

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

GRACIETE BALBINO BATISTA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL *in silico* DE UMA PR-5 DO
TIPO OSMOTINA DE *Physalis angulata* COM POTENCIAL ATIVIDADE
FARMACOLÓGICA**

**Cuité- PB
2015**

GRACIETE BALBINO BATISTA

**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 apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande *Campus* Cuité como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadores: Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos

Prof. Dr. Rafael Trindade Maia

**Cuité-PB
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 791

B333a Batista, Graciete Balbino.

Análise estrutural e funcional in silico de uma PR-5 do tipo osmotina de *Physalis angulata* com potencial atividade farmacológico. / Graciete Balbino Batista – Cuité: CES, 2015.

57 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientador: Dr^a. Magnólia de Araújo Campos.
Coorientador: Rafael Trindade Maia.

1. PaOLP. 2. Adiponectina. 3. Receptor de
adiponectina. 4. Docking molecular. I. Título.

CDU 577.1

GRACIETE BALBINO BATISTA

ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL *in silico* DE UMA PR-5 DO TIPO OSMOTINA DE *Physalis angulata* COM POTENCIAL ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

Aprovada em: 19 de Junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos
Orientadora
UAE/CES/UFCG

Profa. Dra. Júlia Beatriz Pereira de Souza
Examinadora Interna
CES/UFCG

Prof. Dr. José Alixandre de Sousa Luis
Examinador Interno
CES/UFCG

**Cuité-PB
2015**

A minha família, amigos e orientadora, por me ajudarem e darem força quando mais precisei. Em especial a minha mãe, Graça, que me ensinou a lutar pelos meus sonhos e nunca desistir, um exemplo de mãe e de mulher, sempre será a minha fonte de inspiração.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Supremo Pai, Deus, pelo amparo em meio às angústias, por me ouvir com paciência e me conceder a vitória no momento certo.

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

Ao CNPq, pela concessão da bolsa PIBIC-2012/2013.

A minha Orientadora, grande amiga e mãe científica Prof. Dra. Magnólia de Araújo Campos, por todo conhecimento, paciência e conselhos a mim transmitidos. Por me “adotar” no meio científico, estimulando meu lado pesquisadora e por tantas vezes ao longo desses quase quatro anos se dispôs a me acolher e me amparar. Digna de admiração e muito carinho.

Ao Prof. Rafael Trindade Maia, UFCG/CDSA, Sumé-PB, pela orientação direta, disponibilidade e grande contribuição em parte substancial do presente trabalho, não seria possível sem sua grande ajuda.

A pesquisadora Dra. Marília Santos Silva, Embrapa Cerrados-DF, pela contribuição em minha formação acadêmica durante o acolhimento no estágio PIBIC-2012 e amizade formada.

Ao corpo docente do CES-UFCG-Cuité-PB, por me motivar a cada aula e conhecimento, ajudando a concretizar este sonho. De Gécilio a Rodrigo (primeira e última aula), vocês são os melhores.

A Rafaela Bezerra da Silva, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, pela co-orientação de IC, me ensinando os primeiros passos de *Docking* molecular.

A minha família, pelo apoio financeiro e emocional, em especial a minha mãe (Dona Graça) e a minha irmã (Joisciele) por compreenderem minha ausência em tantos momentos e me fortalecerem para sair em busca de meus sonhos. Foram e sempre serão por vocês todos os esforços. Ao meu pai (Seu João), por acreditar e me motivar mostrando orgulho a cada vez que fala “minha filha vai ser farmacêutica e tudo é mérito dela”, mas nada seria possível sem o apoio e amor de vocês. Amo vocês!

Ao meu grande amigo Guilherme da Cunha, por toda força, estímulo, amizade e carinho. Você sempre foi um incentivador de meus sonhos, que Deus permita ser sempre assim.

Aos colegas de curso, por me aturarem e compartilhar momentos, alegres ou não. Muito sucesso turma 2010.2!

Ao meu trio: Thalyta Mangueira, Francielly Macedo e Paola Batista, meu terno obrigada. A Thalyta, por estar sempre presente em minha vida ao longo desses cinco anos fazendo o que sabe de melhor, ser amiga! Você foi o anjo enviado por Deus, para ser minha irmã que não de sangue, te amo. A Francielly, por aturar minha brutalidade e não desistir de minha amizade, por cada gargalhada que nos induziu a dar mesmo nos dias e momentos mais difíceis. A Paola, pelo excesso de sensatez, cada conselho e abraço amigo. Minhas melhores alegrias e piores tristezas foram compartilhadas com vocês. Deus nos mantenha unidas em meio a essa amizade e companheirismo.

A família LBiotech, por tornar os anos de pesquisa e experimentos menos árduos. Em especial Glaúcia Medeiros, Cristiane Sousa, Rayane Abreu e Paula Sousa, os ensinamentos e paciência compartilhados estão sempre comigo.

A família Monteiro (Júlio Leonardo, Jean Carlos, Dona Dalva e Seu José), por me acolherem em seu lar, levo vocês em minhas lembranças.

Aos amigos Cuiteenses, pela diversão e companheirismo de sempre, em especial Carlos Emmanuel, Kameron Leal, Lucivânia Alves, Fabio Pontes, Lucivan Lucas, Ticiany Marques, dentre outros.

Aos amigos de infância e ensino médio, por compreender minha ausência e me apoiar sempre que preciso: Karol, Camila, Silmara, Renaly, Gerson, Edneide, Dany.

Aos Meus tios e tias, em especial minha segunda mãe e segundo pai, Cida Balbino e Marcos Balbino, por me adotarem por oito anos e me apoiarem sempre que necessário.

Muito Obrigada!

*“O mundo é para quem nasce para conquistá-lo,
e não para quem sonha que pode conquistá-lo,
ainda que tenha razão.”*

(Fernando Pessoa).

*“Uma oportunidade conduz diretamente a outra”
(A menina que roubava livros).*

RESUMO

ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL *in silico* DE UMA PR-5 DO TIPO OSMOTINA DE *Physalis angulata* COM POTENCIAL ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

Análises computacionais ou *in silico* mimetizam informações biológicas para proteínas deduzidas a partir de suas sequências gênicas. Estas análises vêm sendo amplamente utilizadas em Química Medicinal para o desenho racional de novos fármacos assistido por computador e representam poderosas ferramentas para investigar a estrutura e função de biomoléculas e seus respectivos complexos, quando existem estruturas proteicas experimentais disponíveis, geradas por cristalografia ou ressonância magnética, com alta similaridade com as sequências de aminoácidos de interesse. Devido a sua importância como proteína antimicrobiana de grande interesse para aplicações biotecnológicas, o objetivo deste trabalho foi realizar a análise estrutural e funcional comparativa de uma proteína PR-5 do tipo osmotina de *Physalis angulata*, a partir de sua sequência gênica, usando estratégias de bioinformática. O Programa Swissmodel foi utilizado para construir um modelo tridimensional para a PaOLP, por meio de modelagem molecular por homologia. O modelo foi validado pelas análises de ANOLEA, QMEAN6, GROMOS, Ramachandran e ProSa quanto a energia e localização de resíduos de aminoácidos. O modelo proposto para a PaOLP foi considerado estável e apresentou representação muito próxima da estrutura real da proteína. A estrutura da PaOLP apresentou sítio ativo com características funcionais típicas para a família de proteínas PR-5 do tipo osmotina. PaOLP se ligou fortemente ao receptor de adiponectina com interação comprovada por energias eletrostática, tendo três resíduos da PaOLP como *hotspot* da interação. PaOLP apresentou elevada similaridade de sequência de aminoácidos com a osmotina de fumo, agonista comprovado para o receptor de adiponectina humana, tendo os resíduos funcionais conservados entre elas. Portanto, PaOLP representa um bom alvo para ser explorado como agonista alternativo para o receptor da adiponectina, que está disponível e livre de propriedade intelectual.

Palavras-Chave: PaOLP. Adiponectina. Receptor de Adiponectina 1. *Docking* molecular.

ABSTRACT

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL *in silico* ANALYSIS OF A *Physalis angulata* OSMOTIN-LIKE PR-5 WITH POTENTIAL PHARMACOLOGICAL ACTIVITY

Computational or *in silico* analyzes mimic biological information for deduced proteins from its gene sequences. These analyzes have been widely used in Medicinal Chemistry for the rational design of new drugs assisted by computer and represent powerful tools to investigate the structure and function of biomolecules and their complexes, when there are available experimental protein structures generated by crystallography or magnetic resonance which share high similarity with the amino acid sequences of interest. Due to its importance as antimicrobial protein of interest to biotechnological applications, the aim of this study was to perform the comparative structural and functional analysis of a *Physalis angulata* osmotin-like PR-5 protein, from its gene sequence, using bioinformatics strategies. The Swissmodel program was used to construct a three-dimensional model for PaOLP through molecular modeling by homology. The model was validated by analysis of ANOLEA, QMEAN6, GROMOS, Ramachandran and ProSe in relation to the energy and location of amino acid residues. The proposed model for PaOLP was considered stable and presented very close representation of the real structure of the protein. The structure of the PaOLP active site presented typical functional features for the family of osmotin-like PR-5 proteins. PaOLP bind strongly to the adiponectin receptor whose interaction was proven by electrostatic energy, in which three residues of PaOLP were the hotspot of the interaction. PaOLP shared high amino acids sequence similarity with the tobacco osmotin, proven agonist to adiponectin receptor, possessing functional residues conserved between them. Hence, PaOLP is a good target to be explored as an alternative agonist to adiponectin receptor, which is available and free of intellectual property.

Keywords: PaOLP. Adiponectin. Adiponectin Receptor 1. Molecular Docking.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Imagem ilustrativa <i>in situ</i> da planta <i>Physalis angulata</i> no Horto Florestal Olho d'água da Bica, Cuité-PB (ABREU, 2011)	19
FIGURA 2 - Ilustração de vias de respostas à ativação dos receptores de adiponectina, ADIPOR1 e ADIPOR2. PPARs, Receptores activados pelo proliferador peroxissoma. MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno (Adaptado de www.medscape.com).....	23
FIGURA 3 – Adiponectina em suas configurações monomérica, dimérica e oligomérica (GUERRE-MILLO, 2004).....	24
FIGURA 4 - O processo de <i>docking</i> molecular permite avaliar a energia de ligação (ΔG) entre duas moléculas (http://dlab.cl/wp-content/uploads/2010/07/Docking-DeltaG.jpg?0cf197)	30
FIGURA 5 - Modelo 3D proposto para PaOLP. A - Representação em faixas (Ribbon) obtida através do VMD, mostrando os três domínios: Azul (I), Laranja (II) e Rosa (III), em amarelo estão destacadas as oito pontes dissulfeto. B - Sobreposição estrutural entre o modelo teórico (azul) e o molde PDB ID 2I0W (vermelho). Valor de RMSD (<i>Root mean-square deviation</i>) de 0,06 Å	34
FIGURA 6 - Validação da qualidade do modelo da PaOLP com base na estrutura secundária (DSSP). Em ANOLEA e GROMOS em verde destacam-se os resíduos em conformação favorável, o vermelho sinaliza os resíduos em conformações desfavoráveis. Para o QMEAN a curva segue em um gradiente de cores de azul (baixa energia) a vermelho (energia alta)	35
FIGURA 7 - Comparação do QMEAN6 <i>scores</i> obtidos para o modelo de PaOLP com os scores de estruturas do mesmo tamanho depositadas no PDB	36
FIGURA 8 - Diagrama de Ramachandran indicando 88,3% dos resíduos em regiões de conformação mais favorável (vermelho), 11,7% em regiões permitidas (amarela)	38
FIGURA 9 - Gráfico de validação do modelo 3D proposto para PaOLP pelo Programa ProSA. O ponto preto representa a PaOLP dentro da área azul, que indica os <i>scores</i> de outras estruturas de proteínas depositadas no PDB	39
FIGURA 10 - Imagem representativa da estrutura 3D de PaOLP, indicando o provável sítio ativo geralmente associado à ação antimicrobiana. A - Provável sítio de ligação, de acordo com o <i>cluster1</i> , previsto pelo Programa Ghecom. B - Representação da superfície do potencial eletrostático de uma fenda eletronegativa. Em azul, as regiões	

eletropositivas. Em vermelho, as regiões eletronegativas	40
FIGURA 11 - Resíduos que formam cavidades com potencial para ligação, de acordo com o Programa Ghecom. Em vermelho, os resíduos que fazem parte do <i>cluster1</i>	41
FIGURA 12 - Complexos mais bem ranqueados gerados pelo <i>Docking</i> entre ADIPOR1 e PaOLP (ligante), segundo os scores do Programa ClusPro	42
FIGURA 13 – Conformação do complexo A entre a PaOLP e o ADIPOR1, com destaque para os resíduos de interface no complexo (A), na PaOLP (B) e no ADIPOR1 (C). Os resíduos-chave (<i>hotspot</i>) da interação estão indicados coloridos em B e C	44
FIGURA 14 – Comparação do Complexo A da interação PaOLP-ADIPOR1 com a interação ADIPOQ-ADIPOR1 e NtOSM-ADIPOR1	45
FIGURA 15 - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de PaOLP com as proteínas homólogas osmotina <i>Solanum lycopersicon</i> (GenBank AAC64171.1) e osmotina de <i>Nicotiana tabacum</i> (gi 1709500), usando o programa ClustalW. Os pontos representam resíduos idênticos nas três proteínas. Aminoácidos sombreados em amarelo são similares, em vermelho é o resíduo Arg44 e em azul indicam o peptídeo de interação com ADIPOR1. Aminoácidos diferentes estão indicados sem sombreado ..	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Dados de <i>raw scores</i> e <i>Z-scores</i> da análise dos 6 parâmetros QMEAN para o modelo teórico de PaOLP	37
TABELA 2 - Parâmetros dos três primeiros complexos obtidos via <i>docking</i> PaOLP-ADIPOR1, usando o Servidor ClusPro.....	43
TABELA 3 - Lista de resíduos que participam da interface proteína-proteína entre ADIPOR1 (cadeia A) e PaOLP (cadeia D). Em laranja e azuis estão indicados os <i>hotspot residues</i> , sendo os laranjas aqueles resíduos-chave da interação. NH, <i>non hotspot</i> . H, <i>hotspot</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PaOLP	<i>Physalis angulata</i> Osmotin-Like Protein
OLPs	Osmotin-Like Protein
ADIPOR	Receptor de adiponectina 1
AMPC	Adenosina Monofosfato quinase
Apn	Adiponectina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
PDB	Protein Data Bank
ECA	Enzima conversora de angiotensina
VMD	Visual Molecular Dynamics
ANOLEA	Avaliação Ambiental Atômica Não-Local
QMEAN	Server for Model Quality Estimation
GroMos	Groningen Molecular
CES	Centro de Educação e Saúde
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1 PaOLP: a Proteína do tipo osmotina de <i>Physalis angulata</i>.....	18
3.1.1 <i>Physalis angulata</i> como planta fonte de fármaco.....	19
3.2 Osmotina de plantas uma subclasse de proteínas PR-5.....	20
3.3 Adiponectina: O hormônio de humanos mimetizado pela osmotina de <i>N. tabacum</i>...	22
3.3.1 Caracterização do tecido adiposo.....	25
3.4 Bases da interação proteína-proteína.....	26
3.5 Modelagem Molecular.....	27
3.6 <i>Docking</i> Molecular.....	29
4. METODOLOGIA.....	31
4.1.1 Modelagem de PR-5 de <i>Physalis angulata</i>	31
4.1.2 Validação do modelo.....	32
4.1.3 Predição do sítio ativo.....	32
4.2 <i>Docking</i> molecular.....	32
4.3 Análise comparativa da similaridade de sequências.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Caracterização da estrutura 3D da PaOLP.....	33
5.2 Qualidade do modelo proposto para PaOLP.....	34
5.3 Caracterização funcional <i>in silico</i> da PaOLP.....	39
5.3.1 Predição do sítio ativo da PaOLP.....	40
5.3.2 Caracterização da interação PaOLP-receptor de adiponectina 1.....	42
6 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A utilização da bioinformática tem sido de extrema importância na medicina moderna nesta era pós-genômica, onde o maior desafio é o desenho racional de estruturas moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos. A partir de sequências gênicas é possível prever as estruturas primárias, secundárias e terciárias de proteínas alvo, bem como sua interação com outras moléculas proteicas ou não. Estas análises *in silico* podem ser realizadas por meio de programas que mimetizam informações biológicas para as proteínas deduzidas, usando critérios matemáticos estatísticos, para investigar a estrutura e função de biomoléculas e seus respectivos complexos (NAMBRA; SILVA; SILVA, 2008). Dessa forma, o auxílio de computadores no desenvolvimento de novos fármacos tem proporcionado uma diminuição no número de estruturas sintetizadas e um aumento cada vez mais significativo do grupo de estruturas que são testadas, avaliadas e que se tornam medicamentos, contribuindo ainda para que este processo seja menos lento e dispendioso.

