



SIMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANCORAMENTO DO HERBICIDA GLIFOSATO A PROTEÍNA GLUTATIONA S-TRANSFERASE PHI 3 EM *Oryza sativa japônica*

Vinícius Costa Amador (1); Ravenna Lins Rodrigues (2); Felipe França de Oliveira (3); Rafael Trindade Maia (4)

1 Pós-graduando em Agronomia- Melhoramento Genético de Plantas. Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, PPGAMGP, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: vinicius.costa.amador@gmail.com

2 Discentes do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, PB, Sumé, Paraíba, Brasil. Email: ravennalinsrodrigues@gmail.com

3 Discentes do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, PB, Sumé, Paraíba, Brasil. Email: felipe_ufcg2016@hotmail.com

4 Professor Doutor. Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, PB, Sumé, Paraíba, Brasil. E-mail: rafael.trindade@ufcg.edu.com

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa*) é uma gramínea herbácea pertencente ao gênero *Oryza*, reconhecida por ser base da dieta e principal fonte de proteínas para mais da metade da população mundial, o que o torna uma espécie de grande interesse para a pesquisa científica. O principal fator limitante no cultivo do arroz são as plantas daninhas, devido a competição por recursos necessários para um desenvolvimento saudável, de tal forma, que o controle químico se torna a forma de manejo de plantas daninhas mais usada, onde em muitos casos a cultivar sofre perdas produtivas, pelo contato com o herbicida. A desintoxicação e excreção de xenobióticos, como herbicidas está intrinsecamente relacionada a superfamília de enzimas glutathione s-transferases (GST's) que conferem em arroz (*Oryza sativa*) a proteção ao estresse biótico e abiótico, atuando na biotransformação de proteção contra estresse oxidativo. A bioinformática surge com a técnica de *docking*/ancoragem molecular, que tem como objetivo sugerir e explorar as melhores conformações e suas possíveis interações moleculares, estudar e diferenciar uma família de ligantes ou inibidores. O *docking* molecular é uma técnica de amplo espectro alta celeridade de processamento e custos reduzidos. Portanto esse trabalho tem como objetivo elucidar a interação de uma proteína de arroz da família das GST e o herbicida glifosato, demonstrando sua importância biotecnológica e as vantagens voltadas para a agroindústria e indústria de defensivos agrícolas e para o melhoramento genético vegetal, apontando proteínas relacionadas a tolerância a herbicidas.

Palavras chave: Bioinformática, Herbicida, *Oryza sativa*, Glutathione

DOCKING SIMULATION AND EVALUATION OF THE GLYPHOSATE HERBICIDE AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 3 PROTEIN IN *Oryza sativa japônica*

AMADOR VC et al. Simulação e Avaliação de Ancoramento do Herbicida Glifosato a Proteína Glutathione S-Transferase Phi 3 em *Oryza Sativa Japônica*.
Revista Saúde e Ciência online, v. 7, n. 2, (maio a agosto de 2018). 502 p.



ABSTRACT

Rice is an herbaceous plant in the grass family, from the genus *Oryza*, which feeds more than half the human population and therefore has great global importance. In spite of such importance, there are just a few studies to minimize the problems intrinsic to the cultivation of these cereals. One of the main limiting factor in the cultivation are rice weeds, due to competitor resources, inherent in a healthy development, the chemical control is still the most important form of weeds management, where in many cases the cultivar suffers productive losses, by contact with the herbicide. It is known that the superfamily of glutathione s-transferase (GSTs) enzymes confer on rice (*Oryza sativa*), a biotic and abiotic aesthetic, acts on biotransformation to protect against oxidative stress and excretion of xenobiotics, including herbicide detoxification. It is necessary to explore the mechanism of interaction, as well as the proteins with herbicides in question. Bioinformatics arises with the molecular anchoring technique, which aims to suggest and explore possible better conditions of molecular interaction, to study and differentiate between a family of ligands or inhibitors. Molecular docking is a broad-spectrum technique with high processing speed and low cost. This work aims to elucidate an interaction of a GST family rice protein and glyphosate herbicide, demonstrating its biotechnological importance and as advantages for agroindustry and agrochemicals industry and for plant genetic improvement, pointing to proteins related to tolerance to herbicides.

