, Asp268, Gln274, Pro275, Cys277, Arg364, Arg366; enquanto que na proteína CsMir4 (cadeia B) foram: Val7, Ala23, Ile24, Trp25, Phe136, Thr139, Arg161, Asp176, Pro178, Pro181 (Anexo II). Neste caso, os resíduos de ancoragem da CsMir4 no complexo participam do principal sítio ativo dessa proteína, indicado em vermelho na Figura 10B.

Por outro lado, os *hotspots* que fazem parte da interface da ancoragem de tripsina com as duas miraculinas CsMir1 e CsMir4 não participam do sítio catalítico desta protease, mas sim de outra região desta proteína (Figura 13). É possível que as proteínas miraculinas CsMir1 e CsMir4 não exerçam sua potencial atividade inibitória por competição, visto que não se ligam no sítio de protease da tripsina, mas sim em algum sítio alostérico desta enzima.

Figura 13. Resíduos que formam cavidades com potencial para ligação, de acordo com o servidor Ghecom. Em vermelho, os resíduos que fazem parte do cluster1 para a tripsina de *A. pisum*.



A demonstração de atividade inibitória de protease tripsina por interação com exosítios foi demonstrada por Patil et al. (2012), onde o inibidor de Kunitz de tamarindo (TKI) apresentou atividade inibitória dupla contra o Fator Xa, por competição e por ligação a outros dois exosítios. Especula-se que CsMir4 possa ter uma atividade inibitória mais específica do que CsMir1, visto que se liga a tripsina no seu sítio ativo principal e que a tripsina respondeu uma com maior superfície de contato, composta por 11 resíduos-chave, enquanto que esta protease interagiu com CsMir1 apenas com 8 resíduos *hotspots*.

Uma vez que as proteínas do tipo miraculina têm a característica de desenvolver a ação de inibidores de tripsina, que podem atuar na imunidade

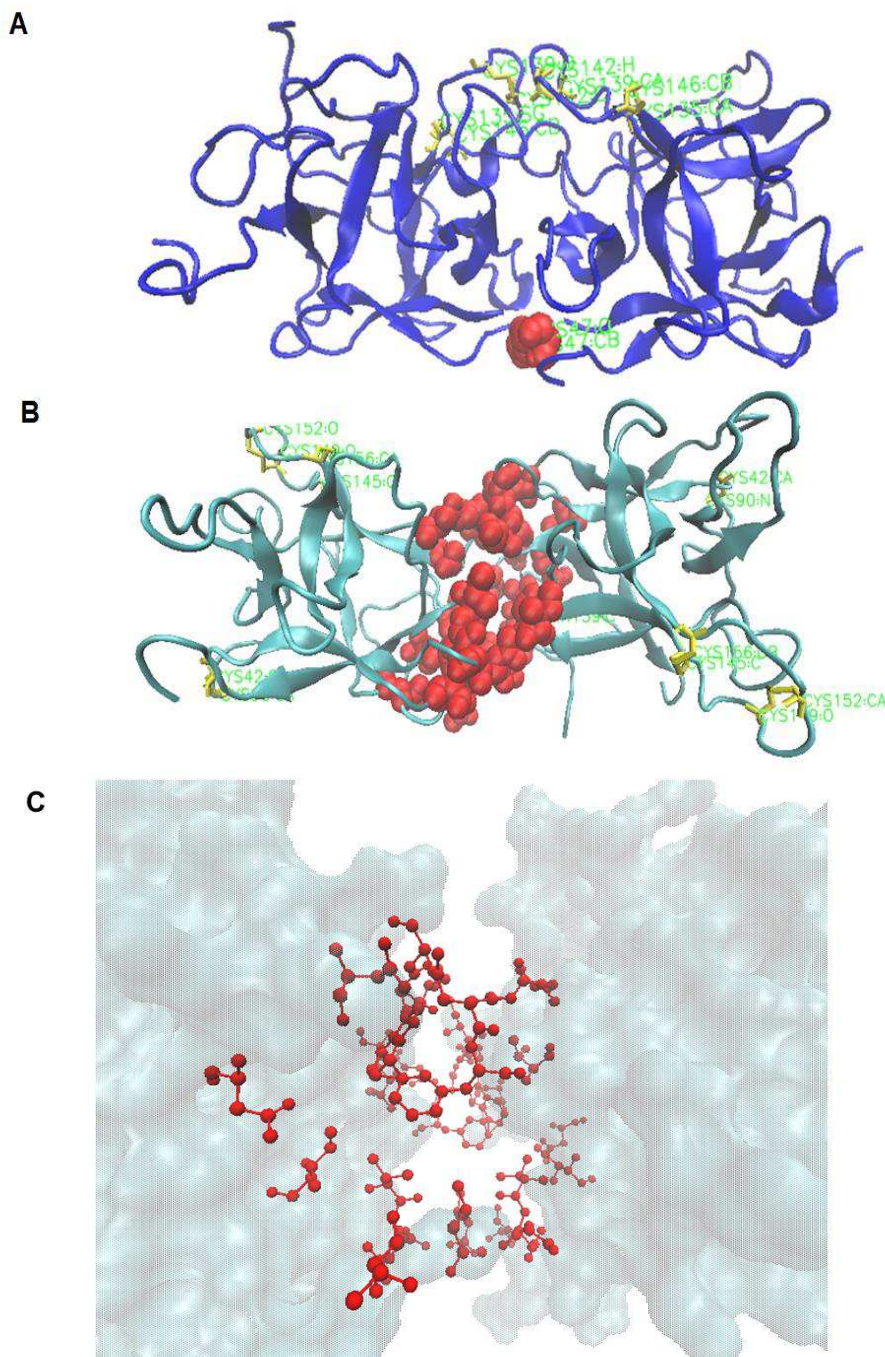
natural da planta na defesa de predadores e agentes patogênicos (SELVAKUMAR et al., 2011), esta informação é de grande importância para aplicações biotecnológicas na agricultura, pelo potencial uso na engenharia de plantas para resistência de plantas as proteínas miraculinas.

### 5.2.3 Estudo da atividade de modificação de sabor

Para estudar o potencial das proteínas CsMir1 e CsMir4 quanto a atividade de modificação de sabor azedo/ácido em doce, foi realizada a construção dos homodímeros dessas proteínas, uma vez que estudos anteriores revelaram que a miraculina não possui propriedade de modificação de sabor na forma de monômero (IGETA et al., 1991; ITO et al 2007; MATSUYAMA et al., 2009).

Na Figura 14 estão demonstrados os modelos tridimensionais *in silico* construídos para os homodímeros das proteínas CsMir1 e CsMir4, através da junção das subunidades monoméricas propostas anteriormente, utilizando o servidor automático GalaxyGemini (KO et al., 2012; SHIN et al., 2014). As subunidades monoméricas da proteína CsMir1 foram interligadas por um conjunto de resíduos compostos por: Gly45, Glu46, Pro48, Leu49, Pro86, Thr89, Asn94, Trp100, Gly105, Gly106, Ile107, His110, Pro111, Gly112, Ala113, Lys114, Leu117, Val143, Lys144, Leu145, além de uma cisteína na posição 47, que forma uma ponte dissulfeto com uma cisteína 47 da outra subunidade, conferindo assim estabilidade ao dímero. Já as subunidades monoméricas da proteína CsMir4 foram interligadas pelos seguintes resíduos: Val7, Asn8, Gly9, Ile24, Trp25, Gly26, Asp52, Asn55, Ile133, Gly134, Asn135, Phe136, Thr139, Ile185, Thr192, Val194. A identificação desses resíduos que interligam as subunidades monoméricas foi feita pela ferramenta KFC2 Server (DARNELL; PAGE; MITCHELL, 2007; ZHU e MITCHELL, 2011).

Figura 14. Estruturas 3D dos dímeros das proteínas CsMir1 (A) e CsMir4 (B) construídas por meio de modelagem molecular por homologia. As cisteínas formadoras das pontes dissulfeto estão indicadas em amarelo. Os resíduos que fazem parte da interação intracadeias estão destacados em vermelho. Detalhes da representação dos resíduos que fazem parte da homodimerização da CsMir4 (C).