Na busca por novos genes que codificam proteínas com propriedades terapêuticas, em nosso Laboratório foi isolado recentemente um gene *PR-5* que codifica uma proteína do tipo Osmotina, denominada PaOLP (de *Physalis angulata* “Osmotin-Like Protein”), isolado a partir do genoma da planta *Physalis angulata*, presente no Horto Florestal do Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité da UFCG. A análise de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida de PaOLP revelou características conservadas dentro da família de proteínas PR-5, tendo sido diagnosticado o posicionamento correto de resíduos funcionais implicados na atividade antimicrobiana de membros desta família de proteínas (ABREU et al., 2012).

Na área da agricultura, proteínas PR-5 apresentam elevada importância como moléculas com atividade antifúngica potente contra fungos e Oomicetos fitopatogênicos e que estão envolvidas em respostas de plantas a diversos estresses bióticos e abióticos (THOMPSON et al., 2006). Entretanto, o grande potencial farmacológico de proteínas PR-5 foi revelado a partir da demonstração *in silico* e *in vivo* de que a proteína osmotina de fumo (*Nicotiana tabacum*) funciona como agonista do receptor de adiponectina (KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005; MIELE et al., 2011).

A adiponectina é uma proteína plasmática secretada pelos adipócitos de humanos com função relacionada ao aumento da sensibilidade de receptores a insulina, atividade protetora do sistema cardiovascular, ação antiaterosclerótica, tendo sua expressão e liberação diminuída em pessoas obesas. Sua relação com o sistema adiposo é inversamente proporcional, ou seja,

quanto mais gorduras apresentam no corpo, menos secretam adiponectina. Pessoas que apresentam os diferentes níveis de obesidade tendem a apresentar síndromes metabólicas, como diabetes II, hipertensão, aterosclerose e propõe-se que a diminuição da secreção de insulina esteja diretamente ligada a esse quadro (ZHOU et al., 2009).

Portanto, uma vez que a adiponectina está envolvida em diferentes vias fisiológicas, o estudo da comparação e predição da estrutura 3D da proteína codificada pelo gene *PaOLP* com a osmotina de fumo pode contribuir para a indicação de possível candidato a fármaco, direcionado para diminuir a obesidade ou aumentar a sensibilidade a insulina, diminuindo dessa forma o índice de Diabetes Mellitus tipo 2, por exemplo. Além disso, a osmotina pode ser considerada segura para o consumo humano uma vez que se encontra presente em diversas plantas, as quais muitas são utilizadas para consumo humano como: produtos hortícolas, frutas, nozes (HUANG et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar a análise estrutural e funcional comparativa de uma proteína PR-5 do tipo osmotina de *Physalis angulata*, usando estratégias de bioinformática.

2.2 Objetivos específicos

- Construir e validar um modelo tridimensional de PaOLP, por meio de modelagem molecular por homologia;
- Estudar a interação de PaOLP com um receptor de adiponectina (ADIPOR1), através de Docking Molecular;
- Demonstrar os resíduos conservados entre as estruturas primárias da osmotina de fumo, osmotina de tomate e PaOLP, usando o alinhamento múltiplo de sequências.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Um grande destaque na produção e procura de novos fármacos é dado à relação proteína-ligante, proteína-receptor. A relação entre uma osmotina codificada por genes de plantas e a adiponectina produzida pelo tecido adiposo de humano tem se mostrado de grande interesse para o setor farmacêutico.

3.1 PaOLP: a proteína do tipo osmotina de *Physalis angulata*

O gene *PaOLP* foi isolado por ABREU e colaboradores (2012) a partir do genoma de *Physalis angulata*, presente no Horto Florestal do Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité da UFCG.

De acordo com os autores, o gene PaOLP possui 744 pb de comprimento e codifica uma proteína PR-5 denominada de PaOLP (de *Physalis angulata* osmotin-like protein). A sequência codificadora da PaOLP não contém introns e é traduzida como uma proteína precursora de 247 resíduos de aminoácidos de comprimento, que deve ser processada, pela retirada de um peptídeo sinal composto pelos 21 primeiros aminoácidos e de um propeptídeo carboxi-terminal de 19 aminoácidos, em uma isoforma madura com 207 aminoácidos. PaOLP madura apresenta os 16 resíduos de cisteína conservadas que estão envolvidos em oito pontes dissulfeto características de proteínas PR-5. ABREU et al. (2012) relataram ainda que PaOLP compartilha significativa similaridade de sequência de aminoácidos, que variou de 62 a 97%, com proteínas antifúngicas do tipo PR-5 disponíveis no Banco de dados GenBank.

3.1.1 *Physalis angulata* como planta fonte de fármacos

Physalis angulata (Linnaeus 1753), pertence à família Solanaceae, é nativa da América do Sul e no Brasil são popularmente conhecidas como camapú, balãozinho, juá-de-capote, bucho-de-rã, camambu, mata-fome, bate-testa e balão-rajado (MUNIZ et al., 2011). É original dos Andes, mas atualmente cultivada em vários países, no Brasil as espécies dessa planta melhor se adaptam na Amazônia e no Nordeste (MATOS; 2002).

Trata-se de uma planta herbácea, ereta, medindo 40-70 cm de comprimento (LORENZI; MATOS, 2008), podendo alcançar dois metros se conduzida por tutoramento, sendo anual e reproduz-se por semente. As folhas são pubescentes, alternas, e as formas variam de obovada a ovada lanceolada ou amplamente ovalada a estreita elíptica (GONEM et

al., 2000; SILVA; AGRA, 2005). As flores são solitárias, cálice soldado até a metade e permanece nos frutos, a corola é gamopétala amarelada (1/4 do interior do tubo marrom), anteras azuladas ou violetas, dorsifixas (GONEM et al., 2000; SILVA; AGRA, 2005). Possui um ciclo relativamente curto, produzindo a maior quantidade de frutos (do tipo baga com cálice crescente) em média aos 90 dias após a sementeira. Os frutos são pequenos e redondos, com coloração alaranjada quando maduros envolvidos por sépalas em forma de balão (FREITAS; OSUÑA, 2006) (Figura 1).

FIGURA 1 – Imagem ilustrativa *in situ* da planta *Physalis angulata* no Horto Florestal Olho d'água da Bica, Cuité-PB.



Fonte: Abreu (2011). Arquivo pessoal.

O gênero *Physalis* constitui um grupo de plantas de grande importância econômica e social em países como Colômbia, México, China e Japão. Este gênero possui espécies que produzem frutos comestíveis, com alto valor nutricional (presença de vitaminas A e C) e grande importância farmacológica devido à bioprodução de substâncias complexas com diversas propriedades terapêuticas comprovadas (LORENZI; MATOS, 2002). A procura do mercado consumidor por pequenos frutos e novos insumos (fitofármacos) ou medicamentos (fitomedicamentos) oriundos de vegetais superiores é vasta e visa atender ao tripé: eficácia, segurança e qualidade. No país, essa procura busca incrementar as pesquisas científicas com plantas, em especial aquelas de origem endógena, como no caso da *P. angulata* (SILVA et al., 2005).

A *P. angulata* é amplamente utilizada na medicina popular como anticoagulante, antimutagênicas, anti-inflamatória, antisséptico, analgésico e no tratamento da diabetes, entre

outros (LIN et al., 1992, CHIANG et al., 1992). Outras atividades foram relatadas, como atividade moluscicida (SANTOS et al., 2003), citotóxicas contra cânceres de mama, fígado e boca (HSIEH et al., 2006), além de atividades imunomoduladoras (SOARES, 2006) e tripanossomicidas. Considerando os efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios da *P. angulata* e levando também em consideração que a obesidade e a sua associação com estímulos estressores como infecções cutâneas e respostas inflamatórias do indivíduo obeso, verifica-se a possibilidade do extrato do “camapu” atuar sobre o controle de a ingestão alimentar a fim de se encontrar novas formas de prevenção e tratamento da obesidade e das doenças associadas a ela (NAGAFUGI et al., 2004).

O uso de *P. angulata* na região amazônica se faz por meio do chá de sua raiz e folhas para o tratamento de patologias hepáticas e contra malária. No Pará, o chá da raiz é utilizado como analgésico (AMOROZO; GÉLY, 1988). As tribos indígenas da Amazônia utilizam a infusão das folhas como diurético e para diabetes, malária, e reumatismo (SCHULTES; RAFFAUF, 1990; DUKE; VASQUEZ, 1994) e usam o suco das folhas, interna e externamente como vermífugo (RUTTER, 1990; KEMBER; ELZA, 1995). No Brasil, a espécie ainda é empregada para tratar reumatismo crônico, dermatites e doenças de pele, bem como no combate a febre, vômito, problemas renais e de vesícula biliar (ALMEIDA, 1993).

A espécie *P. angulata* apresenta uma variável e extensa composição química, e grande parte desses componentes já foram isolados e caracterizados quimicamente, incluindo alcalóides (BASEY et al., 1992); flavonóides simples e glicosilados; ácidos graxos; carotenóides (ISMAIL; ALAM, 2001); terpenóides e esteróis (SHIM et al., 2002). O principal grupo de esteróis presente nessa espécie são as fisalinas, moléculas derivadas do ergostano do tipo 13,14-seco-16,24 ciclo ergostano, carboxilados em C-15, dentro do gênero *Physalis* já foram identificadas dezenove fisalinas (MAKINO et al., 1995), sendo que a espécie *P. angulata* possui em sua constituição as fisalinas B, D, E, F, G, H, I, J, K (CHIANG et al., 1992).

3.2 Osmotinas de plantas: uma subclasse de proteínas PR-5

Proteínas osmotinas são membros da família de proteínas PR-5, as quais fazem parte do sistema imune inato de plantas e foram inicialmente descobertas relacionadas com a patogênese (PR, de *Pathogenesis-Related*) em fumo (*Nicotiana tabacum*) (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). A família de proteínas PR-5 faz parte de um grupo maior de proteínas PR, classificado atualmente como PR-1 a PR-17 (VAN LOON; VAN STRIEN, 2002), e

compreende proteínas vegetais envolvidas em diversos processos tais como o desenvolvimento (NEALE et al., 1990), proteção contra estresse osmótico (LAROSA et al., 1992) e tolerância ao congelamento (NEWTO; DUMAN, 2000). Além disso, as PR-5 também permeabilizam a membrana plasmática de fungos e oomicetos (ABAD et al., 1996; YUN et al., 1997). A família PR-5 é multigênica, bastante conservada entre as plantas e animais (nestes é chamada de PR5L), tais como insetos e nematódeos, indicando que possuem um importante papel na rota evolutiva desses organismos (SHATTERS et al., 2006).

Portanto, a grande importância de se estudar proteínas PR-5 está na sua diversidade de funções. A maioria das proteínas PR-5 têm largo espectro específico de atividade antifúngica e isso se deve ao reconhecimento do alvo através de sua interação com os componentes da superfície celular do patógeno (NARASIMHA et al., 2003; VERONESE et al., 2003).

As osmotinas são proteínas PR-5 básicas de aproximadamente 26 kDa. A alta similaridade na seqüência peptídica de proteínas de diferentes espécies com a osmotina do tabaco faz com que essas proteínas sejam comumente denominadas na literatura de *osmotin-like proteins* (OLPs) (SINGH et al., 1987). Como outras proteínas da família PR-5, as osmotinas podem atuar permeabilizando as membranas celulares dos fungos, o que impede a manutenção do gradiente de pH, resultando em prejuízo para o desenvolvimento do patógeno (YUN et al., 1997) sendo capazes de inibir o crescimento *in vitro* de vários patógenos, que acometem plantas, caracterizadas como proteínas com atividade antifúngicas. Neste sentido, proteínas do tipo osmotinas possuem interesse para aplicações biotecnológicas na agricultura, visando resistência a fungos fitopatogênicos economicamente importantes, mas também têm sido estudadas como antifúngicos para doenças em humanos e animais, uma vez que osmotina induz apoptose em leveduras (NARASIMHA et al., 2003).