Keywords: Bioinformatic, Herbicide, *Oryza sativa*, Glutathione.

INTRODUÇÃO

O *Oryza sativa*, também conhecida popularmente como “arroz”, é um dos cereais mais produzido e consumido do mundo, tornando o principal alimento dos países desenvolvidos sendo ultrapassado apenas pelo trigo (1) Pelo o seu excelente valor nutritivo, tornou-se parte da culinária brasileira e tornando assim o principal alimento de países asiáticos, fornecendo valor energético e proteico para os consumidores (2). No período de 2016 a 2017 foi previsto o aumento do consumo do arroz no total de 2,6 bilhões de toneladas do grão em escala mundial (3). Não obstante sua notável importância, verifica-se certa escassez de estudos para desenvolver técnicas com potencial de minimizar problemas intrínsecos ao cultivo desta cerealífera, como a competição com plantas daninhas, por exemplo (4). A maior parte dos custos na produção do arroz vem principalmente da utilização de fertilizantes, agrotóxicos, utilização de maquinários e sementes que representa em torno de 60% do custo (3). Devido o decréscimo produtivo e de qualidade causado e a dificuldade na realização da colheita da cultura (5-6) faz-se necessário o uso de herbicidas. Herbicidas são



seletores químicos capazes de classificar ervas daninhas de plantas produtivas provocando assim a morte desses organismos. A classificação de herbicidas se dá através de agrupamentos de acordo com seu mecanismo de aplicação nas plantas e sua estrutura química básica. Geralmente herbicidas que fazem parte do mesmo grupo químico exibem efeitos similares nas plantas susceptíveis, apesar de existir exceções a regras (7).

O glifosato “N-(fosfometil)glicina” pertence ao grupo dos aminoácidos fosfonados tendo como seu precursor, a glicina que atua em todo o organismo, sendo Pós-emergente e não seletivo largamente utilizado na agricultura. O herbicida possui dois outros grupos funcionais além do fosfonato, (amino e carboxilato) que podem assim se conjugar fortemente na interação entre íons metálicos, principalmente entre os de transições em pH aproximadamente neutro em que os grupos carbóxilato e fosfonato se encontra em estado de desprotonação. Devido a habilidade de conjugação com ligante tridentado faz com que o herbicida glifosato se encontre em um estado privilegiado entre herbicidas em geral (8). Devido a interação com ervas daninhas, o glifosato passa a ser rapidamente absorvido pelas folhas, agindo assim no processo de interrupção da biossíntese de ácidos aminoaromáticos essenciais, comprometendo assim a produção de clorofila e carotenoides, ocasionando danos celulares irreversíveis. Os principais danos ocorridos devido a absorção do glifosato é a ruptura parcial do cloroplasto e a ocorrência da perda líquida do retículo endoplasmático rugoso caracterizando-se como danos mais severos. A aplicação do glifosato se dá nas dessecações de coberturas vegetais e no controle de ervas daninhas, esse processo ocorre em plantio direto onde o solo não sofre movimentações (9).

