Resistência a fungicidas estrobilurínicos: Estudo do efeito de mutações no citocromo *b* em modelo de homologia de *Venturia inaequalis*

José Geraldo Rocha Júnior (PG)[1], Carlos Maurício R. Sant'Anna (PQ)[1].

[1]*Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica, RJ.*

Palavras Chave: *fungicidas, inibidores Q_o, mutação, V. inaequalis.*

Introdução

O fungo *V. inaequalis* é o agente causador da sarda de macieira, uma doença que se manifesta como lesões escuras ou cinza-marrons na superfície de folhas, flores ou frutos. Essa doença reduz significaticamente o rendimento e a qualidade dos frutos, tornando-os menos comercializáveis.

Uma das mais recentes adições ao arsenal de fungicidas modernos compreende os fungicidas derivados da estrobilurina, que atuam inibindo a respiração celular por se ligarem ao sítio Q_o do citocromo *b*, no complexo III[1].

Neste sítio foram identificadas as mutações G143A e G143S em *Magnaporthe grisea*, expressando resistência ao azoxistrobim, sendo que a primeira delas já demonstrou estar associada à resistência ao controle de diversos fungos fitopatogênicos[2].

O objetivo deste trabalho é avaliar, através de cálculos com o método de orbital semi-empírico PM3, a influência destas mutações na afinidade dos fungicidas azoxistrobim e metil cresoxim (figura 1) com um modelo de homologia do sítio Q_o de *V.inaequalis*, criado a partir da estrutura cristalográfica do citocromo *b* de *Saccharomyces cerevisiae* (1EZV, códico *pdb*)[3].

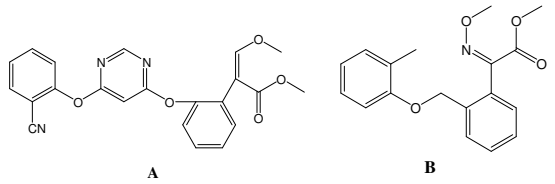

Figura 1. A, azoxistrobim. **B**, metil cresoxim

Resultados e Discussão

A seqüência dos aminoácidos do citocromo *b* de *V.inaequalis* foi obtida no *UniProt Knowledgebase* (código O48334)[4] e enviada para o servidor *Swiss-Model*[5] para a construção do modelo 3D desta sub-unidade. Para identificar os aminoácidos pertencentes ao sítio Q_o do citocromo *b* de *V.inaequalis*, foi feito o alinhamento deste modelo com a estrutura cristalográfica da enzima bovina, co-cristalizada com o azoxistrobim (1SQB)[6].

A seguir, foram preparados outros modelos do sítio Q_o, trocando-se o animoácido G143 por uma alanina e uma serina, os quais correspondem às mutações G143A e G143S. Estes modelos foram otimizados com os ligantes azoxistrobim e metil cresoxim presentes e ausentes no sítio de ligação. Cada ligante também foi otimizado separadamente.

Com os valores de entalpia obtidos após as otimizações, foram determinadas as variações de entalpia quando os ligantes estão complexados no sítio. Os valores obtidos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Valores das entalpias de formação dos complexos sítio Q_o-ligante, em kcal/mol.

	G143A	G143S	Nativa
Azoxistrobim	19,70	26,48	10,29
Metil-cresoxim	7,78	15,19	-4,48

Pelos valores encontrados, pode-se observar que houve um aumento da entalpia de formação dos complexos após ocorrer as mutações no sítio, indicando que estas mutações têm um efeito desfavorável para a formação do complexo sítio-ligante e que este aumento foi maior no sítio contendo a mutação G143S.

Observou-se que os resíduos mutantes provocaram um deslocamento dos inibidores dentro do sítio, devido a repulsões estéricas entre as cadeias laterais dos aminoácidos mutantes com um grupo fenila dos inibidores.

Conclusões

Os resultados permitem compreender as razões moleculares para a resistência às estrobilurinas causada pelas mutações G143A e G143S. Dessa forma, os modelos construídos serão utilizados para avaliar se novos fungicidas poderão ser mais eficientes para espécies de fungos que sofrem este tipo de mutação.

Agradecimentos

CAPES e CNPq.

[1] Yamaguchi, I. e Fujimara, M. *J. Pest. Sci.* **2005**, 30, 67-74.
[2] Ishii, H. et al. *Phitopat*. **2001**, 91, 1166.
[3] Hunte, C. et al. J. Struc. Fold. Des. **2000**, 8, 669-84.
[4] Zeng, D. Köller, W. *Curr. Genet*. **1997**, 32, 361-66.
[5] http://swissmodel.expasy.org.
[6] Esser, L. et al. *J. Mol. Biol*. **2004**, 341, 281-302.