



ARLEY REY PAEZ

**IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DOS ALVOS PROTEICOS DE
NOVOS NEMATICIDAS: TIOXAZAFENO E
FLUAZAINDOLIZINA**

**LAVRAS-MG
2022**

ARLEY REY PAEZ

**IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DOS ALVOS PROTEICOS DE NOVOS
NEMATICIDAS: TIOXAZAFENO E FLUAZAINDOLIZINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em química/bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Paez, Arley Rey.

Identificação *in silico* dos alvos proteicos de novos
nematicidas: tioxazafeno e fluazaindolizina / Arley Rey Paez. -
2022.

163 p. : il.

Orientador(a): Denilson Ferreira de Oliveira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Heterodera. 2. Meloidogyne. 3. Hsp90. I. Oliveira, Denilson
Ferreira de. II. Título.

ARLEY REY PAEZ

**IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DOS ALVOS PROTEICOS DE NOVOS
NEMATICIDAS: TIOXAZAFENO E FLUAZAINDOLIZINA**

**IN SILICO IDENTIFICATION OF THE PROTEIN TARGETS OF NEW
NEMATICIDES: TIOXAZAFEN AND FLUAZAINDOLIZINE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em química/bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de junho de 2022.
Dr. Jorge Teodoro de Souza - UFLA
Dr. Geraldo Humberto Silva - UFV

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

*À providência divina que sempre nos espera. A minha
madre Rosa Emma, por sua paciência, esforço e apoio
incondicionais; a Milena, pela companhia e carinho; e a
todos aqueles que de forma indireta ajudaram a boa
consecução do presente trabalho acadêmico.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química pela oportunidade e confiança na realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), por garantir oportunidades de desenvolvimento acadêmico aos países da América Latina.

Aos professores do Departamento de Química, pelos ensinamentos transmitidos e concessão dos espaços para o desenvolvimento dos trabalhos.

Ao Professor Dr. Denilson Ferreira de Oliveira, pela orientação, paciência, apoio e lições profissionais oferecidas constantemente para a conclusão do trabalho de mestrado.

Ao Dr. Willian César Terra, pela confiança e conhecimentos compartilhados durante o percurso do mestrado.

A minha Madre Rosa Emma Páez León pelo seu apoio incondicional.

A minha amiga e parceira Ana Milena Gómez, por seu carinho, compreensão e palavras de apoio.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Os nematoides parasitas de plantas (NPPs) são organismos microscópicos que habitam o solo e os tecidos vegetais. Dentre tais organismos se destacam aqueles dos gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera*, pois afetam mais de 2500 espécies diferentes de plantas, com perdas econômicas que superam os US\$100 bilhões por ano. No Brasil, esses nematoides constituem uma notável ameaça para o progresso e a segurança alimentar do país. Os métodos mais populares para o controle de NPPs se baseiam no uso de nematicidas químicos. No entanto, as políticas de segurança animal e ambiental têm limitado os seus usos. Em decorrência, novos nematicidas como o tioxazafeno (NemaStrike™) e a fluazaindolizina (Salibro™) têm surgido. Embora sejam considerados seguros, ainda não se conhecem os seus mecanismos de ação. Consequentemente, tem-se como objetivo principal deste trabalho identificar os possíveis alvos enzimáticos desses nematicidas. Para isso, empregou-se a abordagem *in silico*, que abrangeu: busca farmacofórica, modelagem molecular de proteínas e *docking* molecular. Na busca por inibidores de proteínas farmacoforicamente semelhantes ao tioxazafeno e à fluazaindolizina, foram selecionados os compostos: BXZ (4-bromo-6-(6-hidroxi-1,2-benzoxazol-3-il)benzeno-1,3-diol) e EW0 (7-cloro-4-(3-metoxianilino)-N-(4-metoxifenil)sulfonyl-1-metilindol-2-carboxamida), com escores de Tanimoto de 0,52 e 0,40, respectivamente. BXZ é um potente inibidor ($IC_{50} = 190$ nmol/L) de chaperonas do tipo Hsp90; enquanto EW0 é um forte inibidor da enzima chave da gliconeogênese, a frutose 1,6-bisfosfatase (FBPase; $IC_{50} = 29$ nmol/L). Em Hsp90 não produzidas por NPPs, os resultados de *docking* molecular mostraram que o tioxazafeno se liga a tais enzimas com a mesma energia de afinidade do BXZ (-7,5 kcal/mol), o que sugere que o tioxazafeno pode agir como inibidor de enzimas chaperonas do tipo Hsp90. Por outro lado, nas Hsp90 de *H. glycines* os resultados de afinidade dependeram do estado conformacional do domínio N-terminal (DNT) das Hsp90 modeladas a partir das sequências selecionadas. Em modelos Hsp90 com a região DNT em estado fechado não houve diferença estatística significativa quando comparada a energia de afinidade com aquela obtida nas Hsp90 de mamíferos. Porém, nos modelos Hsp90 com a região DNT em estado aberto a energia de afinidade foi estatisticamente diferente (-6,5 kcal/mol). A fluazaindolizina, por outra parte, ligou-se às enzimas FBPase não produzidas por NPPs com energia de afinidade média igual a -8,0 kcal/mol. Nas FBPases produzidas por *Meloidogyne graminicola* e *Meloidogyne entrelobii*, e que foram modeladas até a obtenção de suas estruturas quaternárias, as energias de afinidade calculadas não foram estatisticamente diferentes das obtidas nas FBPases não provenientes de NPPs. Comparada com potentes inibidores FBPase, a fluazaindolizina esteve entre os três melhores resultados de afinidade registrados em ambos os *softwares* de ancoramento empregados. Conclui-se que a metodologia aqui empregada mostra que os resultados obtidos estão em concordância com as características farmacofóricas dos compostos BXZ e EW0. O tioxazafeno, assim como outros benzisoxazoles, conta com as características estruturais necessárias para agir como antagonista competitivo do ATP em enzimas Hsp90. Por outro lado, a fluazaindolizina, da mesma forma que outras sulfonilcarbaxamidas, conta com as qualidades necessárias para ser um potente inibidor de enzimas FBPases.

Palavras-chave: Tioxazafeno. Fluazaindolizina. *In silico*. *Heterodera*. *Meloidogyne*. Hsp90. FBPase.

ABSTRACT

Plant-parasitic nematodes (PPNs) are microscopic organisms that inhabit soil and plant tissues. Among these organisms, those of the genera *Meloidogyne* and *Heterodera* stand out because they affect more than 2,500 different plant species, with economic losses exceeding US\$ 100 billion per year. In Brazil, these nematodes constitute a notable threat to the country's progress and food security. The most popular methods for the control of PPNs are based on the use of chemical nematicides. However, animal and environmental safety laws have limited their use. As a result, new nematicides such as tioxazafen (NemaStrike™) and fluazaindolizine (Salibro™) have emerged. Although they are considered safe, their mechanisms of action are not yet known. Consequently, the main objective of this work was to identify the possible enzymatic targets of these nematicides. For this, an *in silico* approach was employed, which included: pharmacophore search, protein molecular modeling and molecular docking. In the search for proteins inhibitors pharmacophorically similar to tioxazafen and fluazaindolizine, two compounds were selected: BXZ (4-bromo-6-(6-hydroxy-1,2-benzoxazol-3-yl)benzene-1,3-diol) and EW0 (7-chloro-4-(3-methoxyanilino)-*N*-(4-methoxyphenyl)sulfonyl-1-methylindol-2-carboxamide) with Tanimoto scores of 0.52 and 0.40, respectively. BXZ is a potent inhibitor ($IC_{50} = 190$ nmol/L) of Hsp90-type chaperones; whereas EW0 is a strong inhibitor of the key enzyme of gluconeogenesis, fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase; $IC_{50} = 29$ nmol/L). On Hsp90 not produced by PPNs, molecular docking results showed that tioxazafen binds to such enzymes with the same affinity energy as BXZ (-7.5 kcal/mol), suggesting that tioxazafen may act as an inhibitor of Hsp90-type chaperone enzymes. On the other hand, in Hsp90 of *H. glycines* the affinity results depended on the conformational state of the N-terminal domain (NTD) of Hsp90 modeled from the selected sequences. In Hsp90 models with the NTD region in closed state there was no statistically significant difference when comparing the affinity energy with that obtained in mammalian Hsp90; however, in Hsp90 models with the NTD region in open state the affinity energy was statistically different (-6.5 kcal/mol). Fluazaindolizine, on the other hand, bound to FBPase enzymes not produced by PPNs with a half affinity energy of -8.0 kcal/mol. In FBPases produced by *Meloidogyne graminicola* and *Meloidogyne enterolobii*, and which were modelled until their quaternary structures were obtained, the calculated affinity energies were not statistically different from those obtained in FBPases not originating from PPNs. Compared with potent FBPase inhibitors, fluazaindolizine was among the three best affinity results recorded in both docking software employed. In conclusion, the methodology employed here shows that the results obtained are in agreement with the pharmacophore characteristics of the compounds BXZ and EW0. The tioxazafen, similarly to other benzisoxazoles has the necessary structural characteristics to act as competitive antagonist of ATP in Hsp90 enzymes. On the other hand, fluazaindolizine, like other sulfonylcarbaxamides, has the necessary qualities to be a potent inhibitor of FBPases enzymes.

Keywords: Tioxazafen. Fluazaindolizine. *In silico*. *Heterodera*. *Meloidogyne*. Hsp90. FBPase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação gráfica do ciclo de vida do nematoide das galhas: *Meloidogyne* spp. 22
- Figura 2 - Mapa de distribuição geográfica do nematoide do cisto: *Heterodera glycines*. As áreas e os círculos de cor amarelo correspondem às regiões do mundo nas quais o nematoide está atualmente presente. 24
- Figura 3 - Estruturas 2D de novos nematicidas comerciais: (a) fluopiram (N-[2-[3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il]etil]-2-(trifluorometil)benzamida); (b) fluazaindolizina (8-cloro-N-(2-cloro-5-metoxifenil)sulfonil-6 (trifluorometil)imidazo[1,2a]piridina-2-carboxamida); (c) tioxazafeno(3-fenil-5-tiofen-2-il-1,2,4-oxadiazol); (d) fluensulfona (5-cloro-2-(3,4,4-trifluorobut-3-enilsulfonil)-1,3-tiazol); (e) ciclobutrifluram (N-[(1R,2R)-2-(2,4-diclorofenil)ciclobutil]-2 (trifluorometil)piridina-3-carboxamida). 27
- Figura 4 - Estruturas 2D de algumas substâncias provenientes de modificações estruturais feitas no anel do 1,2,4-oxadiazol, que foram ativas em ensaios *in vitro* com *Heterodera glycines* (EC50 20 µg/mL) e *in vivo* com *Meloidogyne* incognita (2,0 kg/ha em casa de vegetação). 29
- Figura 5 - Percentagem de redução média de nematoides por tioxazafeno, em comparação com dois nematicidas padrões comercialmente disponíveis no mercado. Os valores descritos representam os resultados em vários ambientes controlados e ensaios de microplot em campo. 30
- Figura 6 - Produtividade de sementes de soja tratadas com tioxazafeno em ensaios de campo EUP de grande escala, durante a safra 2015 nos EUA. As médias de tratamento com uma letra em comum não são significativamente iguais no nível de significância de 0,05. F/I: fungicida/inseticida base; Comm Std: padrões comerciais; Bu/A: Bushels per acre. 31
- Figura 7 - Radiograma do tioxazafeno em soja seguida da absorção da semente indicando concentração de composto em uma zona de raiz e seus efeitos na produção radicular após 74 dias de aplicação. F/I: fungicida/inseticida base; Commstd: padrões comerciais. 32
- Figura 8 - N-fenilsulfonilimidazopiridina-2-carboxamidas ativas contra *Meloidogyne* spp. e que deram origem à fluazaindolizina. (a) 8-cloro-N-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)sulfonil)-6-(trifluorometil)imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida; (b) 8-cloro-N-((2-fluorofenil)sulfonil)-6-(trifluorometil)imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida. 33
- Figura 9 - Estruturas químicas de ligantes inibidores de Hsp90, que estavam experimentalmente complexados às enzimas 4EFU, 4L90, 3WHA, 1YET, 3VHA, 3BMY, 3R92, 3QTF, 3RKZ; e que foram empregados no ancoramento molecular nas Hsp90 não produzidas por *Heterodera glycines*. 66
- Figura 10 - Estruturas químicas de alguns ligantes inibidores de Hsp90 que apresentaram os melhores valores de energia de afinidade pelos modelos das sequências AAO14563 e ACR57216 e que foram submetidos à busca farmacofórica na base de dados do MCULE. ... 68
- Figura 11 - Representações tridimensionais das conformações mais estáveis do tioxazafeno após dinâmica molecular (MMFF94) e otimização por mecânica quântica (Hamiltoniano PM7). 69

Figura 12 - Sobreposição tridimensional de Tio-2 (cor verde) aos ligantes selecionados na busca farmacofórica, com os quais Tio-2 apresentou maior semelhança estrutural (cor cinza).	71
Figura 13 - Resultado do alinhamento* entre o domínio N-terminal (DNT) da Hsp90 3BM9, e o DNT das sequências AAO14563, ACR57215 e ACR57216. Abaixo, percentagens de similaridade entre as sequências alinhadas.....	73
Figura 14 - Estrutura e localização dos domínios DNT, MD e DCT no homodímero da proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Para maior clareza, as cadeias da Hsp90 foram distintamente coloridas. O ligante ATP está marcado de cor verde fosforescente na região DNT.....	74
Figura 15 - Estrutura tridimensional do ligante BXZ (4-bromo-6-(6-hidroxi-1,2-benzisoxazol-3-il)benzeno-1,3-diol), que foi selecionado na busca farmacofórica, e sobreposição tridimensional do mesmo (cor cinza) com as conformações mais estáveis do tioxazafeno (cor verde).	76
Figura 16 - Ciclo da Hsp90. Após a ligação do ATP ao DNT, o ATP-lid se fecha sobre o nucleotídeo, permitindo que a Hsp90 transite por diferentes estados conformacionais durante o seu ciclo ATPase. Algumas co-chaperonas ligam-se preferencialmente a conformações específicas de Hsp90 (indicado pelos círculos de cores).....	79
Figura 17 - Alinhamento* global das sequências AAO14563 e ACR57216 com a Hsp90 5FWK. A direita, alinhamento** 3D entre a cadeia A de 5FWK (roxa) e os modelos selecionados pelo GalaxyWeb para AAO14563: GAL1 (amarelo), GAL2 (verde), GAL3 (azul), GAL4 (cinza) e GAL5 (vermelho).....	83
Figura 18 - Representação gráfica que mostra a diferença estrutural entre a região DNT de um par de modelos desenhados para a sequência AAO14563. De cor vermelha é ressaltado o segmento ATP-lid como uma característica estrutural móvel que pode responder à ligação de ATP.....	85
Figura 19 - Valores de afinidade (kcal/mol) pela Hsp90, obtidos com o uso do software QuickVina v.2.1 para o tioxazafeno (TIO) e para ligantes inibidores da Hsp90. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. As barras com mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).	86
Figura 20 - Representação 3D e 2D dos modos de interação do ligante inibidor de Hsp90, BXZ, no cristal da proteína 3BM9, e do resultado de ancoramento do tioxazafeno na mesma enzima através do software QuickVina v.2.1.	87
Figura 21 - Superfície molecular da região DNT de Hsp90, que foi colorida de acordo com o potencial de lipofilicidade (MLP) de Chimera X v.1.4. O resultado é mostrado com coloração na superfície molecular variando de azul ciano escuro (mais hidrofílico), passando por branco (menos hidrofílico), e terminando com dourado escuro (mais lipofílico). ADP (cor purpura), BXZ (cor vermelho) e TIO (cor verde).	88
Figura 22 - Valores de afinidade (kcal/mol) obtidos com o uso do software AutoDock v. 4.2.6 para o tioxazafeno (TIO) e para os ligantes inibidores da Hsp90. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. As barras com a mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).	90
Figura 23 - Representação 3D e 2D dos modos de interação do ligante inibidor BXZ na Hsp90 3BM9 após ancoramento com os softwares QuickVina v.2.1 e AutoDock v.4.2.6.	91

Figura 24 - Representação 3D e 2D dos modos de interação do tioxazafeno com a Hsp90 3BM9 após ancoramento com o software AutoDock v.4.2.6.....	92
Figura 25 - Sobreposição tridimensional e raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) entre o resultado experimental (cor vermelho) e o resultado teórico (cor azul) obtido para cada um dos ligantes BXZ, CXZ, 06J, 05S e 06T, através do uso do software QuickVina v.2.1.....	94
Figura 26 - Sobreposição tridimensional e raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) entre o resultado experimental (cor vermelho) e o resultado teórico (cor azul) obtido para cada os ligantes BXZ, CXZ, 06J, 05S e 06T, através do uso do software AutoDock v.4.2.6.....	95
Figura 27 - Valores de afinidade (kcal/mol) obtidos com o uso dos softwares QuickVina v.2.1 e AutoDock v.4.2.6 para o tioxazafeno (TIO) e para os ligantes inibidores de Hsp90 05S, 06J, 06T, BXZ, CXZ, EFU, GDM, RL3, VHA e WHA, que foram ancorados nos modelos de Hsp90 de Heterodera glycines com o ATP-lid em estado fechado. As barras de erro correspondem aos desvios padrão. As barras com a mesma letra minúscula em cada gráfico não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).....	96
Figura 28 - Resultado qualitativo de ancoramento do tioxazafeno nas Hsp90 modeladas a partir das sequências AAO14564 (azul) e ACR57216 (amarelo), produzidas por Heterodera glycines e que se encontravam com o segmento ATP-lid em estado fechado. De cor verde é ressaltada a posição e localização do ligante inibidor BXZ no cristal da enzima 3BM9.....	98
Figura 29 - Valores de afinidade (kcal/mol) obtidos com o uso do software QuickVina v.2.1 e AutoDock v.4.2.6 para o tioxazafeno (TIO) e para os inibidores de Hsp90 05S, 06J, 06T, BXZ, CXZ, EFU, GDM, RL3, VHA e WHA, que foram ancorados nos modelos com o ATP-lid em estado aberto das Hsp90 produzidas por Heterodera glycines. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).....	100
Figura 30 - Representação gráfica do resultado obtido com o software QuickVina v.2.1 que mostra os modos de interação em 3D e 2D do melhor ancoramento do tioxazafeno nas Hsp90 modeladas a partir de 7KW7 e cujo resultado foi logo complexado na Hsp90 3BM9 como forma de estabelecer o efeito do modelo nos resultados qualitativos de ancoramento. De cor verde é marcada a posição e localização experimental do ligante BXZ em 3BM9.	101
Figura 31 - Representação gráfica do resultado obtido com o software QuickVina v.2.1, que mostra os modos de interação em 3D e 2D do melhor ancoramento do tioxazafeno nas Hsp90 modeladas a partir de 7KW7.	102
Figura 32 - Substâncias selecionadas da base de dados do MCULE e que apresentaram os menores valores de energia de afinidade ($\sim -10,0$ kcal/mol) após ancoramento nos modelos da Hsp90 de Heterodera glycines.....	103
Figura 33 - Resultado qualitativo do ancoramento da substância MCULE-5730954407 (cor azul), feito com o software QuickVina v.2.1, nos modelos das Hsp90 de Heterodera glycines com a região DNT em seu estado fechado. De cor magenta é representada a localização de CXZ em 3BMY, e de cor verde o ligante BXZ em 3BM9.....	104
Figura 34 - Resultado qualitativo obtido com o software QuickVina v.2.1 para o ancoramento de MCULE-5730954407 (cor azul) nas Hsp90 3BM9 e 3BMY. De cor verde (BXZ) e de magenta (CXZ).	105

Figura 35 - Resultado qualitativo obtido com o software QuickVina v.2.1 para o ancoramento de MCULE-5730954407 (cor azul) nos modelos das Hsp90 de <i>Heterodera glycines</i> com a região DNT em seu estado aberto. De cor magenta é representada a localização de CXZ em 3BMY, e de cor verde o ligante BXZ em 3BM9.....	106
Figura 36 - Estruturas 2D de novos nematicidas comerciais: (a) fluopiram (N-[2-[3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il]etil]-2-(trifluorometil)benzamida); (b) fluazaindolizina (8-cloro-N-(2-cloro-5-metoxifenil)sulfonil-6-(trifluorometil)imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida); (c) tioxazafeno (3-fenil-5-tiofen-2-il-1,2,4-oxadiazol); (d) fluensulfona (5-cloro-2-(3,4,4-trifluorobut-3-enilsulfonil)-1,3-tiazol); (e) ciclobutrifluram (N-[(1R,2R)-2-(2,4-diclorofenil)ciclobutil]-2-(trifluorometil)piridina-3-carboxamida).....	122
Figura 37 - Estruturas químicas de ligantes inibidores de FBPase, que estavam experimentalmente complexados às enzimas 2F3D, 3A29, 3KBZ, 2VT5, 3KC1, 7CVN, 6LW2; e que foram empregados no ancoramento molecular nas FBPases não produzidas por nematoides fitoparasitas.	129
Figura 38 - Estruturas químicas das diferentes formas tautoméricas da fluazaindolizina em pH 7,0.	131
Figura 39 - Representação tridimensional das conformações mais estáveis dos diferentes tautômeros após dinâmica molecular (MMFF94) e otimização por mecânica quântica (Hamiltoniano PM7).....	133
Figura 40 - Resultado do alinhamento* entre a sequências de aminoácidos da FBPase 6LW2 e as sequências CAD2178941 e KAF7639614. Abaixo, percentagens de similaridade entre as sequências alinhadas.....	136
Figura 41 - Estruturas quaternárias que mostram os diferentes estados conformacionais (R e T) do homotetrâmero da enzima frutose-1,6-bisfosfatase. Cada subunidade (C1-C4) é representada por uma cor diferente. De verde fosforescente é ressaltado o sítio alostérico de ligação do AMP.	137
Figura 42 - Estruturas 2D de inibidores da frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase) que mimetizam o efeito do inibidor alostérico natural AMP.	138
Figura 43 - Estrutura tridimensional do ligante EW0 (7-cloro-4-(3-metoxianilino)-N-(4-metoxifenil)sulfonil-1-metilindol-2-carboxamida), que foi selecionado na busca farmacofórica; e sobreposição tridimensional do mesmo (cor cinza) com o nematicida fluazaindolizina (cor roxa).	139
Figura 44 - Alinhamento 3D entre as subunidades monoméricas de FBPases procedentes de diferentes espécies de organismos e as subunidades da enzima 6LW2, que foi selecionada na busca farmacofórica (cor verde). O sítio catalítico é indicado por um “X” de cor preta. A região alostérica é indicada por o retângulo preto. 7NS5 (cinza, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>), 2GQ1 (magenta, <i>Escherichia coli</i>), 1DCU (azul, <i>Pisum sativum</i>), 5OEZ (vermelho, <i>Leishmania major</i>), 1FSA (amarelo, <i>Sus scrofa</i>).	141
Figura 45 - Alinhamento global entre as sequências de FBPases de <i>M. graminicola</i> e <i>M. enterolobii</i> com as sequências das enzimas usadas como templates: 2F3B e 1NUW. A direita, alinhamento** 3D entre a FBPase 2F3B (cor magenta) e dois dos modelos selecionados pelo GalaxyWeb para a sequência CAD2178941: GAL1 (verde), GAL2 (laranja).....	144
Figura 46 - Alinhamento 3D entre a enzima da busca farmacofórica 6LW2 (cor violeta) e alguns dos modelos construídos para as estruturas quaternárias das FBPases de <i>M. graminicola</i> (KAF7639614) e <i>M. enterolobii</i> (CAD2178941).....	146

Figura 47 - Valores de afinidade (kcal/mol) calculados com o uso do software QuickVina v.2.1 para a estrutura mais estável da fluazaindolizina em pH 7,0 (FLUA) e dos ligantes inibidores de FBPase: 2T0, 2T4, 2T6, AMP, EW0, GJO e ROK. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. As barras com mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).....	148
Figura 48 - Resultado qualitativo que mostra a localização da fluazaindolizina (cor cinza) na proteína da busca farmacofórica 6LW2 após ancoramento com o software QuickVina v.2.1. A superfície da enzima foi colorida de acordo com o potencial de lipofilicidade (MLP) de Chimera X v.1.4. De azul é representada a zona mais hidrofílica, enquanto que de cor branca a menos hidrofílica; por outro lado, a zona hidrofóbica foi colorida de cor dourado escuro. De verde o ligante EW0 e de cor magenta o AMP.	149
Figura 49- Representação 3D das interações hidrofóbicas ($\pi-\pi$) entre os anéis indol e 3-metoxibenzeno de dois ligantes EW0 vizinhos.	150
Figura 50 - Representação 3D e 2D dos modos de interação da fluazaindolizina (FLUA) ancorada na enzima 6LW2 através do software QuickVina v.2.1. O resultado teórico é comparado com o experimental obtido para o ligante da busca farmacofórica EW0.	151
Figura 51 - Valores de afinidade (kcal/mol) obtidos com o uso do software AutoDock v.4.2.6 para a estrutura mais estável da fluazaindolizina em pH 7,0 (FLUA) e dos ligantes inibidores de FBPase: 2T0, 2T4, 2T6, AMP, EW0, GJO e ROK. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. As barras com mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).....	152
Figura 52 - Representação 3D e 2D dos modos de interação do ligante inibidor EW0 na FBPase 6LW2 após ancoramento com os softwares QuickVina e AutoDock.....	153
Figura 53 - Representação 3D e 2D dos modos de interação da fluazaindolizina na FBPase 6LW2 após ancoramento com o software AutoDock.....	154
Figura 54 - Sobreposição tridimensional e raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) entre o resultado experimental (cor verde) e o resultado teórico (cor magenta), obtido para os ligantes ROK, 2T0, 2T4, EW0 e GJO através do software QuickVina v.2.1.....	155
Figura 55 - Sobreposição tridimensional e desvio da raiz quadrada média das posições atômicas (RMSD) entre o resultado experimental (cor roxo) e o resultado teórico (cor amarelo) obtido para os ligantes ROK, 2T0, 2T4, EW0 e GJO através do software AutoDock v.4.2.	156
Figura 56 - Valores de afinidade (kcal/mol) registrados para a fluazaindolizina em pH 7,0 (FLUA) e para os ligantes 2T0, 2T4, EW0, GJO e ROK, nas estruturas quaternárias das FBPases CAD2178941 e KAF7639614, através do software QuickVina v.2.1. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).....	158
Figura 57 - Valores de afinidade (kcal/mol) registrados para a fluazaindolizina em pH 7,0 (FLUA) e para os ligantes 2T0, 2T4, EW0, GJO e ROK, nas estruturas quaternárias das FBPases CAD2178941 e KAF7639614, através do software AutoDock v.4.2.6. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).....	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos da fluazaindolizina (Salibro TM) na atividade, mobilidade, infectividade e reprodução de espécies de nematoides parasitas de plantas.	35
Tabela 2 - Características de nematicidas sintéticos antigos (carbofuran: carbamato; fenamifos: organofosforado) e novos (fluopiram, fluensulfona, tiozazafeno e fluazaindolizina).	59
Tabela 3 - Ligantes e proteínas selecionadas durante a busca farmacofórica com o LiSiCa v.1.0.1, na base de dados do LigandExpo de março de 2020 (32.000 small molecules).	70
Tabela 4 - Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas após a busca farmacofórica com o tiozazafeno e que apresentaram escores acima de 200, com uma cobertura maior do que 90%. Os alinhamentos foram feitos com Blastp 2.10.0 ⁺ , no banco de genomas de nematoides (taxid: 315429 e 6301) do National Center for Biotechnology Information – NCBI.	72
Tabela 5 - Hsp90 semelhantes a 3BM9, cujos ligantes foram selecionados para ancoramento nos modelos das Hsp90 produzidas por <i>Heterodera glycines</i> (continua).	78
Tabela 6 - Resultado das modelagens das sequências ACR57216 e AAO14563, que foram selecionadas como possíveis alvos proteicos do tiozazafeno em <i>Heterodera glycines</i> . As sequências foram alinhadas a seus templates para logo calcular os seus valores de raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD).	81
Tabela 7 - Valores de energia das melhores conformações para cada um dos tautômeros da fluazindolizina desprotonada, após busca conformacional por dinâmica molecular (mecânica molecular empregando MMFF94) e subsequente otimização das melhores conformações usando a mecânica quântica (método semi-empírico com o Hamiltoniano PM7).	132
Tabela 8 - Ligantes e enzimas selecionadas na busca farmacofórica com o LiSiCa v.1.0.1, realizada na base de dados do LigandExpo de abril de 2021 (35,000 small molecules).	134
Tabela 9 - Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas na busca farmacofórica com a fluazaindolizina e que apresentaram escores acima de 200 com uma cobertura maior do que 90%. Os alinhamentos foram feitos com o programa Blastp 2.10.0 ⁺ , no banco de genomas de nematoides (taxid 315429 e taxid: 6301) do National Center for Biotechnology Information – NCBI.	135
Tabela 10 - Estrutura tridimensional do ligante EW0 (7-cloro-4-(3-metoxianilino)-N-(4-metoxifenil)sulfonil-1-metilindol-2-carboxamida), que foi selecionado na busca farmacofórica; e sobreposição tridimensional do mesmo (cor cinza) com o nematicida fluazaindolizina (cor roxa).	140
Tabela 11 - Resultado da modelagem das sequências CAD2178941 e KAF7639614, que foram selecionadas como possíveis alvos enzimáticos da fluazaindolizina em <i>Meloidogyne</i> spp. As sequências foram alinhadas a seus templates para calcular os seus valores de raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD).	142

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Nematoides Parasitas de Plantas (NPPs): Visão Geral	21
2.2	Biologia e ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp. e <i>Heterodera</i> spp.	21
2.3	Impacto dos NPPs na Agricultura	23
2.4	Manejo dos NPPs: um Foco em Novos Nematicidas	26
2.4.1	Tioxazafeno: o Nematicida das Sementes.....	27
2.4.1.1	Atividade Nematicida do Tioxazafeno.....	29
2.4.2	Fluazaindolizina: o Nematicida Seletivo	33
2.4.2.1	Atividade Nematicida da Fluazaindolizina	34
2.5	Química Computacional: uma Ferramenta para o Desenvolvimento Racional de Novos Nematicidas.....	36
2.5.1	Desenvolvimento de Produtos Biologicamente Ativos Baseados no Ligante .	37
2.5.2	Modelagem de Proteínas	37
2.5.3	<i>Docking</i> Molecular (Ancoramento Molecular)	38
2.6	Conclusão	40
	REFERÊNCIAS	41
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	54
	ARTIGO 1 - PROTEINA DE CHOQUE TÉRMICO 90 (Hsp90) COMO POSSÍVEL ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS NEMATICIDAS	55
1	INTRODUÇÃO	57
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
2.1	Busca Conformacional e Otimização do Tioxazafeno.....	61
2.2	Seleção de Potenciais Alvos Proteicos através de Busca Farmacofórica.....	61
2.3	Identificação dos Potenciais Alvos Proteicos nos Genomas de NPPs	62
2.4	Seleção de Estruturas 3D de Proteínas do Choque Térmico 90 (Hsp90)	62
2.5	Modelagem 3D das Hsp90 Produzidas por <i>H. glycines</i>	63
2.6	Avaliação da Qualidade Tridimensional de cada Modelo Gerado para as Sequências AAO14563 e ACR57216	65
2.7	Ancoramento Molecular (<i>Docking</i>) nas Hsp90 não Produzidas por <i>H. glycines</i> e nos Modelos Construídos para as Sequências AAO14563 e ACR57216.....	65
2.8	Busca por Compostos que Possam Ligar-se mais fortemente às Hsp90 Modeladas a Partir das Sequências AAO14563 e ACR57216	67
2.9	Análise estatística.....	68

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1	Busca conformacional e farmacofórica	69
3.2	Análise das Proteínas nos Genomas dos Principais NPPs	71
3.3	Seleção de Estruturas Tridimensionais de Proteínas do Choque Térmico (Hsp90)	77
3.4	Modelagem e Avaliação dos Modelos Tridimensionais das Hsp90 Produzidas por <i>Heterodera glycines</i>: AAO14563 e ACR57216	80
3.5	<i>Docking</i> Molecular nas Hsp90 não Produzidas por NPPs	85
3.6	<i>Docking</i> Molecular nas Hsp90 Modeladas a Partir das Sequências AAO14563 e ACR57216, Contendo o Segmento ATP-<i>lid</i> em Estado Fechado	96
3.7	<i>Docking</i> Molecular nas Hsp90 Modeladas a Partir das Sequências AAO14563 e ACR57216, contendo o Segmento ATP-<i>lid</i> em Estado Aberto	99
3.8	Busca por Compostos que Possam Ligar-se Mais Fortemente às Hsp90 Modeladas a Partir das Sequências AAO14563 e ACR57216	102
4	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	107
	ARTIGO 2 - FLUAZAINDOLIZINA: UMA ABORDAGEM <i>IN SILICO</i> NA IDENTIFICAÇÃO DE SEU POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO.	118
1	INTRODUÇÃO	120
2	MATERIAIS E MÉTODOS	123
2.1	Busca Conformacional e Otimização da Fluzaindolizina	123
2.2	Seleção de Potenciais Alvos Proteicos Através de Busca Farmacofórica	124
2.3	Identificação dos Potenciais Alvos Proteicos no Genoma de NPPs	124
2.4	Seleção de Estruturas 3D de Enzimas FBPases	125
2.5	Modelagem 3D das FBPases Produzidas por <i>M. enterolobii</i> e <i>M. graminicola</i>	125
2.6	Avaliação da Qualidade Tridimensional dos Modelos Gerados para as Sequências: CAD2178941 e KAF7639614	127
2.7	Construção das Estruturas Quaternárias das FBPases Modeladas a Partir das Sequências: CAD2178941 e KAF7639614	127
2.8	Ancoramento Molecular (<i>Docking</i>) Nas FBPases Não Produzidas por Nematoides	128
2.9	Determinação da Energia de Afinidade nas Estruturas Quaternárias das FBPases Produzidas por <i>M. graminicola</i> (KAF7639614) e <i>M. enterolobii</i> (CAD2178941)	130
2.10	Análise Estatística	130
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
3.1	Busca Conformacional e Farmacofórica	131
3.2	Análise das Proteínas nos Genomas dos Principais NPPs	134

3.3	Seleção de Estruturas Tridimensionais de Enzimas FBPases Similares a 6LW2.....	139
3.4	Modelagem e Avaliação dos Modelos Tridimensionais das FBPases Produzidas por <i>M. graminicola</i> (KAF7639614) e <i>M. enterolobii</i> (CAD2178941).....	142
3.5	Construção dos homotetrâmeros das FBPases de <i>M. graminicola</i> e <i>M. enterolobii</i>	145
3.6	<i>Docking</i> Molecular nas FBPases Não Produzidas por NPPs.....	146
3.7	Afinidade Molecular Pelas FBPases Modeladas a Partir das Sequências: CAD2178941 de <i>M. enterolobii</i> e KAF7639614 de <i>M. graminicola</i>	157
4	CONCLUSÕES.....	159
	REFERÊNCIAS.....	160

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

De acordo com as projeções das Nações Unidas, a população mundial alcançará 8,5 bilhões de habitantes no ano de 2030 (DESA, U. N. 2019). Em decorrência, o Banco Mundial prevê que a demanda por alimentos inevitavelmente aumentará entre 60-80% (HOLTAPPELS et al., 2021). Embora a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) tenha como objetivo resolver todo o problema da fome mundial até o ano de 2030, o certo é que a segurança alimentar tem diminuído desde o ano de 2015 (MOK; TAN; CHEN, 2020). Dentre os vários fatores que contribuem para desestabilizar a produção mundial de alimentos, cabe destacar aqui as pragas agrícolas e, mais recentemente, a pandemia de COVID-19, causada por SARS-CoV-2 (GU; WANG, 2020; IRELAND et al., 2020). Segundo a FAO, as pragas e doenças de plantas são responsáveis por 40% da perda na produção mundial de alimentos, o que corresponde a mais de US\$220 bilhões por ano (FAO, 2021). Portanto, lidar com as pragas e doenças de plantas é crucial para se conseguir maior sustentabilidade agrícola, principalmente em uma era pós-pandemia.

Embora os microrganismos desempenhem um papel muito importante na agricultura, o certo é que muitos deles agem como fitopatógenos que reduzem significativamente a produção agrícola (LINDSEY; MURUGAN; RENITTA, 2020; PATIL, 2020). Dentre esses microrganismos se encontram os nematoides parasitas de plantas (NPPs), que afetam negativamente o desempenho produtivo de milhares de espécies vegetais (PAN et al., 2016). Existem cerca de 4100 espécies de NPPs, aos quais se atribuem perdas do rendimento produtivo agrícola acima de US\$100 bilhões por ano no mundo todo (KARURI, 2022).

Muitas culturas de importância econômica e comercial como o arroz, a batata, o tomate, o milho, a banana, a soja, entre outras, são vítimas permanentes de ataques por NPPs (SINGH; SINGH; SINGH, 2015). Embora existam muitas espécies de nematoides que podem atacar essas culturas, são poucas as que se associam com perdas econômicas significativas. Em linhas gerais, as mais danosas são aquelas espécies pertencentes aos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Globodera*, que são as responsáveis por 90% das perdas agrícolas mundiais causadas por NPPs (ABD-ELGAWAD; ASKARY, 2015). Para exemplificar é possível citar a espécie *Heterodera glycines* (Ichinohe) que tem forte impacto econômico na agricultura dos Estados Unidos e do Brasil por afetar uma das culturas mais importantes para a produção mundial de proteína e carboidratos: a soja. Atualmente, o Brasil lidera a produção mundial de soja, com mais de 114 milhões de toneladas produzidas por ano, seguido pelos Estados Unidos com 97 milhões de toneladas por ano (COLUSSI; SCHNITKEY, 2021;

FIGUEIREDO et al., 2021). Somente nos Estados Unidos, as perdas econômicas causadas por *H. glycines* excedem US\$ 1,2 bilhão por ano (SHAIBU et al., 2020).

Métodos químicos, combinados com práticas agrícolas de manejo integrado de pragas e doenças de plantas, têm sido a principal forma de controle de NPPs (PAN et al., 2016). Os métodos químicos são os mais eficientes e, portanto, os mais amplamente difundidos no manejo de NPPs. No entanto, muitos dos produtos químicos empregados são altamente nocivos para a saúde humana e ambiental, como é o caso de carbamatos, organofosforados, halogenetos orgânicos, piridinilmetilbenzamidias, entre outros (GANGULY et al., 2021). As atuais políticas de regulamentação ambiental reduziram drasticamente o arsenal de nematicidas disponíveis para o controle dos NPPs, o que aumentou a demanda por novos compostos menos tóxicos e mais compatíveis com as políticas voltadas para a agricultura sustentável. Em decorrência, vários nematicidas foram lançados no mercado nos últimos anos. Esse é o caso, por exemplo, do tioxazafeno (3-fenil-5-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol) e da fluazaindolizina (8-cloro-*N*-(2-cloro-5-metoxifenil)sulfonil-6-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridino-2-carboxamida), que são considerados nematicidas de nova geração, já que apresentam menores toxicidades para mamíferos, sugerindo assim que tenham mecanismos de ação diferentes daqueles observados para os outros nematicidas comerciais. Entretanto, como tais mecanismos ainda não foram elucidados, é imprescindível que se estude os modos de ação do tioxazafeno e da fluazaindolizina, pois além dos dados obtidos poderem contribuir para planejar os usos adequados de tais produtos e minimizar eventuais efeitos indesejados em organismos não alvo, também poderão contribuir para o desenvolvimento futuro de novos nematicidas mais eficientes.

Em decorrência do exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo geral identificar, através de métodos *in silico*, os alvos enzimáticos do tioxazafeno e da fluazaindolizina em NPPs de importância agrícola. Para tanto, os objetivos específicos foram: a) identificar ligantes de proteínas que sejam farmacoforicamente semelhantes ao tioxazafeno e à fluazaindolizina; b) dentre as proteínas cujos ligantes tiverem sido selecionados na busca farmacofórica, selecionar aquelas cujas sequências de aminoácidos forem similares a sequências de aminoácidos nos genomas dos principais NPPs de importância agrícola; c) calcular as afinidades do tioxazafeno e da fluazaindolizina pelas proteínas selecionadas para as comparar aos valores calculados para inibidores das mesmas proteínas; d) modelar as sequências de aminoácidos produzidas por NPPs em estudo e que forem similares às sequências de aminoácidos das proteínas pelas quais o tioxazafeno e a fluazaindolizina tiverem apresentado mais afinidades; e) calcular as afinidades do tioxazafeno e da

fluazaindolizina pelas estruturas tridimensionais modeladas a partir das sequências de aminoácidos dos NPPs em estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nematoides Parasitas de Plantas (NPPs): Visão Geral

Os NPPs são organismos microscópicos, onipresentes, que habitam o solo e os tecidos vegetais. Embora não sejam capazes de percorrer longas distâncias, os movimentos antropogênicos podem fazer com que eles sejam transportados através do material vegetal, solo e maquinaria agrícola contaminada (ABD-ELGAWAD; ASKARY, 2015). Além de bloquear o suprimento de nutrientes absorvidos pelas raízes das plantas, os NPPs também podem fazer com que as plantas sejam mais suscetíveis aos ataques por bactérias, vírus e fungos fitoparasitas (KHANNA et al., 2021).

Muitos dos NPPs de importância agrícola pertencem à ordem Tylenchida, da qual fazem parte os endoparasitas migradores da família Heteroderidae e Pratylenchidae. A família Heteroderidae abrange os gêneros de maior impacto na agricultura, os quais são conhecidos como os nematóides do cisto (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.), e os nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.). Por outro lado, a família Pratylenchidae, contém o gênero *Pratylenchus*, o qual acolhe mais de 60 espécies conhecidas como nematóides da lesão das raízes. Em geral, todas as espécies contidas nesses gêneros são capazes de infectar mais de 3,000 espécies diferentes de plantas, o que faz deles um problema de relevância mundial (AHUJA; SOMVANSHI, 2020; ALI et al., 2017).

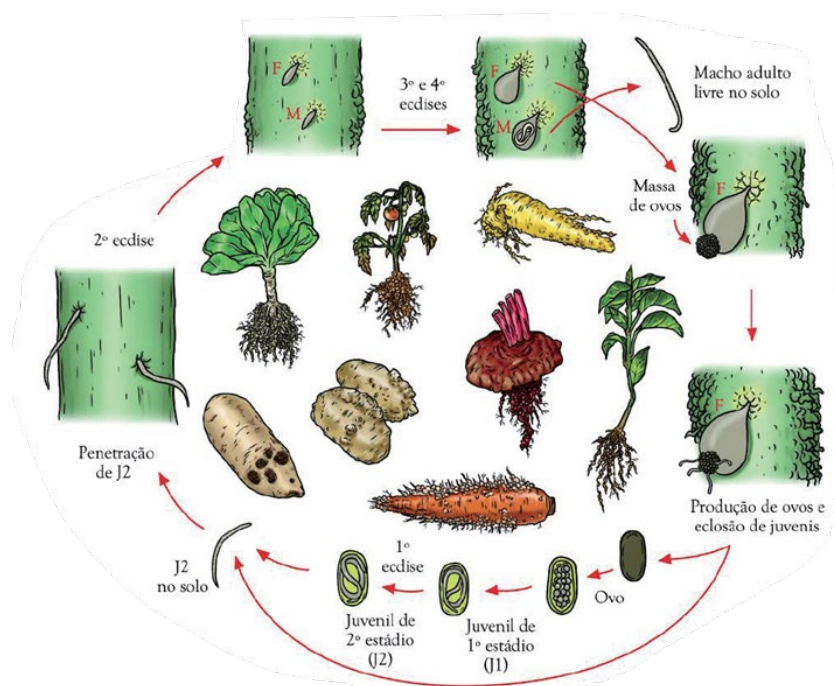
Uma das principais características que diferenciam os nematoides de vida livre daqueles fitopatogênicos (NPPs), é o fato desses últimos apresentarem um estilete oco e prostrátil com o qual perfuram as paredes celulares das plantas para se alimentarem. Nesse processo os NPPs injetam produtos poliméricos ou não, que digerem os componentes citoplasmáticos ou que modificam a fisiologia e morfologia da célula hospedeira (IBRAHIM et al., 2019). Uma bomba muscular nos nódulos basais (metacarpo) fornece a força para o nematoide se alimentar do conteúdo celular. Dependendo do nematoide e da espécie de planta, a relação hospedeiro-parasita pode ser muito complexa, com uma série de eventos de reconhecimento e resposta (MATEILLE et al., 2020). Embora os detalhes desses processos não estejam completamente elucidados, constituem-se alvos-chaves na abordagem para o desenvolvimento racional de novos nematicidas.

2.2 Biologia e ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera* spp.

Os nematoides endoparasitas sedentários dos gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera*, residem a maior parte de seu ciclo de vida no interior das raízes das plantas. Durante esse

processo, e até chegar ao estágio adulto, passam por uma série de quatro estádios juvenis (J1-J4) separados por mudas que envolvem a troca da cutícula (MANDAL et al., 2021). O estágio infeccioso é o J2, que é móvel e penetra nas raízes através da zona de alongação, para logo subir pelos tecidos vasculares das plantas até estabelecer um local de alimentação permanente. No caso dos nematoides do cisto, esse local é composto da fusão de células multinucleadas resultantes da dissolução parcial da parede celular (*sincitium*). No caso dos nematóides das galhas esse local é composto de células gigantes (5 a 7 células) que, junto com a proliferação dos tecidos vegetais ao redor do nematoide, formam as galhas tipicamente reconhecidas como sintomas da infecção (Figura 1). O estabelecimento de locais de alimentação (*sincitium* e células gigantes) permite que os nematoides do cisto e das galhas retirem grandes quantidades de nutrientes da planta, o que induz uma alocação patológica que perturba a produção de produtos fotossintéticos com perda do crescimento e do rendimento das plantas (BOHLMANN, 2015; ESCOBAR et al., 2015).

Figura 1 - Representação gráfica do ciclo de vida do nematoide das galhas: *Meloidogyne* spp.



Fonte: Pinheiro (2017).

Após iniciado o processo de alimentação, os nematoides se tornam sedentários e se desenvolvem até assumir o estágio adulto. As fêmeas adultas são bulbosas e não moveis; e

dependendo das condições ambientais e da espécie, a produção de ovos pode ter início três semanas após a infecção (SIDDIQUE; GRUNDLER, 2018). Assim como as fêmeas, os machos também passam por um estágio de desenvolvimento imóvel, mas recuperam a motilidade durante a terceira muda, antes de deixarem a raiz (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996). O sexo é determinado epigeneticamente, sendo o aumento do número de machos observado quando as condições de alimentação são adversas (ANJAM et al., 2020).

Em *Meloidogyne* spp. as fêmeas produzem centenas de ovos que são depositados em uma matrix gelatinosa, que se projeta da superfície da raiz, e cuja função é proteger os ovos contra a dessecação e o ataque microbiano (ESCOBAR et al., 2015). Quanto aos ovos dos nematoides do cisto, costumam sobreviver anos em um estágio dormente, no corpo morto da fêmea adulta (cisto), que serve como proteção contra os fatores de estresse abiótico e biótico (VARANDAS; EGAS; CONCEIÇÃO, 2020).

2.3 Impacto dos NPPs na Agricultura

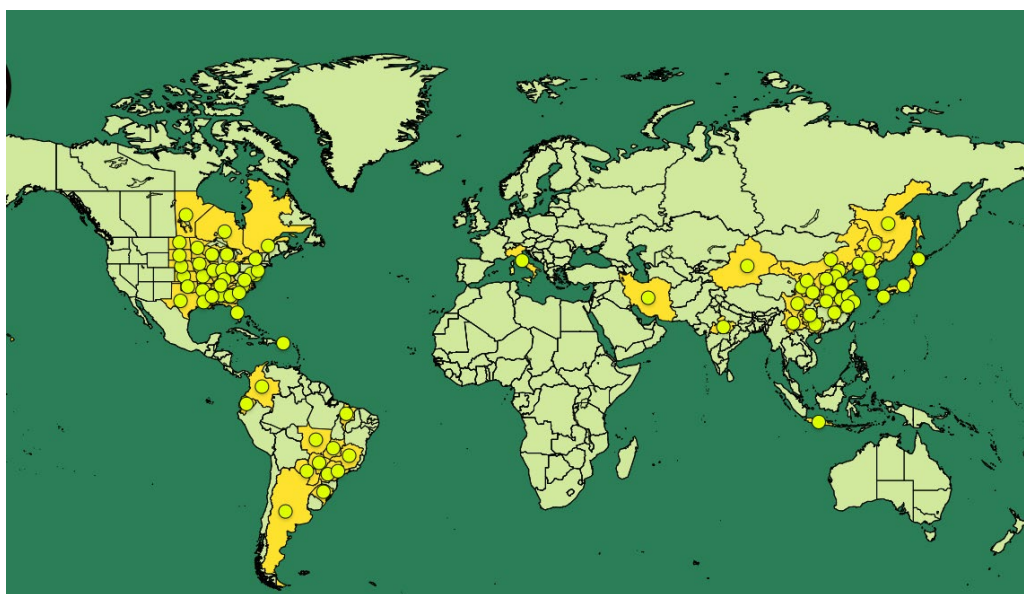
Embora haja aproximadamente 4,100 espécies de NPPs descritas, só um pequeno grupo dessas espécies tem impacto econômico na produção agrícola mundial. Coletivamente, geram perdas econômicas acima de US\$100 bilhões por ano, o que representa um problema para a segurança alimentar de todo o planeta (BERNARD; EGNIN; BONSI, 2017; PULAVARTY et al., 2021). Aparentemente, a perda real é ainda maior, pois muitos produtores, principalmente em países em desenvolvimento, desconhecem a existência dos NPPs, o que, em parte, ocorre porque o diagnóstico de danos relacionados aos nematoides costuma ser difícil devido à falta de sintomas específicos. Em plantações adensadas, por exemplo, as áreas amarelo-claras com murcha e raquitismo, causadas por NPPs, são com frequência associadas a problemas de doenças nas raízes causadas por outros patógenos veiculados pelo solo (JONES et al., 2013).

De todas as espécies de NPPs, as mais bem-sucedidas são sedentárias, que estabelecem um local de alimentação permanente dentro da planta hospedeira. Isso é possível porque tais nematoides desenvolveram um método fascinante e complexo de transformação da célula hospedeira, o que resulta no desenvolvimento de uma estrutura alimentar sustentável (BERNARD; EGNIN; BONSI, 2017).

No Brasil os gêneros mais importantes de NPPs são: *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Rotylenchulus*, *Radopholus*, *Tylenchulus*, *Xiphinema* e *Pratylenchus*. Todos eles estão associados a perdas econômicas acima de R\$35 bilhões por ano (MARQUES et al., 2019). *Meloidogyne* spp. e *Heterodera* spp., são os NPPs mais prejudiciais para a agricultura

mundial, causando perdas da ordem de US\$80 bilhões por ano. O gênero *Meloidogyne* contém mais de 100 espécies, sendo *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, *Meloidogyne arenaria* Neal, *Meloidogyne hapla* Chitwood, *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield, e *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback as espécies de maior impacto no Brasil e no mundo todo. Quanto ao gênero *Heterodera*, *H. glycines* é o principal nematoide do cisto prevalente no Brasil (Figura 2).

Figura 2 - Mapa de distribuição geográfica do nematoide do cisto: *Heterodera glycines*. As áreas e os círculos de cor amarelo correspondem às regiões do mundo nas quais o nematoide está atualmente presente.



Fonte: EPPO *Global Database* (2022).

Meloidogyne spp. e *Heterodera* spp. podem ocorrer em uma ampla variedade de tipos de solo, mas suas associações com danos às culturas são marcadamente evidentes em solos arenosos ou com manchas arenosas no seu interior. Embora sejam muitas as cultivares suscetíveis a esses nematoides, só algumas constituem relevada importância para a produção mundial de alimentos. Assim por exemplo, os cereais, que ocupam mais de 75% da terra destinada para culturas alimentares, são as culturas mais afetadas por esses nematoides (DABABAT; FOURIE, 2018).

Após Estados Unidos e China, Brasil é o terceiro país com maior produção de grãos do mundo. Segundo a FAO, no ano de 2020 o Brasil produziu 123 milhões de toneladas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill.), o que correspondeu a um aumento de 8% em relação à produção

de soja no ano 2019 (114 milhões de toneladas). De forma similar, as produções de milho (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) e trigo (*Triticum aestivum* L.), também aumentaram (FAOSTAT, 2020: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>). Acredita-se que a produção brasileira poderia ser maior, caso as perdas causadas por NPPs pudessem ser reduzidas. No caso da produção de soja, por exemplo, estima-se que 10% é afetada negativamente por *Meloidogyne* spp.; enquanto 30% é danificada pela presença de *H. glycines* (MELLO et al., 2017). Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Tocantins, Maranhão e Bahia, são os estados mais afetados por esses nematoides, com perdas econômicas acima de R\$ 16,2 bilhões por ano (FAVORETO et al, 2019). Em outros países produtores de grãos como Austrália, Índia, Turquia, Iran e Arábia Saudita, as perdas superam 40% da produção anual (LI et al., 2020; TOUMI et al., 2018). No Canadá, Estados Unidos e México, as perdas variam de 15% a 60% da produção anual (BRIAR; SHRESTHA; REDDY, 2018; POTTER; MCKEOWN, 2003).