Atualmente preconiza-se e tem-se resultado da similaridade da osmotina com a estrutura da adiponectina, sendo esta capaz de mimetizar a ação dessa proteína humana, responsável pela perda de peso e redução da ocorrência de doenças cardíacas, diabetes e alguns tipos de tumores. A proteína osmotina tem um receptor específico de membrana codificado pelo gene ORE20 / PHO36 (YOL002c) que codifica uma proteína semelhante a um receptor transmembrana de sete domínios, receptor ao qual a adiponectina se liga para exercer sua ação. Em particular, o produto de ORE20 / PHO36 liga especificamente a osmotina na membrana plasmática e controla a morte celular através de uma via de sinalização RAS2. Estas observações abriram discussões para questões interessantes uma vez que o homólogo de mamífero de PHO36 é um receptor para o hormônio adiponectina humana

(ADIPOQ). A osmotina pode induzir fosforilação AMP quinase em miócitos C2C12 mamíferos via receptores de adiponectina (NARASIMHAN et al., 2005). Dessa forma a osmotina é vista, segundo Miele et al. (2011), como uma molécula útil para isolar um peptídeo que pode ser utilizado como um modelo para desenhar novas moléculas com funções agonista no receptor de adiponectina.

3.3 Adiponectina: O hormônio de humanos mimetizado pela osmotina de *N. tabacum*

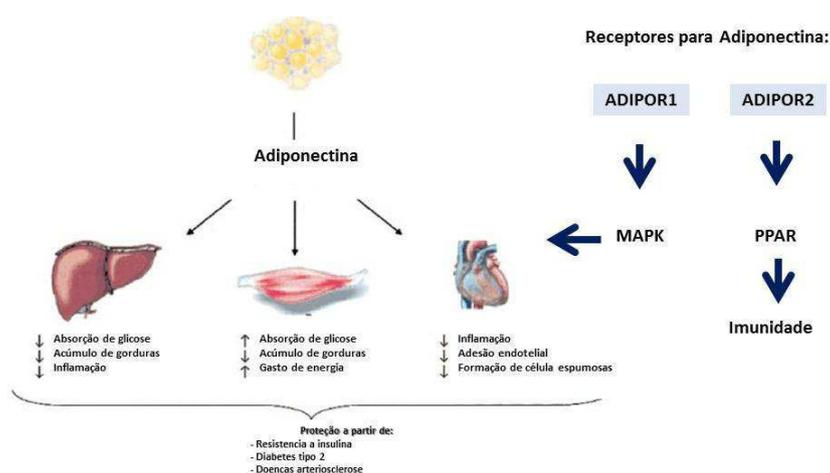
A adiponectina foi originalmente identificada como uma proteína expressa e produzida por adipócitos 3T3-L1 de rato (SCHERER et.al., 1995). Seu homólogo humano foi conhecido em 1996, recebendo a denominação de APM1 (*adipose most abundant gene transcript 1*), além de outras denominações como AdipoQ, GBP28 (*gelatin binding protein of 28kDa*), ApnQ e a sua designação mais usada adiponectina (Apn) (MAEDA et al., 1996). A curiosidade acerca da adiponectina começou quando se notou a diminuição de seus níveis séricos em pessoas obesas, o que parece paradoxal uma vez que esse hormônio é secretado pelos adipócitos. Seus níveis diminuem ainda mais quando se trata de pessoas com doenças coronárias, além de sua diminuição ter grande impacto na dessensibilização dos receptores de insulina. Da mesma forma, altos níveis sanguíneos de adiponectina têm sido relacionados positivamente com melhoras na sensibilidade à insulina e pela expressão de pelo menos dois de seus receptores da membrana celular: AdipoR1 e AdipoR2 (Figura 2). Indivíduos obesos tendem a apresentar níveis elevados do receptor AdipoR1, como forma compensatória aos reduzidos níveis de adiponectina sérica, comparados com pessoas eutróficas (BLÜHER et al., 2006).

Os dois receptores de adiponectina são conservados de levedura ao homem. Enquanto AdipoR1 foi encontrado constitutivamente expresso e em níveis mais abundantes em músculo esquelético, AdipoR2 foi expresso mais abundantemente no fígado de ratos. Estes dois receptores apresentam sete domínios transmembranas, mas são estrutural e funcionalmente distintos de receptores transmembranas acoplados a proteínas G. AdipoR1 e AdipoR2 parecem ser proteínas de membrana integrais; onde o N-terminal é interno e o C-terminal é externo - com topologia oposta a de todos os outros receptores transmembrana acoplados à proteína G já descritos (KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005).

Os receptores transmembrana são caracterizados por apresentar natureza proteica, sob a forma de cadeias polipeptídicas apresentando disposição ou domínios característicos.

Uma das configurações mais frequentes é a representada pelo dobramento do polipeptídeo em sete alças ou domínios, ou segmentos de aminoácidos, com as regiões hidrofóbicas em forma de α -hélice transmembrana, assumindo no interior da membrana um aspecto serpentiforme. Os domínios transmembrana encontram-se interligados por três alças hidrofílicas intracelulares, e para cada domínio transmembrana do tipo heptahelicoidal existe 20 a 30 aminoácidos hidrofóbicos. A fosforilação do receptor ocorre normalmente em sua parte citoplasmática. Além disso, as cadeias polipeptídicas dos receptores apresentam um grupo terminal amínico extracelular e um carboxílico intracelular. As extremidades amínicas extracelulares possuem resíduos de açúcar acoplados a aminoácidos específicos e eventualmente é a região capaz de interagir com um ligante (Carvalho et al., 1997).

FIGURA 2- Ilustração de vias de respostas à ativação dos receptores de adiponectina, ADIPOR1 e ADIPOR2. PPARs, Receptores activados pelo proliferador peroxissoma. MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno.



Fonte: Adaptado de www.medscape.com

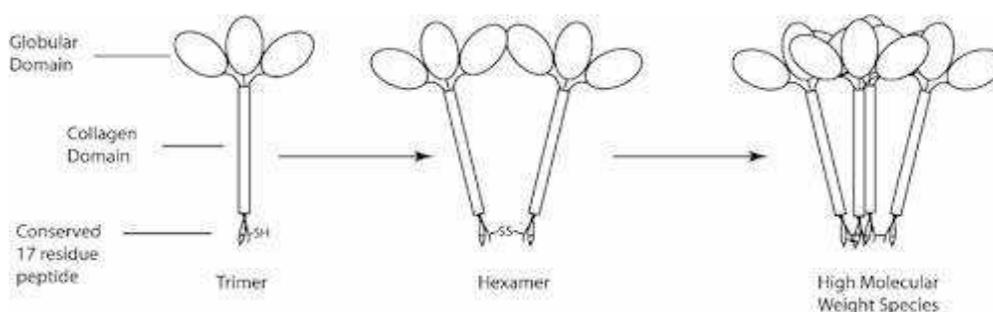
Acreditava-se que a adiponectina era produzida exclusivamente por adipócitos do tecido adiposo branco, mas estudos apontam que também é produzida pelo castanho. Codificada pelo gene presente no cromossomo 3q27 (VASSEUR et al., 2003), tendo 244 amino-ácidos dispersos por 4 diferentes domínios: um peptídeo sinalizador no N terminal, uma região variável (sem homologia entre diferentes espécies) (TSAO et al., 2002), uma região de colágeno (homóloga aos colágenos VIII e X) e um domínio globular no terminal C. Este último partilha homologia sequencial com o fator complemento C1q, sendo a adiponectina incluída na família de proteínas de domínio globular C1q, bem como homologia estrutural com a família de citocinas $TNF\alpha$, como comprovado por cristalografia de raio-X,

sugerindo uma ligação evolucionária entre os membros da família TNF α e a Apn (BERG et al., 2002).

Logo após sua síntese, sofre glicosilações e hidroxilações pós-traducionais originando oito diferentes isoformas. Onde, seis delas são glicosiladas nomeadamente no domínio colagénio (WANG et al., 2002). A Adiponectina glicosilada revelou-se funcionalmente mais potente que o seu equivalente bacteriano não glicosilado, sugerindo que estas alterações pós-tradução podem ser necessárias para uma ótima atividade biológica (NEDVIDKOVA et al., 2004).

A adiponectina apresenta como unidade básica três moléculas ligadas pelos domínios globulares. Estes trímeros ligam-se então pelos domínios colágenos em pares (Apn de baixo peso molecular) ou em oligómeros de quatro ou seis trímeros (Apn de alto peso molecular) (SCHERER et al., 1995) (Figura 3).

FIGURA 3 - Adiponectina em suas configurações monomérica, dimérica e oligomérica



Fonte: GUERRE-MILLO (2004).

As interações envolvendo tanto as ligações entre os domínios colágenos como os globulares são importantes para garantir a estabilidade e atividade das formas multiméricas (CHANDRAN et al., 2003). A adiponectina circulante no plasma é abundante (5 a 30 $\mu\text{g/mL}$) representando cerca de 0,01% das proteínas plasmáticas, sendo essa porcentagem tanto de Apn de alto peso molecular (fAd), como em fragmentos de domínio globular (gAd). Além da interferência da obesidade na secreção de adiponectina, diminuindo seu nível, outras substâncias também exercem esse efeito, como glicocorticóides, agonistas β -adrenérgicos e TNF α . Assim como seu aumento é observado na exposição ao frio, excisão das glândulas supra-renais (FRUEBIS et al., 2001). Atualmente, notou-se que a administração de adiponectina recombinante diminuiu a glicemia e a resistência à insulina em modelos de ratos obesos ou diabéticos. O efeito da adiponectina na melhoria da sensibilidade à insulina é

mediado, pelo menos em parte, por um aumento da oxidação de gordura por ativação da enzima adenina monofosfato quinase, em músculos esqueléticos, semelhante à ação sinalizada pela própria insulina. Enzima que também é ativada no fígado, resultando na redução da produção de glicose hepática.

3.3.1 Caracterização do tecido adiposo

O tecido adiposo é caracterizado como tecido conjuntivo constituído predominantemente por adipócitos, contendo também matriz extracelular, fibras nervosas, estroma vascular, leucócitos, fibroblastos e pré-adipócitos. Como função principal apresenta o armazenamento energético, o isolamento térmico, a proteção contra traumatismos e a secreção de proteínas e peptídeos bioativos que podem ter ações autócrinas, parácrinas e endócrinas (COSTA et al., 2006). Nos mamíferos distinguem-se dois tipos de tecido adiposo, o branco e o castanho, cada qual com suas funções fisiológicas. O tecido adiposo branco apresenta como função o armazenamento de energia na forma de triglicerídeos e em situações de déficit energético (como o jejum) fornece ácidos graxos para a circulação. O tecido adiposo castanho é especializado na termogênese a partir da oxidação de ácidos graxos, pela presença da proteína desacopladora da fosforilação oxidativa termogenina (UCP1) (TIRABY et al., 2003). Em 1987 foi identificada uma ação dos adipócitos no metabolismo dos esteroides sexuais (SIITERI, 1987). Em 1994, a descoberta da leptina veio estabelecer definitivamente o tecido adiposo como órgão endócrino (ZHANG et al., 1994).

Numerosas substâncias identificadas são produzidas pelo tecido adiposo o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), a interleucina 6 (IL6), os ácidos graxos não-esterificados (*non esterified fatty acids*; NEFA), a proteína estimuladora da acilação (*acylation stimulating protein*; ASP), a proteína quimiotática dos monócitos (*monocyte chemotactic protein 1*; MCP-1), a adiponectina, que constitui um novo alvo terapêutico na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares, resistina, visfatina, entre outras (AHIMA, 2006).

As adipocinas podem ser polipeptídeos ou fatores não proteicos, com ação em várias funções incluindo o sistema imune (fatores do complemento e haptoglobulina), endócrino (leptina, hormônios sexuais, fatores de crescimento), metabólico (ácidos graxos, adiponectina e resistina) e cardiovascular (angiotensina e inibidor da ativação do plasminogênio-1) (KOUGIAS, 2006).

A adiponectina é a adipocina mais abundante produzida pelo tecido adiposo, com ações relevantes no sistema cardiovascular e endócrino. Por outro lado, os níveis séricos de adiponectina estão alterados em várias doenças cardiovasculares e metabólicas (doença coronária, diabetes *mellitus* tipo 2), fazendo com que esse peptídeo apresente valor prognóstico.

3.4 Bases da interação proteína-proteína

Nesses últimos anos, vários métodos para prever interações proteicas foram propostos. Compreender a capacidade e as limitações desses métodos é fundamental para o desenvolvimento de abordagens melhores, e para a maior compreensão da natureza dessas interações. Elucidar redes de interações de proteínas é um dos principais objetivos da genômica funcional para organismos plenamente sequenciados, a identificação das interações de pares de domínios é um passo importante para a compreensão das interações proteína-proteína (EISENBERG et al., 2000).

O estudo da estrutura-atividade de possíveis moléculas terapêuticas tem ganhado força nas últimas décadas, desde a produção do primeiro computador de uso múltiplo e criação do *Protein Data Bank* (PDB) entre as décadas de 60 e 70. Nessa ocasião, foi descoberto o primeiro fármaco através de estrutura, um anti-hipertensivo cujo mecanismo de ação baseia-se na inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), o medicamento se encontra no mercado e ainda é o fármaco de primeira escolha para tratamento de hipertensão por alguns médicos, o captopril (LIMA, 2007).

As proteínas interagem umas com as outras de uma maneira altamente específica, e as interações proteína-proteína desempenham um papel fundamental em muitos processos celulares, em particular, a distorção de interfaces de proteína podem levar ao desenvolvimento de várias doenças. Para entender os mecanismos de reconhecimento das proteínas em nível molecular e para desvendar o quadro global de interações entre proteínas na célula, diferentes técnicas experimentais têm sido desenvolvidas. Algumas delas caracterizam as interações individuais de proteínas, enquanto outras avançaram para o rastreamento de interações em escala genômica (SHOEMAKER et al., 2007).

A predição de interações proteína-proteína é um campo combinado da bioinformática e da biologia estrutural numa tentativa de identificar e catalogar interações entre pares ou grupos de proteínas. Compreender estas interações é essencial para investigar as vias de sinalização intracelular. A partir de dados produzidos por técnicas experimentais, vários

métodos computacionais têm sido desenvolvidos com a finalidade de predição das interações proteína-proteína (MIRZAREZAEI et al., 2011).

As investigações sobre a estrutura espacial da proteína sugerem que a unidade fundamental da estrutura da proteína é um domínio, esta região de uma cadeia polipeptídica dobra-se em uma estrutura distinta que fornece a funcionalidade biológica da proteína (EKMAN et al., 2005).

3.5 Modelagem molecular

Trata-se de uma metodologia que visa determinar distâncias interatômicas e densidades eletrônicas de moléculas de interesse biológico, estudar o equilíbrio conformacional das biomoléculas definindo as conformações potencialmente bioativas, explicar racionalmente as atividades farmacológicas de substâncias e definir, confirmar ou descartar hipóteses para o mecanismo de ação em nível eletrônico e molecular de diversos fármacos, identificar interações específicas entre fármacos e receptores, definindo os grupamentos farmacofóricos (MOTTA NETO et al., 1992).

