



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LARISSA BARBOSA NOGUEIRA FREITAS

**ANÁLISE MOLECULAR DA ADAPTAÇÃO DE INSETOS HERBÍVOROS AOS
CARDENOLÍDEOS DE *CALOTROPIS PROCERA*: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E
ECOLÓGICOS**

FORTALEZA

2019

LARISSA BARBOSA NOGUEIRA FREITAS

ANÁLISE MOLECULAR DA ADAPTAÇÃO DE INSETOS HERBÍVOROS AOS
CARDENOLÍDEOS DE *CALOTROPIS PROCERA*: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E
ECOLÓGICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal do
Ceará, como requisito para a obtenção do
Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F936a Freitas, Larissa Barbosa Nogueira.
Análise molecular da adaptação de insetos herbívoros aos cardenolídeos de *Calotropis procera*: Aspectos bioquímicos e ecológicos / Larissa Barbosa Nogueira Freitas. – 2019.
77 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
1. ATP; de Na⁺/K⁺. 2. *Danaus plexippus*. 3. *Oncopeltus fasciatus*. 4. *Aphis nerii*. 5. Polaridade. Seletividade. I. Título.

CDD 572

LARISSA BARBOSA NOGUEIRA FREITAS

ANÁLISE MOLECULAR DA ADAPTAÇÃO DE INSETOS HERBÍVOROS AOS
CARDENOLÍDEOS DE *CALOTROPIS PROCERA*: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E
ECOLÓGICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal do
Ceará, como requisito para a obtenção do
Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Selene Maia de Morais
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Francisco de Assis de Freitas e Maria Luzia Nogueira de Freitas, que sempre priorizaram a educação de suas filhas.

A minhas irmãs, Lyara e Yannara, que sempre estiveram ao meu lado durante minha formação acadêmica, e sempre serão exemplos pra mim.

Ao Prof. Dr. Mácio Viana Ramos, pelo exemplo de dedicação e orientação ao longo desses anos. Sou muito grata a todas as críticas construtivas, ensinamentos e ao convívio durante este período que me fizeram crescer.

Ao Prof. Dr. Cláverson Diniz Texeira de Freitas, coordenador do Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais na Universidade Federal do Ceará (UFC), e a Prof^ª. Dr^ª. Selene Maia de Moraes, professora na Universidade Estadual do Ceará (UECE), pela colaboração e aperfeiçoamento deste projeto.

A todos os alunos do grupo de pesquisa de Plantas Laticíferas coordenado pelo prof. Dr. Mácio Viana e que me trouxeram muitos ensinamentos e boas lembranças.

Aos alunos de pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste projeto.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), por todo suporte necessário para minha formação acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo fornecimento de apoio financeiro.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

A planta *Calotropis procera* sintetiza uma variedade de metabólitos secundários, dentre os quais se destacam os cardenolídeos, um tipo de metabólito tóxico de defesa contra herbívoros. Trinta e cinco cardenolídeos já foram identificados em *C. procera* e tiveram sua estrutura molecular estabelecida. Cardenolídeos são tóxicos ao inibir a atividade enzimática de ATPases Na^+/K^+ , provocando a morte celular. Entretanto, os insetos herbívoros *Danaus plexippus* (Lepidoptera), *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii* (Hemiptera) são capazes de utilizarem *C. procera* como hospedeira. Porque a planta sintetiza tamanha variedade de cardenolídeos? Quais as características estruturais e químicas destas moléculas? Como esses herbívoros driblam a ação destes metabólitos? Neste trabalho, os cardenolídeos de *C. procera* foram classificados em três grupos, um deles com três subgrupos, de acordo com as suas características estruturais. O índice de hidropaticidade foi definido por meio do log do coeficiente de partição (Log P). Modelos tridimensionais (3D) das ATP α 1 de Na^+/K^+ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* foram construídos através da modelagem comparativa utilizando os servidores SWISS-MODEL e Phyre2, e posteriormente foram validados e refinados. Após refinamento, as estruturas 3D foram novamente validadas. O sítio de ligação de cardenolídeos nas estruturas 3D dessas três enzimas foi identificado e analisado. Com auxílio de dados estruturais descritos na literatura, sobre a ligação de ouabaína (cardenolídeo mais utilizado para estudos de toxicidade) em ATP α de Na^+/K^+ , foi proposto que a resistência de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* aos efeitos tóxicos dos cardenolídeos de *C. procera* também está relacionada às substituições de aminoácidos com propriedades químicas diferentes em locais específicos das enzimas. Provavelmente, substituições nas posições 104, 115 e 302 exerçam o maior efeito sobre o aumento da insensibilidade das ATP α de Na^+/K^+ desses herbívoros aos cardenolídeos. Por meio dos procedimentos de docking molecular das estruturas 3D dessas ATP α 1 de Na^+/K^+ com os cardenolídeos de *C. procera* foi possível estabelecer uma relação entre a especificidade na polaridade dos cardenolídeos sequestrados por esses herbívoros e a seletividade desses metabólitos sobre suas ATP α de Na^+/K^+ . Logo, é presumível que os cardenolídeos que não são sequestrados por esses herbívoros sejam capazes de se ligarem no sítio ativo de suas ATP α de Na^+/K^+ , de modo que a seletividade desses metabólitos sobre essas enzimas está diretamente relacionada à sua polaridade. Conclui-se que a *C. procera* diversifica as estruturas dos cardenolídeos na tentativa de que algum deles possa interagir com ATPases de Na^+/K^+ de herbívoros e promover sua defesa química. Os insetos, por sua vez, alcançam a resistência, excluindo de seu organismo os cardenolídeos

potencialmente tóxicos e sequestrando aqueles que não são seletivos para eles ou ainda modificando a estrutura do cardenolídeo, embora esta última estratégia não seja metabolicamente conhecida.

Palavras-chave: ATP α de Na⁺/K⁺. *Danaus plexippus*. *Oncopeltus fasciatus*. *Aphis nerii*. Polaridade. Seletividade.

ABSTRACT

The plant *Calotropis procera* synthesizes a variety of secondary metabolites, such as cardenolides, a type of toxic metabolite of defense against herbivores. Thirty-five cardenolides have already been identified in *C. procera* and had their molecular structure resolved. Cardenolides are toxic by inhibiting the enzymatic activity of ATPases of Na^+/K^+ , causing cell death. However, herbivorous insects *Danaus plexippus* (Lepidoptera), *Oncopeltus fasciatus* and *Aphis nerii* (Hemiptera) are capable of using *C. procera* as host. Why does the plant synthesize a variety of cardenolides? Which are the structural and chemical characteristics of these molecules? How do these herbivores prevent the action of these metabolites? In this work, the *C. procera* cardenolides were classified in three groups, one of them with three subgroups, according to their structural characteristics. The hydrophobicity index was defined through the partition coefficient $\log(P)$. Three-dimensional (3D) models of the ATP α 1 of Na^+/K^+ from *D. plexippus*, *O. fasciatus* and *A. nerii* were constructed through comparative modeling using the SWISS-MODEL and Phyre2 servers, and were subsequently validated and refined. After refinement, the 3D structures were validated again. The binding site of cardenolides in the 3D structures of these three enzymes was identified and analyzed. With the aid of structural data described in the literature about the binding of ouabain (the most commonly used cardenolides for toxicity studies) in ATP α 1 of Na^+/K^+ , it was proposed that the resistance of *D. plexippus*, *O. fasciatus*, and *A. nerii* to the toxic effects of *C. procera* cardenolides is also related to amino acid substitutions with different chemical properties in specific enzyme sites. Probably, substitutions in positions 104, 115 and 302 have the higher effect on the increased insensitivity of the ATP α 1 of Na^+/K^+ of these herbivores to cardenolides. Through molecular docking of the 3D structures of these ATP α 1 of Na^+/K^+ with the cardenolides from *C. procera* was possible to establish a relationship between the specificity of polarity of the cardenolides sequestered by these herbivores and the selectivity of these metabolites about their ATP α 1 of Na^+/K^+ . Therefore, it is presumable that cardenolides that are not sequestered by these herbivores can bind in active site of their ATP α 1 of Na^+/K^+ , thus the selectivity of these metabolites to these enzymes is directly related to their polarity. It is concluded that *C. procera* diversifies the cardenolides structure in an attempt to any of them can interact with ATP α 1 of Na^+/K^+ of the herbivores and promote their chemical defense. Insects, in turn, achieve the resistance excluding potentially toxic cardenolides from their bodies and sequestering those that are not

selective for them or modifying the structure of the cardenolides, although this latter strategy is not metabolically known.

Keywords: ATP α of Na⁺/K⁺. *Danaus plexippus*. *Oncopeltus fasciatus*. *Aphis nerii*. Polarity. Selectivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br.....	15
Figura 2	– Estrutura comum entre os cardenolídeos.....	17
Figura 3	– Via de biossíntese de cardenolídeos em <i>Calotropis procera</i>	19
Figura 4	– Organização estrutural de ATPase de Na ⁺ /K ⁺	21
Figura 5	– Estrutura cristalina da ATPα de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Squalus acanthias</i>	23
Figura 6	– Organização estrutural dos domínios citoplasmáticos (P, N e A) e das hélices transmembranares (αM1-10) dos modelos tridimensionais das ATPα1 de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> (A), <i>Oncopeltus fasciatus</i> (B) e <i>Aphis nerii</i> (C) incorporados na bicamada lipídica.....	46
Figura 7	– Alinhamento de secções das sequências de aminoácidos da ATPα de Na ⁺ /K ⁺ da glândula retal de tubarão da espécie <i>Squalus acanthias</i> (PDB ID: 2zxe) e das ATPα1 de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> e <i>Aphis nerii</i>	49
Figura 8	– Localização do sítio de ligação de cardenolídeos na ATPα de Na ⁺ /K ⁺ da glândula retal de tubarão da espécie <i>Squalus acanthias</i> (PDB: 3a3y) (A), e nos modelos tridimensionais das ATPα1 de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> (B), <i>Oncopeltus fasciatus</i> (C) e <i>Aphis nerii</i> (D).....	53
Figura 9	– Destaque das posições 104, 115 e 302 nas ATPα de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> (A), <i>Oncopeltus fasciatus</i> (B), e <i>Aphis nerii</i> (C).....	54
Figura 10	– Alinhamento múltiplo de secções das sequências de aminoácidos de ATPα de Na ⁺ /K ⁺ de insetos representativos das famílias Nymphalidae, Lygaeidae e Aphididae, incluindo <i>Danaus plexippus</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> e <i>Aphis nerii</i>	66
Figura 11	– Alinhamento Análise Filogenética Molecular pelo método de Máxima Verossimilhança.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Alinhamento Cardenolídeos de <i>Calotropis procera</i>	16
Tabela 2	– Alinhamento Insetos herbívoros de <i>Calotropis procera</i>	27
Tabela 3	– Alinhamento Espécies de insetos utilizadas na construção e análise da árvore filogenética.....	31
Tabela 4	– Alinhamento Valores atribuídos no grid box por meio do programa AutoDock 1.5.6, aos modelos das ATP α 1 Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> e <i>Aphis nerii</i>	36
Tabela 5	– Alinhamento Classificação dos cardenolídeos de <i>Calotropis procera</i> ..	37
Tabela 6	– Alinhamento Hidropaticidade dos cardenolídeos de <i>Calotropis procera</i>	40
Tabela 7	– Validação dos modelos tridimensionais das ATP α 1 de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> e <i>Aphis nerii</i> gerados pelos servidores Swiss Model (Modelo 1) e Phyre2 (Modelo 2).....	43
Tabela 8	– Validação dos modelos tridimensionais refinados das ATP α 1 de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> e <i>Aphis nerii</i> gerados pelos servidores Swiss Model (Modelo 1) e Phyre2 (Modelo2)	43
Tabela 9	– Posição dos segmentos de aminoácidos das ATP α 1 de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> e <i>Aphis nerii</i> correspondente aos domínios citoplasmáticos (A, P e N) e transmembranares (α M1-10).....	44
Tabela 10	– Posição dos segmentos de aminoácidos das ATP α 1 de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> e <i>Aphis nerii</i> correspondente às hélices transmembranares (α M1-10) que ficam incorporados na bicamada lipídica.....	47
Tabela 11	– Acoplamento molecular de cardenolídeos de <i>C. procera</i> com os modelos tridimensionais das ATP α 1 de Na ⁺ /K ⁺ de <i>Danaus plexippus</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> e <i>Aphis nerii</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DXS	1-Deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase
DXR	1-Deoxi-D-xilulose-5-fosfato reductoisomerase
MCT	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferase
CMK	4-Difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinase;
MDS	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase
HDS	4-Hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ildifosfato sintase
AACT	Acetil-CoA Acetiltransferase
HMGS	Hidroximetilglutaril-CoA Sintase
HMGR	Hidroximetilglutaril-CoA redutase
MK	Mevalonate quinase
PMK	Fosfomevalonate quinase
MPD	Difosfomevalonate decarboxilase
IDI	Isopentenil-difosfate delta-isomerase
GGPPS	Geranylgeranyl pirofosfato sintase 1
FDPS1	Farnesil difosfato sintase 1
SQS	Esqualeno sintase
SMO	Esqualeno monooxigenase
CAS	Cicloartenol sintase
SMT1	Esterol 24-C-metiltransferase
MO	Monooxigenases
CPI1	Ciclopropil isomerase
CYP51G1	Citocrome P450, família 51, subfamília A (esterol 14-demetilase)
FK	Delta14-sterol reductase
HYD1	Colestenol delta-isomerase
STE1	C-5 esterol desaturase
DWF5	Esterol delta7 redutase
DWF1	Delta 24-esterolredutase
SMT2	Esterol metiltransferase 2
OR	Oxidoredutase
HOX	Hidroxilase
MAT	Maloniltransferase
GT	Glicosil transferase/glucuronosil transferase

UGT	UDP-glicosiltransferase/glucuronosil transferase
GH	Glicohidrolase
3 β -HSD	3- β -hidroxiesteróide desidrogenase
5 β -POR	Progesterona 5 β -redutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Defesa Vegetal.....	14
1.2	<i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.	15
1.3	Cardenolídeos.....	17
1.3.1	Síntese de cardenolídeos em <i>Calotropis procera</i>	18
1.4	ATPase de Na ⁺ /K ⁺	20
1.5	Interação de cardenolídeos com a subunidade α da ATPase de Na ⁺ /K ⁺	22
1.6	Associação Planta-Inseto.....	24
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo Geral.....	28
2.2	Objetivos Específicos.....	28
3	METODOLOGIA.....	29
3.1	Bases de dados.....	29
3.2	Cardenolídeos de <i>C. procera</i>	29
3.3	Classificação e Hidropaticidade dos Cardenolídeos de <i>C. procera</i>	29
3.4	Busca das sequências de subunidades α das ATPase de Na ⁺ /K ⁺	29
3.5	Alinhamento e Análise Filogenética.....	30
3.6	Modelagem Computacional.....	32
3.7	Validação e Refinamento dos Modelos.....	33
3.8	Caracterização dos Modelos Tridimensionais.....	35
3.9	Acoplamento Molecular Computacional.....	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
4.1	Cardenolídeos de <i>C. procera</i>	37
4.2	Modelagem computacional e caracterização dos modelos tridimensionais.....	42
4.3	Alinhamento de sequências de aminoácidos de ATP α 1 de Na ⁺ /K ⁺	48
4.4	Descrição do sítio de ligação de cardenolídeos.....	53
4.5	Análise do acoplamento molecular.....	55
4.6	Análise filogenética.....	66
5	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Defesa Vegetal

As plantas habitam ambientes complexos e são constantemente expostas a um conjunto de estresses abióticos e bióticos. A pressão evolutiva selecionou plantas capazes de produzirem uma ampla variedade de processos metabólicos defensivos que as permitissem tolerarem condições de estresse ao seu desenvolvimento. Esses mecanismos defensivos da planta podem ser classificados como constitutivo e induzido, ambos são estruturais e químicos (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002). A defesa constitutiva está presente no vegetal independente de estímulos externos, enquanto que a defesa induzida é gerada após a percepção de estímulos ambientais (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002).

Na defesa química das plantas estão presentes os metabólitos secundários, que são compostos orgânicos. Esses compostos moleculares não parecem exercer uma função direta no crescimento e desenvolvimento das plantas. Sua produção nos vegetais está associada aos seus mecanismos de defesa (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002). Além disso, a distribuição dos metabólitos secundários não é uniforme em todo o reino vegetal, ou seja, um metabólito específico é encontrado apenas em uma espécie ou em um grupo de espécies com taxonomia relacionada.

Em resposta aos ataques por patógenos e herbívoros a planta pode aumentar a taxa de produção de compostos moleculares para sua defesa ou induzir a produção de novos compostos que estavam ausentes antes da herbivoria (PANDEY *et al.*, 2016). Os principais grupos de metabólitos secundários são: alcaloides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, terpenos, flavonoides e saponinas (WINK; SCHIMMER, 2018).

Em particular, no grupo de saponinas estão incluídos os cardenolídeos - glicosídeos cardíacos (WINK; SCHIMMER, 2018). Muitas espécies de plantas da família Apocynaceae são conhecidas devido a sua produção de cardenolídeos. Esses compostos exercem um importante papel na defesa das plantas devido ao seu efeito tóxico sobre patógenos e herbívoros (WEN *et al.*, 2016). No entanto, a produção de cardenolídeos é limitada a alguns gêneros da família Apocynaceae (*Asclepias*, *Apocynum*, *Calotropis*, *Cryptostegia*, *Nerium*, *Periploca*, *Strophantus*, *Thevetia* e *Xysmalobium*) (BARTNIK; FACEY, 2017). Entre esses gêneros, a planta *Calotropis procera* produz uma imensa variedade de cardenolídeos, no entanto, os efeitos dessa diversidade ainda é pouco explorado (PANDEY *et al.*, 2016).

1.2 *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Calotropis é um pequeno gênero da família Apocynaceae, apresentando-se como uma planta arbustiva com até 4,5 metros de altura. São distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo originárias da África, Ásia e América (ENDRESS; BRUYNS, 2000). A espécie *Calotropis procera* é conhecida pela sua capacidade de produzir grandes quantidades de látex e é popularmente denominada por flor-de-seda, maçã do mar morto, mosca e leiteira (Figura 1).

Figura 1 - *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.



Fonte: Arquivo pessoal.

O látex de *C. procera* apresenta uma grande variedade de metabólitos secundários, incluindo cardenolídeos, alcaloides, terpenos, resinas, flavonóides e taninos (KONNO, 2011). A complexidade na composição do látex é uma estratégia de defesa dessa planta sobre os seus patógenos e herbívoros (KONNO, 2011). No entanto, todos os tecidos vegetais estão suscetíveis aos estresses bióticos, logo, os compostos de defesa estão distribuídos por todos os tecidos da planta, e não apenas no látex.

Um total de trinta e cinco cardenolídeos já foram identificados em *C. procera* e tiveram suas estruturas moleculares resolvidas (Tabela 1). Desses cardenolídeos, vinte e um foram identificados no látex *C. procera*, nove em hastes, três nas folhas e dois na casca da raiz. Os cardenolídeos são potentes agentes de defesa devido a sua capacidade de inibir a

atividade enzimática de ATPases de Na^+/K^+ ao se ligar especificamente na subunidade α dessa enzima (BARTNIK; FACEY, 2017).

Tabela 1 - Cardenolídeos de *Calotropis procera*.

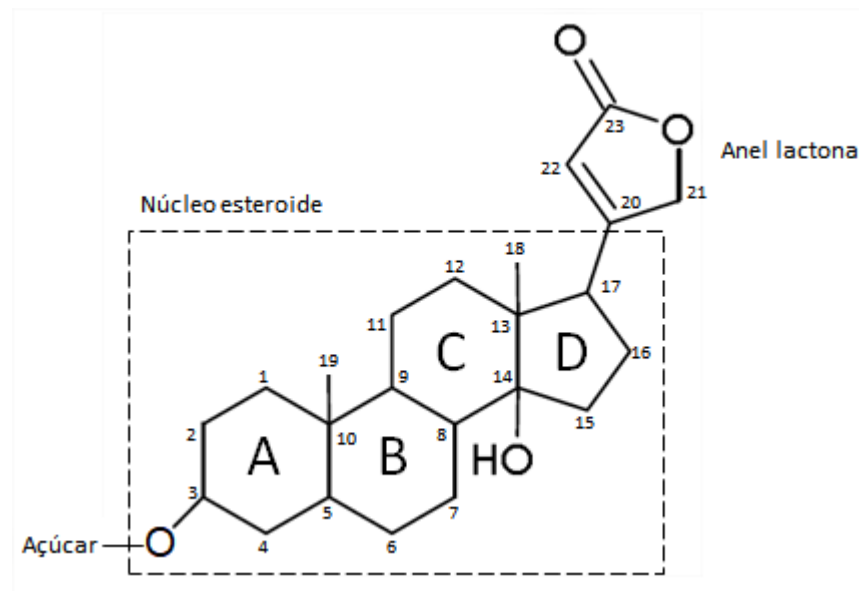
Cardenolídeo	Tecido	Referência
Calotropina	Látex	Bruschweiler <i>et al.</i> , 1969
Gomfoside	Látex	Bruschweiler <i>et al.</i> , 1969
β -tetrahidro-Uscharidina	Látex	Bruschweiler <i>et al.</i> , 1969
15 β - Hidroxi Uscharina	Látex	Bruschweiler <i>et al.</i> , 1969
Voruscharina	Látex	Bruschweiler <i>et al.</i> , 1969
Siriogenina	Látex	Bruschweiler <i>et al.</i> , 1969
Proceragenina	Folhas	Akhtar <i>et al.</i> , 1991
Deglucouzarina	Haste	Elgamal <i>et al.</i> , 1999
Frugoside	Haste	Elgamal <i>et al.</i> , 1999
3-[β -(4-O- β -D-glucopiranosil- β -D-6-desoxiallopiranosil)oxi]uzarigenina	Haste	Hanna <i>et al.</i> , 1999
Uzarina	Haste	Hanna <i>et al.</i> , 1999
Uzarigenone	Haste	Elgamal <i>et al.</i> , 1999
Dihidrouscharina	Látex	Desheesh <i>et al.</i> , 2004
Dihidrovouroscharina	Látex	Desheesh <i>et al.</i> , 2004
2''-oxovoruscharina	Casca da raiz	Quaquebeke <i>et al.</i> , 2005
Uzarigenina	Haste	Shaker <i>et al.</i> , 2010
β -anhidroepidigitoxigenina	Haste	Shaker <i>et al.</i> , 2010
2 β ,19-Epoxi-3 β ,14 β -dihidroxi-19-metoxi-5 α -card-20(22)-enolide	Haste	Shaker <i>et al.</i> , 2010
β -Anhidroepidigitoxigenina-3 β -O- β -glucopiranoside	Haste	Shaker <i>et al.</i> , 2010
Calotropagenina	Látex	Kanojiya; Madhusudanan, 2010
Asclepina	Folhas	Kanojiya; Madhusudanan, 2010
Uscharidina	Folhas	Kanojiya; Madhusudanan, 2010
Proceraside A	Casca da raiz	Ibrahim <i>et al.</i> , 2014
15 β -Hidroxicalactina	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015
Afroside	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015
Ischarina	Látex	Sweidan; Zarga, 2015
Ischaridina	Látex	Sweidan; Zarga, 2015
Uscharina	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015
Calactina	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015
Calactoprocina	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015
Calotoxina	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015
12 β -Hidroxicoroglaucigenina	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015
Afrogenina	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015
Procegenina A	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015
Procegenina B	Látex	Mohamed <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.3 Cardenólídeos

Os cardenólídeos compreendem uma grande família de esteroides, exibindo uma variedade estrutural imensa, mas todos esses compostos compartilham um motivo estrutural comum (PRASSAS *et al.*, 2008). Essa estrutura conservada consiste em um núcleo esteroide de quatro anéis conectados na conformação *cis-trans-cis*, com dois grupos metil nas posições β do C-10 e do C-13, um grupo 14 β -hidroxila, e um anel lactona na posição β do C-17, formando uma genina, ou aglicona. Nos cardenólídeos glicosilados, a porção de açúcar fica ligada na posição β do C-3 do núcleo esteroide (Figura 2) (PRASSAS *et al.*, 2008).

Figura 2 - Estrutura comum entre os cardenólídeos.



Fonte: Arquivo pessoal.

Os cardenólídeos têm um anel lactona de cinco membros (butirolactona) insaturado na posição 20 ou 22 (Figura 2). A fração lactona é o que os distingue dos bufadienólídeos, os quais possuem um anel lactona de seis membros e com duas ligações insaturadas. Ambos os cardenólídeos e os bufadienólídeos são de ocorrência natural e produzidos por plantas (PRASSAS *et al.*, 2008).