As Glutathione S-Transferase (GSTs) são enzimas que tem como principal função catalisar o ataque nucleofílico da sua forma reduzida em compostos orgânicos que possuem em suas estruturas químicas um átomo de carbono, nitrogênio ou enxofre eletrofilico, e se encontram dessa forma em meio biológico como homo ou heterodímero possuindo assim o papel importante na biotransformação e excreção de xenobióticos além de proteção contra estresse oxidativo (10). Sendo enzimas sintetizadoras que podem adicionar ou substituir tripeptídios Glutathione (GSH; γ -Glu-Cys-Gly) sem auxílio de ribossomo por um determinado núcleo eletrofilico que recebe essas determinadas moléculas (11). Por fazer parte de um conjunto de super enzimas, as glutathione são encontradas intracelularmente em altas concentrações,



essencialmente em todos os organismos aeróbicos. Devido ao potencial inibitório das enzimas relacionadas à GSH tendo como alvo para desenvolver substâncias que apresentam características farmacológicas (10). O processo de geração atua no meio intracelular, a partir da atuação de duas enzimas que fazem a ligação peptídica entre os aminoácidos envolvidos, classificadas em duas fases, na seguinte sequência: inicialmente a biossíntese, que começa com a catalização da ligação peptídica dos aminoácidos ácido glutâmico e cisteína, produzida através da enzima γ -glutamylcisteína sintetase; conseqüentemente, este dipeptídeo, une-se a glicina pela reação da enzima glutationa sintetase. (12)

O processo computacional utilizado para previsão de estruturas intermoleculares a partir da interação de duas ou mais moléculas constituintes é conhecido como *docking* molecular. Esse processo se dá pela interação entre duas substâncias sendo elas: Proteínas e proteína, ligante e proteína ou a interação entre ácido nucleico (DNA ou RNA) e uma molécula pequena (inibidor, substrato, medicamento, etc). A ancoragem molecular (*docking*) tem como objetivo, resolver problemas que são definidos como coordenadas atômicas de duas moléculas, prevendo assim a sua associação (13). Os processos de *docking* fornecem avaliação da energia na ligação entre a proteína e o ligante, antes do processo de sintetização, facilitando assim o corte de custos ocorridos na etapa de síntese e de testes farmacológicos na utilização de várias substâncias na parte laboratorial. Tornando assim uma ferramenta importante para a identificação de compostos que não tem compatibilidade com outros alvos, e encontrar as possíveis substâncias que podem apresentar uma boa interação com o sítio ativo do alvo. (14).

METODOLOGIA

Data mining: O modelo utilizado foi obtido por modelagem molecular por homologia, feito com o servidor SWISSMODEL, do PMDB- *Protein Model DataBase* (<https://bioinformatics.cineca.it/PMDB/>) e encontra-se disponível para acesso público através do código. A estrutura do ligante herbicida glifosato foi obtida na base de dados de pequenas moléculas ZINC *database* (15) em arquivos .mol2.

Preparação das moléculas: Os arquivos.mol2 foi convertido para .pdbqt no Autodock 1.5.6 (<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>),

AMADOR VC et al. Simulação e Avaliação de Ancoramento do Herbicida Glifosato a Proteína Glutathione S-Transferase Phi 3 em *Oryza Sativa Japonica*.
Revista Saúde e Ciência online, v. 7, n. 2, (maio a agosto de 2018). 502 p.



teve os hidrogênios polares removidos e suas moléculas foram assinaladas com os parâmetros de carga Gasteiger (16). A estrutura da OsGSTU4 foi obtida a partir do arquivo .pdb do modelo teórico, o qual foi convertido para arquivo .pdbqt no Autodock e foram adicionado hidrogênios e parâmetros de carga Kollman (17). A glutathione foi tratada como co-fator.

Docking: Os cálculos de *docking* rodaram no programa Autodock 1.5.6 (<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>) e as simulações foram realizadas parâmetro de cargas atômicas AD4 e com o ligante flexível e a proteína rígida (18) através do algoritmo genético lamarckiano (LGA).

O Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) é uma ferramenta computacional que busca sob de uma vasta variedade de parâmetros, ou seja, o algoritmo faz uma varredura de possíveis combinações/soluções representativas para um problema pré-determinado, baseadas em princípios de genética, seleção natural e evolução proposto primariamente por Darwin (19-5-21).

