

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

Seleção de compostos com base na ativação dos receptores ecdisteroides em
linhagens celular Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9)

Maicon Roberto Ribeiro Machado

Pelotas, 2019

Maicon Roberto Ribeiro Machado

**Seleção de compostos com base na ativação dos receptores
ecdisteroides em linhagens celular Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área do conhecimento: Entomologia).

Orientador: Dr. Moises João Zotti

Pelotas, 2019

Maicon Roberto Ribeiro Machado

Seleção de compostos com base na ativação dos receptores ecdisteroides em linhagens celular Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9)

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Fitossanidade, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21 de fevereiro de 2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Moises João Zotti

Departamento, de Fitossanidade, FAEM/UFPel (Orientador)

Doutor em Applied Biological Science pela Ghent University, UGENT, Bélgica

Prof. Dr. Dori Edson Nava

Pesquisador da Embrapa Clima Temperado e professor permanente no curso de Pós-graduação em Fitossanidade e Entomologia da Universidade Federal de Pelotas.

Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (Esalq/USP).

Dr. Deivid Araújo Magano

DAEB- Departamento de Água e Esgotos Bagé/ RS.

Doutor em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Santa Maria.

Prof^a. Dra. Letícia Neutzling Rickes

Professora do Instituto Educacional Dimensão, Pelotas/ RS.

Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

A minha Mãe
Solange Aparecida Ribeiro Machado
Dedico

Agradecimentos

A minha mãe Solange Aparecida Ribeiro Machado pelo apoio indispensável nesta longa caminhada. A minha irmã Yasmin Ribeiro Machado, aos meus Tios, em especial Tadeu Machado, Rosa Maria Machado e Claér Machado, esta conquista foi possível graças a ajuda de vocês.

A minha companheira, amiga e namorada Janaina Pinheiro Dalbosco, pela convivência, amor, companheirismo e apoio.

Ao amigo Deivid Araújo Magano pelos bons momentos vividos na Universidade Federal Santa Maria, pelo aprendizado, ensinamentos e pela experiência de vida e acolhimento na graduação como bolsista do seu projeto de Doutorado.

Ao professor da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) Dr. Moises João Zotti pela amizade, vivência desde os tempos da graduação na Universidade Federal de Santa Maria, orientação no mestrado, paciência em transmitir os seus conhecimentos em entomologia molecular e bioinformática, confiança e apoio neste projeto.

Aos professores Dra. Márcia Wulff Schuch (Laboratório de Fruticultura UFPel), Dr. Luciano do Amarante (Laboratório Bioquímica UFPel) e ao Dr. Éder João Lenardão (Laboratório de Síntese Orgânica UFPel), pelo auxílio prestado, amizade construída nestes dois anos, e por disponibilizar os seus laboratórios para realização deste projeto.

A todos os integrantes do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP-UFPel) pelo auxílio e convivência nesse período, em especial a Dra. Mariane D'Ávila Rosenthal pelo acolhimento, pelo auxílio prestado laboratorial e pela Amizade, Pós Doc Leticia Rickes que contribuiu no início do mestrado, pelo auxílio prestado em técnicas laboratoriais, Ciro Pedro Guidoti pelo auxílio e pela paciência em ensinar e transmitir o seu conhecimento adquirido em biotecnologia celular e bioinformática. Aos colegas Ericmar Ávila dos Santos, Ronaldo Zantedeschi, Deise Cagliari e Franciele de Armas pela rotina de laboratório diariamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos. Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade (PPGFs) da UFPel, por me oportunizar a realização do curso

de Mestrado. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade (PPGFs) pelos ensinamentos transmitidos, em especial aos Professores Moises João Zotti, Flávio de Melo Garcia e Daniel Bernardi.

Aos membros da banca avaliadora dessa dissertação: Professor Dr. Dori Edson Nava, Professora Dra. Leticia Neutzling Rickes e Dr. Deivid Araújo Magano por aceitarem compor à banca de avaliação. À todas as pessoas que contribuíram, seja direta ou indiretamente, para obtenção desse título de mestre em ciência.

Muito obrigado!

“Toda decisão acertada é proveniente de experiência.

E toda experiência é proveniente de
uma decisão não acertada”.

(Albert Einstein)

Resumo

MACHADO, Maicon Roberto Ribeiro. **Seleção de compostos com base na atividade dos receptores ecdisteroides em linhagens celular S2 e SF9.** 2019 58 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Os análogos de dibenzoilhidrazinas (DAH) foram os primeiros inseticidas desenvolvidos do grupo de reguladores de crescimento de insetos, chamados agonistas do receptor de ecdisteróide de insetos. Uma característica notável das dibenzoilhidrazinas é a sua alta atividade e especificidade em insetos da ordem Lepidoptera, além disso, algumas dibenzoilhidrazinas possuem atividade em insetos da ordem Diptera. Nesse sentido, os compostos não esteroidais análogos específicos para ordem Lepidóptera podem apresentar alguma atividade em células das ordens Diptera e Coleóptera. No entanto, para a descoberta de agonistas do receptor ecdisteróide que têm como alvo outros grupos de insetos importantes, como Diptera, são necessários sistemas eficientes de triagem baseados na ativação do receptor ecdisteróide. Neste estudo, um sistema de triagem baseado em linhagens de células embrionárias da ordem Lepidoptera (SF9) e Diptera (S2) foram transfectadas e adicionados plasmídeo repórter específico. Este sistema de Triagem de alto desempenho HTTS foi desenvolvido com o intuito de descobrir e avaliar compostos que possuem atividade agonista ou antagonista do receptor ecdisteroides. Para validação dos sistemas de triagem, obteve-se curvas doses respostas da atividade agonista do hormônio natural de insetos o 20 H e Fitoesteróide Ponasterona A análogos da ecdise, para ambas linhagens celular S2 e SF9. Uma biblioteca de vinte e três compostos foram realizados testes de citotoxicidade e quatorze compostos apresentaram viabilidade celular inferior a 80%, e foram descartados. Nove compostos apresentaram viabilidade celular de no mínimo 80% e foram testados no sistema de triagem de células da ordem Diptera e Lepidoptera. Os nove compostos testados não apresentaram atividade agonistas nas duas linhagens de células de diptera e lepidoptera. Dois compostos nomeados de DAF-2 e DAF-4 apresentaram atividade antagonista bloqueando o receptor nuclear parcialmente em ambas linhagens celulares em comparação ao hormônio natural 20 H.

Palavras-chave: Biotecnologia Celular; 20-Hidroxicdisônio; Ponasterona-A; bioprospecção de novos compostos; linhagens celulares.

ABSTRACT

MACHADO, Maicon Roberto Ribeiro. **Compound screening based on ecdysteroid receptor activity in S2 and SF9 cell lines** 2019 58 f. Dissertation (Master degree) - Graduation Program in Crop Protection, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019

Dibenzoylhydrazine analogues (DAHs) were the first insecticides developed from the group of insect growth regulators called insect ecdysteroid receptor agonists. A notable feature of dibenzoylhydrazines is their high activity and specificity in insects of the order Lepidoptera, in addition, some dibenzoylhydrazines have activity in insects of the order Diptera. Hence, non-steroidal analogue compounds specific to the order Lepidoptera may present some activity in cells of the Diptera and Coleoptera orders. However, for the detection of ecdysteroid receptor agonists targeting other important insect groups, such as Diptera, efficient screening systems based on ecdysteroid receptor activation are required. In this study, a screening system based on Lepidoptera (SF9) and Diptera (S2) embryonic cell lines were transfected and specific reporter plasmids were added. This HTTS high performance screening system was developed aiming to discover and evaluate compounds that have ecdysteroid receptor agonist or antagonist activity. To validate the screening systems, we prepared dose response curves on agonist activity of the natural hormone of insects 20 H and Phytosteroid Ponasterone A ecdysis analogs, for both cell lines S2 and SF9. A library of twenty-three compounds were tested for cytotoxicity and fourteen compounds resulted in cell viability below 80% and were discarded. Nine compounds resulted on cell viability of at least 80% and were tested in the cell screening system of Diptera and Lepidoptera orders. The nine compounds tested did not present agonist activity in both lepidopteran and dipteran cell lines. Two compounds named DAF-2 and DAF-4 showed antagonistic activity by blocking the nuclear receptor partially in both cell lines compared to the natural hormone 20H.

Keywords: Cell Biotechnology; 20-Hydroxyecysonium; Ponasterone-A; bioprospection of new compounds; Cell lines.