Define-se Modelagem Molecular como o conjunto de técnicas da Química Computacional que permite prever, dentre outras coisas, a estrutura e a energia de diferentes estados de um mesmo sistema molecular, assim como suas variações ao longo de uma reação química. Portanto, estruturas com tempos de vida muito curtos, tais como intermediários de reação ou estados de transição hipotéticos podem ser modelados e suas propriedades “medidas” com relativa facilidade, através da modelagem de sua estrutura permitem-se isolá-la e “congelá-la” virtualmente (SANT’ANNA et al., 1995).

A informação acerca da estrutura de uma proteína está armazenada na sequência de seu gene, presente nos cromossomos de um organismo. A estrutura nativa, que é uma macromolécula estável em condições fisiológicas formadas por ligações peptídicas entre aminoácidos, que apesar de ser estável não é estática; muitas vezes a função dependerá da flexibilidade desta molécula (CAPRILES et al., 2014). As proteínas na sua forma nativa devem apresentar características como baixa energia livre e uma relevância biológica, para que a cadeia assuma suas funções no meio onde se encontra.

Utiliza-se muito atualmente duas técnicas principais para determinação experimental da estrutura tridimensional de uma proteína, que pode ser via técnica de cristalografia por difração de raios-X e a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Entretanto, essas técnicas apresentam algumas limitações que variam de acordo com cada tipo de proteína,

como a demora no isolamento e purificação, assim como o tempo gasto para isso, que pode levar anos. São processos muito caros e alguns desses problemas podem tornar o método experimental não confiável.

Dessa forma, os métodos computacionais vêm se tornando cada vez mais utilizados para predição de proteínas, o que trará um maior embasamento para que a parte experimental seja realizada de forma mais adequada, visando um resultado previamente determinado. Os métodos de modelagem molecular atualmente disponíveis são *ab initio*, “*threading*” e modelagem por homologia ou comparativa (DORN, 2008).

A modelagem *ab initio* tenta prever 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 (NICOLAU JUNIOR, 2013). Essa metodologia requer três elementos: uma representação da geometria da proteína, uma função potencial e uma técnica de busca do espaço da superfície da energia livre (OSGUTHORPE, 2000). 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 *Threading* 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 de topologias existentes, por exemplo, SCOP (MURZIN et al., 1995). Esta metodologia é frequentemente usada com intuito de descobrir homologias remotas que não podem ser descobertas por alinhamento de sequências padrão (GIBAS; JAMBECK, 2001). Esse tipo de modelagem molecular *in silico* simula soluções de problemas científicos relacionados à estrutura proteica, elaborando informações relevantes a posicionamento e relacionamento dos aminoácidos para sua descrição, é um problema sofisticado que resulta em um elevado número de variáveis físico-químicas a serem manipuladas, sem contar as inúmeras variáveis conhecidas e desconhecidas envolvidas no enovelamento (MENETTI, 2006).

A modelagem por homologia 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. Trata-se de uma área multidisciplinar que visa estabelecer modelos confiáveis para estruturas biológicas e fármacos (MENETTI, 2006). A modelagem por essa

técnica é realizada utilizando uma ou mais proteínas-molde 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).

3.6 *Docking* molecular

Docking molecular ou ancoramento molecular é uma ferramenta para predição de possíveis interações entre as moléculas. Segundo Guedes, Magalhães e Dardenne (2014), para compreensão de mecanismos celulares é necessário determinar e compreender interações entre macromoléculas ou entre macromoléculas e uma pequena proteína ligante, podendo essa atuar como agonista/antagonista ou substrato/inibidor em determinado processo fisiológico.

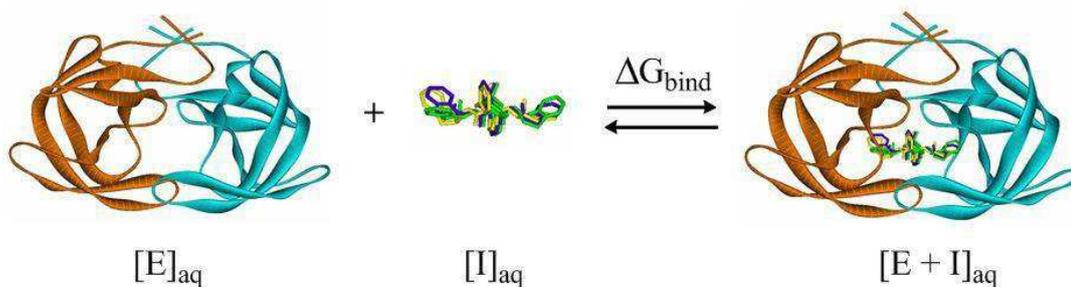
Este tipo de interação pode ocorrer entre proteínas, carboidratos ou outras moléculas. A previsão do modo de ligação e dos detalhes do reconhecimento molecular proteína-proteína e receptor-ligante assume cada vez mais papel de destaque em pesquisa associadas à saúde e à biotecnologia (FELTRIN et. al., 2010).

As metodologias computacionais de *docking* proteína-ligante estão baseadas no modelo chave-fechadura, proposto por Emil Fischer em 1894. Neste modelo, o receptor proteico é associado a uma “fechadura”, e seu sítio de ligação é considerado como o “buraco da fechadura”. A possível “chave da fechadura” é o ligante, e a interação entre o ligante e a proteína está relacionada a uma das possíveis ações de “abrir” ou “trancar” a porta. O modelo chave-fechadura, contudo, induzia uma interpretação de que a “fechadura”, representada pela molécula receptora, é rígida, porém no meio biológico tanto o ligante quanto a proteína são flexíveis, podendo modificar a sua conformação durante o processo de formação do complexo receptor-ligante. Uma visão mais adequada deste processo é denominada de encaixe induzido, onde tanto o ligante quanto a proteína se adaptam um ao outro durante o processo de reconhecimento molecular. De fato, a flexibilidade de uma proteína está diretamente associada à sua atividade, seja na catálise de reações enzimáticas, na transdução de sinais, no transporte através de proteínas de membrana, ou em mudanças conformacionais associadas a formas ativas e não ativas de proteínas (GUEDES et. al., 2014).

As associações entre moléculas biologicamente relevantes desempenham um papel central na transdução de sinais. Além disso, a orientação relativa de dois parceiros interagentes pode afetar o tipo de sinal produzido. O processo de *docking* molecular simula o curso natural da interação de um ligante no sítio ativo de um receptor por via de menor

energia por meio da complementariedade química entre as estruturas. Através dessa interação e por ferramentas de bioinformática, é possível estimar a energia média da interação receptor-ligante (SOUSA, 2011) (Figura 4).

FIGURA 4 - O processo de *docking* molecular permite avaliar a energia de ligação (ΔG) entre duas moléculas.



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

O *docking* é útil para prever tanto a força quanto o tipo de sinal produzido. Sendo essa técnica usada frequentemente para prever a orientação de ligação de pequenas moléculas candidatas a fármacos aos seus alvos proteicos a fim de prever a afinidade e a atividade da molécula menor. Desempenhando um papel importante no desenvolvimento racional de fármacos (FELTRIN et. al., 2010).

4 METODOLOGIA

4.1.1 Modelagem da PR-5 PaOLP de *Physalis angulata*

Para construção do modelo tridimensional da PR-5 foi adotado a técnica da modelagem por homologia, que se baseia na similaridade sequencial e estrutural entre proteínas homólogas e com isto utiliza uma ou mais estruturas de proteínas já elucidadas como referência para determinar a estrutura 3-D de uma determinada sequência-alvo primária (GIBAS; JAMBERCK, 2001). A modelagem por homologia parte da premissa de que as semelhanças estruturais entre famílias de proteínas são ainda mais conservadas que as semelhanças sequenciais. Deste modo, proteínas com homologia comprovada são admitidas como ideais para modelagem comparativa.

A sequência primária da PR-5 foi submetida a um alinhamento BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990) contra a base de dados do PDB (*Protein Data Bank*) na busca de uma estrutura de referência (*template*) para o alinhamento estrutural. O modelo foi construído com auxílio do servidor automático Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) (ARNOLD et al., 2006) utilizando a ferramenta *Automated mode*. A visualização do modelo foi realizada através do servidor VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (HUMPFREY et al. 1996). Após análise do *output* foi escolhido como *template* uma taumatina do tomate (*Solanum lycopersium*; PDB 2I0W), por apresentar os maiores valores de identidade (95%), similaridade (98%) e uma boa resolução (2.5Å), já que é aceitável uma resolução de até 3.5Å.

4.1.2 Validação do modelo

A estrutura tridimensional obtida teve sua qualidade local dos aminoácidos analisada pelos campos de força *ANOLEA* (MELO; FEYTMANS, 1998) e *QMEAN* (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011). A qualidade global da proteína foi determinada pelo *Dfire* (ZHOU; ZHOU, 2002) e *QMEAN6* (BENKERT et al., 2008). A qualidade estereoquímica foi acessada pelo diagrama de Ramachandran, o qual foi obtido através do *PROCHECK* (LASKOWSKI et al., 1993).

4.1.3 Predição do sítio ativo

Para localizar a região potencialmente catalítica da PaOLP, o modelo construído foi analisado 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.

4.2 Docking Molecular

Para o experimento de *docking* foi selecionado receptor de adiponectina humano 1 (ADIPOR1) do PDB (3WXV). A osmotina foi obtida do arquivo *.pdb* do modelo teórico gerado neste estudo. Para o docking proteína-proteína o receptor de adiponectina foi tratado como a molécula receptora e a PaOLP como a molécula ligante. Ambas 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).

4.2 Análise comparativa da similaridade de sequências

A sequência de aminoácidos deduzida da região madura de PaOLP foi comparada com outras proteínas PR-5 usando a ferramenta BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e, para visualização de resíduos conservados entre as proteínas PaOLP, osmotina de fumo e osmotina de tomate, foi realizado um alinhamento múltiplo de sequências usando o Programa ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

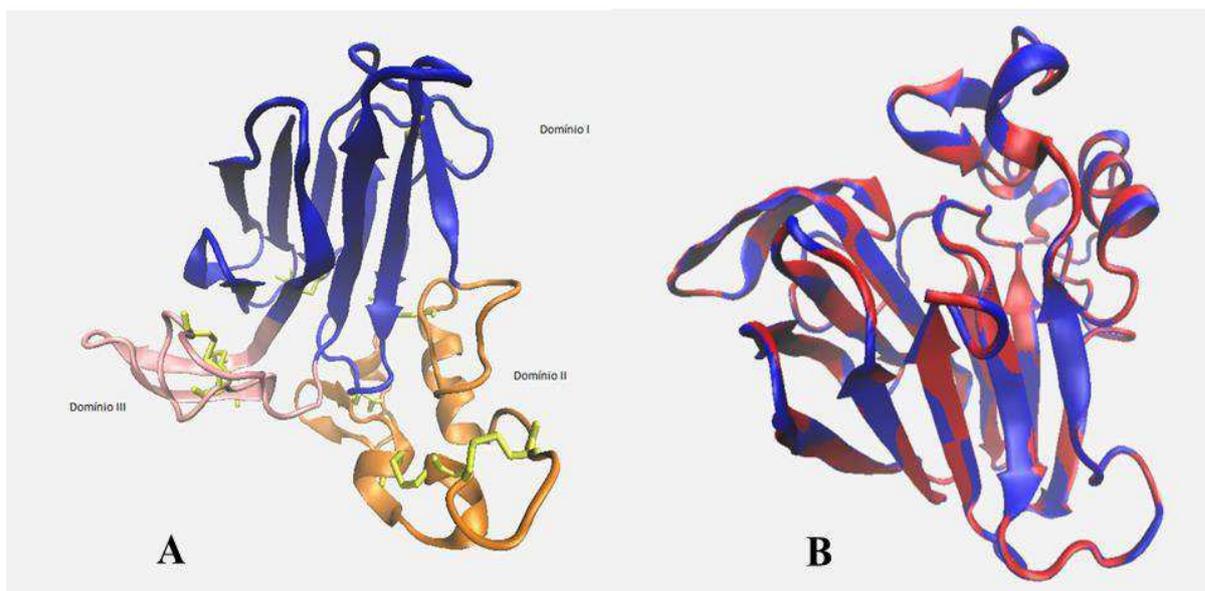
Este trabalho descreve, pela primeira vez, a caracterização estrutural e funcional comparativa *in silico* de uma proteína PR-5 do tipo osmotina isolada de *Physalis angulata*, denominada PaOLP. Trata-se de um estudo computacional de modelagem molecular a partir da sequência do gene *PaOLP*, onde a sequência primária da proteína deduzida madura foi examinada com potencial para fármacos, tendo como foco o seu envolvimento em interação com o receptor de adiponectina (ADIPOR1), considerando sua importância como agonista desse receptor, devido a sua homologia funcional ao hormônio humano adiponectina sensível a insulina.

5.1 Caracterização da estrutura 3D de PaOLP

Um modelo tridimensional *in silico* foi proposto para a proteína PaOLP deduzida madura usando a estratégia de modelagem comparativa, por meio do servidor Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) (ARNOLD et al., 2006) (Figura 5). A estrutura 3D de PaOLP proposta é composta por três domínios (I, II e III), característicos dos membros da família PR-5 do tipo osmotina (KOIWA et al., 1999). O domínio I é do tipo β -sanduiche, formado por fitas beta, apresentando também duas pontes dissulfeto e uma terceira ponte compartilhada com o domínio II. O domínio II é formado por quatro alfa-hélices e duas fitas beta, contendo além da ponte compartilhada com o domínio I mais três pontes de dissulfeto. Já o domínio III é composto por duas fitas-beta e duas pontes dissulfetos. A proteína possui em sua estrutura um total de oito pontes de dissulfeto, originadas pela presença das dezesseis cisteínas que a compõe (Figura 5A).

Este modelo foi proposto a partir da maior similaridade estrutural encontrada no PDB, que foi com a osmotina de *Solanum lycopersicon* (ID 2I0W), cuja sobreposição gerou uma energia de *DFire* de -225,42, determinante da qualidade global da estrutura e estabilidade (Figura 5B). Devido a este critério, o modelo proposto para PaOLP foi considerado ótimo por apresentar uma alta energia negativa. A energia de *DFire* é uma função de pontuação que baseia-se nos ângulos de orientação envolvidos em interações dipolo-dipolo (MURZIN, 1995). Para um modelo ser considerado bom, quanto menor sua energia melhor, indicando sua capacidade de se manter na forma ativa (RANGWALA et al., 2011). Isto porque, para proteínas, uma alta energia negativa é um requisito para manter-se em estado ativo sem a necessidade de gastar muita energia.