Fonte: Dados da pesquisa

Os modelos dos dímeros foram validados utilizando os mesmos três métodos de avaliação da energia utilizados pelos monômeros, relevando

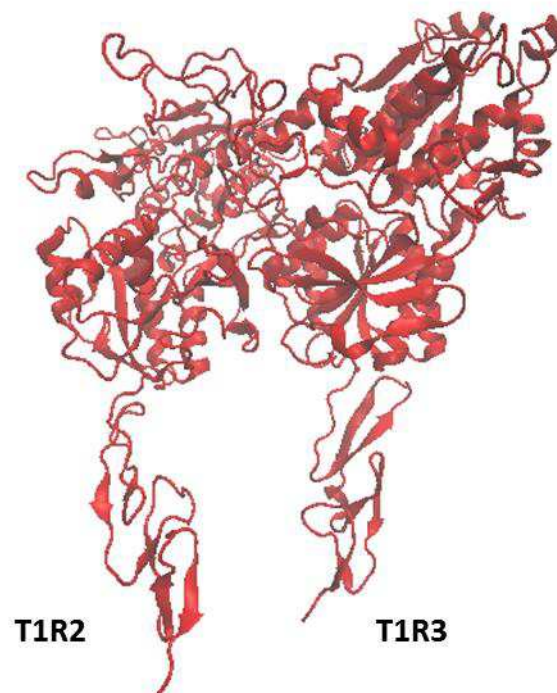
assim, que as estruturas diméricas propostas são satisfatórias (Dados não mostrados).

Os índices de instabilidade para as proteínas miraculinas mostraram que a CsMir1 apresenta o índice de 47.51, sendo assim considerada uma proteína instável. Já a CsMir4 apresentou o índice de 35.15, sendo considerada uma proteína estável, de acordo com a ferramenta ProtParam.

#### 5.2.4. Docking molecular do receptor de sabor doce com as miraculinas diméricas

Tendo em vista que estruturas cristalográficas dos receptores de sabor doce não estão disponíveis, nesse estudo foi construído e validado um modelo heterodimérico para o complexo receptor de sabor doce mT1R2/T1R3 de *M. musculus*, o qual compartilha 83% de similaridade de sequência de aminoácidos com o receptor hT1R2/T1R3 de *Homo sapiens* (Figura 15).

Figura 15: Estrutura 3D do receptor heterodimérico de sabor doce mT1R2/T1R3 de *M. musculus* geradas, usando 2E41.pdb como molde.



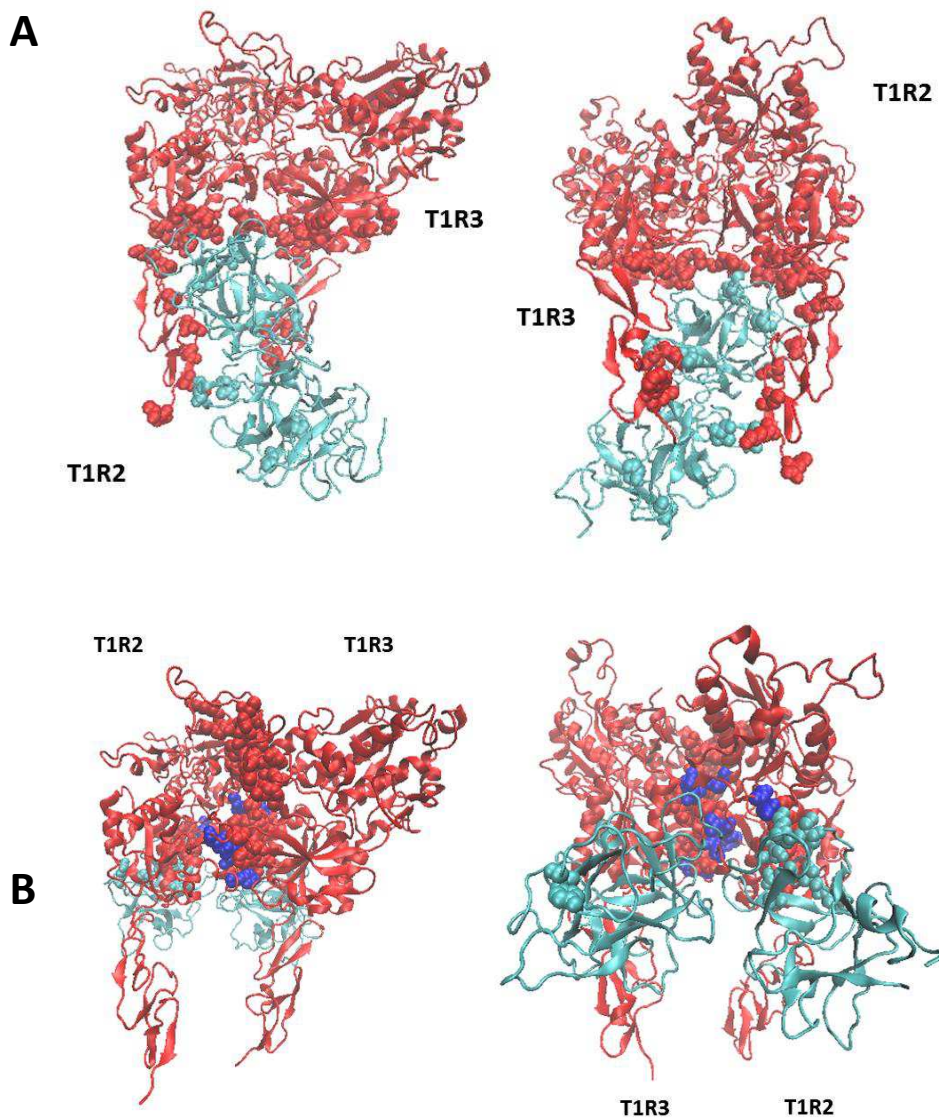
Fonte: Dados da pesquisa.

A interação entre as miraculinas e o receptor mT1R2/T1R3 foi analisada por meio de *docking* molecular, usando CsMir1 e CsMir4 como ligantes. A análise visual dos dois complexos gerados revelou que ambas as miraculinas se ligaram ao receptor (Figura 16).

No Anexo III estão listados os aminoácidos envolvidos na interface do complexo receptor mT1R2/T1R3-CsMir1, sendo que 17 resíduos-chave foram indicados como *hotspots* na cadeia A, correspondente a subunidade T1R2: Trp206, Ser272, Arg274, Ili482, Ser483, Ser486, Asn491, Val494, Ili496, Met498, Lys501, Ser502, Pro505, Asn551, Thr557 e Leu560, os quais interagiram apenas com 4 resíduos-chave da cadeia X, um monômero de CsMir1: Ser34, Thr43, Asp61 e Ser96 (Figura 16A). Apenas 01 resíduo *hotspot* da cadeia X de CsMir1 participa do sítio ativo desta proteína, enquanto que nenhum resíduo do sítio ativo do receptor mT1R2/T1R3 foi considerado *hotspot*.



Figura 16: Conformações frente e verso dos complexos mT1R2/T1R3-CsMir1 (A) e mT1R2/T1R3-CsMir4 (B), indicando em ciano os homodímeros das proteínas miraculinas e em vermelho o receptor heterodimérico de sabor doce. As bolas estão indicando os resíduos-chave, sendo em azul destaque para os resíduos do domínio ATD do receptor T1R2 potencialmente responsáveis pela resposta a miraculinas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dentre os resíduos envolvidos na interface do complexo T1R2/T1R3-CsMir4, um total de 38 resíduos da cadeia A do receptor, correspondente a subunidade T1R2 foram considerados resíduos-chave, os quais estão

indicados no Anexo IV (Figura 15B). Destes, 09 resíduos foram considerados *hotspots* para a cadeia X (subunidade do homodímero de CsMir4) e apenas 01 resíduo-chave da cadeia Y (outra subunidade de CsMir4). Nenhum dos resíduos considerados chave nas proteínas mT1R2/T1R3 e CsMir4 participam dos seus respectivos sítios ativos.

Estudos experimentais mostram que há pelo menos três locais de ligação potenciais em receptores de sabor doce (CUI et al., 2006).. A atividade do receptor para o aspartame e para adoçantes artificiais depende de resíduos no domínio do terminal amino de T1R2 humano. A atividade do receptor para a proteína doce brazeina depende do domínio rico cisteína de T1R3. E ainda, a atividade do receptor para o adoçante ciclamato e o inibidor de sabor doce lactisole dependem de resíduos dentro do domínio transmembrana de T1R3 humano Neste trabalho, não houve interação com a cadeia B, correspondente a T1R3 do receptor, com as subunidade do homodímero de CsMir1 e de CsMir4.

A análise de predição de domínios transmembrana identificou quais os resíduos do receptor que participavam das regiões extracelular, transmembrana e intracelular, levando a elucidação de que ambas, CsMir1 e CsMir4 se ligaram no domínio ATD do receptor T1R2. Portanto, os resíduos-chave da ancoragem dos complexos mT1R2/T1R3-CsMir1 e mT1R2/T1R3-CsMir4 estão localizados na subunidade T1R2 (cadeia A) do receptor heterodimérico. Interessantemente, dentro da região indicada por KOIZUMI et al., (2011) como região responsável pela resposta dos receptores mT1R2/T1R3 e hT1R2/T1R3 a miraculina, 07 resíduos *hotspots* foram encontrados no T1R2 interagindo com CsMir1, enquanto 09 resíduos-chave foram encontrados interagindo com a CsMir4, nesta mesma subunidade.