Lista de Figuras

Figura 1: Classificação dos receptores nucleares em insetos holometabólicos (BONNETON et al., 2008). Para cada receptor, o quadro colorido indica sua presença/ausência no genoma em cada uma das sete espécies. A árvore do lado esquerdo indica a filogenia entre espécies, enquanto que a árvore na base indica as relações entre os receptores. ----- 19

Figura 2: Compostos esteroidais e não esteroidais utilizados na triagem em células de Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9). Fonte: Machado (2019). ----- 32

Figura 3: Viabilidade celular frente à exposição das novas moléculas em três concentrações molares (0,0001; 0,00001 e 0,000001). Os controles DMSO e meio celular, anova One Way Anova Figura A (F= 1401,69 gl= 4;GL resíduo= 30; P<0.0001); Figura B (F= 386,66 gl= 4;GL resíduo= 30; P<0.0001); Figura C (F= 886,68 gl= 4;GL resíduo= 30; P<0.0001), (teste t, p<0,05) Figura D (F= 173,25 gl= 4;GL resíduo= 30; P<0.0001), (teste t, p<0,05). Fonte: Machado (2019). ----- 38

Figura 4: Viabilidade celular frente à exposição das novas moléculas em três concentrações molares (0,0001; 0,00001 e 0,000001). Os controles DMSO e meio celular. anova One Way Anova Figura E (F= 1168,13 gl= 4; GL resíduo= 30; P<0.0001); Figura F (F= 2814,67 gl= 4; GL resíduo= 40; P<0.0001); Figura G (F= 911,35 gl= 4; GL resíduo= 30; P<0.0001). Fonte: Machado (2019).----- 39

Figura 5: Curvas sigmóides de dose-resposta referentes a atividade de dois ecdisteroides em células S2 e SF9.Fonte: Machado (2019) ----- 40

Figura 6: Efeito agonista observado para as nove novas moléculas nas linhagens celulares S2 (A) e SF9 (B). A atividade agonista das moléculas foram comparadas com a concentração de 100µM do hormônio 20-Hidroxiectdisônio (20H), Ponasterona A e o DMSO (Solvente de diluição das moléculas) como controle. Os Valores que são seguidos por letras foram

significativamente diferentes (teste tukey = 0,05). A diferença significativa do mensuramento da luminescência medida em comparação ao controle com 20-Hidroxicdisônio, anova One Way Anova. Bioensaios agonista S2 (F= 402,7, gl= 11; GL resíduo= 24; P<0.0001)e (teste tukey =.significativo P < 0.05), Agonista SF9(F= 1913, gl= 11; GL resíduo= 24; P<0.0001)e (teste t =.significativo P < 0.05). -----42

Figura 7: Efeito antagonista observado para as nove novas moléculas nas linhagens celulares S2 (A) e SF9 (B). A atividade antagonista das moléculas foram comparadas com a concentração de 100µM do hormônio 20-Hidroxicdisônio (20H), Ponasterona A e o DMSO (Solvente de diluição das moléculas) como controle. Os Valores que são seguidos por letras foram significativamente diferentes (teste tukey = 0,05). A diferença significativa do mensuramento da luminescência medida em comparação ao controle com 20-Hidroxicdisônio, anova One Way Anova. Bioensaios antagonista S2 (F= 12,87, gl= 11; GL resíduo= 24; P<0.0001) e (teste tukey =.significante P < 0.05), Antagonista SF9 (F= 7,634, gl= 11; GL resíduo= 24; P<0.0001)e (teste tukey =.significante P < 0.05).-----44

Figura 8: Cavidade de ligação dos ecdisteroides dentro do receptor. Na imagem 20-Hidroxicdisônio ancorada no receptor de ecdisteroides de *Drosophila melanogaster* (A) e *Heliothis virescens* (B). Os dois lobos localizados na porção superior da cavidade estão indicados por uma estrela (lado esquerdo) e por um triângulo (lado direito). No receptor de *Lepidoptera* (B) é possível observar o lobo esquerdo saliente, sítio o qual ligam-se as dibenzoilhidrazinas. Autor: Machado (2019). -----46

Figura 9: DAF-2 Interface gráfica da possível interação entre a molécula DAF-2 e o receptor de ecdisteroides de *Drosophila melanogaster* (A) e *Heliothis virescens* (B). Está ilustrado o resultado da inibição dos aminoácidos THR467 e MET- 508 em receptor de ecdisteroide de diptera e inibição dos aminoácidos THR-343 e ARG-387 em receptor ecdisteroide de lepidoptera. Autor: Machado (2019).-----48

Figura 10: Interface gráfica da possível interação entre a molécula DAF-4 e o receptor de ecdisteroides de *Drosophila melanogaster* (A) e *Heliothis virescens* (B). Está ilustrado o resultado da inibição dos aminoácidos ARG-511 em receptor de ecdisteróide de diptera e inibição dos aminoácidos ASN-504 e ARG-387 em receptor ecdisteroide de lepidoptera. Autor: Machado (2019).-----49

Lista de Tabelas

- Tabela 1: Identificação das moléculas utilizadas no estudo conforme suas fórmulas químicas (F.Q.), nome químico, peso molecular (P.M.), pureza inicial (P.I.) e solvente utilizado para as diluições. -----33
- Tabela 2: Atividade agonista de 20-Hidroxiecdisonio (20H), Ponasterona-A (PonA). -----41
- Tabela 3: Atividades de Compostos no bioensaios em cultura celular S2 e SF9 para agonistas do ecdisteroides. -----42
- Tabela 4: Atividades de Compostos no bioensaios em cultura celular S2 e SF9 para antagonista do ecdisteroides. -----44

Sumário

1. Introdução Geral	14
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1 Inseticidas inibidores de crescimento e desenvolvimento de insetos	17
2.2 Receptores nucleares: classificação e distribuição	17
2.3 Estrutura geral dos receptores nucleares.....	20
2.4 Planejamento racional de inseticidas: foco em receptores nucleares	23
3. Artigo 1- 1 Seleção de compostos com base na ativação dos receptores ecdisteroides em linhagens celular Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9)	28
3.1 Introdução	29
3.2. Material e Métodos	31
3.2.1 Compostos Químicos	31
3.2.2. Linhagens Celulares.....	34
3.2.3. Ensaios de Citotoxicidade.....	34
3.2.4. Transfecção Celular	35
3.2.5. Bioensaios para agonistas e antagonistas do receptor ecdisteroides e a capacidade de resposta ao ECR-USP	35
3.2.6. Modelagem tridimensional (3D) dos receptores nucleares de diptera (DRLBDs) de Lepidoptera (EcRLBDs)	37
3.3. Resultados e Discussão.....	37
3.3.1 Teste de citotoxicidade	37
3.3.2. Atividade agonista do ecdisteroide	39
3.3.3. Atividade antagonista do ecdisteroide.....	43
3.3.4. Modelagem tridimensional de Diptera e Lepidoptera EcR-LBD	46
3.3.5 Modelagem tridimensional dos compostos DAF-2 e DAF-4.....	47
3.4. Conclusões.....	50
3.5. Referências	50
4 Conclusões Gerais	53
Referências	54

1. Introdução Geral

Com avanço da agricultura o surgimento de pragas em escala global, foi necessário o desenvolvimento de pesticidas inorgânicos, botânicos e naturais, explorados principalmente durante o século XIX e século XX, um progresso significativo na síntese de novas substâncias químicas resultou na descoberta de estruturas e atividades biológicas de vários compostos. Inseticidas convencionais de amplo espectro, como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, foram desenvolvidos e usados para controlar pragas nas últimas cinco décadas, reduzindo assim rendimento dos cultivos agrícolas (CASIDA et al. 1998). O surgimento do Manejo Integrado de Pragas (MIP) propiciou avanços significativos no desenvolvimento de novos inseticidas com propriedades seletivas que atuam em sítios bioquímicos ou processos fisiológicos presentes em grupos de insetos (HOFFMANN et al. 1998).

Historicamente, o manejo de insetos, tem sido realizado com um número restrito de inseticidas. Hoje existem apenas 30 alvos onde os atuais inseticidas atuam (GHANIM e YSHAAYA, 2010). Algumas moléculas estão há bastante tempo no mercado, com resultados consolidados inclusive, como é o caso do clorfenapyr, indoxacarb e metoxifenozone. Entretanto, outras moléculas foram registradas há pouco tempo, como cyantraniliprole e Espinoteram. Os mecanismos de ação destas moléculas conhecidas atuam em proteínas. A determinação destes alvos é crucial para o planejamento racional de novos pesticidas, uma vez que a falta de novos grupos químicos beneficia o surgimento de artrópodes pragas resistentes aos inseticidas disponíveis no mercado de agroquímicos, existem mais de 550 artrópodes pragas catalogados como resistentes (IRAC, 2018).

As principais espécies resistentes a inseticidas são de importância agrícola, médica e veterinária. Os casos mais frequentes encontrados na literatura são relacionados a classe dos organofosforados e organoclorados, visto que estas duas classes de inseticidas são utilizadas há quase 50 anos. Uma informação interessante é que a indústria farmacêutica possui aproximadamente 1000 alvos terapêuticos (RASK-ANDERSEN et al., 2011), que são utilizadas para desenvolvimento de fármacos enquanto a indústria de pesticidas tem apenas 30 alvos que são explorados no desenvolvimento de

produtos (IRAC, 2018). A busca de novos mecanismos de ação é um grande problema para indústria de agroquímicos, pois o processo de pesquisa e desenvolvimento de pesticidas é complexo, longo e de alto custo. A descoberta de novos pesticidas tem suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas. Os avanços expressivos da Químioinformática e biologia molecular no desenvolvimento de fármacos contribuíram para a utilização das técnicas, servindo de modelo para o desenvolvimento de novos pesticidas no controle de insetos (DAS, 2016). O estudo e a compreensão de rotas e vias bioquímicas e fisiológicas são essenciais para delimitar alvos moleculares e desenvolver mecanismos que levam ao controle de insetos.