FIGURA 5 - Modelo 3D proposto para PaOLP. **A**- Representação em faixas (Ribbon) obtida através do VMD, mostrando os três domínios: Azul (I), Laranja (II) e Rosa (III), em amarelo estão destacadas as oito pontes dissulfeto. **B** - Sobreposição estrutural entre o modelo teórico (azul) e o molde PDB ID 2I0W (vermelho). Valor de RMSD (*Root mean-square deviation*) de 0,06 Å.



Fonte: Dados da pesquisa

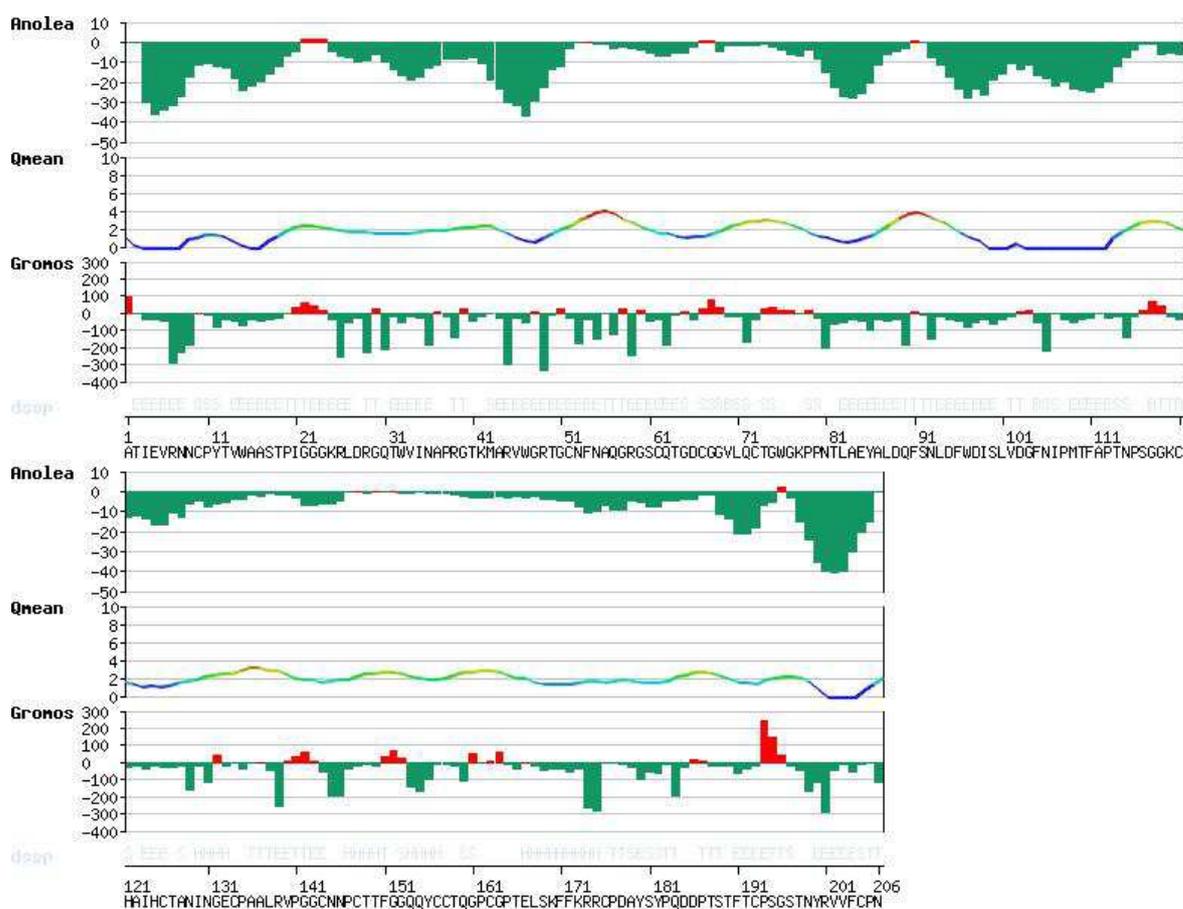
5.2 Qualidade do modelo proposto para PaOLP

Para validar a qualidade local dos aminoácidos na estrutura 3D proposta para PaOLP foram utilizados três métodos de avaliação da energia em função da estrutura secundária (ANOLEA, QMEAN e Gromos). Além desses, utilizou-se ainda o método Ramachandran que avalia a qualidade estereoquímica do modelo.

A análise dos dados obtidos a partir dos gráficos do ANOLEA (Avaliação Ambiental Atômica Não-local) para o modelo 3D da PaOLP revelou regiões que apresentam energia positiva, desfavoráveis, mas consideradas aceitáveis por estarem em regiões de alça, as quais muitas vezes não estão relacionadas às funções catalíticas da proteína (Figura 6). A importância da ANOLEA está na determinação de onde há aminoácidos em zonas de maior energia (em número e porcentagem) e quais são eles, além de calcular um valor de Z-score, que é ideal que seja negativo (UFRGS, 2011). Dessa forma, a ANOLEA indica a qualidade do modelo de acordo com a energia gerada por cada aminoácido na proteína. A observação de energia positiva no modelo nos revela condições desfavoráveis de energia no sistema, que podem estar associadas a erros ou regiões específicas de cada família de proteína (MELO;

FEYTMANS, 1998). Os dados da energia gerados por ANOLEA foram confirmados pelas análises de QMEAN e Gromos (Figura 5).

FIGURA 6 - Validação da qualidade do modelo da PaOLP com base na estrutura secundária (DSSP). Em ANOLEA e GROMOS em verde destacam-se os resíduos em conformação favorável, o vermelho sinaliza os resíduos em conformações desfavoráveis. Para o QMEAN a curva segue em um gradiente de cores de azul (baixa energia) a vermelho (energia alta).

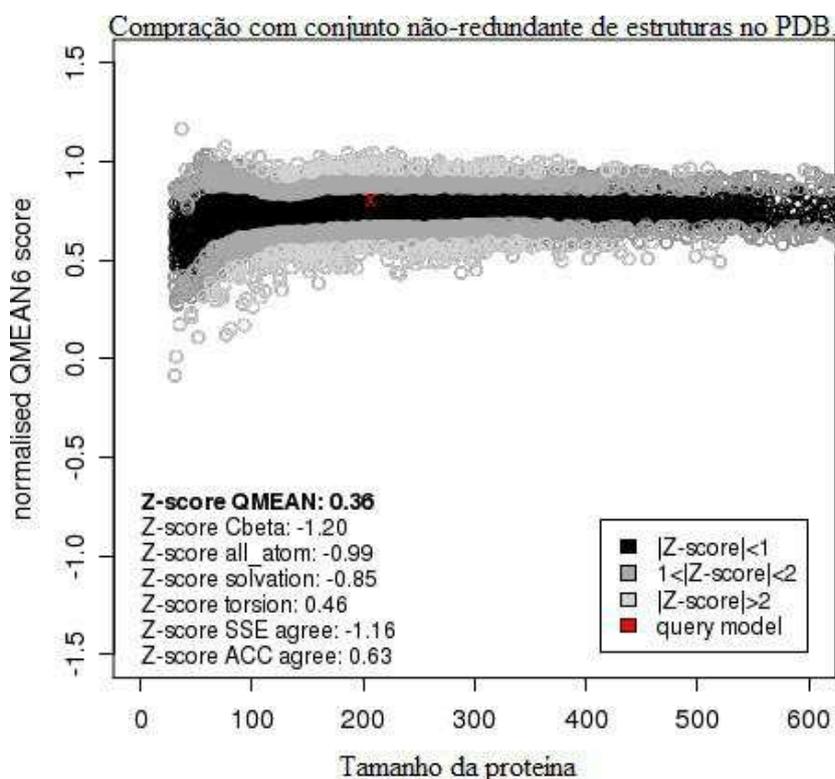


Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados da comparação dos seis parâmetros de QMEAN para o modelo proposto de PaOLP com os scores de estruturas do mesmo tamanho depositadas no PDB indicaram que a estrutura é satisfatória, já que revelou um valor de QMEAN *score* de 0,80 e um *Z-score* de 0,36 (Figura 7). Uma vez que a avaliação do QMEAN fornece um *score* que varia de 0 a 1, sendo os valores mais próximos de 1 correlacionados com melhor qualidade do modelo, e que o valor do *Z-score* refere-se a comparação do modelo em questão com outras estruturas depositadas de mesmo tamanho (UFRGS, 2011), o modelo de PaOLP é considerado ótimo do

ponto de vista termodinâmico e de qualidade estrutural, por apresentar valores próximos a proteínas já elucidadas experimentalmente, portanto, confiável.

FIGURA 7 - Comparação do QMEAN6 *scores* obtidos para o modelo de PaOLP com os *scores* de estruturas do mesmo tamanho depositadas no PDB.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na Tabela 1 estão apresentados os dados de *raw scores* e *Z-scores* da análise dos 6 parâmetros QMEAN para o modelo teórico de PaOLP, confirmando que o modelo é confiável. O *score* global do QMEAN é uma combinação linear de seis termos estruturais utilizando potenciais estatísticos. Os resultados do Qmean6 contêm os valores de energia para cada um dos seis parâmetros estruturais analisados, apresentando ainda um *score* médio. O *Raw score* corresponde ao *score* bruto calculado e o *Z-score* é a comparação do valor de Z (teste Z) com uma população amostral seguindo uma distribuição normal. O QMEAN6 é um *score* confiável para todo o modelo, que pode ser utilizado a fim de comparar e classificar qualitativamente os modelos experimentais e computacionais (BENKERT et al., 2008).

TABELA 1 - Dados de *raw scores* e *Z-scores* da análise dos 6 parâmetros QMEAN para o modelo teórico de PaOLP.

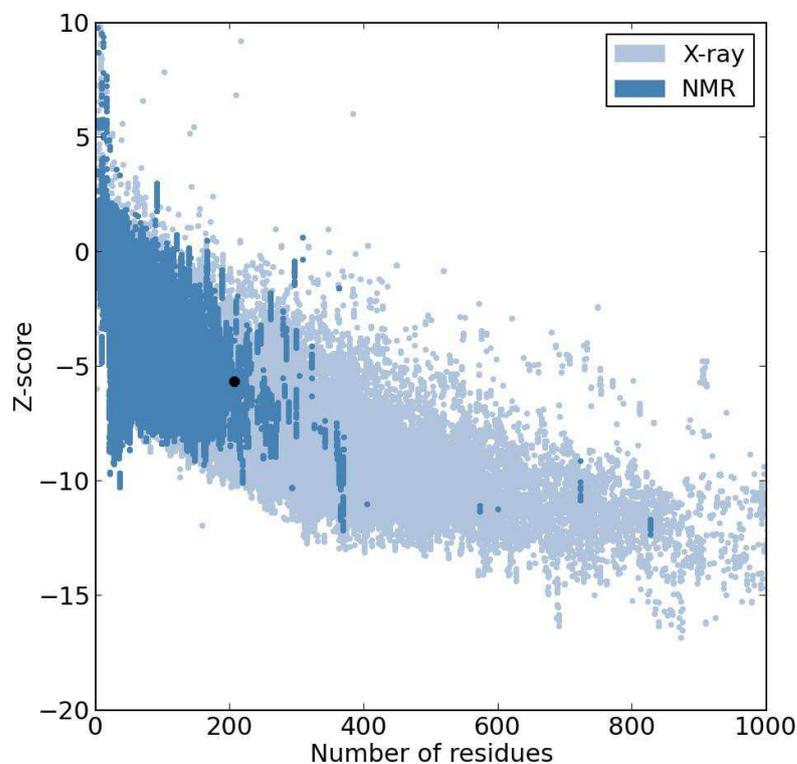
Score	Raw score	Z-score
Energia de interação C-beta	-67.37	-1.20
Energia de todos os pares de átomos	-4850.08	-0.99
Energia de solvatação	-14.71	-0.85
Energia das torsões angulares	-64.85	0.46
Conformação de estrutura secundária	75.8%	-1.16
Acessibilidade ao solvente	83.1%	0.63
QMEAN6 score	0.804	0.36

Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com o diagrama de Ramachandran para o modelo de PaOLP, 88,3% dos resíduos adotaram uma conformação energeticamente favorável, ou seja, não apresentaram impedimento na sua conformação estereoquímica (Figura 8). Os aminoácidos que correspondem às folhas betas e alfa-hélices estão localizados em regiões tidas como favoráveis, há alguns aminoácidos que fazem parte de regiões de alça ou *loops* em regiões menos favoráveis e permitidas, nas regiões proibidas não se encontra nenhum aminoácido do modelo, com exceção dos resíduos de glicina (representados em triângulos no diagrama) o que é considerado aceitável uma vez que a estrutura peptídica desse aminoácido, cadeia lateral simples, não provoca impedimento estereoquímico que possa vir a atrapalhar a conformação da proteína (Figura 8).

O gráfico de Ramachandran representa a conformação do esqueleto da cadeia polipeptídica e é descrito pela enumeração dos valores de Φ (phi) e ψ (psi) para cada resíduo. Entre o carbono alfa e o grupo amina de um peptídeo tem-se um ângulo de torção Φ , entre o carbono alfa e o carbono beta tem-se um ψ e é através desses ângulos que se determina o quanto a molécula em estudo pode se conformar sem que haja formação de regiões desfavoráveis (LASKOWSKI et al., 1993).

FIGURA 9 - Gráfico de validação do modelo 3D proposto para PaOLP pelo Programa ProSA. O ponto preto representa a PaOLP dentro da área azul, que indica os *scores* de outras estruturas de proteínas depositadas no PDB.



Fonte: Dados da pesquisa.

Portanto, os resultados obtidos através dos métodos de validação da estrutura proposta para PaOLP confirmaram o modelo como válido e confiável, sem a necessidade de refinamento de estruturas, já que o mesmo se mostrou dentro dos padrões e pode ser considerado um modelo de representação bastante próxima da estrutura real da proteína.