Os tubérculos são outro grupo importante de culturas fortemente afetado pelos NPPs. A batata (*Solanum tuberosum* L.) é o terceiro alimento mais consumido no mundo após o arroz e o milho (DEVAUX; KROMANN; ORTIZ, 2014). É uma cultura fundamental para a segurança alimentar de milhões de pessoas na América do Sul, África e Ásia. Segundo a FAO, 359 milhões de toneladas foram produzidas no mundo todo no ano de 2020. Só no Brasil foram produzidas, nesse mesmo ano, 4 milhões de toneladas de batata (FAOSTAT, 2020). Na África do Sul se estima uma diminuição de mais de 11% no rendimento comercializável desse tubérculo por causa de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. graminicola* e *M. enterolobii* (JONES et al., 2017; SCURRAH; NIERE; BRIDGE, 2005). Na Nigéria, foram observadas reduções no rendimento de tubérculos de até 20% após a infecção com *M. incognita* (OKECHALU; WONANG, 2015). No Brasil, os nematoides mais comuns na cultura da batata são os das galhas (*Meloidogyne* spp.) e das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.), os quais em conjunto geram perdas do rendimento produtivo da batata de até 12% (PINHEIRO; DA SILVA; PEREIRA, 2016).

Os NPPs também afetam as culturas hortícolas, cuja importância é de abrangência mundial, principalmente em regiões tropicais, já que dependendo do solo e do clima, as vezes se torna praticamente impossível a produção de hortaliças na presença desses micro-organismos. No Brasil a presença de NPPs nas principais culturas hortícolas é intensificada pela existência de grandes áreas cultivadas; pela localização dessas áreas em regiões urbanas e periurbanas, o que facilita o transporte dos NPPs através das pessoas, máquinas e animais; e

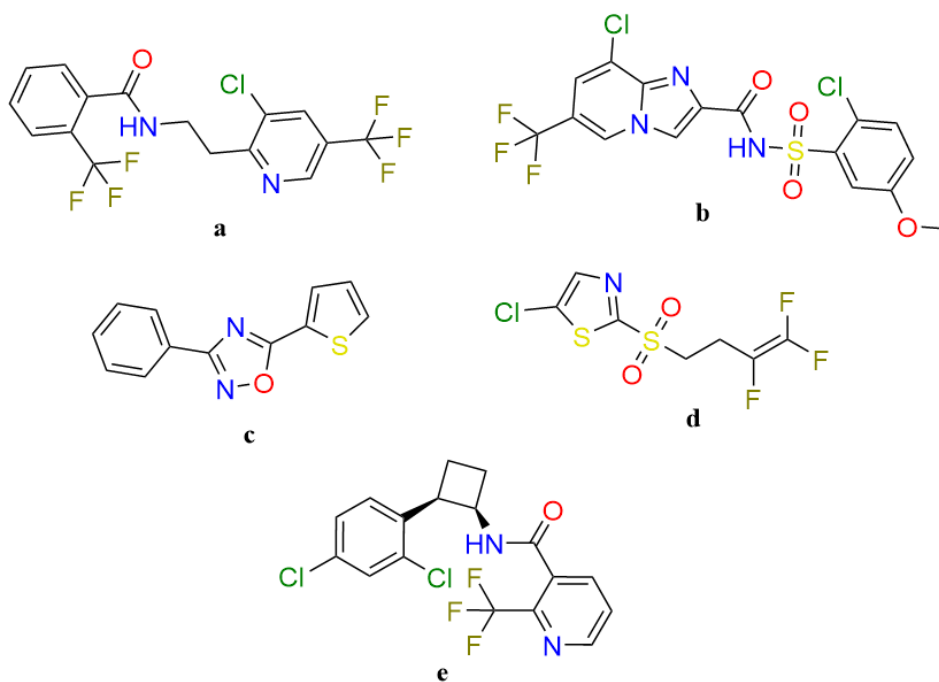
pela falta de cultivares resistentes. As perdas do rendimento das principais culturas hortícolas (fruticultura, olericultura e floricultura) são estimadas em 12% para frutas e nozes, 11% para hortaliças herbáceas e 10% para culturas ornamentais, o que representa uma perda de R\$ 5 bilhões por ano (PINHEIRO, 2017; LOPES; PINHEIRO; GUIMARÃES, 2019).

2.4 Manejo dos NPPs: um Foco em Novos Nematicidas

Embora a resistência genética e rotação de culturas sejam utilizadas no controle dos NPPs (POVEDA; ABRIL-URIAS; ESCOBAR, 2020), o método historicamente mais utilizado corresponde ao emprego de nematicidas químicos fumigantes e não fumigantes, já que vários desses produtos são economicamente viáveis e de fácil aplicação (ZASADA et al., 2010). Quase a metade do mercado global de nematicidas, que corresponde a US\$ 1 bilhão por ano, é usado para o controle de espécies dos gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera* (WRAM; ZASADA, I.A., 2019). No entanto, com o aumento dos requisitos da segurança alimentar e de proteção ambiental, vários nematicidas não são mais considerados adequados para a agricultura moderna, pois há vários dados que demonstram a elevada toxicidade dos mesmos para o ambiente como um todo. Por exemplo, o uso do brometo de metila e do dibromocloropropano são atualmente proibidos para o controle dos NPPs (SHARMA et al., 2020; TAYLOR, 1994). Tanto os organofosforados quanto os carbamatos, que atuam como inibidores da acetilcolinesterase, são altamente tóxicos para vários outros organismos (COSTA et al., 2008). Conseqüentemente, vários desses nematicidas têm sido eliminados do mercado ou estão sob uso restrito (SITHOLE et al., 2021). Além disso, o uso constante de vários nematicidas tem acarretado o surgimento de populações de nematoides resistentes a tais produtos, o que exacerba ainda mais a dificuldade de controle dos NPPs (D'ERRICO et al., 2017).

Em decorrência da demanda por novos nematicidas, nos últimos dez anos surgiram produtos como: fluopiram (Velum Prime®), fluensulfona (Nimitz®), fluazaindolizina (Salibro™), tioxazafeno (NemaStrike™) e, mais recentemente (2021), a Syngenta lançou no mercado o TYMIRIUM™, que se trata de um nematicida para sementes baseado no ingrediente ativo: cyclobutrifluram (Figura 3; CASTILLO; OZORES-HAMPTON; NAVIA GINE, 2017; LAHM et al., 2017; WALKER, D. P. et al., 2019). Destes novos nematicidas não fumigantes, apenas o fluopiram tem um mecanismo de ação conhecido sobre os NPPs (FASKE; HURD, 2015).

Figura 3 - Estruturas 2D de novos nematicidas comerciais: (a) fluopiram (N-[2-[3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il]etil]-2-(trifluorometil)benzamida); (b) fluazaindolizina (8-cloro-N-(2-cloro-5-metoxifenil)sulfonil-6 (trifluorometil)imidazo[1,2a]piridina-2-carboxamida); (c) tiofazafeno(3-fenil-5-tiofen-2-il-1,2,4-oxadiazol); (d) fluensulfona (5-cloro-2-(3,4,4-trifluorobut-3-enilsulfonil)-1,3-tiazol); (e) ciclobutrifluram (N-[(1R,2R)-2-(2,4-diclorofenil)ciclobutil]-2 (trifluorometil)piridina-3-carboxamida).



Fonte: Do autor (2022).

2.4.1 Tiofazafeno: o Nematicida das Sementes

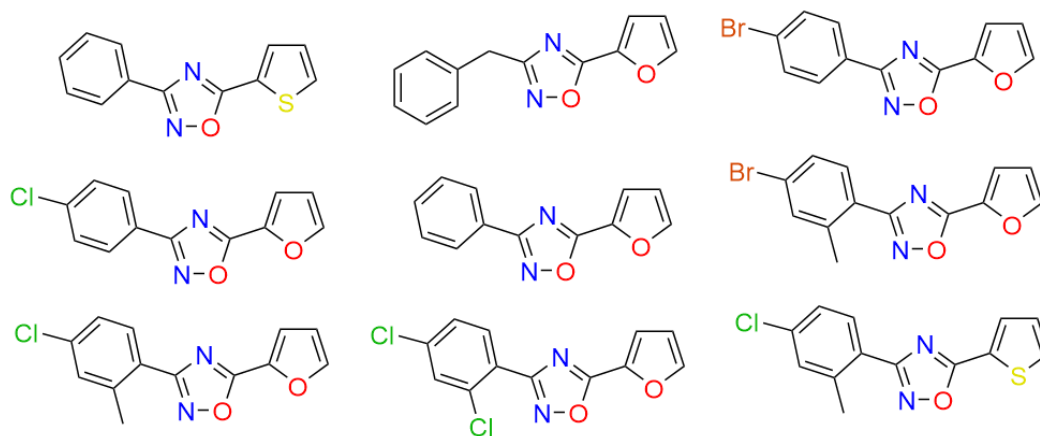
O tiofazafeno (3-fenil-5-tiofen-2-il-1,2,4-oxadiazol) é um novo nematicida de amplo espectro, desenvolvido pela companhia Monsanto para o controle de NPPs em sementes de milho, soja e algodão, cujo mecanismo de ação ainda não é conhecido (ZHANG, R. et al., 2020). Os esforços que levaram a sua descoberta começaram com uma série de compostos que incluíam estilbenos, chalconas e derivados do azobenzeno (serie ECA), os quais apresentaram, em estudos *in vitro*, atividade nematicida de amplo espectro contra nematoides parasitas de plantas e contra nematoides de vida livre como *Caenorhabditis elegans* (Maupas) Dougherty. No entanto, estudos em casa de vegetação e em campo revelaram sérias dificuldades para seus usos como nematicida, já que suas eficiências não eram satisfatórias.

Modificações no núcleo da estrutura química eram necessárias para superar as dificuldades observadas nos estudos *in vivo*, o que foi feito através de um método de *scaffold hop* (BÖHM; FLOHR; STAHL, 2004) distinto do empregado na série de compostos ECA (SLOMCZYNSKA et al., 2015). Para reduzir o tempo e as despesas da triagem de dezenas de

milhares de compostos em ensaios *in vitro*, métodos *in silico* foram empregados na triagem inicial (LI; SHAH, 2017). É comum que nessas abordagens a estrutura 3D da proteína alvo seja conhecida. No entanto, na descoberta do tiozazafeno nenhuma estrutura alvo nos NPPs era conhecida. Portanto, foi necessário construir um novo nematocida a partir de um modelo baseado na estrutura do ligante. Na elaboração desse modelo, do qual surgiu o tiozazafeno, uma busca farmacofórica foi feita em biblioteca de mais de 4 milhões de compostos disponíveis comercialmente. Após classificação e pontuação dos resultados da triagem virtual, só 477 compostos foram selecionados para a próxima etapa, que correspondeu a ensaios biológicos rápidos, *in vitro*, com nematóides tais como: *C. elegans*, *M. incognita* e *H. glycines*. 14% desses compostos (67 em 477) foram ativos contra *H. glycines* e *M. incognita* na concentração de 40 µg/mL. Nos ensaios *in vivo*, em casa de vegetação, só 23 dos 67 compostos inicialmente selecionados foram capazes de reduzir em 50% o surgimento de galhas em plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.). Os resultados desses ensaios revelaram que havia problemas relacionados à atividade e longevidade de cada composto no solo.

Após uma série de iterações e refinamentos do modelo, um grupo de compostos análogos de oxadiazóis foram selecionados por serem altamente ativos contra *M. incognita* e *H. glycines* (Figura 4). Modificações estruturais do anel oxadiazólico, seguidas de ensaios *in vitro*, revelaram que certas características estruturais favoreciam a atividade nematocida dos compostos (grupo fenil na posição 3' e um grupo 2-tiofenil ou 2-furanil na posição 5'). Daí emergiu o tiozazafeno, que conjugava eficácia intrínseca, longevidade em solo, baixa toxicidade e acessibilidade sintética.

Figura 4 - Estruturas 2D de algumas substâncias provenientes de modificações estruturais feitas no anel do 1,2,4-oxadiazol, que foram ativas em ensaios *in vitro* com *Heterodera glycines* (EC50 20 µg/mL) e *in vivo* com *Meloidogyne incognita* (2,0 kg/ha em casa de vegetação).



Fonte: Adaptado de Slomczynska (2015).

2.4.1.1 Atividade Nematicida do Tioxazafeno

Os compostos heterocíclicos têm sido amplamente utilizados no desenho de medicamentos e drogas. Entre esses compostos, há os derivados 1,2,4-oxadiazólicos, que exibem uma ampla gama de atividades biológicas como: herbicida, antibacteriana, antifúngica e inseticida, dentre outras (DHAMELIYA et al., 2022; JALHAN et al., 2017). O tioxazafeno é um representante desses compostos, que tem demonstrado propriedades nematicidas superiores às de outros nematicidas de uso comercial (Temik®, Furadan®, Nematicur®, Nemathorin® etc.). Conseqüentemente, os testes em geral têm demonstrado que o tioxazafeno pode proteger eficientemente os cultivares de algodão, soja e milho, de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera* spp. (Figura 5).

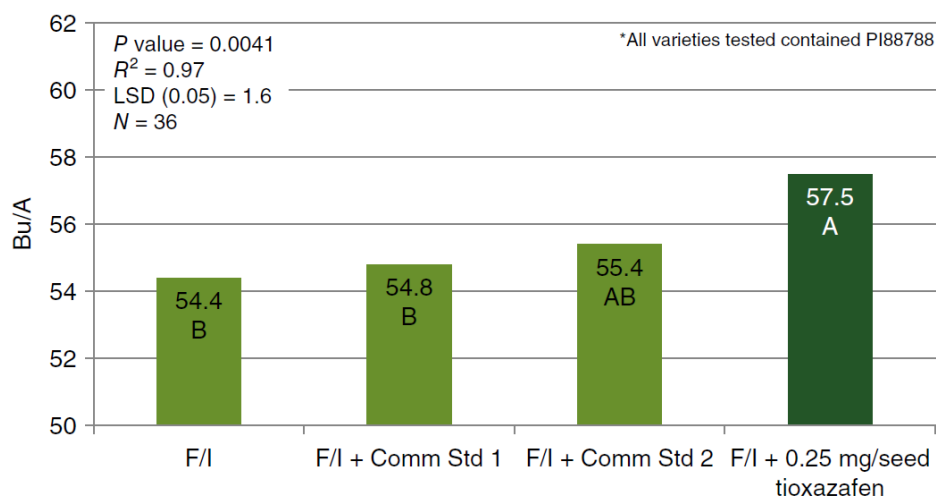
Figura 5 - Percentagem de redução média de nematoides por tioxazafeno, em comparação com dois nematicidas padrões comercialmente disponíveis no mercado. Os valores descritos representam os resultados em vários ambientes controlados e ensaios de *microplot* em campo.

	Soybean SCN	Corn lesion	Corn/cotton RKN	Cotton reniform
Tioxazafen	72%*	86%	77%	63%
Commercial standard 1	9%	86%	70%	10%
Commercial standard 2	58%	71%	82%	67%

Fonte: Slomczynska (2015).

Em ensaios escalonados em campo, com cultivares de milho e soja, conduzidos pela U.S.A EUP (Experimental Use Permit) em 40 localidades que apresentavam populações de nematoides três vezes maiores do que aquelas necessárias para causar danos economicamente significativos, observou-se que o tioxazafeno incrementava o rendimento produtivo de forma mais eficiente do que as observadas para nematicidas de uso comercial (SOUTH et al., 2019; Figura 6).

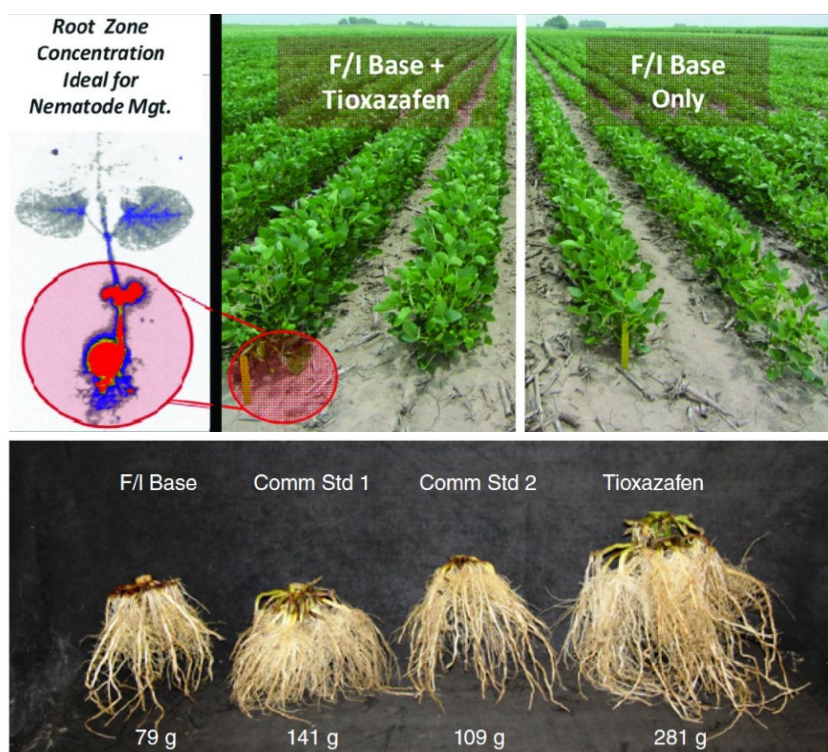
Figura 6 - Produtividade de sementes de soja tratadas com tiozazafeno em ensaios de campo EUP de grande escala, durante a safra 2015 nos EUA. As médias de tratamento com uma letra em comum não são significativamente iguais no nível de significância de 0,05. F/I: fungicida/inseticida base; Comm Std: padrões comerciais; Bu/A: Bushels per acre.



Fonte: South (2019).

Estudos de fitotoxicidade com sementes de soja tratadas com tiozazafeno radiomarcado indicaram que o composto é predominantemente distribuído para a zona radicular e não tem mobilidade ascendente para o tecido vegetativo. As plantas exibiram uma raiz visualmente muito maior do que qualquer um dos padrões comerciais compostos de uma mistura de fungicidas/inseticida base (SLOMCZYNSKA et al., 2015). Além disso, a massa do colmo fresco acima do solo, assim como o seu diâmetro e altura, também foi maior para as plantas de soja tratadas com o tiozazafeno (Figura 7). Essas diferenças de massa, diâmetro e altura são atribuídas à proteção obtida com o tiozazafeno até 74 dias após aplicação do mesmo. Resultados similares foram obtidos em cultivares de milho e algodão, com ganhos de até 117 lbs/acre em relação aos padrões comerciais (SLOMCZYNSKA et al., 2015; WALKER, D. P. et al., 2019; SPARKS et al., 2020).

Figura 7 - Radiograma do tiozazafeno em soja seguida da absorção da semente indicando concentração de composto em uma zona de raiz e seus efeitos na produção radicular após 74 dias de aplicação. F/I: fungicida/inseticida base; Commstd: padrões comerciais.



Fonte: Slomczynska (2015) e South (2019).

Resultados similares foram obtidos por Uzuele (2016) no estado de Mato Grosso, na região centro-oeste do Brasil. Ensaio em casa de vegetação e em campo com sementes de soja, algodão e milho tratadas com o tiozazafeno, mostraram que as plantas foram mais resistentes à infecção por *H. glycines*, *M. javanica*, *M. incognita* e *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven. As melhores doses observadas foram de 0,250 mg/semente para o controle de *M. javanica* e *P. brachyurus* em soja; 0,500 mg/semente no controle de *H. glycines* e *M. incognita* em cultivares de soja e milho, respectivamente; e 0,750 mg/semente para o controle de *M. incognita* em cultivares de algodão. Segundo Slomczynska *et al* (2015), efeitos de fitotoxicidade não foram registrados em nenhum dos cultivares. Consequentemente, conclui-se que o tiozazafeno é eficiente no tratamento de sementes para o controle de NPPs em cultivares de soja, milho e algodão no Brasil, com baixos riscos de fitotoxidez.

Embora sejam conhecidos os efeitos nematicidas do tiozazafeno, ainda não se conhece quais seriam seus possíveis mecanismos de ação. Caracterizações fenotípicas sobre NPPs e nematoides de vida livre como *C. elegans*, na presença do tiozazafeno, indicam um

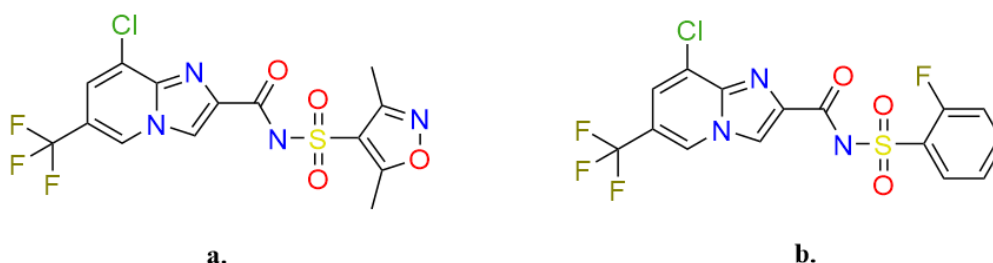
mecanismo de ação distinto daqueles conhecidos para outros nematicidas. Ensaios de mutagênese extensiva em *C. elegans* resultou em populações resistentes a concentrações elevadas de tioxazafeno. O mapeamento de nucleotídeos e o sequenciamento revelaram que esses mutantes apresentavam mutações dentro de genes que codificam proteínas que participam da transdução e arranjo de proteínas (SOUTH et al., 2019).

2.4.2 Fluazaindolizina: o Nematicida Seletivo

Corteva Agriscience™, uma divisão agrícola da companhia DowDuPont (antiga DuPont Crop Protection), descobriu e desenvolveu o Salibro™, baseado na nova substância ativa fluazaindolizina (Reklemel™ Active). É o primeiro membro da nova classe química de nematicidas *N*-fenilsulfonilimidazopiridina-2-carboxamida (sulfonamida) (LAHM et al., 2017).

Através de uma triagem de alto rendimento (HTS por suas siglas em inglês) de uma biblioteca interna de compostos contra nematoides das galhas, foram identificadas sulfonamidas ativas em concentrações abaixo 500 µg/mL (Figura 8). Embora as suas atividades *in vitro* tenham sido muito boas, observaram-se efeitos fitotóxicos nos ensaios *in vivo*. A partir de então, teve início o trabalho com o duplo objetivo de maximizar a atividade nematicida e de reduzir os efeitos tóxicos para as plantas (LAHM et al., 2017).

Figura 8 - *N*-fenilsulfonilimidazopiridina-2-carboxamidas ativas contra *Meloidogyne* spp. e que deram origem à fluazaindolizina. (a) 8-cloro-*N*-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)sulfonil)-6-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxamida; (b) 8-cloro-*N*-((2-fluorofenil)sulfonil)-6-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxamida.



Fonte: Do autor (2022).

Após testar diferentes análogos de uma série de arilsulfonamidas 2,5-dissubstituídas com: Me, OMe, OEt, SMe, SO₂Me, OCF₂H, OCF₃, ciano, nitro, carbometóxi e dimetilamino, em uma variedade de estudos que avaliavam atributos toxicológicos e ambientais, a fluazaindolizina foi selecionada. As suas propriedades físico-químicas lhe conferem um bom equilíbrio em termos de mobilidade no solo ($K_{foc}=128$) e propriedades residuais (DT₅₀ 35 dias) na zona radicular do solo. É compatível com uma variedade de métodos de aplicação como irrigação por gotejamento, aspersão de leito, microjato, encharcamento pré-plantio, aplicações em sulcos e incorporação ao solo. Agronomicamente, tem um ajuste em uma variedade de culturas, incluindo hortaliças frutíferas e cucurbitáceas, tubérculos (cenoura, batata-doce, batata), soja, cana-de-açúcar, café, milho, cítricos, nozes, frutas de caroço e uvas (GROOVER; LAWRENCE, 2021).

2.4.2.1 Atividade Nematicida da Fluazaindolizina

A fluazaindolizina tem sido extensivamente testada em laboratórios, ensaios em casa de vegetação, microparcels e em campo na América do Norte, América do Sul, Europa e na Ásia. Nestes ensaios a fluazaindolizina provou ser extremamente eficaz contra uma ampla variedade de espécies de nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.), e outros importantes nematoides parasitas de plantas, como: *Rotylenchulus reniformis* (Linford) Oliveira, *Xiphinema* spp., *Helicotylenchus* spp. e algumas espécies de nematoides das lesões (*Pratylenchus* spp.), bem como outras espécies importantes de NPPs (LAHM et al., 2019).

Em concentrações entre 1-50 µg/mL, a fluazaindolizina reduz significativamente a mobilidade e atividade de grande variedade de NPPs após 24 h de exposição, embora diferenças significativas tenham sido observadas na sensibilidade dos NPPs à fluazaindolizina. Os nematoides das galhas, reniformes e espiralados estiveram entre os mais sensíveis, com efeitos visíveis a 1-25 µg/mL. Em termos de suscetibilidade, esse grupo foi seguido por nematoides dos gêneros *Xiphinema*, *Hoplolaimus*, e *Belonolaimus*, nos quais os efeitos foram visíveis a 25-50 µg/mL. NPPs da lesão radicular e do cisto estiveram entre os que apresentaram menores sensibilidades à fluazaindolizina nos ensaios *in vitro*, pois os efeitos só foram visíveis em concentração maior do que 100 µg/mL. Alguns NPPs dos gêneros *Ditylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Paratylenchus*, e *Criconemella*, não sofreram alterações na mobilidade ou na atividade do corpo quando expostos à fluazaindolizina (LAHM et al., 2019). Vale mencionar que essa diferença de sensibilidade à fluazaindolizina

parece normal, pois vários outros nematicidas comerciais também apresentam diferenças desta natureza (GOURD; SCHMITT; BARKER, 1993; OKA, 2014).

A fluazaindolizina também apresentou um forte efeito sobre a infectividade e a reprodução dos nematoides das galhas, da lesão, e do cisto. Para as espécies de nematoides ectoparasitas anelados (*Criconemella* spp.), pino (*Paratylenchus* spp.) ou lança (*Hoplolaimus* spp.), observaram-se taxas de reprodução significativamente mais baixas (Tabela 1). É interessante ressaltar que o impacto da fluazaindolizina sobre determinadas espécies foi dependente dos isolados e da idade do inóculo.

Tabela 1 - Efeitos da fluazaindolizina (Salibro™) na atividade, mobilidade, infectividade e reprodução de espécies de nematoides parasitas de plantas.

Common name (genus)	Activity ^{a)}	Mobility ^{b)}	Infectivity/ reproduction ^{c)}
Root-knot nematodes (<i>Meloidogyne</i>)	++++	++++	++++
Root-lesion nematodes (<i>Pratylenchus</i>)	++	++	+++
Potato cysts nematodes (<i>Globodera</i>)	++	++	+++
Sugar beet/soybean cyst nematodes (<i>Heterodera</i>)	+	+	NT
Spiral nematodes (<i>Helicotylenchus</i>)	++++	++++	++++
Sting nematode (<i>Belonolaimus</i>)	+++	+++	++
Dagger nematodes (<i>Xiphinema</i>)	+++	NT	NT
Stem nematodes (<i>Ditylenchus</i>)	0	0	NT
Stubby root nematodes (<i>Trichodorus</i>)	+	+	NT
Reniform nematode (<i>Rotylenchulus</i>)	++++	++++	++++
Stunt nematode (<i>Tylenchorhynchus</i>)	0	NT	NT
Pin nematode (<i>Paratylenchus</i>)	+	+	++
Needle nematodes (<i>Longidorus</i>)	+++	NT	NT
Lance nematode (<i>Hoplolaimus</i>)	++	++	++
Ring nematode (<i>Mesocriconema</i>)	+	+	++

++++ = efeitos visíveis a <1–25 µg/mL (princípio ativo); +++ = efeitos visíveis a <25–50 µg/mL; ++ = efeitos visíveis a <50–100 µg/mL; + = efeitos visíveis a <250 µg/mL; 0 = nenhum efeito observado; tempo de duração (24–72 h); NT = Não testado. (a) Com base em ensaios aquosos *in vitro*; (b) Com base em ensaios *in vitro* que avaliam a mobilidade (capacidade de passar papel de filtro/camada de areia); (c) Com base em ensaios *in vivo* avaliando a infectividade (infestação de raízes – nematoides endoparasitários) e/ou reprodução (espécies ectoparasitárias) após exposição prévia de estágios vermiformes ao Salibro™.

Fonte: Lahm (2019).

Em nematoides de vida livre e entomopatogênicos, como *Rhabditis* spp., *Panagrolaimus* spp., *Acrobeles* spp., e *Aphelenchus* spp., a fluazaindolizina não apresentou

efeitos adversos sobre a atividade e capacidade reprodutiva em concentração entre 250-500 $\mu\text{g/mL}$ (THODEN; ALKADER; WILES, 2020). Esses resultados estão em correspondência com outras publicações que demonstram que os nematoides de vida livre têm maior resistência aos efeitos de certos agroquímicos, quer sejam de origem semissintética ou natural (BROWNING et al., 2004; CARRASCOSA; SÁNCHEZ-MORENO; ALONSO-PRADOS, 2015). Adultos de *C. elegans* tratados com fluazaindolizina (300 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram aumento de mortalidade ou redução de motilidade após 120 h de exposição. Logo, a fluazaindolizina tem um alto grau de seletividade em relação aos NPPs.

2.5 Química Computacional: uma Ferramenta para o Desenvolvimento Racional de Novos Nematicidas

A introdução de um novo produto químico no mercado é um processo muito complexo, arriscado e caro em termos de tempo, dinheiro e mão de obra empregada. Na área de medicamentos, por exemplo, geralmente é aceito que o processo de descoberta e desenvolvimento do produto leva cerca de 10 a 14 anos, com um consumo de capital de US\$1 bilhão (DAINA et al., 2017). Para reduzir o tempo, custo e os riscos do impacto ambiental, muitas empresas do mercado de medicamentos e agroquímicos, como Bayer AG, fazem seleções computacionais de estruturas químicas potencialmente úteis (SCOTTI, L. et al., 2012; SURABHI; SINGH, BK, 2018).

Um exemplo bastante atual do uso da seleção computacional está sendo observado com a atual pandemia de COVID-19, causada por SARS-CoV-2, que tornou mais evidente a importância da bioinformática como ferramenta imprescindível para a solução inteligente dos problemas. Os estudos *in silico* permitiram, de forma muito mais rápida e econômica, conhecer diferentes aspectos da genética e da bioquímica do vírus, facilitando assim o desenvolvimento de vacinas e medicamentos específicos como o Lopinavir (AGHAEE; GHODRATI; GHASEMI, 2021).

Existem, basicamente, dois tipos de abordagens no desenvolvimento computacional de produtos biologicamente ativos: desenho de compostos químicos baseados na estrutura do alvo biológico (abordagem direta), e o desenho baseado no ligante (abordagem indireta). Na abordagem direta, a estrutura tridimensional do alvo biológico é conhecida, enquanto na abordagem indireta a referida estrutura tridimensional é desconhecida. Em linhas gerais, o desenvolvimento de novos produtos biologicamente ativos através da abordagem direta pode ser dividido em quatro partes: 1) descrição da estrutura tridimensional do alvo biológico; 2)

modelagem do farmacóforo do ligante; 3) construção das moléculas (amostragem); 4) e avaliação das moléculas geradas (MOUCHLIS et al., 2021).

2.5.1 Desenvolvimento de Produtos Biologicamente Ativos Baseados no Ligante

Neste caso a estrutura tridimensional do alvo biológico não é conhecida, mas as estruturas químicas dos ligantes que se ligam ao alvo são conhecidas. Logo, assume-se que compostos com semelhanças estruturais em relação a tais ligantes também podem ter ação biológica sobre o alvo. Para a busca por estruturas tridimensionais semelhantes aos ligantes inicialmente identificados, uma ferramenta útil corresponde ao *screening* farmacofórico. Há também, os estudos da relação entre as estruturas dos ligantes e suas atividades biológicas, que são conhecidos como métodos QSARs (*Quantitative Structure-Activity Relationships*), os quais são normalmente conduzidos para identificar combinações apropriadas de descritores físico-químicos ou estruturais, capazes de explicar a variação da bioatividade em um grupo de compostos bioativos (HAMMAD; TAHA, 2009).

2.5.2 Modelagem de Proteínas

Na elucidação do papel funcional de novos compostos biologicamente ativos, é de grande importância dispor da estrutura 3D do alvo proteico a ser avaliado. Essa informação estrutural pode ser obtida a partir de cristalografia de raios-X, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), ou pelo emprego de outras técnicas como a cristalografia de nêutrons e a micrografia de elétrons (EM) (SCHMIDT, C.; URLAUB, 2017; SCHMIDT, T.; BERGNER; SCHWEDE, 2014). Porém, na prática, o emprego dessas técnicas é limitado, uma vez que demanda pessoal técnico qualificado, bem como equipamento e material altamente custosos, o que faz com que o número de proteínas com estruturas tridimensionais elucidadas por esses métodos esteja muito aquém do acúmulo de sequências de aminoácidos de proteínas que são conhecidas. Além disso, têm-se limitações técnicas com respeito às proteínas, já que muitas delas não podem ser purificadas, ou não mantêm seus estados nativos após a cristalização (PEARCE; ZHANG, 2021). Felizmente, foram desenvolvidos diferentes métodos computacionais para a elucidação da estrutura 3D de um amplo grupo de proteínas. Esses métodos podem ser divididos em duas categorias: a.) métodos *ab initio*, e b.) métodos baseados no *template* (homologia e *threading*). No primeiro caso, o método se baseia na previsão do enovelamento da proteína a partir de princípios físico-químicos; no segundo caso, o método se baseia no emprego de uma (ou mais) estrutura experimental que serve como

modelo para construir um modelo de homologia estrutural baseado nas coordenadas atômicas (SILAKARI; SINGH, 2021).

Embora os métodos de previsão computacionais forneçam uma alternativa econômica na ausência de estruturas experimentais, o certo é que obter modelos suficientemente exatos é um desafio. No entanto, desde o ano 2012, tem-se incorporado, nos métodos de predição de estruturas de proteínas, a arquitetura da aprendizagem profunda (*DeepMind Technologies*), com o objetivo de melhorar a qualidade dos modelos de proteínas (PEARCE; ZHANG, 2021). Assim, por exemplo, os resultados do ano 2020 da CASP (*Critical Assessment of Structure Prediction*, versão14), sobre a qualidade dos modelos de proteínas do SARS-CoV-2 (Covid-19), abriram uma nova era na modelagem de proteínas, já que foi possível obter, através do emprego de uma rede de inteligência artificial (IA), modelos de proteínas com uma pontuação de precisão GDT_TS (*global distance test - total score*) que esteve na faixa de 67 (correta topologia) a 87 [competitivo com o experimental (90)], obtendo-se assim melhorias na qualidade dos modelos de até 30% em comparação com a versão 2018 da CASP, cujo escore máximo foi de 57 (CALLAWAY, 2020; GAO et al., 2020; KRYSHTAFOVYCH et al., 2021).

A modelagem *in silico* de proteínas tem facilitado a integração de uma imensa quantidade de informações, o que tem sido útil no fortalecimento de nossa compreensão das estruturas e funções das proteínas. Por exemplo, na compreensão das interações proteína-proteína, proteína-ligante, e na anotação funcional de genes identificados nos genomas de organismos (GANGULY; TEWARI; SINGH, R., 2015; GOPAL *et al.*, 2001). Também tem sido usada na identificação de diferenças sutis de proteínas relacionadas cujas estruturas tridimensionais não puderam ser determinadas por métodos experimentais (CUENO et al., 2013). Em conjunto com as simulações por dinâmica molecular, o modelamento de proteínas é útil na geração de hipóteses sobre a dinâmica e cinética de proteínas, o que é importante nos estudos de seletividade de compostos biologicamente ativos (BHOI et al., 2021; EL-SHEHABI et al., 2021).

2.5.3 Docking Molecular (Ancoramento Molecular)

O *docking* molecular faz uso dos conceitos mais avançados em biologia molecular, biotecnologia, bioinformática, química e matemática. Ele tem como objetivo alcançar uma conformação otimizada para o alvo biológico e seu ligante, assim como a orientação relativa entre ambos, de modo que a energia livre de todo o sistema seja mínima. Por essa razão, o

docking molecular é uma ferramenta imprescindível no desenho racional de moléculas biologicamente ativas quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico (GUPTA; SHARMA, R.; KUMAR, A., 2018).

Há várias abordagens que podem ser utilizadas em *docking* molecular. Por exemplo, pode-se empregar a técnica de correspondência, que descreve o alvo biológico e o ligante como superfícies complementares (GABA et al., 2015; MENG; SHOICHET; KUNTZ, 1992). Em geral, os movimentos dos ligantes para se encontrar o melhor posicionamento no sítio de interação com o alvo biológico podem incorporar transformações de corpo rígido, como translações e rotações, bem como mudanças internas na estrutura do ligante, incluindo rotações do ângulo de torção. Cada um desses movimentos no espaço de conformação do ligante induz um custo energético total do sistema e, portanto, após cada movimento, a energia total do sistema é calculada (TORRES et al., 2019). O mais comum algoritmo de *docking* molecular é o modelo de receptor rígido/ligante flexível. Os principais métodos de acoplamento que são usados extensivamente, empregam algoritmos de pesquisa baseados em Monte Carlo, algoritmo genético, baseado em fragmento e dinâmica molecular.

As principais limitações e desafios na metodologia de *docking* molecular foram identificadas há quase duas décadas. Observa-se, por exemplo, que muitos compostos podem mostrar grandes afinidades no ancoramento, mas falhas na simulação por dinâmica molecular, o que é atribuído à dificuldade de se levar em consideração a questão entrópica durante o *docking* molecular (GUPTA; SHARMA, R.; KUMAR, A., 2018). Embora existam algumas limitações no método, a sua versatilidade, fácil implementação e baixo custo, fazem com que vários grupos de pesquisas, voltados para o mundo acadêmico ou comercial, promovam o desenvolvimento e o uso de estudos de *docking* molecular em vários estágios do processo de desenvolvimento de produtos biologicamente ativos.

O uso do *docking* molecular e da simulação por dinâmica molecular para estimar a afinidade de ligação entre um alvo e seu ligante, atualmente desempenham um papel fundamental na validação de alvos para o desenvolvimento de agroquímicos de uso comercial. Por exemplo, o mecanismo de ação do herbicida extraído de *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze, α -tertienil, foi validado por *docking* molecular, que confirmou a sua interação com proteínas transcetolases (ZHAO et al., 2020). De igual forma, as ferramentas de biologia estrutural e química computacional têm facilitado a validação teórica dos mecanismos de ação de inúmeros compostos de origem natural ou sintética que atualmente fazem parte do mercado de diversas indústrias tais como a farmacêutica, de alimentos e ambiental (LIU et al., 2018; TALELE; KHEDKAR; RIGBY, 2010).

2.6 Conclusão

Saber como funcionam os nematicidas é de grande importância científica e tecnológica. No caso específico do tioxazafeno e da fluazaindolizina, isto permitirá ter um uso mais racional desses compostos, uma vez que os problemas de desempenho e segurança poderão ser antecipados. Além disso, os estudos sobre os seus mecanismos de ação poderão facilitar melhoras nas suas estruturas químicas, o que permitirá reduzir os problemas do desenvolvimento de resistência. Para tanto, a bioinformática é uma ferramenta poderosa, pois permite simular em curto espaço de tempo e com baixo custo, o funcionamento de sistemas em organismos vivos. Logo, a bioinformática será de grande importância para estudar o tioxazafeno e a fluazaindolizina.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELGAWAD, M. M.; ASKARY, T. H. Impact of phytonematodes on agriculture economy. In: ASKARY, T. H., MARTINELLI, P. R. **Biocontrol Agents of Phytonematodes**, Wallington: CABI, p. 3-49, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/9781780643755.0003>. Acesso em: 24 Mar. 2022.
- AGHAEI, E.; GHODRATI, M.; GHASEMI, J. B. *In silico* exploration of novel protease inhibitors against coronavirus 2019 (COVID-19). **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 6 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imu.2021.100516>. Acesso em: 06 abr. 2022.
- AHUJA, A.; SOMVANSHI, V. S. Diagnosis of plant-parasitic nematodes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A review. **Crop Protection**, v. 147, n. 105459, p. 3-10, sep. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219420303926>. Acesso em: 17 ago. 2021.
- ALI, M. A. *et al.* Smart parasitic nematodes use multifaceted strategies to parasitize plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1699, p. 1-21, out. 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01699/full>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- AMARASINGHE, K.D.; MAIER, M. B.; SRIVASTAVA, A.; GRAY, J. L. One-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from carboxylic acid esters and amidoximes using potassium carbonate. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 22, p. 3629–3631, 29 maio. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.03.155>. Acesso em: 29 fev. 2022.
- ANJAM, M. S.; SHAH, S. J.; MATERA, C.; RÓŹAŃSKA, E.; SOBCZAK, M.; SIDDIQUE, S.; GRUNDLER, F.M.W. Host factors influence the sex of nematodes parasitizing roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**, v. 43, n. 5, p. 1160–1174, maio. 2020. Disponível em: <https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1111%2Fpce.13728&token=WzMzMDQxNjQsIjEwLjExMTEvcGNlLjEzNzI4Ii0.3ZP8FEred5f2xZzUrHgmPjVQgkY>. Acesso em: 13 jan. 2022.
- BERNARD, G. C.; EGNIN, M.; BONSI, C. The Impact of Plant-Parasitic Nematodes on Agriculture and Methods of Control. In: SHAH, M.M.; MAHAMOOD, M. (Ed.). **Nematology - Concepts, Diagnosis and Control**. 3rd ed. London: InTech, 2017. p. 9-23. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/55521>. Acesso em: 8 abr. 2022.

BHOI, P. *et al.* Design, synthesis, molecular modelling and antiproliferative evaluation of novel benzothiazole trihybrids. **Biophysical Chemistry**, v. 278, p. 106664. 1 nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106664>. Acesso em: 7 abr. 2022.

BOHLMANN, H. Introductory chapter on the basic biology of cyst nematodes. *In*: ESCOBAR, C.; FENOLL, C. (ed.). **Advances in Botanical Research**. [S. l.]: Academic Press, 2015. p. 33–59. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065229614000020>. Acesso em: 24 Mar. 2022.

BRIAR, S. S.; SHRESTHA, G.; REDDY, G. V. P. Plant Parasitic Nematodes of Montana and Wyoming. *In*: SERGEI A.; SUBBOTIN, J. J. C. (Ed.). **Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America**. [S.l.]: Springer Nature, Cham, 2018, p. 69–86. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-99585-4?noAccess=true>. Acesso em: 27 mar. 2022.

BROWNING, M; DAWSON, C; ALM, S R; GORRÈS, J H; AMADOR, J A. Differential effects of butyric acid on nematodes from four trophic groups. **Applied Soil Ecology**, v. 27, n. 1, p. 47–54, 20 jul. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.03.005>. Acesso em: 04 abr. 2022.

CALLAWAY, E. “It will change everything”: DeepMind’s AI makes gigantic leap in solving protein structures. **Nature**, v. 588, n. 7837, p. 203–204. 13 jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33257889/>. Acesso em: 7 abr. 2022.

CARRASCOSA, M.; SÁNCHEZ, S.; ALONSO, J. L. Effects of organic and conventional pesticides on plant biomass, nematode diversity and the structure of the soil food web. **Nematology**, v. 17, n. 1, p. 11–26, 12 jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1163/15685411-00002849>. Acesso em: 04 abr. 2022.

CASTILLO, G. X.; OZORES-HAMPTON, M.; NAVIA GINE, P. A. Effects of fluensulfone combined with soil fumigation on root-knot nematodes and fruit yield of drip-irrigated fresh-market tomatoes. **Crop Protection**, v. 98, n. 9, p. 166-171, 15 ago. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219417300959>. Acesso em: 5 fev. 2022.

COLUSSI, J. AND G. SCHNITKEY. "New Soybean Record: Historical Growing of Production in Brazil." *farmdoc daily* (11):49, Department of Agricultural and Consumer Economics, University of Illinois at Urbana-Champaign, March 30, 2021. Disponível em: <https://farmdocdaily.illinois.edu/wp-content/uploads/2021/03/fdd300321.pdf>. Acesso em: 8 abr. 2022.

COSTA, L. G. *et al.* Neurotoxicity of pesticides: A brief review. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 4, p. 1240-1249, 1 jan. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17981626/>. Acesso em: 22 fev. 2022.

CUENO, M. E. *et al.* Homology modeling study toward identifying structural properties in the HA2 B-loop that would influence the HA1 receptor-binding site. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 44, p. 161–167. 1 jul. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2013.05.011>. Acesso em: 7 abr. 2022.

D'ERRICO, G. *et al.* Nematicidal efficacy of new abamectin-based products used alone and in combination with indolebutyric acid against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Redia**, v. 100, n. 1, p. 95-101, 12 dez. 2017. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/NEMATICIDAL-EFFICACY-OF-NEW-ABAMECTIN-BASED-USED-IN-Roversi/f1494c171ded89bf63dc1d5210b8f7b3b4f5c027>. Acesso em: 3 fev. 2022.

DABABAT, A. A.; FOURIE, H. Nematode parasites of cereals. *In*: SIKORA, R. A.; COYNE, D.; HALLMANN, J.; TIMPER, P. (Ed.) **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. 3rd ed. USA: CABI, 2018. p. 163-220. Disponível em: <https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20183227832>. Acesso em: 8 abr. 2022.

DAINA, A. *et al.* Drug Design Workshop: A Web-Based Educational Tool to Introduce Computer-Aided Drug Design to the General Public. **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 3, p. 335-344, 14 fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/bibliotecavirtual.uis.edu.co/10.1021/acs.jchemed.6b00596>. Acesso em: 06 abr. 2022.

DESA, U. (2019). World Urbanization Prospects 2018: Highlights (ST/ESA/SER. A/421). Disponível em: <https://desapublications.un.org/publications/2018-revision-world-urbanization-prospects>. Acesso em: 06 abr. 2022.

DEVAUX, A.; KROMANN, P.; ORTIZ, O. Potatoes for Sustainable Global Food Security. **Potato Research**, v. 57, n. 3–4, p. 185–199, 1 dec. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11540-014-9265-1>. Acesso em: 28 mar. 2022.

DHAMELIYA, T. M.; CHUDASMA, S. J.; PATEL, T. M.; DAVE, B. P. A review on synthetic account of 1,2,4-oxadiazoles as anti-infective agents. **Molecular Diversity**, v. 1, n. 1, p. 1-14. 5 jan. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8727175/>. Acesso em: 29 fev. 2022.

EL-SHEHABI, F. *et al.* Homology modelling, molecular dynamics simulation and docking evaluation of β -tubulin of *Schistosoma mansoni*. **Biophysical Chemistry**, v. 278, p. 106660. 1

nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106660>. Acesso em: 7 abr. 2022.

ESCOBAR, C. *et al.* Overview of root-knot nematodes and giant cells. *In*: _____. (Ed.). **Advances in Botanical Research**. [S.l.]: Academic Press, 2015. p. 33–59. Disponível em: <https://dkx.wtu.dyndns.tv/science/article/pii/S0065229615000142>. Acesso em: 24 mar. 2022.

FAO. Climate change fans spread of pests and threatens plants and crops, new FAO study. Disponível em: <https://www.fao.org/news/story/en/item/1402920/icode/>. Acesso em: 2 Jun. 2021.

FASKE, T. R.; HURD, K. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to fluopyram. **Journal of Nematology**, v. 47, n. 4, p. 316–321, 4 dec. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755706/>. Acesso em: 5 fev. 2022.

FIGUEIREDO MOURA DA SILVA, E. H. *et al.* Impact assessment of soybean yield and water productivity in Brazil due to climate change. **European Journal of Agronomy**, v. 129, p. 126329. 1 set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2021.126329>. Acesso em: 8 abr. 2022.

GABA, M. *et al.* An overview on Molecular Docking. **International Journal of Drug Development & Research**. v. 02, n. 2, p. 1–14, 25 jul. 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279179780_An_overview_on_Molecular_Docking. Acesso em: 7 abr. 2022.

GANGULY, B.; TEWARI, K.; SINGH, R. Homology modeling, functional annotation and comparative genomics of outer membrane protein H of *Pasteurella multocida*. **Journal of Theoretical Biology**, v. 386, p. 18–247. 2 dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.08.028>. Acesso em: 11 out. 2021.

GANGULY, R. K.; MUKHERJEE, A.; CHAKRABORTY, S. K.; VERMA, J. P. Impact of agrochemical application in sustainable agriculture. *In*: VERMA, J. P.; MACDONALD, C. A.; GUPTA, V. K. PODILE, A. R. (Ed.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 15–24. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64325-4.00002-x>. Acesso em: 8 abr. 2022.

GAO, W. *et al.* Deep Learning in Protein Structural Modeling and Design. **Patterns**, v. 1, n. 9, p. 1–12. 11 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.patter.2020.100142>. Acesso em: 7 abr. 2022.

GOPAL, S. *et al.* Homology-based annotation yields 1,042 new candidate genes in the *Drosophila melanogaster* genome. **Nature Genetics**, v. 27, n. 3, p. 337–340. 4 mar. 2001. Disponível em: <https://www.proquest.com/docview/70649574?parentSessionId=Xp45kV%2F%2FsHuw1YVIJphwBU7aj1px5ojv1M5KHc7wbRk%3D&pq-origsite=primo&accountid=29068>. Acesso em: 7 abr. 2022.

GOURD, T. R.; SCHMITT, D. P.; BARKER, K. R. Differential sensitivity of *Meloidogyne* spp. and *heterodera glycines* to selected nematocides. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 4, p. 746–751, 12 dez. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279834>. Acesso em: 04 abr. 2022.

GRAF, R. Umsetzungen mit N-Carbonyl-sulfamidssäurechlorid, III. Umsetzungen mit Olefinen und Aldehyden; über β -Lactame. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 661, n. 1, p. 111-157, 1963 Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jlac.19636610109>. Acesso em: 02 abr. 2022.

GU, H. Y.; WANG, C. W. Impacts of the COVID-19 pandemic on vegetable production and countermeasures from an agricultural insurance perspective. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 19, n. 12, p. 2866–2876, 12 dez. 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63429-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63429-3). Acesso em: 14 mar. 2022.

GUPTA, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? **Computational Biology and Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 210-217, 3 jul. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30067954/>. Acesso em: 7 abr. 2022.

HAMMAD, A. M. A.; TAHA, M. O. Pharmacophore modeling, quantitative structure - Activity relationship analysis, and shape-complemented in silico screening allow access to novel influenza neuraminidase inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 4, p. 978-996, 2 abr. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci8003682>. Acesso em: 6 abr. 2022.

HEMMING, K. 1,2,4-Oxadiazoles. *In*: KATRITZKY, A.R.; RAMSDEN, C. A.; SCRIVEN, E. F. V.; TAYLOR, R. J. K. (Ed.). **Comprehensive Heterocyclic Chemistry III**. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 244-309. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/1%2C2%2C4-Oxadiazoles-Hemming/01a32660990da2ac490c015be5ddcd57b90297da>. Acesso em: 29 fev. 2022.

HOLTAPPELS, D. *et al.* The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 68, n. 1, p. 60-71, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.016>. Acesso em: 14 mar. 2022.

IBRAHIM, H. M. M. *et al.* Effective approaches to study the plant-root knot nematode interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 141, n. 1, p. 332–342, ago. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S098194281930244X>. Acesso em: 20 jun. 2021.

IRELAND, K. B. *et al.* Plant Pest Impact Metric System (PPIMS): Framework and guidelines for a common set of metrics to classify and prioritise plant pests. **Crop Protection**, v. 128, n. 3, p. 7-22, 2 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105003>. Acesso em: 14 fev. 2022.

JALHAN, S.; SINGH, S.; SAINI, R.; SETHI, N. S.; JAIN, U. K. Various biological activities of coumarin and oxadiazole derivatives. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 7, p. 38–43, 19 abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i7.18461>. Acesso em: 12 fev. 2022.

JONES, J. T. *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946–961, dez. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23809086/>. Acesso em: 27 mar. 2022.

JONES, R. K.; STOREY, S. G.; KNOETZE, R.; FOURIE, H. Nematode pests of potato and other vegetable crops. *In*: FOURIE, H.; SPAULL V. W.; JONES, R. K.; DANEEL, M. S.; WAELE, D. (Ed.). **Nematology in South Africa: A View from the 21st Century**. [S.l.]: Springer, Cham, 2017. p. 231–260. Disponível em: <https://searchworks-lb.stanford.edu/view/13467490>. Acesso em: 28 mar. 2022.

KARURI, H. Root and soil health management approaches for control of plant-parasitic nematodes in sub-Saharan Africa. **Crop Protection**, v. 152, p. 105841, 1 Feb. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105841>. Acesso em: 24 Mar. 2022.

KHANNA, K. *et al.* Plants-Nematodes-Microbes Crosstalk within Soil: A trade-off among friends or foes. **Microbiological Research**, v. 248, n. 126755, p. 7-17, jul. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944501321000616>. Acesso em: 24 Mar. 2022.