A porção de açúcar ligada ao núcleo esteroide é composta por até quatro resíduos de açúcar e os mais comuns são a glicose, galactose, manose, ramnose e digitalose (PRASSAS *et al.*, 2008; MORSY, 2017). O açúcar interfere na farmacodinâmica e na farmacocinética dos cardenólídeos glicosilados (PRASSAS *et al.*, 2008). Apesar de não

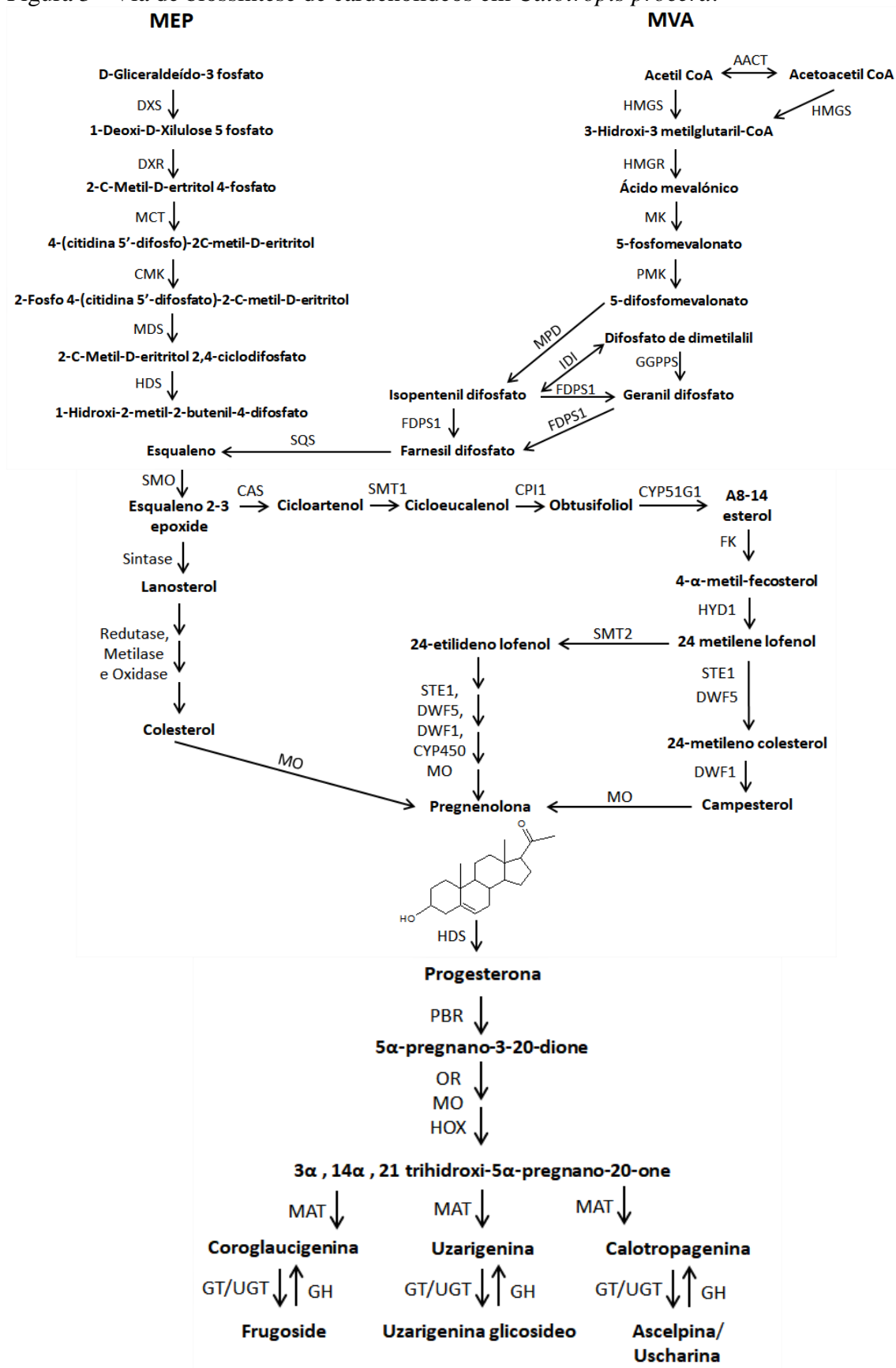
possuírem atividade direta sobre a ação dos próprios cardenolídeos, diferentes tipos de monossacarídeos influenciam em sua seletividade sobre as ATPases de Na^+/K^+ . Assim, as propriedades químicas do açúcar podem interferir no nível de toxicidade desses cardenolídeos sobre seu alvo molecular, a subunidade α da ATPase de Na^+/K^+ (PRASSAS *et al.*, 2008; BARTNIK; FACEY, 2017).

1.3.1 Síntese de cardenolídeos em Calotropis procera

Apesar de já ter sido resolvida a estrutura molecular de uma ampla variedade de cardenolídeos, a via de biossíntese desses metabólitos ainda não está bem clara. No trabalho de Pandey *et al.* (2016), foi proposto uma via de biossíntese de cardenolídeos em *C. procera*, baseando-se no sequenciamento de transcriptoma *de novo*.

Os transcritos anotados foram agrupados com base na classificação Gene Ontology (GO). As sequências anotadas foram similares as de vias de biossíntese dos metabólitos secundários fenilpropanóides, flavonoides, tropano, piperidinae, alcalóides piridínicos, terpenóides e policetídeos. Da via metabólica dos terpenóides destacaram-se os genes relacionados na biossíntese da espinha dorsal dos terpenóides, carotenóides e diterpenóide. Esses dados obtidos através do Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) foram essenciais para a identificação dos genes envolvidos na síntese dos cardenolídeos em *C. procera* (PANDEY *et al.*, 2016).

Foi sugerido que a porção esteroide dos cardenolídeos é derivada de vias dos terpenóides (via do ácido mevalônico, MVA e a via do metileritritol fosfato, MEP). Enzimas de treze famílias de genes relacionados com a síntese de esteroides, como redutase, oxidase e metilase, catalisam a conversão do esqualeno em pregnenolona. O pregnenolona possui quatro anéis conectados, que serve como a base para a formação do núcleo esteroide da genina (Figura 3) (PANDEY *et al.*, 2016).

Figura 3 - Via de biossíntese de cardenolídeos em *Calotropis procera*.Fonte: Adaptado de Pandey *et al.* (2016).

Quando formado a pregnenolona a enzima 3β -HSD catalisa sua conversão em progesterona, que é imediatamente reduzida a 5α -pregnano-3,20-diona pela 5β -POR. A partir daí as enzimas oxirredutase, monooxigenases, hidroxilase e maloniltransferase catalisam a formação de diferentes intermediários. Por fim, as enzimas da classe transferase, glicosil transferase, glicuronosil transferase, UDP-glicosil transferase e GT/UGT, participam na etapa de glicosilação da genina (Figura 3) (PANDEY *et al.*, 2016).

Esta última etapa na biossíntese dos glicosídeos cardíacos requer um grande número de GT/UGTs, enzimas responsáveis pela diversidade estrutural da porção de açúcar dos cardenolídeos em *C. procera* (PANDEY *et al.*, 2016).

A síntese e acúmulo dos cardenolídeos nos tecidos vegetais aumentam em resposta à herbivoria. Tais lesões podem induzir a secreção das unidades de geninas, dos vacúolos onde são armazenadas, para que possam ser glicosiladas e convertidas em cardenolídeos glicosilados. Além disso, também podem provocar a translocação de cardenolídeos já sintetizados do local de síntese para o local onde houve a herbivoria (PANDEY *et al.*, 2016).

1.4 ATPase de Na^+/K^+

A enzima ATPase de Na^+/K^+ - bomba de sódio (3.6.1.37) - é uma proteína transmembranar presente em células animais (PIVOVAROV, 2019). A ATPase de Na^+/K^+ promove o transporte ativo primário, responsável pelo estabelecimento e manutenção do gradiente iônico de sódio e potássio na membrana plasmática. Esse gradiente é formado pelo transporte de 3 íons sódio (Na^+) para o meio extracelular e de 2 íons potássio (K^+) para o meio intracelular, que ocorre contra seu gradiente de concentração (SKOU, 1997).

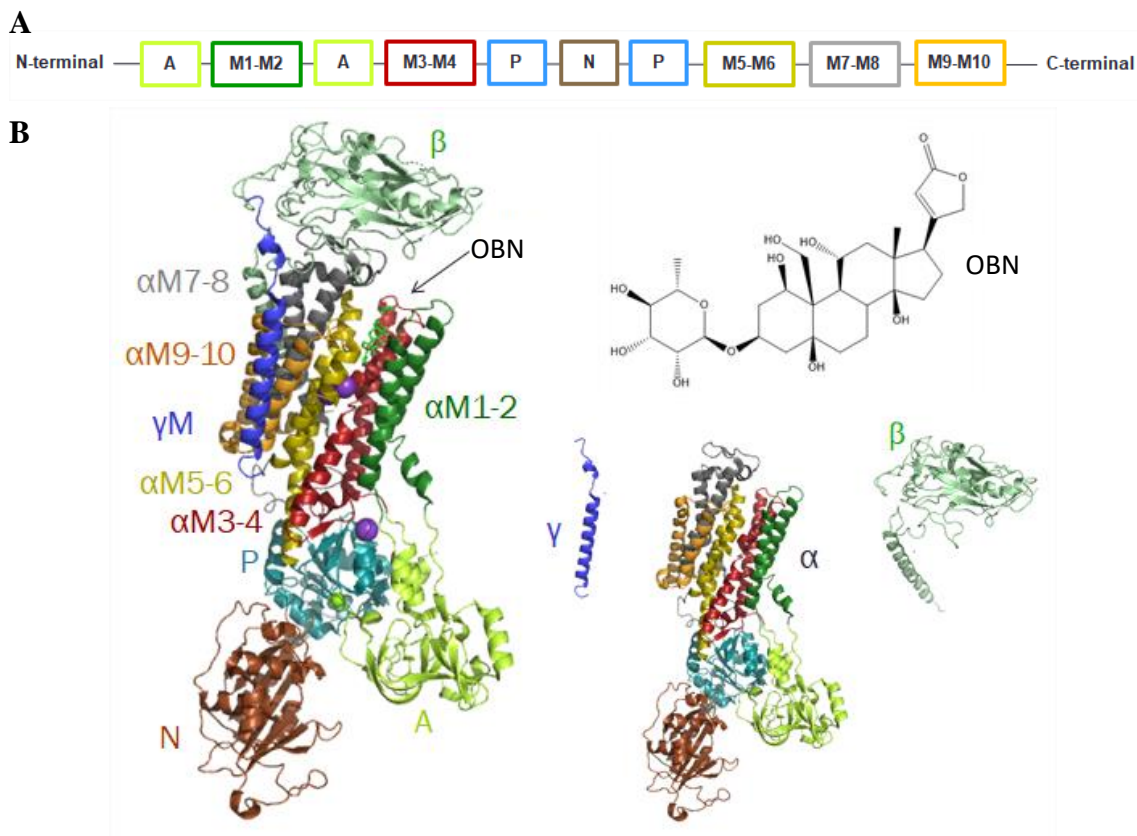
A manutenção do gradiente eletroquímico na membrana pela ATPase de Na^+/K^+ garante a força propulsora para transporte ativo secundário, a manutenção do volume celular, o transporte de outros íons através da membrana plasmática e manutenção da homeostase do pH (SKOU, 1997). O nível intracelular de íons de cálcio (Ca^{2+}) também é regulado pela ATPase de Na^+/K^+ . O transporte de Ca^{2+} para o meio intracelular é realizado pela troca de Na^+ para o meio extracelular (SKOU, 1997).

A ATPase de Na^+/K^+ é membro da família das ATPases do tipo P, denominadas assim por serem fosforiladas de forma reversível usando ATP durante o ciclo de transporte dos íons (MORTH *et al.*, 2011). A fosforilação ocorre pela transferência do grupo fosforil do ATP ao resíduo Asp de um motivo conservado da enzima, provocando uma mudança

conformacional, da forma E1 para E2, que possuem afinidade seletiva ao Na^+ e ao K^+ , respectivamente (MORTH *et al.*, 2011; MATCHKOV; KRIVOI, 2016).

As ATPases do tipo P são caracterizadas pela presença de três domínios citoplasmáticos e seis hélices transmembranares (M1-M6) (LUTSENKO; KAPLAN, 1995). Os domínios citoplasmáticos são o de ligação de nucleotídeos (N), o de fosforilação (P) e o atuador (A) (Figura 4). As ATPases de Na^+/K^+ pertencem à subclasse P2, caracterizadas por possuírem dez hélices transmembranares, as hélices principais M1-M6 com a adição das hélices M7-M10 na porção carboxi-terminal (Figura 4A) (MORTH *et al.*, 2011).

Figura 4 - Organização estrutural de ATPase de Na^+/K^+ .



Fonte: Arquivo pessoal. (A): Distribuição dos domínios citoplasmáticos e das hélices transmembranares na sequência da subunidade α de ATPase de Na^+/K^+ . O domínio atuador (A) na extremidade N-terminal, e o domínio de ligação de nucleotídeos (N) e de fosforilação (P). As hélices que formam o núcleo principal da porção transmembranar (M1-M6) e as hélices da extremidade C-terminal (M7-M10). (B): Estrutura proteica da ATPase de Na^+/K^+ , um complexo heterotrímérico com as subunidades α , β e γ . A ouabaína (OBN) está acoplada em seu sítio de ligação na subunidade α , indicado por uma seta. Os íons Mg^{2+} , F^+ e K^+ estão representados como esferas de cor verde, cinza claro e roxa, respectivamente. Figura foi produzida através do programa PyMOL 2.0.7.

A ATPase de Na^+/K^+ é um complexo heterotrímérico constituído por subunidades α (α_1 , α_2 , α_3 e α_4), β (β_1 , β_2 e β_3) e γ (Figura 4B). A subunidade α (~110 kDa) é responsável pelo processo catalítico e transporte dos cátions, possuindo dez domínios transmembranares e

cinco loops extracelulares (BLANCO; MERCER, 1998; MATCHKOV; KRIVOI, 2016). A subunidade β (~31,5 kDa) é uma glicoproteína responsável por modular a afinidade enzimática aos íons Na^+ e K^+ . Além disso, a subunidade β é essencial para atividade catalítica por aumentar a estabilidade da subunidade α (BLANCO; MERCER, 1998; MATCHKOV; KRIVOI, 2016). Já a subunidade γ é um pequeno polipeptídeo hidrofóbico de massa molecular 8–14 kDa e associa-se as subunidades α e β (BLANCO; MERCER, 1998).

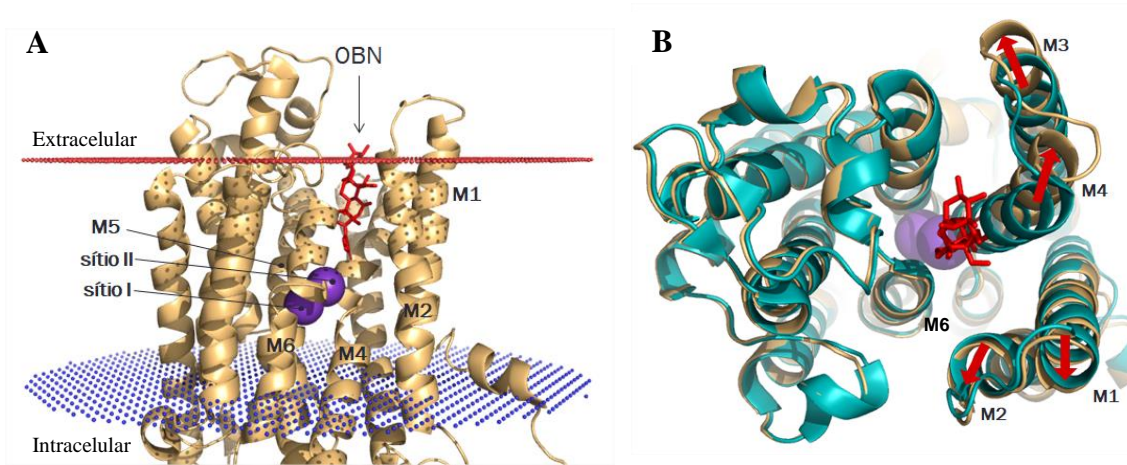
As múltiplas isoformas desta enzima desempenham diferentes papéis e, portanto, são específicas para tecidos e estágios de desenvolvimento dos organismos (LINGREL *et al.*, 2003). A subunidade $\alpha 1$ é onipresente e em alguns tecidos é a única isoforma expressa, como, por exemplo nos eritrócitos, epitélios renais e no fígado (MATCHKOV; KRIVOI, 2016). A subunidade $\alpha 2$ é expressa principalmente no músculo esquelético, cérebro e coração; enquanto a subunidade $\alpha 3$ é mais comum nos tecidos neuronais. A subunidade $\alpha 4$ já foi encontrada no testículo, relacionada com a motilidade e fertilização espermática (WOO *et al.*, 2000), e no músculo esquelético (KERYANOV; GARDNER, 2002).

O sítio de ligação dos cardenolídeos é localizado na subunidade α das ATPases de Na^+/K^+ , formado pelas hélices transmembranares M1, M2, M4, M5, e M6, próximo ao local de ligação do K^+ (Figura 4B) (OGAWA *et al.*, 2009). Quando a atividade enzimática da ATPase de Na^+/K^+ é inibida por cardenolídeos o gradiente eletroquímico não é formado, logo, o potencial de membrana também não é gerado. A ausência do potencial de membrana na célula leva ao desequilíbrio químico, por interferir no transporte de íons através da membrana plasmática. Os níveis intracelulares de Na^+ aumentam e há um subsequente aumento da concentração intracelular Ca^{2+} , interferindo na manutenção de processos metabólicos vitais da célula, podendo levar o animal a óbito (BÖGEHOLZ *et al.*, 2019).

1.5 Interação de cardenolídeos com a subunidade α da ATPase de Na^+/K^+

O sítio de ligação dos cardenolídeos na ATP α de Na^+/K^+ é envolto pelas hélices M1, M2, M4, M5, e M6, formando uma cavidade de ligação que abrange a região extracelular e transmembranar da enzima, próximo ao sítio II de ligação íon K^+ (Figura 5A) (OGAWA *et al.*, 2009).

Figura 5 - Estrutura cristalina da ATP α de Na $^+$ /K $^+$ de *Squalus acanthias*.



Fonte: Arquivo pessoal. (A) Sítio de ligação de cardenólídeos na estrutura cristalina resolvida no estado ligado à ouabaína (PDB ID: 3a3y) (Ogawa *et al.*, 2009). (B) Sobreposição estrutural da ATP α de Na $^+$ /K $^+$ no estado não ligado à ouabaína (azul) e ligado à ouabaína (amarelo). A seta vertical indica a ouabaína (OBN; bastões de cor vermelha) ligada em seu sítio de ligação. As hélices transmembranares que formam o sítio de ligação de cardenólídeos (M1, M2, M4, M5 e M6) e os sítios I e II de ligação dos íons K $^+$ (esferas de cor roxa) estão identificadas. As linhas horizontais pontilhadas (vermelho e azul) correspondem a bicameral lipídica. As setas vermelhas em “B” indicam a direção do movimento das hélices M1, M2, M3 e M4 quando a ouabaína se liga na enzima. Figura foi produzida através do programa PyMOL 2.0.7.

Geralmente, os trabalhos que descrevem, ao nível estrutural, o acoplamento de cardenólídeos em ATPases de Na $^+$ /K $^+$ utilizam a ouabaína, um cardenólídeo glicosilado de referência e derivado da planta *Strophanthus gratus*. Portanto, os dados estruturais descritos adiante são de estruturas cristalizadas de ATP α de Na $^+$ /K $^+$ ligada à ouabaína.

A associação da ouabaína na ATP α de Na $^+$ /K $^+$ desencadeia mudanças estruturais nas hélices M1-5, mas especialmente no segmento entre os resíduos G 300 e G 321 do Loop M3-4 à hélice M4. A hélice M4 se distancia de M6, e M1-2 se movimentam para um espaço gerado pelo rearranjo de M4 (Figura 5B) (OGAWA *et al.*, 2009). Essa mudança na conformação da ATP α de Na $^+$ /K $^+$ aumenta o espaço da cavidade de ligação dos cardenólídeos (Figura 5B) (OGAWA *et al.*, 2009; YATIME *et al.*, 2011). Além disso, o rearranjo estrutural de M1 e M2 sofre maior influência pelas propriedades químicas e estruturais dos cardenólídeos (LAURSEN *et al.*, 2015).

O anel de lactona da ouabaína localiza-se em um funil hidrofóbico de α M4-6, direcionado ao sítio II e I de ligação do íon K $^+$ (Figura 5A). A natureza dos íons ligados no sítio II da ATP α de Na $^+$ /K $^+$ e dos grupos substituintes ligados na genina dos cardenólídeos pode facilitar ou dificultar a entrada dos cardenólídeos em sua cavidade de ligação (LAURSEN *et al.*, 2013). Essas propriedades estão relacionadas à profundidade que os

cardenólídeos podem atingir na sua cavidade de ligação, por exemplo, a falta de grupos hidroxilas e de açúcar nos cardenólídeos facilita sua entrada no funil hidrofóbico, logo, a afinidade de ligação desses compostos são também influenciadas por essas propriedades (LAURSEN *et al.*, 2015).

Os princípios fundamentais para a ligação de cardenólídeos na ATP α de Na⁺/K⁺ são descritos por Laursen *et al.* (2015). Inicialmente é formado um complexo de baixa afinidade da superfície α hidrofóbica do núcleo esteroide com a extremidade mais externa ao ambiente extracelular das hélices α M4–5 e do loop α M5–6. Quando a enzima passa ao estado fosforilado (E2) a região em torno do cardenólídeo é fechada pela formação de ligações de hidrogênio entre a superfície β do núcleo esteroide e as cadeias laterais polares dos resíduos de aminoácidos de M1, M2 e M6 (LAURSEN *et al.*, 2015).

1.6 Associação Planta-Inseto

Apesar de plantas sintetizarem um amplo repertório de metabólitos defensivos, as mesmas ainda estão sujeitas a herbivoria por insetos. Isso é resultado de um processo coevolutivo entre os insetos herbívoros e suas plantas hospedeiras, envolvendo adaptações químicas e fisiológicas de ambos.

Ao longo desses últimos anos, as pesquisas têm demonstrado com melhor precisão as adaptações moleculares e genéticas dos insetos herbívoros às defesas químicas das plantas. Nesse contexto, há duas formas gerais de adaptações metabólicas: Após a ingestão, os insetos modificam as biomoléculas produzidas pela planta, reduzindo sua toxicidade. Assim, o transporte e a excreção desses compostos são facilitados. O inseto também pode utilizá-los em seu próprio benefício, sequestrando e armazenando as biomoléculas tóxicas para sua própria defesa contra seus predadores e parasitas. Outra forma de adaptação é tornar insensíveis os sítios-alvos a esses compostos tóxicos de defesa da planta (BIRNBAUM, 2018).

Um exemplo a essas duas formas de adaptação é encontrada no inseto *Danaus plexippus* (Lepidoptera) que são especialistas de Apocynaceae. A larva de *D. plexippus* sequestra e armazena cardenólídeos de *C. procera* para utilizá-los na defesa contra seus predadores durante a fase larval e a fase adulta (DOBLER *et al.*, 2012; PETSCHENKA *et al.*, 2013). As ATPases de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus* são altamente resistente à toxicidade dos cardenólídeos presentes em suas plantas hospedeiras (DOBLER *et al.*, 2012).

As substituições dos aminoácidos leucina por valina na posição 104 (L104V) e asparagina por histidina na posição 115 (N115H) no primeiro loop extracelular na ATP α de

Na^+/K^+ de *D. plexippus* é o que lhe confere resistência aos efeitos inibitórios dos cardenolídeos (DOBLER *et al.*, 2012). As posições 104 e 115 na subunidade α são posições variáveis, e de maior relevância no contexto sobre a insensibilidade desta enzima aos cardenolídeos. As substituições Q104V ou L104V e N115H alteram potencialmente a sensibilidade de ATP α de Na^+/K^+ aos cardenolídeos, e esse efeito não é limitado apenas à enzima de *D. plexippus* (DOBLER *et al.*, 2012). No entanto, a forma como Q104V e N115H interfere na sensibilidade é desconhecida.