Atualmente existe uma variedade de novos agentes de controle de insetos desenvolvidos, ou em desenvolvimento, e que podem ser utilizados em uma variedade de insetos, sendo muitos deles com novos mecanismos de ação. A crescente demanda por produtos naturais se intensificou nas últimas décadas sendo amplamente utilizados compostos biológicos ativos e estão sendo considerados uma alternativa importante estratégia para o manejo sustentável de insetos-praga na agricultura, uma vez que são biodegradáveis e potencialmente adequados para a utilização em programas de gestão integrada (MAZID et al., 2011).

As plantas desenvolveram uma infinidade de diferentes defesas químicas cobrindo quase todas as classes de metabólitos (secundários) que representam uma grande barreira à herbívoros: alguns são constitutivos; outros são induzidos após o ataque. Os principais metabólitos são: glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, alcalóides e terpenóides, e além de outras macromoléculas inibidores de proteinase. Estes representam uma grande diversidade de estruturas com muitos usos potenciais, incluindo suas aplicações como pesticidas (ADEYEMI, 2010 e ISMAN et. al., 2011). Seus modos de ação incluem ruptura de membrana, inibição de nutrientes e transporte de íons, inibição de processos de transdução de sinal, inibição do metabolismo ou interrupção do controle hormonal de processos fisiológicos (MITHÖFER et al., 2012).

O crescimento e desenvolvimento pós-embriônico de insetos, incluindo a muda, são regulados através de várias vias ativadas por hormônios juvenis,

ecdisteróides ou neuropeptídios (HENRICH et al., 1998). O receptor de ecdisona (EcR) pertence à superfamília de receptores nucleares (NRs) que são fatores de transcrição dependentes de ligantes. O receptor de ecdisona está presente apenas em invertebrados e desempenha um papel central na regulação da expressão de uma vasta gama de genes durante o desenvolvimento e a reprodução a entidade funcional é um heterodímero composto por EcR e a proteína ultraspiráculo (USP) - o ortólogo do receptor X retinóide de vertebrados (RXR) (BILLAS e MORAS, 2005).

Nas últimas três décadas, inseticidas não esteroidais chamados dibenzolhidrazinas foram descobertos, sendo estes compostos desenvolvidos e comercializados ao longo dos anos, como a tebufenozida (RH-5992), halofenozida (RH-0345) e metoxifenozida (RH-2485). Essa classe de compostos químicos não esteroidais possuem atividade agonistas do receptor ecdisteróides e são específicos para Lepidoptera e Coleóptera (SOIN et al., 2009, SOIN et al., 2010 e SMAGGHAIE et al., 2012).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos: a estabelecer e otimizar um protocolo para avaliar a atividade agonista ou antagonista de moléculas sobre o receptor de ecdisteróides em células SF9 de Lepidoptera e S2 Diptera por meio de um sistema de triagem; a buscar novas moléculas e elucidar as interações ligante / receptor de ecdisteróides, a comparar a atividade hormônio 20 He e PonA nas células S2 e SF9 com plasmídeo repórter específico.

1. Revisão de Literatura

2.1 Inseticidas inibidores de crescimento e desenvolvimento de insetos

As pesquisas focadas no desenvolvimento de inseticidas durante as últimas quatro décadas aprofundaram a compreensão da fisiologia dos hormônios juvenis (JH), os estudos foram desenvolvidos em uma diversidade de espécies de insetos. Esse hormônio funciona no nível molecular e seu modo de ação permanece indefinido. A descoberta de novos inseticidas quimicamente que imitam a ação dos dois hormônios de crescimento e desenvolvimento de insetos, a 20-hidroxiecdisona (20 H) esteroidal e o hormônio juvenil sesquiterpenóide (JH) (DHADIALLA et al., 1998). Portanto, o hormônio juvenil é uma molécula necessária em determinados momentos no desenvolvimento de insetos no processo de muda e metamorfose, e em altas concentrações aplicadas em insetos via tópica torna-se tóxico (WILSON, 2004). Os compostos não-esteroidais de Dibenzoilhidrazinas que são agonistas do hormônio esteróide da muda de insetos e também referidos como agonistas de ecdisona (EAs), cinco compostos de dibenzoilhidrazinas são comercializados para o controle de larvas de lepidópteros e coleópteros. Destes, quatro compostos (metoxifenoziata, tebufenoziata, cromafenoziata e fufenoziata) são predominantemente tóxicos para as larvas de lepidópteros, enquanto o quinto composto, a halofenoziata, é ativo em larvas de lepidópteros e coleópteros (SMAGGHE et al., 2012). As benzoilureias constituem um importante grupo de pesticidas com atividade inseticida e atuam em sítios bioquímicos seletivos presentes em ordens de insetos específicos. Estes inseticidas atuam inibindo a síntese de quitina na cutícula do inseto (SWEVERS e SMAGGHE, 2016). Devido à sua baixa toxicidade para os mamíferos e à rápida degradação no solo, o seu desenvolvimento comercial e uso na prática agrícola aumentaram.

2.2 Receptores nucleares: classificação e distribuição

Em se tratando de um projeto que visa a prospecção e o planejamento de novos ligantes para receptores nucleares (NRs), torna-se de extrema importância uma descrição detalhada da organização, estrutura e função destas macromoléculas. Os receptores nucleares consistem em uma superfamília de fatores de transativação alostéricos dependentes da ligação de pequenas moléculas (GRONEMEYER et al., 2004; MORAS e GRONEMEYER, 1998). Os

NRs estão amplamente envolvidos no controle de diversos processos fisiológicos e representam alvos terapêuticos para um grande número de doenças humanas incluindo câncer, doenças do coração e distúrbios endócrinos e metabólicos. No genoma humano, 48 membros desta família foram identificados, que representam várias possibilidades para o desenvolvimento de novos medicamentos. Em contraste para invertebrados, apenas 21 receptores foram encontrados no genoma de *Drosophila* (MAGLICH et al., 2001) sendo responsáveis pela regulação de rotas cruciais no metabolismo, homeostase, crescimento e desenvolvimento.

Os NRs podem ser separados em sete grupos com base na estrutura e função (ARANDA e PASCUAL, 2001; LAUDET, 1997). Uma das maiores famílias, NR1, engloba os receptores dos hormônios da tireóide (TRs), receptores do ácido retinóico (RARs), receptores da vitamina D (VDRs), e receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPARs). A segunda família, NR2, engloba o receptor do retinóide X (RXRs) e o fator nuclear 4 do hepatócito (HNF4). Os receptores de hormônios esteróides em mamíferos, como o receptor de estrogênio (ER) e receptores de glicocorticoides (GR) pertencem a família NR3. O receptor de hormônio esteróides em insetos, o receptor de ecdisteróides (EcR), está no grupo NR1, com o descrito por Bonneton et al. (2008) (Fig. 1). Os RXRs podem atuar como parceiros heterodiméricos de muitos membros da família NR1, incluindo TRs, VDRs, PPARs, mas também com vários outros receptores órfãos, além do EcR. Na família NR1, além do EcR, estão incluídos o E75 e o E78 (STONE e THUMMEL, 1993). O gene E75 em *D. melanogaster* codifica três isoformas, E75A, E75B e E75C (SEGRAVES e HOGNESS, 1990). Este receptor pode atuar como repressor do receptor do hormônio 3 (HR3), que também pertence a NR1, provavelmente através de interação direta com o receptor (WHITE et al., 1997). Em *Drosophila*, a inativação do E75 provoca letalidade larval, entretanto mutações nulas específicas nas isomorfias revelam diferentes sub-funções para cada uma das três isoformas (BIALECKI et al., 2002).

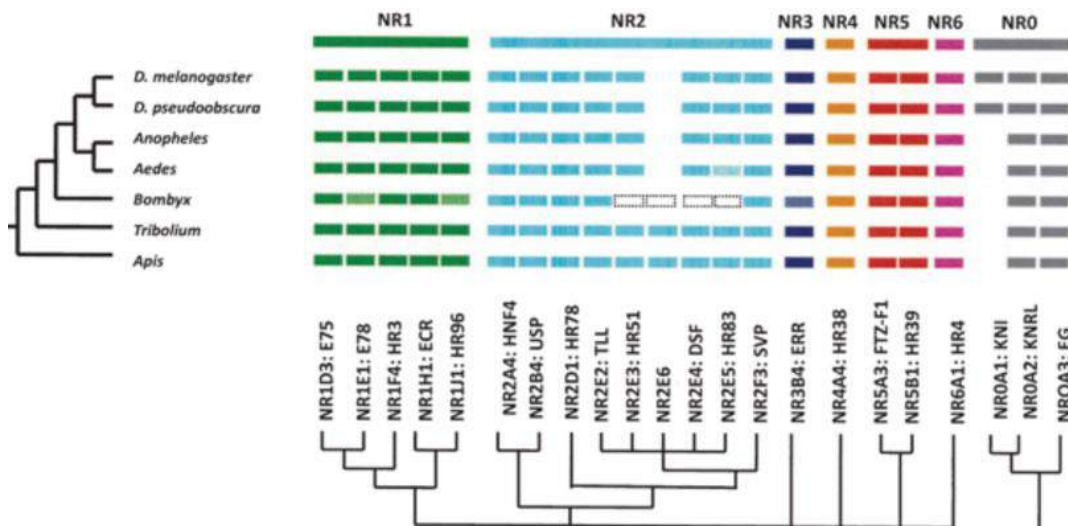


Figura 1: Classificação dos receptores nucleares em insetos holometabólicos (BONNETON et al., 2008). Para cada receptor, o quadro colorido indica sua presença/ausência no genoma em cada uma das sete espécies. A árvore do lado esquerdo indica a filogenia entre espécies, enquanto que a árvore na base indica as relações entre os receptores.