KRYSHTAFOVYCH, A. *et al.* Modeling SARS-CoV-2 proteins in the CASP-commons experiment. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 89, n. 1, p. 1987–1996. 5 out. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.26231>. Acesso em: 11 out. 2021.

LAHM, G. P. *et al.* Fluazaindolizine: A new active ingredient for the control of plant-parasitic Nematodes *In*: JESCHKE P.; WITSCHEL M.; KRAMER W.; SCHIRMER U. (Ed.). **Modern**

Crop Protection Compounds. Germany: Wiley-VCH, 2019. p. 1615-1628. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527644179>. Acesso em: 04 abr. 2022.

LAHM, G. P. *et al.* The discovery of fluazaindolizine: A new product for the control of plant parasitic nematodes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 7, p. 1572-1575, 16 fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.029>. Acesso em: 04 abr. 2022.

LI, Q.; SHAH, S. Structure-based virtual screening. *In*: WU, C. H.; ARINGHI, C. N.; ROSS, K. E. (Ed.). **Protein Bioinformatics: From Protein Modifications and Networks to Proteomics**. New York NY: Humana Press, 2017. p. 111-127. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6783-4_5. Acesso em: 5 fev. 2022.

LI, T. J. *et al.* The hatching of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) in response to different inorganic ions. **Scientia Agricola**, v. 79, n. 1, p. 1-7, 18 sep. 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/9494sQzDKBxBGWMTWvz7dBN/>. Acesso em: 27 mar. 2022.

LINDSEY, A. P. J.; MURUGAN, S.; RENITTA, R. E. Microbial disease management in agriculture: Current status and future prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 4-13, 12 jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101468>. Acesso em: 14 fev. 2022.

LOPES V. S.; PINHEIRO J. B.; GUIMARÃES F. C. Nematodes in Horticulture: An Overview. **Journal of Horticultural Science and Crop Research**, v. 1, n. 1, p. 1-10, mar. 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198255/1/1106-Nematodes-in-Horticulture-An-Overview.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2022.

MANDAL, H. R.; KATEL, S.; SUBEDI, S.; SHRESTHA, J. Plant Parasitic Nematodes and their management in crop production: a review. **Journal of Agriculture and Natural Resources**, v. 4, n. 2, p. 327-338, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3126/janr.v4i2.33950>. Acesso em: 20 jun. 2021.

MARQUES, B. N. *et al.* Nematodes Associated to Tropical Forages in Pasture Areas. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 36, n. 4, p. 1-10, maio. 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/333324397_Nematodes_Associated_to_Tropical_Forages_in_Pasture_Areas. Acesso em: 27 mar. 2022.

MATEILLE, T. *et al.* Competitive interactions in plant-parasitic nematode communities affecting organic vegetable cropping systems. **Crop Protection**, v. 135, n. 105206, p. 5-10, sep. 2020. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219420301393>. Acesso em: 20 jun. 2021.

MELLO, J. R.; MOREIRA, J. A.; MALAFAIA, G.; ARAÚJO, F. G. Using tannery sludge to manage soybean cyst nematodes in soybean crops. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 12, p. 294 - 298, 15 nov. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/321100320_Using_Tannery_Sludge_to_Manage_Soybean_Cyst_Nematodes_in_Soybean_Crops. Acesso em: 27 mar. 2022.

MENG, E. C.; SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 505-524, 14 maio. 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.540130412>. Acesso em: 7 abr. 2022.

MILLER, W. H.; GRAHAM C. R.; BROWN, D. L. Processes for the preparation of 3,5-disubstituted-1,2,4-oxadiazoles. Depositante: **Monsanto Technology LLC**, St. Louis, MO (US) Patent 9,040,711 B2. Depósito: 6 fev. 2014. Concessão: 26 maio. 2015. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US9040711B2/en>. Acesso em: 02 abr. 2022.

MOK, W. K.; TAN, Y. X.; CHEN, W. N. Technology innovations for food security in Singapore: A case study of future food systems for an increasingly natural resource-scarce world. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p. 155–168, 1 ago. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422442030515X>. Acesso em: 06 sep. 2022.

MONDAL, S.; MALAKAR, S. Synthesis of sulfonamide and their synthetic and therapeutic applications: Recent advances. **Tetrahedron**, v. 76, n. 48, p. 131662, 10 oct. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131662>. Acesso em: 06 abr. 2022.

MOUHLIS, V. D. *et al.* Advances in de novo drug design: From conventional to machine learning methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1-22, 7 fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33562347/>. Acesso em: 06 abr. 2022.

OGAWA, Y.; TOKUNAGA, E.; KOBAYASHI, O.; HIRAI, K.; SHIBATA, N. Current Contributions of Organofluorine Compounds to the Agrochemical Industry. **iScience**, v. 23, n. 9, p. 101467, 25 Sep. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101467>. Acesso em: 06 abr. 2022.

OKA, Y. Nematicidal activity of fluensulfone against some migratory nematodes under laboratory conditions. **Pest Management Science**, v. 70, n. 12, p. 1850–1858, 1 dez. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24452922>. Acesso em: 04 abr. 2022.

OKECHALU, O. B.; WONANG, D. L. The response of eleven sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars to Infection by *Meloidogynespp* in Jos, Nigeria. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 10, no. 4, p. 42-46, aug. 2015. Disponível em: <https://iosrjournals.org/iosr-jpbs/papers/Vol10-issue4/Version-4/G010444249.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PAN, L. *et al.* Design and synthesis of novel coumarin analogs and their nematicidal activity against five phytonematodes. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 3, p. 375–379, 11 mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.01.029>. Acesso em: 14 fev. 2022.

PATIL, B. L. Plant Viral Diseases: Economic Implications. *In*: BAMFORD, D. H.; ZUCKERMAN M. (Ed.). **Encyclopedia of Virology**, U.S.A: Academic Press, p. 81-97, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21307-1>. Acesso em: 14 fev. 2022.

PAUL, N.; MUTHUSUBRAMANIAN, S. Domino Vilsmeier-Haack/ring closure sequences: A facile synthesis of 3-chlorobenzo[b]thiophene-2-carbaldehydes. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 29, p. 3743–3746, 20 jul. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.05.046>. Acesso em: 02 abr. 2022.

PEARCE, R.; ZHANG, Y. Toward the solution of the protein structure prediction problem. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 1, p. 1–18. 1 jul. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34119522/>. Acesso em: 6 abr. 2022.

PINHEIRO, B. J. Nematóides em hortaliças. 1 ed. Brasília, DF: **Embrapa**, 2017. 194 p. Disponível em: <https://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00085470.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2022.

PINHEIRO, J. B.; SILVA, G. O. da; PEREIRA, R. B. Nematóides na cultura da batata. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, 2016. 12 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica. 143). Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortaliças/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1021759/nematóides-na-cultura-da-batata>. Acesso em: 8 fev. 2022.

POTTER, J. W.; MCKEOWN, A. W. Nematode biodiversity in Canadian agricultural soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 83, n. 3, p. 289–302, ago. 2003. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/274762156_Nematode_biodiversity_in_Canadian_agricultural_soils. Acesso em: 28 mar. 2022.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and

endophytic fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 1-14, 12 maio. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7261880/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

PULAVARTY, A. *et al.* Plant parasitic nematodes: A review on their behaviour, host interaction, management approaches and their occurrence in two sites in the republic of Ireland. **Plants**. v. 10, n. 2352, p. 1-16, nov. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8624893/>. Acesso em: 27 mar. 2022.

SCHMIDT, C.; URLAUB, H. Combining cryo-electron microscopy (cryo-EM) and cross-linking mass spectrometry (CX-MS) for structural elucidation of large protein assemblies. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 46, p. 157–168. 1 out. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29080436/>. Acesso em: 6 abr. 2022.

SCHMIDT, T.; BERGNER, A.; SCHWEDE, T. Modelling three-dimensional protein structures for applications in drug design. **Drug Discovery Today**. v. 19, n. 7, p. 890–897. 1 jul. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24216321/>. Acesso em: 6 abr. 2022.

SCOTTI, L. *et al.* Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2298-2315, 22 maio. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules17032298>. Acesso em: 06 abr. 2022.

SCURRAH, M. I.; NIERE, B.; BRIDGE, J. Nematode parasites of solanum and Sweet potatoes. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. 2 ed. London: CABI Publishing, 2005. p. 193–219. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/287763964_Nematode_parasites_of_solanum_and_sweet_potatoes. Acesso em: 28 mar. 2022.

SHAIBU, A. S. *et al.* Soybean cyst nematode-resistance: Gene identification and breeding strategies. **Crop Journal**, v. 8, n. 6, p. 892–904, 14 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.03.001>. Acesso em: 8 abr. 2022.

SHARMA, A. *et al.* Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, n. 7, p. 1-15, 5 jun. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32512419/>. Acesso em: 22 fev. 2022.

SIDDIQUE, S.; GRUNDLER, F.M.W. Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 46, p. 102–108, dec. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.09.004>. Acesso em: 24 mar. 2022.

SILAKARI, O.; SINGH, P. K. Homology modeling: Developing 3D structures of target proteins missing in databases. *In: _____*. (Ed.). **Concepts and Experimental Protocols of Modelling and Informatics in Drug Design**. U. S. A: Academic Press, 2021, p. 107–130.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/348597698_Homology_modeling_Developing_3D_structures_of_target_proteins_missing_in_databases. Acesso em: 7 abr. 2022.

SINGH, A.; SINGH, G.; BEDI, P. M. S. Thiophene derivatives: A potent multitargeted pharmacological scaffold. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2658–2703, 1 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jhet.3990>. Acesso em: 02 abr. 2022.

SINGH, S.; SINGH, B.; SINGH, A. P. Nematodes: A Threat to Sustainability of Agriculture. **Procedia Environmental Sciences**, v. 29, n. 7, p. 215–216, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.270>. Acesso em: 24 Mar. 2022.

SITHOLE, N. T. *et al.* Potential nematicidal properties of plant extracts against *Meloidogyne incognita*. **South African Journal of Botany**, v. 139, n. 6, p. 409-417, 6 jul. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629921000600>. Acesso em: 22 fev. 2022.

SLOMCZYNSKA, U. *et al.* Tioxazafen: A new broad-spectrum seed treatment nematicide.

In: ACS Symposium Series. [s.l: s.n.]. v. 1204, p. 129–147. 2015. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2015-1204.ch010>. Acesso em: 12 abr. 2022.

SOUTH, S. M. *et al.* Development of Tioxazafen as a New Broad spectrum Nematicide. *In: JESCHKE P.; WITSCHEL M.; KRAMER W.; SCHIRMER U.* (Ed.). **Modern Crop Protection Compounds**. Germany: Wiley-VCH, 2019. p. 1615-1628. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527644179>. Acesso em: 29 fev. 2022.

SURABHI, S.; SINGH, B. K. Computer aided drug design: an overview. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, n. 5, p. 504-509, 18 Sep. 2018. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/327889509_COMPUTER_AIDED_DRUG_DESIGN_AN_OVERVIEW. Acesso em: 06 abr. 2022.

TALELE, T. T.; KHEDKAR, S. A.; RIGBY, A. C. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 127-141, 2010. Disponível em:

<https://www.semanticscholar.org/paper/Successful-applications-of-computer-aided-drug-from-Talele-Khedkar/6718d683573865987a631299ae55b1f77748fc5a>. Acesso em: 7 abr. 2022.

TAYLOR, R. W. D. Methyl bromide-Is there any future for this noteworthy fumigant? **Journal of Stored Products Research**, v. 30, n. 4, p. 253-260, 27 jun. 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022474X94903174>. Acesso em: 22 fev. 2022.

THODEN, T. C.; ALKADER, M. A.; WILES, J. A. Biological attributes of Salibro™, a novel sulfonamide nematocide. Part 2: Impact on the fitness of various non-target nematodes. **Nematology**, v. 23, n. 3, p. 287–303, 24 jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1163/15685411-BJA10041>. Acesso em: 04 abr. 2022.

TORRES, P. H. M. *et al.* Key topics in molecular docking for drug design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1-29, 15 sep. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6769580/>. Acesso em: 7 abr. 2022.

TOUMI, F. *et al.* Cereal cyst nematodes: importance, distribution, identification, quantification, and control. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, n. 1, p. 1–20, jan. 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-017-1263-0>. Acesso em: 27 mar. 2022.

TSUKAMOTO, M.; NAKAMURA, T.; KIMURA, H.; NAKAYAMA, H. Synthesis and application of trifluoromethylpyridines as a key structural motif in active agrochemical and pharmaceutical ingredients. **Journal of Pesticide Science**, v. 46, n. 2, p. 125–142, 10 jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.D21-012>. Acesso em: 06 abr. 2022.

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423).

VARANDAS, R.; EGAS, C.; CONCEIÇÃO, I. L. Potato cyst nematodes: New solutions to an old problem. **Crop Protection**, v. 137, n. 6, p. 1-6, nov. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219420302362>. Acesso em: 28 ago. 2021.

WALKER, D. P.; GRAHAM, C. R.; MILLER, W. H.; KOELLER, K. J. Three step, one-pot process to prepare thiophene-2-carbonyl chloride (TCC), a key raw material in the manufacture of tioxazafen (Nemastrike®). **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 12, p. 834-38, 1 abr. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040403919301364>. Acesso em: 5 fev. 2022.

WILLIAMSON, V. M.; HUSSEY, R. S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1735–1745, nov. 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/ppmc/articles/PMC161311/>. Acesso em: 13 Jan. 2022.

WRAM, C. L.; ZASADA, I. A. Short-term effects of sublethal doses of nematicides on *Meloidogyne incognita*. **Phytopathology**, v. 109, n. 9, p. 1605-1613, 19 jul. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31033406/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

ZASADA, I. A. *et al.* Managing nematodes without methyl bromide. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 9, p. 311-328, 10 maio. 2010. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-073009-114425>. Acesso em: 17 fev. 2022.

ZHANG, R. *et al.* Synthesis and nematicidal activities of 1,2,3-benzotriazin-4-one derivatives containing benzo[d][1,2,3] thiadiazole against *Meloidogyne incognita*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 17, p. 1-8, 14 sep. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32738991/>. Acesso em: 5 fev. 2022.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - PROTEINA DE CHOQUE TÉRMICO 90 (Hsp90) COMO POSSÍVEL ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS NEMATICIDAS

RESUMO

Os nematoides parasitas de plantas (NPPs) são organismos microscópicos que habitam o solo e os tecidos vegetais. Dentre tais organismos se destacam aqueles dos gêneros *Meloidogyne* e *Heterodera*, pois afetam mais de 2500 espécies diferentes de plantas, gerando perdas econômicas mundiais acima de US\$100 bilhões por ano. No Brasil, esses nematoides constituem uma notável ameaça para o progresso e segurança alimentar do país. Quase a metade do mercado global de nematicidas, que corresponde a US\$ 1 bilhão por ano, é usado para o controle desses nematoides. No entanto, com o aumento dos requisitos da segurança alimentar e de proteção ambiental, vários desses nematicidas não são mais considerados adequados para a agricultura moderna. Em decorrência, surgiu o tioxazafeno (NemaStrike™), um novo nematicida para uso em sementes que, embora seja efetivo no controle de NPPs, seu mecanismo de ação ainda permanece desconhecido. Conseqüentemente, o presente trabalho teve como objetivo principal identificar, através de métodos *in silico*, o possível alvo do tioxazafeno em NPPs. Após busca farmacofórica utilizando o modelo gerado a partir do tioxazafeno, na base de dados do LiganExpo, foi selecionado o ligante BXZ (4-bromo-6-(6-hidroxi-1,2-benzoxazol-3-il)benzeno-1,3-diol), que se encontra experimentalmente complexado à proteína de choque térmico 90 (Hsp90): 3BM9. Foram modeladas duas sequências de aminoácidos da Hsp90 (AAO14563 e ACR57216) de *Heterodera glycines*, com seus diferentes arranjos conformacionais. BXZ, assim como o tioxazafeno, pertence a série de compostos oxazólicos, dentre os quais se destacam aqueles inibidores de enzimas chaperonas do tipo Hsp90. Os resultados de *docking* molecular (ancoramento) nas Hsp90 não produzidas por nematoides, mostraram que, assim como o ATP (substrato natural de Hsp90) e de seus competidores antagonistas BXZ e CXZ (4-cloro-6-[5-(2-morfolin-4-iletilamino)-1,2-benzoxazol-3-il]benzeno-1,3-diol), o tioxazafeno interage com resíduos de aminoácidos chaves tais como Asp 93, Gly 97, Lys 58, Met 98, Ala 55 e Thr 184, com afinidade média de -7,8 kcal/mol. Nas Hsp90 produzidas por *H. glycines* houveram diferenças que dependeram da conformação do domínio N-terminal (DNT). Nos modelos com a região DNT em estado aberto se conseguiu obter resultados de interação similares aos registrados nas Hsp90 não produzidas por nematoides; porém a afinidade foi estatisticamente diferente (-6,7 kcal/mol). Conclui-se que Hsp90 é um alvo atraente para o desenvolvimento de novos nematicidas comerciais, uma vez que com sua inibição são afetadas múltiplas proteínas clientes imprescindíveis para o correto funcionamento da fisiologia celular em NPPs.

Palavras-chave: Tioxazafeno. *In silico*. *Heterodera glycines*. Hsp90. *Docking*.

ABSTRACT

Plant parasitic nematodes (PPNs) are microscopic organisms that inhabit soil and plant tissues. Among such organisms, those of the genera *Meloidogyne* and *Heterodera* are the most harmful, as they affect more than 2500 different species of plants, generating worldwide economic losses of over US\$100 billion per year. In Brazil, these nematodes constitute a notable threat to the country's progress and food security. Almost half of the global market for nematicides, which corresponds to US\$ 1 billion per year, is used to control these nematodes. However, with increasing food safety and environmental protection requirements, many of these nematicides are no longer considered suitable for modern agriculture. As a result, tioxazafen (NemaStrike™) has emerged as a new nematicide for use in seeds that, although effective in controlling PPNs, its mechanism of action remains unknown. Consequently, the main objective of the present work was to identify, through *in silico* methods, the possible target of tioxazafen in PPNs. After a search in the LiganExpo database, using the pharmacophoric model generated from tioxazafen, the ligand BXZ (4-bromo-6-(6-hydroxy-1,2-benzoxazol-3-yl)benzene-1,3-diol) was selected. It is experimentally complexed to heat shock protein 90 (Hsp90), 3BM9. Two Hsp90 amino acid sequences (AAO14563 and ACR57216) from *Heterodera glycines* were modeled, with their different conformational arrangements. BXZ, like tioxazafen, belongs to the series of oxazole compounds, among which those inhibitors of Hsp90-type chaperones stand out. Molecular docking results on Hsp90 not produced by nematodes showed that, like ATP (Hsp90's natural substrate) and its antagonist competitors BXZ and CXZ (4-chloro-6-[5-(2-morpholin)-4-ylethylamino]-1,2-benzoxazol-3-yl]benzene-1,3-diol), tioxazafen interacts with key amino acid residues such as Asp 93, Gly 97, Lys 58, Met 98, Ala 55 and Thr 184, with an average affinity of -7.8 kcal/mol. In the Hsp90 produced by *H. glycines* there were differences that depended on the conformation of the N-terminal domain (DNT). In models with the DNT region in the open state, interaction results were obtained similar to those recorded in Hsp90 not produced by nematodes; however the affinity was statistically different (-6.7 kcal/mol). It is concluded that Hsp90 is an attractive target for the development of new commercial nematicides, since its inhibition affects multiple client proteins that are essential for the correct functioning of cellular physiology in PPNs.

Keywords: Tioxazafen. *In silico*. *Heterodera glycines*. Hsp90. Docking.

1 INTRODUÇÃO

Os danos causados pelos nematoides parasitas de plantas (NPPs) para a agricultura são de abrangência mundial. Especificamente no Brasil, os problemas gerados por NPPs são intensificados pela existência de grandes áreas de cultivo que, pelas suas localizações nas zonas urbanas e peri-urbanas, facilitam a disseminação dos NPPs através do movimento de pessoas, maquinaria agrícola, animais etc. Além disso, há de se levar em consideração também, a falta de cultivares resistentes e a pouca importância dada aos NPPs, que contribuem para a dispersão desses animais (PINHEIRO, 2017).

Em geral, os NPPs podem infectar mais de 2500 espécies diferentes de plantas no mundo todo, o que acarreta perdas agrícolas superiores a US\$100 bilhões por ano (SIDDIQUE; GRUNDLER, 2018). Dentre as espécies afetadas pelos NPPs cabe destacar a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), que é uma das leguminosas mais cultivadas no mundo. Ela representa cerca de 70% do total de farinha de proteína e 28% do consumo total de óleo vegetal em todo o mundo. Atualmente, o Brasil produz a maior quantidade de soja no mundo (35%), seguido dos Estados Unidos da América (32%) e Argentina (18%). Durante a pandemia de COVID-19, o Brasil aumentou em 8% a sua produção de soja, passando de 114 milhões de toneladas de grãos em 2019 para 123 milhões de toneladas em 2021 (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>). Acredita-se que aproximadamente 30% da produção atual de soja no Brasil é afetada pela presença dos NPPs: *H. glycines*, *Meloidogyne* spp., e *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans-Stekhoven. Essa percentagem corresponde a perdas da ordem de R\$ 16,2 bilhões por ano (CRUZ et al., 2020; FAVORETO et al., 2019; MELLO et al., 2017).

Os métodos de controle e manejo de NPPs incluem estratégias químicas e não químicas. As primeiras fazem referência ao uso de compostos químicos de origem sintética, enquanto as outras abrangem estratégias diversas tais como: rotação de culturas, exposição do solo ao sol, muda do tempo de plantio, utilização de variedades/cultivares resistentes aos NPPs, entre outras. Embora as estratégias não químicas sejam ecologicamente mais atraentes, em muitas circunstâncias são menos eficientes e versáteis que os métodos de controle químico tradicionais. No entanto, as políticas de proteção animal e ambiental têm limitado, em diversos países, o uso de vários compostos químicos sintéticos para o controle de NPPs, em decorrência dos efeitos comprovadamente nocivos para o ambiente (por exemplo: brometo de metila e dibromocloropropano) e para organismos não alvo (por exemplo: fostiazato, oxamil e fenamifos), (BECKER, 2014; SHARMA et al., 2020). Apesar disso, a comercialização de

nematicidas segue crescendo, passando de US\$ 1 bilhão no ano de 2011 para US\$ 1,4 bilhão em 2021 (CHEN; SONG, 2021).

Com vistas a reduzir os impactos negativos sobre o ambiente e sobre animais não alvos em geral, bem como o custo de produção, a agricultura moderna tem requerido o uso de novos nematicidas, de custos mais baixos, de fácil implementação e com efeitos indesejáveis mínimos. Em decorrência, na última década surgiram nematicidas não fumigantes com mecanismos de ação completamente diferentes dos descritos para os organofosforados e carbamatos, que vêm sendo utilizados há décadas como nematicidas (Tabela 2).

Tabela 2 - Características de nematicidas sintéticos antigos (carbofuran: carbamato; fenamifós: organofosforado) e novos (fluopiram, fluensulfona, tiofazafeno e fluazaindolizina).

Nematicida	Estrutura química	Meia vida no solo	Mecanismo de ação
Carbofuran (Furadan®)		< 40 d	AChE*
Fenamifós (Nemacur®)		< 50 d	AChE*
Fluensulfona (Nimitz®)		< 17 d	Inibidor β -oxidação
Fluopiram (Velum Prime®)		48-200 d	SDHI**
Tiofazafeno (NemaStrike™)		> 75 d	Desconhecido
Fluazaindolizina (Salibro™)		< 45 d	Desconhecido

* AChE = inibição da acetilcolinesterase; ** SDHI = inibição da succinato desidrogenase; d = dias.

Fonte: Adaptado de Deseager *et al.* (2021)

O tiofazafeno (NemaStrike™, Monsanto/Bayer) é um novo nematicida não fumigante, pertencente à classe dos 1,2,4-oxadiazóis (3-fenil-5-tiofen-2-il-1,2,4-oxadiazol); um grupo importante de compostos heterocíclicos com diversas aplicações em áreas químicas tais como

a farmacologia, agroquímica e química de materiais (ZHANG et al., 2020). Aprovado pela EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) no ano de 2017 (<https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-10/documents/fy17finaldecisions.pdf>), o tioxazafeno é um nematicida de amplo espectro efetivo no controle de nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.), do cisto (*Heterodera* spp.) e reniformes (*Rotylenchulus* spp.), em culturas de soja, milho e algodão. Formulado como uma suspensão concentrada (Acceleron®) para sementes, o tioxazafeno é um nematicida de fácil aplicação com mínimo impacto ambiental. Apresenta baixa solubilidade em água (1,24 mg/L) e mobilidade no solo, com uma meia vida acima de 75 dias. Não é fitotóxico e os estudos radioisotópicos indicam que o tioxazafeno se distribui pela raiz sem ingressar aos tecidos vasculares das plantas. É seguro para organismos não alvo como polinizadores, répteis, anfíbios e invertebrados terrestres. Entretanto, grandes doses podem ser letais para vertebrados como peixes e aves (SLOMCZYNSKA et al., 2015; SOUTH et al., 2019).

São poucas as informações que atualmente existem sobre o mecanismo de ação do tioxazafeno, dentre as quais se pode destacar a caracterização fenotípica em NPPs e no nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans* (Maupas) Dougherty na presença do tioxazafeno. Ao que tudo indica, há um mecanismo de ação distinto dos observados para outros nematicidas comerciais, pois a mutagênese extensiva em *C. elegans* resultou em uma única variante resistente a concentrações elevadas de tioxazafeno. O resultado do mapeamento de polimorfismo de nucleotídeos no genoma desse mutante indica que a resistência ao composto é conferida por uma mutação dentro de genes que codificam proteínas que participam da translocação e síntese de proteínas (FASKE; BROWN; KELLY, 2022; SOUTH et al., 2019).

Conhecer o mecanismo de ação do tioxazafeno é imprescindível, pois além do conhecimento sobre o mecanismo poder contribuir para o uso mais racional desse nematicida, pode também, favorecer o desenvolvimento futuro de novos nematicidas mais eficientes. As ferramentas computacionais (*in silico*) compõem um dos meios mais rápidos e econômicos para conhecer os possíveis mecanismos de ação de compostos biologicamente ativos, uma vez que elas permitem simular, em curto espaço de tempo e com baixo custo, o funcionamento de sistemas em organismos vivos. Por exemplo, os métodos *in silico* podem ser usados para compreender a interação entre um composto químico e uma enzima, sem o risco que a experimentação traz (SURABHI; SINGH, BK, 2018).

Ante o exposto, buscou-se, no presente trabalho, utilizar ferramentas computacionais com o objetivo de: *i*) identificar, através de busca farmacofórica, ligantes de proteínas que

sejam estruturalmente semelhantes ao tiofazafeno; *ii*) Procurar por sequências de aminoácidos semelhantes às das proteínas selecionadas, através de buscas no genoma dos principais NPPs de importância agrícola; *iii*) Calcular para o tiofazafeno e para os ligantes selecionados as energias de afinidade pelas suas proteínas alvo; *iv*) modelar, através de métodos *in silico*, as estruturas 3D das sequências de aminoácidos selecionadas nos genomas de NPPs; *iv*) e calcular as energias de afinidade do tiofazafeno e de inibidores pelas estruturas 3D modeladas a partir de sequências de aminoácidos selecionadas nos genomas de NPPs.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Busca Conformacional e Otimização do Tiofazafeno

A estrutura tridimensional do tiofazafeno (Tabela 1) foi preparada com o programa ACD/Chemesketch v.2020.1.2 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada, <https://www.acdlabs.com/>), para logo serem calculados os seus estados de protonação (pKa) em pH 7,0 com o uso do programa MarvinSketch v.21.4 (<https://chemaxon.com/>). Todas as estruturas foram salvas no formato mol e convertidas ao formato sdf através do uso do programa OpenBabel v.2.4.1 (O'BOYLE et al., 2011). A seguir, foram feitas buscas conformacionais com o programa Open3Dalign v.2.3 (TOSCO; BALLE; SHIRI, 2011), através de 1.000 simulações por dinâmica molecular, usando o campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94). O solvente (água) foi implicitamente considerado com o uso do modelo Generalized Born-Surface Area (GBSA). Em seguida, as conformações mais estáveis e todas aquelas até 10 kcal/mol distantes das mais estáveis, foram otimizadas com o programa MOPAC 2016 (Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA), que usou o Hamiltoniano PM7 e considerou o solvente (água) pelo emprego do *Conductor-Like Screening Model* (COSMO) (STEWART, 1990). Por fim, aquelas conformações que apresentaram, segundo a distribuição de Boltzmann, uma população igual ou superior a 5%, foram salvas no formato pdb através do programa GABEDIT v. 2.5.0 (ALLOUCHE, 2011).

2.2 Seleção de Potenciais Alvos Proteicos Através de Busca Farmacofórica

Os ligantes de proteínas da base de dados do Ligand Expo (<http://ligand-expo.rcsb.org/>) (FENG et al., 2004) foram submetidos à adição de átomos de hidrogênio e convertidos ao formato mol2 com o uso do programa OpenBabel. Em seguida, foram submetidos à busca farmacofórica com o programa LiSiCA v.1.0.1 (LEŠNIK et al., 2015),

que usou os modelos farmacofóricos criados pelo próprio programa para as conformações mais estáveis do tioxazafeno. Apenas as proteínas cujos ligantes atenderam aos seguintes requisitos foram selecionadas para as fases seguintes: a) com escore de Tanimoto igual ou superior a 0,5; b) localizados em cavidades nas proteínas; c) sem ligação química covalente com a proteína.

2.3 Identificação dos Potenciais Alvos Proteicos nos Genomas de NPPs

Do RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) foram obtidos, em formato fasta, as sequências de aminoácidos das proteínas que, por cumprirem com os requisitos anteriormente citados, foram selecionadas a partir da busca farmacofórica. Com o uso do programa Ugene v.36.0 (OKONECHNIKOV et al., 2012), e com o emprego do algoritmo de alinhamento Clustal Omega v.1.2.2 (SIEVERS; HIGGINS, 2014), as sequências de aminoácidos foram alinhadas e se calcularam as suas similaridades e dissimilaridades de Hamming, levando-se em consideração todos os *gaps*. Quando duas ou mais sequências de aminoácidos apresentavam similaridade acima de 95% entre elas, selecionou-se aquela enzima que apresentava a melhor resolução cristalográfica.

Através do National Center for Biotechnology Information (NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), que empregava o programa de alinhamento Blastp+ v.2.13.0 (ALTSCHUL et al., 1997; ALTSCHUL et al., 2005), foi feita a busca por sequências similares às das proteínas acima selecionadas, no genoma dos principais nematóides de importância agrícola: *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp., *Globodera* spp., *Pratylenchus* spp., etc. Sequências no genoma dos nematoides que apresentavam um escore acima de 200, coberturas de sequência maior ou igual a 95%, e funções biológicas semelhantes, foram selecionadas como possíveis alvos do tioxazafeno.

2.4 Seleção de Estruturas 3D de Proteínas do Choque Térmico 90 (Hsp90)

Seguindo o procedimento anteriormente descrito para a identificação do alvo proteico nos genomas dos NPPs, foram obtidos do Protein Data Bank, os arquivos fasta e pdb das proteínas com 95% ou mais de similaridade em relação à sequência de aminoácidos da Hsp90 3BM9 (GOPALSAMY et al., 2008). Após o alinhamento das sequências com o Ugene, conforme descrito acima, foram descartadas todas as Hsp90 com 60% ou menos de similaridade em relação à proteína 3BM9. Com o uso do *software* UCSF Chimera v.1.16.1

(<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (PETTERSEN et al., 2004), foram descartadas as proteínas que apresentavam ligantes localizados fora do sítio de ligação do ATP em Hsp90, ou que estivessem fora de cavidades; assim como aquelas que apresentavam resíduos faltantes na região do domínio catalítico (ATPase) N-terminal (DNT).

Com o emprego do *script* em Python: MakeMultimer.py (<http://watcut.uwaterloo.ca/tools/makemultimer/>), foram obtidos os arquivos pdb das unidades biológicas das enzimas similares a 3BM9. As estruturas tridimensionais resultantes foram alinhadas com o programa computacional Lovoalign v.21.027 (MARTÍNEZ; ANDREANI; MARTÍNEZ, 2007), que também foi utilizado para calcular a raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) para cada par de estrutura tridimensional. Aquelas estruturas que apresentavam valores de RMSD acima de 6 Å em relação à 3BM9 foram descartadas.

2.5 Modelagem 3D das Hsp90 Produzidas por *H. glycines*

Previamente à modelagem das sequências AAO14563 e ACR57216, que correspondem as Hsp90 de *H. glycines* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/40956306>), foram feitas avaliações das referidas sequências com vistas a identificar possíveis locais de clivagem, peptídeos sinalizadores, localizações subcelulares, presença de ligações dissulfeto, acessibilidade de solvente etc. Para tal propósito se empregaram os seguintes serviços computacionais: Peptide Cutter (GASTEIGER et al., 2003; https://web.expasy.org/peptide_cutter/), Predict Protein (BERNHOFER et al., 2021; <https://predictprotein.org/>), SignalP 5.0 (ARMENTEROS et al., 2019; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), SPEPLip (FARISELLI; FINOCCHIARO; CASADIO, 2003; http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/spep/pred_spepcgi.cgi), Sigcleave (VON HEIJNE, 1986; <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/sigcleave>), PrediSi (NIELSEN et al., 1997; <http://www.predisi.de/index.html>), Phobius (KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2007; <https://phobius.sbc.su.se/>), Signal-CF (CHOU; SHEN, 2007; <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-CF/>), Signal-3L (ZHANG; PAN; SHEN, 2020; <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L/>), DeepLoc-1.0 (ARMENTEROS et al., 2017; <http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc-1.0/index.php>), BaCelLo (PIERLEONI et al., 2006; <http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello/index.htm>), Euk-mPLoc 2.0 (CHOU; SHEN, 2010; <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>), LocTree3 (GOLDBERG; HAMP; ROST, 2012; <https://roslab.org/services/loctree3/>), MultiLoc2 (BLUM; BRIESEMEISTER;

KOHLBACHER, 2009; <https://abi-services.informatik.uni-tuebingen.de/multiloc2/webloc.cgi>), YLoc (BRIESEMEISTER; RAHNENFÜHRER; KOHLBACHER, 2010; <https://abi-services.informatik.uni-tuebingen.de/yloc/webloc.cgi>), e Dipro (CHENG et al., 2005; <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/index.html>).

Para gerar as estruturas tridimensionais das sequências de aminoácidos, foram empregados métodos de modelamento por homologia (modelagem comparativa) fornecidos pelos servidores: Phyre2 (KELLEY et al., 2015; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), CPHmodels 3.2 (NIELSEN, et al., 2010; <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>), SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018; <https://swissmodel.expasy.org/interactive>), GalaxyWEB (KO et al., 2012; <http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=TBM>), M4T Server v 3.0 (FERNANDEZ-FUENTES et al., 2007; <http://manaslu.fiserlab.org/M4T/>), FALCON2 (KONG et al., 2021; <http://protein.ict.ac.cn/TreeThreader/>), I-TASSER (YANG; ZHANG, 2015; <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), LOMETS (WU; ZHANG, 2007; <https://zhanggroup.org/LOMETS/>), Raptor-X (KÄLLBERG et al., 2012; <http://raptorx.uchicago.edu/StructPredV2/predict/>); IntFOLD (MCGUFFIN et al., 2019; http://www.reading.ac.uk/bioinf/IntFOLD/IntFOLD5_form.html), e HHPred (ZIMMERMANN et al., 2017; <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>). Dado que Hsp90 experimenta mudanças conformacionais durante o seu ciclo ATPase, o que permite obter estruturas cristalográficas de Hsp90 em estados aberto e fechado, considerou-se necessário construir modelos com arranjos conformacionais em ambos os estados. Como os métodos acima descrito forneceram modelos em estado fechado, para a obtenção de modelos em estado aberto foram empregados os serviços de modelagem com seleção manual de molde em estado aberto: AlphaFold2 (CRAMER, 2021; <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb?authuser=0#scrollTo=33g5IIegij5R>), SWISS-MODEL e Robetta (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004; <http://rosetta.bakerlab.org/>). Em todos os casos, utilizaram-se os valores padrões para todos os parâmetros disponíveis. Todos os modelos tridimensionais gerados foram empregados na etapa seguinte.

2.6 Avaliação da Qualidade Tridimensional de cada Modelo Gerado para as Sequências AAO14563 e ACR57216

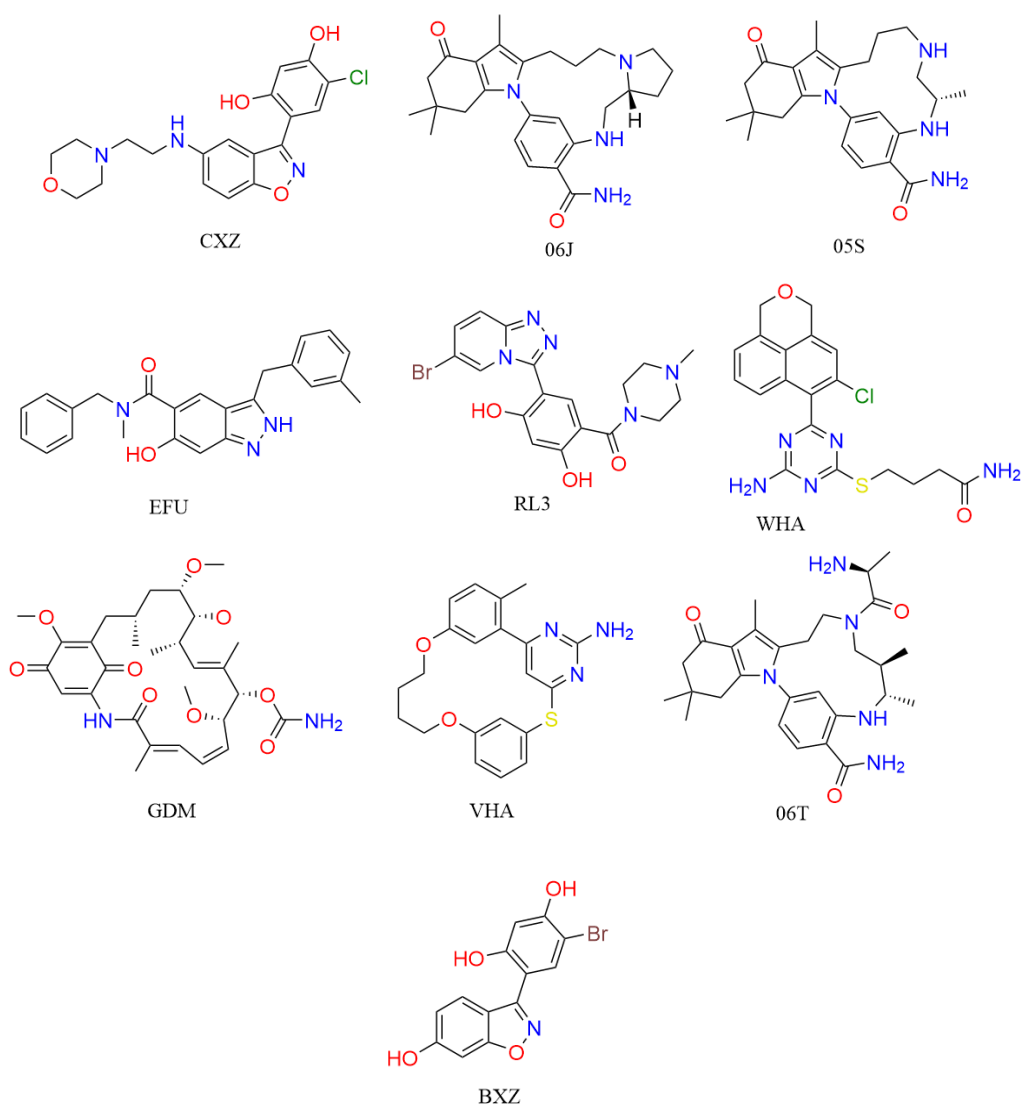
Todos os arquivos pdb dos modelos gerados foram padronizados com o uso do algoritmo PSFgen, que faz parte do programa computacional VMD v. 1.9.3 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). Em seguida, avaliaram-se suas qualidades estereoquímicas e geométricas através do emprego de diferentes servidores tais como: ProTSAV (SINGH et al., 2016; <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/proteomics/protsav.jsp>), ModFOLD (MAGHRABI; MCGUFFIN, 2017; http://www.reading.ac.uk/bioinf/ModFOLD/ModFOLD6_form.html), QMEAN (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011; <https://swissmodel.expasy.org/qmean/>), PSICA (WANG et al., 2019; <http://qas.wangwb.com/~wwr34/mufoldqa/index.html>), e VoroMQA (OLECHNOVIČ; VENCLOVAS, 2017; <https://bioinformatics.lt/wtsam/voromqa>). Os resultados de pontuação (escore: 0 a 1) foram organizados e analisados para logo selecionar aqueles modelos com estado aberto e estado fechado, que apresentavam as melhores características estruturais.

2.7 Ancoramento Molecular (*Docking*) nas Hsp90 não Produzidas por *H. glycines* e nos Modelos Construídos para as Sequências AAO14563 e ACR57216

Para o ancoramento molecular nas Hsp90 não produzidas por *H. glycines*, foram utilizadas as estruturas tridimensionais mais estáveis do tiozafeno e de ligantes selecionados aleatoriamente entre o conjunto de compostos inibidores de Hsp90 obtidos do RCSB Protein Data Bank. Entre os ligantes selecionados estão: EFU (*N*-benzil-6-hidroxi-*N*-metil-3-(3-metilbenzil)-1*H*-indazol-5-carboxamida); RL3 ([5-(6-bromo[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]piridin-3-il)-2,4-diidroxifenil](4-metilpiperazin-1-il)metanona); WHA (4-{[4-amino-6-(5-cloro-1*H*,3*H*-benzo[de]isocromen-6-il)-1,3,5-triazin-2-il]sulfanil}butanamida); GDM (carbamato de (4*E*,6*Z*,8*S*,9*S*,10*E*,12*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-13-hidroxi-8,14,19-trimetoxi-4,10,12,16-tetrametil-3,20,22-trioxi-2-azabicyclo[16.3.1]docosa-1(21),4,6,10,18-pentaen-9-ila); VHA (22-metil-13,18-dioxa-7-tia-3,5-diazatetraciclo[17.3.1.1~2,6~.1~8,12~]pentacosa-1(23),2(25),3,5,8(24),9,11,19,21-nonaen-4-amina); BXZ (4-bromo-6-(6-hidroxi-1,2-benzisoxazol-3-il)benzeno-1,3-diol); CXZ (4-cloro-6-{5-[(2-morfolin-4-iletil)amino]-1,2-benzisoxazol-3-il}benzeno-1,3-diol); 06J ((3*aR*)-13,13,16-trimetil-15-oxo-1,2,3,3*a*,4,5,12,14,15,17,18,19-dodecahidro-13*H*-10,6-(meteno)pirrolo[2',1':3,4][1,4,9]triazacicotetradecino[9,8-*a*]indol-7-carboxamida); 05S ((6*S*)-6,15,15,18-tetrametil-17-oxo-2,3,4,5,6,7,14,15,16,17-decaidro-1*H*-8,12-(meteno)[1,4,9]triazacicotetradecino[9,8-*a*]indol-9-carboxamida); e 06T ((5*R*,6*S*)-3-(*L*-alanil)-

5,6,15,15,18-pentametil-17-oxo-2,3,4,5,6,7,14,15,16,17-decahidro-1*H*-12,8-(meteno)[1,5,9]triazaciclodecino[1,2-*a*]indol-9-carboxamida) (Figura 1). Para o ancoramento nas Hsp90 modeladas a partir das sequências AAO14563 e ACR57216, foram empregados 47 ligantes diferentes e o tioxazafeno. Todos os ligantes foram previamente submetidos à busca conformacional e otimização através dos procedimentos anteriormente descritos para o tioxazafeno (seção 2.1).

Figura 9 - Estruturas químicas de ligantes inibidores de Hsp90, que estavam experimentalmente complexados às enzimas 4EFU, 4L90, 3WHA, 1YET, 3VHA, 3BMY, 3R92, 3QTF, 3RKZ; e que foram empregados no ancoramento molecular nas Hsp90 não produzidas por *Heterodera glycines*.



Fonte: Do autor (2022).

Com o uso do programa VMD v.1.9.3 foram eliminados os *alternation locations* (altloc) de todos os arquivos pdb das Hsp90 co-cristalizadas com os ligantes acima selecionados: 4EFU, 4L90, 3WHA, 1YET, 3VHA, 3BMY, 3R92, 3QTF, 3RKZ e 3BM9. A seguir, com o uso do programa LovoAlign v.21.027, as proteínas foram alinhadas, junto com os modelos, à Hsp90 3BM9, para finalmente serem todos submetidos ao cálculo dos valores de RMSD.

Através dos *scripts* em Python `prepare_ligand4.py` e `prepare_receptor4.py`, que são módulos do programa AutoDockTools (ADT4) v.1.5.6 (MORRIS et al., 2009), foram preparados os arquivos pdbqt de ligantes e proteínas, respetivamente. No caso dos arquivos pdbqt das proteínas selecionadas, apenas os resíduos de aminoácidos foram utilizados, sendo descartado todo o restante no processo de preparação.

A região de ancoramento foi definida através do *script* em Python `GetBox.py` (<https://github.com/MengwuXiao/Getbox-PyMOL-Plugin#readme>), de forma que correspondesse à região na qual estava contida todos os ligantes mais 6 Å em cada direção, o que resultou nos seguintes valores para o *grid* de ancoramento: 30,5 x 25,4 x 22,7 Å³ (x, y, z).

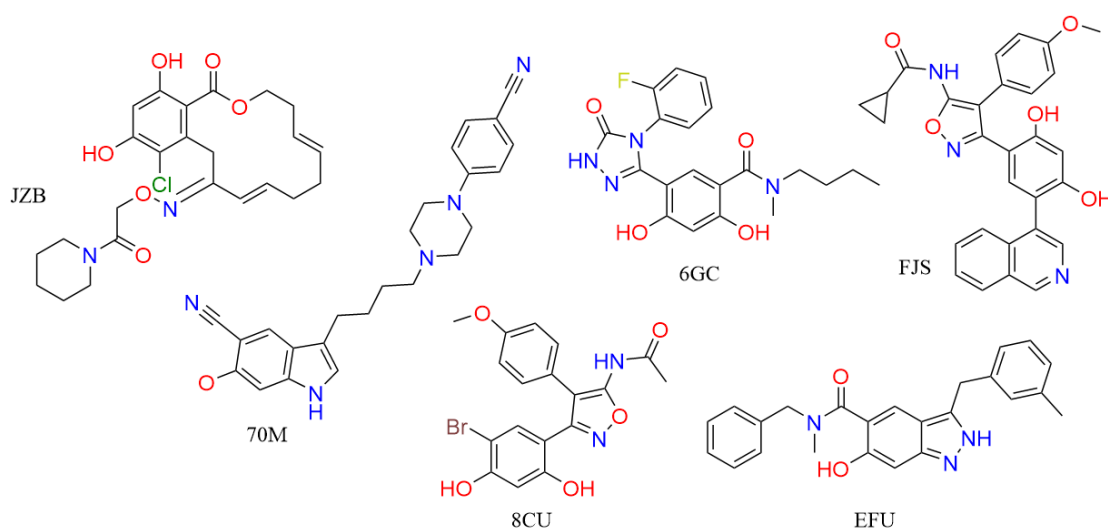
Com o uso dos programas AutoDock v.4.2.6 (MORRIS et al., 2009) e QuickVina v.2.1 (ALHOSSARY et al., 2015), foi feito o ancoramento molecular dos ligantes às proteínas. A exceção do parâmetro *exhaustiveness*, que foi elevado para 128 no QuickVina, todos os outros parâmetros permaneceram com os valores padrões. A validação dos métodos de ancoramento foi corroborada por observação visual e por determinação do valor de RMSD entre a estrutura ancorada computacionalmente, e aquela que foi obtida experimentalmente por cristalografia de raios X (*re-docking*). Para isto, empregaram-se visualizadores gráficos como UCSF Chimera, Pymol (the PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.1, Schrödinger, LLC), ⁺ProteinsPlus (<https://proteins.plus>), LigPlot⁺ v. 2.2.5 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011) e Discovery Studio (BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio v.20.1.0, San Diego: Dassault Systèmes, 2020).

2.8 Busca por Compostos que Possam Ligar-se mais Fortemente às Hsp90 Modeladas a Partir das Sequências AAO14563 e ACR57216

Utilizando as conformações mais estáveis dos inibidores da Hsp90 que apresentaram, no ancoramento molecular com os modelos das sequências AAO14563 e ACR57216, os melhores valores de energia de afinidade (Figura 10), foi feita uma busca farmacofórica na base de dados do MCULE (<https://mcule.com/>), a qual foi obtida em fevereiro de 2022

(6.716.167 compostos). Para tal propósito, seguindo os procedimentos anteriormente descritos para a busca farmacofórica com o tioxazafeno, foi utilizado o programa LiSiCa v.1.0.1. Em seguida, utilizando os ligantes que apresentaram escore de Tanimoto iguais ou superiores a 0,8, foram feitos os ancoramentos moleculares com o uso dos programas AutoDock v.4.2.6 e QuickVina v.2.1, nas Hsp90 modeladas a partir das sequências de aminoácidos acima citadas. Para o ancoramento foram levados em consideração as dimensões e parâmetros anteriormente citados para o ancoramento do tioxazafeno e dos ligantes inibidores selecionados do RCSB Protein Data Bank.

Figura 10 - Estruturas químicas de alguns ligantes inibidores de Hsp90 que apresentaram os melhores valores de energia de afinidade pelos modelos das sequências AAO14563 e ACR57216 e que foram submetidos à busca farmacofórica na base de dados do MCULE.



Fonte: Do autor (2022).

2.9 Análise estatística

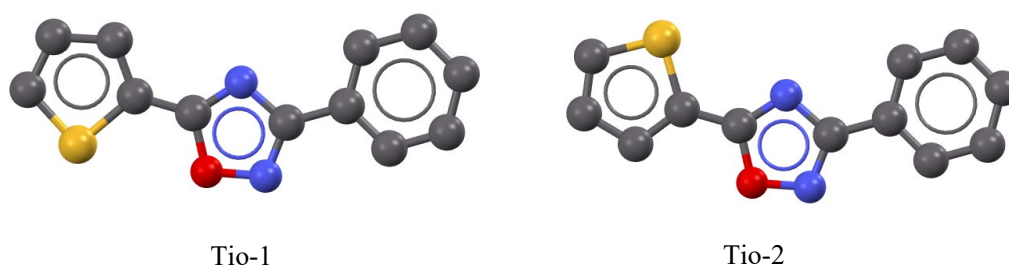
Os resultados de energia de afinidade (kcal/mol) obtidos através de cálculos com AutoDock e QuickVina, tanto para as proteínas do RCSB Protein Data Bank como para os modelos construídos (alvo proteicos), foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e subsequente comparação de médias com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), através do emprego do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Busca conformacional e farmacofórica

A busca conformacional por dinâmica molecular, empregando a mecânica molecular, seguida de otimização por método semi-empírico, revelou a existência de duas conformações energeticamente favoráveis para o tiozafeno (Tio-1 e Tio-2) com distribuições de Boltzmann de 10% e 90%, respectivamente (Figura 11).

Figura 11 - Representações tridimensionais das conformações mais estáveis do tiozafeno após dinâmica molecular (MMFF94) e otimização por mecânica quântica (Hamiltoniano PM7).



Fonte: Do autor (2022).

Após a busca farmacofórica no banco de dados do LiganExpo, foram selecionados 82 complexos diferentes com escores de Tanimoto maiores do que 0,5. Desses 82 complexos, 27 cumpriram com os requisitos anteriormente expostos (Tabela 3).

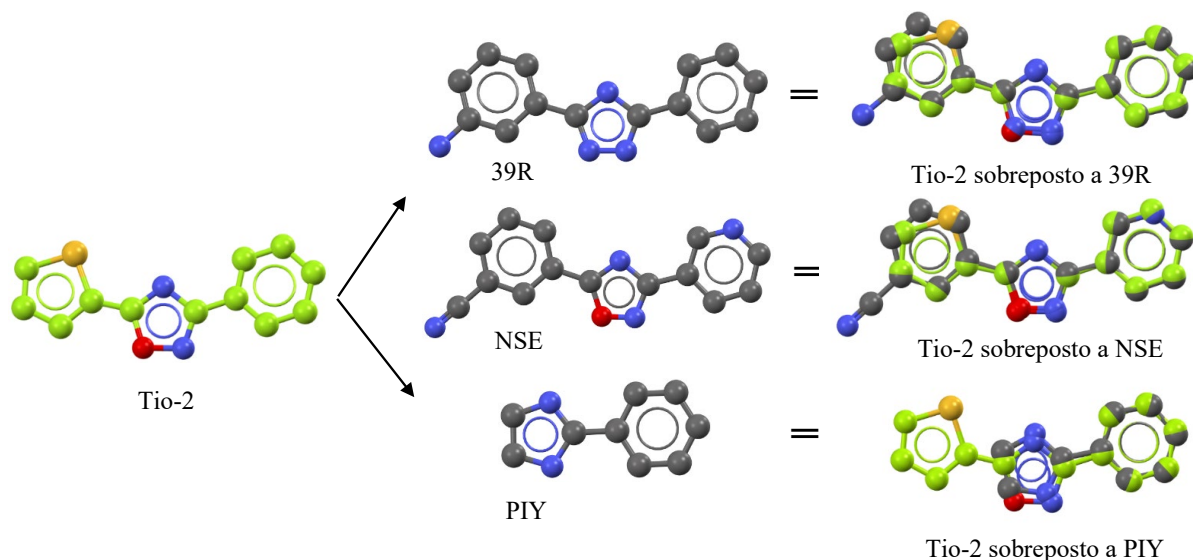
Tabela 3 - Ligantes e proteínas selecionadas durante a busca farmacofórica com o LiSiCa v.1.0.1, na base de dados do LigandExpo de março de 2020 (32.000 small molecules).