T1Rs são candidatos a receptores de sabor dos mamíferos que se combinam para montar dois complexos heterodiméricos de receptores acoplados a proteína G, o T1R2-T1R3 é um receptor doce (ZHAO et al., 2003). Estes receptores reconhecem diversos adoçantes naturais e sintéticos tais como monelina, brazeina, taumatina, curculina, mabinlina, miraculina e pentadina, porém esses mecanismos ainda não são bem elucidados (GNANAVAL E MUTHUKUMAR, 2011).

Uma vez que a proteína CsMir4 apresentou maior superfície de interação comparada com a CsMir1, com um maior número de resíduos *hotspots* também em resposta do receptor, estes resultados sugerem que o dímero da proteína CsMir4 provavelmente atua como modificador de sabor em associação com o receptor heterodimérico de sabor doce mT1R2/T1R3 de *M. musculus* e, por ortologia, em humanos. Se a CsMir4 está envolvida em respostas de indução ou inibição do sabor doce em *M. musculus* e, potencialmente, em humanos, precisa ser comprovado.

Kant (2005) avaliou a estabilidade de três complexos de proteínas modificadoras de sabor com o receptor de sabor doce para humanos o T1R2-T1R3 e mostrou bons resultados para a formação do complexo Miraculina–Receptor, indicando que a miraculina pode vir a ser um dos melhores adoçantes pouco calóricos.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

- Os modelos dos monômeros criados para as proteínas CsMir1 e CsMir4 são válidos e confiáveis, estando dentro dos padrões e sendo considerados bons modelos, com representações muito próximas das estruturas nativas dessas proteínas;

- A miraculina CsMir1, na forma monomérica liga-se a tripsina de *A. pisum* e na sua forma dimérica liga-se ao receptor heterodimérico mT1R2-T1R3 através do domínio ATD da subunidade T1R2, entretanto o potencial para as atividades de inibição de proteases e de indução ou inibição a modificação de sabor amargo/azedo em doce é menor do que para a CsMir4;

- A miraculina CsMir4, na sua forma monomérica liga-se a tripsina de *A. pisum*, possivelmente apresentando atividade de inibição de proteases;

- A miraculina CsMir4, em sua forma dimérica liga-se ao receptor heterodimérico mT1R2-T1R3 através do domínio ATD da subunidade T1R2, possivelmente apresentando atividade de indução ou inibição a modificação de sabor amargo/azedo em doce em *M. musculus*.

- A CsMir4 está indicada como forte candidata para futuros estudos biotecnológicos, visando aplicação como adoçante destinado a pacientes com doenças relacionadas ao consumo excessivo de açúcar.

## REFERÊNCIAS

ADLER, E.; HOON, M. A.; MUELLER, K. L.; CHANDRASHEKAR, J.; RYBA, N. J. P.; ZUKER, C. S. A novel family of mammalian taste receptors. **Cell**. v.100. p. 693–702. 2000.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Cancer facts and figures. 2012. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em 14 de março de 2016.

BACHCHU, M. A. A.; JIN, S. B.; PARK, J. W.; BOO, K. H., JIN-SUN, H.; KIM, Y. W.; LEE, H. Y.; RIU, K. Z.; KIM, J. H. Functional expression. Of miraculina, a taste-modifying protein, in transgenic miyagawa wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Jornal of the Korean society for applied biological chemistry**. V.54. n. 1. p.24-29. 2011.

BAENHI, C. Memoires du Conservatoire de Botanique et de l'Institut de Botanique Systématique de l'Université de Genève. **Boissiera**. v.11. p.97. 1965.

BAIROCH, A.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E. Swiss-prot: juggling between evolution and stability. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, n.1, p. 390 – 55. 2004.

BATISTA, G. B. **Análise estrutural e funcional *in silico* de uma pr-5 do tipo osmotina de *physalis angulata* com potencial atividade farmacológica.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) Universidade Federal de Campina Grande, Cuité. 2015.

BEHRENS, M.; MEYERHOF, W.; HELLFRITSCH, C.; HOFMANN, T. Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. **Angewandte Chemie International Edition**. v.1, ed. 50, n. 10, p. 2220 – 42. 2011.

BERTERETCHE, M. V.; DALIX, A. M.; CESAR D'ORNANO, A. M.; BELLISLE, F.; KHAYAT, D.; FAURION, A. Decreased taste sensitivity in câncer patients under chemotherapy. **Support Care Cancer**. v. 12. p. 571-576. 2004.

BHATTACHARYA, A.; MAZUMDAR, S.; BABU, C. R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 145. p. 669 – 677. 2007.

BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. F. (2000) Os pulgões sobre as culturas do mundo: um guia de identificação e informação. Wiley, John & Sons, Incorporated. p.476 p. 2000

BOHNE, A.; LANG, E.; VON DER LIETH, C. W. Sweet—www-based rapid 3d construction of oligo- and polysaccharides. **Bioinformatics**. v.15, p. 767–768.1999.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de. Saúde*. v. 16, n. 4, p. 279 – 293. 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Ministério da Agricultura mapeia principais pragas das lavouras brasileiras. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/08/ministerio-da-agricultura-mapeia-principais-pragas-das-lavouras-brasileiras>>. Acesso em 01 de Jun de 2016.

BRASIL, **Ministério da Saúde**. Prevenção e Combate: Dengue, Chikungunya e Zika. Disponível em <<http://combateaedes.saude.gov.br/pt/situacao-epidemiologica>>. Acesso em 01 de Jun de 2016.<http://combateaedes.saude.gov.br/pt/situacao-epidemiologica>

BRENNER, E. D.; LAMBERT, K. N.; KALOSHUAN, I.; WILLIAMSON, V. M. Characterization of *Lemir*, a root-knot nematode-induced gene in tomato with na encoded product secreted from the root. **The Journal Plant Physiologic**. V.118. p.237-247. 1998.

BROUWER, J. N.; GLASER, D.; HARD AF SEGERSTAD, C.; HELLEKANT, C.; NINOMIYA, Y.; VAN DER WEL, H. The sweetness-inducing effect of miraculina; behavioural and neurophysiological experiments in the rhesus monkey *Macaca mulatta*. **Journal Physiological**. V.337. p. 221-240. 1983.

BRUGNARA, E.C.; WITTMANN, M.T.S.; WEILER, R.L.; SCHWARZ, S.F. Ploidia e Fertilidade de Pólen em Progênies de Citros. **Bragantia**. Campinas, v.67, n.3, p.599-602, 2008.

CAPRILES, P. V. S. Z.; TREVIZANI, R.; ROCHA, G. K.; DARDENNE, L. E.; CUSTÓDIO, F. L. Modelos Tridimensionais. In: VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Organização de Hugo Verli. Porto Alegre , 2014.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**. v. 26, n. 3. p. 428 – 438. 2003.

CHAVES, M. R. O.; BERNARDO, A. S.; BERNARDO, C. D.; DIAS FILHO, J. F.; PAULA, H.S.C.; PASSOS, X. S. Dengue, Chikungunya e Zika: a nova realidade brasileira. **News lab**. 2014. Disponível em: <[http://www.newslab.com.br/newslab/revista\\_digital/134/artigos/artigo1.pdf](http://www.newslab.com.br/newslab/revista_digital/134/artigos/artigo1.pdf)>. Acessado em 04 de jun de 2016.

COMEAU, S. R.; GATCHELL, D. W.; VAJDA, S.; CAMACHO, C.J. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. **Bioinformatics**. 2004.

COMEAU, T. B.; EPSTEIN, J. B.; MIGAS, C. Taste and smell dysfunction in patients receiving chemotherapy: A review of current knowledge. **Supportive Care in Cancer**. v. 9. p. 575 – 580. 2001.

CONANT, G. C.; WOLFE, K. H. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. **Nature Reviews Genetcs**. v. 9. n. 12. p. 938–950. 2008.

CONTE, C.; EBELING, M.; MARCUZ, A.; NEF, P.; ANDRES-BARQUIN, P. J. Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R Family. **Cytogenetic and genome research**. v. 98. p. 45-53. 2002.

CUDNIK, D.R. THE Miracle Berry and Miraculin: A Review. 2014. Disponível em: <<https://miracleberryandmiraculin.wordpress.com/2014/07/27/the-miracle-berry-and-miraculin-a-review/>>. Acesso em: 15 de outubro de 2015.