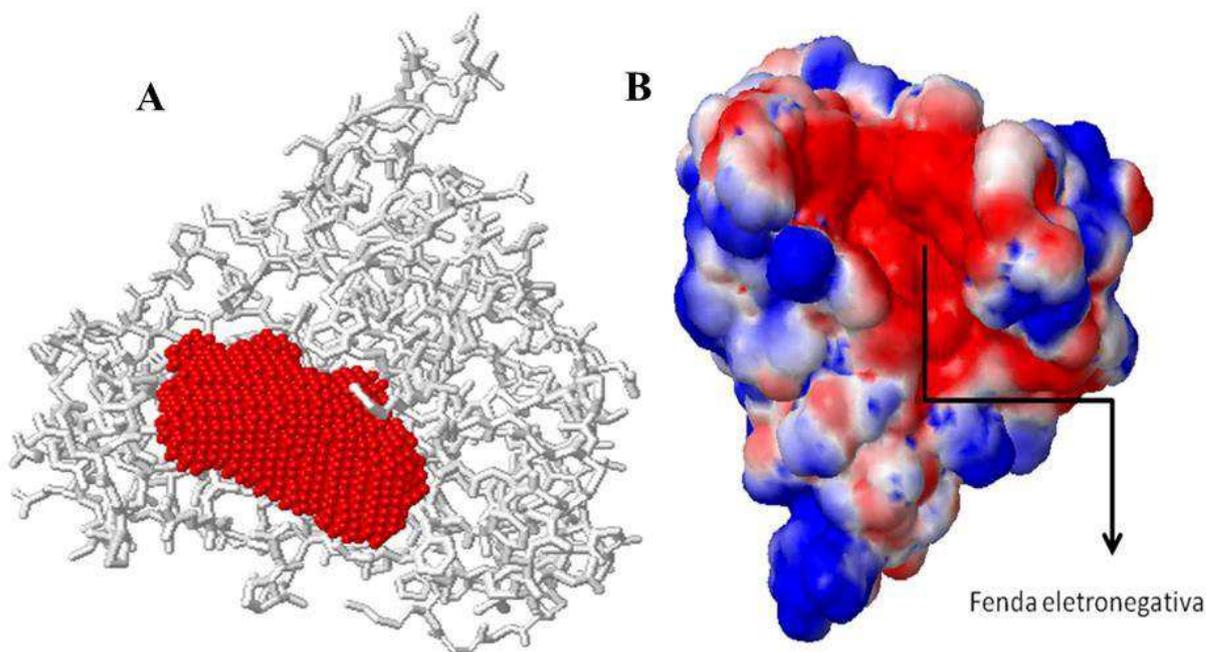
5.3 Caracterização funcional *in silico* da PaOLP

A estrutura da PaOLP gerada neste trabalho foi testada para demonstrar por métodos computacionais sua potencial atividade biológica, usando os critérios da predição de um sítio ativo funcional e da caracterização da interação desta proteína com um receptor de adiponectina humana.

5.3.1 Predição do sítio ativo da PaOLP

A busca pelo sítio ativo da PaOLP tem sua importância quanto a caracterização da potencial atividade desta proteína. Como resultado da análise de Ghecom para predição de sítio ativo, cinco *clusters* foram gerados com possíveis cavidades na superfície da estrutura. O *cluster1* apontou um sítio catalítico na região interdomínios da PaOLP (Figura 10A). A localização deste sítio sobrepõe-se a fenda eletronegativa desta proteína (Figura 10B). Este dado é interessante uma vez que, segundo Nair et al. (2010), a presença da fenda eletronegativa representa um forte indicativo de atividade antimicrobiana para proteínas da família PR-5.

FIGURA 10 - Imagem representativa da estrutura 3D de PaOLP, indicando o provável sítio ativo geralmente associado à ação antimicrobiana. **A**- Provável sítio de ligação, de acordo com o *cluster1*, previsto pelo Programa Ghecom. **B**- Representação da superfície do potencial eletrostático de uma fenda eletronegativa. Em azul, as regiões eletropositivas. Em vermelho, as regiões eletronegativas.

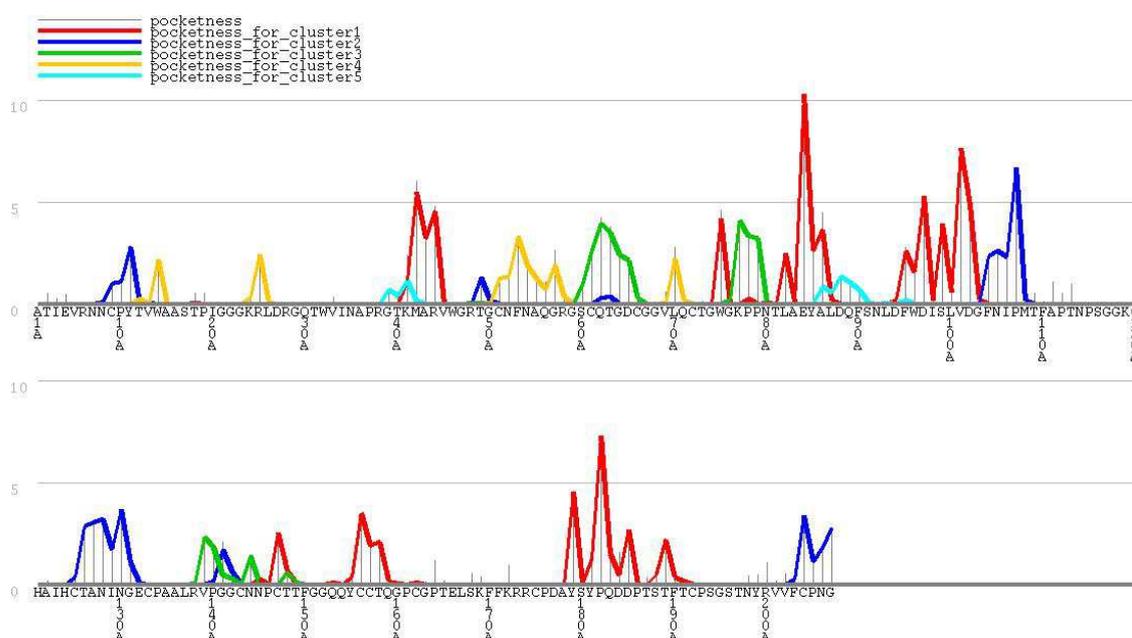


Fonte: Dados da pesquisa.

Dos cinco *clusters* gerados na Figura 11, os aminoácidos de convergência do *cluster1* foram aqueles que mais apresentaram capacidade de formar possíveis cavidades de ligação, indicados na Figura 11 como picos em vermelho. 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, a região eletronegativa da PaOLP representa uma evidência *in silico* de que esta proteína provavelmente apresenta atividade por ligação a outras moléculas (KOIWA et al., 1999; GHOSH; CHAKARABARTI, 2008; THOMPSON et al., 2006).

FIGURA 11 - Resíduos que formam cavidades com potencial para ligação, de acordo com o Programa Ghecom. Em vermelho, os resíduos que fazem parte do *cluster1*.



Fonte: Dados dessa pesquisa.

Com base no *Cluster 1* (Figura 11, em vermelho), os aminoácidos responsáveis pela formação da fenda do sítio ativo que possuem capacidade de ligação a outras moléculas são: M42, R44, W75, L82, E84, A86, F95, D97, S99, V101, D102, C144, C156, T158, Y179, D182, D185 e T189. Evidências para atividade de ligação a ligantes do tipo glucana para proteínas PR-5 já foram demonstradas para vários membros dessa família de proteínas antimicrobianas, incluindo uma proteína PR-5 de gengibre (NAIR et al, 2010), a proteína PtTLP de *Poncirus trifoliata* (ABREU, 2015), entre outras. Essa fenda eletronegativa presente em proteínas PR-5 é responsável pelo mecanismo de atividade de beta-glucanase, bem como a possível área de interação com o receptor de adiponectina humano (YAMAUCHI et al., 2003).

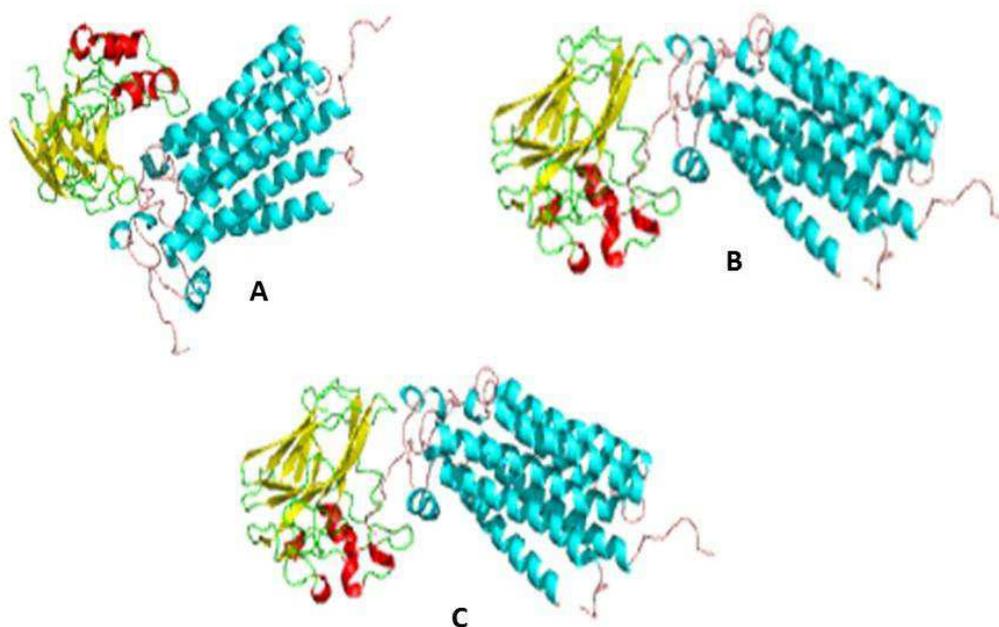
Por esta razão, um *Docking* molecular PaOLP-glucanas foi realizado, onde a PaOLP foi tratada como receptor. Como resultado, aminoácidos do sítio ativo de PaOLP descrito

neste trabalho se ligam especifica e significativamente às 1,3- β -glucana, 1,4- β -glucana e 1,6- β -glucana (Dados não mostrados). Portanto, esta é uma forte evidência de que o sítio ativo de PaOLP é possivelmente funcional para a atividade de β -glucanase. Esta informação é de grande importância para aplicações biotecnológicas na agricultura, pelo potencial uso na engenharia de plantas para resistência de plantas a Oomicetos, fitopatógenos do tipo fungos que causam grandes danos nas principais culturas economicamente importantes, visto que eles apresentam β -glucana como principal constituinte de sua parede celular (BLASCHEK et al., 1987; CLAVAUD; AIMANIANDA; LATGE, 2009).

5.3.2 Caracterização da interação PaOLP-receptor de adiponectina

Com o intuito de caracterizar a atividade biológica de PaOLP pela interação com o receptor de adiponectina, bem como determinar se a interação ocorria no sítio ativo e quais os resíduos envolvidos, um *docking* do tipo proteína-proteína foi realizado para as proteínas ADIPOR1 (receptor de adiponectina 1) e a PaOLP, que foi tratada como ligante, usando o Servidor ClusPro. A análise visual dos três primeiros complexos gerados revelou que PaOLP se liga ao ADIPOR1 (Figura 12).

FIGURA 12 - Complexos mais bem ranqueados gerados pelo *docking* entre ADIPOR1 e PaOLP (ligante), segundo os scores do Programa ClusPro.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os parâmetros dos três complexos demonstrados na Figura 13 estão listados na Tabela 2, ressaltando que o complexo A teve uma amostragem significativamente maior, com 137 membros, do que os demais, com 79 e 50 membros. Nos três casos, os *scores* de energia obtidos foram negativos, sendo considerada como amostra central a média dos membros do complexo comparado com a amostra de menor energia (Tabela 2). Com base nos critérios do Servidor, este dado representa um importante indicativo da existência de uma forte afinidade entre estas duas proteínas complexadas, especialmente no complexo A (COMEAU et al., 2004).

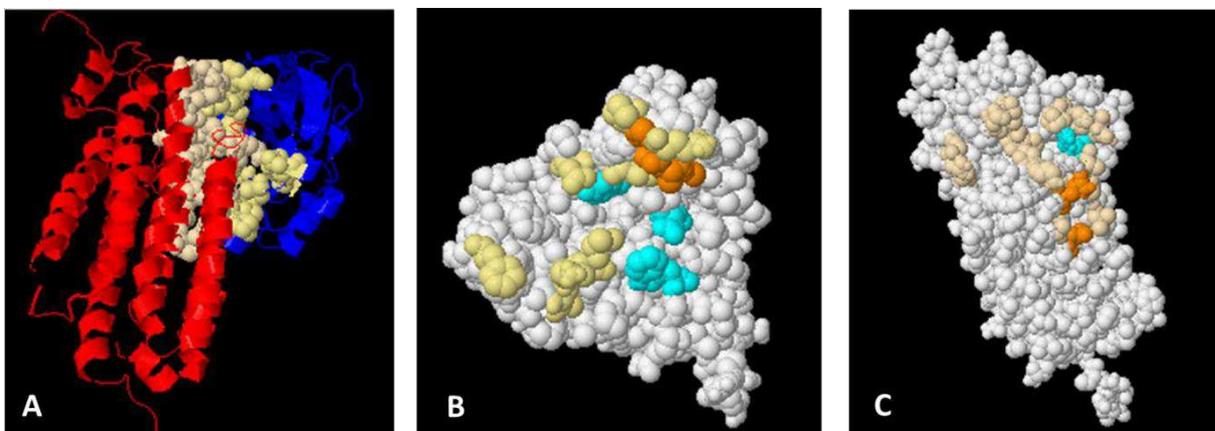
TABELA 2 - Parâmetros dos três primeiros complexos obtidos via *docking* PaOLP-ADIPOR1, usando o Servidor ClusPro.

Complexos	Membros	Amostra	Score
A	137	Central	-156,5
		Menor Energia	-206,5
B	79	Central	-164,1
		Menor Energia	-171,9
C	50	Central	-144,0
		Menor Energia	-153,0

Fonte: Dados da pesquisa.

Por esta razão, a conformação do complexo A foi escolhida para buscar resíduos de interface em ambas as proteínas, os quais foram classificados quanto à interação como aqueles que estão interagindo e não interagindo (Figura 13). Entre os resíduos que estão interagindo, a análise apontou 02 resíduos da PaOLP como aminoácido-chave (*hotspot*) da interação PaOLP-ADIPOR1 (Cys156 e Thr158). Além disso, a análise indicou também (em branco) aqueles que não participam da interface (Figura 13B e C).