Complexo: Enzima + Ligante	Enzima: Organismo	Escore de Tanimoto
1wbg_L03_1_B_1248_D	Trombina: <i>Homo sapiens</i> .	0,5
3bm9_BXZ_1_A_1_B	Chaperona: <i>Homo sapiens</i> .	0,5
1e9x_PIM_1_A_470_C	Fenilacetato 2-hidroxilase: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,5
1f4t_PIM_1_B_411_I	Peroxidase: <i>Sulfolobus solfataricus</i>	0,5
1i48_CCO_1_L_611_JA	Liases: <i>Nicotiana tabacum</i>	0,5
1odo_PIM_1_A_1408_C	Oxidorrreductase: <i>Streptomyces coelicolor</i>	0,5
1phe_Piy_1_A_422_D	5-Monoxigenase: <i>Pseudomonas putida</i>	0,6
2d0t_PIM_1_B_1501_H	Indoleamina 2,3-dioxigenase: <i>Homo sapiens</i> .	0,5
2qge_MR6_1_B_200_D	Transtirretina: <i>Homo sapiens</i> .	0,5
2rfc_PIM_1_D_411_L	Monoxigenase: <i>Picrophilus torridus</i>	0,5
3e5k_PIM_1_A_501_C	Monoxigenase: <i>Streptomyces avermitilis</i>	0,5
3nc7_Piy_1_B_407_G	Sintase do ácido pulcherrimínico: <i>Bacillus subtilis</i>	0,6
4alu_79O_1_A_1308_C	Serina/treonina proteína quinase: <i>H. sapiens</i>	0,5
4bu8_27F_1_C_2165_K	ADP-ribosiltransferase: <i>H. sapiens</i>	0,5
4c35_NU3_1_A_1351_C	Quinase dependente de cAMP: <i>Bos taurus</i>	0,5
4nzb_NSE_1_M_301_MB	Proteína de ligação à acetilcolina: <i>Lymnaea stagnalis</i>	0,7
4o7e_2RN_1_B_202_G	Inibidor de transcrição: <i>H. sapiens</i>	0,5
4qye_3DL_1_A_301_B	Serina/treonina proteína quinase: <i>H. sapiens</i>	0,5
4tz2_39R_1_A_1205_F	Adenosinetrifosfatase: <i>H. sapiens</i>	0,7
4zp5_4QG_1_A_400_C	Serina/treonina proteína quinase: <i>H. sapiens</i>	0,5
5u5z_7VP_1_A_302_C	Peroxidase: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,6
5xkr_BZE_1_D_202_W	Desaminase: <i>Mycobacterium smegmatis</i>	0,5
5ym3_PIM_1_A_502_C	Citocromo-monooxigenase: <i>Salvia miltiorrhiza</i>	0,5
6gtb_FBK_1_A_304_E	Estradiol desidrogenase: <i>H. sapiens</i>	0,5
6t41_MFE_1_A_501_C	Quinase dependente de ciclina: <i>H. sapiens</i>	0,5
5t1m_7EM_1_B_601_F	Receptor de estrogênio: <i>H. sapiens</i>	0,5
5mar_7KE_1_B_403_Q	ADP-ribosiltransferase: <i>H. sapiens</i>	0,5

Fonte: Do autor (2022).

Dentre esses ligantes, os que apresentaram maiores relações estruturais com o tioxazafeno foram os seguintes: 39R (3-(5-fenil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)-anilina), NSE (3-(3-piridin-3-il-1,2,4-oxadiazol-5-il)benzonitrila) e PIY (2-fenil-1*H*-imidazol). Os seus escores de Tanimoto foram iguais a 0,70, 0,66 e 0,58, respetivamente (Figura 12).

Figura 12 - Sobreposição tridimensional de Tio-2 (cor verde) aos ligantes selecionados na busca farmacofórica, com os quais Tio-2 apresentou maior semelhança estrutural (cor cinza).



Fonte: Do autor (2022).

Como será observado no tópico a seguir, nenhum dos alvos desses ligantes (Figura 4) foram selecionados como possíveis *targets* do tioxazafeno. Entretanto, é interessante o fato de 39R estar cocrystalizado ao bromodominio de proteínas do tipo ATAD2 (*Atpase Family AAA Domain-Containing Protein 2*). Assim como as proteínas de choque térmico Hsp90, ATAD2 também pertence a família de proteínas ATPase (E.C.3.6.4), porém apresenta funções um tanto diferentes, uma vez que a energia da hidrólise do ATP em ATAD2 é usada na regulação transcricional de genes que participam ativamente dos sinais do ciclo celular. No entanto, as descobertas feitas sob estirpes de *C. elegans* resistentes ao tioxazafeno, mostram que esta resistência é devida a mutações em genes que codificam proteínas que participam no processo de replicação e tradução de proteínas (SOUTH et al., 2019).

3.2 Análise das Proteínas nos Genomas dos Principais NPPs

Quando as sequências de aminoácidos das proteínas anteriormente selecionadas (Tabela 2) foram empregadas na busca por sequências similares nos genomas dos principais NPPs, apenas 8 das 27 proteínas apresentaram escores acima de 200 e cobertura de sequência maior do que 90% (Tabela 4). Este resultado sugere que apenas essas 8 proteínas podem ser

produzidas por *Meloidogyne* spp. e *H. glycines*, o que significa que são potenciais alvos enzimáticos do tiozafeno.

Tabela 4 - Resultados da busca por seqüências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas após a busca farmacofórica com o tiozafeno e que apresentaram escores acima de 200, com uma cobertura maior do que 90%. Os alinhamentos foram feitos com *Blastp* 2.10.0+, no banco de genomas de nematoides (taxid: 315429 e 6301) do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI.

Código* enzima	Família NPPs	Espécie (s)	Total score	Cobertura (%)	Código** da seqüência no genoma dos NPPs
1WBG	Meloidogynidae	<i>M. incognita</i>	229	96	ABQ02009.1
		<i>M. enterolobii</i>	288	95	CAD2144476.1
		<i>M. enterolobii</i>	291	96	CAD2148955.1
		<i>M. enterolobii</i>	291	96	CAD2189708.1
3BM9	Meloidogynidae	<i>M. enterolobii</i>	287	95	CAD2197692.1
		<i>M. artiellia</i>	285	96	CAU15486.1
		<i>M. incognita</i>	268	95	ADD10372.1
		<i>M. enterolobii</i>	244	95	CAD2159866.1
		<i>H. glycines</i>	291	96	ACR57216.1
3BM9	Heteroderidae	<i>H. glycines</i>	290	96	ACR57215.1
		<i>H. glycines</i>	286	96	AAO14563.2
		<i>M. artiellia</i>	239	90	CAD56894.1
		<i>M. enterolobii</i>	238	90	AMA07359.1
4ALU	Meloidogynidae	<i>M. incognita</i>	238	90	ABI96897.1
		<i>M. incognita</i>	208	90	ADF45514.1
		<i>M. artiellia</i>	214	90	CAD56892.1
4C35	Meloidogynidae	<i>M. enterolobii</i>	259	90	AMA07359.1
		<i>M. enterolobii</i>	265	90	AMA07359.1
		<i>M. incognita</i>	265	90	ABI96897.1
4QYE	Meloidogynidae	<i>M. artiellia</i>	263	90	CAD56894.1
		<i>M. artiellia</i>	265	98	CAD56895.1
		<i>M. incognita</i>	216	91	ADF45513.1
		<i>M. incognita</i>	258	98	ABI96897.1
		<i>M. enterolobii</i>	255	98	AMA07359.1
4ZP5	Meloidogynidae	<i>M. artiellia</i>	254	98	CAD56894.1
		<i>M. enterolobii</i>	302	90	AMA07359.1
		<i>M. incognita</i>	301	90	ABI96897.1
6T41	Meloidogynidae	<i>M. artiellia</i>	298	90	CAD56894.1

*De acordo com o RCSB Protein Data Bank (Disponível em: <https://www.rcsb.org>).

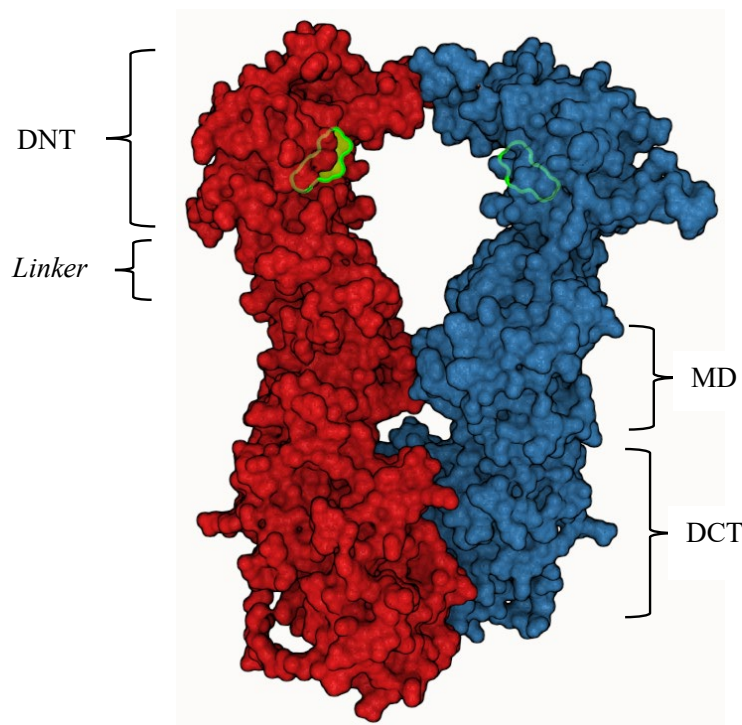
** De acordo com o NCBI (Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Fonte: Do autor (2022).

Somando-se os resultados dos alinhamentos das seqüências de aminoácidos, com as análises de semelhança estrutural e funcional entre as proteínas selecionadas, concluiu-se que várias enzimas deveriam ser descartadas, restando apenas a proteína do choque térmico 90 (Hsp 90) de código 3BM9, que se trata de uma chaperona de 90 kDa (GOPALSAMY et al.,

flexible linker, é essencial para a fusão da chaperona com suas proteínas clientes e co-chaperonas; c) e o domínio C-terminal (DCT), que permite a dimerização das cadeias através de duas hélices carboxi-terminais, formando um feixe de quatro hélices (Figura 14).

Figura 14 - Estrutura e localização dos domínios DNT, MD e DCT no homodímero da proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Para maior clareza, as cadeias da Hsp90 foram distintamente coloridas. O ligante ATP está marcado de cor verde fosforescente na região DNT.



Fonte: Do autor (2022).

No nível celular, as Hsp90 servem como máquinas de dinâmica molecular que ajudam na obtenção das conformações corretas de várias proteínas após as suas sínteses (ERLEJMAN et al., 2014). Conseqüentemente, as Hsp90 podem interagir com um sem número de proteínas clientes tais como proteínas quinases, fatores de transcrição, receptores de hormônio, telomerasas, proteínas para o processamento do RNA, entre outras (WAYNE; MISHRA; BOLON, 2011). Perturbações induzidas experimentalmente na função chaperona da Hsp90, mostraram que também atua como um tampão de variabilidade genética pré-existente e críptica (RYAN; BROWNLIE; WHYARD, 2016). Assim, a Hsp90 contribui para a restrição de mudanças genéticas, tanto através da regulação dos complexos de reparo do DNA envolvidos na manutenção da fidelidade genética, quanto através da supressão de movimentos de elementos transponíveis dentro do genoma (PIACENTINI et al., 2014).

Em nematoides como *Brugia pahangi* Buckley & Edeson Buckley, *Brugia malayi* (Brug) Buckley, *Schistosoma mansoni* Sambom, *Ancylostoma caninum* Ercolani, entre outros, a Hsp90 é essencial para a sobrevivência no interior do hospedeiro, que é bastante hostil para esses nematoides (DEVANEY et al., 2005; GELMEDIN et al., 2015; WENKERT et al., 2010). No nematoide de vida livre *C. elegans*, a Hsp90 é imprescindível para o desenvolvimento larval (L2-L4) e longevidade do nematoide, uma vez que sua atividade chaperona estabiliza o fator de transcrição nuclear DAF-16/FOX, responsável pela ativação de genes envolvidos na longevidade, lipogênese, estresse oxidativo, glicólise, imunidade inata e reprodução (SOMOGYVÁRI; GECSE; SÓTI, 2018).

Por sua importância para a vida da célula, Hsp90 é um alvo considerável para intervenções quimioterápicas de doenças causadas por microrganismos, assim como para o tratamento de doenças autoimunes e câncer (ANTOLIN et al., 2021). Um sem número de produtos naturais e pequenas moléculas sintéticas têm surgido como inibidoras da Hsp90, afetando assim a atividade de suas proteínas clientes. Muitos desses inibidores ligam-se ao sítio do ATP na região DNT, agindo como antagonistas competitivos do ATP.

A partir da fermentação empregando microrganismos para a produção de antibióticos, foram isolados dois potentes inibidores naturais de Hsp90, a geldanamicina (GM) e o radicicol (RD). Esses produtos naturais, especialmente GM, desempenharam uma função de vital importância na elucidação do papel biológico da Hsp90 no câncer (AMOLINS; BLAGG, 2009). Além disso, a forma única adotada pelo ATP quando ligado ao DNT foi usada como base para o projeto dos primeiros inibidores sintéticos (PEARL, 2016).

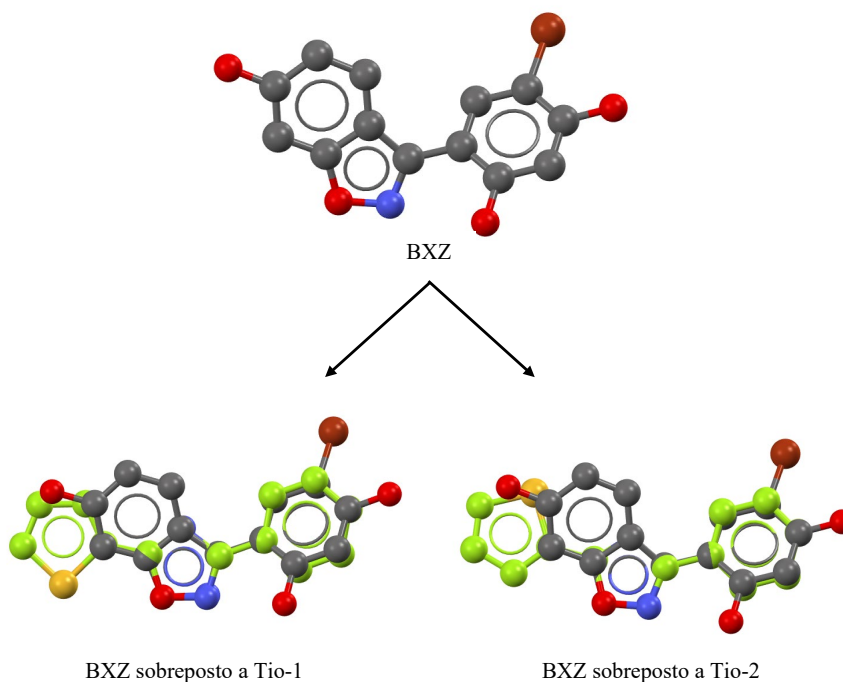
PU3 (9-butil-8-[(3,4,5-trimetoxifenil)-metil]-purin-6-amina) foi o primeiro inibidor sintético de Hsp90 ($EC_{50} = 20 \mu\text{mol/L}$) que, com a evolução das ferramentas computacionais, deu lugar a uma nova série de pirazóis e isoxazóis, com capacidades de inibição da proteína (SHARP et al., 2007; YANG et al., 2011).

Aparentemente, o nitrogênio protonado dos pirazóis acarreta menor interação atrativa de tais substâncias pelo DNT. Consequentemente, a troca de um dos átomos de N por O, o que resulta nos isoxazóis, aumenta a eficiência da interação atrativa pelo DNT, tornando os isoxazóis melhores inibidores da Hsp90 (SHARP et al., 2007). Assim surgiu o BXZ (4-bromo-6-(6-hidroxi-1,2-benzisoxazol-3-il)benzeno-1,3-diol), um benzisoxazol que age como um potente inibidor de Hsp90 em diferentes linhagens de células de câncer humano ($EC_{50} = 190 \text{ nM}$). O seu poder no tratamento do câncer se deve ao fato de interromper as atividades das proteínas clientes da Hsp90 tais como Her2, Raf-1, CDK-4, EGFR e Akt fosforilada (GOPALSAMY et al., 2008; TALDONE; SUN; CHIOSIS, 2009).

A Hsp90 3BM9, produzida pelo *Homo sapiens* (L.), foi co-cristalizada com o inibidor BXZ, o qual apresentou semelhança farmacofórica correspondente a escore de Tanimoto 0,52, com o nematicida tiozazafeno (Figura 7). Vale mencionar que o tiozazafeno pertence ao grupo dos 1,2,4 oxadiazóis que, assim como os isoxazóis, apresentam potentes atividades biológicas. Em agricultura, os oxadiazóis têm sido amplamente utilizados como pesticidas, fungicidas e nematicidas (ZHU *et al.*, 2020).

Vários análogos de oxadiazóis (1,2,4 e 1,3,4) têm sido reportados como excelentes agentes quimioterapêuticos no tratamento contra o câncer. Por exemplo, o *N*-(3-(5-((2-((2-nitrofenil)amino)-2-oxoetil)tio)-1,2,4-oxadiazol-2-il)fenil)benzamida e o 4-(5-(benziltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-2-metoxifenol estão entre os mais potentes inibidores de proteínas quinases (IC_{50} = 1,9 μ mol/L) (FATHI *et al.*, 2019). Aparentemente, os oxadiazóis têm como alvos as vias de sinalização nas quais participam o fator nuclear de resposta ao estresse (NF- κ B), o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o proto-oncogene Raf, entre outras proteínas que participam da sinalização e controle do ciclo celular (MOHAN *et al.*, 2018).

Figura 15 - Estrutura tridimensional do ligante BXZ (4-bromo-6-(6-hidroxi-1,2-benzisoxazol-3-il)benzeno-1,3-diol), que foi selecionado na busca farmacofórica, e sobreposição tridimensional do mesmo (cor cinza) com as conformações mais estáveis do tiozazafeno (cor verde).



Fonte: Do autor (2022).

3.3 Seleção de Estruturas Tridimensionais de Proteínas do Choque Térmico (Hsp90)

Do RCSB Protein Data Bank foram selecionadas 307 estruturas tridimensionais de Hsp90, cujas sequências de aminoácidos apresentaram 95% ou mais de similaridade com 3BM9. Após o descarte de estruturas que não cumpriram com os requisitos anteriormente expostos, restaram 46 Hsp90 e seus ligantes (Tabela 5). Assim como no caso da 3BM9, todas as outras Hsp90 até aqui selecionadas tinham a região DNT, que possui em torno de 225 resíduos de aminoácidos.

Tabela 5 - Hsp90 semelhantes a 3BM9, cujos ligantes foram selecionados para ancoramento nos modelos das Hsp90 produzidas por *Heterodera glycines*. (Continua)

Código Enzima*	Nº de resíduos	Ligante inibidor	Literatura: DOI
1YET	228	GDM	10.1016/s0092-8674(00)80203-2
3B24	229	B2J	10.1016/j.bmcl.2011.08.001
3B25	229	B2K	10.1016/j.bmcl.2011.08.001
3B26	229	B2L	10.1016/j.bmcl.2011.08.001
3B27	229	B2T	10.1016/j.bmcl.2011.08.001
3B28	229	B2X	10.1016/j.bmcl.2011.08.001
3BM9	226	BXZ	10.1021/jm701385c
3BMY	226	CXZ	10.1021/jm701385c
3INW	228	JZB	10.1002/cbic.200900494
3INX	228	JZC	10.1002/cbic.200900494
3QTF	226	05S	10.1016/j.bmcl.2011.02.101
3R4M	228	WOE	10.1021/jm200128m
3R91	226	06H	10.1016/j.bmcl.2011.03.112
3R92	226	06J	10.1016/j.bmcl.2011.04.102
3RKZ	226	06T	10.1016/j.bmcl.2011.05.102
3VHA	229	VHA	10.1016/j.bmcl.2011.11.100
3VHC	229	VHC	10.1016/j.bmcl.2011.11.100
3VHD	229	VHE	10.1016/j.bmcl.2011.11.100
3WHA	229	WHA	10.1016/j.bmc.2013.11.036
4EEH	229	HH6	10.1016/j.bmcl.2012.04.121
4EFT	229	EFT	10.1016/j.bmcl.2012.04.121
4EFU	229	EFU	10.1016/j.bmcl.2012.04.121
4L8Z	228	RL1	10.1016/j.bmcl.2014.03.100
4L90	228	RL3	10.1016/j.bmcl.2014.03.100
4L91	228	X29	10.1016/j.bmcl.2014.03.100
4L93	228	S36	10.1016/j.bmcl.2014.03.100
4L94	228	S46	10.1016/j.bmcl.2014.03.100
5CF0	228	FJS	10.13538/j.1001-8042/nst.26.060503
5J64	228	6G7	10.1038/s41467-017-02258-w
5J6L	228	6GC	10.1038/s41467-017-02258-w
5LNY	229	70K	10.1021/acs.jmedchem.8b00080
5LNZ	229	70Z	10.1021/acs.jmedchem.8b00080
5LO0	229	70N	10.1021/acs.jmedchem.8b00080
5LO1	229	70L	10.1021/acs.jmedchem.8b00080
5LO5	229	70M	10.1021/acs.jctc.8b00230
5LO6	229	70O	10.1021/acs.jctc.8b00230
5OCI	229	9R8	10.1021/acs.jmedchem.8b00080
5OD7	229	H0T	10.1021/acs.jmedchem.8b00080
5ODX	229	9RZ	10.1021/acs.jmedchem.8b00080
5XQD	228	8CF	10.2210/pdb5XQD/pdb
5XQE	228	8CO	10.2210/pdb5XQE/pdb
5XR5	228	8CR	10.2210/pdb5XR5/pdb
5XR9	228	8CU	10.2210/pdb5XR9/pdb

Tabela 6 - Hsp90 semelhantes a 3BM9, cujos ligantes foram selecionados para ancoramento nos modelos das Hsp90 produzidas por *Heterodera glycines*. (Conclusão)

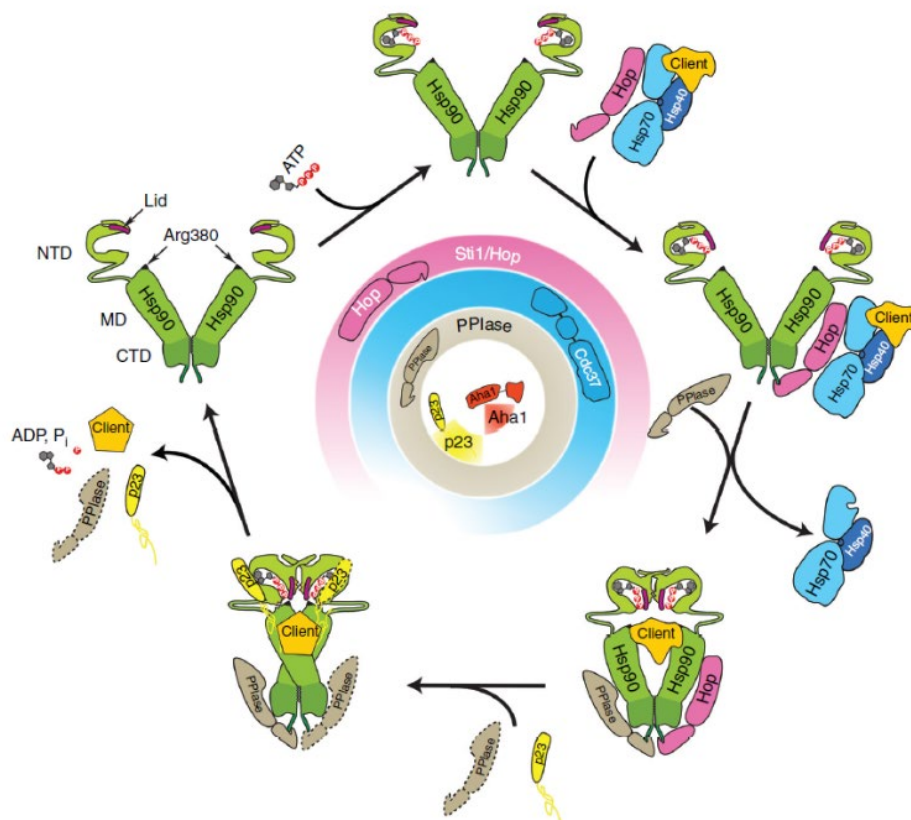
5XRB	228	8DU	10.2210/pdb5XRB/pdb
5XRD	228	9ZC	10.2210/pdb5XRD/pdb
5XRE	228	JX1	10.2210/pdb5XRE/pdb
6FCJ	229	D4W	10.1021/acs.jcim.9b00592

*De acordo com o RCSB Protein Data Bank (Disponível em: <https://www.rcsb.org>).

Fonte: Do autor (2022).

Em todos os casos, a região DNT das enzimas acima selecionadas se encontrava em sua configuração inativa, uma vez que o ATP-*lid* se encontrava aberto em todas as estruturas tridimensionais. Quando uma molécula do ATP se liga à região DNT, o fechamento do ATP-*lid* ocorre, dando início ao ciclo ATPase da Hsp90 (Figura 16).

Figura 16 - Ciclo da Hsp90. Após a ligação do ATP ao DNT, o ATP-*lid* se fecha sobre o nucleotídeo, permitindo que a Hsp90 transite por diferentes estados conformacionais durante o seu ciclo ATPase. Algumas co-chaperonas ligam-se preferencialmente a conformações específicas de Hsp90 (indicado pelos círculos de cores).



Fonte: Tomado de Biebl e Buchner (2019).

3.4 Modelagem e Avaliação dos Modelos Tridimensionais das Hsp90 Produzidas por *Heterodera glycines*: AAO14563 e ACR57216

Dado que ACR57215 e ACR57216 são 100% similares (Figura 5), só foram consideradas para a modelagem as sequências ACR57216 e AAO14563. As informações bioquímicas extraídas dessas sequências indicaram que são de natureza citoplasmática, sem peptídeos sinalizadores e sem a presença de pontes S-S.

Com os métodos de modelagem empregados, foram obtidos, para cada uma das sequências acima selecionadas, diferentes modelos que foram construídos a partir de *templates* de Hsp90 em estado aberto e fechado. Para obter os modelos em estado aberto foram utilizados os serviços de Swiss-Model, AlphaFold2_Advanced e Robetta (Tabela 6).

Tabela 7 - Resultado das modelagens das sequências ACR57216 e AAO14563, que foram selecionadas como possíveis alvos proteicos do tioxazafeno em *Heterodera glycines*. As sequências foram alinhadas a seus templates para logo calcular os seus valores de raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD).

Sequência	Servidor Modelagem	Nº de modelos	Melhor <i>Template</i> para modelo	RMSD*
• AAO14563 • ACR57216	Phyre2	1 1	5FWK; 2CG9	1,8; 2,7 1,3; 2,0
• AAO14563 • ACR57216	CPHmodels	1 1	5FWK	1,3 1,4
• AAO14563 • ACR57216	SWISS-MODEL	1 1	5ULS	1,7 1,7
• AAO14563 • ACR57216	GalaxyWEB	5 5	5FWK	$\bar{X} = 1,0$ $\bar{X} = 0,95^\dagger$
• AAO14563 • ACR57216	M4T Server	1 1	5FWK	1,3 1,2
• AAO14563 • ACR57216	FALCON2	10 10	5FWK; 2CGE; 2IOP; 2CG9; 5ULS	$\bar{X} = 2,5$; $\bar{X} = 3,3$; $\bar{X} = 10$; $\bar{X} = 2,8$; $\bar{X} = 3,6^\dagger$
• AAO14563 • ACR57216	I-TASSER	5 5	5FWK; 2CG9	$\bar{X} = 0,42$; $\bar{X} = 1,58$ $\bar{X} = 0,52$; $\bar{X} = 1,5$
• AAO14563 • ACR57216	LOMETS	5 5	5FWK; 2CG9	$\bar{X} = 3,8$; $\bar{X} = 3,6$ $\bar{X} = 3,4$; $\bar{X} = 3,1$
• AAO14563 • ACR57216	Raptor-X	1 1	5FWK	2,1 1,2
• AAO14563 • ACR57216	IntFOLD	5 5	5FWK; 2CG9	$\bar{X} = 3,3$; $\bar{X} = 3,0$ $\bar{X} = 3,2$; $\bar{X} = 3,1$
• AAO14563 • ACR57216	AlphaFold2_AD**	5 5	-----	-----
• AAO14563 • ACR57216	Robetta	4 4	2IOP; 2IOQ; 2O1U; 7KW7	2,0; 2,2; 1,2; 0,5 2,2; 2,1; 1,1; 0,45

* RMSD calculado com Lovoalign v.21.027.

**A versão avançada de AlphaFold2 não usa templates.

†Só foram considerados os valores médios para a sequências AAO14563

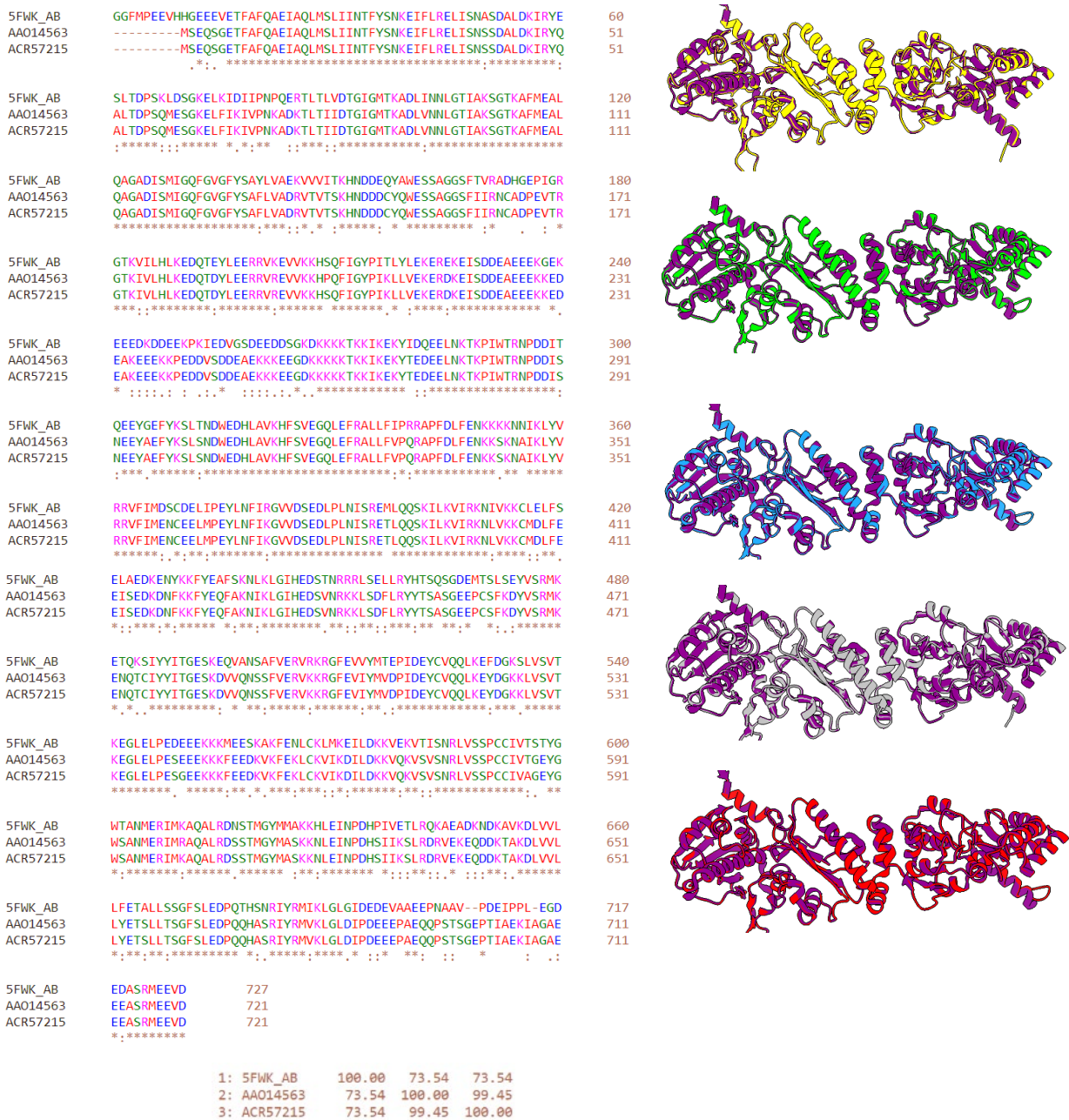
Fonte: Do autor (2022)

Após as avaliações das qualidades estruturais de todos os modelos, foram selecionados, para ancoramento molecular, os modelos fornecidos pelo GalaxyWEB server. Pelo menos 3 dos 5 serviços empregados para avaliar a qualidade dos modelos mostraram que os modelos do GalaxyWEB foram os melhores. Esses modelos foram construídos a partir das cadeias A e B da Hsp90 5FWK que, ao contrário do observado para 3BM9, encontra-se com a região DNT em estado fechado, já que foi co-cristalizada com o seu substrato natural, o ATP.

Vale mencionar que 5FWK é uma Hsp90 de origem humana que, além de estar co-cristalizada com o ATP, também está complexada com as co-chaperonas quinases Cdc37 (p50) e Cdk4, as quais são essenciais para que a Hsp90 interaja com aproximadamente 60% do kinoma da célula (VERBA et al., 2016).

Os alinhamentos entre as sequências de aminoácidos da Hsp90 5FWK, que foi usada como *template*, e as sequências ACR57216 e AAO14563, mostraram que essas proteínas apresentam 74% de similaridade, o que sugere que sejam altamente conservadas entre as espécies (Figura 17).

Figura 17 - Alinhamento* global das sequências AAO14563 e ACR57216 com a Hsp90 5FWK. A direita, alinhamento** 3D entre a cadeia A de 5FWK (roxa) e os modelos selecionados pelo GalaxyWeb para AAO14563: GAL1 (amarelo), GAL2 (verde), GAL3 (azul), GAL4 (cinza) e GAL5 (vermelho).



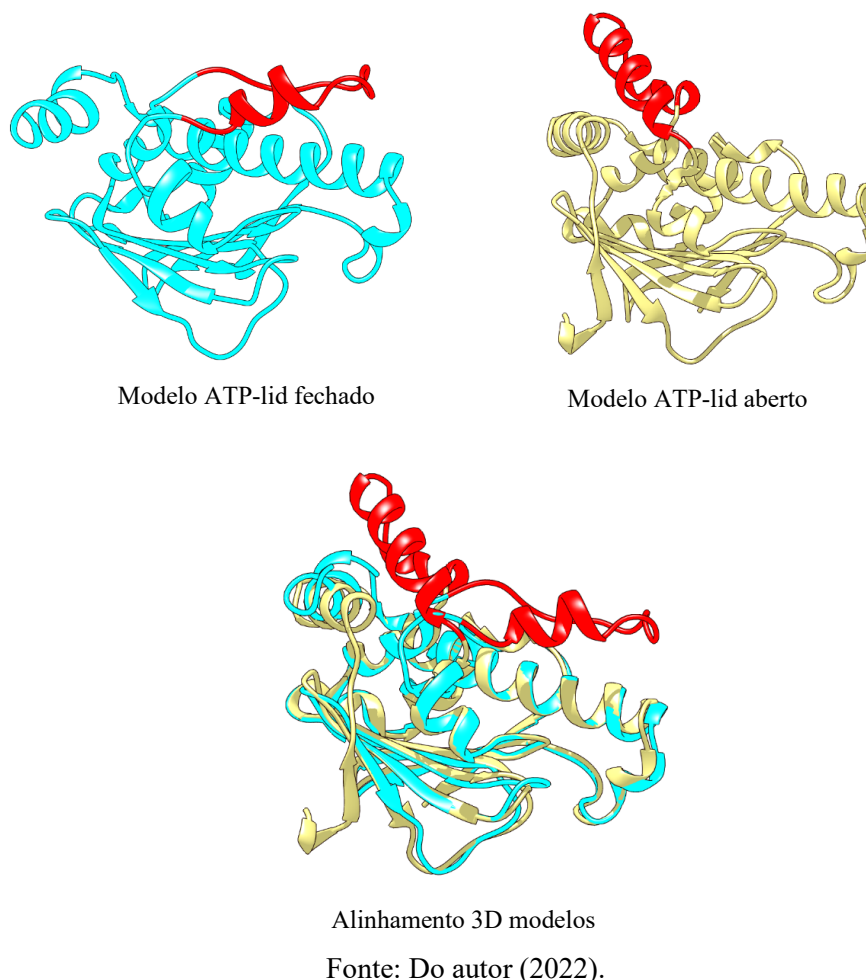
* Alinhamento feito com Clustal Omega v. 1.2.4 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

** Alinhamento feito com ChimeraX v.1.4. (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax>).

Para contrastar os resultados de ancoramento molecular com as Hsp90 na configuração *ATP-lid* fechada, foi necessário construir modelos para ACR57216 e AAO14563 que apresentavam a região DNT em seus estados *ATP-lid* aberto. Após avaliações das qualidades dos modelos fornecidos pelo AlphaFold2_Advanced, Swiss-Model e Robetta, foram selecionados, para ambas as sequências, os cinco melhores modelos fornecidos por esses programas.

A versão avançada de AlphaFold2 não usa *templates* quando há mais de 500 resíduos de aminoácidos na sequência a ser modelada. Logo, a geração de modelos com o *ATP-lid* em estado aberto foi algo automaticamente feito pelo programa. Quanto à modelagem com o Robetta e Swiss-Model, foram selecionados manualmente, a partir do RCSB Protein Data Bank, *templates* de Hsp90 que estavam com o *ATP-lid* aberto e que apresentavam resíduos de aminoácidos para a modelagem do protômero em sua totalidade (721 resíduos). Os modelos selecionados para esses dois programas foram construídos a partir das Hsp90 7KW7 e 2O1U, que correspondem a Hsp90 humana e do cão (*Canis lupus familiaris* L.), respectivamente (Figura 18).

Figura 18 - Representação gráfica que mostra a diferença estrutural entre a região DNT de um par de modelos desenhados para a sequência AAO14563. De cor vermelha é ressaltado o segmento ATP-*lid* como uma característica estrutural móvel que pode responder à ligação de ATP.



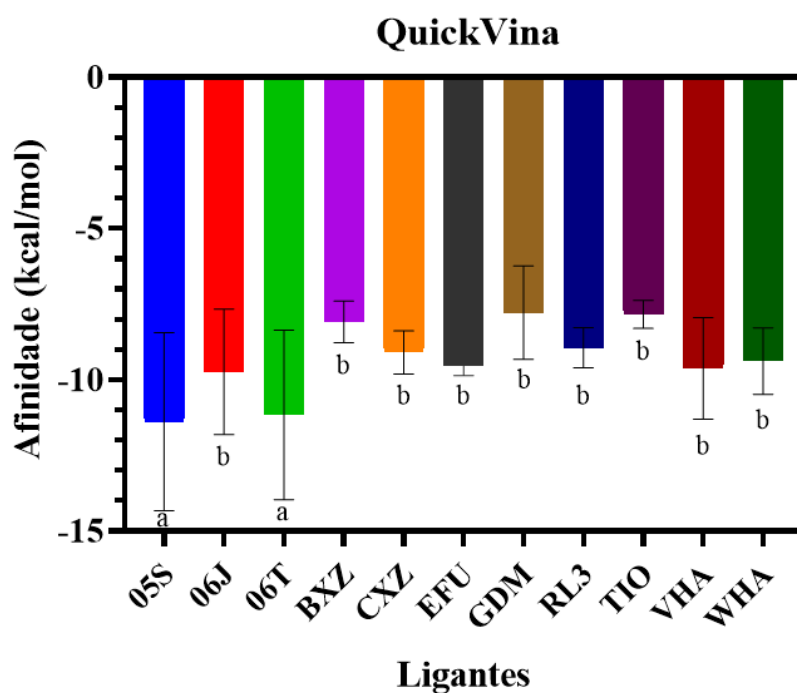
3.5 Docking Molecular nas Hsp90 não Produzidas por NPPs

Dentre as Hsp90 similares a 3BM9 presentes no RCSB Protein Data Bank, foram selecionadas, para esta primeira etapa exploratória sobre afinidade do tioxazafeno pelas Hsp90 não produzidas por NPPs, as seguintes: 4EFU, 4L90, 3WHA, 1YET, 3VHA, 3BM9, 3BMY, 3R92, 3QTF, 3RKZ e 3BM9. Os ligantes dessas proteínas (Figura 10) foram ancorados junto com o tioxazafeno, e serviram como método de avaliação da qualidade do ancoramento através de comparação do resultado teórico com o experimental (*Re-docking*).

De acordo com os cálculos feitos com o *software* QuickVina, o tioxazafeno se ligou às Hsp90 não produzidas por NPPs com uma energia de afinidade média de -7,8 kcal/mol. Comparado com os demais ligantes inibidores, incluindo o potente inibidor natural de Hsp90,

geldanamicina (GDM), o tioxazafeno não apresentou diferenças estatísticas significativas. No entanto, apresentou diferenças em relação aos ligantes inibidores 05S e 06T, os quais se ligaram à Hsp90 com uma energia média de -11,4 e -11,2 kcal/mol, respectivamente (Figura 19).

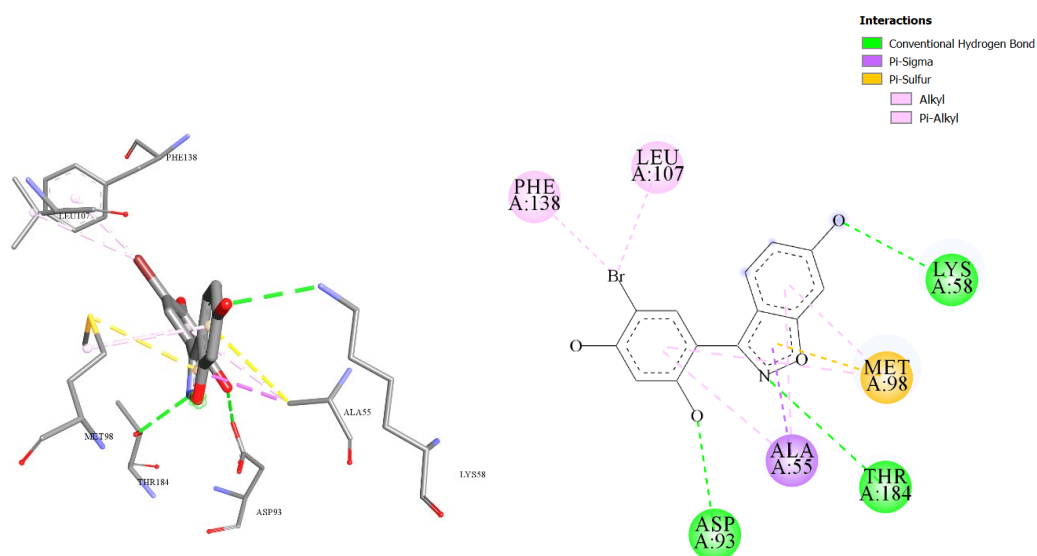
Figura 19 - Valores de afinidade (kcal/mol) pela Hsp90, obtidos com o uso do software QuickVina v.2.1 para o tioxazafeno (TIO) e para ligantes inibidores da Hsp90. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. As barras com mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).



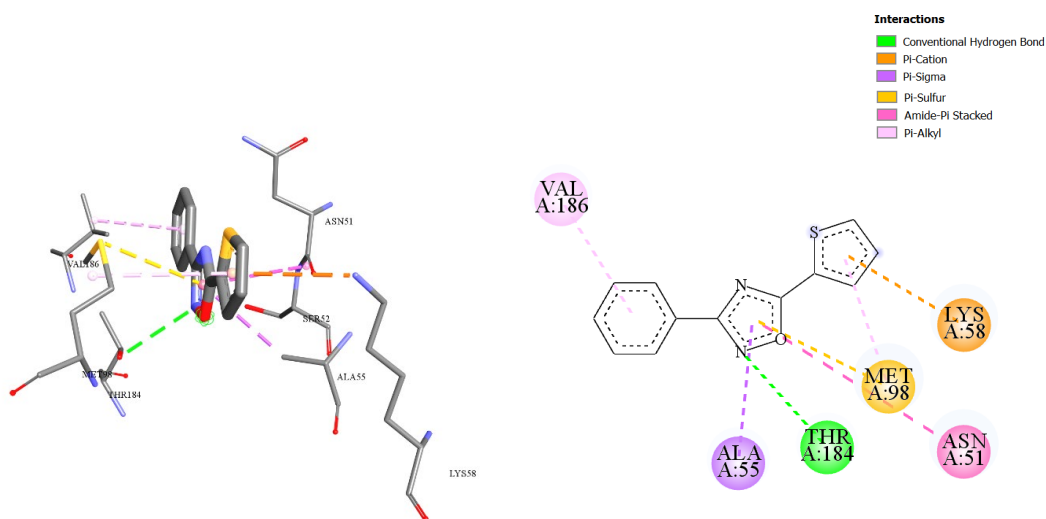
Fonte: Do autor (2022).

Por outro lado, o resultado qualitativo do ancoramento do tioxazafeno na Hsp90 3BM9 foi comparável, quanto à conformação adotada e aos resíduos com os quais interage, com o resultado experimental obtido para o ligante da busca farmacofórica: BXZ (Figura 20).

Figura 20 - Representação 3D e 2D dos modos de interação do ligante inibidor de Hsp90, BXZ, no cristal da proteína 3BM9, e do resultado de ancoramento do tiozafeno na mesma enzima através do *software* QuickVina v.2.1.



BXZ experimentalmente ancorado a 3BM9



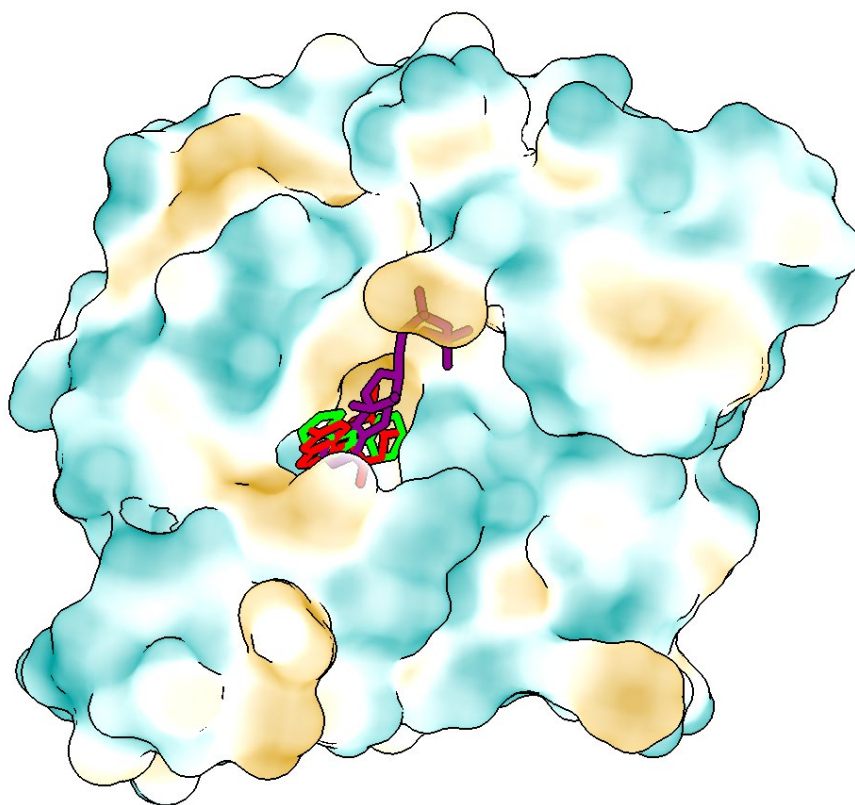
Tio-2 ancorado a 3BM9 pelo *software* QuickVina

Fonte: Do autor (2022).

O sítio de ligação do ATP na Hsp90 se encontra em uma cavidade profunda na face helicoidal da região DNT, a qual é revestida por resíduos predominantemente hidrofóbicos (Figura 21). Na estrutura cristalina, o nucleotídeo ligado faz extensas interações com os resíduos que revestem a bolsa e com várias moléculas de solvente altamente ordenadas que medeiam muitas das principais interações polares. A base de adenina do ATP penetra

profundamente na bolsa, com a face empacotada contra as cadeias laterais hidrofóbicas. No entanto, faz apenas duas ligações diretas de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Asp79 e Thr171; todas as suas outras interações polares são mediadas pela água (PEARL, 2016).

Figura 21 - Superfície molecular da região DNT de Hsp90, que foi colorida de acordo com o potencial de lipofilicidade (MLP) de Chimera X v.1.4. O resultado é mostrado com coloração na superfície molecular variando de azul ciano escuro (mais hidrofílico), passando por branco (menos hidrofílico), e terminando com dourado escuro (mais lipofílico). ADP (cor purpura), BXZ (cor vermelho) e TIO (cor verde).



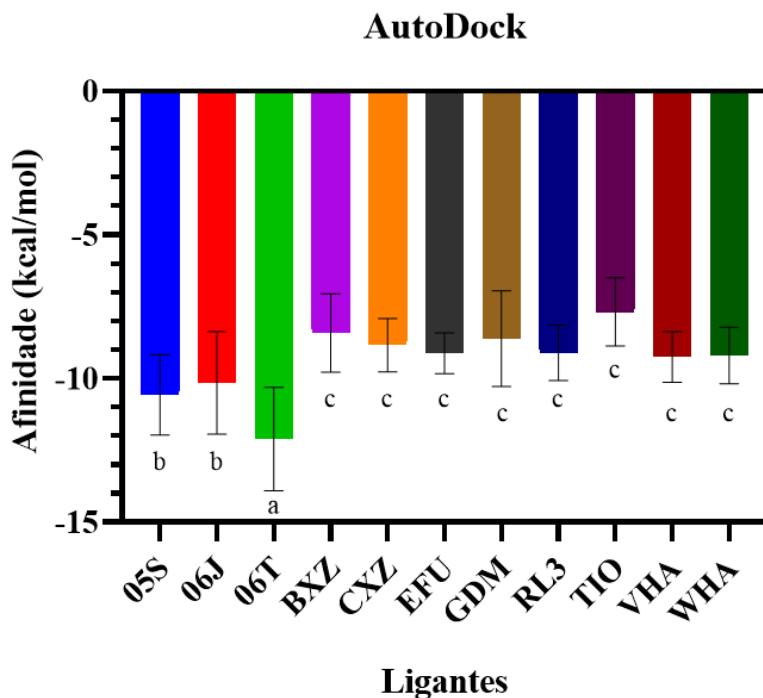
Fonte: Do autor (2022).

Em 3BM9, o anel benzisoxazólico de BXZ ocupa o mesmo espaço tridimensional da base adenina do ATP. No entanto, as posições com as quais BXZ faz ligações de hidrogênio na enzima mudam de Asp79 para Asp93, e de Thr171 para Thr184 (Figura 11). O *software* QuickVina ancorou o tiozazafeno em 3BM9 de tal forma que o anel oxadiazólico do tiozazafeno fica quase totalmente sobreposto ao anel benzisoxazólico de BXZ. Por ser mais

hidrofóbico que BXZ, o tioxazafeno só fez uma ligação de hidrogênio, que como se observa na Figura 21 foi compartilhada com o resíduo Thr184. É possível que, incorporando grupos hidroxílicos no anel benzênico do tioxazafeno, este possa interagir com o resíduo Asp93 em 3BM9, já que como foi demonstrado por GOPALSAMY *et al.*, (2008), o grupo 2'-hidróxi da porção resorcinol de BXZ desempenha um papel crucial na bolsa de ligação do ATP, permitindo-o e interagir com Asp93 e com moléculas de água.

Quando contrastados os resultados de afinidade com aqueles obtidos com o *software* AutoDock, observou-se que não houve diferenças significativas para nenhum dos ligantes até aqui considerados. Assim, por exemplo, o tioxazafeno apresentou afinidade de -7,7 kcal/mol, que foi comparável com a registrada pelo *software* QuickVina (-7,8 kcal/mol). No entanto, ocorreram diferenças significativas entre as afinidades do tioxazafeno e dos ligantes 05S, 06J e 06T (Figura 22). Com o QuickVina não houve diferença estatística significativa entre o tioxazafeno e o ligante 06J (-9,7 kcal/mol), enquanto com o AutoDock a afinidade calculada para 06J foi menor do que -10,0 kcal/mol, o que foi suficiente para afastar 06J do grupo do tioxazafeno.