DANIELL, W.F. On the *Synsepalum dulcificum*, de Cand.; or miraculus berry of Western Africa. **The pharmaceutical jornal and transactions**. v. 11. p. 445 - 446. 1852.

DANILONA, V.; HELLEKANT, G. Elucidating coding of taste qualities with taste modifier miraculina in the common marmoset. **Brain Research Bulletin**. v.68. p.315-321. 2006.

DANILOVA, V.; HELLEKANT, G. Elucidating coding of taste qualities with the taste modifier miraculin in the common marmoset. **Brain Research Bulletin**. v. 68, n. 5. p.315 – 321. 2006.

DARNELL, S. J.; PAGE, D.; MITCHELL, J. C. Automated Decision-Tree Approach to Predicting Protein-Protein Interaction Hot Spots. **Proteins**. v. 68, n. 4, p. 813 – 823. 2007.

DE MARQUI, S. R. **Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae)**. Dissertação (Mestre em Química). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química – Campus de Araraquara 2007.

DORN, M. **Uma proposta para a predição computacional da estrutura 3D aproximada de polipeptídeos com redução do espaço conformacional utilizando análise de intervalos**. Dissertação (Mestre em Ciência da Computação). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2008.

DU, L.; SHEN, Y.; ZHANG, X.; PRINYAWIWATKUL, W.; XU, Z. Antioxdant-rich phytochemicals in miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and antioxidante activity of its extracts. **Food Chemistry**. v.153. p. 279-284. 2014.

DUHOVNY, D.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. In GUSFIELD et al., Ed. **Proceedings of the 2'nd Workshop on Algorithms in Bioinformatics (WABI)**. Lecture Notes in Computer Science 2452, p. 185 - 200. Italy. 2002.

EISEN, J. A. O pulgão Genomics Consortium Internacional Sequence (2010) Genome da ervilha Aphid *pisum Acyrthosiphon*. **PLoS Biology**. v. 8. 2010(2).

EKINS, S. Predicting undesirable drug interactions with promiscuous proteins in silico. **Drug Discovery Today**. v. 09. p. 276 – 285. 2004.

FAUS, I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53. n. 2. p.145-151. 2000.

FÁVERO, P. **Transformação genética de três cultivares de laranja doce a partir de exalantes de plantas adultas**.2010 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia) Piracicaba, p. 01-51, 2010.

FELTRIN, A. C.; MARTINS, M. M.; APPELT, H. R.; KERSTING, R. Simulação de docking molecular de açúcar em hexoquinase. **SEPE**, 2010.

GAHLOTH, D.; SELVAKUMAR, P.; SHEE, C.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K. Cloning, sequence analysis and Crystal structure determination of a miraculina-like protein from *Murraya koenigii*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 494. p. 15 – 22. 2010.

GAHLOTH, D.; SHUKLA, U.; BIRAH, A.; GUPTA, G. P.; KUMAR, P. A. DHALIWAL, H. S.; SHARMA, A. K. Bioinsecticidal activity of *Murraya koenigii* miraculina-like protein against *Helicoperpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 78, n. 3. p.132 – 144. 2011.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. Desenvolvimento bioinformática: ferramentas de software para aplicação em biologia. **Ed. Campus**, Rio de Janeiro, 2001.

GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Atracamento Molecular. In: VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Organização de Hugo Verli. Porto Alegre, 2014.

HANSEN, D.; MACEDO-RIBEIRO, S.; VERISSIMO, P.; YOO, I. M. S.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. V. Crystal structure of a novel cysteinless plant Kunitz-type protease inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 360, n. 4. p. 735 – 740. 2007.

HILLISCH, A.; PINEDA, L. F.; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. **Drug Discovery Today**. v. 09. p. 659 – 669. 2004.



HIRAI, T.; SATO, M.; TOYOOKA, K.; JIN-SUN, H.; YANO, M.; EZURA, H. Miraculin, a taste-modifying protein is secreted into intercellular spaces in plant cells. **Journal of Plant Physiology**. V.167. p.209-215. 2010.

HIRAI, T.; SHOHAEL, A. M.; KIM, Y. W.; YANO, M.; EZURA, H. Ubiquitin promoter-terminator cassette promotes genetically stable expression. Of the taste-modifying protein miraculina in transgenic lettuce. **Plant Cell Reports**. v. 30. p.2255-2265. 2011.

HIWASA-TANASE, K.; NYARUBONA, M.; HIRAI, T.; KATO, K.; ICHIKAWA, T.; EZURA, H. High-level accumulation of recombinant miraculina protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic *miraculina* gene with optimized codon usage terminated by the native miraculina terminator. **Plant Cell Reports**. v.30. p.113-124. 2011.

HOLLOWAY, H.; AKOTO, Y.; GBEWONYO, K. Miracle Fruits: A Resource Manual for Commercial Development of Miraculin for Export. **Bio-Resource International**. Inc.16 pp. 1996.

HUTCHINSON, E. G., THORNTON, J. M. PROMOTIF - A program to identify structural motifs in proteins. **Protein Science**. v. 5, p. 212 - 220. 1996.

IGETA, H.; TAMURA, Y.; NAKAYA, K.; NAKAMURA, Y.; KURIHARA, Y. Determination of disulfide array and subunit structure of taste-modifying protein, miraculina. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1079. p.303-307. 1991.

INGLETT, G. E.; CHEN, D. Contents of phenolics and flavonoids and antioxidant activities in Skin, Pulp, and Seeds of Miracle Fruit. **Journal of Food Sciences**. v. 76, n. 3. p. 479 - 481. 2011.

INOUE, M.; REED, D. R.; LI, X.; TORDOFF, M. G.; BEAUCHAMP, G. K.; BACHMANOV, A. A: Allelic Variation of the *Tas1r3* Taste Receptor Gene Selectively Affects Behavioral and Neural Taste Responses to Sweeteners in the F2 Hybrids between C57BL/6ByJ and 129P3/J Mice. **The Journal of neuroscience**. v. 24, n. 9. p. 2296-303. 2004.

ITO, K.; ASAKURA, T.; MORITA, Y.; NAKAJIMA, K.; KOIZUMI, A.; SHIMIZU-IBUKA, A.; MASUDA, K.; ISHIGURO, M.; TERADA, T.; MARUYAMA, I.; KITAMOTO, K.; MISAHA, T.; ABE, K. Microbial production of sensory-active miraculina. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V.360. p.407-411. 2007.

ITO, K.; SUGAWARA, T.; KOIZUMI, A.; NAKAJIMA, K., SHIMIZU-IBUKA, A.; SHIROISHI, M.; ASADA, H.; YURUGI-KOBAYASHI, T.; SHIMAMURA, T.; ASAKURA, T.; MASUDA, K.; ISHIGURO, M.; MISAHA, T.; IWATA, S.; KOBAYASHI, T.; ABE, K. Bulky high-mannose-type N-glycan blocks the taste-modifying activity of miraculina. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1800. p.986-992. 2010.

JIN-SUN, H.; CUI, M.L.; BIAO MA, B.; EZURA, H. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. **FEBS Letters**. V.580, p. 620–626. 2006.

KANT, R.; RAJASEKARAN, M.B.; SURYANARAYANARAO, R. Sweet and Taste Modifying Proteins – Comparative Modeling and Docking Studies of Curculin, Mabinlin, Miraculin with the T1R2–T1R3 Receptor. **Internet Electron. Journal of Molecular Designer**. v.4, n.2, p.106–123. 2005.

KENNEDY, A. R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 78, n. 3. p. 167 – 209. 1998.

KO, J.; PARK, H.; HEO L.; SEOK, C. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. **Nucleic Acids Reserach**. v. 40, n. 1, p. 294 – 297. 2012.

KOIZUMI, A.; TSUCHIYAA, A.; NAKAJIMAA, K.I.; ITOA, K.; TERADAB, T.; SHIMIZU-IBUKAA, A.; BRIANDC, L.; ASAKURAA, T.; MISAKAA, T.; ABEA, K. Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin. **PNAS**. vol. 108, no. 40, p. 16819–16824. October 4, 2011.

KUNDROTAS, P. J.; ALEXOV, E. Predicting 3D structures of transcient protein-protein complexes by homology. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1764, n. 9. p. 1498-1511. 2006.

KUNISHIMA, N.; SHIMADA, Y.; TSUJI, Y.; SATO, T.; YAMAMOTO, M.; KUMASAKA, T.; NAKANISHI, S.; JINGAMI, H.; MORIKAWA, K. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. **Nature**. v.407. p. 971-977. 2000.