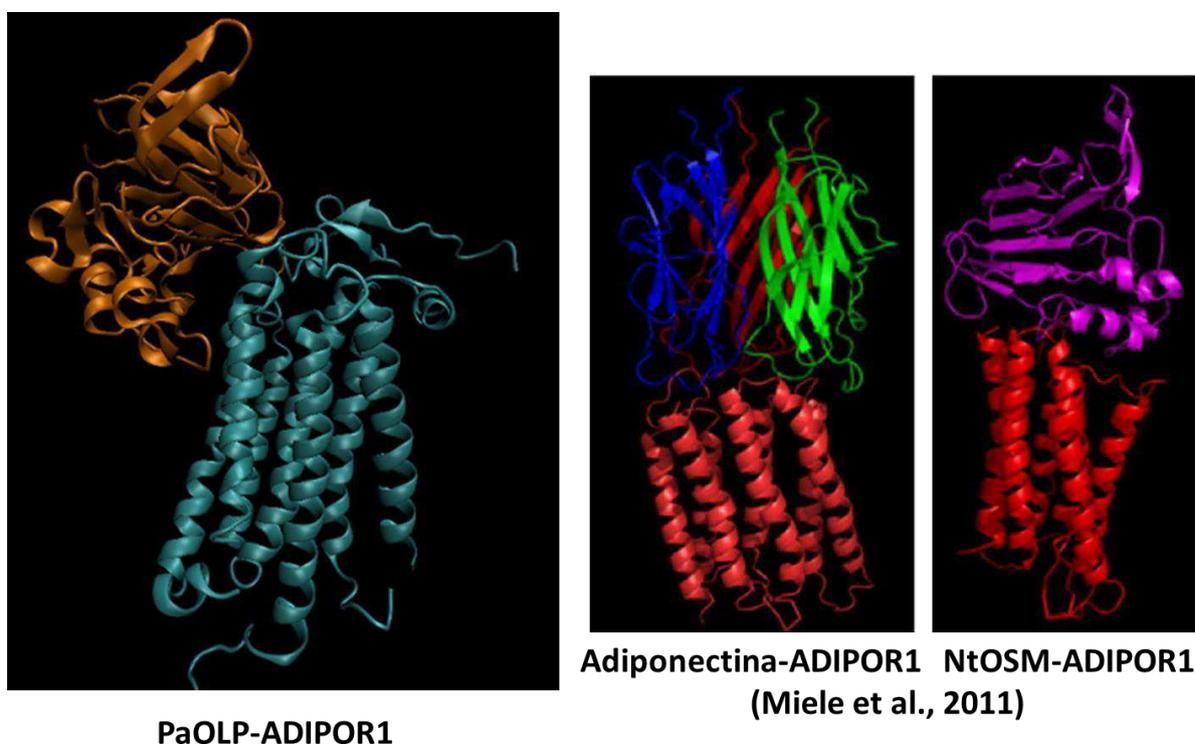
FIGURA 13 – Conformação do complexo A entre a PaOLP e o ADIPOR1, com destaque para os resíduos de interface no complexo (A), na PaOLP (B) e no ADIPOR1 (C). Os resíduos-chave (*hotspot*) da interação estão indicados coloridos em B e C.



Fonte: Dados da pesquisa.

Nas ilustrações da Figura 14, o complexo A da interação PaOLP-ADIPOR1 foi apresentado com destaque visual e comparativo com relação aos complexos do ADIPOR1 com as proteínas adiponectina e osmotina de *N. tabacum*, demonstrados por Miele; Constantini; Colonna (2011). A partir das imagens dos três complexos foi possível observar que as interações ocorreram nas mesmas regiões do receptor, ou seja, nas alças extracelulares, e das proteínas ligantes. Portanto, esta demonstração didática dá suporte a indicação anterior da existência de uma forte interação entre PaOLP-ADIPOR1, posicionada corretamente, quando comparado com os complexos ADIPOQ-ADIPOR1 e NtOSM-ADIPOR1.

FIGURA 14 – Comparação do complexo A da interação PaOLP –ADIPOR1 com a interação ADIPOQ-ADIPOR1 e NtOSM-ADIPOR1.



Fonte: Dados da pesquisa

Na Tabela 3 estão listados os 32 resíduos de aminoácidos presentes em ambas as proteínas e que participam da interface PaOLP-ADIPOR1. Destes, 17 resíduos estão localizados na cadeia A de ADIPOR1 e 15 pertencem a cadeia D de PaOLP. Além disso, 08 (oito) resíduos do sítio ativo de PaOLP estão participando desta interação (M42, W75, D102, C156, T158, Y179, P182 e D185), indicando que a interação com ADIPOR1 aconteceu no sítio ativo de PaOLP. Destes oito, 3 são resíduos *hotspots*.

Como é possível observar a partir da Tabela 3, a ligação entre as proteínas ocorreu preferencialmente na cadeia A de ADIPOR1, que está representada por alças extracelulares nas Figuras 12 e 14. Este dado está de acordo com MIELE; COSTANTINI; COLONNA (2011), que demonstraram que a interação entre a osmotina de fumo e ADIPOR1 ocorreu através de três ligações de H e quatro pontes salinas, onde a osmotina interagiu com o ADIPOR1 por alças extracelulares.

TABELA 3 - Lista de resíduos que participam da interface proteína-proteína entre ADIPOR1 (cadeia A) e PaOLP (cadeia D). Em laranja e azuis estão indicados os *hotspot residues*, sendo os laranjas aqueles resíduos-chave da interação. NH, *non hotspot*. H, *hotspot*.

Resíduo/Posição	Cadeia	Área de superfície de acessibilidade relativa	Potencial Interatômico	Hotspot Status	Hotregion Status
ASP102	A	20.14	9.87	NH	
LYS105	A	16.71	8.02	NH	
ASP106	A	42.94	7.34	NH	
ASP108	A	29.52	11.36	NH	
TYR109	A	7.37	16.68	NH	
GLU198	A	27.48	11.99	NH	
ARG202	A	31.11	14.59	NH	
PRO261	A	12.33	4.85	NH	
LYS262	A	25.66	16.05	NH	
GLN265	A	6.29	23.13	H	1
GLY269	A	4.41	9.81	NH	
LEU272	A	7.3	27.66	H	1
ILE311	A	31.33	29.44	NH	
GLY315	A	7.7	16.31	NH	
ALA318	A	0	16.31	NH	
ALA319	A	28.56	4.62	NH	
ARG320	A	7.85	19.43	H	-
ARG324	A	38.18	14.65	NH	
THR40	D	9.13	14.32	NH	
LYS41	D	16.43	7.08	NH	
MET42	D	14.54	13.36	NH	
TRP75	D	18.54	35.54	H	-

PHE90	D	61.6	8.61	NH	
ASP102	D	5.97	21.9	H	-
CYS156	D	12.99	19.98	H	1
CYS157	D	0	34.86	H	1
THR158	D	9.19	19.99	H	1
GLN159	D	32.54	15.4	NH	
GLY160	D	1.81	19.58	H	1
PRO161	D	61.62	7.36	NH	
TYR179	D	1.62	31.88	H	-
PRO182	D	9.96	17.99	NH	
ASP185	D	25.22	17.77	NH	

Fonte: Dados da pesquisa

Segundo Narasimhan et al. (2005), o domínio I (núcleo da proteína) da osmotina de fumo comporta-se como o homólogo estrutural do domínio β -barril da adiponectina, essa semelhança induz a osmotina de fumo a se ligar e ativar o receptor de adiponectina (ADIPOR1) para realizar fosforilação da quinase através da ativação de AMPK (3'5'-adenosina-monofosfato-quinase) em células de músculos.

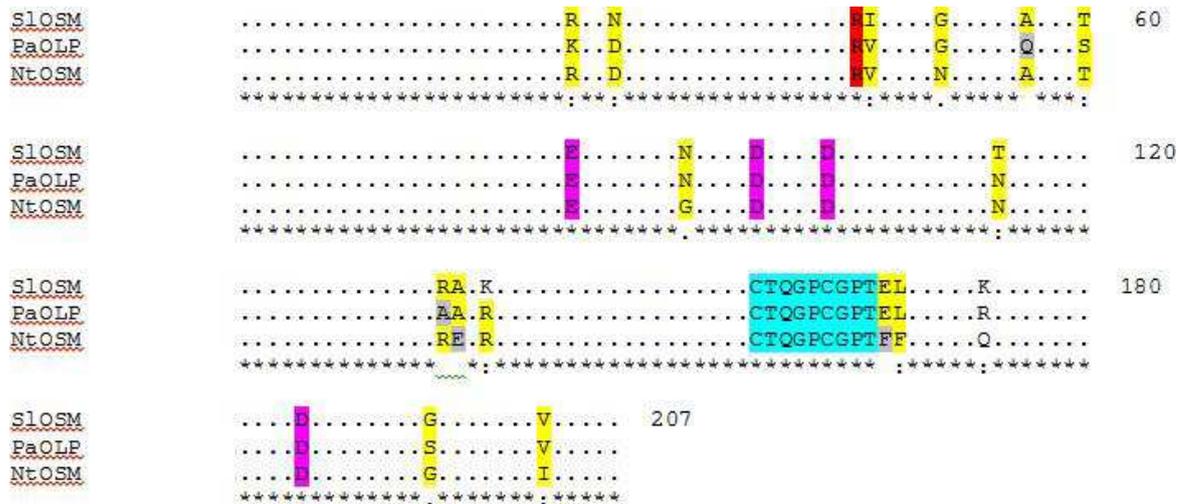
Estudos de interação osmotina de fumo com receptores de adiponectina são escassos. Miele; Costantini; Colonna (2011) demonstraram a interação *in silico* entre osmotina e ADIPOR1 em comparação com a interação entre adiponectina e ADIPOR1. Estes autores relataram que, embora não havendo similaridade de sequência entre a osmotina de fumo e a adiponectina humana, ambas se ligam ao receptor ADIPOR1 e desencadeiam as mesmas cascatas de sinalização dependente de fosforilação por quinases em músculos, sendo a interação maior entre osmotina-ADIPOR1 por ensaios *in vivo* e *in vitro*. Este trabalho revelou ainda o potencial de proteínas do tipo osmotina como agonistas para receptores ADIPOR1, os quais estão envolvidos em resposta à diabetes tipo II, diabetes gestacional e obesidade, além de outras doenças envolvidas em distúrbios causados pela obesidade, tais como: Cânceres, esteatose hepática e desordens cardiovasculares.

Miele; Costantini; Colonna (2011) evidenciaram ainda que os determinantes estruturais dessas interações são muito semelhantes, sendo as regiões de interação de

osmotinas e adiponectina quase completamente sobrepostas. A presença de resíduos carregados e aromáticos na interface foi conservada em ambas as proteínas, e os autores sugeriram que tanto a adiponectina quanto a osmotina mostra afinidade semelhante em termos de energia de ligação com o ADIPOR1.

Neste sentido, com base na homologia por BlastP, a sequência de aminoácidos de PaOLP madura compartilha 96% de similaridade com a proteína osmotina de fumo (*N. tabacum*) e 98% com a osmotina NP24 de tomate (*S. lycopersicon*). O alinhamento múltiplo destas sequências, via ClustalW, revelou que os resíduos ácidos presentes no sítio ativo da osmotina de fumo estão conservados na PaOLP e na NP24 de tomate usada como molde para construção do modelo 3D da PaOLP (Figura 15). Dessa forma, a PaOLP tem potencial para desempenhar as mesmas atividades descritas para osmotina de fumo. A sequência de um peptídeo desenhado por Miele e colegas (2011), que se ligou especificamente ao ADIPOR1 *in silico* e ativou a cascata de AMPK em células sinoviais de rato *in vivo*, também está conservado em PaOLP e na NP24 de tomate.

FIGURA 15 - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de PaOLP com as proteínas homólogas osmotina *Solanum lycopersicon* (GenBank AAC64171.1) e osmotina de *Nicotiana tabacum* (gi 1709500), usando o programa ClustalW. Os pontos representam resíduos idênticos nas três proteínas. Aminoácidos sombreados em amarelo são similares, em vermelho é o resíduo Arg44 e em azul indicam o peptídeo de interação com ADIPOR1. Aminoácidos diferentes estão indicados sem sombreadamento.



Fonte: Dados da pesquisa

Tendo como base a descoberta de que a proteína osmotina de fumo e peptídeo derivado agem como agonistas para o receptor de adiponectina (MIELE; COSTANTINI; COLONNA, 2011) o potencial terapêutico da PaOLP foi elucidado neste trabalho pela elevada similaridade de sequência com a osmotina de fumo, por se ligar ao ADIPOR1, por apresentar estrutura 3D predita e um sítio ativo carregado eletronegativamente possivelmente funcionais. Estas evidências precisam ser experimentalmente comprovadas, visto que a PaOLP pode ser explorada na área da saúde como um agonista alternativo para o receptor de adiponectina 1 e na área da agricultura na resistência de plantas economicamente importantes contra estresses bióticos e abióticos.

6 CONCLUSÕES

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

- O modelo proposto por similaridade para a PaOLP é estável e apresenta representação muito próxima da estrutura real da proteína, validado dentro dos padrões avaliados;
- A estrutura da PaOLP apresenta sítio ativo com características funcionais típicas para a família de proteínas PR-5 do tipo osmotina;
- PaOLP se liga fortemente ao receptor de adiponectina com interação comprovada por energias eletrostática, tendo 3 resíduos da PaOLP como *hotspot* da interação;
- PaOLP apresenta elevada similaridade de sequência de aminoácidos com a osmotina de fumo, agonista comprovada para o receptor do hormônio humano adiponectina, tendo os resíduos funcionais conservados entre elas;
- PaOLP representa um bom potencial terapêutico para ser explorado como agonista alternativo para o receptor de adiponectina 1, que está disponível e livre de propriedade intelectual;
- As estratégias de modelagem e *docking* molecular por comparação *in silico* são ferramentas poderosas para a predição de modelos proteicos e complexos de interação tridimensionais, quando estão disponíveis estruturas proteicas experimentais geradas por cristalografia ou ressonância magnética com alta similaridade com as sequências de aminoácidos de interesse.

REFERÊNCIAS

- ABAD, L. R.; D'URZO, M. P.; LIU, D.; NARASIMHA, M. L.; REUVENI, M.; ZHU J. K.; NIU, X.; SINGH, N. K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R. A. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, v.118, p. 11-23, 1996.
- ABREU, R. A.; SOUZA, C. C. A.; MEDEIROS, G. D. A.; SILVA, M. S.; RIBEIRO, S. G.; CAMPOS, M.A. Cloning and molecular characterization of a gene encoding an osmotin-like protein from *Physalis angulata* genome. In: 58º Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu. Sociedade Brasileira de genética, v.1; p. 118-118, 2012.
- ABREU, R. A.; **Caracterização funcional e estrutural comparativa *in silico* de uma proteína PR-5 do tipo taumatina de *Poncirus trifoliata***. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos). Universidade Federal de Campina Grande, 2015.
- AHIMA, R. S. Metabolic actions of adipocyte hormones: Focus on Adiponectin. **Obesity Research**, v. 14, p. 9-15, 2006.
- ALMEIDA, E.R. Plantas medicinais brasileiras. Conhecimentos populares e científicos. São Paulo: **Hemus Editora Ltda**, p. 341, 1993.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARNOLD K.; BORDOLI L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. A SWISS-MODEL Workspace: Um ambiente baseado na web para a modelagem da estrutura de proteínas de homologia. **Bioinformática**, v. 22, p. 195-201, 2006.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Revista Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BASEY, K.; Mc GRAW, B. A.; WOOLLEY, J. G. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4173-4176, 1992.
- BLASCHEK, W.; SCHLITZ, M.; KRAUS, J.; FRANZ, G. In vitro production of specific polysaccharides: isolation and structure of an antitumor active β -glucan from *Phytophthora parasitica*. **Food Hydrocolloids**, v.1, n.5-6, p.371-380, 1987.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Para a estimativa da qualidade absoluta de modelos de estrutura de proteínas individuais. **Bioinformática**, v. 27, n. 3, p. 343-50, 2011.
- BENKERT, P.; TOSATTO, S.C.E.; SCHOMBURG, D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 71, n. 1, p. 261-277, 2008.