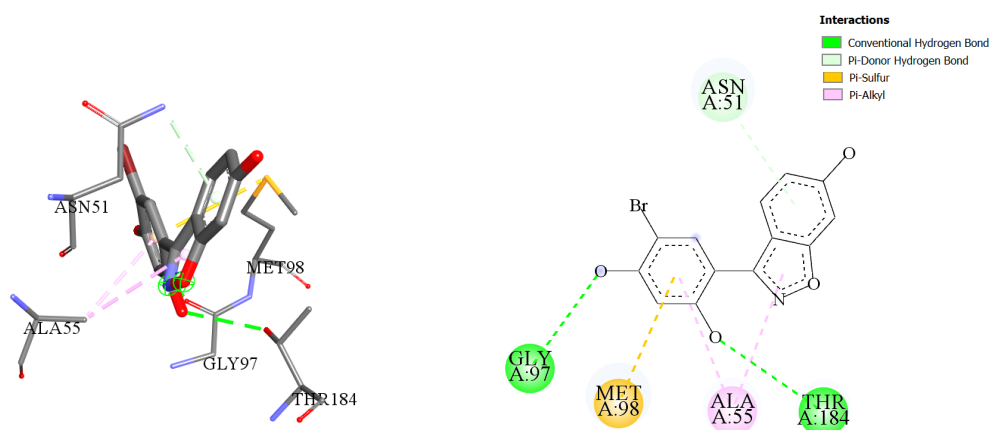
Figura 22 - Valores de afinidade (kcal/mol) obtidos com o uso do *software* AutoDock v. 4.2.6 para o tioxazafeno (TIO) e para os ligantes inibidores da Hsp90. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. As barras com a mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).



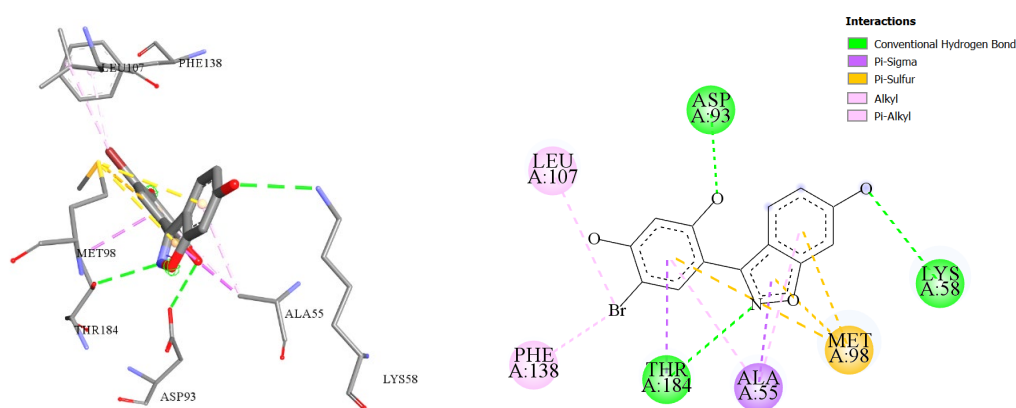
Fonte: Do autor (2022).

Embora os resultados tenham sido quantitativamente semelhantes para ambos os *softwares* de ancoramento empregados, diferenças qualitativas foram observadas para a maioria dos ligantes. Assim, por exemplo, o ancoramento feito com o AutoDock para o ligante BXZ em 3BM9 foi significativamente diferente do obtido com QuickVina (Figura 23). Para este último *software*, o resultado da interação entre BXZ e 3BM9 foi semelhante ao registrado experimentalmente, enquanto para AutoDock não ocorreu a mesma precisão na orientação e posicionamento do ligante re-ancorado.

Figura 23 - Representação 3D e 2D dos modos de interação do ligante inibidor BXZ na Hsp90 3BM9 após ancoramento com os *softwares* QuickVina v.2.1 e AutoDock v.4.2.6.



BXZ ancorado a 3BM9 pelo *software* AutoDock

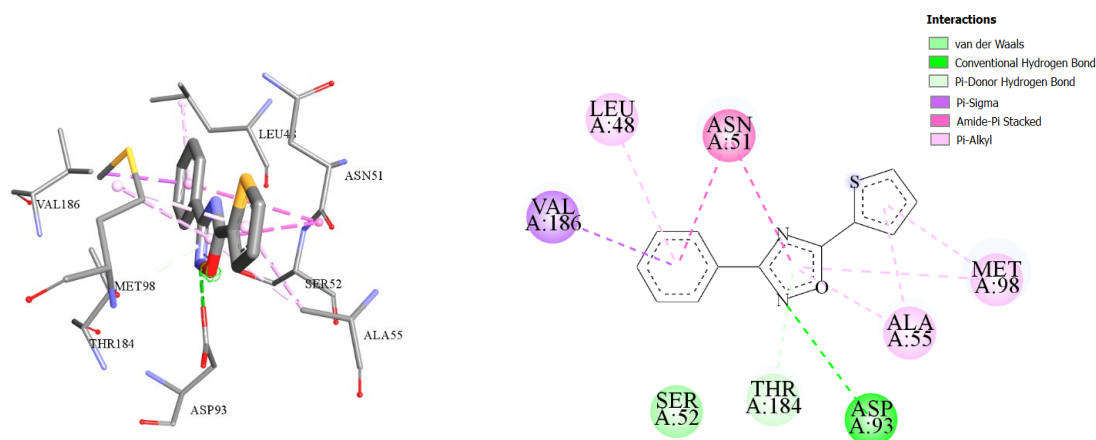


BXZ ancorado a 3BM9 pelo *software* QuickVina

Fonte: Do autor (2022).

Além disso, o resultado qualitativo para o tioxazafeno também foi diferente daquele obtido com QuickVina, quando ancorado na Hsp90 3BM9. Com o *software* AutoDock, o melhor resultado para o tioxazafeno ficou profundamente inserido na bolsa hidrofóbica de ligação do ATP, com o grupo oxadiazólico mais próximo da posição ocupada pela porção resorcinol do ligante BXZ. Como se observa na Figura 16, o nitrogênio da posição 2' do grupo oxadiazólico interage com o resíduo Asp 93, o qual interage com o oxigênio 3' da porção resorcinol de BXZ. De qualquer forma, ambos os programas de ancoramento empregados tiveram êxito em posicionar o tioxazafeno na região do DNT ocupada pela base de purina do ATP.

Figura 24 - Representação 3D e 2D dos modos de interação do tiozazafeno com a Hsp90 3BM9 após ancoramento com o *software* AutoDock v.4.2.6.



Tio-2 ancorado a 3BM9 pelo *software* AutoDock

Fonte: Do autor (2022).

Em termos gerais, observou-se, em Hsp90 não produzidas por nematoides, que os inibidores da série 2-aminobenzamidas macrocíclicas tais como 06T, 06J e 05S (ZAPF et al., 2011), estiveram entre os ligantes com mais afinidades por tais proteínas. Por outro lado, as afinidades calculadas para potentes inibidores de Hsp90, como BXZ, CXZ, EFU, GDM, RL3, VHA e WHA, não foram estatisticamente diferentes daquela calculada para o tiozazafeno por ambos os *softwares* de ancoramento empregados.

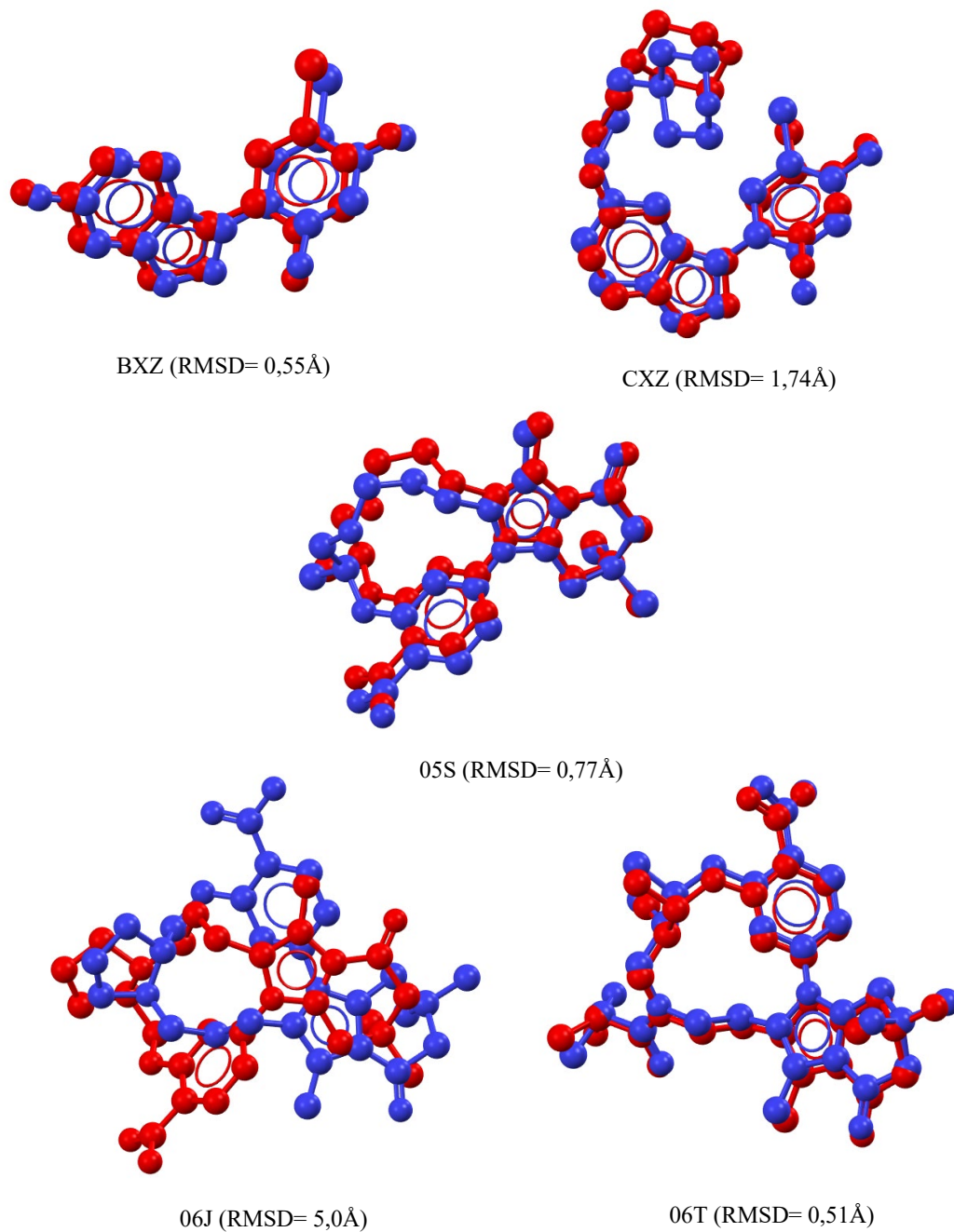
As técnicas comuns para a avaliação da precisão dos protocolos de ancoramento são o *re-docking* (auto-encaixe), o *cross-docking* e o enriquecimento de ligantes. O auto-encaixe é uma abordagem muito utilizada para a avaliação inicial da precisão de um programa de ancoramento molecular. Logo, foi empregado no presente trabalho. Ele recria a posição original do ligante co-cristalizado experimentalmente, enquanto que o *cross-docking* avalia a capacidade do receptor específico de situar conjuntos quimicamente diversos de ligantes com valores RMSD aceitáveis (SHIVANIKA et al., 2020). Considera-se que quando o valor de RMSD entre a pose nativa do ligante no cristal e daquele obtido teoricamente por ancoramento é inferior a 2,0 Å, a previsão é julgada como bem-sucedida (BELL; ZHANG, 2019).

Para a validação do método de ancoramento, foram comparados os resultados teóricos com os resultados experimentais obtidos para os ligantes BXZ, CXZ, 06J, 05S e 06T, os quais

se encontram co-cristalizados com as Hsp90 3BM9, 3BMY, 3R92, 3QTF e 3RKZ, respetivamente.

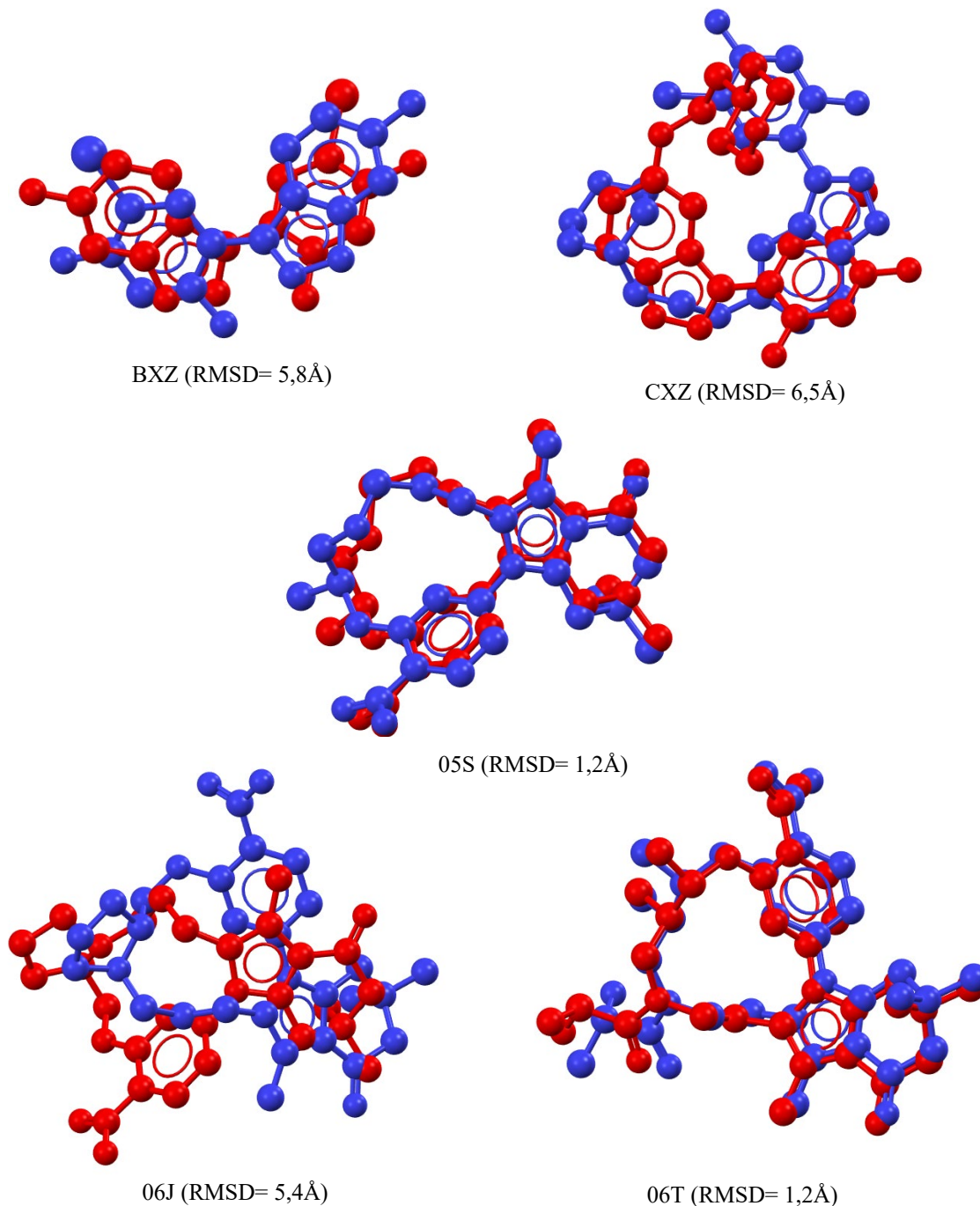
Com exceção do ligante 06J, todos os demais resultados experimentais foram satisfatoriamente reproduzidos ($\text{RMSD} < 2,0 \text{ \AA}$) pelo *software* QuickVina (Figura 24). Por outro lado, o *software* AutoDock só conseguiu reproduzir o resultado experimental para os ligantes 05S e 06T (Figura 25). Para os ligantes BXZ e CXZ, a posição adotada de acordo com os cálculos feitos pelo AutoDock esteve invertida em 180° na vertical do eixe de rotação. No caso do ligante 06J, o programa AutoDock também não conseguiu reproduzir o dado experimental.

Figura 25 - Sobreposição tridimensional e raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) entre o resultado experimental (cor vermelho) e o resultado teórico (cor azul) obtido para cada um dos ligantes BXZ, CXZ, 06J, 05S e 06T, através do uso do *software* QuickVina v.2.1.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 26 - Sobreposição tridimensional e raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) entre o resultado experimental (cor vermelho) e o resultado teórico (cor azul) obtido para cada os ligantes BXZ, CXZ, 06J, 05S e 06T, através do uso do *software* AutoDock v.4.2.6.

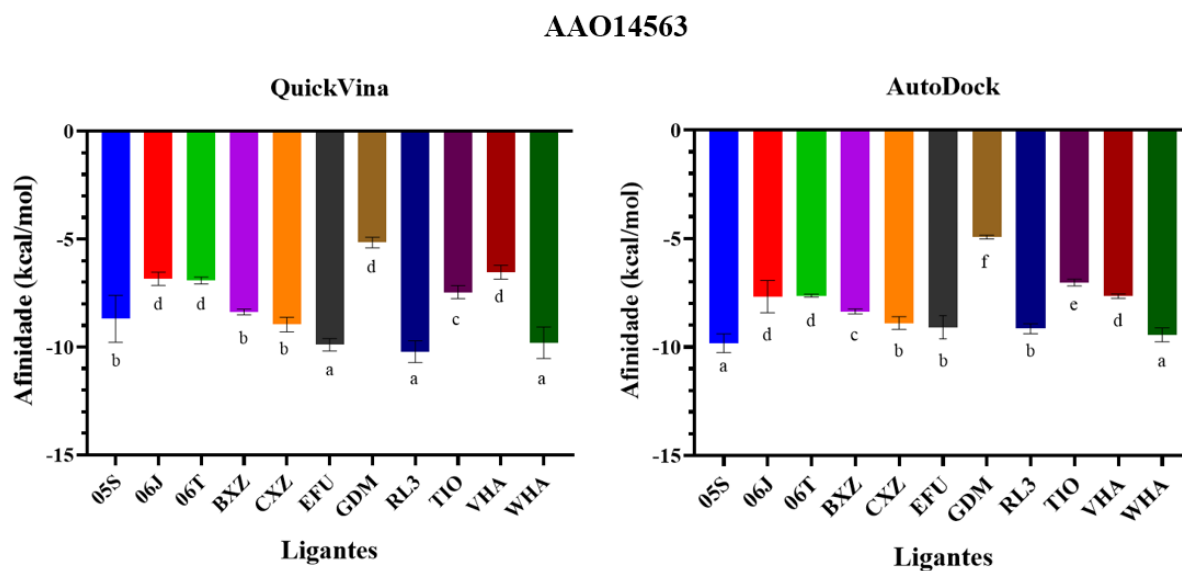


Fonte: Do autor (2022).

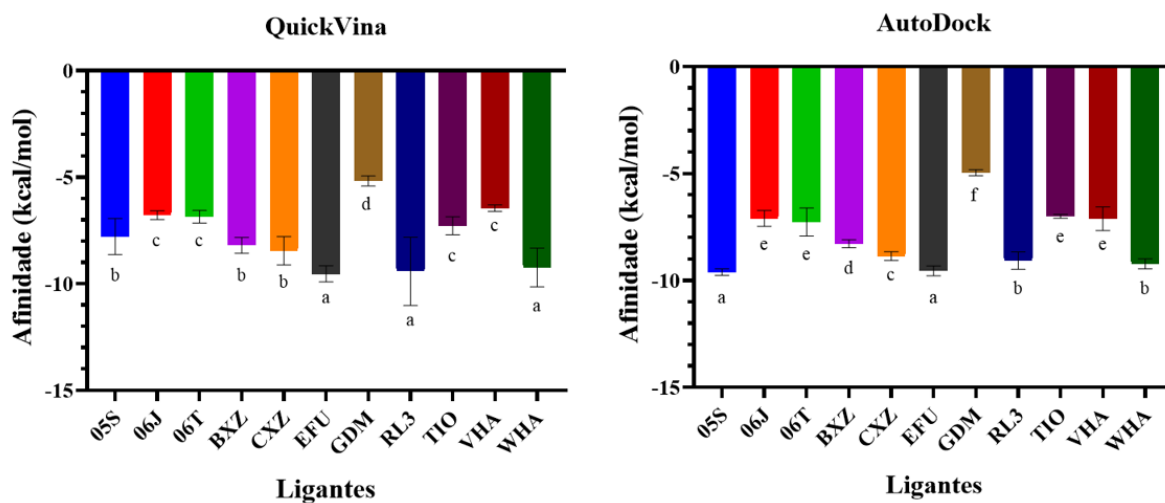
3.6 Docking Molecular nas Hsp90 Modeladas a Partir das Sequências AAO14563 e ACR57216, contendo o Segmento ATP-*lid* em Estado Fechado

Em geral, os resultados dos ancoramentos nas Hsp90 não produzidas por nematoides foram diferentes daqueles realizados com as Hsp90 produzidas por *H. glycines*. Por exemplo, para os modelos da Hsp90 de ambas as sequências (AAO14563 e ACR57216), houve inibidores que se ligaram mais eficientemente a tais modelos que o tiozazafeno. Entre esses ligantes se destacaram 05S, EFU, RL3 e WHA, cujas afinidades pelas Hsp90 de *H. glycines* em estado ATP-*lid* fechado foram de aproximadamente -9,6 kcal/mol. Considerando os resultados obtidos para ambos os *softwares* de ancoramento empregados, o tiozazafeno se ligou a tais modelos com afinidade média de -7,2 kcal/mol, o que foi estatisticamente diferente do valor médio de afinidade do tiozazafeno pelas Hsp90 não produzidas por nematoides (Figura 27).

Figura 27 - Valores de afinidade (kcal/mol) obtidos com o uso dos *softwares* QuickVina v.2.1 e AutoDock v.4.2.6 para o tiozazafeno (TIO) e para os ligantes inibidores de Hsp90 05S, 06J, 06T, BXZ, CXZ, EFU, GDM, RL3, VHA e WHA, que foram ancorados nos modelos de Hsp90 de *Heterodera glycines* com o ATP-*lid* em estado fechado. As barras de erro correspondem aos desvios padrão. As barras com a mesma letra minúscula em cada gráfico não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).



ACR57216

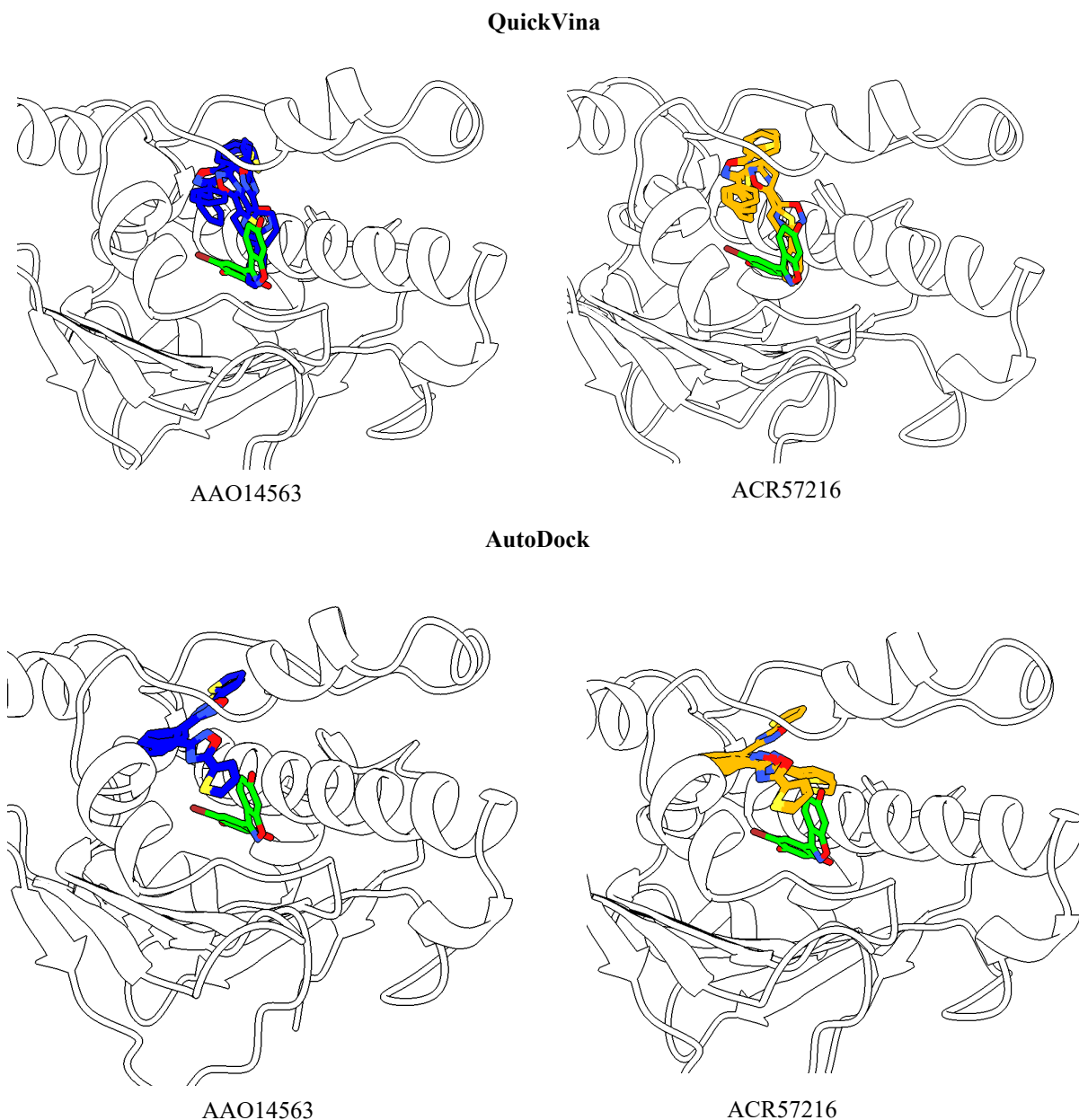


Fonte: Do autor (2022).

Como se observa na Figura 26, os valores de afinidade obtidos para ambas as sequências modeladas, são similares entre elas. Além disso, os ligantes BXZ e CXZ, que estruturalmente são mais próximos ao tioxazafeno, ligaram-se mais eficientemente às Hsp90 produzidas por *H. glycines* do que o tioxazafeno. No entanto, em todos os casos o tioxazafeno se ligou mais eficientemente aos modelos que o potente inibidor de Hsp90, geldanamicina (GDM). Ao contrário dos resultados obtidos com as Hsp90 não produzidas por NPPs, os ligantes 06J e 06T se ligaram com a mesma energia de afinidade que o tioxazafeno (Figura 27).

Em geral, observaram-se diferenças significativas nos modos de interação entre as Hsp90 produzidas e não produzidas por *H. glycines* com o tioxazafeno e BXZ. Como já foi tratado na seção 3.5, o tioxazafeno foi ancorado no sítio de ligação do ATP nas Hsp90 não produzidas por NPPs de um jeito semelhante ao registrado teórica e experimentalmente para o ligante BXZ (Figura 11). Porém, nos modelos de Hsp90 de *H. glycines* com o segmento ATP-*lid* em estado fechado, nenhum dos resultados foi comparável com aqueles obtidos nas Hsp90 não produzidas por NPPs (Figura 28).

Figura 28 - Resultado qualitativo de ancoramento do tiozazafeno nas Hsp90 modeladas a partir das sequências AAO14564 (azul) e ACR57216 (amarelo), produzidas por *Heterodera glycines* e que se encontravam com o segmento ATP-*lid* em estado fechado. De cor verde é ressaltada a posição e localização do ligante inibidor BXZ no cristal da enzima 3BM9.



Fonte: Do autor (2022).

Embora 3BM9 e 5FWK sejam Hsp90 produzidas pelo ser humano, fatores tais como o método cristalográfico, a sua resolução e os estados biológicos nos quais se encontravam as enzimas em seus momentos de cristalização, são alguns dos fatores que influenciam nas

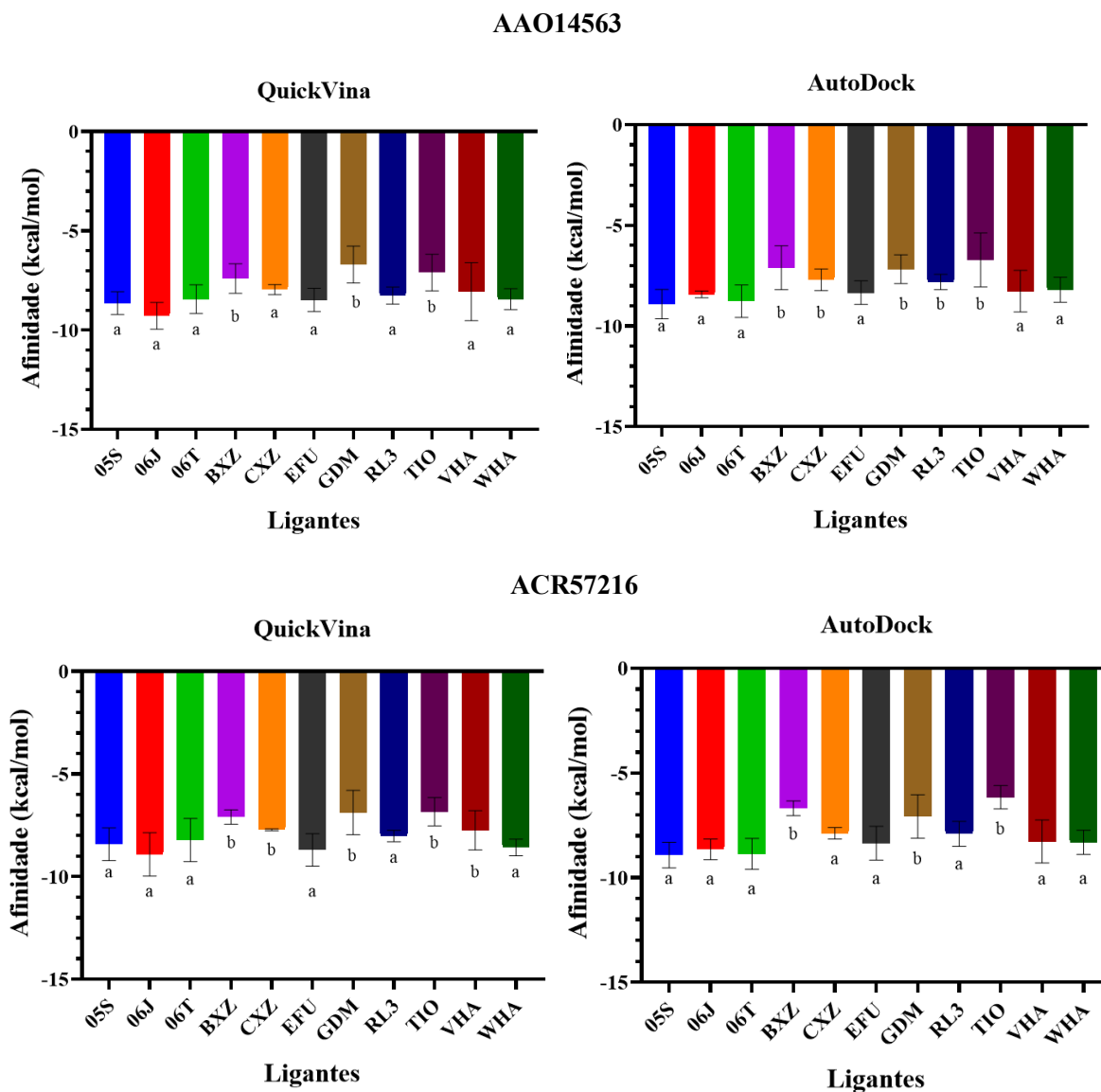
qualidades dos modelos 3D, podendo impactar nas diferenças de ancoramento registradas em modelos de proteína obtidos por métodos diferentes. Por exemplo, a estrutura tridimensional da 3BM9 foi resultado de análise por cristalografia de raios X com resolução de 1,60 Å, enquanto a estrutura tridimensional da 5FWK foi resultado de análise por microscopia eletrônica criogênica com resolução de 3,90 Å, a partir de complexo da proteína com o seu ligante natural, o ATP (VERBA et al., 2016). Essas diferenças são suficientes para obter modos de ligação diferentes quando considerado um modelo de ancoramento com a proteína rígida e o ligante flexível.

3.7 Docking Molecular nas Hsp90 Modeladas a Partir das Sequências AAO14563 e ACR57216, contendo o Segmento ATP-*lid* em Estado Aberto

Os resultados de ancoramentos nas Hsp90 modeladas com o segmento ATP-*lid* em estado aberto foram significativamente diferentes dos resultados obtidos nos modelos com o ATP-*lid* em estado fechado (Figura 21). Não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos para ambos os programas computacionais empregados.

De forma geral, os resultados do ancoramento permitiram a inserção dos ligantes em dois grupos estatisticamente diferentes. No primeiro deles se encontram os ligantes 05S, 06J, 06T, EFU, RL3, VHA e WHA, que se ligaram mais eficientemente aos modelos. No segundo grupo estão os ligantes BXZ, CXZ, GDM e o tioxazafeno (TIO). Assim como registrado para os modelos com o segmento ATP-*lid* em estado fechado, a energia de afinidade do tioxazafeno também foi estatisticamente diferente da calculada para as Hsp90 não produzidas por nematóides (-6,7 kcal/mol). No entanto, não houve diferença estatística na afinidade do tioxazafeno quando comparados os seus valores médios obtidos nos modelos com o segmento ATP-*lid* em estado fechado com aqueles registrados em seu estado aberto.

Figura 29 - Valores de afinidade (kcal/mol) obtidos com o uso do *software* QuickVina v.2.1 e AutoDock v.4.2.6 para o tioxazafeno (TIO) e para os inibidores de Hsp90 05S, 06J, 06T, BXZ, CXZ, EFU, GDM, RL3, VHA e WHA, que foram ancorados nos modelos com o ATP-*lid* em estado aberto das Hsp90 produzidas por *Heterodera glycines*. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

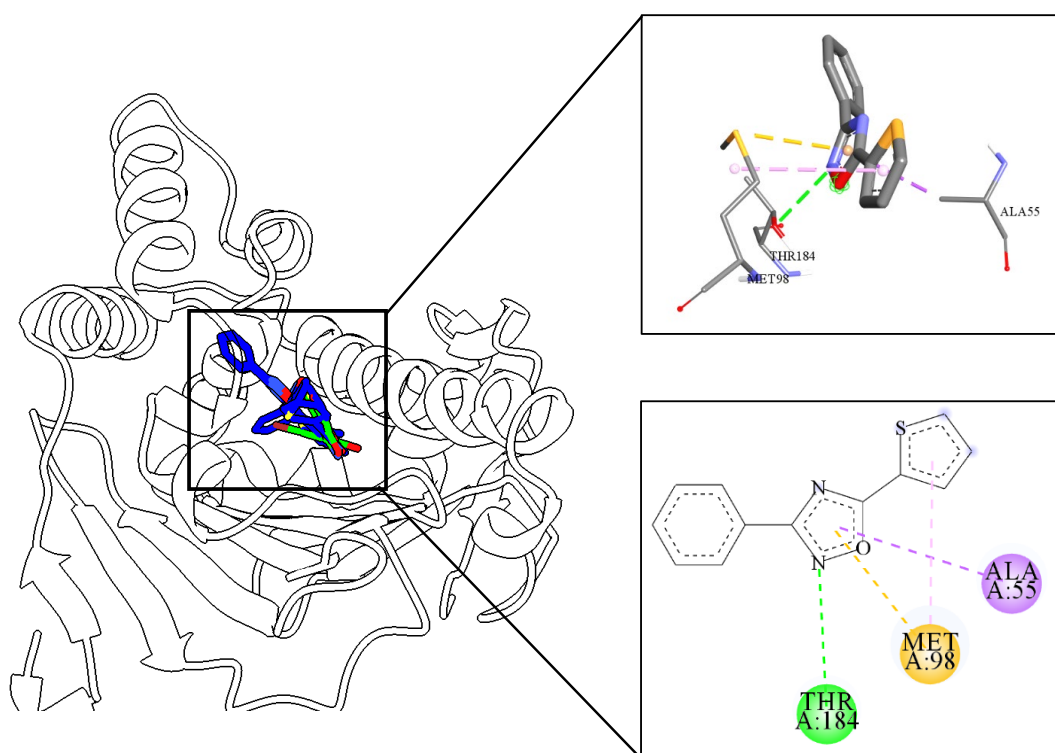


Fonte: Do autor (2022).

Assim como registrado nas Hsp90 não produzidas por NPPs, não houve diferença estatística significativa entre as afinidades do tioxazafeno e dos inibidores BXZ e CXZ. Aliás, os resultados qualitativos dos modos de interação do tioxazafeno com os modelos ATP-*lid* aberto estiveram próximos daqueles observados com as Hsp90 de *H. sapiens*. Nos modelos construídos a partir do *template* 7KW7, o *software* QuickVina conseguiu posicionar o

tioxazafeno de forma similar à ancorada nas Hsp90 não produzidas por NPPs. Quando o resultado desse ancoramento foi posicionado na Hsp90 3BM9 (complexo tio-3BM9 após ancoramento do tioxazafeno nos modelos ATP-*lid* aberto) observou-se que o tioxazafeno interagiu através de ligação de hidrogênio com o mesmo resíduo de aminoácido Thr 184 registrado anteriormente para a 3BM9 (Figura 30).

Figura 30 - Representação gráfica do resultado obtido com o *software* QuickVina v.2.1 que mostra os modos de interação em 3D e 2D do melhor ancoramento do tioxazafeno nas Hsp90 modeladas a partir de 7KW7 e cujo resultado foi logo complexado na Hsp90 3BM9 como forma de estabelecer o efeito do modelo nos resultados qualitativos de ancoramento. De cor verde é marcada a posição e localização experimental do ligante BXZ em 3BM9.

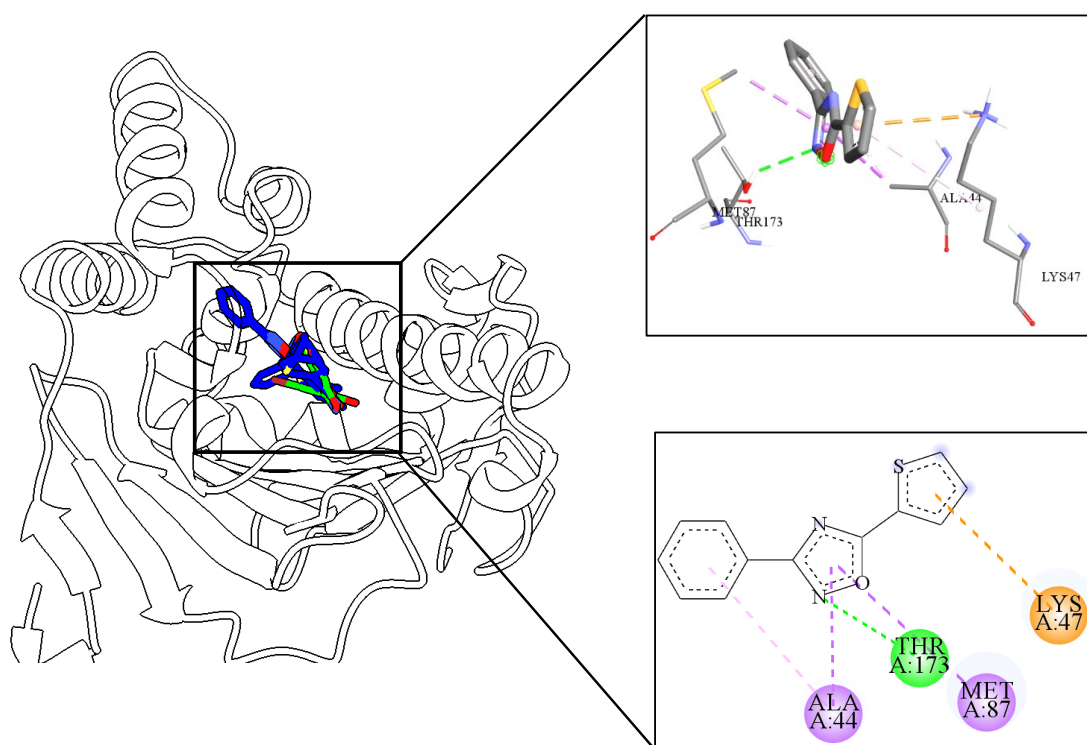


Fonte: Do autor (2022).

De forma similar, conservaram-se as interações π -enxofre entre o resíduo de metionina 98 (Met 98) e o anel oxadiazólico do tioxazafeno, que também mantém contato com o resíduo Ala 55 através de interações do tipo π -sigma (Figuras 11 e 21). Quando analisado esse mesmo

resultado nos modelos construídos a partir do *template* 7KW7, observou-se o mesmo tipo de interações que nas Hsp90 não produzidas por NPPs (Figura 31).

Figura 31 - Representação gráfica do resultado obtido com o *software* QuickVina v.2.1, que mostra os modos de interação em 3D e 2D do melhor ancoramento do tioxazafeno nas Hsp90 modeladas a partir de 7KW7.



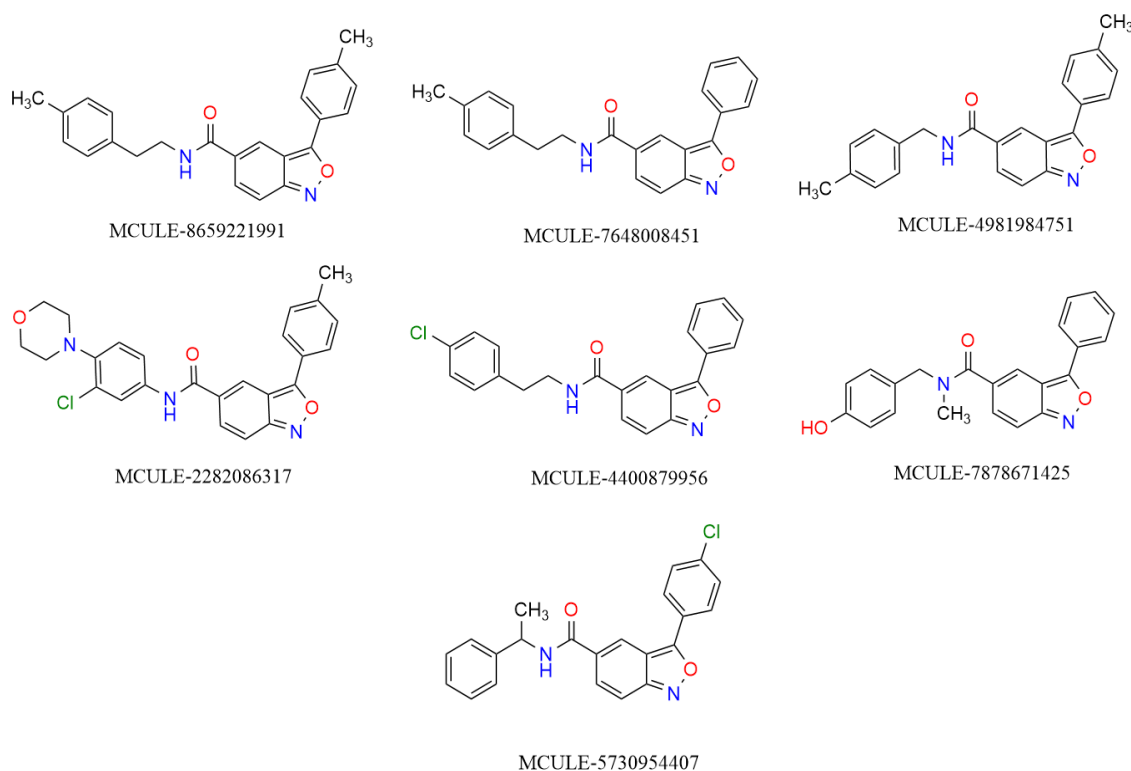
Fonte: Do autor (2022).

Visto que nos modelos ATP-*lid* aberto foi possível, através do software QuickVina, fixar o tioxazafeno na bolsa hidrofóbica do ATP do mesmo jeito que para as Hsp90 não produzidas por NPPs, conclui-se que a semelhança estrutural entre o modelo e o alvo da busca farmacofórica é um fator imprescindível para uma boa correspondência com aquilo que pode acontecer experimentalmente.

3.8 Busca por Compostos que Possam Ligar-se Mais Fortemente às Hsp90 Modeladas a Partir das Sequências AAO14563 e ACR57216

Dentre os 46 inibidores de Hsp90 empregados como referências no presente estudo, os 20 com os menores valores de afinidade pelas Hsp90 de *H. glycines* foram selecionados para a busca farmacofórica. Com isso, foram selecionados 237 compostos do MCULE com escores de Tanimoto iguais ou superiores a 0,8. Os ancoramentos dessas novas substâncias, feitos com os *softwares* AutoDock e QuickVina, nos modelos das Hsp90 de *H. glycines*, permitiram selecionar aquelas com os menores valores de afinidade (Figura 32).

Figura 32 - Substâncias selecionadas da base de dados do MCULE e que apresentaram os menores valores de energia de afinidade ($\sim -10,0$ kcal/mol) após ancoramento nos modelos da Hsp90 de *Heterodera glycines*.

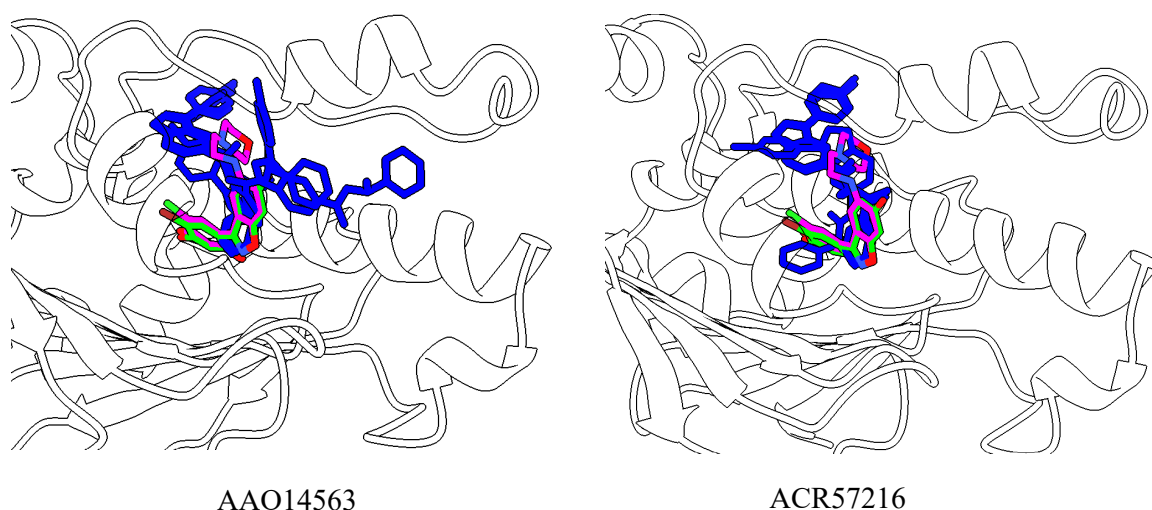


Fonte: Do autor (2022).

Como se observa na Figura 33 todas essas substâncias selecionadas pertencem a uma série de 2,1-benzisoxazóis semelhantes aos inibidores BXZ e CXZ (1,2-benzisoxazóis). Considerando-se esta semelhança e a similaridade de 80% entre as sequências de aminoácidos da região DNT das Hsp90 de *H. glycines* e a de 3BM9 (Figura 5), é de se esperar que esses novos possíveis inibidores de Hsp90 apresentem posicionamentos e interações intermoleculares similares aos registrados para BXZ e CXZ.

Nos modelos construídos a partir de *templates* com a região DNT em estado fechado, todas essas substâncias selecionadas a partir do banco do MCULE apresentaram interações intermoleculares e posicionamentos na bolsa hidrofóbica diferentes dos observados para BXZ e CXZ. Este é o caso, por exemplo, da substância MCULE-5730954407 (3-(4-clorofenil)-*N*-(1-feniletil)-2,1-benzoxazol-5-carboxamida) (Figura 33).

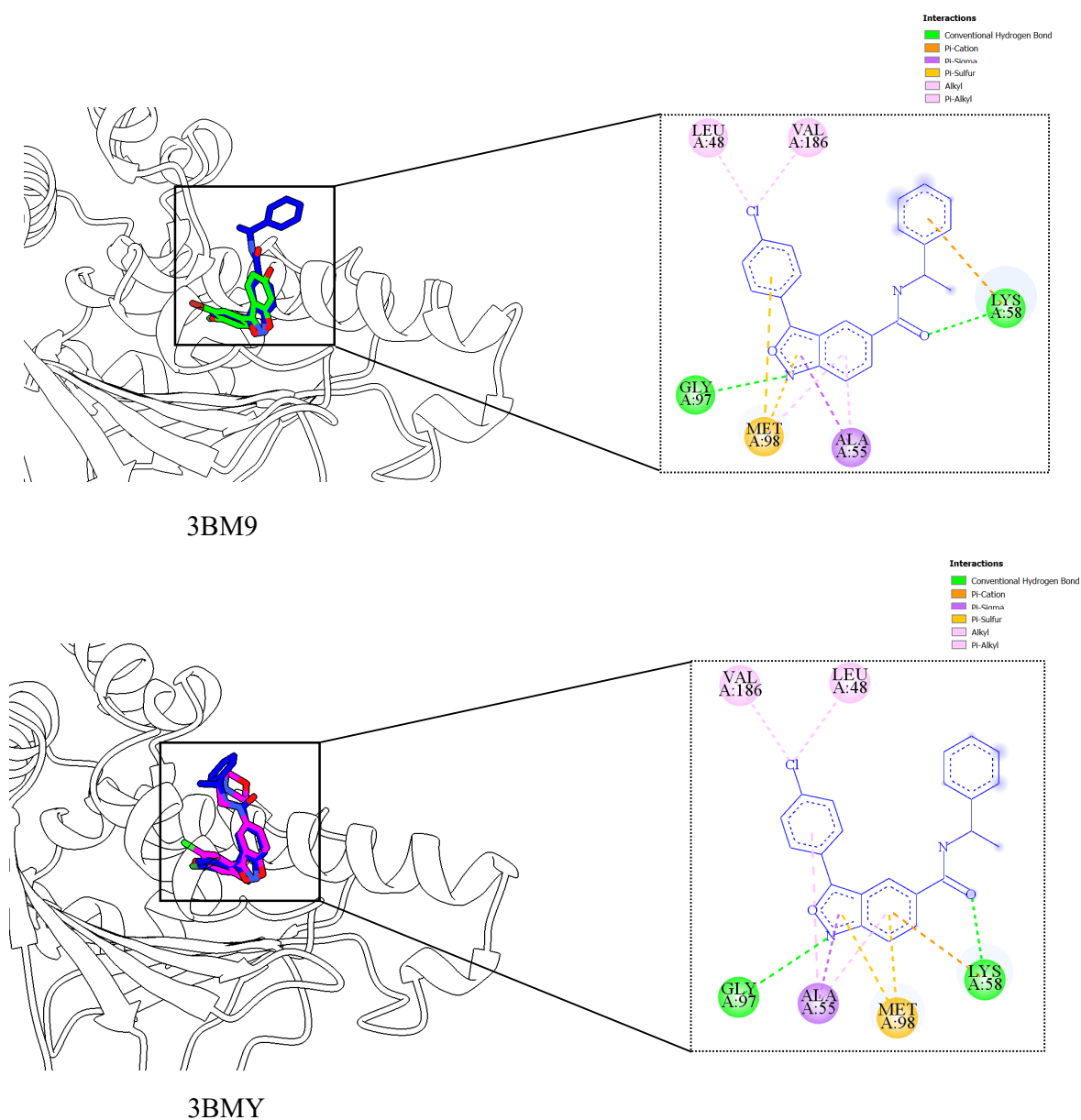
Figura 33 - Resultado qualitativo do ancoramento da substância MCULE-5730954407 (cor azul), feito com o software QuickVina v.2.1, nos modelos das Hsp90 de *Heterodera glycines* com a região DNT em seu estado fechado. De cor magenta é representada a localização de CXZ em 3BMY, e de cor verde o ligante BXZ em 3BM9.



Fonte: Do autor (2022).

Entretanto, quando os ancoramentos foram feitos em 3BM9 e 3BMY, os modos de interação foram similares aos observados para BXZ e CXZ. Este é o caso, por exemplo, para a substância MCULE-5730954407 (Figura 34), o que parece razoável, já que compostos estruturalmente semelhantes tendem a ter modos de interação similares em proteínas do mesmo tipo.