KURIHARA Y. Characteristics of antisweet substances, sweet proteins, and sweetness-inducing proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 32, p. 231 – 252.1992.

KURIHARA, K.; BEIDLER, L.M. Taste-modifying protein from miracle fruit. **Science**. V.161, p.1241–1243. 1969.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. Principios de bioquímica. São Paulo: **Sarvier**. p. 839. 2002.

LESK, A. M. **Introdução à Bioinformática**. Artmed, 2<sup>a</sup> edição. 2008.

LI, X.; STASZEWSKI, L.; XU, H.; DURICK, K.; ZOLLER, M.; ADLER, E. Human receptors for sweet and umani taste. **PNAS**. v.99. n.7. p.4692-4696. 2002.

LINDERSTRØM-LANG, K. U. "Proteins and Enzymes", Lane Medical Lectures. Stanford University Publications, University Serie. **Medical Sciences**. v. 6. 1952.

LOUIS, E.J. Evolutionary genetics: making the most of redundancy. **Nature**. v. 449, n. 7163. p.673–674. 2007.

LUTTEKE, T.; FRANK, M.; VON DER LIETH, C. W. Carbohydrate Structure Suite (CSS): analysis of carbohydrate 3D structures derived from the PDB. **Nucleic Acids Research**. v. 33, p. 242 – 246. 2005.

MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. G. M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**. v. 68, p. 1104–1111. 2007.

MANDAOKAR, A.D.; GOYAL, R.K.; SHUKLA, A.; BISARIA, S.; BHALLA, R.; REDDY, V.S.; CHAURASIA, A.; SHARMA, R.P.; ALTOSAAR, I. E KUMAR, P.A. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hübner). **Crop Protection**. v. 19, p. 307-312. 2000.

MARGOLSKEE, R. F. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. **The journal of Biological chemistry**. v.277. n. 1. p.1-4. 2002.

MASUDA, Y.; NIRASAWA, S.; NAKAYA, K.; KURIHARA, Y. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste-modifying protein, miraculin. **Gene** v. 161. p.175 – 177. 1995.

MATSUYAMA, T.; SATOH, M.; NAKATA, R.; AOYAMA, T.; INOUE, H. Functional expression of miraculin, a taste-modifying protein in *Escherichia coli*. **The journal of biochemistry**. V. 145. p. 445–450. 2009.

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JUNIOR, J. **CITROS**: principais informações e recomendações de cultivo. Instituto Agronômico de Campinas. 2005.

MENETTI, F. S. **Modelagem da interação estrutural entre os motivos IQ da miosina Va com calmodulina**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Informática Biomédica) Universidade de São Paulo, 2006.

MISAKA, T. Molecular mechanisms of the action of miraculina, a taste-modifying proteins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v.24. p.222-225. 2013.

MONDEGO, J. M. C.; DUARTE, M. P.; KIYOTA, E., MARTINEZ, L.; CAMARGO, S. R.; DE CAROLI, F. P.; ALVEZ, B. S. C.; GUERREIRO, S. M. C.; OLIVA, M. L. V.; GUERREIRO-FILHO, O.; MENOSSI, M. Molecular characterization of a miraculina-like gene differentially expressed during coffee development and coffee leaf miner infestation. **Planta**. v.233. p.123-137. 2011.

MORRIS, G. M. *et al.* Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**. v.19, n.14. p. 1639 – 1662. 1998.

MURZIN, A. G.; BRENNER, S. E.; HUBBARD, T.; CHOTHIA, C., SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures, **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 536-540, 1995.

NELSON, G.; HOON, M. A.; CHANDRASHEKAR, J.; ZHANG, Y.; RYBA, N. J. P.; ZUKER, C. S. Mammalian sweet taste receptors. **Cell Press**. v. 106. p. 381-390. 2001.

NICOLAU JUNIOR, N. **Diferenças estruturais e “docking” receptor-ligante da proteína E7 do vírus do papiloma humano (HPV) de alto e baixo risco para câncer cervical**. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, 2013.

NICOLOSI, E. Origin and taxonomy. In: KHAN, I.A. (Ed) **Citrus genetic, breeding and biotechnology**. Oxford: CAB Internatinal, P.18-44. 2007.

NJOKU, N.E., UBBAONU, C.N., ALAGBAOSO, S.O., ELICHIE, C.N., UMELO, M.C. Amino acid profile and oxidizable vitamin content of *Synsepalum dulcificum* berry (miracle fruit) pulp. **Food Science e Nutrition**. v. 3. n. 3, p. 252 - 256. 2015.

OLIVA, M. L. V.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F. C.; ARAUJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1477, n.1. p. 64 – 74. 2000.

OSGUTHORPE, D. J., *Ab initio* protein folding. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, p.146-152, 2000.

PACHECO, A. G. M. **Modelagem Molecular comparativa e estudos de acoplamento molecular da enzima lanosterol 14 $\alpha$ - desmetilase do *Moniliophthora perniciosa***. Dissertação (Mestre em Biotecnologia). Universidade Federal de Feira de Santana. Feira de Santana. 2009.

PALADINO A.; COLONNA, G.; FACCHIANO, A.M.; COSTANTINI, S. Functional hypothesis on miraculin' sweetness by a molecular dynamics approach. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.396, p.726–730. 2010.

PALADINO, A.; COSTANTINI, S.; COLONNA, G.; FACCHIANO, A.M. Molecular modelling of miraculin: Structural analyses and functional hypotheses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.367, p. 26–32. 2008.

PEREIRA, L. G. C. CONTROLE FITOSSANITÁRIO: AGROTÓXICOS E OUTROS MÉTODOS. Consultoria Legislativa. 2013. Disponível em: <[http://www2.camara.leg.br/documentos-e-pesquisa/publicacoes/estnottec/areas-da-conle/tema2/2012\\_25142.pdf](http://www2.camara.leg.br/documentos-e-pesquisa/publicacoes/estnottec/areas-da-conle/tema2/2012_25142.pdf)>. Acessado em 04 de jun de 2016.

PERLAK, F.J., FUCHS, R.L., DEAN, D.A., MCPHERSON, S.L., FISCHHOFF, D.A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect cotton protein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 88, p. 3324-3328. 1991

PIN, J. P.; GALVEZ, T.; PREZEAU, L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 98. p. 325–354. 2003.

PODDA, A.; SIMILI, M.; DEL CARRATORE, R.; MOUHAYA, W.; MORILLON, R.; MASERTI, B.E. Expression profiling of two stress-inducible genes encoding for miraculina-like proteins in citrus plants under insect infestation or salinity stress. **Journal of Plant Physiology**. v.171. p.45-54. 2014.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A. R.; TERRA, W. R.; PARRA, J. R. P.; FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 99. p. 79 – 85. 2001.

PROSDOCIMI, F. Introdução À Bioinformática. Curso Online. **Bioteconologia, Ciência E Desenvolvimento**. 2007. Disponível em: <[http://www2.bioqmed.ufrj.br/prosdocimi/FProsdocimi07\\_CursoBioinfo.pdf/](http://www2.bioqmed.ufrj.br/prosdocimi/FProsdocimi07_CursoBioinfo.pdf/)> acesso em: 05 de out. 2015.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). In: **Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids**. v. 5. Academic Press. p. 259–305. 1991.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. **Annual Review Phytopathology**. v 28. p. 425 - 449. 1990.

RYAN, C. Proteinase inhibitors in plant leaves: a biochemical model for pest-induced natural plant protection. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 3, n. 3. p. 148 – 150. 1978.

SANT'ANNA, C. M. R.; ALENCASTRO, R. B.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Journal of Molecular Structure**. v. 340, p. 193, 1995.

SCHALLER, A.; RYAN, C. A.. Systemin — a polypeptide defense signal in plants. **Bioessays**. v. 18. p. 27 – 33. 1995.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Patchdock and Symmdock: servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic Acid Research**. v. 33, p. w363-w367, 2005.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Geometry based flexible and symmetric protein docking. **Proteins**. v. 60, p. 224-231. 2005.

SELVAKUMAR, P.; GAHLOTH, D.; TOMAR, P.P.S; SHARMA, N.; SHARMA, A.N. Molecular Evolution of Miraculin-Like Proteins in Soybean Kunitz Super-Family. **Journal of Molecular Evolution**. v.73, p.369–379. 2011.

SHEE, C.; SHARMA, A.K. Storage and affinity properties of *Murraya koenigii* trypsin inhibitor. **Food Chemistry**. v. 107, n. 1. p.312 – 319. 2008.

SHIN, W. H.; LEE, G. R.; HEO, L.; LEE, H.; SEOK, C. Prediction of Protein Structure and Interaction by GALAXY protein modeling programs. **Bio Desing**. v. 2, n.1, p. 1 – 11. 2014.