Apesar desse comportamento de *D. plexippus*, de colonizar plantas produtoras de cardenolídeos e sequestrar esses metabólitos, o mesmo ainda está sujeita a prejuízos em sua taxa de sobrevivência da fase larval à fase adulta, quando se alimentam de plantas do gênero *Asclepias* com altas concentrações de cardenolídeos apolares (TAO *et al.*, 2016).

O trabalho de Tao *et al.* (2016) descreve um exemplo de “trade-off”, no qual *D. plexippus* alimenta-se preferencialmente de espécies *Asclepias* com altas concentrações foliares de cardenolídeos apolares quando estão infectadas pelo protozoário *Ophryocystis elektroscirrha*. Esse comportamento aumenta a tolerância de *D. plexippus* à infecção, entretanto, reduz sua taxa de sobrevivência. Esse comportamento não é observado quando *D. plexippus* não está infectada, por isso apresentam maior taxa de sobrevivência (TAO *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que os esporos de *O. elektroscirrha* localizam-se na cutícula de *D. plexippus* ao longo de seu desenvolvimento, que funciona como um local de armazenamento dos cardenolídeos sequestrados por esse herbívoro (HOLZINGER; WINK, 1996; ALTIZER; OBERHAUSER, 1999).

No trabalho de Petschenka *et al.* (2018) foi relatado que os cardenolídeos uzarigenina, deglucouzarina, uzarina, calotropina e calactina causam forte inibição *in vitro* na ATP α de Na^+/K^+ isolada de *D. plexippus*, em relação a inibição causada pela ouabaína. Desses cardenolídeos, apenas uzarigenina possui alta hidrofobicidade, enquanto deglucouzarina, uzarina, calotropina e calactina são mais hidrofílicos.

Os resultados de Petschenka *et al.* (2018) foram diferentes do esperado, uma vez que *D. plexippus* sequestra preferencialmente cardenolídeos mais polares, especialmente calotropina e calactina (MALCOLM, 1990; MEBS *et al.*, 2017).

Os insetos *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii* (Hemipteras) também sequestram cardenolídeos de suas plantas hospedeiras e possuem resistência aos seus efeitos tóxicos (LOHR *et al.*, 2017; ZÜST *et al.*, 2018). Essa resistência também é atribuída a substituições

de aminoácidos na sequência de suas ATP α de Na⁺/K⁺, que reduz a sensibilidade dessa enzima aos cardenólídeos (ZHEN *et al.*, 2012).

Assim como *D. plexippus*, os insetos *O. fasciatus* e *A. nerii* possuem uma restrição ao sequestro de cardenólídeos, que está relacionado à polaridade desses metabólitos. *Oncopeltus fasciatus* sequestram preferencialmente cardenólídeos com polaridade intermediária, no entanto, a identidade desses cardenólídeos ainda é desconhecida. A identificação da polaridade dos cardenólídeos sequestrados por *O. fasciatus* foi realizada através do tempo de retenção por HPLC (high-performance liquid chromatography), utilizando a ouabaína como referência (LOHR *et al.*, 2017).




O pulgão *A. nerii* sequestra preferencialmente os menos polares, tais como a uzarigenina, uscharidina, uscharina e voruscharina (MALCOLM, 1990; ZÜST *et al.*, 2018). Esse inseto também possui um mecanismo metabólico que modifica a estrutura dos cardenólídeos que são sequestrados, tornando-os mais tóxicos aos seus predadores (ZUST *et al.*, 2018).

A resistência de insetos aos efeitos tóxicos dos cardenólídeos, bem como insensibilidade de suas ATP α de Na⁺/K⁺ é resultado de um processo de evolução molecular convergente, o qual foi demonstrado por Dobler *et al.* (2012), através de uma análise filogenética abrangendo trinta e três sequências de aminoácidos de ATP α de Na⁺/K⁺ correspondentes a trinta e três espécies de insetos de vinte e nove gêneros.

Os insetos *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* são espécies especialistas de Apocynaceae e desenvolveram suas estratégias de defesa específicas para superar ou controlar efeitos negativos sobre o seu organismo, causados pelos metabólitos de suas plantas hospedeiras. Insetos especialistas são mais resistentes quando comparado aos insetos generalistas, mas ainda estão sujeitos aos prejuízos causados pelos metabólitos de seus hospedeiros (TAO *et al.*, 2016; ZVEREVA; KOZLOV, 2016).

Até o momento, ainda não está claro o que levou *C. procera* a sintetizar uma tão ampla variedade estrutural de cardenólídeos, uma vez que todos esses metabólitos são específicos ao mesmo alvo molecular, a ATP α de Na⁺/K⁺. Além disso, não foi estabelecido se *C. procera* sintetiza cardenólídeos seletivos aos herbívoros *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, ou se as ATP α de Na⁺/K⁺ desses insetos são insensíveis aos seus trinta e cinco cardenólídeos. Algumas características relevantes desses herbívoros estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Insetos herbívoros de *Calotropis procera*.

Herbívoro (Ordem)	Imagem	Metamorfose ^a	Método e Fonte de alimento de <i>C. procera</i>	Sequestro de cardenólídeos (fase do ciclo de vida) ^c
<i>Danaus plexippus</i> (Lepidoptera)		Holometábolos	Mastigador e Folha	Larva
<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hemiptera)		Hemimetábolos	Sugador e Sementes ^a	Todas
<i>Aphis nerii</i> (Hemiptera)		Hemimetábolos	Sugador e Floema ^b	Todas

Fonte: Elaborada pelo autor. Foto do quarto instar da lagarta de *D. plexippus* foi utilizada. ^a: PANFILIO *et al.*, 2019; ^b: BIRNBAUM, 2019; ^c: HOLDREGE, 2010.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar cardenolídeos de *C. procera* seletivos às ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* e quais os fatores estruturais nestas enzimas que confirmam à esses insetos uma menor sensibilidade aos cardenolídeos.

2.2 Objetivos Específicos

- Classificar os cardenolídeos de *C. procera*;
- Caracterizar a hidropaticidade dos cardenolídeos de *C. procera*;
- Analisar a estrutura dos modelos tridimensionais das ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*;
- Analisar a estrutura do sítio de ligação de cardenolídeos nos modelos tridimensionais das ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*.
- Analisar a interação dos cardenolídeos de *C. procera* com os modelos tridimensionais das ATPases de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*.
- Realizar uma análise filogenética de insetos membros das famílias Nymphalidae, Lygaeidae e Aphididae

3. METODOLOGIA

3.1 Bases de dados

ManarchBase (<http://monarchbase.umassmed.edu/home.html>)

National Center for Biotechnology Information (NCBI) - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools>)

Protein Data Bank (PDB) – (<https://www.rcsb.org/>)

European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) – (<https://www.ebi.ac.uk/>)

Orientations of Proteins in Membranes (OPM) – (<https://opm.phar.umich.edu/>)

3.2 Cardenólídeos de *Calotropis procera*

As estruturas bidimensionais (2D) dos trinta e cinco cardenólídeos de *C. procera* foram construídas através do programa ACD/ChemSketch 2017.1.2 (Freeware). Os dados estruturais descritos na literatura foram utilizados para a construção desses cardenólídeos (Tabela 1). O programa Chem3D 16.0 foi utilizado para gerar as estruturas tridimensionais (3D) a partir das estruturas 2D desses cardenólídeos. Além disso, o Chem3D 16.0 também foi empregado para melhorar a qualidade das estruturas 3D através do processo de minimização de energia antes da realização dos ensaios de docking.

3.3 Classificação e Hidropaticidade dos Cardenólídeos de *Calotropis procera*

Para definição dos grupos de cardenólídeos, cada molécula foi classificada com base nos ligantes associados ao núcleo esteroide e a porção de açúcar ligado. A hidropaticidade foi calculada pelo programa MarvinSketch 17.29.0. O coeficiente de partição do sistema octanol-água ($\log P$) definido pelo programa foi aplicado para estimar o índice de hidropaticidade. Os cardenólídeos com valores de $\log P < 2$ foram considerados mais polares, e os cardenólídeos com valores de $\log P > 2$ foram considerados mais apolares.

3.4 Busca das sequências de subunidades α das ATPase de Na^+/K^+

Neste trabalho foram utilizadas sequências de aminoácidos de ATP α de Na^+/K^+ das espécies de inseto *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, as quais são hospedeiras da planta *C. procera*. Foi utilizada a sequência da ATP α de Na^+/K^+ de *D. plexippus* (MonarchBase no.: DPOGS214640) do Projeto Genoma Monarca, disponível no banco de dados ManarchBase (<http://monarchbase.umassmed.edu/home.html>). (ZHAN *et al.*, 2011; ZHAN; REPERT, 2013). Esse banco de dados fornece todas as informações disponíveis relacionadas ao genoma de *D. plexippus*. Foi a partir do Projeto Genoma Monarca, realizado para descobrir a base

genética sobre a migração dessa espécie de borboleta, que foi possível o sequenciamento e caracterização de seu genoma (ZHAN *et al.*, 2011; ZHAN; REPERT, 2013).

A sequência disponibilizada por esse banco de dados é de nucleotídeos, logo, foi necessário realizar a busca pela sequência de aminoácidos correspondente a ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, que foi realizada por meio do BLASTx. Essa sequência de aminoácidos obtida pelo BLASTx, foi utilizada como sequência de consulta para identificar as sequências de aminoácidos das ATP α de Na⁺/K⁺ de *O. fasciatus* e *A. nerii*, no entanto, para isso foi utilizado o BLASTp.

O programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) é disponibilizado no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e permite a identificação e comparação de regiões similares de sequências de nucleotídeos e aminoácidos, que se encontram depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank), e calcula a significância estatística dessa similaridade (MCGINNIS; MADDEN, 2004). Essa pesquisa é realizada a partir de uma sequência de consulta, de nucleotídeos ou aminoácidos.

O programa BLAST é dividido em cinco categorias de pesquisa, o BLASTn, tBLASTn, tBLASTx, BLASTx e BLASTp. O BLASTn identifica e compara apenas sequências de nucleotídeos; o tBLASTn utiliza uma sequência de aminoácidos como consulta, e essa sequência é comparada aos produtos traduzidos de sequências de nucleotídeos; o tBLASTx utiliza uma sequência de nucleotídeo como consulta, essa sequência é traduzida para uma sequência de aminoácidos correspondente e comparada aos produtos traduzidos de sequências de nucleotídeos; o BLASTx utiliza uma sequência de nucleotídeo como consulta, essa sequência é traduzida para uma sequência de aminoácidos correspondente e comparada sequências de aminoácidos; e o BLASTp identifica e compara apenas sequências de aminoácidos (MCGINNIS; MADDEN, 2004).

3.5 Alinhamento e Análise Filogenética

Os alinhamentos múltiplos neste trabalho foram realizados pelo programa Clustal Omega 1.2.4 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (THOMPSON *et al.*, 1994). Foi empregada a matriz BLOSUM, selecionando com penalidades de gap padrão para alinhamento de pares de base (*gap open*: 10; *gap extension*: 0.1). As sequências de aminoácidos alinhadas correspondem às sequências das ATP α de Na⁺/K⁺ utilizadas ao longo deste projeto, incluindo as de *D. plexippus*, *O. fasciatus*, *A. nerii* e das espécies incluídas na análise filogenética. Foi realizado também um alinhamento múltiplo entre as sequências de

aminoácidos das ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* com a sequência do template utilizado na etapa de modelagem computacional.

Para análise desses alinhamentos foram utilizados dados preliminares na literatura sobre os aminoácidos e as suas respectivas posições na ATP α de Na⁺/K⁺ que exercem alguma influência na sensibilidade desta enzima aos cardenólídeos.

A construção da árvore filogenética foi realizada através do programa MEGA7, utilizando um *bootstrap* com 1000 replicações (KUMAR *et al.*, 2016). Foi utilizado o método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo de correção de Poisson (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965). A árvore foi desenhada em escala, e o comprimento dos ramos corresponde ao número de substituições por local. Todas as posições contêm lacunas e dados ausentes foram eliminadas.

Para a análise filogenética foi incluída sequências de aminoácidos de ATP α de Na⁺/K⁺ de insetos das mesmas famílias de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, as famílias Nymphalidae, Lygaeidae e Aphididae, respectivamente. A busca pelas sequências de aminoácidos foi realizada através do BLASTp. Um menor número de sequências das famílias Lygaeidae e Aphididae estão disponíveis no GenBank portanto, não foi utilizado o mesmo número de sequências para as três famílias. A seleção das espécies teve a finalidade de abranger insetos especialistas e generalistas de cada família, totalizando vinte e seis espécies e uma sequência de aminoácido de ATP α de Na⁺/K⁺ de cada uma dessas espécies (Tabela 3).

Tabela 3 - Espécies de insetos utilizadas na construção e análise da árvore filogenética.

Espécies (Família)	PDB ID	Generalista	Especialista	Sequestra cardenólídeos	Referências
<i>Danaus plexippus</i> (Nymphalidae)	AFU25676.1		✓	✓	ZHEN <i>et al.</i> , 2012
<i>Danaus eresimus</i> (Nymphalidae)	AFU25674.1		✓	✓	ZHEN <i>et al.</i> , 2012
<i>Danaus genutia</i> (Nymphalidae)	CCW28387.1	✓			KHAN; RASTOGI, 2015
<i>Danaus gilippus</i> (Nymphalidae)	AFU25675.1		✓	✓	ZHEN <i>et al.</i> , 2012
<i>Danaus chrysippus</i> (Nymphalidae)	CCW28386.1	✓			KHAN; RASTOGI, 2015
<i>Vanessa tameamea</i> (Nymphalidae)	XP_026489696.1	-	-	-	
<i>Lycorea halia</i> (Nymphalidae)	AFU25681.1	✓			ZHEN <i>et al.</i> , 2012
<i>Limenitis archippus</i> (Nymphalidae)	AFU25678.1	✓			ZHEN <i>et al.</i> , 2012
<i>Bicyclus anynana</i>	XP_023954937.1	-	-	-	

(Nymphalidae)					
<i>Tirumala septentrionis</i> (Nymphalidae)	CCW28398.1	-	-	-	
<i>Tirumala petiverana</i> (Nymphalidae)	CCW28397.1	-	-	-	
<i>Idea leuconoe</i> (Nymphalidae)	CCW28391.1	-	-	-	
<i>Mechanitis polymnia</i> (Nymphalidae)	CCW28394.1	-	-	-	
<i>Ideopsis juvena</i> (Nymphalidae)	CCW28392.1	-	-	-	
<i>Parantica aglea</i> (Nymphalidae)	CCW28395.1	-	-	-	
<i>Amauris tartarea</i> (Nymphalidae)	CCW28384.1	-	-	-	
<i>Euploea core godartii</i> (Nymphalidae)	CCW28389.1		✓		KHAN; RASTOGI, 2015
<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Lygaeidae)	AFU25689.1		✓	✓	BRAMER <i>et al.</i> , 2015
<i>Lygaeus kalmii</i> (Lygaeidae)	AFU25682.1		✓	✓	BRAMER <i>et al.</i> , 2015
<i>Aphis nerii</i> (Aphididae)	AFU25665.1		✓	✓	ZUST <i>et al.</i> , 2018
<i>Aphis gossypii</i> (Aphididae)	XP_027839184.1	✓			CHAUDHARY <i>et al.</i> , 2009
<i>Melanaphis sacchari</i> (Aphididae)	XP_025206956.1	✓			CHAUDHARY <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhopalosiphum maidis</i> (Aphididae)	XP_026817451.1	✓			PEREIRA; SALVADORI, 2006
<i>Myzus persicae</i> (Aphididae)	XP_022167518.1	✓		✓	ALI; AGRAWAL, 2012
<i>Acyrtosiphon pisum*</i> (Aphididae)	XP_003243206.1		✓		RAMSEY <i>et al.</i> , 2010
<i>Sipha flava</i> (Aphididae)	XP_025412835.1	✓			GONZALES <i>et al.</i> , 2002

Fonte: Elaborada pelo autor. * Especialista em leguminosas (Fabaceae).

3.6 Modelagem Computacional

A construção dos modelos tridimensionais (3D) das ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* foi realizada através dos servidores SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (WATERHOUSE *et al.*, 2018) e Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (KELLEY *et al.*, 2015).

Essas ferramentas de bioinformática permite a construção de modelos tridimensionais através da modelagem por homologia, também conhecida como modelagem

comparativa. Esse método prediz a estrutura tridimensional da proteína de acordo com a similaridade entre a sequência de aminoácidos da proteína modelada e a do template, no qual deve ser >30-35% para que seja possível a construção de modelos precisos (VITKUP *et al.*, 2001). O template consiste numa proteína com estruturas tridimensionais resolvidas por métodos experimentais e que possui os seus dados depositados no Protein Data Bank (PDB).

A modelagem por homologia é considerada hoje a técnica computacional mais confiável para predição de estrutura proteica. O seu processo de construção do modelo por modelagem é dividido em quatro etapas principais: i) identificação de estruturas tridimensionais resolvidas por métodos experimentais de possíveis templates, ii) alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína a ser modelada com a desses templates, iii) construção do modelo tridimensional, e iv) avaliação da qualidade do modelo gerado (KELLEY *et al.*, 2015; WATERHOUSE *et al.*, 2018).

3.7 Validação e Refinamento dos Modelos

Os modelos gerados na modelagem computacional foram validados quanto a possíveis erros na sua estrutura tridimensional. As ferramentas utilizadas nesta validação foram o MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (CHEN *et al.*, 2010), ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) e ERRAT (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) (COLOVOS; YEATES, 1993).

O MolProbity é um servidor da web de validação de estruturas que permite avaliar a qualidade do modelo em níveis locais e globais, tanto para proteínas como para ácidos nucleico. Através desse servidor, são avaliados os contatos de todos os átomos, a sua geometria, o comprimento de ligação do backbone, e o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados. Os resultados da validação são apresentados em resumos e gráficos, dos quais está o gráfico de Ramachandran (CHEN *et al.*, 2010).

O gráfico de Ramachandran é o modo mais simples e sensível para avaliar a qualidade de uma estrutura proteica, no qual é descrito os ângulos diedros ϕ (phi) e ψ (psi) de todos os resíduos de aminoácidos da estrutura de peptídeos. Desse modo, os ângulos diedros dos resíduos são definidos como permitidos ou não permitidos. Os ângulos ϕ e ψ dos resíduos são considerados não permitidos quando há impedimento estérico (KLEYWEGT; JONES, 1996).

ProSA-web, por sua vez, calcula a pontuação de qualidade geral (estrutura tridimensional da proteína) e local (posição dos resíduos de aminoácidos na sequência), avaliando as coordenadas atômicas dos $C\alpha$ da estrutura de entrada. Todos esses dados são

plotados em gráficos. A qualidade geral da estrutura é indicada através do Z-score, no qual é exibido em um gráfico junto com Z-scores de todas as cadeias polipeptídicas determinadas experimentalmente e depositado no PDB. Por meio desse gráfico é possível verificar se o Z-score da estrutura de entrada está dentro da faixa de Z-scores das proteínas de tamanhos similares. Quanto ao gráfico da qualidade local, é calculada separadamente a energia média de fragmentos de dez e de quarenta resíduos, os quais são plotados no mesmo gráfico de maneira distinta. Em geral, valores positivos neste gráfico correspondem às regiões contendo erros estruturais (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

O ERRAT expressa em porcentagem o valor de qualidade geral da estrutura proteica. Valores de erro da estrutura de entrada são calculados por comparação com estruturas tridimensionais determinadas experimentalmente e depositado no PDB. Esses valores de erros são plotados em função da posição dos resíduos de aminoácidos da sequência de entrada. Estruturas de alta resolução têm qualidade geral $\geq 95\%$, já as estruturas de baixa resolução (2,5 a 3Å) têm qualidade geral próximo a 91% (COLOVOS; YEATES, 1993).

O refinamento dos modelos gerados na etapa de modelagem computacional foi realizado com auxílio do GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/>) (HEO *et al.*, 2013) e do Fragment Guided Molecular Dynamics (FG-MD) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/FG-MD/>) (ZHANG *et al.*, 2011). Após o refinamento todos os modelos foram novamente validados.

O GalaxyRefine consiste de uma ferramenta do servidor GalaxyWeb, o qual recria as conformações de todas as cadeias laterais. Esse modelo com as suas cadeias laterais reelaboradas são então refinados por relaxamento da sua estrutura, por meio de simulações de dinâmica molecular (HEO *et al.*, 2013).

Já o FG-MD utiliza simulações de dinâmica molecular (MD) para refinar estruturas proteicas em nível atômico. Através de um alinhamento estrutural entre o modelo de entrada e fragmentos de estruturas proteicas de alta resolução do PDB, essa ferramenta busca corrigir as coordenadas de cada átomo do modelo, removendo choques estéricos e ajustando os ângulos de torção e as ligações de hidrogênio (ZHANG *et al.*, 2011).

Adicionalmente, o programa PyMol 2.0.7 foi utilizado para calcular a raiz quadrada do desvio médio (RMSD no inglês, root-mean-square deviation), e para visualização dos modelos e preparo de imagens utilizadas neste trabalho.

O RMSD (Å) é obtido através do alinhamento de dois ou mais modelos tridimensionais de proteínas, e informado como “RMS” na saída de texto do PyMol. O RMSD é utilizado para quantificar a similaridade entre duas ou mais estruturas

tridimensionais, por meio das coordenadas atômicas dos C α das estruturas alinhadas. Valores mais próximos de zero significa maior similaridade entre as estruturas alinhadas (MAIOROV; CRIPPEN, 1994).

3.8 Caracterização dos Modelos Tridimensionais

Os modelos 3D das ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. neri* que apresentaram melhor qualidade, após o refinamento, foram analisados quanto a posição de domínios proteicos, através de dados disponibilizados no PDB e no European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). A posição espacial desses modelos 3D, em relação à bicamada lipídica, foi calculada pelo servidor Positioning of Proteins in Membrane (PPM 2.0), disponível no banco de dados Orientations of Proteins in Membranes (OPM). Por meio desse servidor, também foi possível a identificação exata das sequências de resíduos de aminoácidos que ficam incorporados na bicamada lipídica.

3.9 Acoplamento Molecular Computacional

O acoplamento molecular computacional, ou docking, foi realizado com as estruturas 3D das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. neri* e os cardenólídeos de *C. procera*. Essa etapa foi realizada pelo programa AutoDock Vina 1.5.6. O AutoDock é um conjunto de ferramentas de acoplamentos automatizados, que permitem prever as melhores conformações possíveis de interação entre ligante-macromolécula e sua afinidade (TROTT; OLSON, 2010).

Para os procedimentos de docking, foram adicionados hidrogênios polares e cargas de Gasteiger computorizadas às estruturas 3D das ATP α 1 Na⁺/K⁺ e aos cardenólídeos. Para o estabelecimento dos valores do grid box das estruturas 3D de ATP α 1 Na⁺/K⁺ foi inicialmente mapeado os resíduos de aminoácidos que influenciam na ligação da ouabaína em ATP α de Na⁺/K⁺, com base em dados estruturais descritos na literatura. As posições desses resíduos de aminoácidos são as mesmas identificadas e destacadas na etapa de alinhamento múltiplo, descrita anteriormente. O espaçamento padrão do programa de 0,375 Å foi mantido para as três estruturas 3D, e os valores dos centros e das dimensões estão descritas na tabela 4. O grid box cobriu regiões extracelulares e transmembranares nas três estruturas 3D das ATP α 1 de Na⁺/K⁺.

Tabela 4 - Valores atribuídos no grid box por meio do programa AutoDock 1.5.6, aos modelos das ATP α 1 Na⁺/K⁺ de *Danaus plexippus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii*.

Espécie	Centro			Dimensão		
	x	y	z	x	y	z
<i>Danaus plexippus</i>	146,593	18,119	-4,162	98	104	110
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	139,591	18,411	2,927	126	102	106
<i>Aphis nerii</i>	139,865	16,71	1,559	126	108	126

Fonte: Elaborada pelo autor. O espaçamento do grid box para as três estruturas 3D foi de 0,375 Å.