A grande maioria das proteínas do grupo NR2 são receptores órfãos (DE ROSNY et al., 2008). Os insetos possuem oito genes codantes para esta família tal com segue: HNF4, USP, HR78, seven up, tailless (TLL), HR83, DSF e HR51. O receptor HNF4 é considerado um dos mais conservados receptores nucleares entre artrópodes e vertebrados. A alta similaridade observada entre o domínio de ligação com o ligante (LBD) de vertebrados e artrópodes indica a possibilidade que haja interação com ligante em artrópodes de forma similar. Este receptor é necessário para a rota sinalizadora de ecdisteróides durante o início da metamorfose (FISK e THUMMEL, 1995). O receptor TLL está envolvido no desenvolvimento do cérebro e na segmentação do corpo. Este receptor é homólogo para os fotorreceptores de vertebrados (PNR) (KOBAYASHI et al., 1999), sendo que a função de ambos é conservada entre artrópodes e vertebrados (LAUDET e BONNETON, 2005).

O grupo NR3 compreende os receptores de hormônios sexuais e suprarrenais como o estrogênio, androgênio, progesterona, glicocorticoides e mineral corticoides. Em artrópodes existe o receptor órfão ERR, homólogo ao receptor de estrogênio de vertebrados (OSTBERG et al., 2003). A proteína HR38, pertence ao grupo NR4, possui a característica de ligar-se ao DNA como monômero, ou através de interação com o receptor USP, competindo com a heterodimerização entre USP/EcR. Apesar disso, diferentemente do complexo

USP/EcR, o receptor HR38 não é diretamente regulado pelo hormônio ecdisônio (hormônio que controla muda, metamorfose e outras funções em artrópodes), tal como ocorre com USP e EcR, mas participa na rota do ecdisônio como um parceiro alternativo para o USP. A família NR5 inclui a proteína FTZ-F1 e HR39 que estão envolvidos na cascata de respostas orquestradas pelo ecdisônio (HORNBERGER et al., 1995). Similarmente HR4 pertence à família NR6 sendo que sua expressão está diretamente ligada aos níveis de ecdisônio (CHEN et al., 2002). Uma pequena subfamília de receptores NR0 constitui um grupo de proteínas relacionada como os receptores nucleares que possuem DBD (domínio de ligação com o DNA) mas o LBD (domínio de ligação com o ligante) está ausente (BERTRAND et al., 2004).

2.3 Estrutura geral dos receptores nucleares

Todos os membros desta superfamília são proteínas modulares organizados em domínios. Cada domínio desempenha uma função específica apesar de algumas vezes interagirem entre si para desempenhar determinada função biológica. Os NRs possuem domínios de modulação designados como A/B, C, D, E e F (ESCRIVA et al., 2004). O domínio A/B, amino-terminal, é variável sendo que em muitos NRs possui função AF-1 (Activation Function 1) que promove a ativação da transcrição na ausência de ligantes (NAKAGAWA e HENRICH, 2009). O domínio C (cerca de 70 a 80 aminoácidos), também conhecido como DBD (DNA-binding domain), é a parte mais conservada entre os NRs, sendo caracterizado pelos resíduos de cistinas que estabilizam os dois dedos de zinco, cruciais para ligação com o DNA (MARKOV et al., 2010). A primeira α -hélice se liga ao sulco principal do DNA, fazendo contatos com bases específicas, e a segunda α -hélice forma um ângulo reto com a hélice de reconhecimento (SCHWABE et al., 1993). O DBD tem como alvo algumas sequências específicas de DNA, denominadas ERHs (hormone response elements) para o caso do EcR (VOGTLI et al., 1998). O domínio E, (cerca de 250 aminoácidos) possui o sítio de ligação com o ligante, também conhecido como LBD (Ligand-Binding Domain), permitindo que os NRs desempenhem a função de regulação/transativação. Este domínio possui a sequência de aminoácidos moderadamente conservada entre os membros da família, sendo responsável pela ligação do receptor ao hormônio, ativação da transcrição AF-2

(Activation Function 2) dependente da ligação do hormônio, além de responsável direto pelo homo/heterodimerização entre receptores.

O terminal COOH (AF-2) permite o acoplamento de co-ativadores e/ou co-repressores, essenciais para ativação ou repressão de genes. O domínio E é também essencial para associação dos receptores de esteróides com proteínas de choque térmico (HSPs, Heat Shock Proteins), além de fazer a mediação da interface de dimerização e interações com outras categorias de proteínas. Entre os domínios C e E, há uma região (domínio D) conhecida como hinge, ou dobradiça, a qual é pouco conservada, e está associada com a localização nuclear do receptor e associação com co-repressores (MIYAMOTO et al., 2001). O domínio E é conhecido como o domínio de ligação ao ligante, LBD (Ligand-Binding Domain). Esse domínio é uma característica muito particular dos receptores nucleares e vem sendo massivamente explorado para o desenvolvimento de fármacos e pesticidas, pela indústria farmacêutica e de agroquímicos. Este domínio ainda desempenha a função de dimerização, reconhecimento do ligante e interações com cofatores. A estrutura tridimensional (3D) de um LBD foi analisada pela primeira vez para RAR (RENAUD et al. 1995) e RXR (BOURGUET et al., 1995). A estrutura dos receptores nucleares tem indicado que o LBD é formado por 10 a 12 α -hélices numeradas da hélice 1 (H1) para a hélice 12 (H12) sendo que existe uma folha- β entre H5 e H6. As hélices são arranjadas em forma de sandwich e antiparalelas. A região central, com três hélices, está envolvida por outros dois formando um bolsão hidrofóbico (pocket) que ancora ligantes naturais e outras moléculas que podem ser fármacos ou pesticidas, dependendo do objetivo.

Em artrópodes, o complexo heterodimérico EcR-USP (domínios E) compreende os únicos receptores nucleares que possuem as estruturas resolvidas experimentalmente. Este complexo é ativado pela ligação do hormônio 20-hidroxiecdisonio (20 H, sinal endocrinológico crítico que inicia os processos de troca do exoesqueleto, e metamorfose em artrópodes) e regula a expressão de fatores de transativação, conhecidos como genes precoces, e genes tardios. Estes fatores são responsáveis pela expressão de outros genes, na maioria enzimas de conversão e proteínas de transporte para todos os componentes da quitina (principal componente do exoesqueleto de artrópodes), ou na degradação do exoesqueleto, neste caso as enzimas quitinases. Enquanto

que os genes precoces são ativados pelo complexo 20H-EcR/USP, os genes tardios são reprimidos.

A estrutura do cristal foi resolvida para o lepidóptero *Heliothis virescens* (HvEcR) (BILLAS et al., 2009), *Tribolium castaneum*, (TcEcR) (IWEMA et al. 2007) e *Bemisia tabaci* (BtEcR) (CARMICHAEL et al., 2005). Para estas estruturas o bolsão de ligação do ligante apresenta arquitetura em J (J-shaped) que se estende da hélice H12 para hélice H5 e folha- β , estando completamente no interior do receptor (Figura 1). Em *Bemisia tabaci* (inseto transmissor de viroses para plantas), a região de ligação com o ligante ocupa a maior parte do bolsão de ligação (CARMICHAEL et al., 2005). Ainda, para BtEcR, um pequeno bolso em forma de curva (o bolso auxiliar) pode ser observado na região entre as hélices H1 e H8. A razão para a existência deste bolso auxiliar não é clara.

A ligação do hormônio natural 20H para EcRs segue um padrão canônico em todos os EcRs sequenciados, resolvidos experimentalmente ou modelados. Da mesma forma os resíduos que interagem com ligantes são muito conservados, fornecendo assim pontos de ancoragem precisos que podem ser utilizados no desenho racional de novos ligantes, e talvez com afinidade maior que os ligantes naturais pela adição de pontos de ancoragem adicionais com base nas restrições estruturais do receptor alvo.