SONG, H. K.; SUN, S. W. Kunitz-type soybean trypsin revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. **Journal Molecular Evolution**. v. 275. p. 347 – 363. 1998.

SOUZA, A. F. **Seleção *In Silico* De Genes *Miraculina* De *Citrus Sinensis* Candidatos A Ensaios Funcionais**. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas). Cuité-PB. 2015

SUGAYA, T.; YANO, M.; JIN-SUN, H.; HIRAI, T.; EZURA, H. Transgenic strawberry expressing the taste-modifying protein miraculina. **Plant Biotechnology**. V.25. p.329-333. 2008.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER,W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds) **The citrus industry**. Riverside: University of California, v.1, p.190-430, 1967.

TAKAI, A.; SATOH, M.; MATSUYAMA, T.; ITO, A.; NAKATA, R.; AOYAMA, T.; INOUE, H. Secretion of miraculin through the function of a signal peptide conserved in the Kunitz-type soybean trypsin inhibitor Family.**FEBS Letters**. V.587, p. 1767–1772. 2013.

TALYZINA, N. M., INGVARSSON, P.K. Molecular evolution of a small gene family of wound inducible Kunitz trypsin inhibitors in *Populus*. **Journal Molecular Evolution**. v. 63, n. 1, p. 108 – 119. 2006.

TANCREDI, T.; PASTORE, A.; SALVADORI, S.; ESPOSITO, V.; TEMUSSI, P. A. Interaction of sweet proteins with their receptor. A conformational study of peptides corresponding to loops of brazzein, monellin and thaumatin. **European Journal. Biochemistry**. v. 271. p. 2231–2240. 2004.

**The Protein Data Bank** <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em 07 de Fev de 2016.

THEERASILP, S.; HITOTSUYA, H.; NAKAJO, S.; NAKAYA, K.; NAKAMURA, Y.; KURIHARA, Y. Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculina. **The Journal of Biological Chemistry**. V.264, n.12. p.6655-6659. 1989.

THEERASILP, S.; KURIHARA, Y. Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculina, from miracle fruit. **The Journal of Biological Chemistry**. V.263, n.23. p.11536-11539. 1988.

TSUKUDA, S.; GOMI, K.; YAMAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculina-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. **Plant Molecular Biology**. v.60. p.125-136. 2006.

USDA. United State Department of Agriculture's Animal and Plant Health Inspection Service. U.S. **Database of Completed Regulatory Agency Reviews**. 2008. Disponível: [http:// usbiotechreg.nbii.gov](http://usbiotechreg.nbii.gov). Acessado em: 04 de jun. de 2016.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Organização de Hugo Verli. Porto Alegre, 2014.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Bioquímica**. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

WILKEN, M. K.; SATIROFF, B. A. Pilot study of "Miracle fruit" to improve food palatability for patients receiving chemotherapy. **Clinical Journal of Oncology Nursing**. v. 16, n. 5. p. 173 – 177. 2012.

WITTY, M. Proteins pack muscle to modify taste. **Prepared Foods**. p. 69 – 71. 1999.

WONG, J. M.; KERN, M. Miracle fruit improves sweetness of a low-calorie dessert without promoting subsequent energy compensation. **Appetite**. v.56. p.163-166. 2011.

XU, Q.; CHEN, L.; RUAN, X.; CHEN, D.; ZHU, A.; CHEN, C.; BERTRAND, D.; JIAO, D.; HAO, B.; LYON, M.P.; CHEN, J.; GAO, J.; XING, F.; LAN, H.; CHANG, J.; GE, X.; LEI, Y.; HU, Q.; MIAO, Y.; WANG, L.; XIAO, S.; BISWAS, M.K.; ZENG, W.; GUO, F.; CAO, H.; YANG, C.; XU, X.; CHENG, Y.; XU, J.; LIU, J.; LUO, O.J.; TANG, Z.; GUO, W.; KUANG, H.; ZHANG, H.; ROOSE, M.L.; NAGARAJAN, N.; DENG, X.; RUAN, Y. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature Genetics**. v.45, n.1, p.59-68, january, 2013.

YU MENG, X.; XING ZHANG, H.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug Discovery. . 2012.

ZHU, X.; MITCHELL, J. C. KFC2: A knowledge-based hot spot prediction method based on interface solvation, atomic density and plasticity features. **Proteins**. v. 79, n. 9, p. 2671 – 2683. 2011.

**ANEXOS**



ANEXO i – Lista de resíduos que participam da interface proteína-proteína entre Tripsina (cadeia A) e CsMir1 (cadeia B).

Resíduo/Posição	Cadeia	Área de superfície de acessibilidade relativa	Potencial Interatômico	<i>Hotspot Status</i>
GLU176	A	-1.99	-1.00	
LYS177	A	-2.14	-0.92	
PHE178	A	0.21	0.16	H
HIS179	A	-1.07	-0.57	
PRO181	A	0.39	-0.26	H
TRP182	A	0.11	0.26	H
VAL200	A	0.51	-0.06	H
ALA201	A	0.13	-0.50	H
PRO202	A	-1.07	-0.69	
GLY203	A	-0.98	-0.65	
TRP204	A	-0.48	0.14	H
LYS259	A	-1.57	-0.62	
LEU263	A	-2.60	-0.93	
LEU264	A	-3.10	-0.81	
GLY269	A	-1.71	-0.76	
LEU271	A	-1.77	-0.91	
GLN274	A	0.78	0.07	H
PRO275	A	1.15	-0.19	H
ALA276	A	-0.78	-0.51	
CYS277	A	1.28	-0.17	
LEU278	A	0.68	0.18	H
PRO279	A	-1.98	-0.95	
PRO280	A	-0.91	-0.76	
PHE283	A	-2.60	-0.91	
LYS3262	A	-1.88	-0.94	
MET363	A	-1.95	-0.72	

ARG364	A	-0.30	-0.53	
GLY365	A	-0.51	-0.66	
ARG366	A	1.74	0.33	H
TRP367	A	-0.69	-0.14	
LYS399	A	-0.88	-0.80	
ILE402	A	-0.58	0.01	
LYS403	A	-1.87	-0.93	
THR404	A	-2.59	-0.97	
SER78	B	-3.01	-0.88	
ASN92	B	-0.44	-0.68	
TYR93	B	1.59	0.34	H
ASN94	B	-2.29	-0.82	
ASP95	B	0.05	-0.57	H
SER96	B	0.21	-0.77	
LEU97	B	-1.81	-0.91	
GLY98	B	-1.46	-0.71	
TRP100	B	1.17	0.28	H
ALA113	B	-1.30	-0.88	
LYS114	B	-2.92	-0.90	
LEU116	B	0.37	0.01	H
LEU117	B	-1.51	-0.93	
LYS121	B	-2.55	-0.92	
GLU123	B	-1.97	-0.77	
VAL133	B	-2.47	-0.92	
CYS135	B	-0.97	-0.70	
ASP140	B	-1.03	-0.71	
SER141	B	-0.41	-0.76	
CYS142	B	-2.21	-0.89	
VAL143	B	1.51	-0.07	H
LYS144	B	0.64	0.29	H
LEU145	B	1.56	0.33	H

CYS146	B	1.07	-0.40	H
ASN147	B	0.04	-0.27	H
ARG164	B	0.46	0.14	H
ASP165	B	-0.71	-0.81	
ASP166	B	-2.27	-0.98	

ANEXO ii – Lista de resíduos que participam da interface proteína-proteína entre Tripsina (cadeia A) e CsMir4 (cadeia B). Em amarelo estão indicados os resíduos-chave da interação.