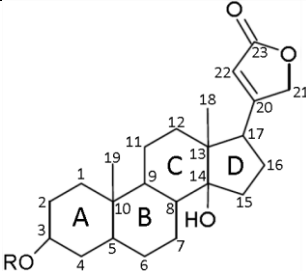
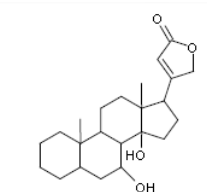
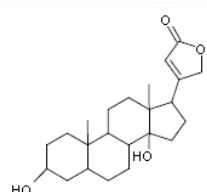
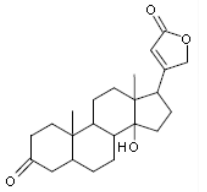
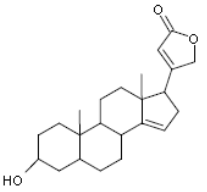
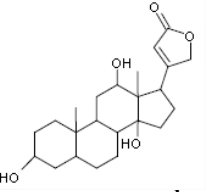
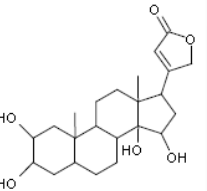
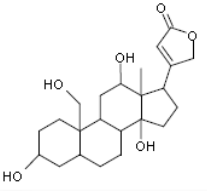
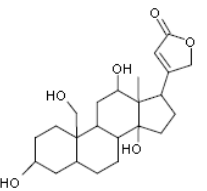
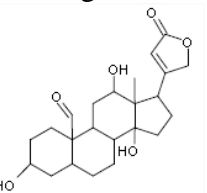
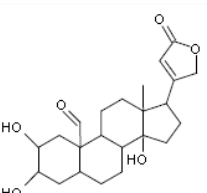
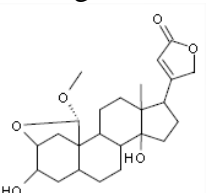
Nesta análise de docking, as estruturas 3D das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ foram mantidas rígidas, enquanto os cardenólídeos foram tratados como ligantes flexíveis. A exaustividade foi fixada em 15 e o número de modos de ligação foi limitado a 10, com diferença máxima de energia de 4 kcal/mol. Os resultados gerados foram analisados e escolhidos com base na coordenação dos cardenólídeos na enzima (OGAWA *et al.*, 2009) e afinidade de ligação prevista. Os resultados foram analisados com o programa PyMOL 2.0.7 (Schrodinger, LLC). Além disso, o PyMOL foi utilizado para preparar todas as imagens 3D.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

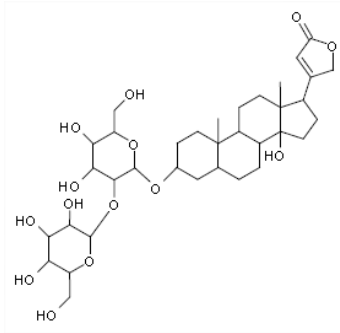
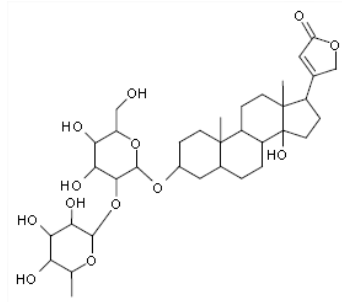
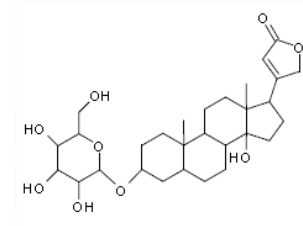
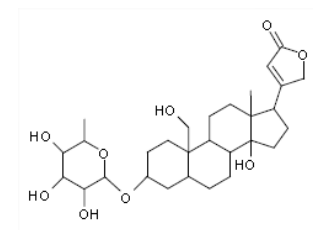
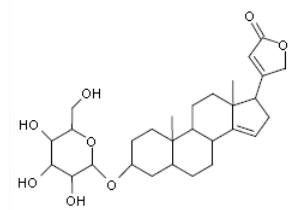
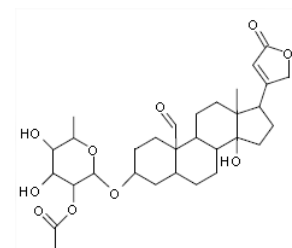
4.1 Cardenólídeos de *Calotropis procera*

Os trinta e cinco cardenólídeos já identificados em *C. procera* foram classificados em três grupos, com base nos ligantes associados ao núcleo esteroide e à porção de açúcar ligado (Tabela 5).

Tabela 5 - Classificação dos cardenólídeos de *Calotropis procera*.

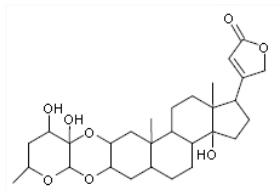
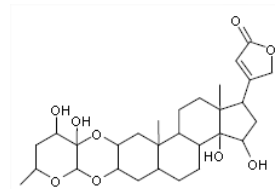
Grupo 1		
 <p>Genina</p>	 <p>Proceragenina^a</p>	 <p>Uzarigenina^b</p>
 <p>Uzarigenone^c</p>	 <p>β-anhydroepidigitoxigenina^b</p>	 <p>Siriogenina^d</p>
 <p>Afrogenina^e</p>	 <p>12β-hidroxicoroglaucigenina^e</p>	 <p>Procegenina A^e</p>
 <p>Procegenina B^e</p>	 <p>Calotropagenina^f</p>	 <p>2β,19-epoxi-3β,14β- dihidroxi-19-metoxi- 5α-card-20(22)- enolide^b</p>

Grupo 2

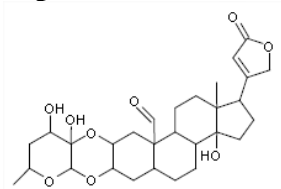
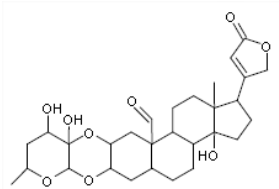
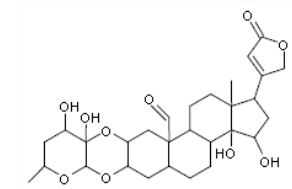
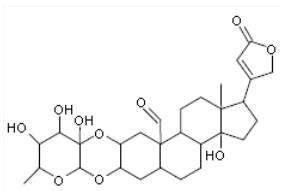
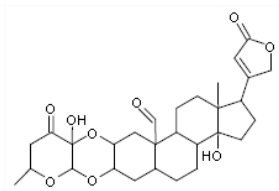
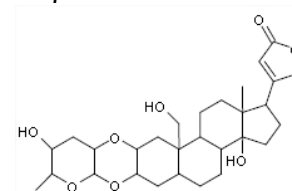
Uzarina^h3-[β-(4-O-β-D-glucopiranosil-β-D-6-desoxiallopiranosil)oxi]uzarigenina^hDeglucouzarina^cFrugoside^cβ-anhydroepidigitoxigenin-3β-O-β-glucopiranoside^bProceraside A^g

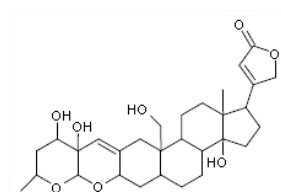
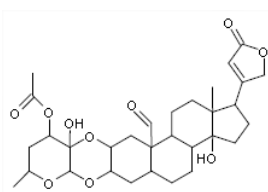
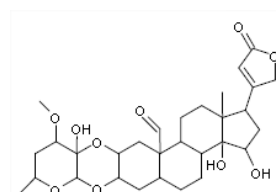
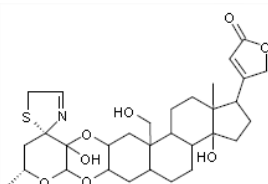
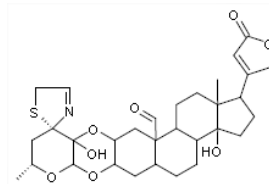
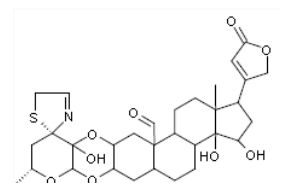
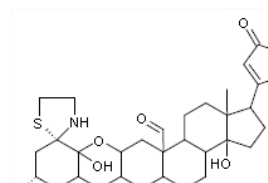
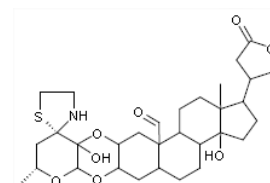
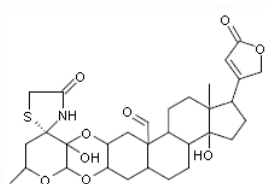
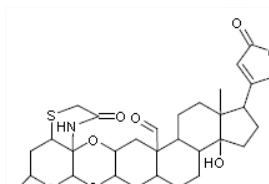
Grupo 3

Grupo 3.1:

Gomfoside^dAfroside^e

Grupo 3.2:

Calotropina^dCalactina^e15β-hidroxicallactina^eCalotoxina^eUscharidina^fIscharidinaⁱ

 β -tetrahydro-uscharidina^dAsclepina^fCalactoprocina^e**Grupo 3.3:**Dihidrouscharina^jUscharina^e15 β -hidroxi uscharina^dVoruscharina^dDihidrovourouscharina^j2''-oxovoruscharina^lIscharinaⁱ

Fonte: Elaborada pelo autor. *: Estrutura da genina de cardenólídeos. ^a: Akhtar *et al.*, 1992; ^b: Shaker *et al.*, 2010; ^c: Elgamel *et al.*, 1999; ^d: Bruschweiler *et al.*, 1969; ^e: Mohamed *et al.*, 2015; ^f: Kanojiya; Madhusudanan, 2010; ^g: Ibrahim *et al.*, 2014; ^h: Hanna *et al.*, 1999; ⁱ: Sweidan; Zarga, 2015; ^j: Desheesh *et al.*, 2004; ^l: Quaquebeke *et al.*, 2005.

O grupo 1 é composto por cardenólídeos sem a porção de açúcar, denominados de geninas, ou agliconas (Tabela 5). Desse grupo, a proceragenina é o único cardenólídeo já identificado em *C. procera* que não possui nenhum ligante em C-3, e que possui um grupo hidroxila em C-7. No grupo 2, o menor grupo, estão presentes os cardenólídeos com um ou dois resíduos de açúcar, a glicose e a ramnose. O resíduo de açúcar está ligado através de seu grupo hidroxila de C-1 ao C-3 do núcleo esteroide (Tabela 5).

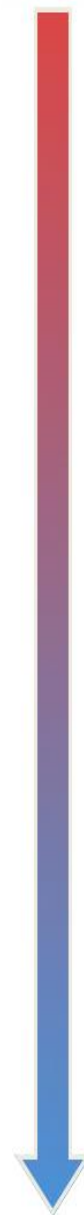
Já no grupo 3 estão inclusos todos os cardenólídeos com 2,3-ligações cíclicas, que consiste em uma hexose ligada aos C-2 e C-3 do núcleo esteroide. Esse é o maior grupo e mais heterogêneo. Os cardenólídeos desse grupo foram agrupados em três grupos menores, grupos 3.1, 3.2 e 3.3. O grupo 3.1 é composto por cardenólídeos que não possuem um grupo hidroxila em C-19 do núcleo esteróide (gomfoside e afroside). No grupo 3.2 estão os

cardenólídeos que possuem o grupo hidroxila em C-19, no qual pode estar no estado oxidado ou reduzido. O grupo 3.3 se distingue do 3.2 pela presença de um grupo tiazolidina ligado na hexose (Tabela 5).

O índice de hidropaticidade dos trinta e cinco cardenólídeos está representado na Tabela 6. Todos os cardenólídeos apresentaram um gradiente uniforme de polaridade, com valores de -0.474 (uzarina) a 3.743 (β -anhydroepidigitoxigenina).

Tabela 6 - Hidropaticidade dos cardenólídeos de *Calotropis procera*.

Cardenólídeos	Log P	Polaridade
Uzarina	-0.474	Mais hidrofílico
12 β -hidroxicoroglaucigenina	0.566	
Procegenina A	0.566	
3-[β -(4-O- β -D-glucopiranosil- β -D-6-desoxiallopiranosil)oxi] uzarigenina	0.573	
Procegenina B	0.870	
15 β -hidroxicalactina	0.889	
Afrogenina	0.918	
Calotropagenina	1.026	
Frugoside	1.063	
Calotoxina	1.274	
Deglucouzarina	1.297	
β -tetrahydro-uscharidina	1.396	
Calactoprocina	1.532	
Proceraside A	1.818	
Siriogenina	1.837	
Ischaridina	1.840	
Afroside	1.856	
Calotropina	1.964	
Calactina	1.964	
β -Anhydroepidigitoxigenin-3 β -O- β -glucopiranoside	1.972	
15 β -hidroxi-uscharina	2.103	
2 β ,19-epoxi-3 β ,14 β -dihidroxi-19-metoxi-5 α -card-20(22)-enolide	2.152	
Asclepina	2.405	
Ischarina	2.408	
2''-oxovoruscharina	2.517	
Uscharidina	2.756	
Dihidrouscharina	2.864	
Gomfoside	2.931	
Dihidrovouroscharina	3.044	
Uzarigenina	3.067	
Proceragenina	3.109	
Uscharina	3.178	
Uzarigenone	3.275	
Voruscharina	3.310	
β -anhydroepidigitoxigenina	3.743	Mais hidrofóbico



Fonte: Elaborada pelo autor. O logaritmo decimal do coeficiente de partição ($\text{Log } P$) está disposto em ordem crescente de $\text{Log } P$. Cardenólídeos mais hidrofóbicos possuem valores de $\text{Log } P > 0$, e os cardenólídeos mais hidrofílicos possuem valores de $\text{Log } P < 0$ (BJELČIĆ *et al.*, 2019). O valores de $\text{Log } P$ foram obtidos através do software MarvinSketch 17.29.0.

Essa grande diversidade estrutural de cardenólídeos sintetizados por *C. procera*, bem como a variedade no grau de polaridade desses metabólitos, pode está relacionada com a coevolução entre *C. procera* e seus respectivos herbívoros. Assim, esse processo de coevolução resultaria na seletividade desses cardenólídeos aos diferentes herbívoros, de modo que um cardenólídeo pode exercer efeitos tóxicos em uma espécie de herbívoro com mais intensidade do que em outras espécies.

É notória a complexidade dos mecanismos de defesa desenvolvidos pelos herbívoros para superar os efeitos tóxicos dos cardenólídeos, e de seu papel em induzir a planta a reformular seus mecanismos de defesa contra tais herbívoros. Assim, a insensibilidade das ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* aos cardenólídeos parecem agir como força motriz sobre a variedade estrutural dos cardenólídeos sintetizados por *C. procera*.

Além disso, a especificidade com relação à polaridade dos cardenólídeos para o sequestro sugere haver seletividade desses metabólitos sobre as ATP α de Na⁺/K⁺ desses insetos. Assim, possivelmente os cardenólídeos que não são sequestrados por esses herbívoros são capazes de se ligarem com maior afinidade em seu sítio de ligação nessas ATP α de Na⁺/K⁺, em relação aos cardenólídeos que não são sequestrados. De modo que a seletividade desses metabólitos a essas enzimas está diretamente relacionada à sua polaridade.

No entanto, por meio do trabalho de Tao *et al.* (2016), descrito anteriormente, é demonstrado um exemplo de “trade-off” em *D. plexippus*, no qual demonstra que os cardenólídeos apolares também são absorvidos pelo organismo desse inseto. Logo, pode-se propor que há cardenólídeos que são especificamente sequestrados por *D. plexippus* e que são capazes de inibir sua ATP α de Na⁺/K⁺, no entanto, a toxicidade é dependente da dose, uma vez que a taxa de sobrevivência de *D. plexippus* foi inversamente proporcional à concentração de cardenólídeos apolares em *Asclepias* (TAO *et al.*, 2016).

Assim, é possível que *C. procera* sintetize cardenólídeos seletivos aos herbívoros *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, e que essa seletividade abrange também aos que são sequestrados por esses insetos.

4. 2 Modelagem computacional e caracterização dos modelos tridimensionais

Os modelos 3D das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* gerados pelos servidores Swiss Model (Modelo 1) e Phyre2 (Modelo 2) utilizaram como template a estrutura cristalográfica da ATPase de Na⁺/K⁺ da glândula retal de tubarão da espécie *Squalus acanthias* (PDB ID: 3a3y e 2zxe, respectivamente). Os modelos 3D de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* apresentaram alta similaridade com as estruturas dos templates, com identidade entre 70 % a 76,26 %. As estruturas 3D desses templates foram resolvidas por cristalografia de raios-X com resoluções de 2,80 Å e 2,4 Å, respectivamente.

A estrutura cristalográfica do template 3a3y foi resolvida na conformação acoplada à ouabaína, enquanto que estrutura do template 2zxe foi resolvida na conformação nativa da enzima. Este trabalho tem a finalidade de gerar modelos 3D com conformações as mais semelhantes possíveis de sua estrutura nativa. Assim, os modelos 2, gerados pelo servidor Phyre2, no qual utilizou o template 2zxe, seriam os modelos 3D ideais para prosseguir com as análises deste trabalho. No entanto, para assegurar a qualidade dos modelos 3D escolhidos, ambos os modelos 1 e 2 foram validados e refinados.

A validação desses modelos 3D foi realizada pelos servidores MolProbity, através do diagrama de Ramachandran, e pelos servidores ProSA-web e ERRAT (Tabela 7). Segundo o exposto pelo diagrama de Ramachandran e pelo ERRAT, todos os modelos 1 de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* possuíam melhor qualidade.

Entretanto, o z-score, calculado pelo ProSA-web, dos modelos 1 das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* (-11,65, -10,95 e -11,84, respectivamente) foram os valores mais distantes do z-score de seu template 3a3y, que corresponde a -10,8. Quanto maior é a diferença entre os valores do z-score do modelo e de seu template menor é a qualidade do modelo, uma vez que esses valores correspondem às coordenadas atômicas dos C α da estrutura. Portanto, de acordo com os dados gerados pelo ProSA-web, os modelo 2 das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, que apresentaram z-score de -11,97, -11,37 e -12,16, respectivamente, possuem melhor qualidade, uma vez que seu template 2zxe possui z-score de -11,35 (Tabela 7).

Tabela 7 - Validação dos modelos tridimensionais das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *Danaus plexippus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii* gerados pelos servidores Swiss Model (Modelo 1) e Phyre2 (Modelo 2).

Espécies (Modelo)		Molprobitry (%)			ProSA-web (z-score)	ERRAT (%)
		Regiões favoráveis	Regiões permitidas	Outliers		
<i>Danaus plexippus</i>	(1)	95,2	99,3	7	-11,65	95,719
	(2)	94,8	99,2	8	-11,97	92,464
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	(1)	95,5	99,7	3	-10,95	95,492
	(2)	94,8	99,4	6	-11,37	92,850
<i>Aphis nerii</i>	(1)	95,3	99,5	5	-11,84	96,118
	(2)	94,3	99,1	9	-12,16	90,974

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os servidores Refine e o FG-MD foram utilizados para o refinamento dos modelos 1 e 2 das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*. Após o refinamento de todos os modelos 1 e 2, foi realizado novamente a validação pelos servidores MolProbitry, ProSA-web e ERRAT (Tabela 8).

Tabela 8 - Validação dos modelos tridimensionais refinados das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *Danaus plexippus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii* gerados pelos servidores Swiss Model (Modelo 1) e Phyre2 (Modelo 2).

Espécies	Servidores	Molprobitry (%)			ProSA-web (z-score)	ERRAT (%)
		Regiões favoráveis	Regiões permitidas	Outliers		
<i>Danaus plexippus</i>	(1) Refine	98,9	99,9	1	-11,66	93,571
	FG-MD	91,5	98,2	18	-11,78	94,501
	(2) Refine	98,8	100,0	0	-12,36	96,524
	FG-MD	89,8	98,0	20	-11,96	93,068
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	(1) Refine	99,2	100	0	-11,29	94,479
	FG-MD	91,0	98,2	18	-10,97	94,094
	(2) Refine	98,9	100	0	-11,62	93,827
	FG-MD	90,3	98,3	17	-11,45	94,507
<i>Aphis nerii</i>	(1) Refine	99,0	99,9	1	-12,2	96,636
	FG-MD	90,2	98,2	12	-11,95	95,719
	(2) Refine	98,6	100	0	-12,5	94,507
	FG-MD	89,4	97,5	25	-12,26	93,820

Fonte: Elaborada pelo autor. Os servidores de refinamento utilizados foram o Refine do GalaxyWEB e o FG-MD.

Após o refinamento pelo servidor GalaxyRefine, é possível demonstrar que os modelos 2 das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, gerados pelo servidor Phyre 2, apresentaram ótima qualidade (Tabela 8), permitindo utilizá-los nas análises adiante desse projeto. Assim, todos os dados apresentados a seguir foram obtidos a partir de estudos utilizando apenas os modelos 2 de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*.

Por meio do programa PyMOL 2.0.7., foi realizado, separadamente, o alinhamento estrutural de cada modelo 3D das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, com a estrutura utilizada como template em suas construções (PDB ID: 2zxe), no qual apresentaram RMSD de 0,245 Å, 0,255 Å e 0,26 Å, respectivamente. Esses valores de RMSD indicam uma boa semelhança entre os modelos 3D avaliados e o template.

Esses valores de RMSD correspondem as similaridades entre as coordenadas atômicas dos C- α dos modelos 3D de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* com as do template 2zxe, e quanto mais próximo de zero menor será a diferença entre essas coordenadas, e melhor será a qualidade do modelo 3D avaliado (MAIOROV; CRIPPEN, 1994).

Os domínios citoplasmáticos A, P e N, e as hélices transmembranares (α M1-10) dos modelos 3D de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* foram identificados e estão detalhados na Tabela 9 e Figura 6. Essa identificação foi realizada por meio dos dados do template 2zxe que estão depositados do EMBL-EBI, e do alinhamento estrutural dos modelos 3D de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* com o modelo 3D do template, através do programa PyMOL 2.0.7.

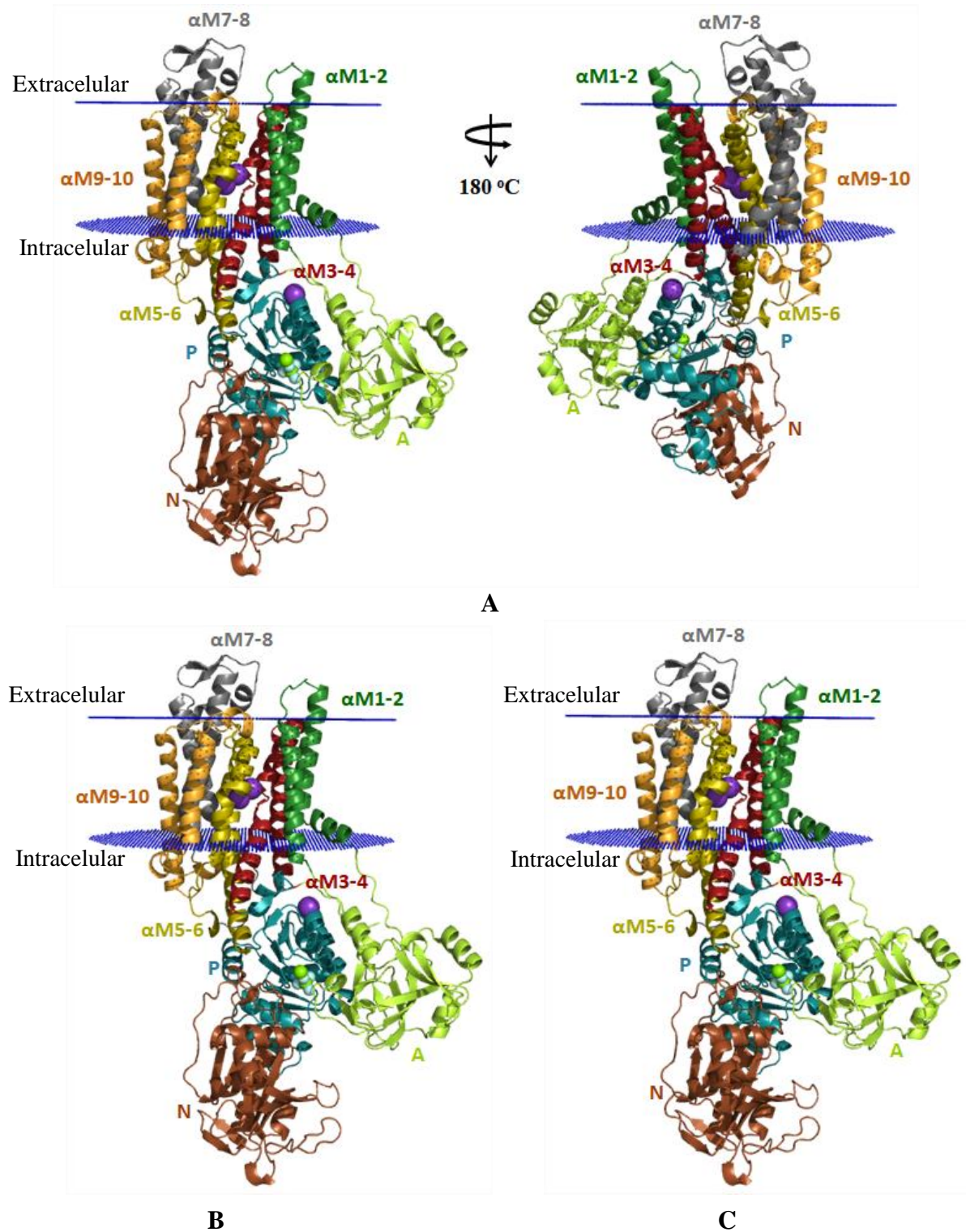
Tabela 9 - Posição dos segmentos de aminoácidos das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *Danaus plexippus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii* correspondentes aos domínios citoplasmáticos (A, P e N) e transmembranares (α M1-10).