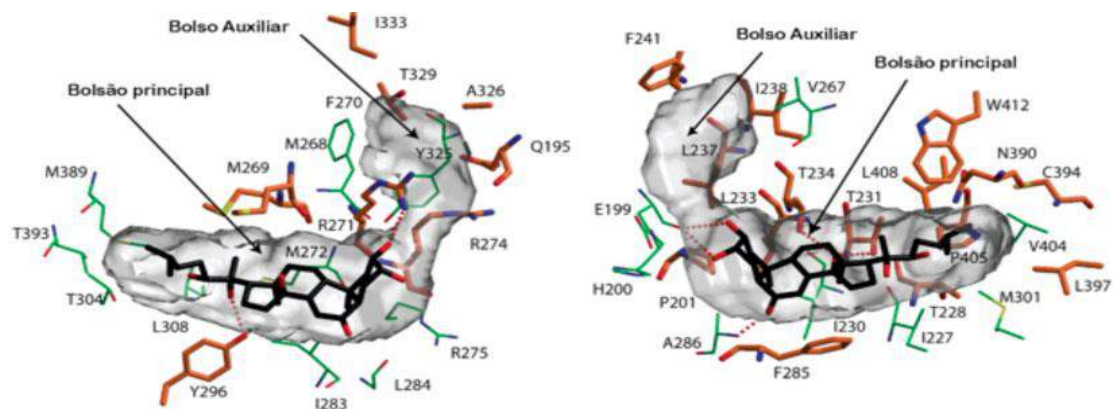


Figura 2: Visão geral do bolsão de ligação (principal e auxiliar). Os resíduos altamente conservados em todas as espécies de artrópodes com este receptor sequenciado, estão coloridos em laranja, ou caso contrário em verde. O fitoecdisteróides PonA ancorado no bolsão principal está representado com átomos de carbono em preto, átomos de oxigênio em vermelho. As linhas pontilhadas vermelhas indicam pontes de hidrogênio Fonte: Machado (2019).

2.4 Planejamento racional de inseticidas: foco em receptores nucleares

Poucas áreas da entomologia têm avançado tão rápido ou recebido tanta atenção nos últimos anos, como a exploração do genoma de insetos e ácaros, e posterior utilização no desenvolvimento de estratégias biotecnológicas de controle. Com o advento da era genômica iniciado com o sequenciamento do genoma de *Drosophila* no ano de 2000, houve uma mudança no foco de experimentos tradicionais, para uma investigação “mecanística” das bases genético-moleculares de processos fisiológicos e comportamentais que ocorrem em insetos, unindo não somente cientistas clássicos, mas outros com diferentes expertises, dando mais conteúdo e significância para as pesquisas. Essa investigação, fundada em mecanismos genético-moleculares tem fornecido inovações não somente visando o controle de insetos-praga, mas também tem contribuído para o avanço da pesquisa fundamental em genética, bioquímica e fisiologia de insetos.

Neste contexto, ainda estão inseridos os problemas associados com os clássicos inseticidas neurotóxicos (resistência de insetos para inseticidas e problemas ambientais) que tem encorajado o desenvolvimento de produtos mais específicos dentro de uma filosofia de planejamento racional, levando em conta características dos alvos bioquímicos. Esta estratégia visa a exploração de diferenças sutis na capacidade de agonistas para se ligarem em “pockets” de receptores nucleares bem como em sítios alostéricos. A exploração de diferenças intrínsecas de cada receptor visa a especificidade da molécula planejada (SWEVERS e SMAGGHE, 2016). Este procedimento direcionado exclusivamente para um único alvo em específico, tal como um receptor nuclear, tem contribuído para o desenvolvimento de procedimentos de triagem de alto desempenho (HTS, High-Throughput Screening). O sucesso desta estratégia é demonstrado pelos vários inseticidas reguladores de crescimento que interferem a regulação endócrina do crescimento, desenvolvimento e reprodução (tebufenozide, metoxyfenozide), hormônio juvenil (metorpeno, fenozycarbe) e os inibidores de síntese de quitina (benzoyfenilureias). Ainda, surgiram outros que atuam especificamente no sistema nervoso, metabolismo de energia (pyridalyl) e nos músculos (neonicotinoides, espinosinas, avermectinas) (HILL et al., 2012).

Devido a necessidade de se testar muitos compostos/moléculas, em todo programa de planejamento racional de fármacos/inseticidas existe um crescente interesse para o desenvolvimento de métodos “in vitro” para substituir os testes de toxicidade em todo o organismo (ZOTTI et al., 2013b). Ainda se busca um sistema que permita testes rápidos para os compostos candidatos, formulações e produtos finais. Considerando o enorme inventário de produtos naturais e sintéticos potencialmente úteis para os programas de manejo de insetos-praga, o sistema ideal seria a tecnologia HTS. Esse sistema é largamente utilizado no setor privado em programas para desenvolvimento de novas drogas em que milhares de compostos são triados para uma determinada atividade biológica. Desta forma, o estabelecimento de uma cultura de células em conjunto com um sistema de HTS para receptores nucleares, sem dúvida, contribuiriam para acelerar o processo de busca e otimização de novos agentes de controle.

Um sistema de screening em células foi recentemente adaptado para o formato HTS para o receptor de ecdisteróides, um receptor nuclear presente em artrópodes. Este sistema foi construído mediante a utilização do gene da luciferase como gene-repórter, um promotor basal e a sequência poli-A (ZOTTI et al., 2013a). Ainda foi adicionado a esse plasmídeo repórter sete cópias da sequência conhecida como EcRE (elemento resposta do ecdisônio), sendo que esta interage com o receptor nuclear EcR em virtualmente todos os artrópodes. Assim, devidamente ao fato de que todos os EcR de artrópodes são capazes de interagirem com o mesmo EcRE, tudo que é necessário para o desenvolvimento de um sistema de screening em células tendo como alvo o receptor nuclear EcR, é, portanto, uma cultura de célula estabelecida que pode ser transfectada com este plasmídeo repórter. Culturas celulares transfectadas de diferentes espécies, assim correspondem, à um diferente sistema de screening específico para uma ordem em particular ou espécie (SWEVERIS et al., 2004).

Em projetos desta natureza uma vez identificada a proteína de interesse, no caso um receptor nuclear crucial para determinado processo fisiológico, utiliza-se técnicas de bioinformática para construir um modelo 3D, identificar cavidades internas, ou na superfície, onde ligantes poderão ser sintetizados de novo contendo as restrições geométricas e estruturais específicas daquela cavidade. Na existência da estrutura determinada

experimentalmente, ainda estas técnicas podem ser utilizadas para desenho de novos agonistas\antagonistas ou ainda para entender o mecanismo de interação proteína-ligante, flexibilidade das proteínas, e com isso otimizar e racionalizar novos e mais potentes moléculas antes mesmo da síntese orgânica, economizando tempo e recursos. No caso de moléculas bioprospectadas, uma vez identificado o receptor nuclear alvo, sistemas de screening baseados em células podem ser desenvolvidos, utilizando-se a tecnologia do gene repórter, com detecção da atividade/potência em leitores de placa facilmente adaptada para testes de alto rendimento (high-throughput screening) (ZOTTI et al., 2013a).

A medida que outros receptores nucleares forem identificados em artrópodes, torna-se mais fácil identificar ou desenhar novos ligantes. Em uma análise com RNAi (mecanismo de silenciamento gênico) em *T. casteanum*, Tan e Palli (2008), demonstraram que 10 dos 19 (E75, HR3, HR4, EcR, USP, FTZ-F1, HR51, SVP, HR38, HR39) receptores nucleares são importantes para a metamorfose. Desta forma, aqueles com fenótipo letal poderão ser usados como candidatos para novos inseticidas, pois os ligantes reconhecidos por receptores em artrópodes são provavelmente diferentes dos ligantes reconhecidos pelos receptores homólogos em mamíferos (SMAGGHE et al., 2012).

Uma vez os receptores nucleares usualmente constituem de fatores de ativação dependentes de ligação com ligantes, o desenvolvimento de sistemas repórteres são atrativos, como demonstrado para EcR. Para esta estratégia um repórter basal é planejado contendo região de ligação idêntica ao receptor nuclear em estudo (para receptores nativos) ou para ativador Gal4 (para fusão com Gal4 do domínio de ligação com o DNA) (SWEVERS et al., 2002).

Além do grande potencial para novos agentes de controle focados em receptores nucleares, a disponibilidade de genomas de artrópodes fornece inúmeras possibilidades para que outros agentes sejam desenvolvidos. Em se tratando de agentes de controle, os artrópodes podem ser considerados como 'caixas pretas' com inúmeros alvos que podem ser explorados para o planejamento de estratégias de controle. Estes agentes podem ser pequenas moléculas bioprospectadas do ambiente que atuem em receptores nucleares como agonistas/antagonistas/inibidores. A plataforma criada entre prospecção de biomoléculas/genômica/bioinformática/planejamento assistido pelo computador fornece, sem dúvida, inúmeras possibilidades para o surgimento de

mecanismos de ação inovadores e na elaboração de estratégias aprimoradas, únicas e específicas para artrópodes praga.