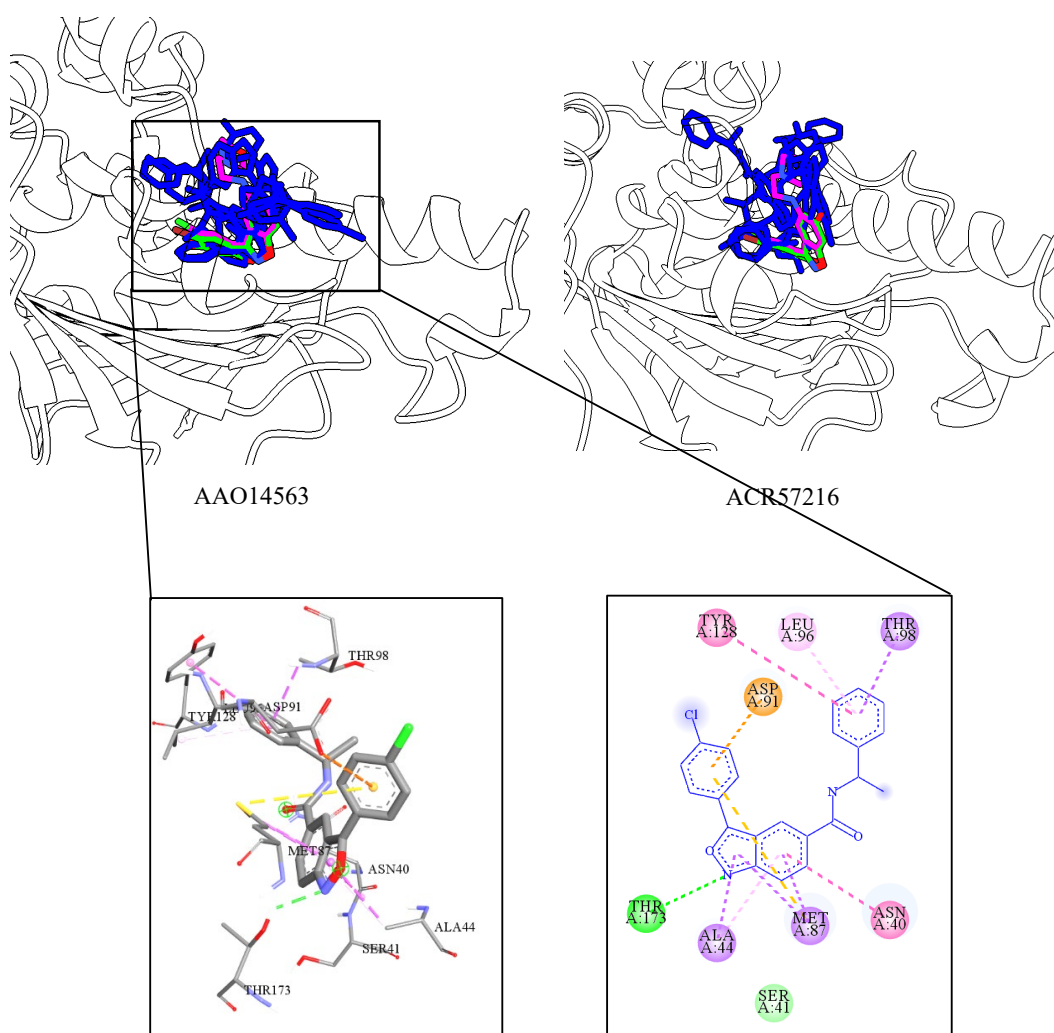
Figura 34 - Resultado qualitativo obtido com o *software* QuickVina v.2.1 para o ancoramento de MCULE-5730954407 (cor azul) nas Hsp90 3BM9 e 3BMY. De cor verde (BXZ) e de magenta (CXZ).



Fonte: Do autor (2022).

Quando a substância MCULE-5730954407 foi ancorada nos modelos construídos a partir do *template* 7KW7 (região DNT em estado aberto), os resultados estiveram mais próximos daqueles obtidos para as Hsp90 3BM9 e 3BMY. Além disso, também ficaram mais próximos dos resultados obtidos para o tioxazafeno nos modelos da Hsp90 de *H. glycines* com a região DNT em estado aberto (Figura 35).

Figura 35 - Resultado qualitativo obtido com o *software* QuickVina v.2.1 para o ancoramento de MCULE-5730954407 (cor azul) nos modelos das Hsp90 de *Heterodera glycines* com a região DNT em seu estado aberto. De cor magenta é representada a localização de CXZ em 3BM9, e de cor verde o ligante BXZ em 3BM9.



Fonte: Do autor (2022).

Assim como o tioxazafeno nos modelos construídos a partir de 7KW7, a substância MCULE-5730954407 faz interações através de ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Thr 173 que, em 3BM9 e 3BM9, corresponde ao resíduo Thr 184. Além disso, o anel benzoisoxazólico da referida substância, assim como o anel oxadiazólico do tioxafeno, faz interações π -sigma com os resíduos Ala 55 e Met 87 (Figura 22).

4 CONCLUSÕES

O estudo *in silico* realizado demonstra que as características farmacofóricas do tiozafeno estão em consonância com as estruturas químicas dos compostos benzoisoxazólicos como o BXZ e o CXZ, que são inibidores da Hsp90. Os principais resíduos de interação de benzoisoxazóis e do tiozafeno em Hsp90 não produzidas por NPPs corresponderam aos resíduos Lys 58, Asp 93, Gly 97 e Thr 184. Nos modelos Hsp90 de *Heterodera glycines* com a região DNT em estado aberto, conservaram-se as mesmas interações com os mesmos resíduos de aminoácidos, os quais mudaram de posição para Lys 47, Asp 82, Gly 86 e Thr 173. Dada a alta similaridade entre as sequências de aminoácidos da região DNT de 3BM9 e das Hsp90 de *H. glycines*, é de esperar que os resultados até aqui obtidos forneçam informações úteis para o desenho de novos inibidores da Hsp90, que possam ser empregados como nematicidas. Modificações estruturais na molécula do tiozafeno com substituintes eletrodadores (-OH, -OCH₃, -NH₂) no anel benzênico ou tiofênico, podem acarretar o surgimento de uma nova estrutura que possa interagir mais eficientemente com os resíduos predominantemente hidrofóbicos da bolsa de interação do ATP em Hsp90.

Além de ser um potencial alvo do tiozafeno em NPPs, Hsp90 também é um escopo atraente para o desenvolvimento de novos nematicidas comerciais, uma vez que com sua inibição, afetam-se múltiplas proteína “clientes” imprescindíveis para o correto funcionamento da fisiologia celular. Em nematoides e protozoários parasitas de interesse mundial como *Plasmodium falciparum* Welch, *Toxoplasma gondi* Nicolle & Manceaux, *Trypanosoma cruzi* Chagas, *Leishmania donovani* Ross, entre outros, Hsp90 é essencial para o ciclo de vida no hospedeiro definitivo.

REFERÊNCIAS

ALHOSSARY, A. *et al.* Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 31, n. 13, p. 2214–2216, 1 jul. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25717194/>. Acesso em: 14 abr. 2022.

ALLOUCHE, A. R. Gabedit – A graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 174–182, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20607691/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. *et al.* DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 33, n. 21, p. 3387–

3395, 1 nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29028934/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 1 abr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30778233/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9254694/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

ALTSCHUL, S. F.; WOOTTON, J. C.; GERTZ, E. M.; AGARWALA, R.; MORGULIS, A.; SCHÄFFER, A. A.; YU, Y. K. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **FEBS Journal**, v. 272, n. 20, p. 5101–5109, oct. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16218944/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

AMOLINS, M.; BLAGG, B. Natural Product Inhibitors of Hsp90: Potential Leads for Drug Discovery. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 140–152, 29 Jan. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2659174/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

ANTOLIN, A. A. *et al.* Evolution of kinase polypharmacology across HSP90 drug discovery. **Cell Chemical Biology**, v. 28, n. 10, p. 1433–1445.e3, 21 out. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8550792/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

BECKER, J. Plant health management: crop protection with nematicides. *In*: VAN ALFEN, N. K. (Ed.). **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. [S.l.]: Academic Press, v. 4. 2014. p. 400–407. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00180-7>. Acesso em: 11 de abr. 2022.

BELL, E. W.; ZHANG, Y. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of cheminformatics**, v. 11, n. 1, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6556049/>. Acesso em: 22 abr. 2022.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21134891/>. Acesso em: 14 abr. 2022.

BERNHOFER, M. *et al.* PredictProtein – Predicting protein structure and function for 29 years. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 1, p. W535–W540, 24 fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33999203/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

BIEBL, M. M.; BUCHNER, J. Structure, function, and regulation of the hsp90 machinery. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 9, p. 529–535, 1 sep. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034017>. Acesso em: 2 maio, 2022.

BLUM, T.; BRIESEMEISTER, S.; KOHLBACHER, O. MultiLoc2: Integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 274–278, 1 set. 2009. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-10-274>. Acesso em: 13 maio. 2022.

BRIESEMEISTER, S.; RAHNENFÜHRER, J.; KOHLBACHER, O. YLoc—an interpretable web server for predicting subcellular localization. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Web Server issue, 27 maio 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20507917/>. Acesso em: 13 maio. 2022.

CHEN, J. X.; SONG, B. A. Natural nematicidal active compounds: Recent research progress and outlook. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 20, n. 8, p. 2015–2031, 2021. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(21\)63617-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63617-1). Acesso em: 11 de abr. 2022.

CHENG, J. *et al.* SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue. jul. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980571/>. Acesso em: 13 maio. 2022.

CHOU, K. C.; SHEN, H. BIN. A New Method for Predicting the Subcellular Localization of Eukaryotic Proteins with Both Single and Multiple Sites: Euk-mPLOC 2.0. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC2848569/>. Acesso em: 13 maio. 2022.

CHOU, K.-C.; SHEN, H.-B. Signal-CF: A subsite-coupled and window-fusing approach for predicting signal peptides. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 3, n. 8, p 633–640, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17434148/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

CRAMER, P. AlphaFold2 and the future of structural biology. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 28, n. 9, p. 704–705, sep. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-021-00650-1>. Acesso em: 14 maio. 2022.

CRUZ, T. T.; ASMUS, G. L.; GARCIA, R. A. Crotalaria species in succession to soybean for

the management of *Pratylenchus brachyurus*. **Ciência Rural**, v. 50, n. 7, p. 1–9, abr. 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/s4KMdRLvsjq4p9mWGVbqwtj/>. Acesso em: 15 abr. 2022.

DESAEGER, J.; WRAM, C.; ZASADA, I. New reduced–risk agricultural nematicides–rationale and review. **Journal of Nematology**, v. 52, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8015323/>. Acesso em: 14 de abr. 2022.

DEVANEY, E. *et al.* Hsp90 is essential in the filarial nematode *Brugia pahangi*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 6, p. 627–636, 1 maio 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.01.007>. Acesso em: 19 abr. 2022.

FARISELLI, P.; FINOCCHIARO, G.; CASADIO, R. SPEFlip: the detection of signal peptide and lipoprotein cleavage sites. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2498–2499, 12 dez. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14668245/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

FASKE, T. R.; BROWN, K.; KELLY, J. Toxicity of Tioxazafen to *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. **Journal of Nematology**, v. 54, n. 1, p. 1–6, 1 fev. 2022. Disponível em: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/jofnem-2022-0007>. Acesso em: 25 abr. 2022.

FATHI, M. A. A. *et al.* 1,3,4–oxadiazole/chalcone hybrids: Design, synthesis, and inhibition of leukemia cell growth and EGFR, Src, IL–6 and STAT3 activities. **Bioorganic chemistry**, v. 84, p. 150–163, 1 mar. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30502626/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

FAVORETO, L. *et al.* Diagnose e manejo de fitonematóides na cultura da soja. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 40, n. 306, p. 18–29, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/344755488_Diagnose_e_manejo_de_fitonematoides_na_cultura_da_soja. Acesso em: 15 abr. 2022.

FENG, Z. *et al.* Ligand Depot: A data warehouse for ligands bound to macromolecules. **Bioinformatics**, v. 20, n. 13, p. 2153–2155, 1 abr. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth214>. Acesso em: 17 abr. 2022.

FERNANDEZ–FUENTES, N. *et al.* Comparative protein structure modeling by combining multiple templates and optimizing sequence–to–structure alignments. **Bioinformatics**, v. 23, n. 19, p. 2558–2565, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm377>. Acesso em: 20 out. 2021.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529–535, 20 dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>. Acesso em: 18 abr. 2022.

GASTEIGER, E. *et al.* ExpASy: The proteomics server for in–depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 1 jul. 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/31/13/3784/2904185>. Accessed on: 13 May 2022. Acesso em: 17 abr. 2022.

GELMEDIN, V. *et al.* Expression profile of heat shock response factors during hookworm larval activation and parasitic development. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 202, n. 1, p. 1–14, 1 jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara>. Acesso em: 19 abr. 2022.

GOLDBERG, T.; HAMP, T.; ROST, B. LocTree2 predicts localization for all domains of life. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 28, n. 18. set. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22962467/>. Acesso em: 13 maio. 2022.

GOPALSAMY, A. *et al.* Discovery of benzisoxazoles as potent inhibitors of chaperone heat shock protein 90. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 373–375, 14 fev. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18197612/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, fev. 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8744570/>. Acesso em: 18 abr. 2022.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. w429–w432, jul. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1933244/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

KÄLLBERG, M. *et al.* Template–based protein structure modeling using the RaptorX web server. **Nature Protocols**, v. 7, n. 8, p. 1511–1520, ago. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730388/>. Acesso em: 14 abr. 2022.

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>. Acesso em: 13 maio. 2022.

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the

Robetta server. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server issue, p. W526–W532, 1 jul. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC441606/>. Acesso em: 14 jan. 2022.

KO, J. *et al.* GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 1, p. W294–W297, 1 jul. 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/40/W1/W294/1078340>. Acesso em: 20 out. 2021.

KONG, L. *et al.* FALCON2: a web server for high-quality prediction of protein tertiary structures. **Bioinformatics**, v. 22, n. 1. 1 dez. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34525939/>. Acesso em: 13 fev. 2022.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 24 out. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21919503/>. Acesso em: 26 abr. 2022.

LEŠNIK, S. *et al.* LiSiCA: A software for ligand-based virtual screening and its application for the discovery of butyrylcholinesterase inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 8, p. 1521–1528, ago. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26158767/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

MAGHRABI, A. H. A.; MCGUFFIN, L. J. ModFOLD6: an accurate web server for the global and local quality estimation of 3D protein models. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W416–W421, 3 jul. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/45/W1/W416/3782602>. Acesso em: 14 maio. 2022.

MARTÍNEZ, L.; ANDREANI, R.; MARTÍNEZ, J. M. Convergent algorithms for protein structural alignment. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1–15, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1995224/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

MCGUFFIN, L. J. *et al.* IntFOLD: an integrated web resource for high performance protein structure and function prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W408–W413, 1 jul. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045208/>. Acesso em: 14 maio 2022.

MELLO, J. R.; MOREIRA, J. A.; MALAFAIA, G.; ARAÚJO, F. G. Using tannery sludge to manage soybean cyst nematodes in soybean crops. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 12, p. 294 – 298, 15 nov. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/321100320_Using_Tannery_Sludge_to_Manage_Soybean_Cyst_Nematodes_in_Soybean_Crops. Acesso em: 27 mar. 2022.

MOHAN, C. D. *et al.* Novel 1,3,4-oxadiazole induces anticancer activity by targeting NF- κ B in hepatocellular carcinoma cells. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 42, p. 1–10, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00042>. Acesso em: 21 abr. 2022.

MORRIS, G. M. *et al.* Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19399780/>. Acesso em: 14 abr. 2022.

NIELSEN, H. *et al.* Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 1997. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/9051728>. Acesso em: 19 fev. 2022.

NIELSEN, M. *et al.* CPHmodels-3.0—remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 2, p. W576–W581, 1 jul. 2010. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/38/suppl_2/W576/1126606. Acesso em: 13 maio. 2022.

O'BOYLE, N. M. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 10, p. 1–33, 12 oct. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21982300/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

OKONECHNIKOV, K. *et al.* Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, v. 28, n. 8, p. 1166–1167, 15 abr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22368248/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

OLECHNOVIČ, K.; VENCLOVAS, Č. VoroMQA: Assessment of protein structure quality using interatomic contact areas. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 85, n. 6, p. 1131–1145, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.25278>. Acesso em: 14 abr. 2022.

PEARL, L. H. Review: The HSP90 molecular chaperone – An enigmatic ATPase. **Biopolymers**, v. 105, n. 8, p. 594–607, 1 ago. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26991466/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

PEARL, L. H. Review: The HSP90 molecular chaperone – An enigmatic ATPase. **Biopolymers**, v. 105, n. 8, p. 594–607, 1 ago. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26991466/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research

and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15264254/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

PIACENTINI, L. *et al.* Transposons, environmental changes, and heritable induced phenotypic variability. **Chromosoma**, v. 123, n. 4, p. 345–354, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24752783/>. Acesso em: 18 abr. 2022.

PIERLEONI, A. *et al.* BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. **Bioinformatics**, v. 22, n. 14, p. e408–e416, 15 jul. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/22/14/e408/228072>. Acesso em: 13 maio. 2022.

PINHEIRO, B. J. Nematóides em hortaliças. 1 ed. Brasília, DF: **Embrapa**, 2017. 194 p. Disponível em: <https://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00085470.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2022.

RYAN, C. P.; BROWNLIE, J. C.; WHYARD, S. Hsp90 and physiological stress are linked to autonomous transposon mobility and heritable genetic change in nematodes. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 12, p. 3794–3805, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28082599/>. Acesso em: 18 abr. 2022.

SHARMA, A. *et al.* Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, n. 7, p. 1–15, 5 jun. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32512419/>. Acesso em: 22 fev. 2022.

SHARP, S. Y. *et al.* Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone in vitro and in vivo by novel, synthetic, potent resorcinylic pyrazole/isoxazole amide analogues. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 4, p. 1198–1211, 1 abr. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17431102/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

SHIVANIKA, C. *et al.* Molecular docking, validation, dynamics simulations, and pharmacokinetic prediction of natural compounds against the SARS–CoV–2 main–protease. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 40, n. 2, p. 1, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7573242/>. Acesso em: 22 abr. 2022.

SIDDIQUE, S.; GRUNDLER, F. M. Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 46, p. 102–108, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.09.004>. Acesso em: 24 Mar. 2022.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. **Methods in Molecular Biology**, v. 1079, p. 105–116, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24170397/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

SINGH, Ankita *et al.* ProTSAV: A protein tertiary structure analysis and validation server. **Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 1, p. 11–19, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.10.004>. Acesso em: 18 abr. 2022.

SLOMCZYNSKA, U. *et al.* Tioxazafen: A new broad-spectrum seed treatment nematicide. In: **ACS Symposium Series**. [s.l.: s.n.]. v. 1204, p. 129–147. 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2015-1204.ch010>. Acesso em: 12 abr. 2022.

SOMOGYVÁRI, M.; GECSE, E.; SÓTI, C. DAF–21/Hsp90 is required for *C. elegans* longevity by ensuring DAF–16/FOXO isoform A function. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30104664/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

SOUTH, S. M. *et al.* Development of Tioxazafen as a New Broadpectrum Nematicide. In: JESCHKE P.; WITSCHER M.; KRAMER W.; SCHIRMER U. (Ed.). **Modern Crop Protection Compounds**. Germany: Wiley–VCH, 2019. p. 1615–1628. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527644179>. Acesso em: 29 fev. 2022.

STEWAR, J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 221–264, nov. 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.540100209>. Acesso em: 17 abr. 2022.

SURABHI, S.; SINGH, B. K. Computer aided drug design: an overview. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, n. 5, p. 504–509, 18 Sep. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/327889509_COMPUTER_AIDED_DRUG_DESIGN_AN_OVERVIEW. Acesso em: 06 abr. 2022.

TALDONE, T.; SUN, W.; CHIOSIS, G. Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2225–2235, 15 mar. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2760286/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

TOSCO, P.; BALLE, T.; SHIRI, F. Open3DALIGN: An open-source software aimed at unsupervised ligand alignment. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 25, n. 8, p. 777–783, ago. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21792629/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

VERBA, K. A. *et al.* Atomic structure of Hsp90–Cdc37–Cdk4 reveals that Hsp90 traps and stabilizes an unfolded kinase. **Science**, v. 352, n. 6293, p. 1542–1547, 24 jun. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27339980/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

VON HEIJNE, G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 11, p. 4683–4690, 11 jun. 1986. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/14/11/4683/2385409>. Acesso em: 19 fev. 2022.

WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS–MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. W296–W303, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29788355/>. Acesso em: 13 abr. 2022.

WANG, W. *et al.* PSICA: a fast and accurate web service for protein model quality analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W443–W450, 2 jul. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31127307/>. Acesso em: 15 abr. 2022.

WAYNE, N.; MISHRA, P.; BOLON, D. N. Hsp90 and client protein maturation. **Methods in Molecular Biology**, v. 787, p. 33–44, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21898225/>. Acesso em: 18 abr. 2022.

WENKERT, D. *et al.* In vitro activity of geldanamycin derivatives against schistosoma japonicum and *Brugia malayi*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2010, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21253549/>. Acesso em: 19 abr. 2022.

WU, S.; ZHANG, Y. LOMETS: a local meta–threading–server for protein structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 10, p. 3375–3382, 3 maio. 2007. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC1904280>. Acesso em: 13 fev. 2022.

YANG, J.; ZHANG, Y. I–TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Web Server issue, p. W174–W181, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4489253/>. Acesso em: 13 fev. 2022.

YANG, Y. *et al.* A combined molecular modeling study on a series of pyrazole/isoxazole based human Hsp90 α inhibitors. **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, n. 12, p. 3241–3250, dez. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21369933/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

ZAPF, C. W. *et al.* Discovery of a stable macrocyclic o–aminobenzamide Hsp90 inhibitor which significantly decreases tumor volume in a mouse xenograft model. **Bioorganic and**

Medicinal Chemistry Letters, v. 21, n. 15, p. 4602–4607, 1 ago. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960894X11007438>. Acesso em: 22 abr. 2022.

ZHANG, W. X.; PAN, X.; SHEN, H. BIN. Signal-3L 3.0: Improving Signal Peptide Prediction through Combining Attention Deep Learning with Window-Based Scoring. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 7, p. 3679–3686, 27 jul. 2020. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/10.1021/acs.jcim.0c00401>. Acesso em: 19 fev. 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Synthesis of novel *N*-pyridylpyrazole derivatives containing 1,2,4-oxadiazole moiety via 1,3-dipolar cycloaddition and their structures and biological activities. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, n. 5, p. 1276–1280, maio. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2019.10.039>. Acesso em: 12 abr. 2022.

ZHU, L. *et al.* Design, synthesis, and biological activity of novel 1,2,4-oxadiazole derivatives. **BMC Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33292412/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

ZIMMERMANN, L. *et al.* A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. **Journal of Molecular Biology**, v. 15, n. 30, p. 2237–224, 20 jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.007>. Acesso em: 14 maio. 2022.

ARTIGO 2 - FLUAZAINDOLIZINA: UMA ABORDAGEM *IN SILICO* NA IDENTIFICAÇÃO DE SEU POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO.

RESUMO

Os nematoides parasitas de plantas (NPPs) são pragas microscópicas onipresentes do solo, que se alimentam dos tecidos vegetais das plantas, o que resulta em perdas severas das colheitas. O NPPs mais importantes no mundo são os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.), que junto com outros poucos NPPs, geram perdas econômicas acima de US\$100 bilhões por ano. No Brasil, *Meloidogyne* spp. constituem uma notável ameaça para o progresso e a segurança alimentar do país. Os nematicidas fumigantes, bem como os carbamatos e organofosforados, representam cerca de 50% de todos os nematicidas comerciais. Porém, muitos desses produtos se encontram sob pressão regulatória por seus efeitos nocivos à saúde. Em decorrência, têm surgido novos nematicidas mais seletivos e seguros como a fluazaindolizina (SalibroTM), a qual tem demonstrado ser efetiva no controle de diversos grupos de NPPs. No entanto, o seu mecanismo de ação nematicida permanece desconhecido. Conseqüentemente, o presente trabalho teve como objetivo principal identificar, através de métodos *in silico*, o possível alvo da fluazaindolizina em NPPs. Após busca farmacofórica na base de dados do LiganExpo, foi selecionado, pela sua semelhança estrutural com a fluazaindolizina, o ligante EW0 (7-cloro-4-(3-metoxianilino)-*N*-(4-metoxifenil)sulfonil-1-metilindol-2-carboxamida), o qual se encontra experimentalmente complexado à enzima frutose 1,6-bisfosfatase (FBPase) de código 6LW2. Foram modeladas as estruturas terciárias e quaternárias de duas sequências de aminoácidos de FBPases produzidas por *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback e *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield. Os resultados de *docking* molecular (ancoramento) em FBPases não produzidas por NPPs, mostraram que a fluazaindolizina se liga a tais enzimas com uma afinidade média de -8,1 kcal/mol. Assim como os potentes inibidores de FBPases EW0 e GJO (4-(3-acetamidofenil)-*N*-(4-metoxifenil)sulfonil-7-nitro-1*H*-indolo-2-carboxamida), a fluazaindolizina interage com a enzima através de ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos chaves tais como Thr31, Leu30, Gly26 e Gly28. Por outro lado, nas FBPases de *M. enterolobii* e *M. graminicola* houveram diferenças estatísticas quanto às afinidades calculados com o *software* QuickVina, segundo o qual as energias registradas foram em geral, mais baixas para todos os ligantes. No entanto, os resultados obtidos com *software* AutoDock não foram estatisticamente diferentes dos obtidos para as FBPases não produzidas por NPPs. As características farmacofóricas identificadas em outras sulfonilcarboxamidas (EW0, GJO etc.) mostram que um possível mecanismo de ação da fluazaindolizina é através da inibição alostérica da FBPase, que é uma enzima chave para a síntese de *novo* de carboidratos. Logo, esta enzima é potencialmente útil para o desenvolvimento de novos nematicidas.

Palavras-chave: Fluazaindolizina. *In silico*. *Meloidogyne* spp. Frutose 1,6-bisfosfatase. *Docking*.

ABSTRACT

Plant parasitic nematodes (PPNs) are ubiquitous microscopic soil pests that feed on plant tissues, resulting in severe crop losses. The most important PPNs in the world are the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), which along with a few other PPNs, generate economic losses in excess of US\$100 billion per year. In Brazil, *Meloidogyne* spp. constitute a notable threat to the country's progress and food security. Fumigant nematicides, as well as carbamates and organophosphates, represent about 50% of all commercial nematicides. However, many of these products are under regulatory pressure due to their harmful health effects. As a result, newer, safer and more selective nematicides such as fluazaindolizine (Salibro™) have emerged, which has been shown to be effective in controlling several groups of PPNs. However, its mechanism of nematicidal action remains unknown. Consequently, the present work had as main objective to identify, through *in silico* methods, the possible target of fluazaindolizine in PPNs. After a pharmacophore search in the LiganExpo database, the ligand EW0 (7-chloro-4-(3-methoxyanilino)-*N*-(4-methoxyphenyl)sulfonyl-1-methylindol-2-carboxamide), which is experimentally complexed to the enzyme fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase), code 6LW2, was selected for its structural similarity with fluazaindolizine. The tertiary and quaternary structures of two amino acid sequences of FBPases produced by *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback and *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield, were modelled. Molecular docking results on FBPases not produced by PPNs, showed that fluazaindolizine binds to such enzymes with an average affinity of -8.1 kcal/mol. Like the potent FBPases inhibitors EW0 and GJO (4-(3-acetamidophenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)sulfonyl-7-nitro-1H-indole-2-carboxamide), fluazaindolizine interacts with the enzyme through hydrogen bonds with key amino acid residues such as Thr31, Leu30, Gly26 and Gly28. On the other hand, in FBPases from *M. enterolobii* and *M. graminicola* there were statistical differences in the affinities calculated with QuickVina software, where the energies recorded were in general lower for all ligands. However, the results obtained with AutoDock software were not statistically different from those obtained for FBPases not produced by PPNs. The pharmacophore characteristics identified in other sulfonylcarboxamides (EW0, GJO etc.) show that a possible mechanism of action of fluazaindolizine is through allosteric inhibition of FBPase, which is a key enzyme for de novo synthesis of carbohydrates. Thus, this enzyme is potentially useful for the development of new nematicides.

Keywords: Fluazaindolizine. *In silico*. *Meloidogyne* spp. Fructose 1,6-bisphosphatase. Docking.

1 INTRODUÇÃO

As cultivares e seus sistemas radiculares sofrem uma variedade de danos durante seus períodos de vida, causados por uma diversidade de microrganismos tais como fungos, bactérias, vírus e nematoides (ZHANG et al., 2020). Dentre esse grupo de microrganismos, os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) estão entre as espécies de nematoides mais prejudiciais do mundo, pois podem causar perdas consideráveis na produção da maioria das espécies de plantas cultivadas (REGMI; DESAEGER, 2020). Ao perturbar a fisiologia das plantas hospedeiras, os nematoides das galhas podem não apenas reduzir o rendimento das culturas, mas também afetar a qualidade do produto (JAOUANNET; ROSSO, 2013). Estima-se que, no mundo, as perdas econômicas geradas por nematoides parasitas de plantas (NPPs) superam os US\$100 bilhões por ano (ELDEEB et al., 2022). Em grande parte, tais perdas se devem à ampla distribuição mundial de *Meloidogyne* spp., e à facilidade com a qual esses fitoparasitas podem infectar plantas diversas. No Brasil, as espécies mais importantes desse gênero são *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (OLIVEIRA et al., 2021; SILVA et al., 2006) que, após penetrarem as raízes das plantas, estabelecem sítios de alimentação, tornando-se endoparasitas sedentários que sequestram os nutrientes e água absorvidos pelas raízes.

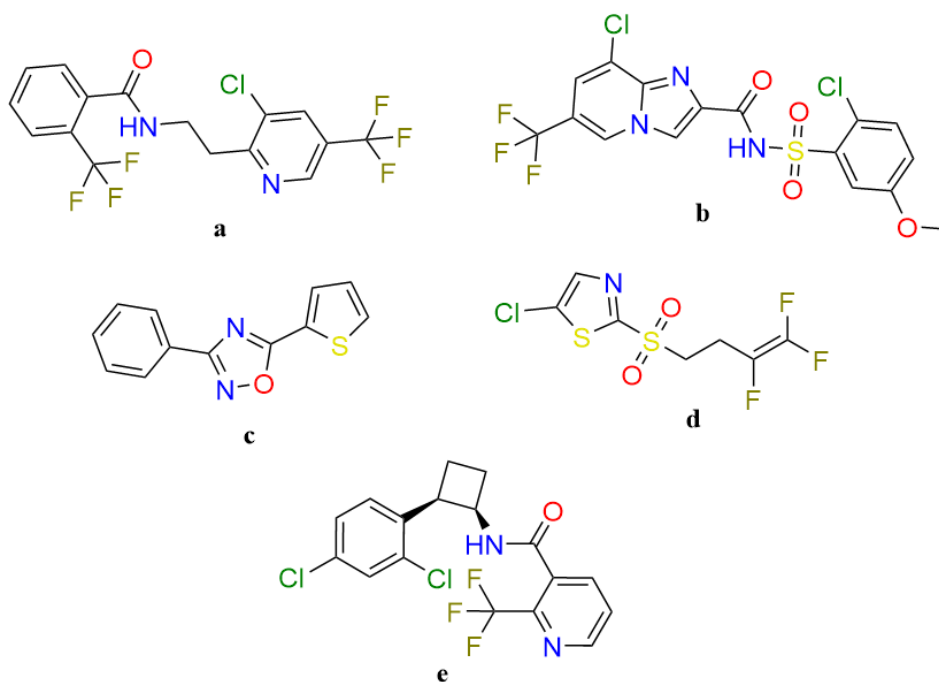
Existem vários métodos de controle comumente usados para reduzir as perdas do rendimento produtivo de cultivares afetadas por NPPs. De maneira geral, esses métodos podem ser classificados em três grandes categorias: controle biológico, controle cultural e controle químico (GRABAU et al., 2020). Embora os métodos de controle biológico e de rotação de culturas apresentem uma pegada ambiental mínima, o certo é que em muitas regiões do mundo a sua prática encontra limitações impostas pelas características econômicas e sociais de suas populações. Consequentemente, os métodos químicos de controle seguem sendo os preferidos pelos agricultores, uma vez que tendem a ser mais práticos, de fácil implementação e com resultados mais rápidos (BECKER, 2014). Entre os métodos de controle químico de NPPs existem duas categorias de acordo com a origem histórica das propriedades físicas dos primeiros nematicidas de uso comercial. Tradicionalmente os fumigantes tais como o brometo de metila, cloropicrina e 1,3-dicloropropeno, têm sido amplamente utilizados desde 1950 no controle de NPPs. Por outro lado, os nematicidas não fumigantes surgiram em 1965 como uma resposta aos efeitos altamente fitotóxicos dos fumigantes. Inicialmente, os nematicidas não fumigantes, que apresentam baixa pressão de vapor, podiam ser divididos em carbamatos (aldicard, carbofuram, carbosulfam, oxamil etc.) e organofosforados (terbufos, etoprofos, fenamifos etc.). Ambos os grupos de substâncias agem

como inibidores não seletivos da enzima acetilcolinesterase, afetando assim, os processos de transmissão nervosa dos seres vivos (EBONE; KOVALESKI; CARDOSO DEUNER, 2019). Embora fossem altamente tóxicos para os mamíferos, eram mais seguros para as plantas do que os nematicidas fumigantes. Conseqüentemente, os carbamatos e os organofosforados se tornaram populares a partir da década de 1970. Porém, com a intensificação das políticas de proteção ambiental a partir do início do século XXI, aumentou significativamente o número de carbamatos e organofosforados proibidos nos países considerados desenvolvidos.

Apesar das enormes pressões regulatórias exercidas pelas agências de proteção ambiental, o valor do mercado de nematicidas continua crescendo. Por exemplo, no ano de 2011 o mercado gerou dividendos acima de US\$ 1 bilhão. No ano de 2020 essa a cifra aumentou para US\$ 1,4 bilhão (WRAM; ZASADA, 2019). Conseqüentemente, na última década tem surgido uma nova série de compostos nematicidas com mecanismos de ação diferentes dos descritos para carbamatos e organofosforados (Figura 1). Métodos tais como o *screening* virtual e *in vitro*, de milhões de bibliotecas de compostos químicos, assim como o desenho de estruturas químicas dirigido por métodos computacionais, têm propiciado o surgimento de novos nematicidas como o fluopiram (Velum Prime®), fluensulfona (Nimitz®), fluazaindolizina (Salibro™), tioxazafeno (NemaStrike™), e mais recentemente (2021) o cyclobutrifluram (TYMIRIUM™) (CHEN; LI; SONG, 2020). Destes novos nematicidas não fumigantes, apenas o fluopiram tem um mecanismo de ação conhecido sobre os NPPs (FASKE; HURD, 2015).

A fluazaindolizina é um novo nematicida seletivo produzido pela companhia Corteva Agriscience™ (Agriculture Division of DowDuPont), que foi descoberto por otimização estrutural após triagem de alto rendimento (*high-throughput screening*) de milhões de compostos. Tem sido testada em diferentes partes do mundo através de ensaios de laboratório, casa de vegetação e em estudos de campo. Em todos esses ensaios mostrou ser efetiva contra diversos tipos de nematoides tais como *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus* spp., *Xiphinema* spp., *Helicotylenchus* spp. e *Pratylenchus* spp. (LAHM et al., 2017). Como pertence ao grupo das *N*-fenilsulfonilimidazopiridina-2-carboxamidas, é facilmente fotodegradada em solução (DT₅₀ < 45 dias) dada à propensão do anel imidazopiridina de experimentar ataques nucleofílicos com uma ampla contribuição de orbitais LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) (LIN et al., 2019).

Figura 36 - Estruturas 2D de novos nematocidas comerciais: (a) fluopiram (N-[2-[3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il]etil]-2-(trifluorometil)benzamida); (b) fluazaindolizina (8-cloro-N-(2-cloro-5-metoxifenil)sulfonyl-6-(trifluorometil)imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida); (c) tiozazafeno (3-fenil-5-tiofen-2-il-1,2,4-oxadiazol); (d) fluensulfona (5-cloro-2-(3,4,4-trifluorobut-3-enilsulfonyl)-1,3-tiazol); (e) ciclobutrifluram (N-[(1R,2R)-2-(2,4-diclorofenil)ciclobutil]-2-(trifluorometil)piridina-3-carboxamida).



Fonte: Do autor (2022).

A fluazaindolizina manifesta moderada solubilidade em água (0,02 g/L), que aumenta com a elevação do pH da solução (2,9 g/L em pH 9,0). O seu coeficiente de partição água/octanol (LogP) mostra que em pH ácido a fluazaindolizina se comporta como uma molécula mais hidrofóbica (LogP = 2,2). No entanto, em pH básico ocorre o contrário, manifestando uma natureza mais hidrofílica, com LogP igual a -0,7 em pH 9,0 (APVMA, 2021). Trata-se de uma substância pouco inflamável, com baixo poder de dispersão aérea, que atua por contato com NPPs, e que não é considerada sistêmica em plantas por aplicação no solo (LAHM et al., 2019). A taxa de aplicação em campo muda com o tipo de cultura, o tipo de solo e o método de aplicação utilizado, variando de 0,25 a 2 kg do ingrediente ativo por hectare (GROOVER; LAWRENCE, 2021).

Atualmente, a fluazaindolizina é classificada, segundo a IRAC (*Insecticide Resistance Action Committee*), dentro do grupo N-UN: nematocida com mecanismo de ação desconhecido ou incerto (SPARKS et al., 2020). Pela sua baixa atividade contra organismos não alvo e pela sua baixa persistência e toxicidade no ambiente, a fluazaindolizina faz parte

de uma nova classe de nematicidas mais eficientes, com atividades biológicas mais seletivas. Consequentemente, conhecer o seu mecanismo de ação é algo de grande importância. Para tanto, as ferramentas computacionais (*in silico*) compõem um dos meios mais rápidos e econômicos, uma vez que elas permitem simular, em curto espaço de tempo e com baixo custo, o funcionamento de sistemas em organismos vivos. Por exemplo, os métodos *in silico* podem ser usados para compreender a interação entre um composto químico e uma enzima, sem o risco que a experimentação traz.

Ante o exposto, buscou-se, no presente trabalho, utilizar ferramentas computacionais com o objetivo de: i) identificar, através de busca farmacofórica, ligantes de proteínas que sejam estruturalmente semelhantes a fluazaindolizina; ii) calcular as energias de afinidade da fluazaindolizina e dos ligantes selecionados pelas suas proteínas alvo; iii) selecionar sequências de aminoácidos nos genomas dos principais NPPs de importância agrícola, que sejam similares às sequências das proteínas pelas quais a fluazaindolizina tiver maiores afinidades; iv) modelar, através de métodos *in silico*, as estruturas 3D das sequências de aminoácidos selecionadas a partir dos genomas de NPPs; iv) e calcular as afinidades da fluazaindolizina pelas estruturas tridimensionais modeladas e as comparar com os valores obtidos para possíveis inibidores de tais estruturas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Busca Conformacional e Otimização da Fluazaindolizina

A estrutura tridimensional da fluazaindolizina (Figura 1) foi preparada com o programa ACD/Chemesketch v.2020.1.2 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada, <https://www.acdlabs.com/>), para logo serem calculados os seus estados de protonação (pKa) em pH 7,0 com o uso do programa MarvinSketch v.21.4 (<https://chemaxon.com/>). Todas as estruturas foram salvas no formato mol e convertidas ao formato sdf através do uso do programa OpenBabel v.2.4.1 (O'BOYLE et al., 2011). A seguir, foram feitas buscas conformacionais com o programa Open3Dalign v.2.3 (TOSCO; BALLE; SHIRI, 2011), utilizando 1,000 simulações por dinâmica molecular, com o campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94). O solvente (água) foi implicitamente considerado com o uso do modelo Generalized Born-Surface Area (GBSA). Em seguida, as conformações mais estáveis e todas aquelas até 10 kcal/mol distantes das mais estáveis, foram otimizadas com o programa MOPAC 2016 (Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA), que usou o Hamiltoniano PM7 e considerou o solvente (água) pelo

emprego do *Conductor-Like Screening Model* (COSMO) (STEWART, 1990). Por fim, aquelas conformações que apresentaram, segundo a distribuição de Boltzmann, uma população igual ou superior a 5%, foram salvas no formato pdb através do programa GABEDIT v. 2.5.0 (ALLOUCHE, 2011).

2.2 Seleção de Potenciais Alvos Proteicos Através de Busca Farmacofórica

Os ligantes de proteínas da base de dados do Ligand Expo (<http://ligand-expo.rcsb.org/>) (FENG et al., 2004) foram submetidos à adição de átomos de hidrogênio e convertidos ao formato mol2 com o uso do programa OpenBabel. Em seguida, foram submetidos à busca farmacofórica com o programa LiSiCA v.1.0.1 (LEŠNIK et al., 2015), que usou os modelos farmacofóricos criados pelo próprio programa para as conformações mais estáveis dos tautômeros da fluazaindolizina. Apenas as proteínas cujos ligantes atenderam aos seguintes requisitos foram selecionadas para as fases seguintes: a) com escore de Tanimoto igual ou superior a 0,4; b) localizados em cavidades nas proteínas; c) sem ligação química covalente com a proteína.

2.3 Identificação dos Potenciais Alvos Proteicos no Genoma de NPPs

Do RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) foram obtidos, em formato fasta, as sequências de aminoácidos das proteínas que, por cumprirem com os requisitos anteriormente citados, foram selecionadas a partir da busca farmacofórica. Com o uso do programa Ugene v.36.0 (OKONECHNIKOV et al., 2012), e com o emprego do algoritmo de alinhamento Clustal Omega v.1.2.2 (SIEVERS; HIGGINS, 2014), as sequências de aminoácidos foram alinhadas e se calcularam as suas similaridades e dissimilaridades de Hamming, levando-se em consideração todos os gaps. Quando duas ou mais sequências de aminoácidos apresentavam similaridade acima de 95% entre elas, selecionou-se aquela enzima que apresentava a melhor resolução cristalográfica para a estrutura tridimensional.

Através do National Center for Biotechnology Information (NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), que empregava o programa de alinhamento Blastp+ v.2.13.0 (ALTSCHUL et al., 1997; ALTSCHUL et al., 2005), foi feita a busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas acima selecionadas, no genoma dos principais nematoides de importância agrícola: *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp., *Globodera* spp., *Pratylenchus* spp. etc. As sequências no genoma dos nematoides que apresentavam escores

acima de 200, cobertura de sequência maior ou igual a 95%, e função biológica semelhante, foram selecionadas como possíveis alvos da fluazaindolizina.

2.4 Seleção de Estruturas 3D de Enzimas FBPases

Seguindo o procedimento anteriormente descrito para a identificação do alvo proteico no genoma dos NPPs, foram obtidos do Protein Data Bank, os arquivos fasta e pdb das enzimas com 95% ou mais de similaridade em relação à sequência de aminoácidos da FBPase 6LW2 (ZHOU et al., 2020). Após o alinhamento das sequências com o Ugene, conforme descrito acima, foram descartadas todas as FBPases com 60% ou menos de similaridade em relação à enzima 6LW2. Com o uso do visualizador gráfico UCSF Chimera v.1.16.1 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>; PETERSEN et al., 2004), foram descartadas as enzimas que apresentavam ligantes localizados fora do sítio de ligação do AMP (adenosina monofosfato) em FBPase, ou que estivessem fora de cavidades; assim como aquelas que apresentavam resíduos faltantes no sítio alostérico de ligação do AMP.

Com o emprego do *script* em Python `MakeMultimer.py` (<http://watcut.uwaterloo.ca/tools/makemultimer/>), foram obtidos os arquivos pdb das unidades biológicas das enzimas similares a 6LW2. As estruturas tridimensionais resultantes foram alinhadas com o programa computacional Lovoalign v.21.027 (MARTÍNEZ; ANDREANI; MARTÍNEZ, 2007), que também foi utilizado para calcular raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) para cada par de estruturas tridimensionais. Aquelas estruturas que apresentavam valores de RMSD acima de 6 Å em relação à 6LW2 foram descartadas.

2.5 Modelagem 3D das FBPases Produzidas por *M. enterolobii* e *M. graminicola*

Previamente à modelagem das sequências CAD2178941 e KAF7639614, que correspondem à enzima FBPase de *M. enterolobii* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAD2178941>) e *M. graminicola* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KAF7639614>), respectivamente, foram feitas avaliações das referidas sequências com vistas a identificar possíveis locais de clivagem, peptídeos sinalizadores, localizações subcelulares, presença de ligações dissulfeto, acessibilidade de solvente etc. Para tal propósito se empregaram os seguintes serviços computacionais: Peptide Cutter (GASTEIGER et al., 2003; https://web.expasy.org/peptide_cutter/), Predict Protein (BERNHOFER et al., 2021;

<https://predictprotein.org/>), SignalP-5.0 (ARMENTEROS et al., 2019; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), SPEPLip (FARISELLI; FINOCCHIARO; CASADIO, 2003; http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/spep/pred_spepcgi.cgi), Sigcleave (VON HEIJNE, 1986; <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/sigcleave>), PrediSi (NIELSEN et al., 1997; <http://www.predisi.de/index.html>), Phobius (KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2007; <https://phobius.sbc.su.se/>), Signal-CF (CHOU; SHEN, 2007; <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-CF/>), Signal-3L (ZHANG; PAN; SHEN, 2020; <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L/>), DeepLoc-1.0 (ARMENTEROS et al., 2017; <http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc-1.0/index.php>), BaCelLo (PIERLEONI et al., 2006; <http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello/index.htm>), Euk-mPLoc 2.0 (CHOU; SHEN, 2010; <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>), LocTree3 (GOLDBERG; HAMP; ROST, 2012; <https://roslab.org/services/loctree3/>), MultiLoc2 (BLUM; BRIESEMEISTER; KOHLBACHER, 2009; <https://abi-services.informatik.uni-tuebingen.de/multiloc2/webloc.cgi>), YLoc (BRIESEMEISTER; RAHNENFÜHRER; KOHLBACHER, 2010; <https://abi-services.informatik.uni-tuebingen.de/yloc/webloc.cgi>), e DIpro (CHENG et al., 2005; <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/index.html>).

Para gerar as estruturas tridimensionais das sequências de aminoácidos, foram empregados métodos de modelamento por homologia (modelagem comparativa) fornecidos pelos servidores: Phyre2 (KELLEY et al., 2015; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), CPHmodels 3.2 (NIELSEN, et al., 2010; <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>), SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018; <https://swissmodel.expasy.org/interactive>), GalaxyWEB (KO et al., 2012; <http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=TBM>), M4T Server v 3.0 (FERNANDEZ-FUENTES et al., 2007; <http://manaslu.fiserlab.org/M4T/>), FALCON2 (KONG et al., 2021; <http://protein.ict.ac.cn/TreeThreader/>), I-TASSER (YANG; ZHANG, 2015; <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), LOMETS (WU; ZHANG, 2007; <https://zhanggroup.org/LOMETS/>), Raptor-X (KÄLLBERG et al., 2012; <http://raptorx.uchicago.edu/StructPredV2/predict/>), IntFOLD (MCGUFFIN et al., 2019; http://www.reading.ac.uk/bioinf/IntFOLD/IntFOLD5_form.html), HHPred (ZIMMERMANN et al., 2017; <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>), AlphaFold2 (CRAMER, 2021; <https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb?authuser=0#scrollTo=33g5Ilegij5R>), e Robetta (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004; <http://rosetta.bakerlab.org/>). Em todos os casos, utilizaram-se os valores padrões para todos

os parâmetros disponíveis. Todos os modelos tridimensionais gerados foram empregados na etapa seguinte.

2.6 Avaliação da Qualidade Tridimensional dos Modelos Gerados para as Sequências: CAD2178941 e KAF7639614

Todos os arquivos pdb dos modelos gerados foram padronizados com o uso do algoritmo PSFgen, que faz parte do programa computacional VMD v. 1.9.3 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). Em seguida, avaliaram-se suas qualidades estereoquímicas e geométricas através do emprego de diferentes servidores tais como: ProTSAV (SINGH et al., 2016; <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/proteomics/protsav.jsp>), ModFOLD (MAGHRABI; MCGUFFIN, 2017; http://www.reading.ac.uk/bioinf/ModFOLD/ModFOLD6_form.html), QMEAN (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011; <https://swissmodel.expasy.org/qmean/>), PSICA (WANG et al., 2019; <http://qas.wangwb.com/~wwr34/mufoldqa/index.html>), e VoroMQA (OLECHNOVIČ; VENCLOVAS, 2017; <https://bioinformatics.lt/wtsam/voromqa>). Os resultados de pontuação (escore: 0 a 1) foram organizados e analisados para logo selecionar aqueles modelos que apresentavam as melhores características estruturais.

2.7 Construção das Estruturas Quaternárias das FBPsases Modeladas a Partir das Sequências: CAD2178941 e KAF7639614

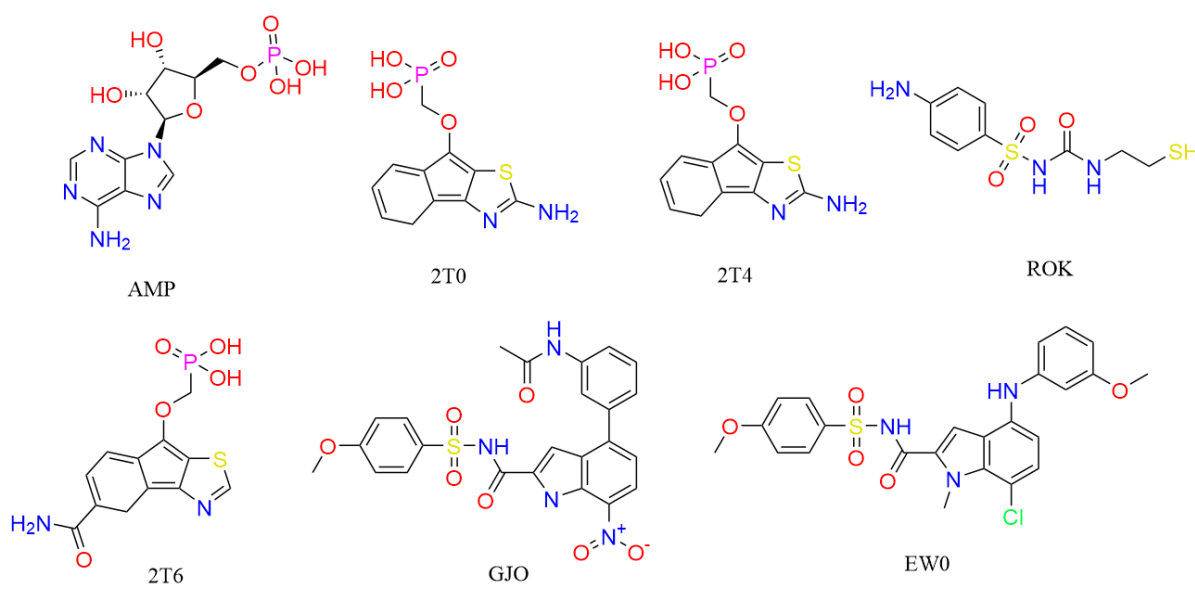
A partir das estruturas terciárias modeladas para as sequências CAD2178941 e KAF7639614, procedeu-se à construção de seus respectivos homotetrâmeros. Para tal propósito, os modelos tridimensionais selecionados após avaliação de suas qualidades estruturais, foram alinhados tridimensionalmente, através do uso do *software* Lovoalign v.21.027, às estruturas quaternárias de todos os templates utilizados na construção de suas estruturas terciárias, incluindo o homotetrâmero 6LW2, que foi a enzima selecionada na busca farmacofórica. O alinhamento cadeia por cadeia forneceu as coordenadas dos homotetrâmeros para os modelos construídos para as FBPsases de *M. enterolobii* e *M. graminicola*. Com o uso do algoritmo PrepDock incorporado ao *software* Chimera v.1.15, foram adicionados átomos de hidrogênio levando-se em consideração aspectos tais como ligações de hidrogênio, efeitos estéricos etc. Também foram adicionadas cargas seguindo o padrão do Chimera (Campo de força do Amber para resíduos padrões e BCC-AM1 para os que não são padrões). A seguir foram avaliadas as qualidades estruturais e energéticas dos homotetrâmeros, através do

emprego de diferentes *softwares* quimioinformáticos tais como: Foldx_5.0 (VAN DURME et al., 2011; <https://foldxsuite.crg.eu/>), OPUS_CA (WU et al., 2007), RW (ZHANG; ZHANG, 2010; <https://zhanggroup.org/RW/>), dDFIRE 1.1 (YANG; ZHOU, 2008; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18260109/>), OPUS-PSP (LU; DOUSIS; MA, 2008), FRST 1.2 (TOSATTO, 2005; <https://mybiosoftware.com/frst-1-2-protein-model-quality-estimation-method.html>), e Rosetta v.2021.38 (PARK et al., 2016). Com os valores registrados em cada método de avaliação empregado, procedeu-se a selecionar os melhores homotetrâmeros após normalização dos dados. Finalmente, os homotetrâmeros selecionados foram empregados na complexação com inibidores de FBPase através do alinhamento dos mesmos com suas FBPases alvo. No caso da fluazaindolizina, esta foi a complexada aos homotetrâmeros de acordo com as coordenadas de localização e posicionamento do ligante EW0 em 6LW2, através do alinhamento com LS-align (HU et al., 2018). Finalmente, os complexos foram otimizados com o uso do Chimera v.1.15. Para tanto alteraram-se os valores de minimize nsteps e de cgsteps para 300 e 30 respectivamente. Quanto aos outros parâmetros, permaneceram com os valores padrões.