Espécie	Domínio	Posição inicial	Sequência de aminoácidos	Posição final
<i>Danaus plexippus</i>	A	23	QELDIDY...GPNALTP	68
	M1	73	PEWVKFC... YGIVAST	107
	M2	113	DDHLYLG... IFSYYQE	137
	A	148	KNMVPQF... SGLDTGE	267
	M3	268	TPIAKEI... FIIAFIL	299
	M4	302	HWLDAVI... TAKRMAS	339
	P	362	DKTGTLTQNRMTV	374
	N	375	AHMWFDN... DPPRAAV	585
	P	586	PDAVAKC... NFASIVT	746
	M5	741	FASIVTG... LAFILCD	783
	M6	789	GTVTILC... AIALAYE	811
	M7	832	NERLISM... FVIMAEN	862
	M8	893	TYRDRKA... WADLIIC	923
	M9	937	NWALNFG...AAFLSYT	957
M10	970	KLVWWLP... RFYLRRN	998	
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	A	22	QELDIDY... GPNALTP	67
	M1	72	SEWVKFC... YFITSTT	106
	M2	112	DNHMYLG... VFSYYQE	136
	A	147	KNMVPQF... SGLDTGS	266
	M3	267	TPIAREI... FIIAFAM	298
M4	301	FWLDAVV... TAKRMAA	338	

	P	361	DKTGTLTQNRMTV	373
	N	374	AHMWFDN...DPPRAAV	584
	P	585	PDAVAKC...NFASIVT	745
	M5	740	FASIVTG...LANVVLN	782
	M6	788	GAVTILC...AISLAYE	810
	M7	831	NERLISL...FVIMAEN	861
	M8	892	TYKERKA...WADLIIS	922
	M9	936	NWALNFG...AAFLSYC	956
	M10	969	KFVWWLP...KYYLRRY	997
<i>Aphis nerii</i>	A	62	QDPYLDY...GPNTLTP	107
	M1	112	PEWIKFA...HTAETST	146
	M2	152	DDYFYLG...IFSYYQQ	176
	A	414	AHMWFDN...DPPRAAV	627
	M3	307	TPIAREI...FIIALMM	338
	M4	341	YWLDAIL...TAKRMAS	378
	P	401	DKTGTLTQNRMTV	413
	N	414	AHMWFDN...DPPRAAV	627
	P	628	PDAVAKC...NFASIVT	788
	M5	783	FASIVTG...IAFIMLS	825
	M6	831	GAIAILC...AISLGYE	853
	M7	874	NNRLISL...FVIMAEN	904
	M8	935	TYQDRKS...WANLIIC	965
	M9	978	NMALNFS...ALFLCYL	999
	M10	1012	KWTWWIP...KFYIRRN	1040

Fonte: Elaborada pelo autor. Os segmentos listados de 1-10 correspondem a sequências de aminoácidos correspondentes aos domínios transmembrares α M1-10, respectivamente. A tabela foi reproduzida com base nos dados da ATPase de Na^+/K^+ do template (PDB ID: 2zxe).

Figura 6 - Organização estrutural dos domínios citoplasmáticos (P, N e A) e das hélices transmembranares (α M1-10) dos modelos tridimensionais das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *Danaus plexippus* (A), *Oncopeltus fasciatus* (B) e de *Aphis nerii* (C) incorporados na bicamada lipídica.



Fonte: Elaborada pelo autor. As linhas pontilhadas horizontais azuis correspondem aos limites aproximados da bicamada lipídica, calculado pelo servidor PPM 2.0. Os íons Mg²⁺, F⁺ e K⁺ estão representados por esferas de cor verde, cinza claro e roxo, respectivamente. Os domínios A, P e N, e as hélices transmembranares são descritos usando os seguintes códigos de cores: marrom [domínio de ligação a nucleotídeos (N)], azul [domínio

de fosforilação (P)], limon [domínio atuador (A)], verde (α M1–2), vermelho (α M3–4), amarelo (α M5–6), cinza (α M7–8) e laranja (α M9–10). Figura produzida com o programa PyMOL 2.0.7.

A posição espacial das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* em relação à bicamada lipídica foi calculada pelo servidor Positioning of Proteins in Membrane (PPM 2.0), disponível no banco de dados Orientations of Proteins in Membranes (OPM) (Figura 6). Por meio desse servidor, também foi possível a identificação exata das sequências de resíduos de aminoácidos que ficam incorporados na bicamada lipídica (Tabela 10).

Tabela 10 - Posição dos segmentos de aminoácidos das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *Danaus plexippus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii* correspondente as hélices transmembranares (α M1-10) que ficam incorporados na bicamada lipídica.

Espécie	α M	Posição inicial	Sequência de aminoácidos	Posição final
<i>Danaus plexippus</i>	1	74	EWVKFCK...CFIAYGI	103
	2	114	DHLYLGI...TGIFSY	135
	3	277	FIHLITG...FIIAFIL	299
	4	306	AVIFLIG...PEGLLAT	325
	5	761	SIAYTLT...FLAFILC	782
	6	790	TVTILCI...DMVPAIA	807
	7	836	ISMAYGQ...FFVYFVI	858
	8	901	EFTCHTA...WADLIIC	923
	9	938	WALNFGL...LSYTPGM	960
	10	971	LVWWLPA...LSIFIYD	988
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	1	73	EWVKFCK...CFVAYFI	102
	2	113	NHMYLGL...TGVFSY	134
	3	276	CGDHTVM...FIIAFAM	298
	4	305	AVVFLIG...LATVTVC	328
	5	759	KSIAYTL...FLANVVL	781
	6	789	AVTILCI...MVP AISL	807
	7	834	LISLSYG...FFVYFVI	857
	8	902	TCHTAFF...ADLIISK	923
	9	937	WALNFGL...AAFLSYC	956
	10	970	FVWWLPG...FIYDEVR	990
<i>Aphis nerii</i>	1	113	EWIKFAK...CFLAHTA	142
	2	153	DYFYLGV...TGIFSY	174
	3	316	FVNFVNI...FIIALMM	338
	4	343	LDAIIFM...PEGLLAT	364
	5	803	SITYTLS...FIAFIML	824
	6	832	AIAILCI...MVP AISL	850
	7	877	LISLAFG...FFTYFVI	900
	8	945	TCHTGFF...ANLIICK	966
	9	980	MALNFSL...ALFLCYL	999
	10	1013	WTWWIPP...FIYDEVR	1033

Fonte: Elaborada pelo autor. Os segmentos listados de 1-10 correspondem às hélices transmembranares α M1-10, respectivamente. A tabela foi reproduzida com auxílio do servidor Positioning of Proteins in Membrane (PPM 2.0), disponível no banco de dados Orientations of Proteins in Membranes (OPM).

Os modelos 3D das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* geradas neste trabalho apresentaram as características típicas de todas as ATPases de Na⁺/K⁺, com o número de dez segmentos transmembranares (α M1-10) (MORTH *et al.*, 2011).

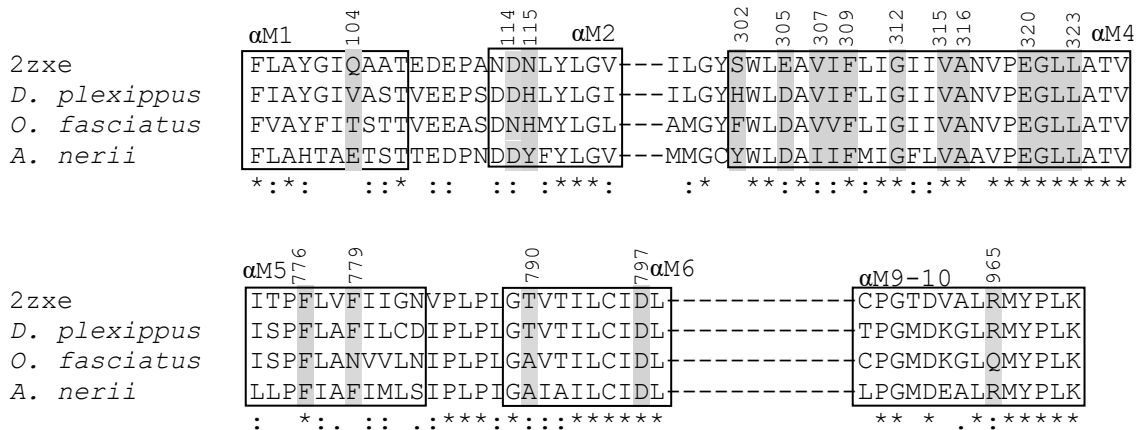
4.3 Alinhamento de sequências de aminoácidos de ATP α 1 de Na⁺/K⁺

O alinhamento entre as sequências de aminoácidos das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus*, *A. nerii* e do template 2zxe demonstrou haver alta similaridade, uma vez que as ATPases de Na⁺/K⁺ consistem de enzimas altamente conservadas (MORTH *et al.*, 2011). O template utilizado neste trabalho consiste em uma enzima sensível aos cardenolídeos, portanto, a ouabaína é capaz de se ligar em seu sítio de ligação nesta enzima (OGAWA *et al.*, 2009). Assim, a sequência de aminoácidos da ATP α de Na⁺/K⁺ do template 2zxe foi utilizada para fazer uma análise comparativa entre sua sequência e as de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*.

A similaridade entre as sequências de aminoácidos das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* com a do template foram de 75,62 %, 73,92 % e 67,90 %, respectivamente. Já a similaridade das sequências dos herbívoros entre si foi maior, com valores de 85,11 % entre *D. plexippus* e *O. fasciatus*, 77,42 % entre *D. plexippus* e *A. nerii*, e 76,65 % entre *O. fasciatus* e *A. nerii*.

Essa maior similaridade entre as sequências de aminoácidos das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, com relação a do template, já seria esperado, visto que esses três insetos são semelhantes quanto a serem resistentes aos efeitos tóxicos dos cardenolídeos (PETSCHENKA *et al.*, 2013; LOHR *et al.*, 2017; ZÜST *et al.*, 2018). No entanto, são poucas substituições de aminoácidos nas sequências de ATP α 1 de Na⁺/K⁺ desses herbívoros que levam a redução na sensibilidade aos cardenolídeos. As posições de resíduos de aminoácidos que causam alguma influência na sensibilidade de ATP α de Na⁺/K⁺ estão destacadas na figura 7, destacando as substituições de aminoácidos na sequência dos três herbívoros.

Figura 7 - Alinhamento de secções das seqüências de aminoácidos da ATP α de Na⁺/K⁺ da glândula retal de tubarão da espécie *Squalus acanthias* (PDB ID: 2zxe) e das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *Danaus plexippus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii*.



Fonte: Elaborada pelo autor. São apresentadas apenas as regiões onde estão localizadas as posições dos resíduos de aminoácidos que causam alguma influência na sensibilidade de ATP α de Na⁺/K⁺, os quais estão sombreados com a cor cinza. As vinte posições que estão destacados foram identificados a partir de dados estruturais já descritos na literatura. A numeração dos aminoácidos e a identificação das hélices (dentro dos quadrados) correspondem à ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*. O alinhamento foi realizado através do programa Clustal Omega. Asteriscos representam resíduos de aminoácidos idênticos; dois pontos representam substituições conservadas; um ponto representa substituições semi-conservadas. Q: glutamina; V: valina; T: treonina; E: glutamato; D: aspartato; N: Asparagina; H: histidina; S: Serina; F: fenilalanina; Y: tirosina; I: Isoleucina; G: glicina; A: alanina; L: leucina; R: arginina. 104 e 115: Price; Lingrel, 1988; 309, 776, 790, 797: Qui *et al.*, 2003; 302, 305, 307, 308, 312, 790: Qui *et al.*, 2005; 312, 315, 316, 320, 321, 322, 323, 776, 779, 790, 797: Ogawa *et al.*, 2009; 312, 315, 316, 776, 779, 790: Yatime *et al.*, 2011 e 305, 307, 308, 312, 315, 316, 776, 790: Dobler *et al.*, 2012.

Entre as vinte posições destacadas como relevantes por influenciar na sensibilidade de ATP α de Na⁺/K⁺, onze estão localizadas na hélice transmembranar α M4, entre a posição 302 e 323 (Figura 7). O segmento entre os resíduos G³⁰⁰ e G³²¹ da enzima corresponde à região da ATP α de Na⁺/K⁺ que sofre o maior rearranjo estrutural desencadeado pela interação da ouabaína, causando o aumento no tamanho de sua cavidade de ligação na enzima (OGAWA *et al.*, 2009; YATIME *et al.*, 2011).

As substituições Q104V e N115H encontradas na ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, já foram descritas anteriormente como substituições que alteram potencialmente a sensibilidade da enzima aos cardenolídeos (DOBLER *et al.*, 2012).

Na ATP α 1 de Na⁺/K⁺ do pulgão *A. nerii* foi identificado as substituições Q104E e N115Y (Figura 7). A substituição Q104E também foi observada por Dobler *et al.* (2012) em uma espécie não identificada do gênero *Largus*, também da ordem hemíptera e que utiliza plantas contendo cardenolídeos como hospedeiras, no entanto, o trabalho não identificou os efeitos dessa substituição na enzima.

As substituições Q104V e N115Y, bem como Q104E e N115H, torna essa região de α M1-2 apolar e com carga, respectivamente. Esse tipo de substituição, de um resíduo sem carga na cadeia lateral por um resíduo com carga, foi também responsável por conferir à ATP α de Na⁺/K⁺ de rato resistência à ouabaína (PRICE; LINGREL, 1988). Por meio de ensaios de mutagênese, com ATP α de Na⁺/K⁺ de rato, as substituições por aminoácidos com carga positiva (Q104R e N115H) foram responsáveis pela resistência desta enzima à inibição por ouabaína (PRICE; LINGREL, 1988).

A substituição Q104T na ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *O. fasciatus* não reduz a sensibilidade dessa enzima aos cardenolídeos, havendo a necessidade de pelo menos outras duas substituições de resíduos de aminoácidos em outras posições na sua sequência proteica, para lhe conferir a insensibilidade aos cardenolídeos (ZHEN *et al.*, 2012). A substituição Q104T não altera a polaridade e a carga nessa posição, como é observado nas ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus* e *A. neri*, logo, pode-se pressupor que a polaridade e a mudança de carga nas posições 104 e 115 estão diretamente relacionadas a redução na sensibilidade das ATP α 1 de Na⁺/K⁺.

A posição 302 (Loop α M3-4) das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. neri* mostrou-se também variável (Figura 7). Foi observado nas sequências de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. neri* a substituição de serina por histidina, fenilalanina e tirosina, respectivamente. Semelhante ao que ocorre nas posições 104 e 115, as substituições em 302 observadas nos três herbívoros também alteram a carga e a polaridade dessa posição, uma vez que histidina tem sua cadeia lateral carregada positivamente, e fenilalanina e tirosina possuem cadeias laterais apolares.

A posição 302 parece exercer um papel crítico na ligação de cardenolídeos em ATP α de Na⁺/K⁺. Como citado anteriormente, a ligação da ouabaína na ATP α de Na⁺/K⁺ sensível desencadeia um maior rearranjo estrutural no segmento de aminoácidos entre os resíduos G³⁰⁰ e G³²¹ (OGAWA *et al.*, 2009; YATIME *et al.*, 2011), de modo que substituições de resíduos neste segmento de aminoácidos podem desencadear mudanças drásticas na afinidade de ligação de ATP α de Na⁺/K⁺ aos cardenolídeos, ao interferir em seu rearranjo estrutural.

Além disso, através de ensaios de docking molecular Qiu *et al.* (2005), observaram em uma ATP α de Na⁺/K⁺ sensível o resíduo T³⁰² envolvido em uma ligação de hidrogênio com um grupo hidroxila do açúcar da ouabaína. Assim como a treonina, a serina é um resíduo com sua cadeia lateral polar e sem carga, e sua substituição por resíduos com carga na cadeia lateral, ou por resíduos apolares e com grupos aromáticos, como encontrado

nas espécies de herbívoros estudadas nesse trabalho, pode ser um fator tão relevante quanto às substituições Q104V e N115H no contexto da insensibilidade de ATP α de Na⁺/K⁺ aos cardenolídeos.

Os resíduos F³⁰⁹, G³¹², V³¹⁵, A³¹⁶, E³²⁰, G³²¹, L³²², L³²³, F⁷⁷⁶, D⁷⁹⁷ foram conservados nas ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* (Figura 7). Esses mesmos resíduos são conservados em outras espécies insensíveis aos cardenolídeos, além das três espécies trabalhadas nesse projeto. Isso foi observado em *Empyreuma pugione* e *Pygoctenucha terminalis* (Lepidopteras), espécies que sequestram cardenolídeos de suas plantas hospedeiras, e diferem apenas na substituição Q104L em relação a ATP α de Na⁺/K⁺ de *Sus scrofa*, no qual é uma espécie sensível aos cardenolídeos (DOBLER *et al.*, 2015).

Anteriormente, Qui *et al.* (2005) por meio de trabalhos com quimeras de ATP α de Na⁺/H⁺ de rato, uma enzima que não se liga a ouabaína, demonstraram que a adição de sete resíduos de aminoácidos, E³⁰⁵, V³⁰⁷, I³⁰⁸ e G³¹² de α M4, e F⁷⁷⁶, T⁷⁹⁰ e D⁷⁹⁷ de α M6-7, foram capazes de conferir a essa ATP α de Na⁺/H⁺ a capacidade de ligação à ouabaína (QIU *et al.*, 2005).

No entanto, a adição de apenas os três resíduos F⁷⁷⁶, T⁷⁹⁰ e D⁷⁹⁷ na ATP α de Na⁺/H⁺ não foi capaz de conferir-lhe a capacidade de ligação à ouabaína (QIU *et al.*, 2005). A influência dos resíduos F⁷⁷⁶ e D⁷⁹⁷ na afinidade de ligação à ouabaína está diretamente relacionada às mudanças na conformação da ATP α de Na⁺/K⁺, que são desencadeadas pela interação da ouabaína (QIU *et al.*, 2003; OGAWA *et al.*, 2009).

Quimeras de ATP α de Na⁺/H⁺ que continha em sua sequência de aminoácidos a adição de apenas um resíduo (E³⁰⁵, V³⁰⁷, I³⁰⁸ ou G³¹²) foram capazes de conferir a essa enzima a capacidade de ligação à ouabaína (QIU *et al.*, 2005). Entretanto, as quimeras que apresentaram afinidade de ligação à ouabaína mais próxima de ATP α de Na⁺/K⁺ sensíveis eram as ATP α de Na⁺/H⁺ que possuíam em sua sequência de aminoácidos os sete resíduos, E³⁰⁵, V³⁰⁷, I³⁰⁸, G³¹², F⁷⁷⁶, T⁷⁹⁰ e D⁷⁹⁷ (QIU *et al.*, 2005).

A substituição de apenas um dos resíduos E³⁰⁵, V³⁰⁷, I³⁰⁸ e G³¹² na quimera que continha F⁷⁷⁶, T⁷⁹⁰ e D⁷⁹⁷, já era observado uma redução significativa na capacidade de ligação da ouabaína na ATP α de Na⁺/H⁺ (QIU *et al.*, 2005).

Na ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus* dentre os sete resíduos identificados por Qiu *et al.* (2005) apenas o glutamato da posição 305 foi substituído por um aspartato (Figura 7), mas ambos tem natureza hidrofílica e com carga negativa na cadeia lateral. Essa substituição pode ser resultado de uma mutação de transversão, e não estar relacionada à necessidade do organismo em superar a toxicidade causada pelos cardenolídeos. A

substituição E305D é encontrada em espécies de inseto que não são expostos aos cardenolídeos (DOBLER *et al.*, 2015), de modo que seja provável que essa mudança de aminoácidos tenha surgido no início da divergência evolutiva na classe Insecta.

Além disso, como citado anteriormente, a substituição de pelo menos um resíduo dentre E³⁰⁵, V³⁰⁷, I³⁰⁸ e G³¹² é responsável pela diminuição na capacidade da ATP α de Na⁺/H⁺ de se ligar à ouabaína (QIU *et al.*, 2005). Nas ATP α de Na⁺/K⁺ dos três herbívoros avaliados neste trabalho é observado a substituição de pelo menos um desses resíduos em *D. plexippus* (E305D), e de dois resíduos em *O. fasciatus* (E305D e I308V) e *A. nerii* (E305D e V307I) (Figura 7).

Assim, substituições dos resíduos E³⁰⁵, V³⁰⁷, I³⁰⁸, G³¹², F⁷⁷⁶, T⁷⁹⁰ e D⁷⁹⁷, especialmente nos E³⁰⁵, V³⁰⁷, I³⁰⁸, G³¹² são o suficiente para conferir à ATP α de Na⁺/K⁺ insensibilidade aos cardenolídeos. Isso é observada nas ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, que são enzimas insensíveis aos cardenolídeos e que possuem pelo menos uma substituição desses aminoácidos (Figura 7).

A substituição T790A está presente nas ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *O. fasciatus* e *A. nerii* (Figura 7), e consiste em uma substituição relevante, na qual foi capaz de conferir resistência à ouabaína em ATP α de Na⁺/K⁺ de células de mamíferos (FENG; LINGREL, 1995).

O oxigênio da cadeia lateral de T⁷⁹⁰ forma ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila de C14 da ouabaína, no qual consiste em um grupo conservado nos cardenolídeos. Assim, o resíduo T⁷⁹⁰ é essencial para ligação de alta afinidade da ATP α de Na⁺/K⁺ aos cardenolídeos (KHALID *et al.*, 2014).

A substituição T790A leva a perda da capacidade de formar ligações de hidrogênio nessa posição da sequência (FENG; LINGREL, 1995), gerando uma redução na afinidade de ligação das ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *O. fasciatus* e *A. nerii* aos cardenolídeos. Essa mesma substituição T790A foi identificada por Dobler *et al.* (2015), em *Lygaeus kalmii*, uma espécie também da ordem hemíptera e sequestradora de cardenolídeos.

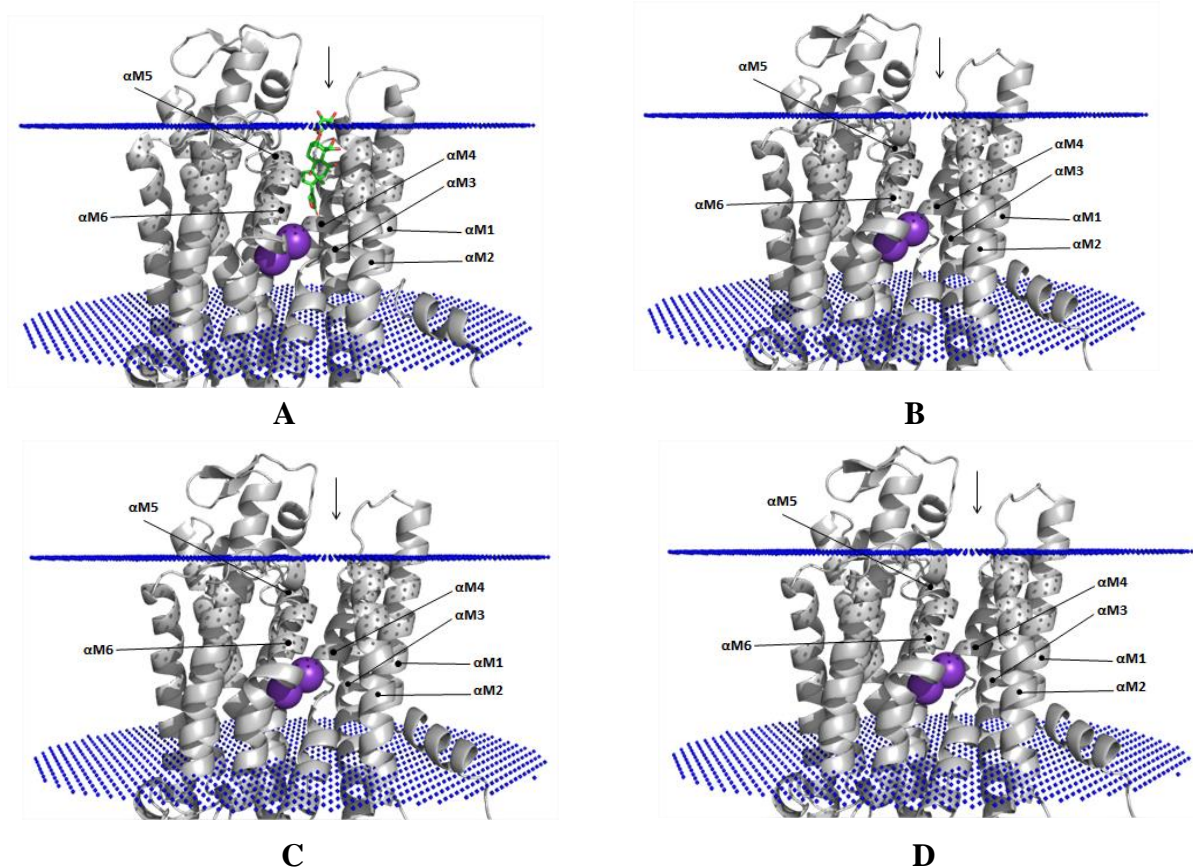
O resíduo T⁷⁹⁰ age também em conjunto com F⁷⁷⁹ para ligar o glicosídeo cardíaco e inibir ATP α de Na⁺/K⁺ sensíveis (PALASIS *et al.*, 1996). Assim, a substituição T790A na ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *O. fasciatus* e *A. nerii* impede ou dificulta o cardenolídeo de ficar acomodado na α M5. Esse efeito de impedir a acomodação do cardenolídeo em sua cavidade de ligação na enzima de *O. fasciatus* é ainda acrescido pela substituição F779N. De modo que não haveria interações o suficiente para estabilizar o acoplamento de cardenolídeos na ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *O. fasciatus*.