Resíduo/Posição	Cadeia	Área de superfície de acessibilidade relativa	Potencial Interatômico	<i>Hotspot Status</i>
PHE178	A	1.32	0.28	H
HIS179	A	-1.56	-0.90	
PRO181	A	-0.38	-0.58	
TRP182	A	0.70	0.24	H
VAL200	A	-0.97	-0.67	
ALA201	A	0.69	-0.52	H
PRO202	A	0.23	-0.54	
GLY203	A	-1.14	-0.59	
TRP204	A	-0.88	-0.02	
LYS221	A	-1.49	-0.64	
ASP231	A	-2.08	-1.00	
ILE233	A	-2.85	-0.96	
LYS259	A	-2.52	-0.95	
LEU263	A	-1.89	-0.95	
ASP264	A	-1.41	-0.97	
LEU265	A	0.24	-0.15	H
GLU266	A	2.15	-0.88	
ASP268	A	0.09	-0.53	H
GLU269	A	-0.56	-0.60	
GLY270	A	-0.44	-0.56	
LEU271	A	-0.79	-0.75	
GLN274	A	1.62	0.25	H
PRO275	A	0.45	-0.42	H
ALA276	A	-1.37	-0.90	
CYS277	A	-1.37	-0.90	H

LEU278	A	-1.97	-0.81	
PRO279	A	-2.48	-0.91	
PRO280	A	-1.44	-0.94	
PHE283	A	-2.22	-0.89	
ARG286	A	-1.76	-0.75	
LYS287	A	-1.96	-0.91	
LYS362	A	-2.02	-0.77	
MET363	A	-0.31	-0.14	
ARG364	A	1.11	0.07	H
GLY365	A	-0.59	-0.57	
ARG366	A	1.48	0.37	H
TRP367	A	-0.63	-0.15	
LYS399	A	-2.23	-0.88	
ILE402	A	-1.16	-0.41	
LYS403	A	-2.73	-0.92	
LEU5	B	-0.70	-0.44	
ASP6	B	-0.88	-0.63	
VAL7	B	0.41	-0.35	H
ASN8	B	-2.21	-0.94	
GLY9	B	-1.88	-0.77	
LYS11	B	2.17	0.87	
ALA23	B	0.81	-0.45	H
ILE24	B	1.58	0.21	H
TRP25	B	0.93	0.27	H
GLY26	B	-0.20	-0.57	
ALA27	B	-0.03	-0.78	
ASP52	B	-0.71	-0.55	
ILE133	B	-2.06	-0.89	
GLY134	B	-2.72	-0.94	
ASN135	B	-0.93	-0.81	
PHE136	B	0.67	-0.16	H

PRO137	B	-1.48	-0.95	
GLY138	B	-0.72	-0.65	
THR139	B	0.47	-0.38	H
ARG161	B	0.47	0.33	H
PHE163	B	1.39	-0.72	
GLU164	B	-2.50	-1.01	
ASP165	B	-2.78	-0.96	
ARG174	B	-2.37	-0.79	
ASP175	B	-1.93	-0.94	
ASP176	B	1.59	-0.28	H
GLU177	B	-1.02	-0.53	
PRO178	B	1.12	-0.13	H
ALA179	B	-1.68	-0.70	
PRO181	B	0.80	-0.30	H
VAL183	B	-0.71	-0.56	
THR192	B	-2.09	-0.99	
SER193	B	-0.55	-0.80	
VAL194	B	-2.09	-1.00	

Anexo iii - Lista de resíduos que participam da interface proteína-proteína entre o receptor T1R2-T1R3 (cadeia A) e CsMir1 (cadeia x).

Resíduo/Posição	Cadeia	Área de superfície de acessibilidade relativa	Potencial Interatômico	<i>Hotspot Status</i>
LEU37	A	-1.75	-0.30	
GLY39	A	-1.67	-0.57	
CYS62	A	-1.97	-0.76	
ASN63	A	-3.14	-0.76	
LEU70	A	-1.89	-0.30	
MET78	A	-0.71	-0.30	
TYR 131	A	-1.26	-0.55	
GLN 133	A	-2.67	-0.86	
TYR 134	A	-2.92	-0.76	
PRO 136	A	-3.19	-0.86	
VAL 138	A	-2.40	-0.30	
ALA 140	A	-3.34	-0.30	
SER 147	A	-3.26	-0.25	
GLU 148	A	-3.15	-0.90	
SER 158	A	-3.28	-0.82	
PHE 160	A	-2.27	-0.30	
LEU 161	A	-2.81	-0.84	
PRO 163	A	-3.07	-0.84	
GLN 164	A	1.84	-0.22	
VAL 165	A	-1.86	-0.36	
SER 168	A	-2.92	-0.82	
ALA 169	A	-2.39	-0.73	
ASP 172	A	-3.09	-0.90	
ASP 176	A	-3.00	-0.60	
PHE 180	A	-1.99	-0.39	
PRO 181	A	-2.84	-0.85	
THR 186	A	-3.31	-0.30	

SER 189	A	-2.28	-0.75	
ALA 196	A	-3.36	-0.30	
VAL 198	A	-1.64	-0.35	
LEU 200	A	-3.27	-0.65	
HIS 203	A	-0.65	-0.58	
PHE 204	A	-0.65	-0.54	
GLN 205	A	-0.23	-0.65	
TRP 206	A	0.57	-0.30	<i>H</i>
ASN 207	A	-2.52	-0.92	
TRP 208	A	-2.81	-0.67	
LEU 212	A	-1.79	-0.30	
SER 214	A	-3.31	-0.84	
ASP 215	A	-3.17	-0.85	
ASP 216	A	-3.19	-0.90	
ASP 217	A	-2.51	-0.86	
TYR 218	A	-3.16	-0.30	
ARG 220	A	-2.80	-0.58	
GLU 221	A	-2.53	-0.86	
SER 227	A	-3.09	-0.29	
GLY 234	A	-2.58	-0.69	
VAL 243	A	-0.56	-0.30	
GLN 251	A	-1.90	-0.30	
LYS 267	A	-3.19	-0.83	
THR 271	A	-0.92	-0.70	
SER 272	A	0.81	-0.46	<i>H</i>
ARG 274	A	0.71	0.17	<i>H</i>
LEU 283	A	-1.92	-0.30	
ASN 296	A	-2.00	-0.96	
PHE 297	A	-2.05	-0.89	
THR 298	A	-0.84	-0.82	
GLY 299	A	-1.10	-0.67	
PHE 300	A	-1.54	-0.83	
VAL 301	A	-1.13	-0.83	



PHE 326	A	-1.76	-0.89	
LEU 327	A	-0.90	-0.73	
GLY 328	A	-0.71	-0.30	
SER 335	A	-3.13	-0.30	
ASP 347	A	-1.47	-0.30	
ASN 355	A	-1.41	-0.62	
ASN 379	A	-3.11	-0.91	
VAL 419	A	-1.70	-0.30	
PHE 442	A	-2.14	-0.52	
GLN 469	A	-2.49	-0.92	
THR 477	A	-3.24	-0.87	
THR 480	A	-3.21	-0.86	
ILE 482	A	0.74	-0.06	<i>H</i>
SER 483	A	0.18	-0.68	<i>H</i>
VAL 485	A	-0.47	-0.69	
SER 486	A	0.80	-0.58	<i>H</i>
TRP 487	A	-0.86	-0.38	
THR 489	A	-0.46	-0.54	
SER 490	A	-3.16	-0.80	
ASN 491	A	0.15	-0.52	<i>H</i>
MET 492	A	-0.99	-0.49	
TYR 493	A	-1.32	-0.78	
VAL 494	A	1.02	-0.06	<i>H</i>
PRO 495	A	-1.45	-0.92	
ILE 496	A	1.55	0.21	<i>H</i>
SER 497	A	-1.21	-0.62	
MET 498	A	0.72	-0.06	<i>H</i>
VAL 499	A	-1.06	-0.58	
SER 500	A	-1.18	-0.79	
LYS 501	A	0.38	-0.57	<i>H</i>
SER 502	A	1.49	-0.45	<i>H</i>
CYS 503	A	-0.56	-0.74	
GLN 504	A	-0.78	-0.83	

PRO 505	A	1.11	-0.46	<i>H</i>
GLY 506	A	-1.66	-0.74	
GLN 507	A	-1.96	-0.94	
CYS 508	A	-1.95	-0.94	
LYS 509	A	-1.65	-0.30	
LYS 510	A	-3.13	-0.82	
PHE 519	A	-0.56	-0.30	
LEU 530	A	-1.04	-0.89	
ASN 531	A	-2.22	-0.97	
SER 533	A	-2.69	-0.82	
ASP 535	A	-1.86	-0.98	
GLU 536	A	-0.40	-0.88	
HIS 537	A	-1.10	-0.85	
PRO 538	A	-1.85	-0.95	
ASP 540	A	-1.78	-0.98	
TYR 549	A	-1.13	-0.66	
LYS 550	A	-1.65	-0.94	
ASN 551	A	0.70	-0.24	<i>H</i>
ASN 552	A	-1.58	-0.82	
PRO 553	A	-0.50	-0.47	
GLU 554	A	-0.81	-0.84	
LYS 555	A	0.58	-0.11	<i>H</i>
SER 556	A	-1.56	-0.79	
THR 557	A	0.67	-0.45	<i>H</i>
ALA 558	A	-1.75	-0.76	
ARG 559	A	-1.08	-0.56	
LEU 560	A	0.27	-0.06	<i>H</i>
PRO 561	A	-1.63	-0.91	
ARG 563	A	-1.86	-0.73	
GLN 1	X	-2.29	0.87	
LEU 2	X	2.68	0.87	
GLY 3	X	-1.84	-0.67	
THR 4	X	-2.74	-0.79	