2.8 Ancoramento Molecular (*Docking*) Nas FBPases Não Produzidas por Nematoides

Para o ancoramento molecular nas FBPases não produzidas por nematoides empregou-se a estrutura tridimensional mais estável da fluazaindolizina em pH 7,0 (FLUA), junto com os ligantes selecionados aleatoriamente dentre o conjunto de compostos inibidores de FBPases obtidos do RCSB Protein Data Bank. Entre os ligantes selecionados estão: 2T0 (diidrogenofosfato de 2-amino-4,5-diidrobenzo[e][1,3]benzotiazol-8-ila), 2T4 (ácido (2-amino-4*H*-indeno[1,2-d][1,3]tiazol-8-il)oximetilfosfônico), 2T6 (ácido (5-carbamoil-4*H*-indeno[1,2-d][1,3]tiazol-8-il)oximetilfosfônico), GJO (4-(3-acetamidofenil)-*N*-(4-metoxifenil)sulfonil-7-nitro-1*H*-indolo-2-carboxamida), ROK (1-(4-aminofenil)sulfonil-3-(2-sulfaniletíl)ureia), EW0 (7-cloro-4-(3-metoxianilino)-*N*-(4-metoxifenil)sulfonil-1-metilindolo-2-carboxamida), e AMP (di-hidrogenofosfato de [(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-aminopurin-9-il)-3,4-diidroxioxolan-2-il]metila)(Figura 36).

Figura 37 - Estruturas químicas de ligantes inibidores de FBPase, que estavam experimentalmente complexados às enzimas 2F3D, 3A29, 3KBZ, 2VT5, 3KC1, 7CVN, 6LW2; e que foram empregados no ancoramento molecular nas FBPases não produzidas por nematoides fitoparasitas.



Fonte: Do autor (2022).

Com o uso do programa VMD v.1.9.3 foram eliminados os *alternation locations* (altloc) de todos os arquivos pdb das enzimas FBPases co-cristalizadas com os ligantes acima selecionados. A seguir, com o uso do programa LovoAlign v.21.027, as enzimas foram alinhadas, junto com os modelos homotetraméricos, à enzima 6LW2, para finalmente obter os seus valores de RMSD.

Através dos *scripts* em Python `prepare_ligand4.py` e `prepare_receptor4.py`, módulos do programa Autodock Tools (ADT4) v.1.5.6 (MORRIS et al., 2009), foram preparados os arquivos `pdbqt`, de ligantes e enzimas, respectivamente. No caso das enzimas selecionadas, apenas a proteína foi empregada, sendo descartado todo o restante no processo de preparação.

A região de ancoramento foi definida através do *script* em Python: `GetBox.py` (<https://github.com/MengwuXiao/Getbox-PyMOL-Plugin#readme>), o qual calculou as dimensões da região de ancoramento de acordo as coordenadas atômicas posicionadas sobre o

espaço ocupado pelos ligantes selecionados para ancoramento mais 6 Å em cada direção. Centro de coordenadas e tamanho do grid: -6.2, 40, -41 Å (x, y, z); 35 x 26 x 37 Å³ (x, y, z).

Com o uso dos programas AutoDock v.4.2.6 (MORRIS et al., 2009) e QuickVina v.2.1 (ALHOSSARY et al., 2015) foi feito o ancoramento molecular entre ligantes e enzimas. A exceção do parâmetro exhaustiveness, que foi elevado para 128 no QuickVina, todos os outros parâmetros permaneceram com os valores padrões. A validação dos métodos de ancoramento foi corroborada por determinação do valor de RMSD entre o resultado qualitativo obtido teoricamente com aquele obtido experimentalmente por cristalografia de raios X (*re-docking*). Para isto, empregaram-se visualizadores gráficos como UCSF Chimera, Pymol (the PyMOL Molecular Graphics System, v.2.4.1, Schrödinger, LLC), +ProteinsPlus (<https://proteins.plus>), LigPlot+ v. 2.2.5 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011) e Discovery Studio (BIOVIA, DassaultSystèmes, Discovery Studio v.20.1.0, San Diego: DassaultSystèmes, 2020).

2.9 Determinação da Energia de Afinidade nas Estruturas Quaternárias das FBPases Produzidas por *M. graminicola* (KAF7639614) e *M. enterolobii* (CAD2178941)

Após as formações dos complexos entre ligantes inibidores de FBPase, incluindo a fluazaindolizina, e as estruturas quaternárias dos modelos FBPases de *M. enterolobii* e *M. graminicola*, procedeu-se ao cálculo das energias de afinidade sem realizar o processo de ancoramento molecular, que consiste de um número de iterações durante as quais os graus de liberdade rotacionais, translacionais e torcionais dos ligantes são amostrados aleatoriamente por uma determinada etapa que estima a energia intermolecular entre cada ligante e o seu receptor. A função *Only score* do programa QuickVina permitiu obter a energia de afinidade da fluazaindolizina seguindo uma simulação de interação de acordo com a localização de outras sulfonilcarboxamidas no sítio alostérico de FBPases. Quanto ao programa AutoDock, a função *energy estimation* foi usada para calcular a energia de uma pose de ligante como encontrada em um complexo, como em uma estrutura cristalográfica de raios-X, sem realizar quaisquer pesquisas. As coordenadas do ligante não foram alteradas, e os mapas de grade foram usados apenas para estimar as diferentes contribuições de energia.

2.10 Análise Estatística

Os resultados de energia de afinidade (kcal/mol) obtidos através de cálculos com AutoDock e QuickVina, tanto para as proteínas do RCSB Protein Data Bank como para os

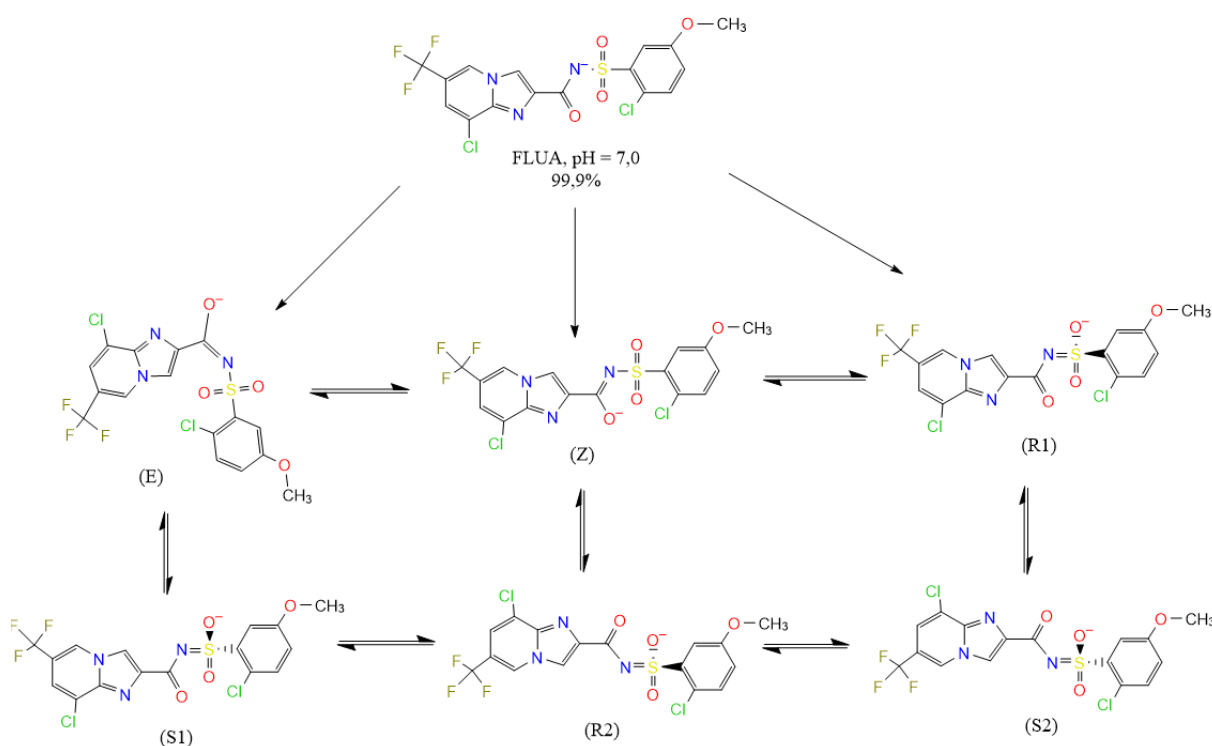
modelos construídos (alvo proteicos), foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e subsequente comparação de médias com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), através do emprego do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Busca Conformacional e Farmacofórica

Quando calculada a constante de dissociação (pK_a) da fluazaindolizina em pH 7,0, através do *software* MarvinSketch v.21.4; 99,9% se encontrava desprotonada no nitrogênio do fragmento sulfonamida. O átomo de nitrogênio desprotonado, que contém a carga negativa, permitiu a possibilidade de formar seis tautômeros para a fluazaindolizina, através da sua interação com os átomos vizinhos (Figura 38).

Figura 38 - Estruturas químicas das diferentes formas tautoméricas da fluazaindolizina em pH 7,0.



Após a busca conformacional por dinâmica molecular, realizada para a fluazaindolizina protonada e desprotonada no átomo de nitrogênio da porção sulfonamida

(FLUA), bem como para os tautômeros da estrutura desprotonada, foram gerados mais de trinta (30) conformações diferentes para cada estrutura química inicial. Porém, após otimização de todas as conformações pelo emprego da mecânica quântica, apenas 4 a 7 conformações, para cada uma das estruturas químicas iniciais, apresentaram energias correspondentes a populações acima de 2% de acordo com a distribuição de Boltzmann. Entretanto, e só considerando a melhor distribuição entre o conjunto de tautômeros, a forma desprotonada da fluazaindolizina é a que predomina com um 27% da população de tautômeros (Tabela 7).

Tabela 8 - Valores de energia das melhores conformações para cada um dos tautômeros da fluazaindolizina desprotonada, após busca conformacional por dinâmica molecular (mecânica molecular empregando MMFF94) e subsequente otimização das melhores conformações usando a mecânica quântica (método semi-empírico com o Hamiltoniano PM7).

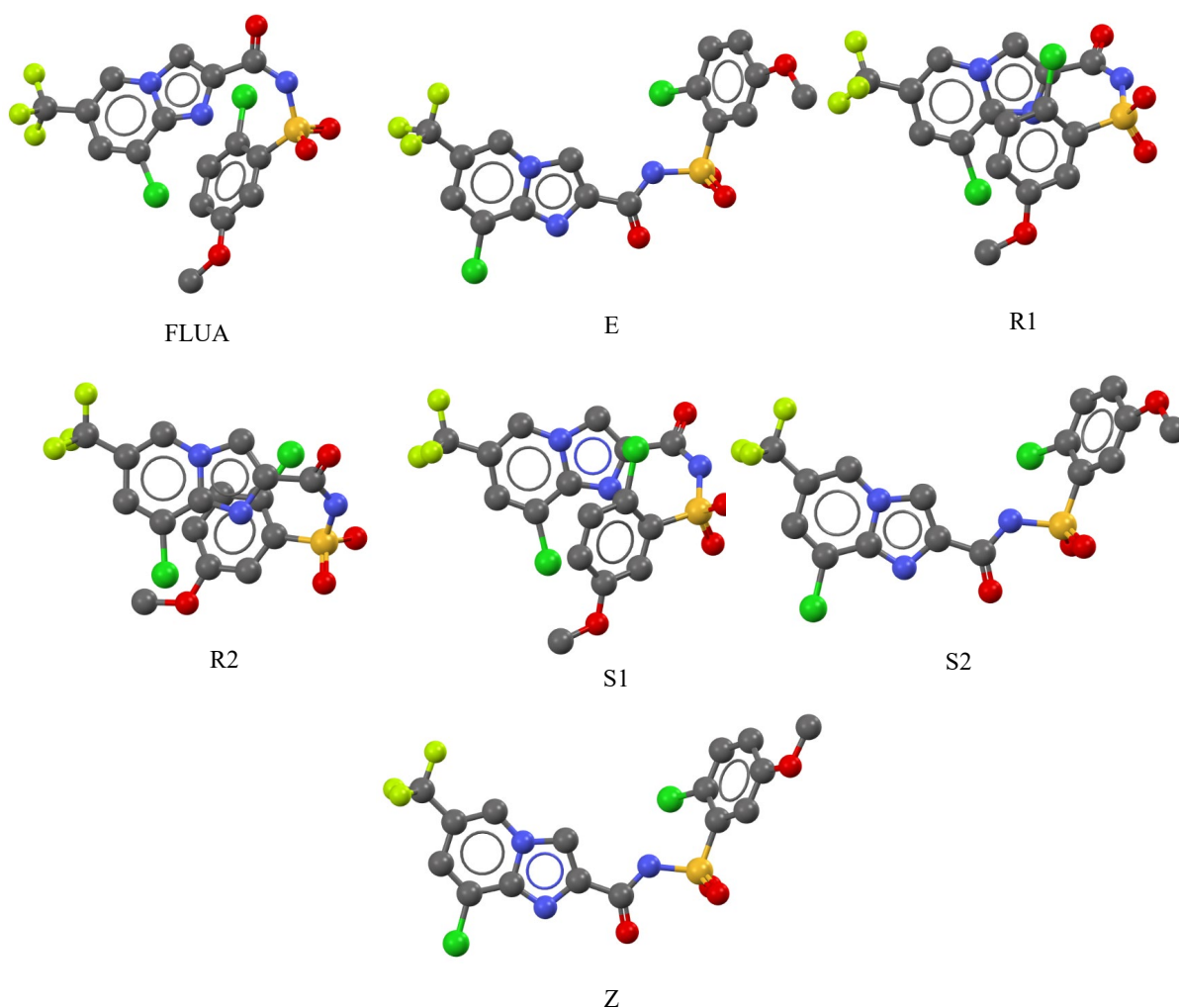
Fluazaindolizina + Tautômeros	Energia (kcal/mol) após dinâmica molecular	Energia total (eV) após mecânica quântica	Distribuição de Boltzmann* (%)
FLUA	9,9214	-5939,26359	27
E	-32,9926	-5939,20983	9
Z	-33,4726	-5939,2471	10
R1	-0,3592	-5939,24932	18
R2	-0,3592	-5939,2328	16
S1	-0,3592	-5939,21268	13
S2	-3,5428	-5939,21988	7
SOMA			100

*Ajustada com base nas distribuições obtidas através da otimização com mecânica quântica das conformações mais representativas de cada tautômero.

Fonte: Do autor (2022).

De forma geral, a fluazaindolizina apresenta seis (6) ligações que, teoricamente, possuem rotações livres, o que tornou possível obter, após a etapa de otimização, diferentes arranjos estruturais para cada um dos tautômeros. Com exceção dos tautômeros E, S1 e S2, existe uma tendência do fragmento 1-cloro-4-metoxibenzeno para formar interações π - π com o anel imidazopiridina. Consequentemente, na maioria dos casos a estrutura tridimensional adota uma forma em “U”, com os anéis aromáticos contrapostos (Figura 39).

Figura 39 - Representação tridimensional das conformações mais estáveis dos diferentes tautômeros após dinâmica molecular (MMFF94) e otimização por mecânica quântica (Hamiltoniano PM7).



Fonte: Do autor (2022).

Na busca por substâncias farmacofôricamente semelhantes à fluazaindolizina, presentes no LigandExpo *database*, foram selecionados 14 complexos (ligante + proteína alvo) diferentes, cujos ligantes apresentaram similaridades de Tanimoto acima de 0,4 (Tabela 8). Todos esses ligantes se encontravam em cavidades dentro de suas enzimas alvo e não apresentavam ligações químicas covalentes com a mesma. Aliás, os relatos da literatura científica mostraram que são inibidores efetivos de suas enzimas alvo.

Tabela 9 - Ligantes e enzimas selecionadas na busca farmacofórica com o LiSiCa v.1.0.1, realizada na base de dados do LigandExpo de abril de 2021 (35,000 *small molecules*).

Complexo: Enzima + Ligante	Enzima: Organismo	Escore de Tanimoto
3iue_FG3_1_A_302__C	Pantotenatosintetase: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,50
4mq6_29W_1_B_401__N	Pantotenatosintetase: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,50
4mui_2DQ_1_B_402__J	Pantotenatosintetase: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,50
4mun_2DZ_1_A_403__E	Pantotenatosintetase: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,47
5a86_D7E_1_A_1433__E	Receptor nuclear S1P: <i>Homo sapiens</i>	0,46
4yd7_F5N_1_A_405__F	Endotiapepsina: <i>Cryphonectria parasitica</i>	0,45
5qtp_PWJ_1_D_501__V	ADP-açúcar pirofosfatase: <i>Homo sapiens</i>	0,45
4p8l_36C_1_A_502__D	decaprenilfosforil-beta-D-ribose oxidase: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,45
4p8y_38C_1_A_502__D	decaprenilfosforil-beta-D-ribose oxidase: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,45
4mue_2DH_1_A_401__C	Pantotenatosintetase: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,43
5pzv_94G_1_D_401__H	Frutose-1,6-bifosfatase: <i>Homo sapiens</i>	0,43
2abj_CBC_1_J_4401__K	Aminotransferase: <i>Homo sapiens</i>	0,40
6lw2_EW0_1_D_401__H	Frutose-1,6-bifosfatase: <i>Homo sapiens</i>	0,40
6des_6R4_1_A_704__E	Acetolactato sintase: <i>Candida albicans</i>	0,40

Fonte: Do autor (2022).

3.2 Análise das Proteínas nos Genomas dos Principais NPPs

Quando as sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas na busca farmacofórica foram empregadas em busca por sequências similares no genoma das principais famílias de nematoides parasitas de plantas (*Meloidogynidae*, *Heteroderidae*, *Pratylenchidae*), foi possível identificar seis sequências com escores acima de 200 e cobertura de sequência maior do que 90% (Tabela 9).

Tabela 10 - Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas na busca farmacofórica com a fluazaindolizina e que apresentaram escores acima de 200 com uma cobertura maior do que 90%. Os alinhamentos foram feitos com o programa Blastp 2.10.0+, no banco de genomas de nematoides (taxid 315429 e taxid: 6301) do National Center for Biotechnology Information – NCBI.

Código* enzima	Família NFPs	Espécie (s)	Total escore	Cobertura (%)	Código** da sequência no genoma dos NFPs
2ABJ	Meloidogynidae	<i>M. graminicola</i>	350	98	KAF7637783.1
3IUE	Meloidogynidae	<i>M. enterolobii</i>	362	92	CAD2179623.1
4MUN	Meloidogynidae	<i>M. enterolobii</i>	362	92	CAD2179623.1
	Heteroderidae	<i>H. glycines</i>	345	92	ACZ34280.1
4P8Y	Meloidogynidae	<i>M. enterolobii</i>	228	93	CAD2141920.1
		<i>M. graminicola</i>	220	91	KAF7629860.1
4YD7	Meloidogynidae	<i>M. incognita</i>	305	95	ABC88426.1
		<i>M. enterolobii</i>	305	95	CAD2203503.1
6LW2	Meloidogynidae	<i>M. enterolobii</i>	459	99	CAD2178941.1
		<i>M. graminicola</i>	452	99	KAF7639614.1

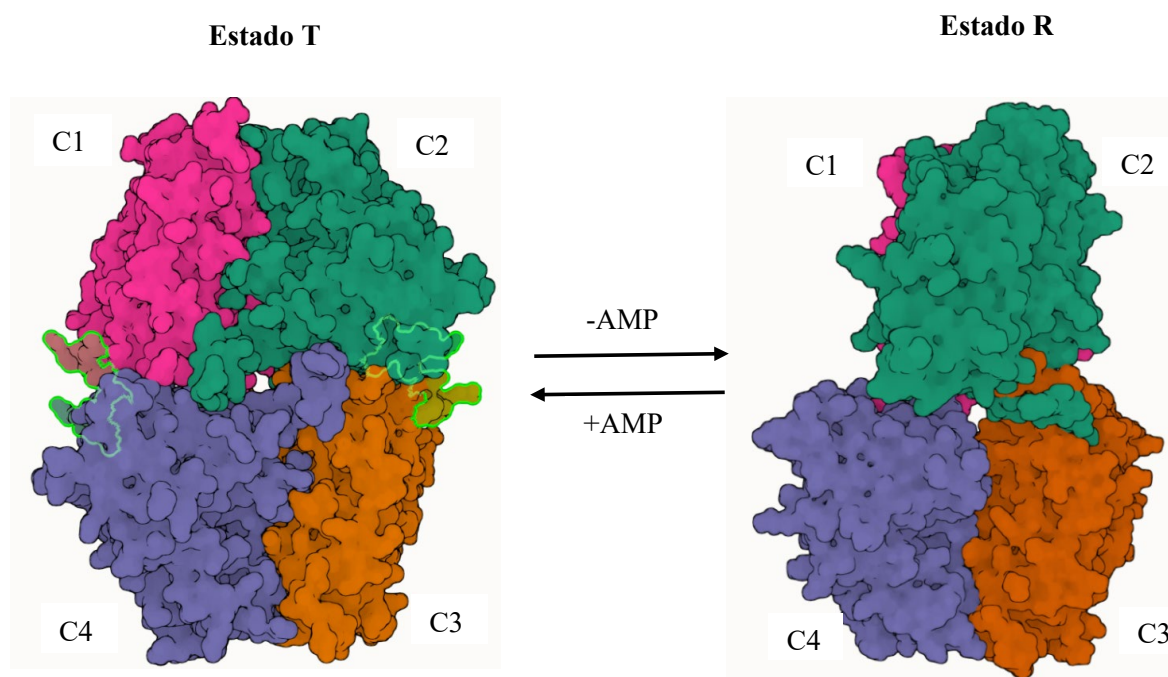
*De acordo com o RCSB Protein Data Bank (Disponível em: <https://www.rcsb.org>).

** De acordo com o NCBI (Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Fonte: Do autor (2022).

Após analisar as relações estruturais e bioquímicas entre a sequência primária de cada proteína da busca farmacofórica e aquela sequência identificada no genoma de *Meloidogyne* spp. ou/ e *Heterodera* spp., restou apenas a proteína 6LW2, que é uma frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase; EC 3.1.3.11) de *Homo sapiens* L. De acordo com os cálculos feitos com o programa Ugene, após alinhamentos das sequências com o programa Clustal Omega, a sequência da FBPase 6LW2 apresentou identidade de 62 % em relação às sequências CAD2178941 e KAF7639614 de *M. enterolobii* e *M. graminicola*, respectivamente (Figura 40).

Figura 41 - Estruturas quaternárias que mostram os diferentes estados conformacionais (R e T) do homotetrâmero da enzima frutose-1,6-bifosfatase. Cada subunidade (C1-C4) é representada por uma cor diferente. De verde fosforescente é ressaltado o sítio alostérico de ligação do AMP.



Fonte: Do autor (2022).

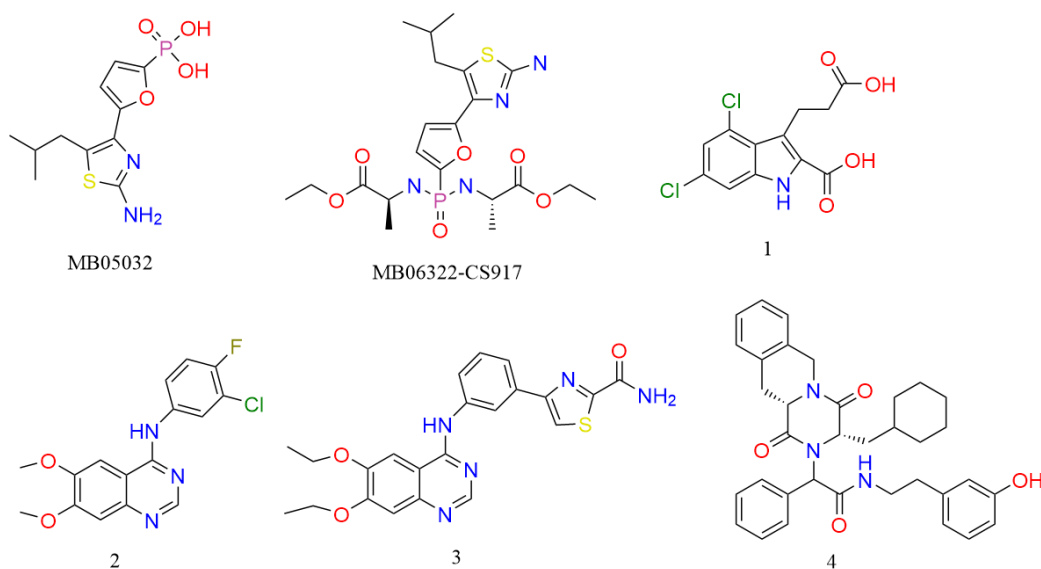
Além de participar da gliconeogênese, a FBPase também é importante na ciclagem do substrato entre F6P e F1,6P2. Este ciclo é essencial para o controle metabólico e geração de calor quando a temperatura ambiente é baixa, assim como na supressão do apoptose (TILLMANN; BERNHARD; ESCHRICH, 2002; VOEHRINGER et al., 2000).

Em *Leishmania* spp. e *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, a via gliconeogênica é imprescindível para a formação de fosfatos de açúcar que logo vão ser transformados em carboidratos de armazenamento e glicoconjugados que são essenciais para a replicação e virulência dos amastigotos na célula hospedeira (BLUME et al., 2015; YUAN et al., 2017). No verme trematódeo *Clonorchis sinensis* Looss a frutose-1,6-bisfosfatase é um dos produtos de excreção/secreção liberados pelo parasita durante o processo de infecção, sugerindo assim que a gliconeogênese faz parte fundamental da patogênese de *C. sinensis* (LIANG et al., 2013). Em nematóides como *Litomosoi descarinii* Travassos e *Ascaris lumbricoides* L., a atividade da FBPase acontece de forma prevalente no fornecimento de energia para o crescimento e desenvolvimento do parasita tanto fora como dentro de seu hospedeiro

definitivo (BURENINA, 2010; SAZ; LESCURE, 1967; SRIVASTAVA et al., 1970). Conseqüentemente, acredita-se que a FBPase é uma enzima limitante do metabolismo energético, o que significa que ela é um alvo atraente para intervenções terapêuticas ou biotecnológicas.

A natureza hidrofílica dos locais de ligação do AMP e seu amplo uso para a regulação alostérica de enzimas nas vias metabólicas em geral, tem dificultado historicamente o desenvolvimento de miméticos do AMP (HEBEISEN et al., 2008). Uma das abordagens empregadas para contornar tal dificuldade consiste no desenho de drogas baseadas na relação entre estrutura e atividade (QSAR), o que permitiu descobrir uma série de furilfosfonatos que imitam o AMP (Figura 42).

Figura 42 - Estruturas 2D de inibidores da frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase) que mimetizam o efeito do inibidor alostérico natural AMP.



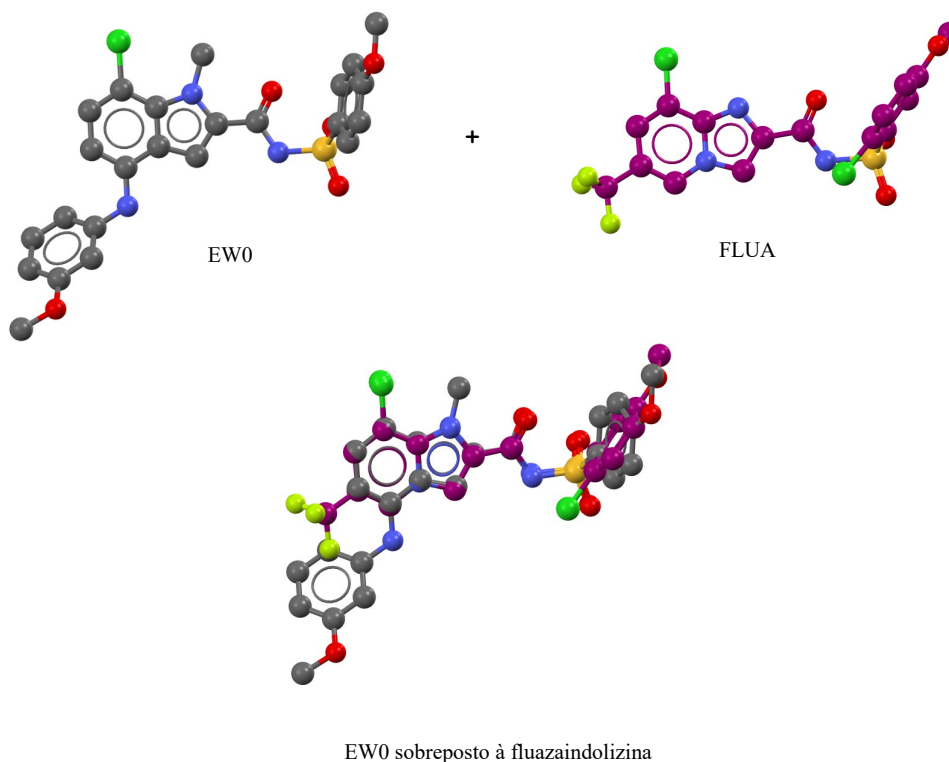
Fonte: Do autor (2022).

Ensaaios clínicos realizados em humanos, revelaram que a pró-droga MB06322-CS97 é um potente e específico inibidor da FBPase humana (DANG et al., 2010). Pfizer e Ontogen têm reportado outros vários quimiotipos inibidores de FBPases que incluem: ácido indolcarboxílicos (1), anilinoquinazolininas (2 e 3) e piperazinedionas (4) (Figura 7) (VON GELDERN et al., 2006). Na última década, novos inibidores que atuam sobre sítios alostéricos ou diretamente nos sítios ativos têm sido descobertos. Alguns exemplos são as

benzoxazol-2-benzenossulfonamidas, sulfonilureas aromáticas e arilsulfonilcarboxamidas, que agem como potentes inibidores alostéricos da enzima (HUANG et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

A estrutura tridimensional da FBPase 6LW2 se encontra co-cristalizada experimentalmente com o ligante EW0, que apresentou escore de Tanimoto de 0,4 em relação ao nematicida fluazaindolizina (Tabela 8). Vale mencionar que, assim como a fluazaindolizina, EW0 é um derivado das indol *N*-sulfonilcarboxamidas (Figura 43).

Figura 43 - Estrutura tridimensional do ligante EW0 (7-cloro-4-(3-metoxianilino)-*N*-(4-metoxifenil)sulfonil-1-metilindol-2-carboxamida), que foi selecionado na busca farmacofórica; e sobreposição tridimensional do mesmo (cor cinza) com o nematicida fluazaindolizina (cor roxa).



Fonte: Do autor (2022).

3.3 Seleção de Estruturas Tridimensionais de Enzimas FBPases Similares a 6LW2

Do RCSB Protein Data Bank foram selecionados 45 complexos de estruturas tridimensionais de enzimas FBPases, cujas sequências de aminoácidos apresentaram 95% ou mais de similaridade com a sequência 6LW2. Após o descarte de estruturas que não

cumpriram com os requisitos anteriormente expostos, restaram 13 FBPsases junto com os seus ligantes que, segundo dados da literatura são inibidores da enzima (Tabela 10).

Tabela 11 - Estrutura tridimensional do ligante EW0 (7-cloro-4-(3-metoxianilino)-N-(4-metoxifenil)sulfonil-1-metilindol-2-carboxamida), que foi selecionado na busca farmacofórica; e sobreposição tridimensional do mesmo (cor cinza) com o nematocida fluazaindolizina (cor roxa).

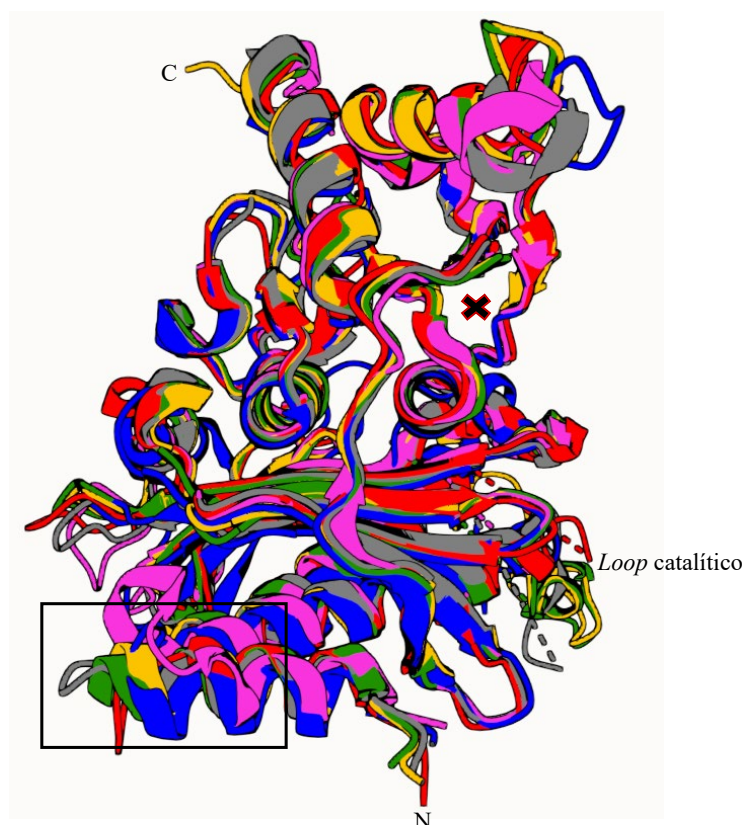
Código Enzima*	Nº de resíduos	Ligante inibidor	Literatura: Doi
3A29	337	2T0	10.1016/j.bmcl.2009.08.081
3KBZ	337	2T4	10.1016/j.bmcl.2009.12.056
3KC0	337	2T5	10.1016/j.bmcl.2009.12.056
3KC1	337	2T6	10.1016/j.bmcl.2009.12.056
2FIX	338	870	10.1016/j.bmcl.2006.01.014
5PZU	338	94D	10.2210/pdb5PZU/pdb
2FHY	374	A37	10.1016/j.bmcl.2006.01.015
1FRP	335	AMP	10.1073/pnas.91.26.12482
1FSA	337	AMP	10.1002/pro.5560051120
1FTA	337	AMP	10.1016/S0021-9258(18)47047-0
7CVN	338	GJO	10.14142/j.cnki.cn21-1313/r.2020.12.001
2VT5	338	ROK	10.1016/j.bmcl.2008.06.103
6LW2	338	EW0	10.1021/acs.jmedchem.0c00726

*De acordo com o RCSB Protein Data Bank (Disponível em: <https://www.rcsb.org>).

Fonte: Do autor (2022).

Com exceção de 1FRP e 1FSA, que são FBPsases de *Sus scrofa* L., as demais estruturas correspondem a FBPsases do *H. sapiens*. No entanto, vale mencionar que, com exceção das arqueobactérias, as sequências de aminoácidos das FBPsase são significativamente conservadas entre os organismos (TILLMANN; BERNHARD; ESCHRICH, 2002). Os alinhamentos 3D entre as subunidades das FBPsases, que compõem a estrutura quaternária homotetramérica de diferentes espécies de organismos, mostram que efetivamente existe uma alta correspondência estrutural conservada entre o domínio catalítico das FBPsases. Por outro lado, o sítio alostérico, que em condições naturais é controlado pelo AMP, pode variar ligeiramente entre as espécies (GAO; SHEN; HONZATKO, 2014), (Figura 44).

Figura 44 - Alinhamento 3D entre as subunidades monoméricas de FBPases procedentes de diferentes espécies de organismos e as subunidades da enzima 6LW2, que foi selecionada na busca farmacofórica (cor verde). O sítio catalítico é indicado por um “X” de cor preta. A região alostérica é indicada por o retângulo preto. 7NS5 (cinza, *Saccharomyces cerevisiae*), 2GQ1 (magenta, *Escherichia coli*), 1DCU (azul, *Pisum sativum*), 5O EZ (vermelho, *Leishmania major*), 1FSA (amarelo, *Sus scrofa*).



Fonte: Do autor (2022).

O *loop* catalítico (resíduos 52-71) é uma parte estrutural importante para a função enzimática da FBPase, que apresenta estrutura similar entre as diferentes espécies de organismos vivos. Entretanto, em protozoários parasitas como *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., o *loop* mostra diferenças funcionais devidas à inserção de dois resíduos de aminoácidos (Tyr57 e Gln61), tornando-se um pouco diferente daqueles encontrados em mamíferos e bactérias (YUAN et al., 2017).

3.4 Modelagem e Avaliação dos Modelos Tridimensionais das FBPases Produzidas por *M. graminicola* (KAF7639614) e *M. enterolobii* (CAD2178941)

As informações bioquímicas extraídas dessas sequências indicaram que são de natureza citoplasmática, sem peptídeos sinalizadores e sem a presença de pontes S-S. Foram obtidos 32 modelos tridimensionais para cada uma das sequências FBPase produzidas por *M. graminicola* e *M. enterolobii* (Tabela 11).

Tabela 12 - Resultado da modelagem das sequências CAD2178941 e KAF7639614, que foram selecionadas como possíveis alvos enzimáticos da fluazaindolizina em *Meloidogyne* spp. As sequências foram alinhadas a seus templates para calcular os seus valores de raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD).

Sequência	Servidor Modelagem	Nº de modelos	Melhor Template para modelo	RMSD* (modelos vstemplates)
• CAD2178941 • KAF639614	Phyre2	1 1	1NUW	0,4 0,5
• CAD2178941 • KAF639614	CPHmodels	1 1	1EYI 1NUZ	0,5 0,75
• CAD2178941 • KAF639614	SWISS-MODEL	1 1	2F3B	0,16 0,2
• CAD2178941 • KAF639614	GalaxyWEB	5 5	2F3B; 1NUW	$\bar{X} = 0,3$; $\bar{X} = 0,53$ $\bar{X} = 0,3$; $\bar{X} = 0,45^\dagger$
• CAD2178941 • KAF639614	M4T Server	1 1	5K54; 1NV5	1,1; 1,6 0,88; 1,6
• CAD2178941 • KAF639614	HHPred	1 1	2F3B; 1NUW	0,6; 0,7 0,3; 0,39
• CAD2178941 • KAF639614	I-TASSER	2 2	1FSA	$\bar{X} = 0,3$ $\bar{X} = 0,6$
• CAD2178941 • KAF639614	LOMETS	5 5	1FSA; 7NS5	$\bar{X} = 0,6$; $\bar{X} = 2,1$ $\bar{X} = 3,3$; $\bar{X} = 1,7$
• CAD2178941 • KAF639614	Raptor-X	1 1	1CNQ	0,1 0,7
• CAD2178941 • KAF639614	IntFOLD	5 5	1FSA	$\bar{X} = 0,4$ $\bar{X} = 1,0$
• CAD2178941 • KAF639614	AlphaFold2	5 5	2F3D; 1RDX	$\bar{X} = 1,7$; $\bar{X} = 2,6$ $\bar{X} = 2,1$; $\bar{X} = 2,5$
• CAD2178941 • KAF639614	Robetta	5 5	1NUW; 5PZQ	$\bar{X} = 1,3$; $\bar{X} = 3,1$

$$\bar{X}=1,2; \bar{X}=2,3$$

* RMSD calculado com Lovoalign v.21.027.

†Só foram considerados os valores médios para a sequências CAD2178941.

Fonte: Do autor (2022).

Após avaliação das qualidades estruturais de todos os modelos, foram selecionados, para ancoramento molecular, os modelos fornecidos pelo GalaxyWEB *server*, pois cinco de seis métodos de avaliação empregados os qualificaram como os melhores. Todos os modelos tridimensionais selecionados foram construídos a partir dos *templates* 2F3B e 1NUW, que se tratam de FBPases pertencentes a *S. scrofa* (javali). Embora a unidade biológica da FBPase seja um homotetrâmero, a maioria dos *softwares* de modelagem empregados, incluindo o GalaxyWEB, usam como *template* uma única subunidade/cadeia (~ 338 resíduos de aminoácidos) das 4 possíveis. Consequentemente, os modelos tridimensionais selecionados corresponderam à estrutura terciária da FBPase. O alinhamento entre as sequências de aminoácidos das cadeias A de 2F3B e 1NUW, com as sequências CAD2178941 e KAF7639614, mostrou que existe uma relação de similaridade de 65%, o que está em consonância com o fato dessa enzima ser altamente conservada entre as espécies (Figura 45).

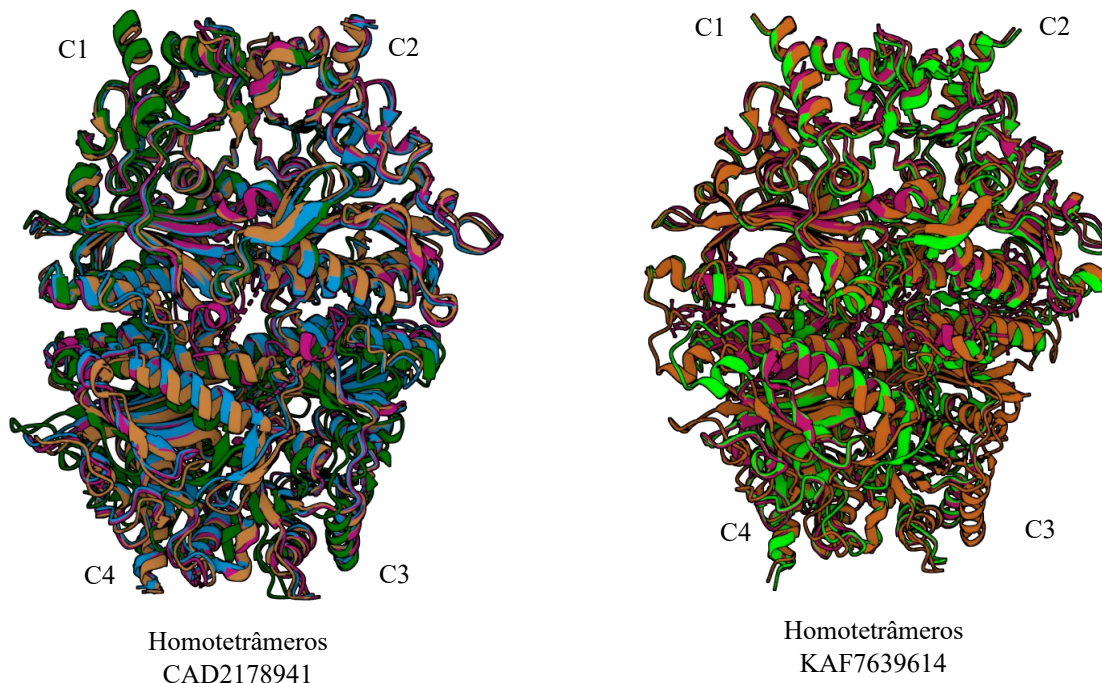
possibilitando assim as interações hidrofóbicas do tipo π - π entre os anéis heterocíclicos (ZHOU et al., 2020). Visando reproduzir aquilo que acontece na estrutura quaternária, procedeu-se à construção, através do modelo da subunidade fornecida pelo GalaxyWEB, das estruturas homotetraméricas das FBPases de *M. graminicola* e *M. enterolobii*.

3.5 Construção dos homotetrâmeros das FBPases de *M. graminicola* e *M. enterolobii*

Após avaliar as qualidades estruturais e energéticas dos diferentes homotetrâmeros construídos a partir de todos os templates utilizados pelos programas de modelagem (Tabela D), foram selecionados oito (8) homotetrâmeros de FBPase para a sequência CAD2178941 e dez (10) para a sequência KAF7639614.

O alinhamento estrutural desses homotetrâmeros selecionados, com a enzima FBPase 6LW2, mostrou que foi possível construir as unidades biológicas das FBPases de *M. graminicola* e de *M. enterolobii* com uma precisão aceitável dada a complexidade estrutural do homotetrâmero (Figura 46).

Figura 46 - Alinhamento 3D entre a enzima da busca farmacofórica 6LW2 (cor violeta) e alguns dos modelos construídos para as estruturas quaternárias das FBPases de *M. graminicola* (KAF7639614) e *M. enterolobii* (CAD2178941).



Fonte: Do autor (2022).

Pela dinâmica de movimento do estado R ao T, e vice-versa, é possível obter diferentes cristais de FBPases com pequenas divergências quanto à rotação das subunidades. É por isso que os homotetrâmeros selecionados para ancoramento uma vez alinhados a 6LW2 apresentaram valores de RMSD de aproximadamente 4,0 Å. Por outro lado, o alinhamento entre as subunidades/cadeias de qualquer dos modelos inicialmente obtidos pelo GalaxyWEB server com qualquer das subunidades/cadeias da enzima 6LW2, resultou em valores de RMSD abaixo de 2,0 Å, o que se deve ao fato de, nesse último, terem sido eliminados os efeitos de acoplamento entre estruturas quaternárias complexas.

3.6 Docking Molecular nas FBPases Não Produzidas por NPPs

Dentre as FBPases similares a 6LW2, presentes no RCSB Protein Data Bank, as seguintes foram selecionadas para esta primeira etapa exploratória sobre a afinidade da fluazaindolizina pelas FBPases não produzidas por NPPs: 3A29, 3KBZ, 3KC1, 2VT5, 6LW2, 2F3D e 7CVN. Os ligantes dessas enzimas (Figura 2) foram ancorados junto com a

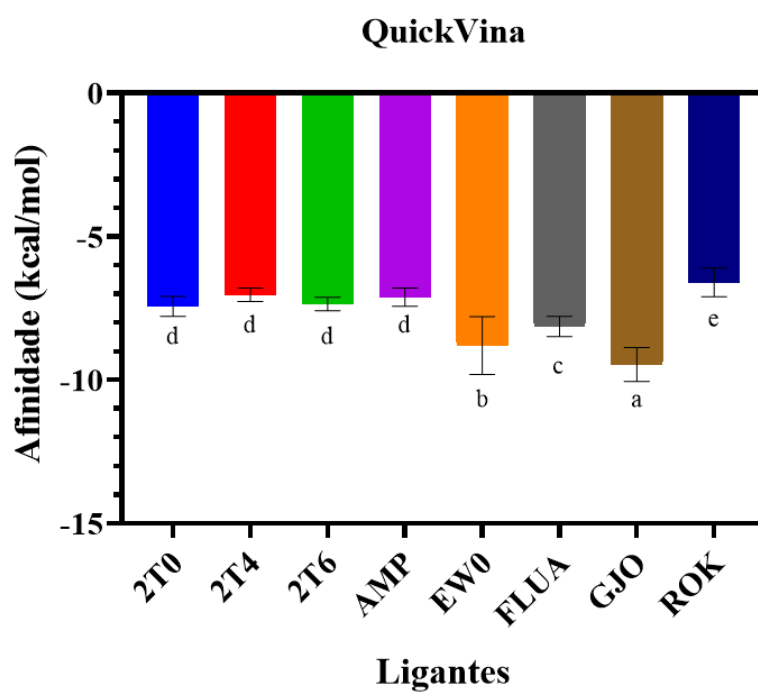
fluazaindolizina, e serviram como método de avaliação da qualidade do ancoramento através de comparação qualitativa do resultado teórico com o experimental (Re-docking).

Em conformidade com os cálculos feitos com o *software* QuickVina, a fluazaindolizina se ligou às FBPases não produzidas por NFPs com uma energia de afinidade média de: -8,1 kcal/mol (Figura 47). Entre o conjunto de inibidores até aqui considerados, a fluazaindolizina apresentou o terceiro melhor valor de afinidade pelas enzimas FBPases. Por outro lado, o ligante inibidor da busca farmacofórica EW0 e o ligante GJO estiveram entre os dois melhores, com valores de afinidade de -8,8 kcal/mol e -9,4 kcal/mol, respectivamente. No entanto, a fluazaindolizina ligou-se mais eficientemente as FBPases não produzidas por NFPs que o seu regulador natural o AMP, e que os potentes inibidores tricíclicos derivados do ácido indolcarboxílico 2T0, 2T4 e 2T6 (TSUKADA et al., 2009). De forma geral, a afinidade da fluazaindolizina pelas FBPases não produzidas por NFPs esteve quase uniforme para as 7 enzimas utilizadas nesta primeira etapa exploratória.

Quando examinado o resultado qualitativo do ancoramento nas FBPases não produzidas por NFPs, encontrou-se que a fluazaindolizina adotou uma posição semelhante a registrada experimentalmente para os ligantes EW0, GJO e ROK (Figura 48).

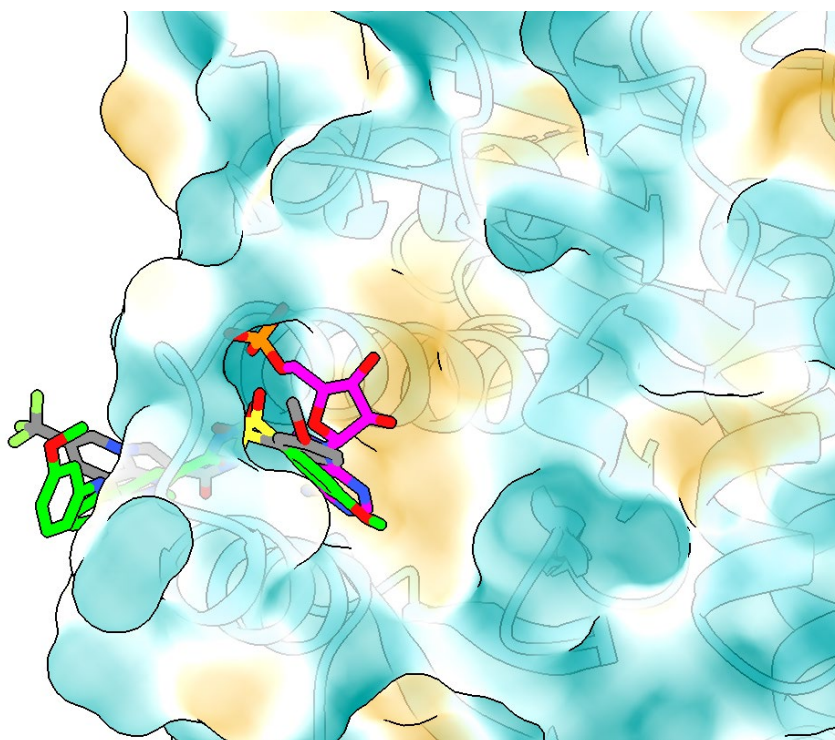
EW0 faz parte de uma nova série de inibidores FBPase, que por suas características estruturais ocupa o domínio AMP ao mesmo tempo que abrange a interfase entre dois domínios AMP vizinhos (ZHOU et al., 2020). Os primeiros inibidores FBPase, incluindo 2T0, 2T4 e 2T6, apresentam um modo de interação e localização mais próximo daquele observado para o AMP, no qual a porção adenina é posta em contato com a região mais hidrofóbica do *pocket* (resíduos: Val17, Gln20, Gly21 e Thr31) e o grupo fosfato é orientado para a área mais hidrofílica (resíduos: Glu29, Gly28, Thr27, Lys112, Leu30, Met 30 e Tyr113). Posteriormente, novos inibidores apresentaram modos de localização distintos, no qual as interações com os resíduos hidrofílicos são auxiliadas por redes de moléculas de água que interagem com a porção sulfoniluréia do inibidor, enquanto a porção hidrofóbica é preenchida pela porção aromática.

Figura 47 - Valores de afinidade (kcal/mol) calculados com o uso do software QuickVina v.2.1 para a estrutura mais estável da fluazaindolizina em pH 7,0 (FLUA) e dos ligantes inibidores de FBPsase: 2T0, 2T4, 2T6, AMP, EW0, GJO e ROK. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. As barras com mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2022).

Figura 48 - Resultado qualitativo que mostra a localização da fluazaindolizina (cor cinza) na proteína da busca farmacofórica 6LW2 após ancoramento com o software QuickVina v.2.1. A superfície da enzima foi colorida de acordo com o potencial de lipofilicidade (MLP) de Chimera X v.1.4. De azul é representada a zona mais hidrofílica, enquanto que de cor branca a menos hidrofílica; por outro lado, a zona hidrofóbica foi colorida de cor dourado escuro. De verde o ligante EW0 e de cor magenta o AMP.

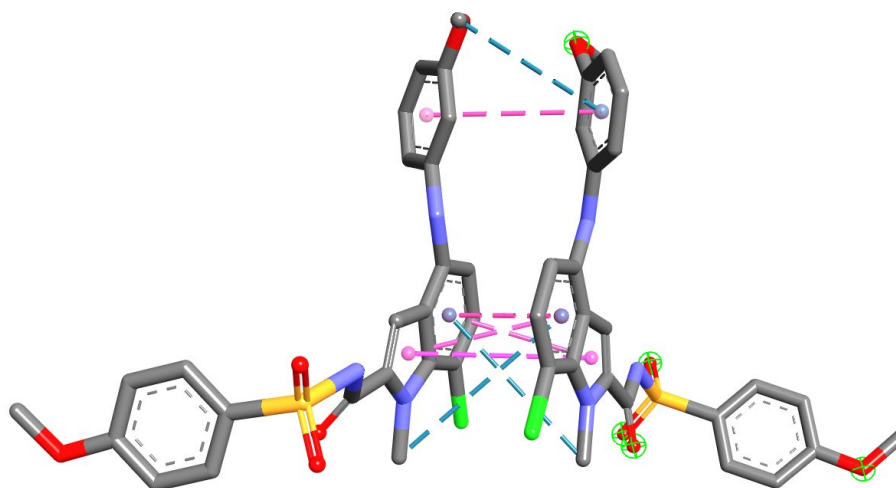


Fonte: Do autor (2022).