Outro fator que reduz a sensibilidade da ATP α 1 de Na $^+$ /K $^+$ de *O. fasciatus* são as substituições D114N (α M2) e R965Q (Loop α M9-10). Os resíduos D 114 e R 965 formam interações iônicas entre si e, apesar de não atuarem diretamente na ligação da ouabaína, a substituição de pelo menos um desses resíduos por um resíduo sem carga na cadeia lateral, tal como ocorre na ATP α 1 de Na $^+$ /K $^+$ de *O. fasciatus*, é capaz de causar uma redução drástica na afinidade de ligação (OGAWA *et al.*, 2009).

4.4 Descrição do sítio de ligação de cardenólídeos

A localização e descrição do sítio de ligação de cardenólídeos nos modelos 3D das ATP α 1 de Na $^+$ /K $^+$ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* (Figura 8) foi realizada com auxílio dos dados publicados por Ogawa *et al.* (2009), no qual descreve o sítio de ligação da ouabaína e seu acoplamento na ATP α de Na $^+$ /K $^+$ da glândula retal de tubarão da espécie *S. acanthias* (PDB: 3a3y), que se refere a mesma enzima utilizada como template na construção dos três modelos “2” estudados neste trabalho.

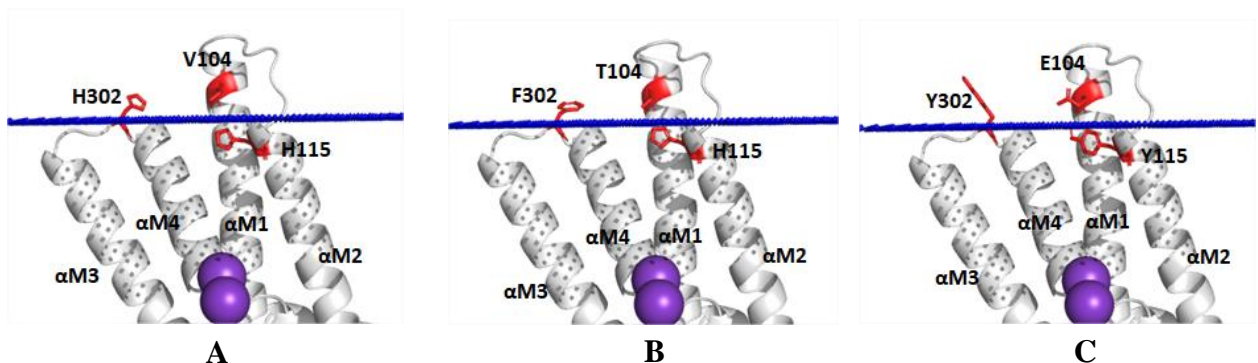
Figura 8 - Localização do sítio de ligação de cardenólídeos na ATP α de Na $^+$ /K $^+$ da glândula retal de tubarão da espécie *Squalus acanthias* (PDB: 3a3y) (A), e nos modelos 3D das ATP α 1 de Na $^+$ /K $^+$ de *Danaus plexippus* (B), *Oncopeltus fasciatus* (C) e *Aphis nerii* (D).



Fonte: Elaborada pelo autor. A seta vertical indica a localização do sítio de ligação de cardenólídeos. A ouabaína acoplada à estrutura cristalizada da ATPase de Na^+/K^+ de *S. acanthias* é representada na forma de bastões verde e com o oxigênio destacado em vermelho, e os íons K^+ são representados por esferas de cor roxa. As hélices transmembranares que formam o sítio de ligação estão identificadas ($\alpha\text{M1-6}$). As linhas pontilhadas horizontais azuis correspondem aos limites aproximados da bicamada lipídica, calculado pelo servidor PPM 2.0. Figura produzida com o servidor PyMOL 2.0.7.

As posições 104, 115 e 302 nos modelos 3D das $\text{ATP}\alpha$ de Na^+/K^+ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* localizam-se exatamente na região extracelular, transmembranar, e na interface da superfície extracelular da membrana plasmática, respectivamente (Figura 9). As posições 104, 115 e 302 ficam na região mais externa do sítio de ligação dos cardenólídeos, de modo que resíduos nessas posições são os primeiros a formarem contatos com esses metabólitos. Além disso, as posições 104, 115 e 302 ficam localizadas nas hélices transmembranares αM1 , αM2 e no Loop $\alpha\text{M3-4}$, respectivamente. Nessas hélices são observadas as maiores mudanças estruturais desencadeadas pela interação com cardenólídeos.

Figura 9 - Destaque das posições 104, 115 e 302 nas $\text{ATP}\alpha$ de Na^+/K^+ de *Danaus plexippus* (A), *Oncopeltus fasciatus* (B), e *Aphis nerii* (C).



Fonte: Elaborada pelo autor. Os resíduos de aminoácidos nas posições 104 (região extracelular), 115 (região transmembranar) e 302 (interface da superfície extracelular da membrana plasmática) são destacados em forma de varetas vermelhas. Os íons K^+ são representados por esferas de cor roxa e as linhas pontilhadas horizontais azuis correspondem aos limites aproximados da bicamada lipídica, calculado pelo servidor PPM 2.0. Figura produzida com o servidor PyMOL 2.0.7.

Vale ressaltar que após a ligação de cardenólídeos em sua cavidade de ligação a região em torno desse metabólito é fechada por meio de ligações de hidrogênio entre o seu núcleo esteroide e as cadeias laterais polares dos resíduos de aminoácidos de αM1 , αM2 e αM6 (LAURSEN *et al.*, 2015). Esse processo não foi descrito de forma detalhada por Laursen *et al.* (2015), e não exclui a possibilidade de que os resíduos de M4 também possam influenciar sobre o fechamento dessa região na enzima através da formação de ligações de hidrogênio.

Assim, é pressuposto que as mudanças nas propriedades químicas dos resíduos nas posições 104 de α M1 e 115 de α M2, bem como na posição 302 do Loop α M3-4, possam exercer influência direta tanto no rearranjo estrutural desencadeado pela ligação dos cardenolídeos na enzima para aumentar a dimensão de sua cavidade de ligação, como também sobre o fechamento dessa região envolta do cardenolídeo. Logo, as substituições nas posições 104, 115 e 302 de resíduos polares e sem carga por resíduos apolares ou de menor polaridade e com carga dificultam ou impedem esse comportamento estrutural nas ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*.

Além disso, a carga positiva de histidina nas posições 115 e 302 da ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus* e na posição 115 na enzima de *O. fasciatus* pode resultar em uma interação eletrostática com cargas negativas de lipídeos da porção extracelular da membrana plasmática. Assim, propõem-se que tais interações eletrostáticas também possam prejudicar o rearranjo estrutural nas ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus* e *O. fasciatus* e, portanto, conferir a essas enzimas uma redução na sensibilidade aos cardenolídeos.

Deve-se também ressaltar, que as propriedades químicas e estruturais dos cardenolídeos também exercem influência sobre o rearranjo estrutural de ATP α de Na⁺/K⁺. Assim, a redução na sensibilidade aos cardenolídeos nas ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* parece depender não apenas de V¹⁰⁴, E¹⁰⁴, H¹¹⁵, Y¹¹⁵, H³⁰², F³⁰² e Y³⁰², mas também das características químicas e estruturais dos cardenolídeos que irão interagir com esses resíduos de aminoácidos.

4.5 Análise do acoplamento molecular

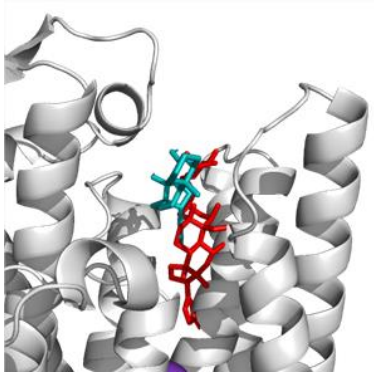
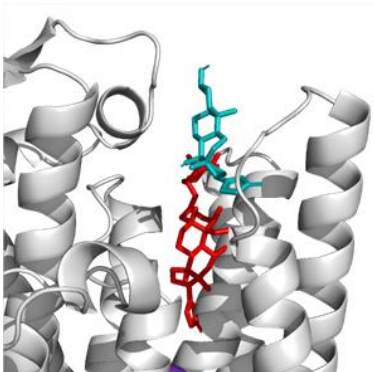
O acoplamento molecular computacional, ou docking, entre os modelos 3D das ATP α 1 Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* e os cardenolídeos de *C. procera* foi realizado com a finalidade de identificar quais desses cardenolídeos são capazes de interagir no seu sítio de ligação dessas enzimas.

Assim, estabelecendo uma relação direta entre a capacidade dos cardenolídeos de adentrarem, parcial ou total, em sua cavidade de ligação nesses modelos 3D com a sua seletividade será possível identificar quais cardenolídeos de *C. procera* são seletivos para *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, ou seja, quais desses cardenolídeos foram resultados de uma resposta do mecanismo de defesa de *C. procera* contra esses herbívoros. Além disso, por meio do docking foi possível esclarecer a relação entre a polaridade desses cardenolídeos e sua seletividade sobre as ATP α 1 Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*.

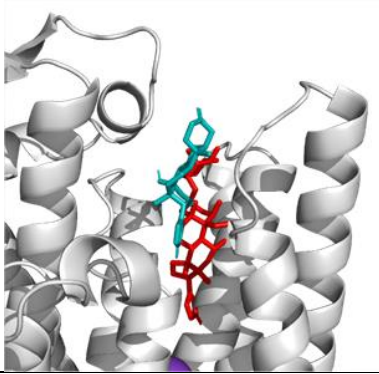
Os dados do acoplamento da ouabaína na estrutura cristalográfica da ATPase de Na^+/K^+ de *S. acanthias* (PDB ID: 3a3y) foram utilizados como referência (OGAWA *et al.*, 2009). Do total de trinta e cinco cardenolídeos de *C. procera* apenas sete não ficaram acoplados na cavidade de ligação de nenhum dos modelos 3D. Esse cardenolídeos são 12 β -hidroxicoroglaucigenina, β -Anhydroepidigitoxigenin-3 β -O- β -glucopiranoside, gomfoside, afroside, calotoxina, β -tetrahydro-uscharidina e calactoprocina.

Os demais cardenolídeos formaram ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos com resíduos de aminoácidos chaves localizados na cavidade de ligação (descritos anteriormente na Figura 7). O docking dos cardenolídeos que adentraram na cavidade de ligação dos modelos 3D de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* são mostrados na Tabela 11. Vale ressaltar que não houve diferença relevante entre os valores de afinidade de ligação do docking dos cardenolídeos com os modelos 3D, os quais variaram entre -6,2 kcal/mol a -10,0 kcal/mol.

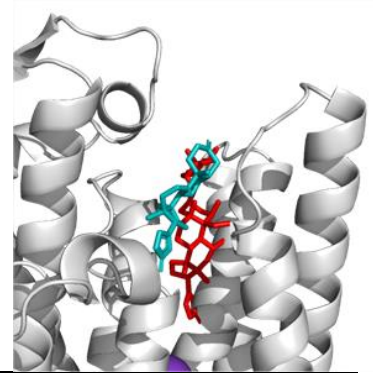
Tabela 11 - Acoplamento molecular de cardenolídeos de *Calotropis procera* com os modelos tridimensionais das ATP α 1 de Na^+/K^+ de *Danaus plexippus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii*.

	<i>Danaus plexippus</i>	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	<i>Aphis nerii</i>
Proceragenina Menos Polar		Não interagiu	Não interagiu
Uzarigenina Menos Polar		Não interagiu	Não interagiu

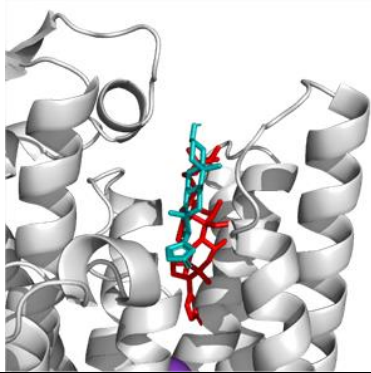
Uzarigenone
Menos Polar



Não interagiu



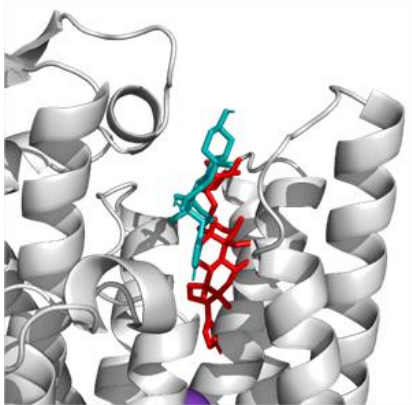
β -anidroepidigitoxigenina
Menos Polar



Não interagiu

Não interagiu

Siriogenina
Mais Polar

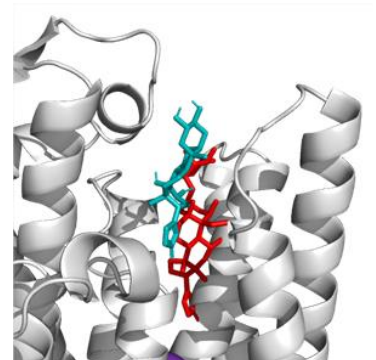
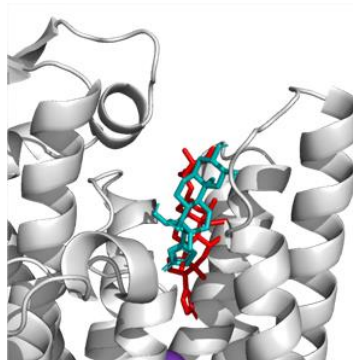


Não interagiu

Não interagiu

Afrogenina
Mais Polar

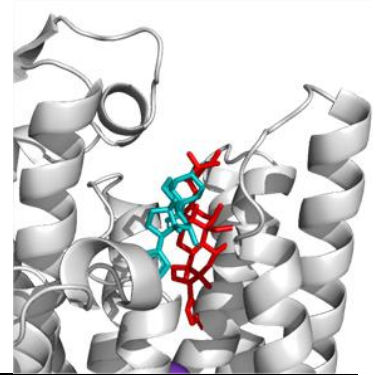
Não interagiu

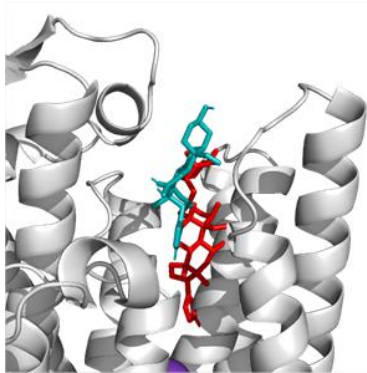


Procegenina A**Mais Polar**

Não interagiu

Não interagiu



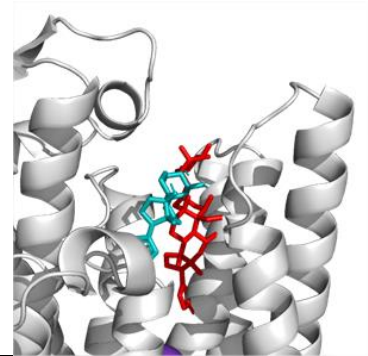
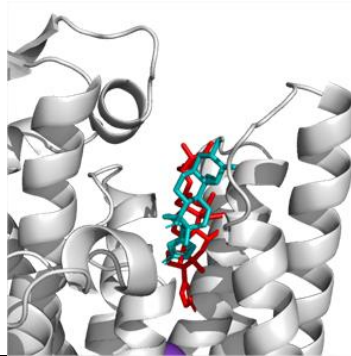
Procegenina B**Mais Polar**

Não interagiu

Não interagiu

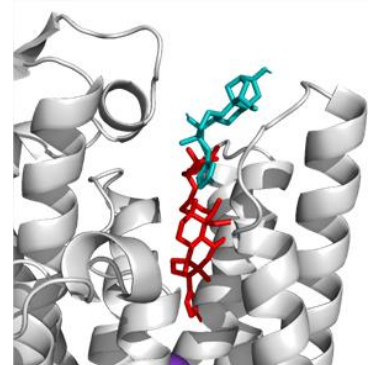
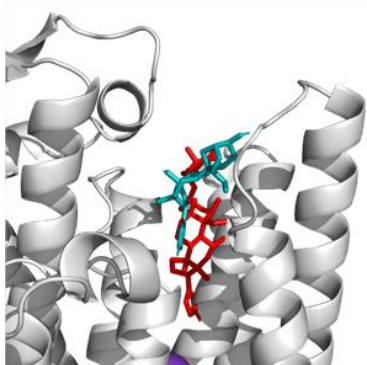
Calotropagenina**Mais Polar**

Não interagiu

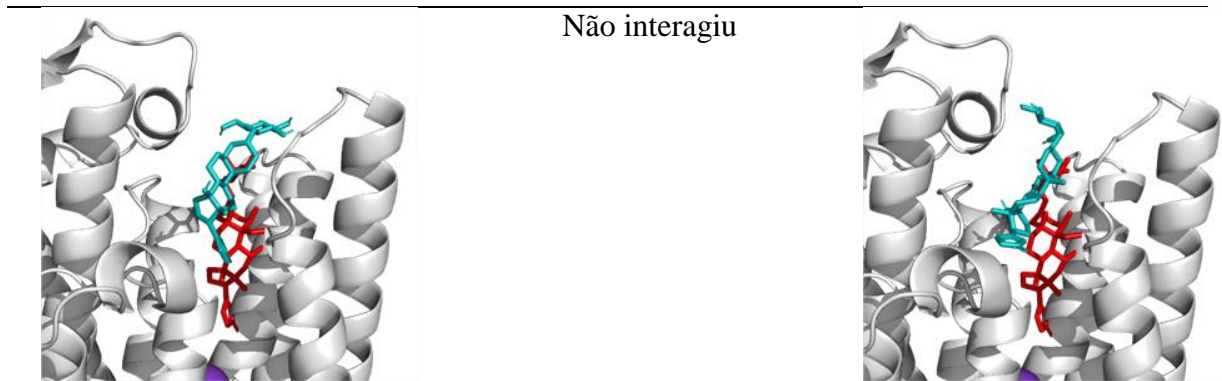


2 β ,19-Epoxi-3 β ,14 β -dihidroxi-19-metoxi-5 α -card-20(22)-enolide**Menos Polar**

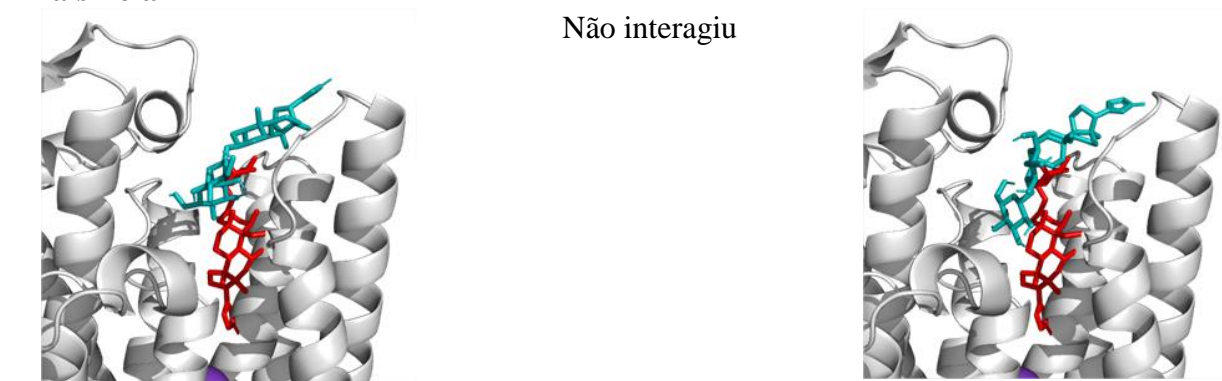
Não interagiu



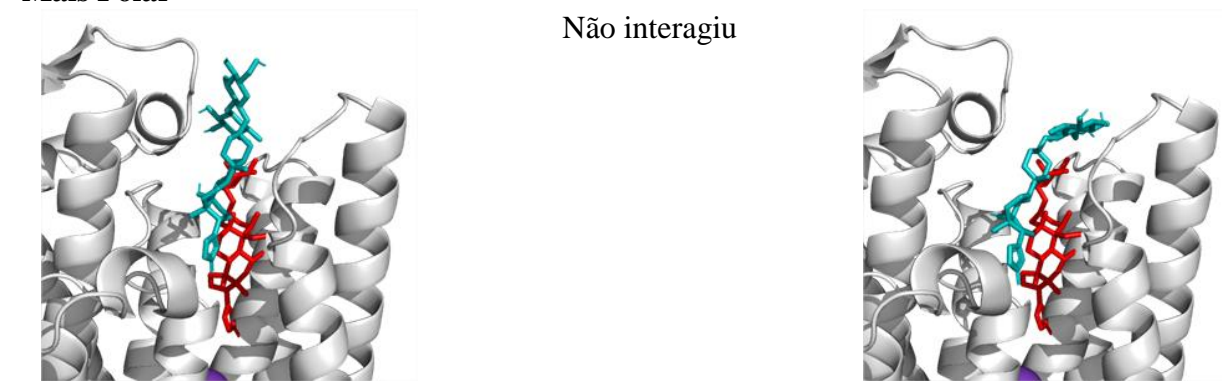
Deglucouzarina**Mais Polar**



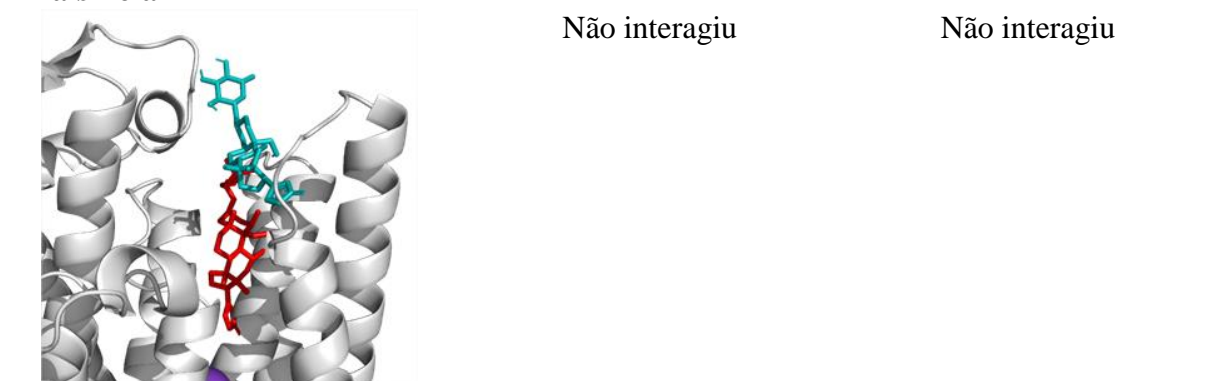
Uzarina
Mais Polar



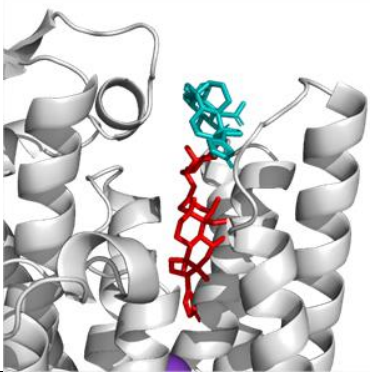
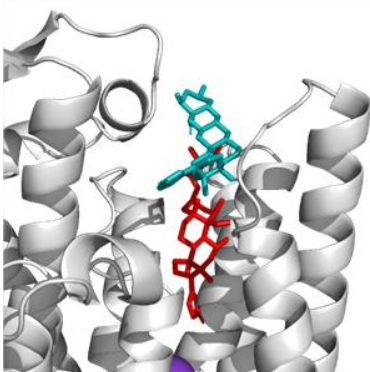
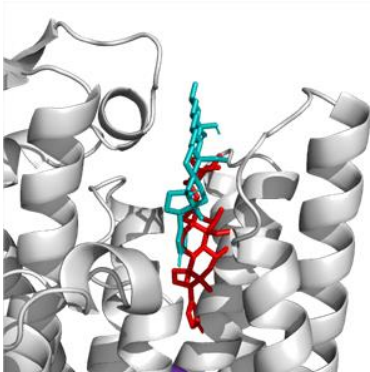
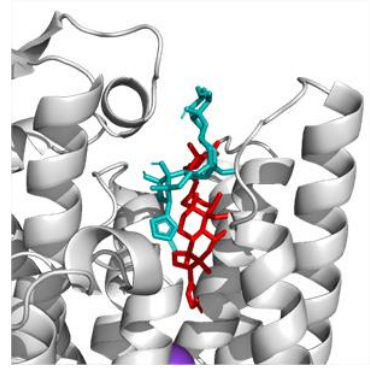
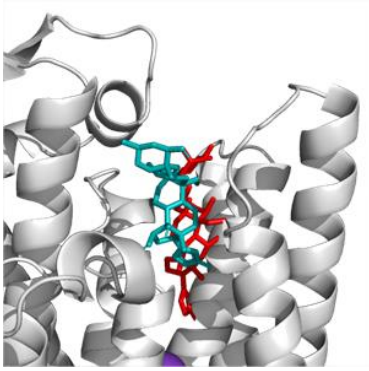
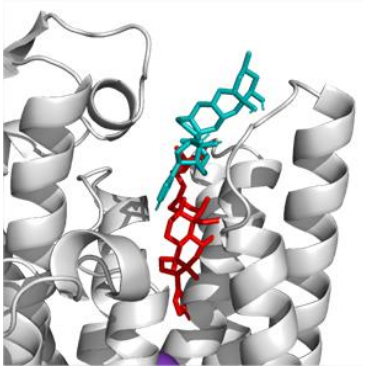
3-β-(4-O-β-D-glucopiranosil-β-D-6 desoxiallopiranosil)oxi]uzarigenina
Mais Polar