SER 5	X	-3.18	-0.82	
GLU 6	X	-2.61	-0.89	
SER 7	X	-1.76	-0.30	
GLU 8	X	-2.16	-0.75	
PRO 9	X	-3.18	-0.30	
VAL 10	X	-1.79	-0.35	
LEU 11	X	-2.93	-0.87	
ASP 12	X	-2.55	-0.85	
VAL 13	X	-2.38	-0.85	
TYR 14	X	-3.14	-0.78	
GLY 15	X	-2.55	-0.67	
ASN 16	X	-3.18	-0.86	
LYS 17	X	-2.52	-0.83	
VAL 18	X	-1.59	-0.35	
GLU 19	X	-2.71	-0.88	
SER 20	X	-2.85	-0.84	
ASN 21	X	-3.03	-0.91	
LEU 22	X	-3.18	-0.86	
GLU 23	X	-2.84	-0.89	
TYR 24	X	-2.92	-0.77	
LYS 25	X	-3.31	-0.48	
LEU 26	X	-2.78	-0.86	
LEU 27	X	-2.83	-0.92	
GLU 28	X	-1.38	-0.49	
VAL 29	X	-2.86	-0.38	
LYS 30	X	-2.03	-0.82	
ASN 31	X	-2.36	-0.94	
GLY 32	X	-2.05	-0.76	
THR 33	X	-1.10	-0.91	
SER 34	X	0.48	-0.49	<i>H</i>
GLY 35	X	-2.72	-0.30	
PHE 37	X	-2.02	-0.30	
SER 38	X	-3.26	-0.83	

ILE 39	X	-0.84	-0.85	
HIS 40	X	-1.84	-0.91	
GLY 41	X	-0.96	-0.69	
GLY 42	X	-1.78	-0.71	
THR 43	X	0.14	-0.75	<i>H</i>
SER 44	X	-0.67	-0.86	
GLY 45	X	-2.06	-0.47	
GLU 46	X	-0.87	-0.90	
CYS 47	X	-0.05	-0.63	
PRO 48	X	-3.25	-0.88	
LEU 49	X	-0.52	-0.73	
ASP 50	X	-1.20	-0.98	
VAL 51	X	-1.82	-0.35	
VAL 52	X	-3.32	-0.30	
GLN 53	X	-2.39	-0.77	
LEU 54	X	-1.21	-0.88	
SER 55	X	-2.90	-0.82	
SER 56	X	-1.93	-0.85	
PRO 57	X	-1.96	-0.87	
THR 58	X	-2.00	-0.91	
GLU 59	X	-1.48	-0.92	
ARG 60	X	-0.63	-0.75	
ASP 61	X	0.31	-0.65	<i>H</i>
HIS 62	X	-1.72	-0.89	
TYR 63	X	-1.83	-0.82	
VAL 64	X	-3.27	-0.89	
ARG 65	X	-2.58	-0.73	
LEU 66	X	-3.39	-0.30	
LEU 67	X	-2.44	-0.82	
PRO 68	X	-1.84	-0.47	
PHE 69	X	-2.65	-0.81	
ASP 70	X	-3.18	-0.88	
ASN 71	X	-2.77	-0.89	

SER 72	X	-3.23	-0.76	
THR 73	X	-2.67	-0.87	
VAL 74	X	-1.14	-0.30	
ARG 76	X	-1.79	-0.39	
GLU 77	X	-3.17	-0.81	
SER 78	X	-2.55	-0.82	
THR 79	X	-2.93	-0.87	
ASP 80	X	-3.33	-0.85	
LEU 81	X	-1.86	-0.18	
ASN 82	X	-3.32	-0.89	
LEU 83	X	-2.08	-0.30	
ILE 84	X	-1.97	-0.71	
GLU 85	X	-2.10	-0.92	
PRO 86	X	-2.53	-0.91	
VAL 87	X	-1.86	-0.36	
TRP 88	X	-3.05	-0.66	
THR 89	X	-3.30	-0.89	
VAL 90	X	-2.64	-0.62	
GLY 91	X	-2.61	-0.68	
ASN 92	X	-2.26	-0.81	
TYR 93	X	-3.12	-0.77	
ASN 94	X	-1.20	-0.73	
ASP 95	X	-1.69	-0.92	
SER 96	X	0.69	-0.70	<i>H</i>
LEU 97	X	-1.69	-0.93	
GLY 98	X	-2.42	-0.72	
LYS 99	X	-2.33	-0.72	
TRP 100	X	-2.44	-0.61	
PHE 101	X	-1.36	-0.46	
LEU 102	X	-1.62	-0.18	
THR 103	X	-2.11	-0.68	
THR 104	X	-2.96	-0.52	
GLY 105	X	-1.71	-0.65	

GLY 106	X	-1.94	-0.65	
ILE 107	X	-2.53	-0.85	
ILE 108	X	-3.12	-0.89	
GLY 109	X	-1.81	-0.65	
HIS 110	X	-2.60	-0.86	
PRO 111	X	-3.21	-0.88	
LYS 114	X	-2.65	-0.83	
THR 115	X	-1.81	-0.43	
LEU 116	X	-2.03	-0.30	
LEU 117	X	-2.17	-0.66	
ASN 118	X	-2.24	-0.69	
TRP 119	X	-1.87	-0.12	
LYS 121	X	-1.66	-0.15	
LEU 122	X	-1.82	-0.18	
GLU 123	X	-2.11	-0.74	
LYS 124	X	-2.90	-0.85	
VAL 125	X	-3.27	-0.66	
SER 126	X	-2.86	-0.82	
VAL 127	X	-2.78	-0.89	
SER 128	X	-1.78	-0.78	
ILE 129	X	-3.11	-0.68	
TYR 130	X	-1.90	-0.30	
ASN 131	X	-2.26	-0.70	
LEU 132	X	-1.84	-0.30	
VAL 133	X	-3.23	-0.84	
HIS 134	X	-1.90	-0.18	
CYS 135	X	-2.60	-0.85	
PRO 136	X	-1.64	-0.47	
SER 137	X	3.21	-0.81	
VAL 138	X	-2.58	-0.87	
CYS 139	X	-3.00	-0.30	
ASP 140	X	-3.20	-0.85	
SER 141	X	-3.10	-0.78	

CYS 142	X	-3.33	-0.80	
VAL 143	X	-3.19	-0.87	
LYS 144	X	-2.83	-0.85	
LEU 145	X	-2.04	-0.66	
CYS 146	X	-3.25	-0.84	
ASN 147	X	-3.12	-0.30	
LYS 148	X	-1.55	-0.30	
VAL 149	X	-1.78	-0.36	
GLY 150	X	-1.96	-0.65	
ILE 151	X	-3.11	-0.87	
PHE 152	X	-3.07	-0.79	
TYR 153	X	-0.87	-0.80	
VAL 154	X	-0.62	-0.87	
ASP 155	X	-2.01	-0.79	
GLY 156	X	-2.02	-0.71	
VAL 157	X	-1.31	-0.94	
ARG 158	X	-3.12	-0.36	
ARG 159	X	-1.62	-0.80	
LEU 160	X	-1.86	-0.18	
VAL 161	X	-1.91	-0.36	
LEU 162	X	-3.10	-0.83	
VAL 163	X	-2.56	-0.86	
ARG 164	X	-2.50	-0.72	
ASP 165	X	-3.06	-0.86	
ASP 166	X	-2.60	-0.88	
ASP 167	X	-3.01	-0.86	
GLN 168	X	-3.01	-0.89	
PRO 169	X	-3.16	-0.87	
LEU 170	X	-1.97	-0.74	
ARG 171	X	-2.97	-0.71	
LEU 172	X	-1.90	-0.30	
VAL 173	X	-3.26	-0.87	
LEU 174	X	-1.67	-0.19	

PHE 175	X	-1.33	-0.33	
PRO 176	X	-2.98	-0.85	
ALA 177	X	-1.78	-0.83	
PRO 178	X	-2.71	-0.93	
ASN 179	X	-1.96	-1.00	
PRO 180	X	-2.28	-0.89	
SER 181	X	-1.88	-0.86	
ARG 182	X	-1.74	-0.79	
SER 183	X	-2.13	-0.88	
SER 184	X	-1.39	-0.84	
MET 185	X	-2.56	-0.85	



Anexo iv - Lista de resíduos que participam da interface proteína-proteína entre o receptor T1R2-T1R3 (cadeia A) e CsMir4 (cadeia x).