Em 6LW2, EW0 preenche o sítio de localização da adenina com sua porção 4-metoxibenzenossulfonamida que interage com os resíduos Glu20, Ala24 e Leu30 através de interações hidrofóbicas. Por outro lado, o acoplador (*linker*) entre o fragmento 4-metoxibenzenossulfonamida e o fragmento 4-amilaminoindol, o *N*-acilsulfonamida, age como bioisóstero do grupo fosfato no AMP interagindo, através de uma rede de moléculas de água, com os resíduos da região hidrofílica: Thr27, Glu29, Lys112 e Tyr113. Aliás, o próprio acoplador *N*-acilsulfonamida forma uma extensa rede de ligações de hidrogênio com os aminoácidos-chave Leu30 e Thr31, que contribuem de maneira especial com afinidade dos inibidores pelas FBPases (BIE et al., 2014). Na estabilização do complexo na estrutura quaternária, interveem as interações de empilhamento π - π entre dois anéis indol e dois anéis 3-metoxibenzeno das subunidades/cadeias A (B) e D (C), respectivamente (Figura 49). Finalmente, outra característica importante da ligação de EW0 em 6LW2, diz respeito ao

grupo NH entre as duas porções aromáticas que forma uma ligação de hidrogênio com o grupo C=O do resíduo Gly26.

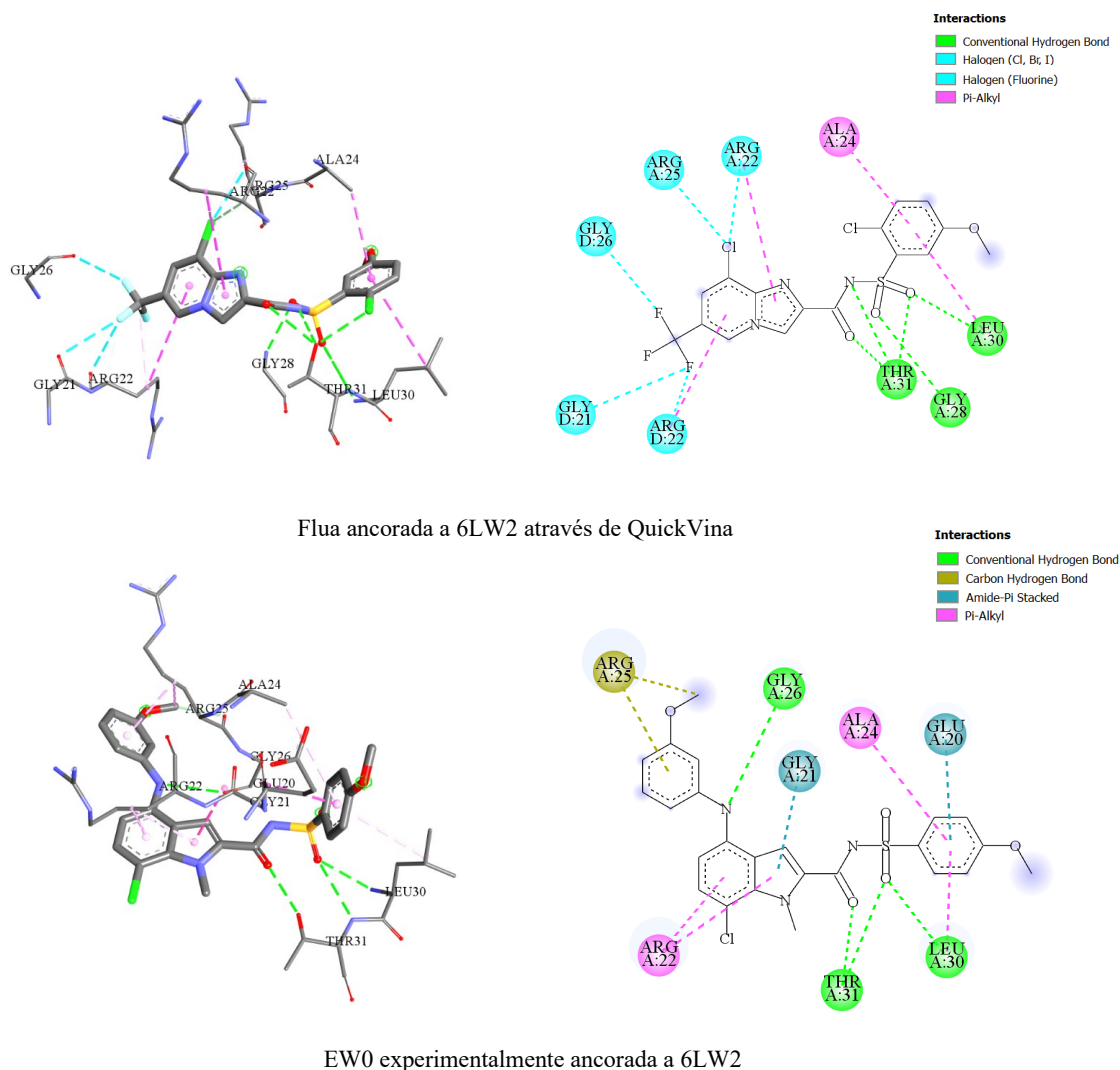
Figura 49- Representação 3D das interações hidrofóbicas ($\pi-\pi$) entre os anéis indol e 3-metoxibenzeno de dois ligantes EW0 vizinhos.



Fonte: Do autor (2022).

Em virtude de que a fluazaindolizina foi ancorada, pelo software QuickVina, na enzima da busca farmacofórica 6LW2, de forma similar à registrada experimentalmente para o ligante EW0, é de se esperar que seus modos de interação sejam similares. De fato, a fluazaindolizina fez as interações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos tais como Thr31 e Leu30. Aliás, o grupo NH da porção sulfonamida faz ligação de hidrogênio com o resíduo Gly28, completando assim as 3 interações de hidrogênio registradas para o ligante inibidor EW0 (Figura 50).

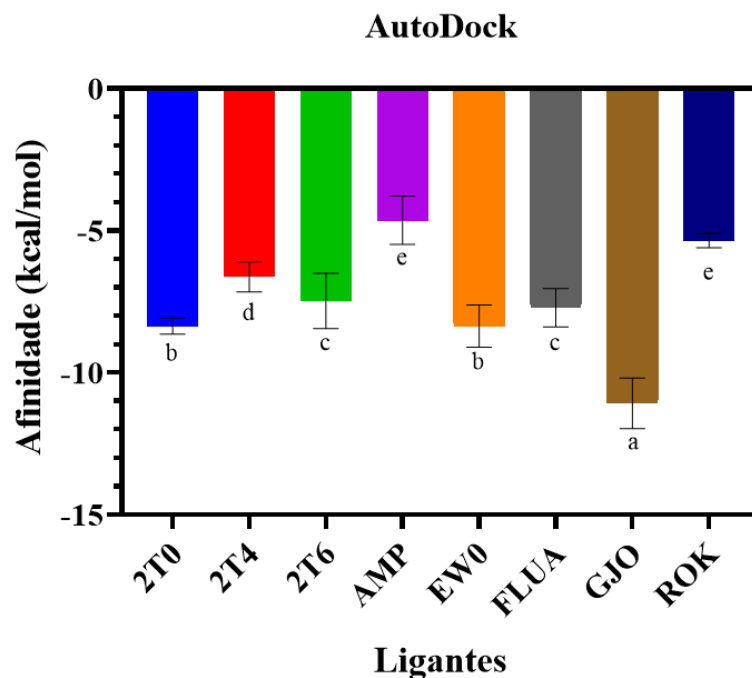
Figura 50 - Representação 3D e 2D dos modos de interação da fluazaindolizina (FLUA) ancorada na enzima 6LW2 através do software QuickVina v.2.1. O resultado teórico é comparado com o experimental obtido para o ligante da busca farmacofórica EW0.



Fonte: Do autor (2022).

O comportamento dos resultados de afinidade obtido com o *software* AutoDock foram em essência similares aos obtidos com QuickVina, uma vez que se observou o mesmo padrão com os ligantes GJO e EWO nas duas primeiras posições e a fluazaindolizina ocupando o terceiro melhor valor de afinidade. Porém, em termos absolutos, as energias foram estatisticamente diferentes para alguns ligantes quando comparados os resultados entre os dois programas de ancoramento empregados. Assim por exemplo, a energia de afinidade média de ligantes tais como GJO (-11,0 kcal/mol), 2T0 (-8,4 kcal/mol), AMP (-4,6 kcal/mol) e ROK (-5,4 kcal/mol), foram significativamente diferentes das obtidas com o *software* QuickVina (Figura 51).

Figura 51 - Valores de afinidade (kcal/mol) obtidos com o uso do software AutoDock v.4.2.6 para a estrutura mais estável da fluazaindolizina em pH 7,0 (FLUA) e dos ligantes inibidores de FBPsase: 2T0, 2T4, 2T6, AMP, EW0, GJO e ROK. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. As barras com mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

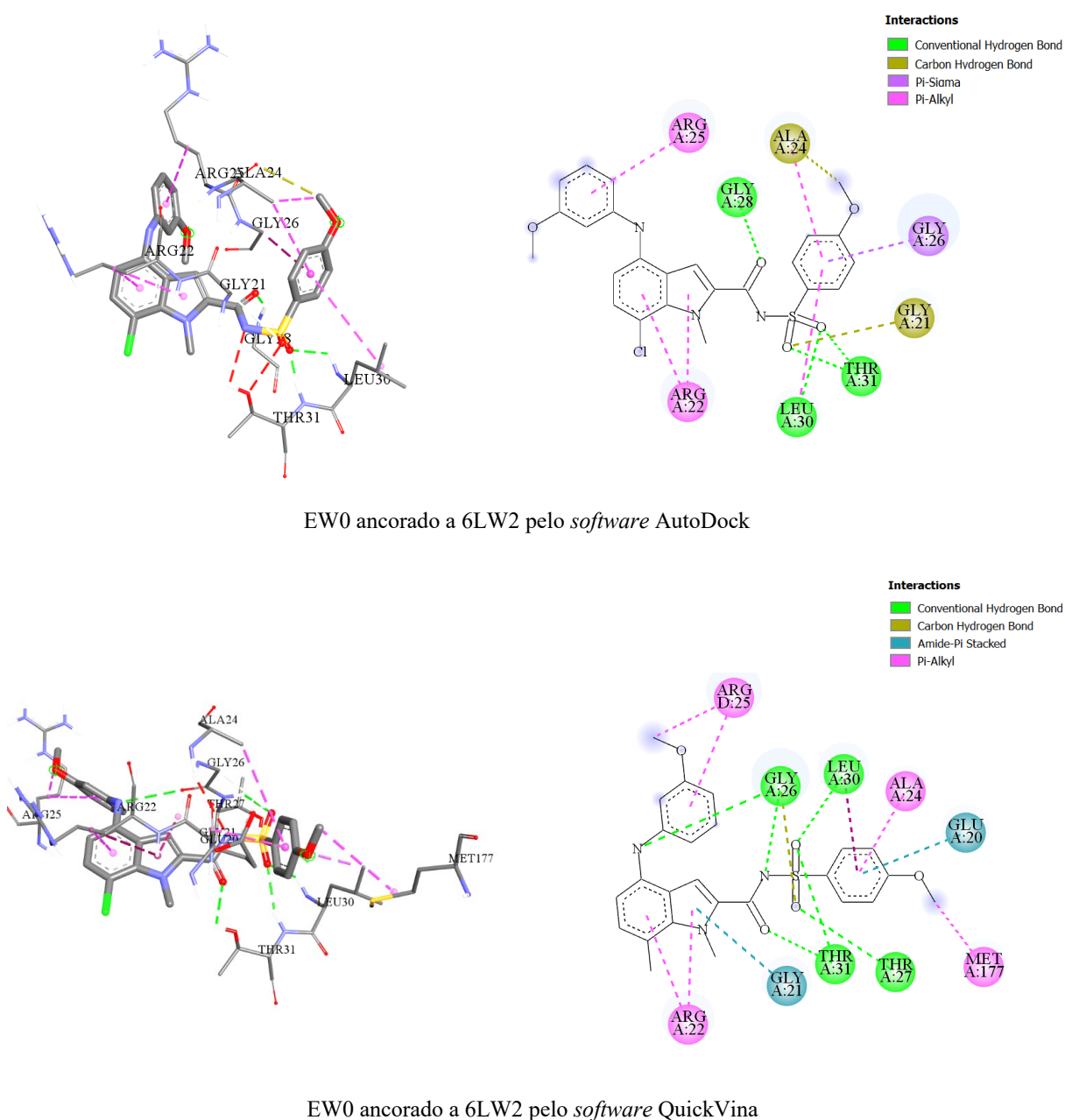


Fonte: Do autor (2022).

Por outro lado, EW0 (-8,4 kcal/mol) e FLUA (-7,8 kcal/mol), não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparadas as energias de afinidade entre ambos os *softwares*. Diferente de QuickVina, as energias de ancoramento calculadas com AutoDock estiveram mais dispersas com respeito aos valores médios da população de enzimas FBPsases usadas no ancoramento.

Levando em consideração o fato de EW0 apresentar 8 ligações rotacionáveis em sua estrutura molecular, foi notável a correspondência obtida entre os resultados qualitativos de ambos os *softwares* de ancoramento aqui empregados (Figura 52).

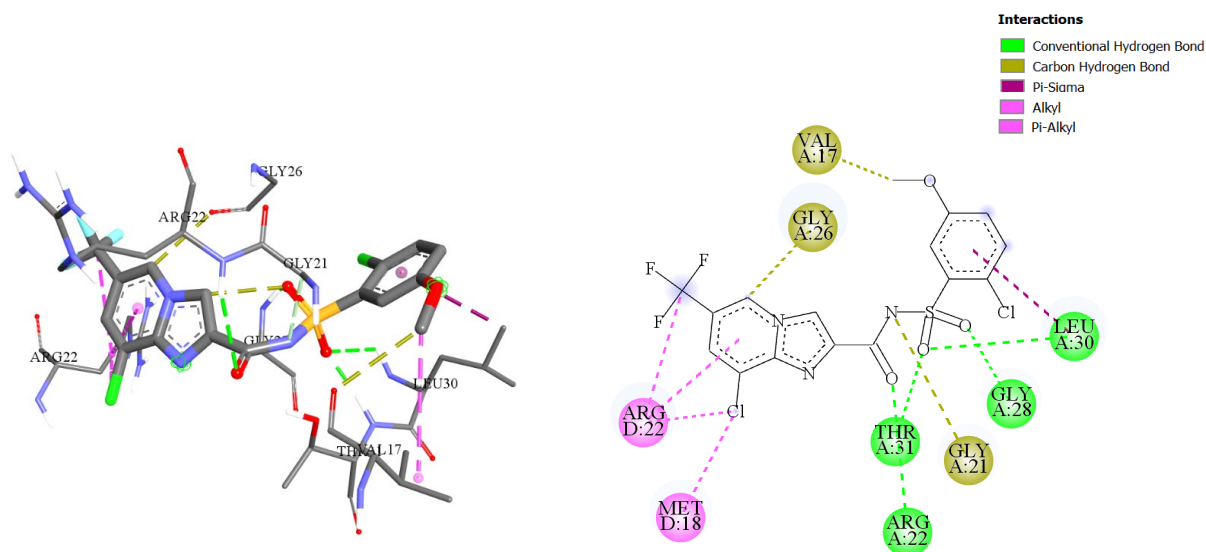
Figura 52 - Representação 3D e 2D dos modos de interação do ligante inibidor EW0 na FBPase 6LW2 após ancoramento com os softwares QuickVina e AutoDock.



Fonte: Do autor (2022).

Em ambos os casos, conservaram-se as ligações de hidrogênio com resíduos importantes tais como Thr31 e Leu30; por outro lado, também foram preservadas as interações hidrofóbicas com os resíduos Ala24, Arg22, Arg25 e Gly21. Da mesma maneira, o resultado qualitativo do ancoramento da fluazaindolizina na enzima 6LW2 foi similar ao registrado em QuickVina (Figura 53). Em ambos os casos se conservaram as ligações de hidrogênio com os resíduos Thr31, Leu30 e Gly28.

Figura 53 - Representação 3D e 2D dos modos de interação da fluazaindolizina na FBPase 6LW2 após ancoramento com o *software* AutoDock.



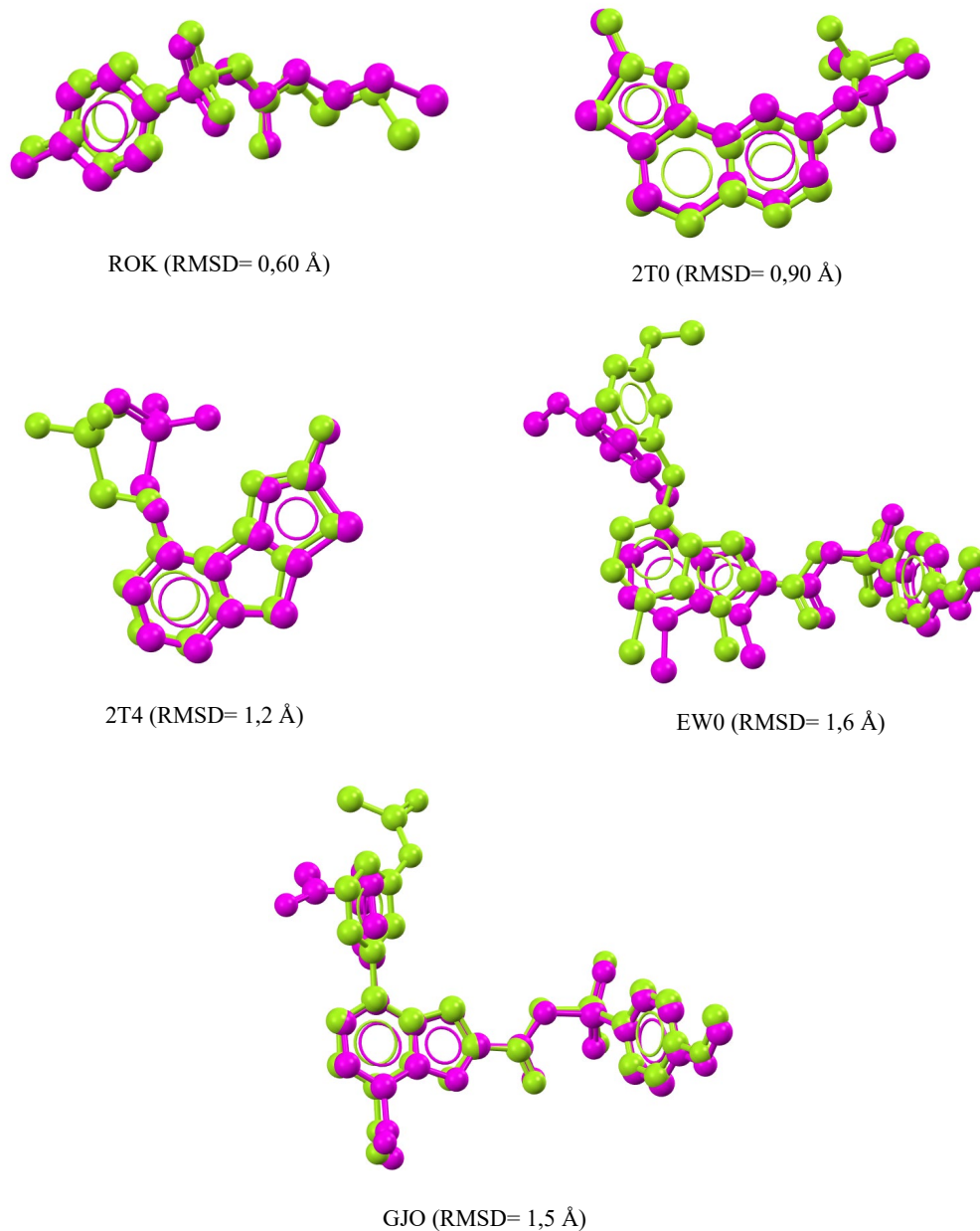
FLUA ancorada a 6LW2 pelo *software* AutoDock

Fonte: Do autor (2022).

Para avaliar a qualidade dos métodos de ancoramento empregados no presente trabalho, foram examinados os resultados de *re-docking* (auto-encaixe) obtidos para os ligantes inibidores 2T0, 2T4, GJO, EW0 e ROK, experimentalmente a complexados as FBPases 3A29, 3KBZ, 7CVN, 6LW2 e 2VT5, respectivamente. Considera-se que quando o valor de RMSD entre a pose nativa do ligante no cristal e aquela obtida teoricamente por ancoramento é inferior a 2,0 Å, a previsão é julgada como bem sucedida (BELL; ZHANG, 2019).

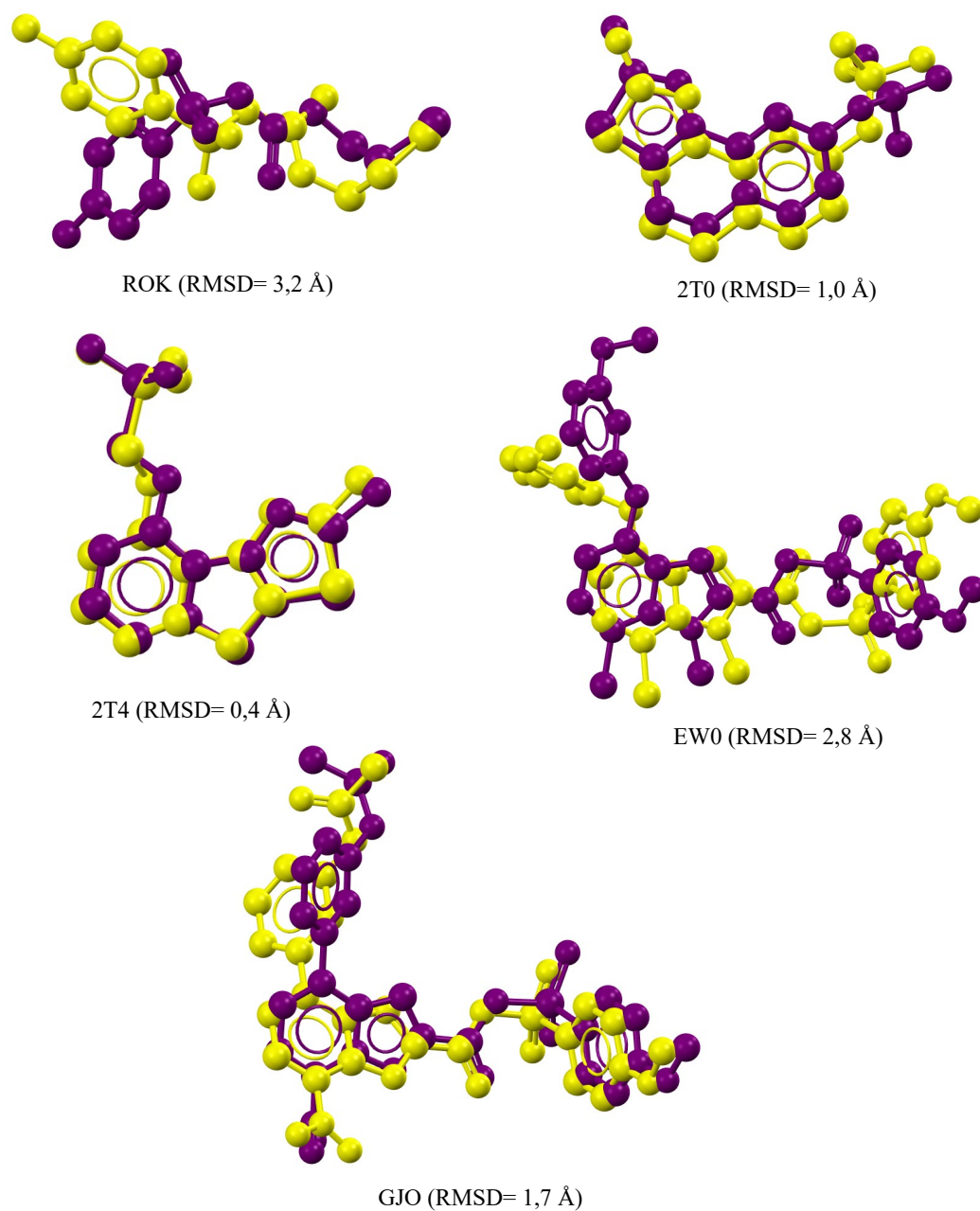
Com QuickVina v.2.1 foi possível reproduzir o resultado experimental em todos os casos considerados (RMSD < 2,0 Å). Para ligantes com uma menor quantidade de ligações rotacionáveis como ROK, 2T0 e 2T4, os valores de RMSD estiveram abaixo de 1,0 Å. Porém, em ligantes com um número maior de ligações rotacionáveis como EW0 e GJO, esses valores estiveram em torno de 1,5 Å, o que é muito bom considerando a complexidade das moléculas (Figura 54). Por outro lado, AutoDock não conseguiu reproduzir o resultado experimental para os ligantes 2T0 e EW0, uma vez que seus valores de RMSD estiveram acima de 2,0 Å (Figura 55). No entanto, o resultado para EW0 esteve perto do resultado experimental, uma vez que se conservaram as interações com resíduos importantes do site de ancoramento (Figura 51).

Figura 54 - Sobreposição tridimensional e raiz quadrada do desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) entre o resultado experimental (cor verde) e o resultado teórico (cor magenta), obtido para os ligantes ROK, 2T0, 2T4, EW0 e GJO através do *software* QuickVina v.2.1.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 55 - Sobreposição tridimensional e desvio da raiz quadrada média das posições atômicas (RMSD) entre o resultado experimental (cor roxo) e o resultado teórico (cor amarelo) obtido para os ligantes ROK, 2T0, 2T4, EW0 e GJO através do software AutoDock v.4.2.



Fonte: Do autor (2022).

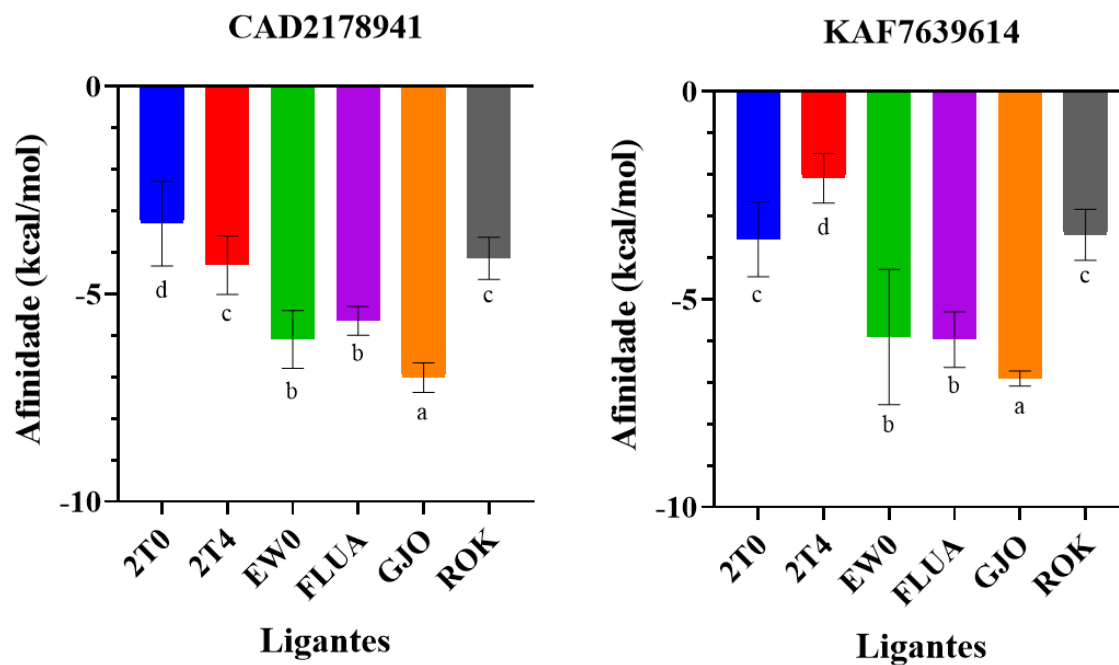
3.7 Afinidade Molecular Pelas FBPases Modeladas a Partir das Sequências: CAD2178941 de *M. enterolobii* e KAF7639614 de *M. graminicola*

Pelo fato de que nas FBPases não produzidas por NPPs os resultados estiveram próximos aos experimentais; e como a fluazaindolizina adquiriu uma posição similar à de outras sulfonilcarboxamidas tais como EW0 e GJO, decidiu-se situar, nos modelos homotetraméricos construídos para as sequências CAD2178941 e KAF7639614, os ligantes inibidores de FBPase 2T0, 2T4, GJO, EW0 e ROK em conformidade com os seus posicionamentos experimentais. A fluazaindolizina foi posicionada de acordo com o posicionamento experimental para o ligante EW0 em 6LW2.

Em geral, os cálculos de afinidade registrados para ambos os *softwares* nos modelos das FBPases de *M. enterolobii* e *M. graminicola*, apresentaram um comportamento similar ao registrado nas FBPases não produzidas por NPPs, com a fluazaindolizina e EW0 ocupando o segundo melhor valor de afinidade após de GJO. No entanto, as energias de afinidade registradas com QuickVina foram estatisticamente diferentes das registradas nas FBPases não produzidas por NPPs. Assim por exemplo, a energia de afinidade média calculada para GJO foi de -7,0 kcal/mol em ambas as FBPases modeladas; por outro lado, a fluazaindolizina e EW0 apresentaram uma energia de afinidade média de -6,0 kcal/mol (Figura 56).

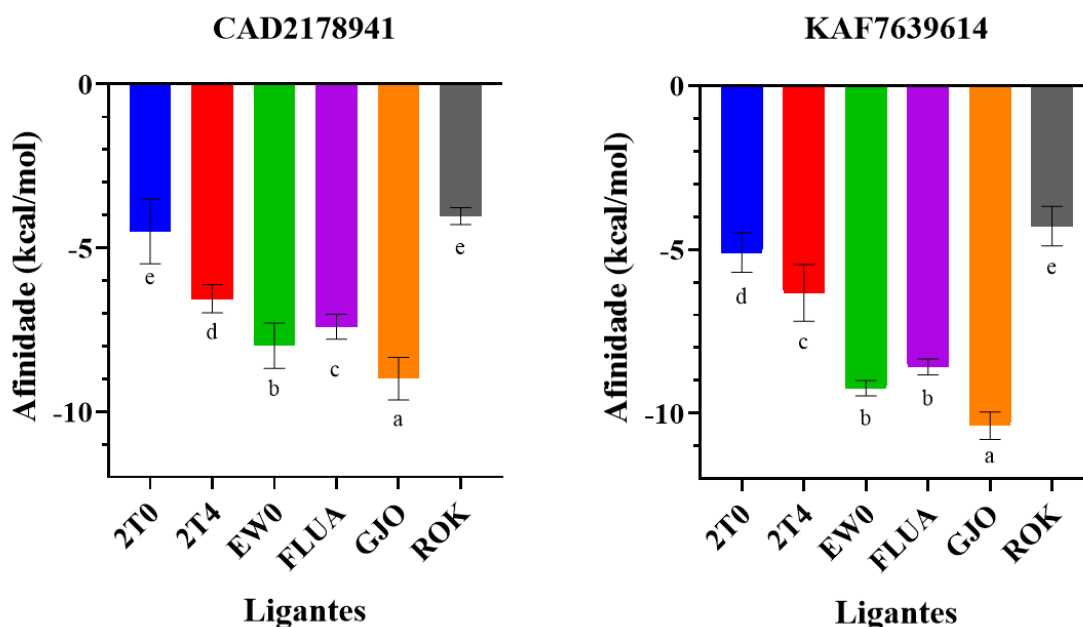
De outro lado, as afinidades calculadas com AutoDock v.4.2.6 foram, para ambas as FBPases modeladas, similares às registradas em FBPases não produzidas por nematoides. Deste modo, GJO foi quem apresentou o melhor valor de afinidade (-10,5 kcal/mol) seguido do ligante EW0 (-9,0 kcal/mol) e da fluazaindolizina que teve energia de afinidade média de -8,0 kcal/mol (Figura 57).

Figura 56 - Valores de afinidade (kcal/mol) registrados para a fluazaindolizina em pH 7,0 (FLUA) e para os ligantes 2T0, 2T4, EW0, GJO e ROK, nas estruturas quaternárias das FBPases CAD2178941 e KAF7639614, através do software QuickVina v.2.1. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2022).

Figura 57 - Valores de afinidade (kcal/mol) registrados para a fluazaindolizina em pH 7,0 (FLUA) e para os ligantes 2T0, 2T4, EW0, GJO e ROK, nas estruturas quaternárias das FBPases CAD2178941 e KAF7639614, através do software AutoDock v.4.2.6. As barras de erro correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra minúscula não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2022).

4 CONCLUSÕES

A metodologia empregada no presente trabalho mostrou que um possível mecanismo de ação nematicida da fluazaindolizina é através do bloqueio da síntese de novo da glucose por inibição da enzima frutose 1,6-bisfosfatase (FBPase). Em microrganismos patógenos, a gliconeogênese é imprescindível para sobrevivência no interior do hospedeiro, uma vez que é essencial na síntese de carboidratos de armazenamento e de glico-conjugados que modulam o processo immuno-patogênico.

As energias de afinidade registradas tanto em FBPases não produzidas por nematoides assim como naquelas modeladas para as sequências CAD2178941 e KAF7639614 de *M. enterolobii* e *M. graminicola*, respectivamente, mostrou que a fluazaindolizina pode agir como um potente inibidor de enzimas FBPases. Assim como o potente inibidor EW0, a fluazaindolizina apresentou uma energia de afinidade média de aproximadamente -8,0 kcal/mol. Considerando a complexidade dos possíveis modos interação que apresenta o sítio de regulação alostérico, e pelo fato de EW0 e GJO apresentarem modos de interação diferentes dos registrados para o AMP e para outros inibidores FBPases, foi possível obter, para a fluazaindolizina, um modo de interação no qual é aproveitado tanto o sítio de ligação

do AMP como a região na interface entre dois sítios alostéricos vizinhos. O fato de ocupar essas duas regiões do sítio alostérico se deveram a presença de três componentes fundamentais tais como o grupo *N*-acilsulfonamida, o anel metoxibenzeno e a fração imidazopiridina. Todos esses recursos estruturais, também presentes em EW0, GJO e em outras benzenosulfonamidas, criam um modo de ligação muito diferente daqueles observados nos conhecidos imitadores de AMP, como MB05032, 2T0, 2T4 etc., que fazem uso completo apenas do espaço ocupado pelo AMP. Em resumo, a fluazaindolizina faz parte da nova série de inibidores de *N*-acilarilsulfonamida com um possível modo de ligação único que fornece uma oportunidade para obter inibidores que se ligam ao sítio alostérico, altamente potentes e semelhantes a drogas inibidoras FB Pase.

REFERÊNCIAS

- ALHOSSARY, A. *et al.* Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 31, n. 13, p. 2214–2216, 1 jul. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25717194/>. Acesso em: 14 abr. 2022.
- ALLOUCHE, A. R. Gabedit – A graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 174–182, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20607691/>. Acesso em: 17 abr. 2022.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. *et al.* DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 33, n. 21, p. 3387–3395, 1 nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29028934/>. Acesso em: 19 fev. 2022.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 1 abr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30778233/>. Acesso em: 17 fev. 2022.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9254694/>. Acesso em: 17 abr. 2022.
- ALTSCHUL, S. F.; WOOTTON, J. C.; GERTZ, E. M.; AGARWALA, R.; MORGULIS, A.; SCHÄFFER, A. A.; YU, Y. K. Protein database searches using compositionally adjusted

substitution matrices. **FEBS Journal**, v. 272, n. 20, p. 5101–5109, oct. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16218944/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

BARCISZEWSKI, J. *et al.* T-to-R switch of muscle fructose-1,6-bisphosphatase involves fundamental changes of secondary and quaternary structure. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 72, n. 4, p. 536–550, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27050133/>. Acesso em: 27 fev. 2022.

BECKER, J. O. *Plant Health Management: Crop Protection with Nematicides*. Elsevier Ltd., 2014. (Nota técnica). Disponível em: 10.1016/B978-0-444-52512-3.00180-7. Acesso em: 28 abr. 2022.

BELL, E. W.; ZHANG, Y. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6556049/>. Acesso em: 23 fev. 2022.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21134891/>. Acesso em: 14 abr. 2022.

BERNHOFER, M. *et al.* PredictProtein – Predicting protein structure and function for 29 years. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 1, p. W535–W540, 24 fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33999203/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

BIE, J. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 7-nitro-1H-indole-2- carboxylic acid derivatives as allosteric inhibitors of fructose-1,6- bisphosphatase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 1850–1862, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.01.047>. Acesso em: 23 fev. 2022.

BLUM, T.; BRIESEMEISTER, S.; KOHLBACHER, O. MultiLoc2: Integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 274–278, 1 set. 2009. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-10-274>. Acesso em: 13 maio. 2022.

BLUME, M. *et al.* A *Toxoplasma gondii* gluconeogenic enzyme contributes to robust central carbon metabolism and is essential for replication and virulence. **Cell Host and Microbe**, v. 18, n. 2, p. 210–220, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26269956/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

BRIESEMEISTER, S.; RAHNENFÜHRER, J.; KOHLBACHER, O. YLoc—an interpretable web server for predicting subcellular localization. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Web Server issue, 27 maio 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20507917/>. Acesso em: 13 maio. 2022.

BURENINA, E. A. Fructose bisphosphatase of cestodes of *Bothriocephalus scorpii*. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 46, n. 2, p. 153–162, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0022093010020031>. Acesso em: 22 fev. 2022.

CHEN, J.; LI, Q. X.; SONG, B. Chemical Nematicides: Recent Research Progress and Outlook. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 44, p. 12175–12188, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02871>. Acesso em: 28 abr. 2022.

CHENG, J. *et al.* SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue. Jul. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980571/>. Acesso em: 13 maio. 2022.

CHOE, J. Y.; FROMM, H. J.; HONZATKO, R. B. Crystal structures of fructose 1,6-bisphosphatase: Mechanism of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8565–8574, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi000574g>. Acesso em: 27 abr. 2022.

CHOU, K. C.; SHEN, H. BIN. A New Method for Predicting the Subcellular Localization of Eukaryotic Proteins with Both Single and Multiple Sites: Euk-mPLOC 2.0. **PloS ONE**, v. 5, n. 4, 2010. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC2848569/>. Acesso em: 13 maio. 2022.

CHOU, K.-C.; SHEN, H.-B. Signal-CF: A subsite-coupled and window-fusing approach for predicting signal peptides. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 3, n. 8, p. 633–640, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17434148/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

CRAMER, P. AlphaFold2 and the future of structural biology. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 28, n. 9, p. 704–705, sep. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-021-00650-1>. Acesso em: 14 maio. 2022.

DANG, Q. *et al.* Fructose-1,6-bisphosphatase inhibitors. 2. Design, synthesis, and structure-activity relationship of a series of phosphonic acid containing benzimidazoles that function as 5'-adenosinemonophosphate (AMP) mimics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 441–451, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20055427/>. Acesso em: 22 fev. 2022.

EBONE, L. A.; KOVALESKI, M.; CARDOSO DEUNER, C. Nematicides: History, mode, and mechanism action. **Plant Science Today**, v. 6, n. 2, p. 91–97, 2019. Disponível em: [10.14719/pst.2019.6.2.468](https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.2.468). Acesso em: 28 abr. 2022.

ELDEEB, A. M. et al. Controlling of *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae) using nematicides, *Linum usitatissimum* extract and certain organic acids on four peppers cultivars under greenhouse conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 5, p. 3107–3113, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8958357/>. Acesso em: 27 abr. 2022.

FARISELLI, P.; FINOCCHIARO, G.; CASADIO, R. SPEFlip: the detection of signal peptide and lipoprotein cleavage sites. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2498–2499, 12 dez. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14668245/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

FASKE, T. R.; HURD, K. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to fluopyram. **Journal of Nematology**, v. 47, n. 4, p. 316–321, 1 dez. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26941460/>. Acesso em: 28 abr. 2022.

FERNANDEZ–FUENTES, N. et al. Comparative protein structure modeling by combining multiple templates and optimizing sequence–to–structure alignments. **Bioinformatics**, v. 23, n. 19, p. 2558–2565, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm377>. Acesso em: 20 out. 2021.

GAO, Y.; SHEN, L.; HONZATKO, R. B. Central cavity of fructose-1,6-bisphosphatase and the evolution of AMP/fructose 2,6-bisphosphate synergism in eukaryotic organisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 12, p. 8450–8461, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24436333/>. Acesso em: 23 fev. 2022.

GASTEIGER, E. et al. EXPASy: The proteomics server for in–depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 1 jul. 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/31/13/3784/2904185>. Accessed on: 13 May 2022. Acesso em: 17 abr. 2022.

GIZAK, A. et al. Fructose-1,6-bisphosphatase: From a glucose metabolism enzyme to multifaceted regulator of a cell fate. **Advances in Biological Regulation**, v. 72, n. March, p. 41–50, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30871972/>. Acesso em: 27 abr. 2022.

GOLDBERG, T.; HAMP, T.; ROST, B. LocTree2 predicts localization for all domains of life. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 28, n. 18. Set. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22962467/>. Acesso em: 13 maio. 2022.

GRABAU, Z. J. *et al.* Nematicide efficacy at managing *Meloidogyne arenaria* and non-target effects on free-living nematodes in peanut production. **Journal of Nematology**, v. 52, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7266054/>. Acesso em: 28 abr. 2022.

GROOVER, W. L.; LAWRENCE, K. S. Evaluation of a new chemical nematicide, fluazaindolizine (Reklemel™ active), for plant-parasitic nematode management in bermudagrass. **Journal of Nematology**, v. 53, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33860264/>. Acesso em: 4 abr. 2022.

HEBEISEN, P. *et al.* Allosteric FBPase inhibitors gain 10 5 times in potency when simultaneously binding two neighboring AMP sites Scheme 1. Structure of the AMP mimicking FBPase inhibitor MB05032 and its prodrug CS917. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 4708–4712, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.06.103>. Acesso em: 22 fev. 2022.

HU, J. *et al.* LS-align: An atom-level, flexible ligand structural alignment algorithm for high-throughput virtual screening. **Bioinformatics**, v. 34, n. 13, p. 2209–2218, 1 jul. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29462237/>. Acesso em: 26 abr. 2022.

HUANG, Y. *et al.* Identification of the new covalent allosteric binding site of fructose-1,6-bisphosphatase with disulfiram derivatives toward glucose reduction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 11, p. 6238–6247, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32375478/>. Acesso em: 23 fev. 2022.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, fev. 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8744570/>. Acesso em: 18 abr. 2022.

JAOUANNET, M.; ROSSO, M. Effectors of root sedentary nematodes target diverse plant cell compartments to manipulate plant functions and promote infection. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 9, p. e25507, 9 set. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23857349/>. Acesso em: 27 abr. 2022.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. w429–w432, jul. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1933244/>. Acesso em: 19 fev. 2022.

KÄLLBERG, M. *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. **Nature Protocols**, v. 7, n. 8, p. 1511–1520, ago. 2012. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730388/>. Acesso em: 14 abr. 2022.

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>. Acesso em: 13 maio. 2022.

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server issue, p. W526–W532, 1 jul. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC441606/>. Acesso em: 14 jan. 2022.

KO, J. *et al.* GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 1, p. W294–W297, 1 jul. 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/40/W1/W294/1078340>. Acesso em: 20 out. 2021.

KONG, L. *et al.* FALCON2: a web server for high-quality prediction of protein tertiary structures. **Bioinformatics**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34525939/>. Acesso em: 13 fev. 2022.

LAHM, G. P. *et al.* Fluazaindolizine: A new active 165chemical165f165 for the 165chemical165f plant-parasitic Nematodes In: JESCHKE P.; WITSCHEL M.; KRAMER W.; SCHIRMER U. (ed.). **Modern Crop Protection Compounds**. Germany: Wiley-VCH, 2019. P. 1615-1628. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527644179>. Acesso em: 4 abr. 2022.

LAHM, G. P. *et al.* The 165chemical165 of fluazaindolizine: A new product for the 165chemical165f plant parasitic nematodes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 7, p. 1572–1575, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28242274/>. Acesso em: 28 abr. 2022.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 24 out. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21919503/>. Acesso em: 26 abr. 2022.

LEŠNIK, S. *et al.* LiSiCA: A software for ligand-based virtual screening and its application for the discovery of butyrylcholinesterase inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 8, p. 1521–1528, ago. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26158767/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

LIANG, P. *et al.* Biochemical characterization and functional analysis of fructose-1,6-bisphosphatase from *Clonorchis sinensis*. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 7, p. 4371–4382, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23652997/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

LIN, H. *et al.* Photodegradation of fluazaindolizine in water under simulated sunlight irradiation: Identification of transformation products and elucidation of transformation mechanism. **Chemosphere**, v. 214, p. 543–552, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.151>. Acesso em: 28 abr. 2022.

LU, M.; DOUSIS, A. D.; MA, J. OPUS-PSP: An Orientation-dependent Statistical All-atom Potential Derived from Side-chain Packing. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 288, 2 fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.033>. Acesso em: 24 abr. 2022.

MAGHRABI, A. H. A.; MCGUFFIN, L. J. ModFOLD6: an accurate web server for the global and local quality estimation of 3D protein models. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W416–W421, 3 jul. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/45/W1/W416/3782602>. Acesso em: 14 maio. 2022.

MARTÍNEZ, L.; ANDREANI, R.; MARTÍNEZ, J. M. Convergent algorithms for protein structural alignment. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1–15, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1995224/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

MCGUFFIN, L. J. *et al.* IntFOLD: an integrated web resource for high performance protein structure and function prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W408–W413, 1 jul. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045208/>. Acesso em: 14 maio 2022.

MORRIS, G. M. *et al.* Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19399780/>. Acesso em: 14 abr. 2022.

NIELSEN, H. *et al.* Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 1997. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/9051728>. Acesso em: 19 fev. 2022.

NIELSEN, M. *et al.* CPHmodels–3.0—remote homology modeling using structure–guided sequence profiles. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 2, p. W576–W581, 1 jul. 2010. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/38/suppl_2/W576/1126606. Acesso em:

13 maio. 2022.

O'BOYLE, N. M. *et al.* Open Babel: Na open 167chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 10, p. 1–33, 12 oct. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21982300/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

OKONECHNIKOV, K. *et al.* Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, v. 28, n. 8, p. 1166–1167, 15 abr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22368248/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

OLECHNOVIČ, K.; VENCLOVAS, Č. VoroMQA: Assessment of protein structure quality using interatomic contact areas. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 85, n. 6, p. 1131–1145, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.25278>. Acesso em: 14 abr. 2022.

OLIVEIRA, C. M. G. *et al.* Distribution of meloidogyne species in carrot in brazil. **Ciencia Rural**, v. 51, n. 5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200552>. Acesso em: 27 abr. 2022.

PARK, H. *et al.* Simultaneous Optimization of Biomolecular Energy Functions on Features from Small Molecules and Macromolecules. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 12, n. 12, p. 6201–6212, 13 dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00819>. Acesso em: 26 abr. 2022.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15264254/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

PIERLEONI, A. *et al.* BaCellLo: a balanced subcellular localization predictor. **Bioinformatics**, v. 22, n. 14, p. e408–e416, 15 jul. 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/22/14/e408/228072>. Acesso em: 13 maio. 2022.

REGMI, H.; DESAEGER, J. Integrated management of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in Florida tomatoes combining host resistance and nematicides. **Crop Protection**, v. 134, p. 105170, 1 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105170>. Acesso em: 27 abr. 2022.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. **Methods in Molecular Biology**, v. 1079, p. 105–116, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24170397/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

SILVA, J. F. DA *et al.* Perdas por nematóides chegam a 10,6% da soja mundial. **Visão Agrícola**, v. 5, p. 103–107, 2006. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va05-fitossanidade07.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2022.

SINGH, Ankita *et al.* ProTSAV: A protein tertiary structure analysis and validation server. **Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 1, p. 11–19, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.10.004>. Acesso em: 18 abr. 2022.

SPARKS, T. C. *et al.* Insecticides, biologics and nematicides: Updates to IRAC's mode of action classification – a tool for resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 167, n. January, p. 104587, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104587>. Acesso em: 4 abr. 2022.

SRIVASTAVA, V. M. L. *et al.* Glycolysis in *Litomosoides carinii*, the filarial parasite of the cotton rat. **Experimental parasitology**, v. 28, n. 2, p. 176–185, 1970. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(70\)90087-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(70)90087-1). Acesso em: 22 fev. 2022.

STEWAR, J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 221–264, nov. 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.540100209>. Acesso em: 17 abr. 2022.

TILLMANN, H.; BERNHARD, D.; ESCHRICH, K. Fructose-1,6-bisphosphatase genes in animals. **Gene**, v. 291, n. 1–2, p. 57–66, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12095679/>. Acesso em: 27 fev. 2022.

TOSATTO, S. C. E. The victor/FRST function for model quality estimation. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 10, p. 1316–1327, dez. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16379537/>. Acesso em: 26 abr. 2022.

TOSCO, P.; BALLE, T.; SHIRI, F. Open3DALIGN: An open–source software aimed at unsupervised ligand alignment. **Journal of Computer–Aided Molecular Design**, v. 25, n. 8, p. 777–783, ago. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21792629/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

TSUKADA, T. *et al.* Synthesis, SAR, and X-ray structure of tricyclic compounds as potent FBPase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 20, p. 5909–5912, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.081>. Acesso em: 23 fev. 2022.

VAN DURME, J. *et al.* A graphical interface for the FoldX forcefield. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 27, n. 12, p. 1711–1712, jun. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21505037/>. Acesso em: 24 abr. 2022.

VOEHRINGER, D. W. *et al.* Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 6, p. 2680–2685, 14 mar. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15989/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

VON GELDERN, T. W. *et al.* Benzoxazole benzenesulfonamides are novel allosteric inhibitors of fructose-1,6-bisphosphatase with a distinct binding mode. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 7, p. 1811–1815, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16442285/>. Acesso em: 23 fev. 2022.

VON HEIJNE, G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 11, p. 4683–4690, 11 jun. 1986. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/14/11/4683/2385409>. Acesso em: 19 fev. 2022.

WANG, W. *et al.* PSICA: a fast and accurate web service for protein model quality analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W443–W450, 2 jul. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31127307/>. Acesso em: 15 abr. 2022.

WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. W296–W303, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29788355/>. Acesso em: 13 abr. 2022.

WRAM, C. L.; ZASADA, I. A. Short-term effects of sublethal doses of nematicides on *Meloidogyne incognita*. **Phytopathology**, v. 109, n. 9, p. 1605–1613, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31033406/>. Acesso em: 28 abr. 2022.

WU, S.; ZHANG, Y. LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 10, p. 3375–3382, 3 maio. 2007. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC1904280>. Acesso em: 13 fev. 2022.

YANG, Y. *et al.* A combined molecular modeling study on a series of pyrazole/isoxazole based human Hsp90 α inhibitors. **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, n. 12, p. 3241–3250, dez. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21369933/>. Acesso em: 21 abr. 2022.

YANG, Y.; ZHOU, Y. Specific interactions for ab initio folding of protein terminal regions with secondary structures. **Proteins**, v. 72, n. 2, p. 793–803, 1 ago. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18260109/>. Acesso em: 24 abr. 2022.

YUAN, M. *et al.* Structures of *Leishmania* Fructose-1,6-Bisphosphatase Reveal Species-Specific Differences in the Mechanism of Allosteric Inhibition. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 20, p. 3075–3089, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.08.010>. Acesso em: 17 fev. 2022.

ZHANG, J.; ZHANG, Y. A Novel Side-Chain Orientation Dependent Potential Derived from Random-Walk Reference State for Protein Fold Selection and Structure Prediction. **PLOS ONE**, v. 5, n. 10, p. e15386, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965178/>. Acesso em: 24 abr. 2022.

ZHANG, R. *et al.* Synthesis and nematicidal activities of 1,2,3-benzotriazin-4-one derivatives containing benzo[d][1,2,3]thiadiazole against *Meloidogyne incognita*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 17, p. 127369, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127369>. Acesso em: 27 abr. 2022.

ZHANG, W. X.; PAN, X.; SHEN, H. BIN. Signal-3L 3.0: Improving Signal Peptide Prediction through Combining Attention Deep Learning with Window-Based Scoring. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 7, p. 3679–3686, 27 jul. 2020. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/10.1021/acs.jcim.0c00401>. Acesso em: 19 fev. 2022.

ZHOU, J. *et al.* Discovery of N-Arylsulfonyl-Indole-2-Carboxamide Derivatives as Potent, Selective, and Orally Bioavailable Fructose-1,6-Bisphosphatase Inhibitors – Design, Synthesis, in Vivo Glucose Lowering Effects, and X-ray Crystal Complex Analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 18, p. 10307–10329, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32820629/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

ZIMMERMANN, L. *et al.* A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New Hhpred Server at its Core. **Journal of Molecular Biology**, v. 15, n. 30, p. 2237–224, 20 jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.007>. Acesso em: 14 maio. 2022.