A presente metodologia fez uso do LGA em conjunto com o método de Goodford, permitindo, ao mesmo tempo, a amostragem do espaço configuracional do ligante conjuntamente ao cálculo da energia de interação atômica do receptor e do ligante (22- 19).

Os parâmetros de *grid*, calcularam mapas de afinidade previamente para cada átomo do ligante que interage com o receptor, imersos em uma caixa de pontos reticulados (uma grade de energia). O uso de *grids* neste trabalho teve a finalidade de construir uma caixa de pontos reticulados regularmente espaçados, sendo centrado na região de interesse do receptor, desta forma os *grids* estabelecidos foram de 126 x 126 x 126 angstroms pelo programa Autogrid (<http://autodock.scripps.edu/wiki/AutoGrid>) e centrado no receptor (GST) (20-23).

Os parâmetros usados para simulações foram os seguintes: 10.000 réplicas, análises de energia a cada 1.500.000 e 27.000 gerações, tamanho populacional de 150 e taxas de mutação e crossing-over de 0,02 e 0,08 respectivamente. Os programas rodados subseqüentemente foram o Autogrid gerando os mapas de interação e o Autodock gerando as conformações de ancoramento molecular. Foram geradas 10 conformações que foram ranqueadas com base na menor energia e analisadas no VMD (24) e pelo programa preditor de sítios catalíticos, GHECOM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



O resultado do *docking* realizado para o herbicida glifosato, executado no programa autodock, foi o ranqueamento de dez possíveis complexos, a Tabela 1 lista as três melhores possíveis conformações. Este procedimento tem como base os scores de energias intermoleculares, energia de ligação e ligações de hidrogênio, evidenciando os átomos (e resíduos) da proteína e do ligante que apresentam interações favoráveis para o modelo, conforme descrevem (19), sendo, portanto, apropriado para predição de complexos moleculares, simulação computacional de associações moleculares entre substrato e enzima, (25-26) como o presente trabalho.

Tabela 1. Resultados dos três melhores complexos ranqueados pelo autodock no *docking* do glifosato

Complexo	Energia livre de ligação Kcal/mol	Energia intermolecular final Kcal/mol	Ligações de hidrogênio
1	-1.72	-2.91	A:LYS148:HZ2 A:LYS148:HZ3 B:LYS:43:HZ3
2	-2.14	-3.34	B:LYS145:HZ2 B:LYS148:HZ3
3	-1.65	-2.85	A:LYS148:HZ3 B:LYS43:HZ3

Fonte: Tabela produzida pelo desenvolvedor da pesquisa.

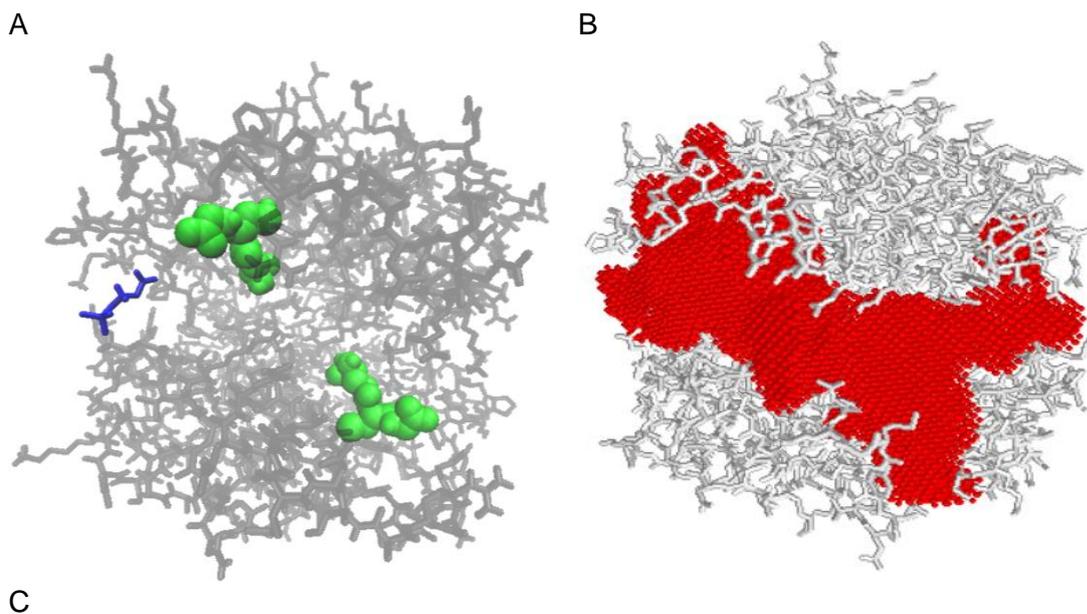
Os resultados revelados pelo *docking* do glifosato mostram repetições de alguns resíduos (Lisina 148 da cadeia A, e Lisina 43 da cadeia B) que se apresentaram extremamente favoráveis, sendo estes, possivelmente resíduos âncora para a ligação, combinando com os resultados evidenciado por (27).