- BERKOWITZ, B.A. Avaliação Básica e Clínica de Novas Drogas. In: KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica & Clínica. Rio de Janeiro, 9ª ed. **Guanabara Koogan**, cap. 5, p. 53-61, 2006.
- BERG, A. H.; COMBS, T.P.; SCHERER, P. E. Acrp30/ adiponectin: an adipocytokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends in Endocrinology Metabolism**. v. 13, p. 84–89, 2002.
- BLÜHER, M. Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, Springfield, v. 91, n. 6, p.2310-2316, 2006.
- BREITENEDER, H.; EBNER, C. Classificação molecular e bioquímica de derivados de plantas alérgenos alimentares. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 106, p. 27-36, 2000.
- CARVALHO, W. A; CARVALHO, S. D. R; METRADO, C. A; VIANA, G. T. P. Biologia molecular dos receptores farmacológicos e seus sistemas efetores de interesse em anesthesiologia. *Revista Brasileira de Anesthesiologia*. v. 47, nº 2, p. 152-167, 1997
- 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.
- CHANDRAN, M.; PHILLIPS, S. A.; CIARALDI, T.; HENRY, R. R. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? **Diabetes Care**. v. 26, n. 8, p. 2442-50, 2003.
- 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**. Jan, v. 1; n. 20, p. 45-50, 2004.
- COSTA, J. V.; DUARTE, J. S.; Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Médica Portuguesa**. v. 19, p. 251-256, 2006.
- CHIANG, H.C.; JAW, S.M.; CHEN, C.F.; Inhibitory effects of Physalin B and Physalin F on Various Human Leukemia Cells *in vitro*. **Anticancer Research**. v. 12, n. 4, p. 1155-1162. PMID:1503404, 1992. Aqui falta itálico
- CLAVAUD C.; GASTEBOIS A.; AIMANIANDA V.; LATGÉ J. P. *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. **Future Microbiology**. v. 4,p. 583–595, 2009.
- 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.

DUKE, J.A.; VASQUEZ, R. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. **Boca Raton: CRC Press**, p 224, 1994.

EISENBERG, D.; MARCOTTE, E.M.; Xenarios, I.; Yeates, T.O. Protein function in the post-genomic era. **Nature**. v. 405, n. 6788, p. 823-826, 2005.

EKMAN, D.; BJORKLUND, A.K.; Frey-Skott, J.; Elofsson, A. Multi-domain proteins in the three kingdoms of life: orphan domains and other unassigned regions. **Journal of Molecular Biology**. v. 348, n.1, p. 231-43, 2005.

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

FREITAS, T.A.; OSUÑA, J.T.A.; Efeito do substrato e da luminosidade na germinação de sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Sitientibus**. v. 6, p.101-104, 2006.

FRUEBIS, J.; TSAO, T. S.; JAVORSCHI, S.; EBBETS-REED, D.; ERICKON, M. R.; YEN, F. T.; BIHAIN, B. E.; LODISH, H. F. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. **Proceeding of National Academic Sciences, USA**. v. 98, p. 2005–2010, 2001.

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

GONEM, O.; YILDIRIM, A.; UYUGUR, F.N.; A New Record for the Flora of Turkey *Physalis angulate* L. (Solanaceae). **Turkish Journal Botanic**. v. 24, p. 299-301, 2000.

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.

HSIEH, W.T.; HUANG, K. Y.; LIN, H. Y.; CHUNG, J. G. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. **Food Chemical. Toxicology**. v. 44, p. 974–983, 2006.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: dinâmica molecular visuais. **Journal of Molecular Graphics**. v. 14, n.1, p. 33-8, 27-8, 1996.

ISMAIL, N.; ALAM, M. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. **Fitoterapia**. v. 72, p. 676-679, 2001.

TAKASHI KADOWAKI and TOSHIMASA YAMAUCHI. Adiponectin and Adiponectin Receptors. **Endocrine Reviews**. v. 26, n. 3, p. 439 – 451, 2005.

KAWABATA, T. Detection of multiscale pockets on protein surfaces using mathematical morphology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19938154>> Acessado em: 06/06/15. **Pubmed**, 2010.

KOUGIAS, P.; CHAI, H.; LIN, P. H.; YAO, Q.; LUMSDEN, A. B.; CHEN, C.; Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease. **Journal Surgical Research**. v. 126, p. 121-9, 2005.

LAROSA, P. C.; CHEN, Z; NELSON, D. E; SINGH, N. K.; HASEGAWA, P. M; BRESSAN, R. A. Osmotin gene expression is posttranscriptionally regulated. **Plant Physiology**. v.100, p.409-415, 1992.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR M. W; MOSS, D.; THORNTON, J. M. PROCHECK.: um programa para verificar a qualidade estereoquímica de estruturas de proteínas. **Journal Applied Crystallograohy**, v.26, p.283-291, 1993.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Revista Química Nova**. Rio de Janeiro, v.30, n.6, p.1456-1468, 2007.

LIN, Y.S.; CHIANG, H.S.; HONE, E.; SHIN, S.J.; WON, M.H.; Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. extract. **American Journal Chincial Medica**. v. 20, n. 3-4, p. 233-243. PMID:1471607.
<http://dx.doi.org/10.1142/S0192415X92000242>, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.; Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**. p. 512, 2002.

MAEDA, K.; OKUBO, K.; SHIMOMURA, I.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y.; MATSUBARA, K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). **Biochemical and Biophysical Research Communivations**. v. 221, p. 286-289, 1996.

MAKINO, B.; KAWAI, M.; OGURA, T.; NAKANISHI, M.; YAMAMURA, H.; BUTSUGAN, Y. Structural Revision of Physalin H isolated from *Physalis angulata*. **Journal of Natural Products**. v.58, n. 11, p. 1668-1674, 1995.

MELO, F.; FEYTMANS, E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. **Journal of Molecular Biology**. v. 277, n. 5, p.1141-1152, 1998.

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

MIELE, M.; COSTANTINI, S.; COLONNA G. Structural and Functional Similarities between Osmotin from *Nicotiana Tabacum* Seeds and Human Adiponectin. **PLoS ONE**. v. 6, n. 2, p.16690, 2011.

MIN, K.; Ha, S. C.; HASEGAWA, P. M; BRESSAN, R. A; YUN, D. J.; KIM, K. K.; A estrutura de cristal de osmotina, uma proteína vegetal antifúngico. **Proteínas**. v. 54, p. 170, 2004.

MIRZAREZAEI, M.; SADEGHI, M.; B. ARAABI. Dynamical analysis of yeast protein interaction network during the sake brewing process. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 965-973, 2011.

MUNIZ, J.; KRETZSCHMAR, A.A.; RUFATO, L.; PELIZZA, T.R.; MARCHI, T.; DUARTE, A.E.; LIMA, A.P.F.; GARANHANI, F. Conduction systems for *Physalis* production in southern Brazil. **Revista Brasileira Fruticultura**. v. 33, n. 3, p. 830-838. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000083>, 2011.

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.

NAGAFUGI S, OKABE H, AKARANE H, ABE F. Trypanocidal Constituents in Plants. Withanolides from the Aerial Parts of *Physalis angulata*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v. 27, p. 193-197, 2004.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H. T. P. da Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Araraquara, Brasil. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13-23, 2008.

NARASIMHAN, M.L.; COCA, M.A.; JIN, J; YAMAUCHI, ITO. Y.; KADOWAKI, T; KIM, K. K; PARDO, J. M; DAMSZ, B.; HASEGAWA, P.M.; YUN, D.J; BRESSAN, R. A. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. **Molecular Cellular**. v. 17, p. 171-180, 2005.

NEALE, A. D; WAHLEITHNER, J. A.; LUND, M; BONNETT H. T.; KELLY, A; MEERS-WAGNER, D. R.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin, and extension are expressed in tobacco explants during flower formation. **Plant Cell**. v. 2, p. 673-684, 1990.

NEDVIDKOVA, J.; SMITKA, K.; KOPSKY, V.; HAINER, V.; Adiponectin, an adipocyte-derived protein. **Physiological Research**. p. 54, n. 2, p.133-40, 2005.

NEWTO, S. S; DUMAN, J. G.; Na osmotin-like protein cryoprotective protein from the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. **Plant Molecular Biology**. v. 44, p. 581-589, 2000.

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.

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

PALMEIRA FILHO, P. L.; PAN, S. S. K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, v.1, n.18, 3-22, 2003.

RANGWALA, Huzefa; KARYPIS, George. Introduction to Protein Structure Prediction: Methods and Algorithms. **Hoboken: John Wiley & Sons**, 2011. In: VERLI, H. Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular. Organização de Hugo Verli. Porto Alegre, 2014.

- RUTTER, R.A. Catalogo de Plantas Utiles de la Amazonia Peruana. **Yarinacocha: Instituto Lingüístico de Verano**. p. 349, 1990.
- SANT'ANNA, C. M. R., ALENCASTRO, R. B., BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. **Journal of Molecular Structure**. v. 340, p. 193, 1995.
- SANTOS, J. A. A; TOMASSINI, T. C. B.; XAVIER, D. C. D; RIBEIRO, I. M.; SILVA M. T. G.; MORAIS-FILHO, Z. B. Molluscicidal activity of *Physalis angulata* L. extracts and fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) under laboratory conditions. **Memorial I Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 425-428, 2003.
- SCHERER, P. E.; WILLIAMS, S.; FOGLIANO, M.; BALDINI, G.; LOGISH, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **Journal of Biology Chemical**. v. 270, p. 26746-26749, 1995.
- SCHULTES, R. E.; RAFFAUF. The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. **R. F. Dioscorides Press**. p. 500, 1990.
- SHIM, J. S.; PARK, K. M.; CHUNG, J. Y.; HWANG, J. K. Antibacterial activity of oleanolic acid from *Physalis angulata* against oral pathogens. **Nutraceuticals and Food**. v. 6, n. 2, p. 215-218, 2002.
- SILVA, K.N.; AGRA, M.F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p. 344-351, 2005.
- SIITERI, P. K.; Adipose tissue as a source of hormones. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 45, p. 277-82, 1987.
- SINGH, N. K.; BRACKER, C. A.; HASEGAWA, P.M.; HANDA, A. K; BUCKEL, S.; HERMODSON, M. A.; PFANKOCH, E; REGNIER, F. E.; BRESSAN, R.A. Characterization of osmotin. **Plant Physiology**. v. 85, p. 529-536, 1987.
- SILVA, M.T.G.; SIMAS, M.S.; BATISTA, T.G.F.M.; CARDARELLI, P.; TOMASSINI, T.C.B. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 100, n.1, p. 779-782, 2005.
- SHATTERS, R. G.; BOYKIN, L. M.; LAPOINTE, S. L; HUNTER, W. B.; WEATHERBEE, A. A. Phylogenetic and Structural Relationships of PR5 Gene Family Reveals an Ancient Multigene Family Conserved in Plants and Select Animal Taxa. **Journal of Molecular Evolution**. v. 63, n.1, p. 12-29, 2006.
- SHOEMAKER, B.A.; PANCHENKO, A.R.; Deciphering Protein-Protein Interactions. Part I. Experimental Techniques and Databases. **PLoS Computational Biology**. v. 3, n. 3, p. 42, 2007.
- SOARES, M. B; BRUSTOLIM, D; SANTOS, L. A; BELLINTANI, M. C.; PAIVA, F. P.; RIBEIRO, Y. M; TOMASSINI, T. C.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.. Physalins B, F and G,

seco-steroids purified from *Physalis angulata* L inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **International Immunopharmacology**. v. 6, p. 408– 414, 2006.

TIBARY, C; LANGIN, D; Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 14, p. 439-441, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Ferramentas de validação. **Disciplina de bioinformática**. Disponível em: <
http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/Tutorial_Validacao.pdf> Acessado em 03/06/15. Porto alegre, 2011.

VASSEUR, F.; LLEPRETREL, F.; LACQUEMANT, C.; FROGUEL, P. The genetics of adiponectin. **Current Diabetes Reports**. v.3, p. 151-158, 2003.

VAN LONN, L. C.;VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 55, p. 85 – 97, 2002.

VERONESE, P.; RUIZ M.; COCA, M. A; HERNANDEZ-LOPEZ, A.; LEE, H.; IBEAS, J.I; DAMSZ, B.; PARDO, J. M; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; NARASIMHAN, M. L. Em defesa contra patógenos. Ambas as sentinelas vegetais e pé soldados preciso conhecer o inimigo. **Plant Physiology**. v. 131, p. 1580-1590, 2003.

WANG, Y. X. U. A; KNIGHT, C. Xu. L. Y.; COOPER, G. J. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin: potential role in the modulation of its insulin- sensitizing activity. **Journal OF Biology Chemical**. v. 277, p. 19521–19529, 2002.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J. Y. Ito; TSUCHIDA, A. T.; YOKOMIZO, KITA, S. Clonagem de receptores que medeiam a adiponectina metabólica antidiabético efeitos. **Nature**. v. 423, n. 6941, p. 762-9, 2003.

YUN, D. J.; ZHAO, Y.; PARDO, J. M.; NARASIMHAN, M. L.; DAMSZ, B.; LEE, H.; ABAD, L. R.; D'URZO, M. P.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. **Proceedings of the National Academy Sciences**. USA. v. 94, p. 7082–7087, 1997.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. v. 372, p. 425-432, 1994.

ZHOU, L.; DEEPA, S. S.; ETZLER, J. C.; RYUS, J.; MAO, X.; FANG, Q.; LIUS, D. D.; TORRES, J. M.; JIA, M.; LECHLEITER, J. D.; LIU, F.; The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A. Adiponectin Activates AMP-activated Protein Kinase in Muscle Cells via APPL1/LKB1-dependent and Phospholipase C/Ca²⁺/Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase-dependent Pathways. **The Journal of biological chemistry**. v. 284, n. 33, p. 22426-22435, 2009.