Artigo- Revista Neotropical Entomology

**Seleção de compostos com base na ativação dos receptores
ecdisteroides em linhagens celular Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9)**

MACHADO, Maicon. Roberto. Ribeiro.; GUIDOTI, Ciro. Pedro. LENARDÃO,
Eder. João.; PENTEADO, Filipe.; ZOTTI, Moises. João

3. Artigo 1- ¹ Seleção de compostos com base na ativação dos receptores ecdisteroides em linhagens celular Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9)

²MACHADO, M. R. R.; ²GUIDOTI, C. P. ³LENARDÃO, E. J.; ³PENTEADO, F.;

²ZOTTI, M. J.¹

Resumo: Neste estudo, 23 compostos organocalcogênicos análogos de dibenzoilhidrazinas foram testados em sistema de triagem. Quatorze compostos apresentaram citotoxicidade nas concentrações micro molar testadas, com viabilidade celular inferior a 80%, e foram descartados. Nove compostos apresentaram viabilidade celular de no mínimo 80% pelo menos em uma das três concentrações micro molar testadas e após os resultados obtidos foram encaminhadas para sistema de triagem em células baseado na ativação do receptor ecdisteróides. Neste estudo, um sistema de triagem foi otimizado em linhagens de células embrionárias da ordem Lepidoptera (SF9) e Diptera (S2), estas linhagens celulares foram transfectadas e adicionados plasmídeo repórter específico. Os nove compostos testados não apresentaram atividade agonistas nas duas linhagens de células de Díptera e Lepidóptera. Dois compostos nomeados de DAF-2 e DAF-4 apresentaram antagonismo, em células S2 a molécula DAF-2 inibiu a luminescência do ECR-USP em 29,91%, e molécula DAF-4 inibiu a luminescência do receptor nuclear expressivamente, em 51 a 55% em comparação ao 20- Hidroxiecdisônio (controle). Em células SF9 DAF- 2 inibiu a luminescência do ECR-USP em 19,62 %, e a DAF-4 inibiu a luminescência do receptor em 35,14 % em comparação ao 20- Hidroxiecdisônio (controle). A análise *in silico*, do receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster* para o composto DAF-2 mostram a inibição da atividade dos aminoácidos THR467 e MET- 508 e o composto DAF-4 inibição dos aminoácidos ARG-511. Para o receptor de ecdisteróides *Heliothis virescens* para composto DAF-2 inibição da atividade dos aminoácidos THR-343 e ARG-387 e o composto DAF-4 inibição dos aminoácidos ASN-504 e ARG-387.

Palavras chave: Dibenzolhidrazinas; Plasmídeo repórter, Biotecnologia celular, 20-Hidroxiecdisônio; Ponasterona-A; Bioprospecção de novos compostos

¹ Artigo a ser submetido a Revista Neotropical Entomology.²Universidade Federal de Pelotas, ²Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: maiconmachado30@hotmail.com; ³Departamento de Química Orgânica Universidade Federal de Pelotas.

ABSTRACT: In this study, 23 organocalcogenic analogues of dibenzoylhydrazines compounds were tested in a screening system. Fourteen compounds exhibited cytotoxicity at the micro molar concentrations tested, resulting in cell viability lower than 80%, and were discarded. Nine compounds showed cell viability of at least 80% in at least one of the three micro molar concentrations tested and the compounds were tested in the cell screening system based on ecdysteroid receptor activation. In this study, a screening system was optimized in Lepidoptera (SF9) and Diptera (S2) embryonic cell lines. These cell lines were transfected, and specific reporter plasmids were added. The nine compounds tested did not present agonist activity in the two cell lines of Diptera and Lepidoptera. Two compounds named DAF-2 and DAF-4 showed antagonism, in S2 cells the DAF-2 molecule inhibited the ECR-USP luminescence in 29.91%, and DAF-4 molecule significantly inhibited the nuclear receptor luminescence in 51 to 55% compared to 20-Hydroxyecysonium (control). In SF9 DAF-2 cells inhibited ECR-USP luminescence in 19.62%, and DAF-4 inhibited the receptor luminescence by 35.14% compared to 20-Hydroxyecysonium (control). The *in silico* analysis of the *Drosophila melanogaster* receptor for the compound DAF-2 shows the inhibition of the activity of the amino acids THR467 and MET-508 and the compound DAF-4 inhibition of the amino acids ARG-511. For the *Heliothis virescens* receptor for dendritic compounds DAF-2 showed inhibition of the activity of amino acids THR-343 and ARG-387 and the compound DAF-4 inhibition of amino acids ASN-504 and ARG-387.

Keywords: Dibenzoylhydrazines; Reporter Plasmid, Cell Biotechnology, 20-Hydroxyecysonium; Ponasterone-A; Bioprospection of new compounds.

3.1 Introdução

O processo de crescimento e reprodução de insetos são regulados pela combinação de vários hormônios que pertencem a diversas classes químicas distintas. Os principais hormônios que desencadeiam os processos químicos são os esteroides, terpenóides e peptídeos (NIJHOUT e EMLLEN, 1998) O hormônio endócrino 20 hidroxí ecdisônio (20 He) e o hormônio juvenil regulam o processo de muda e metamorfose dos artrópodes. O receptor hormonal é formado pelo receptor ecdisteróide (ECR) e o ultra-espiráculo, que juntos formam um heterodímero do receptor nuclear, receptor de ecdisona (EcR, NR1H1) e Ultraspiraculo (USP, NR2B4) (KOELLE 1991, YAO et al., 1993).

Os receptores nucleares funcionam como fatores de transcrição ativados por ligantes que regulam a expressão de genes-alvo responsivos pelos processos de desenvolvimento, reprodução em insetos (MANGELSDORF et al., 1995). Os hormônios ecdisteróide e juvenil (JH) exercem uma importante função

regulatória ao iniciar e desencadear esses processos de muda e metamorfose. O hormônio juvenil (JH) é distinto devido à sua estrutura única e à diversidade de seus efeitos no desenvolvimento e reprodução de insetos (WYATT et al., 1996). O receptor de hormônio nuclear de insetos não está presente em mamíferos (YAO et al., 1992), e, portanto, representa um alvo lógico para o desenvolvimento de inseticidas. Essa observação levou ao desenvolvimento de vários compostos como: As dibenzoilhidrazinas que foram desenvolvidas e comercializadas ao longo dos anos, como a tebufenozida (RH-5992), halofenozida (RH-0345) e metoxifenozida (RH-2485). Sua atividade é baseada na ligação do receptor EcR e induz ao processo de muda dos insetos em crescimento, sendo letal em fases larvais e interfere a reprodução em adultos (DHADIALLA et al., 1998, SMAGGHE et al., 2012). Conseqüentemente, estes inseticidas são normalmente incluídos em programas de Manejo de Pragas (MIP) e são utilizados em diferentes pragas e culturas.

O sistema de triagem virtual é uma ferramenta que busca novos compostos agonistas do receptor ecdisteróides, através da utilização de parâmetros computacionais que compara as diferenças de uma molécula em inibir os aminoácidos do receptor nuclear através da análise “in silico” (HARADA et al., 2011). A exploração de diferenças intrínsecas de cada receptor visa a especificidade da molécula planejada (SMAGGHE et al., 2012). Este procedimento direcionado exclusivamente para um único alvo em específico, tal como um receptor nuclear, tem contribuído para o desenvolvimento de procedimentos de triagem de alto desempenho (HTS, High-Throughput Screening (SWEVERS e SMAGGHE, 2016). Desta forma, uma das vantagens da triagem de compostos em cultura celular é de que a célula secreta de forma endógena todos os componentes necessários para o funcionamento do organismo (ZOTTI et al., 2013b). A triagem de compostos é uma ferramenta de alto desempenho para a busca de novos compostos a partir da síntese orgânica e triagem computacional, servindo de modelo para o desenvolvimento racional de pesticidas para as indústrias agroquímicas, tornando-se uma ferramenta necessária para a busca de moléculas seletivas para o controle de insetos pragas (SWEVERS et al., 2004, SOIN et al., 2010, SMAGGHE et al., 2012).

3.2. Material e Métodos

3.2.1 Compostos Químicos

Foram testadas Nove moléculas de organocalcogênicos no sistema de triagem (estruturalmente semelhantes a dibenzoilhidrazinas com ~95% de pureza), estes compostos apresentaram viabilidade celular superior a 80% e foram testadas no sistema de triagem. Cinco moléculas foram sintetizadas e purificadas no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LabSOL) da Universidade Federal de Pelotas. Duas moléculas foram recebidas da UNIWESYTET W BIALYMSTOKU País Polônia e foram sintetizadas e purificadas com ~95% pelo Dra. Isabella. Duas moléculas foram recebidas da Universidade de Buenos Aires e foram nomeadas de DAF-2 e DAF-4. e foram sintetizadas e purificadas com ~95% pelo Dr. Gerardo Burton. Os hormônios ecdisteróides Ponasterona-A (>65% de pureza) e 20-Hidroxiectdisônio (~95% de pureza) foram comprados da Sigma Aldrich (Bornem, Bélgica). Na Figura 1 constam as estruturas químicas ordenadas, as quais foram utilizadas nos ensaios. As moléculas foram diluídas em concentrações molares conforme seu peso molecular em álcool etílico absoluto ou Dimetilsulfóxido (DMSO) (Tabela 1). A diluição inicial foi realizada na concentração molar de 10^3 , sendo que diluições em série foram realizadas para reduzir as concentrações, formando um espectro, principalmente nos hormônios, os quais foram necessárias diversas concentrações para confecção de curvas dose-resposta.