O primeiro dos resultados ranqueados pelo autodock para o glifosato pode ser visualizado na Figura 1.

De maneira geral, na Figura 1A pode-se observar a seguinte sequência: em cinza, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutathione S-transferase; em verde, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals), a molécula de glifosato está representado em verde, alocada em uma região que pode ser identificada como um sítio catalítico, como descreve a Figura 1B. A Figura 1B nos proporcionar a visualização da região que desempenhou os maiores desvios (em vermelho) de hidrofobicidade da proteína (como confirma o gráfico da Figura 1B); a ideia geral é que regiões mais hidrofóbicas tendem a ficar no interior da proteína, enquanto que as hidrofílicas ficam mais na superfície, há uma tendência natural dos sítios ativos se



situarem mais em regiões de alta hidrofobicidade, pois ficam no interior da proteína onde é menos exposto ao solvente e outras interferências(18). A Figura 1C mostra a distribuição de resíduos ao decorrer da sequência primária da OsGSTF3, em função de zonas hidrofóbicas, sendo os descritos como: vermelho, azul escuro, verde, amarelo e azul claro, indicando em sequência do mais promissor, para o menos promissor.



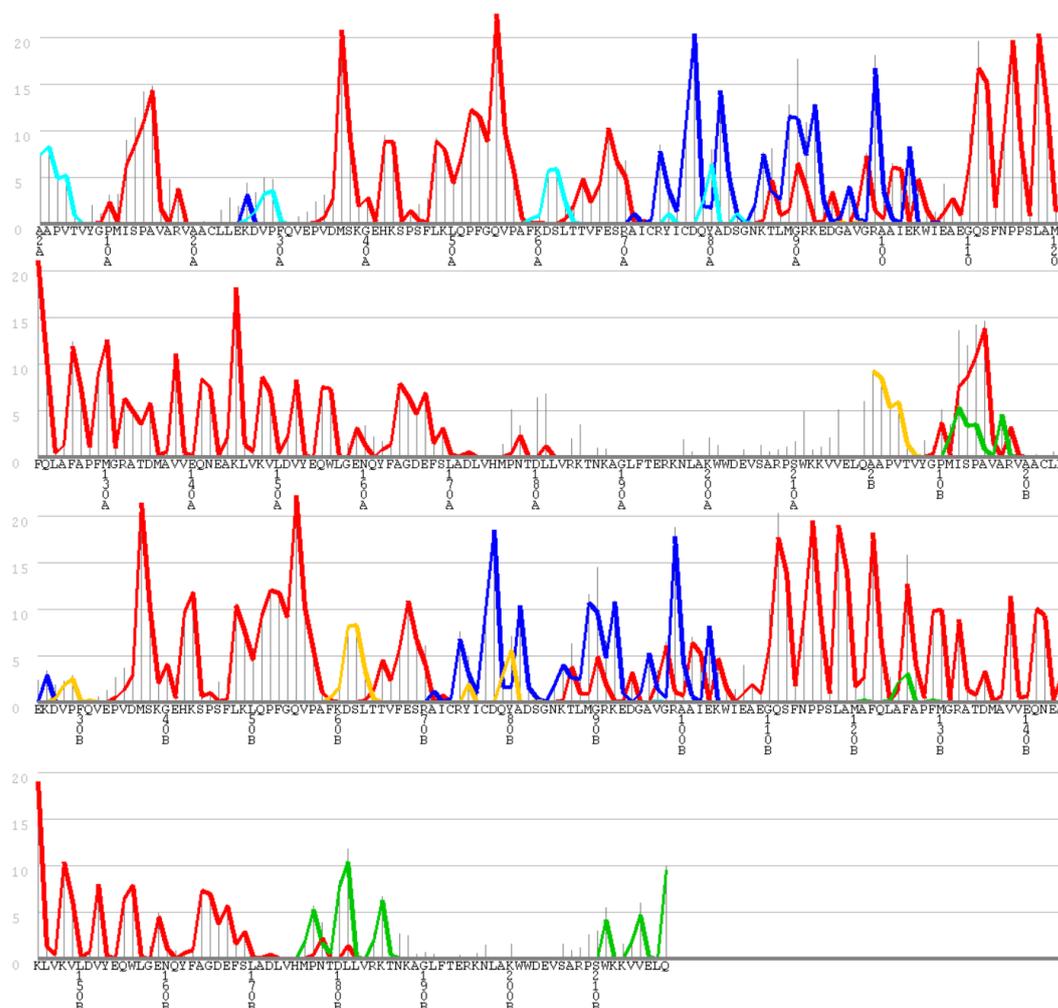


Figura 1. Imagem do primeiro complexo OsJGSTF3-glifosato obtido por meio do programa autodock (A), produzida no programa *Visual Molecular Dynamics*, e ao lado representação do melhor resultado de representação do sítio catalítico (em vermelho) da proteína OsJGSTF3 (B), pelo servidor GHECOM.

Com a mesma ferramenta o programa *Visual Molecular Dynamics*, foi possível caracterizar átomos dos resíduos sob a referida distância de 4 Å, que podem ser observados em detalhe nas Figuras 2 (“a” e “b”). É possível observar que a região de *docking*/ancoramento é a região do sítio catalítico da proteína

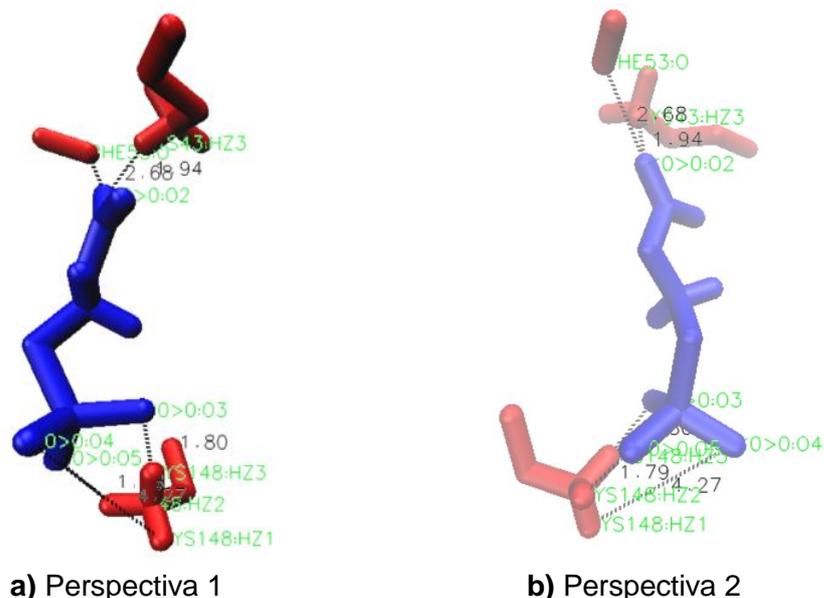


Figura 2. Representação de resíduos âncora, marcados a uma distância máxima de 4 ângstroms (vermelho) do ligante (azul) glifosato com suas respectivas distâncias (preto) e átomos.