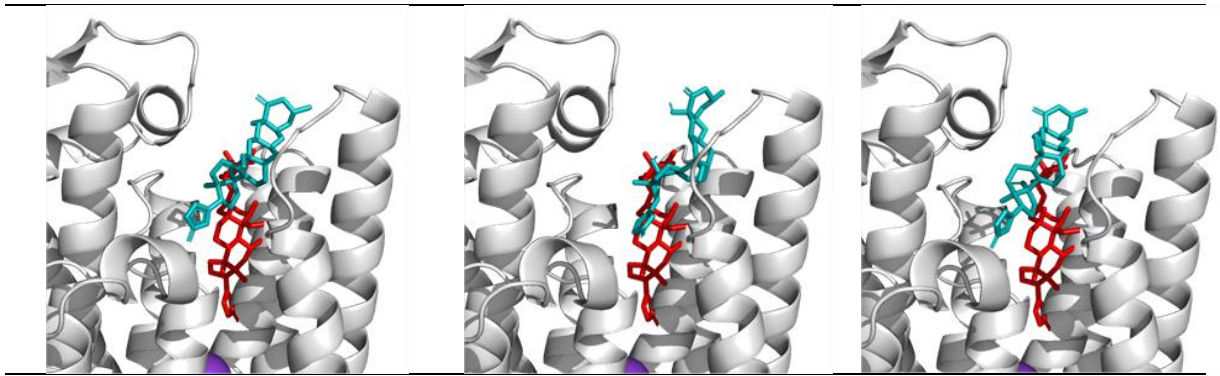


Frugoside
Mais Polar



Proceraside A
Mais Polar

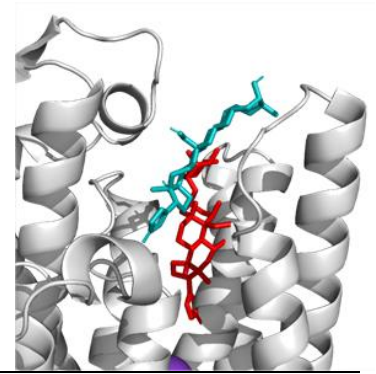
	Não interagiu	Não interagiu
Calotropina Mais Polar		
	Não interagiu	Não interagiu
Calactina Mais Polar		
	Não interagiu	Não interagiu
15 β-hidroxicalactina Mais Polar		
		
Ucharidina Menos polar		



Ischaridina
Mais Polar

Não interagiu

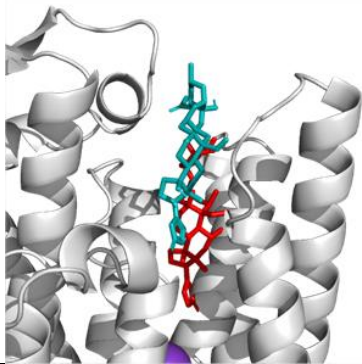
Não interagiu



Asclepina
Menos Polar

Não interagiu

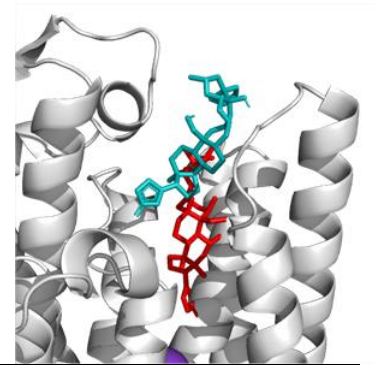
Não interagiu



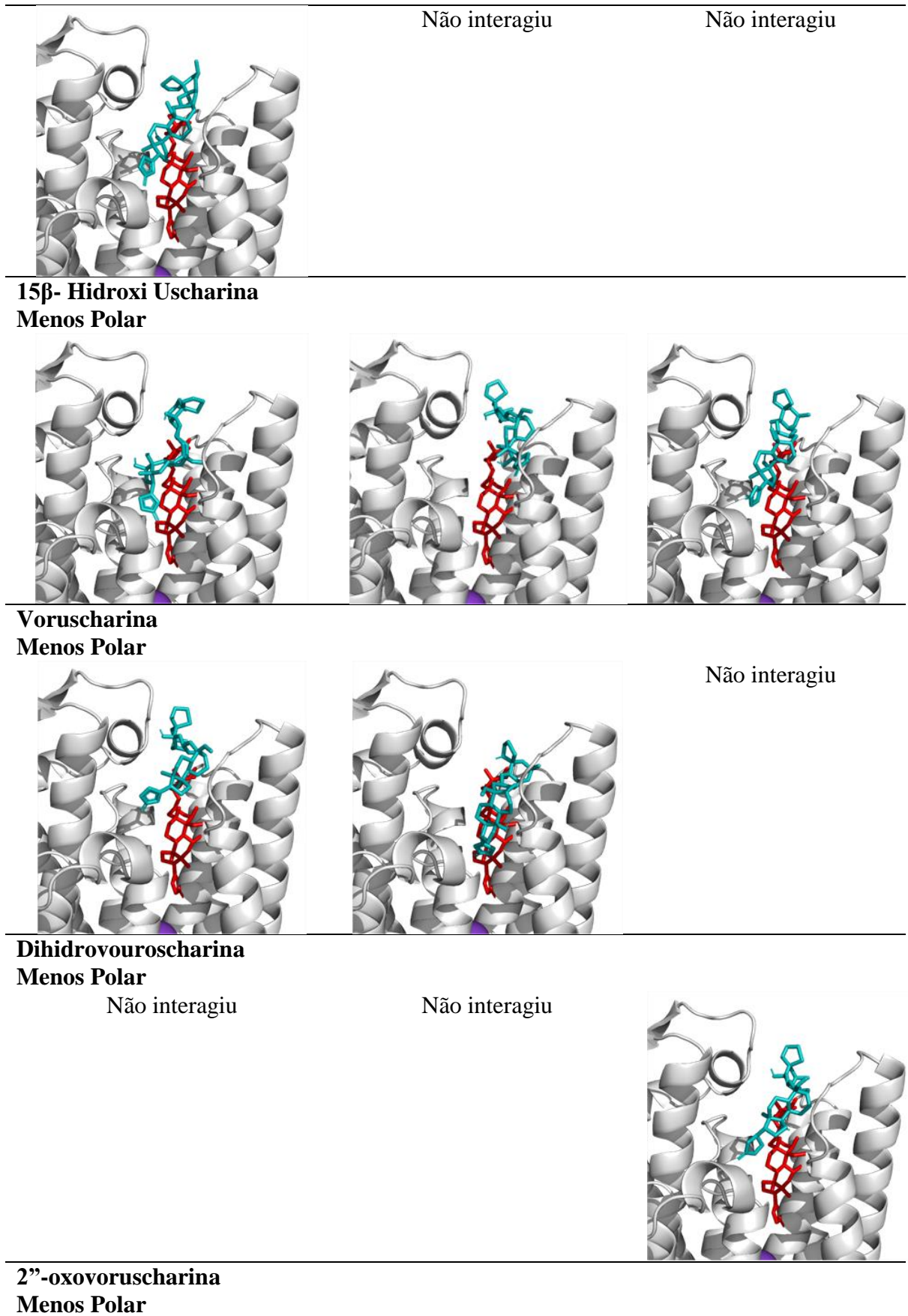
Dihidrouscharina
Menos Polar

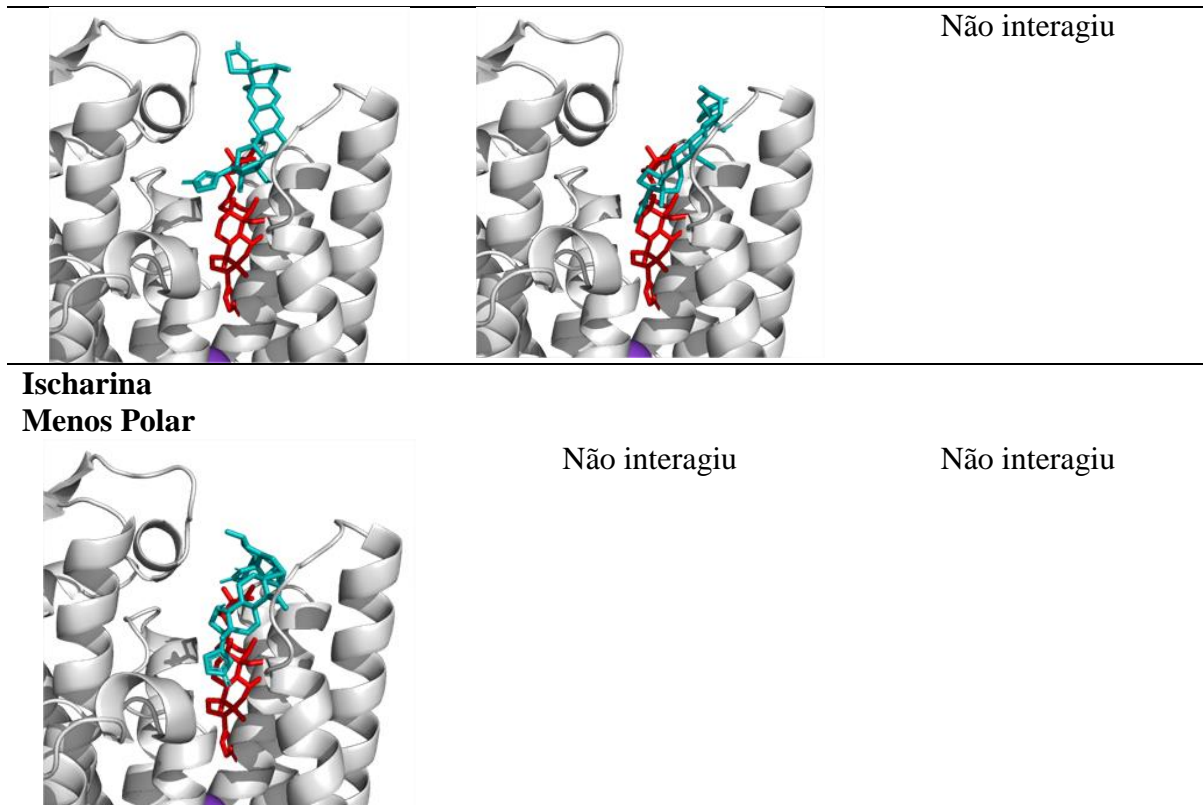
Não interagiu

Não interagiu



Ucharina
Menos Polar





Fonte: Elaborada pelo autor. Os cardenolídeos de *C. procera* estão representados por bastões de cor azul. As coordenadas da ouabaina acoplada na estrutura da ATPase de Na^+/K^+ de *S. acanthias* (PDB ID: 3a3y) são mostradas em vermelho, na forma de bastões (OGAWA *et al.*, 2009). Na parte inferior das imagens é possível visualizar a porção de uma esfera roxa, que representa um íon K^+ no sítio II de ligação de K^+ . Figuras produzidas com o servidor PyMOL 2.0.7.

Possivelmente, em condições *in vivo* os cardenolídeos citados na Tabela 11 poderiam induzir algum rearranjo estrutural nas $\alpha\text{M1-4}$ das $\text{ATP}\alpha 1 \text{ Na}^+/\text{K}^+$ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, e interferir em sua atividade enzimática.

Os resultados do docking apresentados aqui estão em conformidade com a relação que há entre a polaridade dos cardenolídeos de *C. procera* e sua seletividade sobre as $\text{ATP}\alpha 1 \text{ Na}^+/\text{K}^+$ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*, como sugerido anteriormente. Apesar de ser pequena a diferença entre número de cardenolídeos polares e apolares que interagiram com os modelos 3D, houve semelhança nos resultados ao associar a polaridade dos cardenolídeos que interagiram com esses modelos 3D e a especificidade na polaridade requerida para o sequestro por *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii*.

Visto que, dentre os cardenolídeos que interagiram com a $\text{ATP}\alpha 1 \text{ Na}^+/\text{K}^+$ de *D. plexippus*, que totaliza vinte e dois cardenolídeos, doze possuíam natureza mais hidrofóbica. Esses doze cardenolídeos menos polares são: proceragenina, uzarigenina, uzarigenone, β -anidroepidigitoxigenina, 2 β ,19-Epoxi-3 β ,14 β -dihidroxi-19-metoxi-5 α -card-20(22)-enolide, uscharidina, asclepina, uscharina, 15 β -hidroxi uscharina, voruscharina, 2''-oxovoruscharina e

ischarina. Já os dez cardenolídeos que são mais polares foram siriogenina, procegenina B, deglucouzarina, uzarina, 3-[β -(4-*O*- β -*D*-glucopiranosil- β -*D*-6-desoxiallopiranosil) oxy] uzarigenina, frugoside, proceraside A, calotropina, calactina, 15 β -hidroxicalactina (Tabela 11).

A preferência das lagartas de *D. plexippus* por sequestrar cardenolídeos mais polares, pode justificar a menor sensibilidade de sua ATP α 1 Na⁺/K⁺ a esses cardenolídeos. Os cardenolídeos com natureza mais hidrofóbica, e possivelmente mais tóxica, devem ser excretados ou metabolizados pela *D. plexippus*.

O modelo 3D de *O. fasciatus* exibiu menor sensibilidade aos cardenolídeos de *C. procera*. Apenas sete cardenolídeos associaram-se com esse modelo 3D, dos quais quatro têm natureza hidrofóbica (15 β -hidroxi uscharina, 2''-oxovoruscharina, uscharidina e voruscharina) e três têm natureza hidrofílica (15 β -hidroxicalactina, afrogenina e calotropagenina) (Tabela 11).

A polaridade de seis cardenolídeos que adentraram na cavidade de ligação do modelo 3D de *O. fasciatus* estão nos extremos dos valores de Log *P* dos trinta e cinco cardenolídeos de *C. procera* (Tabela 6). Apenas 15 β -hidroxi uscharina apresentou índice de hidropaticidade intermediária (Log *P* de 2.103), em relação aos demais cardenolídeos da Tabela 6.

O herbívoro *O. fasciatus* sequestra cardenolídeos com polaridade intermediária, logo, os seis cardenolídeos de *C. procera* que poderiam lhe causar algum efeito tóxico não são expostos às suas ATPases de Na⁺/K⁺, uma vez que estes estão fora da faixa de polaridade tolerada para o sequestro.

Com relação ao modelo 3D de *A. nerii*, dentre os quatorze cardenolídeos que interagiram com esse modelo seis tem natureza hidrofóbica, e os demais apresentam natureza mais hidrofílica. Os seis cardenolídeos com natureza hidrofóbica são uzarigenone, 2 β ,19-Epoxi-3 β ,14 β -dihidroxi-19-metoxi-5 α -card-20(22)-enolide, uscharidina, dihidrouscharina, 15 β -hidroxi uscharina e dihidrovourouscharina. Enquanto que os oito cardenolídeos com natureza hidrofílica são afrogenina, procegenina A, calotropagenina, deglucouzarina, uzarina, 3-[β -(4-*O*- β -*D*-glucopiranosil- β -*D*-6-desoxiallopiranosil) oxy] uzarigenina, 15 β -hidroxicalactina e ischaridina.

Aphis nerii, além de ser uma espécie sequestradora de cardenolídeos predominantemente apolares, possui um mecanismo que modifica a estrutura dos metabólitos que são sequestrados, tornando-os mais tóxicos aos seus predadores (ZUST *et al.*, 2018). Assim, é possível que o seu mecanismo de modificação possa atuar sobre os cardenolídeos

sequestrados que poderia lhe causar prejuízos no desenvolvimento, por ter afinidade à sua ATP α de Na⁺/K⁺. No entanto, vale ressaltar que a estrutura de uscharidina é mantida quando sequestrada e armazenada por *Aphis nerii*.

A sensibilidade que as ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus*, e *A. nerii* apresentaram aos cardenolídeos pode estar diretamente relacionada a fonte alimentar e ao tipo de metamorfose que esses herbívoros sofrem ao longo de seu desenvolvimento. A metamorfose dos insetos é de dois tipos, holometábolo, no qual o inseto passa por todas as fases de desenvolvimento (ovo, larva, pupa e adulto), e hemimetábolo, em que ocorre uma metamorfose incompleta e o estágio jovem (ninfa) é semelhante a sua fase adulta (YANG, 2001).

A lepidóptera *D. plexippus* é holometábolo e sequestram os cardenolídeos apenas na sua fase larval. A fase larval de *D. plexippus* é a única fase do ciclo de vida em que seu organismo é exposto à uma elevada concentração de cardenolídeos, uma vez que as larvas são mastigadoras de folhas de *C. procera*, que consiste em um tecido que tem elevada concentração de cardenolídeos. Os cardenolídeos sequestrados por lepidópteras são armazenados no exoesqueleto (HOLZINGER; WINK, 1996), de modo que na fase adulta de *D. plexippus* suas ATPases de Na⁺/K⁺ não são expostas aos cardenolídeos que foram sequestrados durante sua fase larval.

Vale ressaltar também, que as lagartas de *D. plexippus* iniciam a herbivoria realizando cortes nas folhas permitindo a liberação de látex antes de se alimentarem. Esse comportamento é empregado para contornar o látex, logo, a concentração de cardenolídeos ingerido pelas lagartas também é reduzido, uma vez que no látex é encontrado maior concentração de cardenolídeos. Assim, ainda que as ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus* apresentem uma maior sensibilidade aos cardenolídeos de *C. procera*, as lagartas desenvolveram outros meios para contornar a toxicidade dos metabólitos de suas hospedeiras.

Já os hemípteras *O. fasciatus* e *A. nerii* são hemimetábolos e são expostos aos cardenolídeos durante todo o seu desenvolvimento, justificando a necessidade de possuírem ATPases de Na⁺/K⁺ com maior insensibilidade a esses metabólitos. Ambos são insetos sugadores e, portanto, não é possível evitar o contato com os cardenolídeos presentes nos fluidos vegetais de suas plantas hospedeiras, como as lagartas de *D. plexippus*.

4.6 Análise filogenética

O alinhamento e a árvore filogenética abrangendo vinte e seis seqüências de aminoácidos de ATP α de Na⁺/K⁺ correspondentes a insetos das famílias Nymphalidae, Lygaeidae e Aphididae estão ilustrados nas Figuras 10 e 11.

Figura 10 - Alinhamento múltiplo de secções das seqüências de aminoácidos de ATP α de Na⁺/K⁺ de insetos representativos das famílias Nymphalidae, Lygaeidae e Aphididae, incluindo *Danaus plexippus*, *Oncopeltus fasciatus* e *Aphis nerii*.