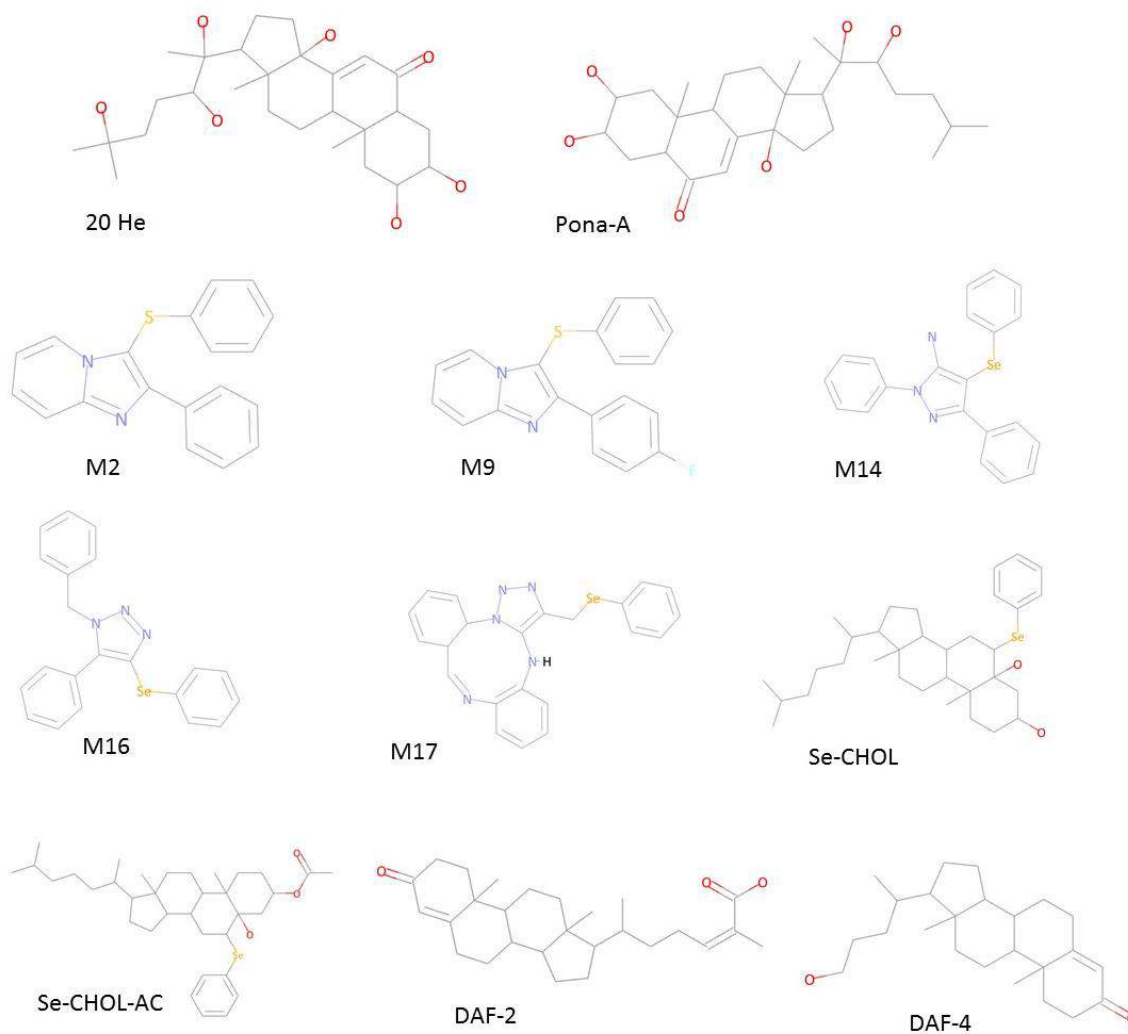


Figura 2: Compostos esteroidais e não esteroidais utilizados na triagem em células de Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9). Fonte: Machado (2019).

Tabela 1: Identificação das moléculas utilizadas no estudo conforme suas fórmulas químicas (F.Q.), nome químico, peso molecular (P.M.), pureza inicial (P.I.) e solvente utilizado para as diluições.

Moléc	F.Q ¹	Nome Químico	M.M. ² (g.mol)	P.I.	Solvente
*20 H	C27 H44 O7	2 A,3 A,14 A,20 A,22,25-Hexahydroxy-7-cholesten-6-one	480,648621	95	Ácool ⁶
*PonA	C27 H44 O6	Cholest-7-en-6-one,2,3,14,20,22-pentahydroxy-, (2b,3b,5b,22R)	464.643000	>65	Ácool ⁶
M1	C11 H18 S1	2-methyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine	240,00	95	DMSO ⁷
*M2	C18 H27 S1	2-phenyl-3-(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine	302,00	95	DMSO
M3	C17 H28 N2 Se1	2-phenyl-3-(phenylselanyl)imidazo[1,2-a]pyridine	350,00	95	DMSO
M4	C19 H28 N2 Se1	3-(phenylselanyl)-2-(p-tolyl)imidazo[1,2-a]pyridine	364,00	95	DMSO
M5	C20 H32 N2 S1	2-(4-methoxyphenyl)-3-(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine	332,00	95	DMSO
M6	C19 H30 N1 S1 Br1	3-((4-bromophenyl)thio)-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine	380,00	95	DMSO
M7	C18 H30 Se1 Cl1	3-((4-chlorophenyl)selanyl)-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine	384,00	95	DMSO
M8	C18 H38 N 2 Se1	2-phenyl-3-(p-tolylselanyl)imidazo[1,2-a]pyridine	364,00	95	DMSO
*M9	C20 H38 N2 S1 F1	2-(4-fluorophenyl)-3-(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine	320,00	95	DMSO
M10	C18 H29 N2 S1 Br1	2-(4-bromophenyl)-3-(phenylthio)imidazo[1,2-a]pyridine	380,00	95	DMSO
M11	C20 H40 O1 N2	3-((4-methoxyphenyl)selanyl)-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine	380,00	95	DMSO
M12	C19 H40 O1 N2	2-(4-methoxyphenyl)-3-(phenylselanyl)imidazo[1,2-a]pyridine	380,00	95	DMSO
M13	C17 H24 N2 S1	3-(butylthio)-2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine	282,00	95	DMSO
*M14	C21 H42 N3 Se1	1,3-diphenyl-4-(phenylselanyl)-1H-pyrazol-5-amine	391,00	95	DMSO
M15	C16 H34 N2 Se1	3,5-dimethyl-1-phenyl-4-(phenylselanyl)-1H-pyrazole	328,00	95	DMSO
*M16	C21 H38 N3 Se1	1-benzyl-5-phenyl-4-(phenylselanyl)-1H-1,2,3-triazole	391,00	95	DMSO
*M17	C22 H44 N5 S1 N5	(Z)-1-((phenylselanyl)methyl)-15H-dibenzo[d,h][1,2,3]triazolo[1,5-	431,00	95	DMSO
M18	C22H44 N5 Se1 F1	(Z)-1-(((4-fluorophenyl)selanyl)methyl)-15H-	449,00	95	DMSO
M19	C20 H41 N5 S1	(Z)-1-((phenylthio)methyl)-15H-dibenzo[d,h][1,2,3]triazolo[1,5-	383,00	95	DMSO
*DAF-2	C22 H38 O3	3β-(t-Butyldimethylsilyloxy)-5-cholenic acid methyl ester	417,00	95	DMSO
*DAF-4	C21 H36 O2	3β-(t-Butyldimethylsilyloxy)-5,24-cholestadien-27-oic acid ethyl	360,00	95	DMSO
*SE-CHOL	C26 H33 O2 Se1	(5R,6R,10R,13R)-10,13-dimethyl-17-(6-methylheptan-2-yl)-6-	559,00	95	DMSO
*SE-CHOL-AC	C30H31O3 Se1	5R,6R,10R,13R)-5-hydroxy-10,13-dimethyl-17-(6-methylheptan-	601,00	95	DMSO

¹Fórmula química, ² Massa Molar, ³Pureza inicial (%), ⁴20-Hidroxiectdisônio, ⁵Ponasterona-A, ⁶Etanol Absoluto (100%), ⁷Dimetilsulfóxido

*Moléculas que foram testadas no sistema de triagem de cultura celular S2 e SF9, viabilidade celular maior ou igual a 80%.

3.2.2. Linhagens Celulares

As culturas celulares foram doadas pelo Departamento de Fitossanidade da Universidade de Ghent (Bélgica), Dr, Guy Smagghe. A coleção está estabelecida no Departamento de Fitossanidade da Universidade de Pelotas (Brasil), no laboratório de Entomologia Molecular (Lab. ENTOMOL-UFPel). As Células SF9 provenientes de células embrionárias de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) foram mantidas a 27°C em meio de cultura celular InsectXpress™2 (LONZA®) em frascos de meio de cultura tipo garrafa com tampa de filtro vent (KASVI®) de 25cm² e 75cm². Já as células S2, provenientes de células embrionárias de *D. melanogaster*, foram mantidas em incubadora a 27°C, em meio de cultura InsectXpress™2 (LONZA®) em frascos tipo garrafa com tampa de filtro vent (KASVI®) de 25cm² e 75 cm².

3.2.3. Ensaio de Citotoxicidade

Para determinar a citotoxicidade dos compostos, foram realizados ensaios de citotoxicidade, utilizando a câmara de Neubauer também conhecido como hemocítômetro. As concentrações de células S2, SF9 para montar ensaio de citotoxicidade eram de S2 500.000 células/ ml e SF9 300.000 células/ ml. As células foram acondicionadas em placas de 24 poços de cultivo celular (KASVI®).