A Tabela 2 apresenta os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante. Onde podemos observar os átomos de hidrogênio dos resíduos lisinas 43, e lisina 148 e o oxigênio do resíduo fenilalanina 53, se ligando a átomos de oxigênios 2, 3 e 5, à distância de 1,79 à 2,68 Å, reforçando a hipótese de serem resíduos âncora, formando ligações covalentes com o ligante. (28)

Tabela 2. Representação de átomos de resíduos próximos ao glifosato e suas respectivas distâncias em ângstroms no primeiro complexo.

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
LYS43:HZ3	<O> 0:O2	1.94
PHE53:O	<O> 0:O2	2.68
LYS148:HZ2	<O> 0:O5	1.79
LYS148:HZ3	<O> 0:O3	1.80

Fonte: Tabela produzida pelo desenvolvedor da pesquisa.

A não ligação do glifosato com a subunidade glutatona (GSH), revela uma possível incapacidade da OsGSTF3 o herbicida, o que concorda com os resultados de um experimento feito para avaliação do efeito do herbicida glifosato, que revelou



diversos efeitos contraproducentes, tais como: diminuição da altura, número de filhos aférteis, e perdas de grãos de até 63% em *Oryza sativa* (29).

CONCLUSÃO

Os resultados deste experimento mostram que apesar das GST's serem proteínas promíscuas, sendo capazes de metabolização de um amplo espectro de xenobióticos, possivelmente a OsGSTF3 não é capaz de solubilizar o glifosato, a partir da conjugação com a subunidade GSH.

O *docking* molecular se apresentou uma excelente ferramenta para descrição e previsão de interações moleculares. Os resultados concebidos neste trabalho, pode auxiliar no possível desenvolvimento de defensivos com maior precisão, considerando que é uma cultura com desenvolvimento de poucas tecnologias voltadas para o seu cultivo e manutenção.

REFERÊNCIAS

1. Costa JA, Silva MC, Oliveira IP, Costa FR, Lima AF. Respostas de Aplicações de Diferentes Doses de Zinco na Cultura do Arroz em Solos do Cerrado. Rev Focu Mont Bel (FMB). 2015; 9 (1): 59 - 139.
2. Cordeiro ACC, Suhre E, Medeiros RD, Vilarinho AA. Sistemas de Cultivo e Manejo de Água na Produção de Diferentes Genótipos de Arroz em Várzea, no Estado de Roraima. Pesq Agropec Trop. 2010; 40(3):362-369.
3. CONAB. 2017 [cited 11 October 2017]. Available from: <http://www.conab.gov.br/conteúdos.php?a=1252>
4. Silva M, Durigan J. Períodos de Interferência das Plantas Daninhas na Cultura do Arroz de Terras Altas: I – Cultura do IAC 202. Planta Daninha. 2006;24(4):685-694.
5. Cardoso G, Alves P, Beltão N, Vale L. Períodos de interferência das plantas daninhas em Algodoeiro de Fibra Colorida 'BRS Safira'. Rev Ciê Agron. 2010; 41(3):456-462.
6. Freitas R, Berger P, Ferreira L, Cardoso A, Freitas T, Pereira C. Interferência de Plantas Daninhas na Cultura de Algodão em Sistema de Plantio Direto. Plant Dan. 2002; 20(2): 197-205.
7. Oliveira RS, Constantin J, Inoue MH. Biologia e Manejo de Plantas Daninhas. 22ª ed. Curitiba, PR: Omnipax; 2011.
8. Coutinho CFB, Mazo LH. Complexos Metálicos com o Herbicida Glifosato: Revisão. Quim Nova. 2005; 28 (6): 1038-1045.
9. Da Silva MD, Peralba MCR, Mattos MT. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio passo do pilão. R Ecot e Mei Amb. 2003; 13 : 19-28.
10. Huber PC, Almeida WP. Glutationa e Enzimas Relacionadas: Papel Biológico e Importância em Processos Patológicos. Quim Nova. 2008 abri 04; 31(5): 1170-1179.