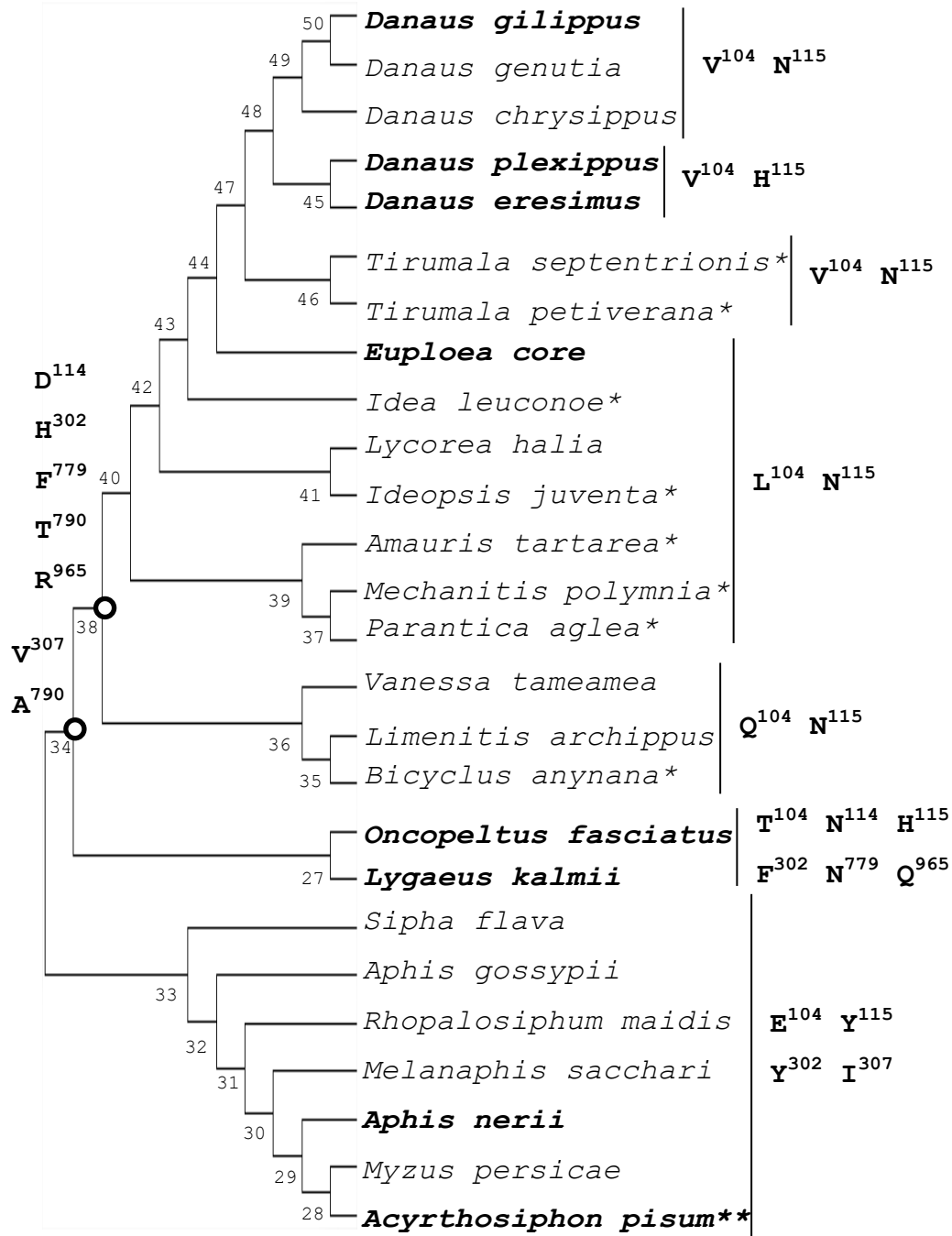
	α M1	104	114	115	α M2	302	305	307	309	312	315	316	320	323	α M4
<i>Danaus plexippus</i>	FIAYGIVASTVEEPS	DDHLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Danaus eresimus</i>	FIAYGIVASTVEEPS	DDHLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Danaus genutia</i>	FIAYGIVASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Danaus gilippus</i>	FIAYGIVASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Danaus chrysippus</i>	FIAYGIVASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Vanessa tameamea</i>	FIAYGIQASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Lycorea halia</i>	FIAYGILASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Limenitis archippus</i>	FIAYGIQASTVEEP	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Bicyclus anynana</i>	FIAYGIQASTVEEP	ADDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Tirumala septentrionis</i>	FIAYGIVASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Tirumala petiverana</i>	FIAYGIVASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Idea leuconoe</i>	FIAYGILASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Mechanitis polymnia</i>	FIAYGILASTVEEP	ADDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Ideopsis juvena</i>	FIAYGILASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Parantica aglea</i>	FIAYGILASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Amauris tartarea</i>	FIAYGILASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Euploea core godartii</i>	FIAYGILASTVEEPS	DDNLYLGI	-----	ILGYHWLDAVI	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	FVAYFITSTTVEEAS	DNHMYLGL	-----	AMGYFWLDAVV	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Lygaeus kalmii</i>	FVAYFITSTTVEEAS	DNHMYLGL	-----	AMGYFWLDAVV	FLIGIIVANVPEGLLATV										
<i>Aphis nerii</i>	FLAHTAETSTTEDP	DDYFYLGV	-----	MMGCYWLDAII	IFMIGFLVAAVPEGLLATV										
<i>Aphis gossypii</i>	FLAHTAETSTTEDP	DDYFYLGV	-----	MMGCYWLDAII	IFMIGFLVAAVPEGLLATV										
<i>Melanaphis sacchari</i>	FLAHTAETSTTEDP	DDYFYLGV	-----	MMGCYWLDAII	IFMIGFLVAAVPEGLLATV										
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	FLAHTAETSTTEDP	DDYFYLGV	-----	MMGCYWLDAII	IFMIGFLVAAVPEGLLATV										
<i>Myzus persicae</i>	FLAHTAETSTTEDP	DDYFYLGV	-----	MMGCYWLDAII	IFMIGFLVAAVPEGLLATV										
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	FLAHTAETSTTEDP	DDYFYLGV	-----	MMGCYWLDAII	IFMIGFLVAAVPEGLLATV										
<i>Sipha flava</i>	FLAHTAETSTTEDP	DDYFYLGV	-----	MMGCYWLDAII	IFMIGFLVAAVPEGLLATV										

.: :: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*

	α M5	776	779	790	797	α M6	α M9-10	965
<i>Danaus plexippus</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Danaus eresimus</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Danaus genutia</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Danaus gilippus</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Danaus chrysippus</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Vanessa tameamea</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Lycorea halia</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Limenitis archippus</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Bicyclus anynana</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Tirumala septentrionis</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Tirumala petiverana</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Idea leuconoe</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Mechanitis polymnia</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Ideopsis juvena</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Parantica aglea</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Amauris tartarea</i>	ISPFLAFILCDI	IPLPLG	TVTILCIDI	-----	TPGMDKGLRMYPL			
<i>Euploea core godartii</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	ISPFLANVVLN	IPLPLG	AVTILCIDI	-----	CPGMDKGLQMYPL			
<i>Lygaeus kalmii</i>	ISPFLANVVLN	IPLPLG	AVTILCIDI	-----	CPGMDKGLQMYPL			
<i>Aphis nerii</i>	LLPFIAFIMLS	IPLPIGA	AAILCIDI	-----	LPGMDEALRMYPL			
<i>Aphis gossypii</i>	LLPFIAFIMLS	IPLPIGA	AAILCIDI	-----	LPGMDEALRMYPL			
<i>Melanaphis sacchari</i>	LLPFIAFIMLS	IPLPIGA	AAILCIDI	-----	LPGMDEALRMYPL			
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	LLPFIAFIMLS	IPLPIGA	AAILCIDI	-----	LPGMDEALRMYPL			
<i>Myzus persicae</i>	LLPFIAFIMLS	IPLPIGA	AAILCIDI	-----	LPGMDEALRMYPL			
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	LLPFIAFIMLS	IPLPIGA	AAILCIDI	-----	LPGMDEALRMYPL			
<i>Sipha flava</i>	LLPFIAFIMLS	IPLPIGA	AAILCIDI	-----	LPGMDEALRMYPL			

Fonte: Elaborada pelo autor. São apresentadas apenas as regiões onde estão localizadas as posições dos resíduos de aminoácidos que causam alguma influência sobre a sensibilidade de ATP α de Na⁺/K⁺ aos cardenólídeos, os quais estão sombreados com a cor cinza. As vinte posições que estão destacados foram identificados a partir de dados estruturais de ATP α de Na⁺/K⁺ já descritos na literatura. . A numeração dos aminoácidos e a identificação das hélices (dentro dos quadrados) correspondem à ATP α 1 de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*. O alinhamento foi realizado através do programa Clustal Omega. Asteriscos representam resíduos de aminoácidos idênticos; dois pontos representam substituições conservadas; um ponto representa substituições semi-conservadas. Q: glutamina; V: valina; T: treonina; E: glutamato; D: aspartato; N: Asparagina; H: histidina; S: Serina; F: fenilalanina; Y: tirosina; I: Isoleucina; G: glicina; A: alanina; L: leucina; R: arginina.

Figura 11 - Análise Filogenética Molecular pelo método de Máxima Verossimilhança.



Fonte: Elaborada pelo autor. A árvore foi baseada no modelo de correção de Poisson (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965). A análise envolveu 26 sequências de aminoácidos de ATP α de Na⁺/K⁺ de membros das famílias Nymphalidae, Lygaeidae e Aphididae. Todas as posições contendo lacunas e dados ausentes foram

eliminadas. Os números ao longo dos ramos indicam valores de bootstrap em 100 análises replicadas. As espécies identificadas a partir da literatura como especialistas estão em negrito. *: desconhecidas quanto a serem especialistas ou generalistas; **: Especialista em leguminosas (Fabaceae); As posições dos resíduos de aminoácidos que influenciam na afinidade da ATP α de Na⁺/K⁺ aos cardenólídeos são mostrados, com os respectivos resíduos. Q: glutamina; V: valina; T: treonina; E: glutamato; D: aspartato; N: Asparagina; H: histidina; S: Serina; F: fenilalanina; Y: tirosina; I: Isoleucina; G: glicina; A: alanina; L: leucina; R: arginina. Árvore filogenética foi construída através do MEGA7.

A árvore mostra dois grupos monofiléticos, um grupo composto pelas famílias Nymphalidae e Lygaeidae e outro pela família Aphididae. A partir dessa árvore filogenética, não foi identificada diferença entre espécies generalistas e especialistas, quanto aos resíduos de aminoácidos nas posições consideradas relevantes no contexto de sensibilidade aos cardenólídeos, especialmente no grupo da família Aphididae (Figura 11).

Mudanças de resíduos dentro de uma mesma família foi observado apenas em Nymphalidae, o grupo com maior número de espécies representativas. Dentro deste grupo, apenas as posições 104 e 115 mostraram-se ser variáveis. De modo que a sensibilidade das ATP α de Na⁺/K⁺ do grupo Nymphalidae parece ser dependente exclusivamente das posições 104 e 115, independente de qualquer outra posição nesta enzima.

Todas as espécies utilizadas nessa análise filogenética com L¹⁰⁴ e N¹¹⁵ possuem ATPases de Na⁺/K⁺ altamente sensíveis à ouabaína, incluindo o especialista em Apocynaceae, *E. core* (PETSCHENKA *et al.*, 2013). A resistência de espécies aos efeitos tóxicos dos cardenólídeos não é atribuída unicamente a insensibilidade das ATPases de Na⁺/K⁺, como é o caso de *E. core*, o qual é capaz de degradar esses metabólitos (PETSCHENKA *et al.*, 2016).

No gênero *Tirumala* e nas espécies *D. gilippus*, *D. genutia*, *D. chrysippus* ocorre um processo de simlesiomorfia em N¹¹⁵. Essas mesmas espécies possuem ATPases de Na⁺/K⁺ com insensibilidade intermediária à ouabaína, em relação aos insetos com V¹⁰⁴ e H¹¹⁵ (altamente insensíveis) e com L¹⁰⁴ e N¹¹⁵ (altamente sensíveis) (PETSCHENKA *et al.*, 2013). É plausível que a redução na insensibilidade das enzimas deste grupo possa estar relacionado unicamente ao N¹¹⁵, que consiste em um resíduo conservado em espécies sensíveis aos cardenólídeos.

Os membros do grupo da família Lygaeidae ficaram limitados aos insetos *O. fasciatus* e *L. kalmii*, ambos especialistas de Apocynaceae e com os resíduos chaves conservados. A árvore filogenética obtida neste trabalho está de acordo com a produzida por Petschenka *et al.* (2013), em relação aos grupos Nymphalidae e Lygaeidae. No grupo da

família Aphididae todos os resíduos chaves que foram destacados no alinhamento da figura 10 são conservados, em relação a *A. nerii*, o único especialista de Apocynaceae deste grupo.

5 CONCLUSÃO

A variedade estrutural dos cardenolídeos sintetizados por *C. procera* tem a finalidade de aumentar o espectro de ação de sua defesa química sobre ATP α de Na⁺/K⁺ com diferentes graus de sensibilidade. Em contrapartida, os herbívoros *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* sequestram preferencialmente os cardenolídeos que não são seletivos a suas ATP α de Na⁺/K⁺, ou que são seletivos, mas não lhes cause efeitos tóxicos severos em baixas concentrações. Os cardenolídeos com maior potencial de toxicidade sobre esses herbívoros são possivelmente excretados ou metabolizados, para evitar danos ao organismo.

O grau de sensibilidade das ATP α de Na⁺/K⁺ de *D. plexippus*, *O. fasciatus* e *A. nerii* pode está relacionado a polaridade dos cardenolídeos e as propriedades químicas dos resíduos de aminoácidos nas posições 104, 115 e 302, justificando a especificidade na polaridade dos cardenolídeos sequestrados.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, N. *et al.* Proceragenin, an antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 31, p. 2821-2824, 1992.
- ALI, J. G.; AGRAWAL, A. A. Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. **Trends in plant science**, [s.l.], v. 17, n. 5, p. 293-302, 2012.
- ALTIZER, S. M.; OBERHAUSER, K. S. Effects of the protozoan parasite *Ophryocystis elektroscirrha* on the fitness of monarch butterflies (*Danaus plexippus*). **Journal of invertebrate pathology**, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 76-88, 1999.
- BARTNIK, M.; FACEY, P. C. Glycosides. *In: Pharmacognosy*. [S.l.]: Academic Press, p. 101-161, 2017.
- BIRNBAUM, S. S. L.; ABBOT, P. Insect adaptations toward plant toxins in milkweed–herbivores systems—a review. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s.l.], v. 166, n. 5, p. 357-366, 2018.
- BIRNBAUM, S. S. **Transcriptional plasticity in a specialist, non-model insect associated with living in a toxic environment**. Nashville, 2019. Doctoral dissertation, Vanderbilt University.
- BLANCO, G.; MERCER, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [s.l.], v. 275, n. 5, p. 633-650, 1998.
- BÖGEHOLZ, N. *et al.* Overexpression of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger influences ouabain-mediated spontaneous Ca²⁺ activity but not positive inotropy. **Fundamental & clinical pharmacology**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 43-51, 2019.
- BRAMER, C. *et al.* Na⁺/K⁺-ATPase resistance and cardenolide sequestration: basal adaptations to host plant toxins in the milkweed bugs (Hemiptera: Lygaeidae: Lygaeinae). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 282, n. 1805, p. 20142346, 2015.
- BRÜSCHWEILER, F.; STÖCKEL, K.; REICHSTEIN, T. Calotropis-Glykoside, vermutliche Teilstruktur.. Glykoside und Aglykone, 321. Mitteilung. **Helvetica chimica acta**, [s.l.], v. 52, n. 8, p. 2276-2303, 1969.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein science**, [s.l.], v. 2, n. 9, p. 1511-1519, 1993.
- DESHEESH, M. A. *et al.* Glycosidic Cardenolides. Histopathological Symptoms of Cardenolides Effects On Different Organs from Whit Norway Rats (*Rattus norvegicus* var. *albus*). **Alexandria Science Exchange Journal**, [s.l.], v. 24, p. 655 – 669, 2004.
- DOBLER, S. *et al.* Community-wide convergent evolution in insect adaptation to toxic cardenolides by substitutions in the Na, K-ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 32, p. 13040-13045, 2012.

DOBLER, S. *et al.* Convergent adaptive evolution—how insects master the challenge of cardiac glycoside-containing host plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s.l.], v. 157, n. 1, p. 30-39, 2015.

ELGAMAL, M. H. A. *et al.* Complete ¹H and ¹³C signal assignments of 5 α -cardenolides isolated from *Calotropis procera* R. BR. **Journal of molecular structure**, [s.l.], v. 477, p. 201-208, 1999

EMANUELSSON, O. *et al.* Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 300, n. 4, p. 1005-1016, 2000.

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae sl. **The Botanical Review**, [s.l.], v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000.

FENG, J.; LINGREL, J. B. Analysis of Amino Acid Residues in the H5-H6 Transmembrane and Extracellular Domains of Na, K-ATPase. alpha. Subunit Identifies Threonine 797 as a Determinant of Ouabain Sensitivity. **Biochemistry**, [s.l.], v. 33, n. 14, p. 4218-4224, 1994.

FERRÈ, F.; CLOTE, P. Disulfide connectivity prediction using secondary structure information and diresidue frequencies. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 21, n. 10, p. 2336-2346, 2005.

GONZALES, W. L. *et al.* Host plant changes produced by the aphid *Sipha flava*: consequences for aphid feeding behaviour and growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s.l.], v. 103, n. 2, p. 107-113, 2002.

HANNA, A. G. *et al.* Two cardenolides from *Calotropis procera*. **Magnetic resonance in chemistry**, [s.l.], v. 37, p. 754-757, 1999

HEO, LIM; PARK, H.; SEOK, C. GalaxyRefine: protein structure refinement driven by side-chain repacking. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. 384-388, 2013.

HOLDREGE, C. **The Story of an Organism: Common Milkweed**. [S.l.]: The Nature Institute, 2010. Disponível em: <http://natureinstitute.org/txt/ch/images/milkweed/Milkweed.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2019.

HOLZINGER, F.; WINK, M. Mediation of cardiac glycoside insensitivity in the monarch butterfly (*Danaus plexippus*): role of an amino acid substitution in the ouabain binding site of Na⁺, K⁺-ATPase. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 22, n. 10, p. 1921-1937, 1996.

IBRAHIM, S. R. *et al.* Proceraside A, a new cardiac glycoside from the root barks of *Calotropis procera* with in vitro anticancer effects. **Natural product research**, [s.l.], v. 28, p. 1322-1327, 2014.

KANOJIYA, S.; MADHUSUDANAN, K. P. Rapid identification of calotropagenin glycosides using high-performance liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, [s.l.], v. 23, p. 117-125, 2012.

- KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, [s.l.], v. 10, n. 6, p. 845, 2015.
- KERYANOV, S.; GARDNER, K. L. Physical mapping and characterization of the human Na, K-ATPase isoform, ATP1A4. *Gene*, [s.l.], v. 292, n. 1, p. 151-166, 2002.
- KHALID, M. *et al.* The high and low affinity binding sites of digitalis glycosides to Na, K-ATPase. *Arabian Journal for Science and Engineering*, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 75-85, 2014.
- KHAN, S. R.; RASTOGI, N. Impact of mining activity on butterfly diversity and community composition. *J Entomol Zool Stud*, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 178-185, 2015.
- KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. Alwyn. Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, [s.l.], v. 4, n. 12, p. 1395-1400, 1996.
- KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*, [s.l.], v. 72, n. 13, p. 1510-1530, 2011.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, [s.l.], v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, [s.l.], v. 51, n. 10, p. 2778-2786, 2011.
- LAURSEN, M. *et al.* Structures and characterization of digoxin-and bufalin-bound Na⁺, K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 112, n. 6, p. 1755-1760, 2015.
- LAURSEN, M. *et al.* Crystal structure of the high-affinity Na⁺, K⁺-ATPase–ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 110, n. 27, p. 10958-10963, 2013.
- LOHR, J. N. *et al.* The function and evolutionary significance of a triplicated Na, K-ATPase gene in a toxin-specialized insect. *BMC evolutionary biology*, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 256, 2017.
- LUTSENKO, S.; KAPLAN, J. H. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry*, [s.l.], v. 34, n. 48, p. 15607-15613, 1995.
- MAIOROV, V. N.; CRIPPEN, G. M. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *Journal of molecular biology*, [s.l.], v. 235, n. 2, p. 625-634, 1994.
- MALCOLM, S. B. Chemical defence in chewing and sucking insect herbivores: plant-derived cardenolides in the monarch butterfly and oleander aphid. *Chemoecology*, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 12-21, 1990.

MATCHKOV, V. V.; KRIVOI, I. I. Specialized functional diversity and interactions of the Na, K-ATPase. **Frontiers in physiology**, [s.l.], v. 7, p. 179, 2016

MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic acids research**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 20-25, 2004.

MEBS, D.; WUNDER, C.; TOENNES, S. W. Poor sequestration of toxic host plant cardenolides and their rapid loss in the milkweed butterfly *Danaus chrysippus* (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae: Danaini). **Toxicon**, [s.l.], v. 131, p. 1-5, 2017.

MOHAMED, N. H. *et al.* Cytotoxic cardenolides from the latex of *Calotropis procera*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, [s.l.], v. 25, p. 4615-4620, 2015.

MORTH, J. P. *et al.* A structural overview of the plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 60, 2011.

OGAWA, H. *et al.* Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺, K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 106, n. 33, p. 13742-13747, 2009.

PALASIS, M. *et al.* Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na, K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 271, n. 24, p. 14176-14182, 1996.

PANDEY, A. *et al.* Transcriptome and metabolite analysis reveal candidate genes of the cardiac glycoside biosynthetic pathway from *Calotropis procera*. **Scientific reports**, [s.l.], v. 6, p. 34464, 2016.

PANFILIO, K. A. *et al.* Molecular evolutionary trends and feeding ecology diversification in the Hemiptera, anchored by the milkweed bug genome. **Genome biology**, [s.l.], v. 20, p. 64, 2019.

PEREIRA, P. R. V.; SALVADORI, J. R. **Pulgão-do-milho: *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae)**. [S.I.]: 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/74021/1/Pulgao-do-milho.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2019.

PETSCHENKA, G. *et al.* Stepwise evolution of resistance to toxic cardenolides via genetic substitutions in the Na⁺/K⁺-ATPase of milkweed butterflies (Lepidoptera: Danaini). **Evolution**, [s.l.], v. 67, n. 9, p. 2753-2761, 2013.

PETSCHENKA, G. *et al.* Convergently evolved toxic secondary metabolites in plants drive the parallel molecular evolution of insect resistance. **The American Naturalist**, [s.l.], v. 190, n. S1, p. 29-43, 2017.

PETSCHENKA, G. *et al.* Relative selectivity of plant cardenolides for Na⁺/K⁺-ATPases from the monarch butterfly and non-resistant insects. **Frontiers in plant science**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-13, 2018.

PIVOVAROV, A. S.; CALAHORRO, F.; WALKER, R. J. Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. **Invertebrate Neuroscience**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 1-19, 2019.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature reviews Drug discovery**, [s.l.], v. 7, p. 11-926. 2008.

PRICE, E. M.; LINGREL, J. B. Structure-function relationships in the sodium-potassium ATPase. alpha. subunit: Site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme. **Biochemistry**, [s.l.], v. 27, n. 22, p. 8400-8408, 1988.

QIU, L. Y. *et al.* Phe783, Thr797, and Asp804 in transmembrane hairpin M5-M6 of Na⁺, K⁺-ATPase play a key role in ouabain binding. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 47, p. 47240-47244, 2003.

QIU, L. Y. *et al.* Reconstruction of the complete ouabain-binding pocket of Na, K-ATPase in gastric H, K-ATPase by substitution of only seven amino acids. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 280, n. 37, p. 32349-32355, 2005.

QUAQUEBEKE, E. V. *et al.* Identification of a Novel Cardenolide (2 ‘‘-Oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the Hemisynthesis of Novel Derivatives Displaying Potent in Vitro Antitumor Activities and High in Vivo Tolerance: Structure–Activity Relationship Analyses. **Journal of medicinal chemistry**, [s.l.], v. 48, p. 849-856, 2005.

RAMSEY, J. S. *et al.* Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*. **Insect Molecular Biology**, [s.l.], v. 19, p. 155-164, 2010.

SHAKER, K. H. *et al.* Secondary metabolites from *Calotropis procera* (Aiton). **Phytochemistry Letters**, [s.l.], v. 3, p. 212-216, 2010.

SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 355-362, 1993.

SKOU, J. C. The identification of the sodium–potassium pump (Nobel lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 37, n. 17, p. 2320-2328, 1998.

SWEIDAN, N. I.; ZARGA, M. H. A. Two novel cardenolides from *Calotropis procera*. **Journal of Asian natural products research**, [S.I.], v. 17, p. 900-907, 2015.

TAO, L. *et al.* Fitness costs of animal medication: antiparasitic plant chemicals reduce fitness of monarch butterfly hosts. **Journal of Animal Ecology**, [s.l.], v. 85, n. 5, p. 1246-1254, 2016.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, [s.l.], v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

- CHEN, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [*s.l.*], v. 66, n. 1, p. 12-21, 2010.
- VITKUP, D. *et al.* Completeness in structural genomics. **Nature Structural and Molecular Biology**, [*s.l.*], v. 8, n. 6, p. 559, 2001
- WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic acids research**, [*s.l.*], v. 46, n. 1, p. 296-303, 2018.
- WEN, S. *et al.* Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. **Fitoterapia**, [*s.l.*], v. 112, p. 74-84, 2016.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, [*s.l.*], v. 35, n. suppl_2, p. 407-410, 2007.
- WINK, M.; SCHIMMER, O. Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. **Annual Plant Reviews online**, [*s.l.*], v. 39, p. 21-161, 2018.
- WITTSTOCK, U.; GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current opinion in plant biology**, [*s.l.*], v. 5, n. 4, p. 300-307, 2002.
- YATIME, L. *et al.* Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺, K⁺-ATPase. **Journal of structural biology**, [*s.l.*], v. 174, n. 2, p. 296-306, 2011.
- ZHAN, S. *et al.* The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. **Cell**, [*s.l.*], v. 147, n. 5, p. 1171-1185, 2011.
- ZHAN, S.; REPPERT, S. M. MonarchBase: the monarch butterfly genome database. **Nucleic acids research**, [*s.l.*], v. 41, n. 1, p. 758-763, 2013.
- ZHANG, J.; LIANG, Y.; ZHANG, Y. Atomic-level protein structure refinement using fragment-guided molecular dynamics conformation sampling. **Structure**, [*s.l.*], v. 19, n. 12, p. 1784-1795, 2011.
- ZHEN, Y. *et al.* Parallel molecular evolution in an herbivore community. **science**, [*s.l.*], v. 337, n. 6102, p. 1634-1637, 2012.
- ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. *In: Evolving genes and proteins*. [*s.l.*]: Academic Press, p. 97-166, 1965.
- ZÜST, T.; MOU, S.; AGRAWAL, A. A. What doesn't kill you makes you stronger: The burdens and benefits of toxin sequestration in a milkweed aphid. **Functional ecology**, [*s.l.*], v. 32, n. 8, p. 1972-1981, 2018.
- ZVEREVA, E. L.; KOZLOV, M. V. The costs and effectiveness of chemical defenses in herbivorous insects: a meta-analysis. **Ecological Monographs**, [*s.l.*], v. 86, n. 1, p. 107-124, 2016.