11. Dixon DP, Edwards R. Glutathione Transferases. *The Arab Book/Ameri Soci of pln biolog.* Mai 08 2010; 8:e0131. 1-15. doi: 10.1199/tab.0131. PMC3244946.
12. Amador VC, Maia RT, de Sousa AA. *Bioinformática na Resistencia de Plantas a Herbicidas.* 1st ed. Novas Edições Acadêmicas; 2017.
13. Mihasan M. What in Silico Molecular Docking can do for the 'Bench-working biologists'. *Biosci.* 2012; 37: 1089-1095. doi: 10.1007/s12038-012-9273-8.
14. Souza RL. *Aplicação da técnica de ancoragem molecular na otimização do fármaco hipoglicemiante metformina.* Centr Uni Luter Palm. Palmas. 2015.
15. Dastmalsh S, Hamzeh M, Sokout B. *Methods and algorithms for molecular Docking-Based Drug Design and Discovery.* 1ed. 1998.
16. GASTEIGER J, MASILI M. *TETRAHEDRON.* 1980; 36: 3219-3228. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040402080801682> Acessado em 15/06/2015.
17. Winer S, Kollman P, Case D, Singh U, Ghio C, Alagona G et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *Jour of the Amer Chem Soci.* 1984; 106(3): 765-784. doi: 10.1021/ja00315a051.
18. Gomes E, Guez MAU, Martin N, Silva R. *Enzimas Termoestáveis: Produção e Aplicação Industrial.* Quím Nova. 2007;30 (1): 136-145.
19. Morris G, Goodsell D, Halliday R, Huey R, Hart W, Belew R et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry.* 1998; 19(14):1639-1662.
20. Gasteiger J, Masili M. *Tetrahedron.* 1980; 36: 3219-3228. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040402080801682> Acessado em 15/06/2015. 2015
21. Pedro, Rocha L. *Uma Nova Representação para o Problema de Predição da Estrutura de Proteínas em Grade.* Dissertação [Mestrando em Ciencia em Modelagem Computacional]. Rio de Janeiro: Laboratório Nacional de Computação Científica; 2008.
22. Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of computational chemistry .* 1985; 28: 849-857.
23. Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS. A Semiempirical Free Energy force field With Charge-BASED Desolvation. *J.Comput. Chem.* 2007; 28: 1145-1652.
24. Humphrey W, Dalkar A, Shulten K. *VMD: Visual Molecular Dynamics* 1996; 14(1):33-38.
25. Trosset J, Scheraga H. Prodock: Software package for protein modeling and docking. *Journal of Computational Chemistry.* 1999;20(4):412-427.
26. Brooijmans N, Kuntz I. *Molecular Recognition and Docking Algorithms.* Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 2003;32(1):335-373.
27. Rigo M. *Estudo in silico da reatividade cruzada entre epitopos de hantavírus.* [Tese de Mestrado]. Instituto de Biociências da UFRS; 2011.
28. OLIVEIRA Jr., R. S. Mecanismo de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA Jr., R. S.; Constantin, J.; INOUE, M. H. (Coord.). *Biologia e Manejo de Plantas Daninha.* Curitiba, PR: Omnipax, 2011;141-184.
29. Silva BV, Horta BAC, Alencastro RB, Pinto AC. *Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos.* Quim Nova. 2009; 32(2):453-462.