A viabilidade foi mensurada com o corante Tryplan Blue solução 0,4 % (Sigma Aldrich), reagente o qual é capaz de penetrar na membrana celular caso estas estejam mortas, conferindo uma coloração azul escuro às mesmas. A contagem celular e a deposição das células nos poços, 1 e 1,5 µl, para S2 e SF9, respectivamente, das moléculas diluídas em álcool absoluto ou DMSO foram adicionadas nos respectivos poços e incubadas por 24 horas à 27°. Em cada linhagem celular, o efeito citotóxico das novas moléculas foi testado em tratamentos padrão, os quais são as concentrações de 1µM, 10µM e 100µM.

Cada tratamento foi realizado em triplicata, sendo que cada experimento foi reproduzido pelo menos 2 a 3 vezes. A análise estatística foi realizada pelo teste t, com comparação múltipla das médias das moléculas com a média do

controle, dentro de cada grupo (concentração). Os dados foram analisados com o software Prism v5 (GraphPad Software Inc. La Jolla, Ca).

3.2.4. Transfecção Celular

Os compostos foram testados quanto à sua capacidade de ativar a transcrição de um gene repórter de luciferase indutível por ecdisteróides em células S2 ou SF9 que são responsivas ao receptor ecdisteróide. Antes da exposição, as células foram transfectadas com o plasmídeo repórter utilizando reagente Escort™ IV (Sigma Aldrich). A formulação deste reagente foi constituída por um lipídeo policatiônico exclusivo e um lipídio neutro não transfectado. Este composto de formação de lipossomas é utilizado para transfecção de ácidos nucleicos numa grande variedade de tipos de células eucarióticas. De acordo com as instruções do fabricante (Sigma Aldrich) e como descrito. Resumidamente, o protocolo de transfecção é descrito: Utiliza-se uma placa de cultivo de células de fundo chato de 6 poços com área de crescimento celular de 9,60 cm². Um poço foi preenchido com 3.000000 de células S2 ou 2.000000 células SF9. As células ficaram em repouso por 30 minutos para aderirem no fundo do poço. Escort™ IV foi incubado com a solução contendo o plasmídeo repórter ERE-b.act.luc durante 45 min em meio de cultura. O construtor repórter ERE-b.act.luc é composto de sete cópias do elemento de resposta ao ecdisona (ERE) derivado do promotor de hsp27 de *Drosophila*, um promotor de actina basal derivado de *Spodoptera* (b.act), seguido do gene repórter para a luciferase do pirilampo (luc) e um sinal de terminação. As células foram incubadas a 27 ° C por 16 h, após este período o meio de transfecção foi removido e substituído por meio de cultura normal.

3.2.5. Bioensaios para agonistas e antagonistas do receptor ecdisteróides e a capacidade de resposta ao ECR-USP

As células transfectadas foram tratadas com ecdisteróides, ou os compostos organocalcogênicos, em concentrações molares de acordo com o tratamento. Após a remoção do meio de transfecção e substituição por meio normal, 1µl da molécula diluída em álcool ou DMSO para S2 e 1,5µl para SF9 foi

adicionado ao poço. Os dados para agonista/antagonista foram mensurados em forma numérica de luminescência emitida pela enzima luciferase frente à adição do substrato Luciferin. Quanto maior for a ativação do receptor de ecdisteróides, maior a luminescência. Para montagem do ensaio repórter, utilizou-se uma solução com uma densidade de 50.000 células / ml foi preparada com células de díptera (S2), e 30.0000 células / ml para as células da Ordem lepidóptera (SF9). Obteve-se, uma da solução contendo 10 ml composta com células transfectadas foi preparada para montagem dos bioensaios. Foi adicionado 100 µl da solução em cada poço com uma micropipeta em uma placa de micro titulação de 96 poços branca (Thermo Scientific, Roskilde, DN, Dinamarca).

Para as curvas de dose resposta e experimentos de atividade agonista, a luminescência foi mensurada 24 horas após a adição dos tratamentos (moléculas). Para atividade antagonista, primeiramente foi adicionado 1µl e 1,5µl, para S2 e SF9, respectivamente, das novas moléculas, na concentração de 100µM e incubado por 24h a 27°C. Após a primeira incubação, foi adicionado o hormônio 20-Hidroxiectdisônio e a Ponasterona-A (controle) na concentração de 100µM e incubado novamente, desta vez por 24 horas a 27°C. Após os correspondentes períodos de incubação, com uma micropipeta as células foram transferidas para uma placa de 96 poços, sendo que cada poço recebeu 100 µl da suspensão de células. Para mensurar a expressão da luciferase, foi utilizado o substrato de luciferase Steady-Glo luciferase assay system kit (Promega, Leiden, Holanda). Foi adicionado à placa de 96 poços com as células, 100 µl do substrato de luciferase. O mensuramento foi realizado com o luminômetro SpectraMax M5e, (Molecular Devices, USA). (UFPEI). Cada tratamento foi realizado em triplicata técnica, sendo que cada experimento foi realizado pelo menos 2 vezes. Respectivas EC50 (valores de concentração efetiva mediana de indução de 50% de luminescência) com 95% de confiabilidade foram calculados com o software Prism v4 (GraphPad Software Inc. La Jolla, Ca), a precisão dos dados da curva sigmoide foi avaliada com base nos valores R2. Os dados de efeito agonista foram calculados pelo teste t a 5% de confiabilidade, tendo como controle positivo 20-Hidroxiectdisônio, na concentração de 100µM. Já para efeito antagonista, foram consideradas moléculas eficientes aquelas que reduziram em

>15% a luminescência quando comparado ao controle positivo com 20-Hidroxiccdisônio ou Ponasterona-A.

3.2.6. Modelagem tridimensional (3D) dos receptores nucleares de díptera (DRLBDs) de Lepidoptera (EcRLBDs)

No presente trabalho foi investigado 9 compostos organocalcogênicos estruturalmente semelhantes às Dibenzoilhidrazinas e os hormônios 20-Hidroxiccdisonio em receptores de ecdisteróides de díptera e de lepidóptera (Figura 2). Para confirmar a habilidade destas moléculas na ativação ou bloqueio do receptor do ecdisônio, como já citado, foram utilizados uma linhagem celular de lepidoptera (SF9) e uma linhagem celular de díptera (S2). Assim, as estruturas tridimensionais dos compostos químicos foram usadas para construir o modelo de 3D-QSAR, que descreve a atividade dos compostos Daf-2 e Daf-4 e dos hormônios ao ecdisônio. Os compostos que não apresentaram atividade no receptor nuclear da ordem Díptera e Lepidóptera foram excluídos das análises virtuais. O modo com que os compostos Daf-2 e Daf-4 e o hormônio 20 He se ligam ao receptor de ecdisteroides de Lepidoptera foi revelado por análise estrutural cristalografia de raio-X (BILLAS et al., 2003). Tais estruturas se encontram no site Protein Data Base (PDB, 2018), de onde foram obtidos para as análises do presente estudo. O modelo tridimensional do receptor de ecdisteroides de *D. melanogaster* foi gerado com a ferramenta online Swiss-Model (BIASINI et al., 2014), a partir da sequência de aminoácidos disponível online (GeneBank nº P34021). Todas as simulações virtuais foram realizadas no sistema operacional Microsoft Windows 7®, com o uso do software Discovery Studio® e Chimera®.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1 Teste de citotoxicidade

A linhagem celular S2 de *Drosophila melanogaster*, foi exposta aos bioensaios de viabilidade celular. Inicialmente eram 23 compostos químicos organocalcogênicos estruturais, que foram testados nos bioensaios em três

concentrações micro molares de cada composto químico, as concentrações que foram utilizadas nos bioensaios são $10^{-3}\mu\text{M}$, $10^{-6}\mu\text{M}$ e $10^{-9}\mu\text{M}$. Após o período de 48 horas, com o auxílio do método de microscopia e contagem celular, observamos que 14 compostos químicos apresentaram viabilidade celular inferior a 80% nas 3 concentrações micro molares testadas (figura 3), : (M3,M4, M5, M8,M11,M18,M19) e (figura 4), M1, M6,M7,M10,M12,M13 e M15. Algumas moléculas não esteroidais podem apresentar citotoxicidade parcial em algumas concentrações micro molar, ou ser extremamente citotóxicas interferindo na viabilidade (SOIN et. al., 2010).

Nove compostos testados nas concentrações $10^{-3}\mu\text{M}$, $10^{-6}\mu\text{M}$ e $10^{-9}\mu\text{M}$ apresentaram citotoxicidade parcial (figura 3) (M2, M9, M14, M16 e M17) e (figura 4) (DAF-2, DAF-4, SE-CHOL e SE-CHOL-AC), as concentrações micro molares que apresentaram uma viabilidade de no mínimo 80%, foram adicionadas em nosso banco de novas moléculas, sendo encaminhadas para triagem de alto desempenho, buscando atividade agonista ou antagonista do receptor nuclear de lepidóptera e díptera (SWEVERS et al., 2004).

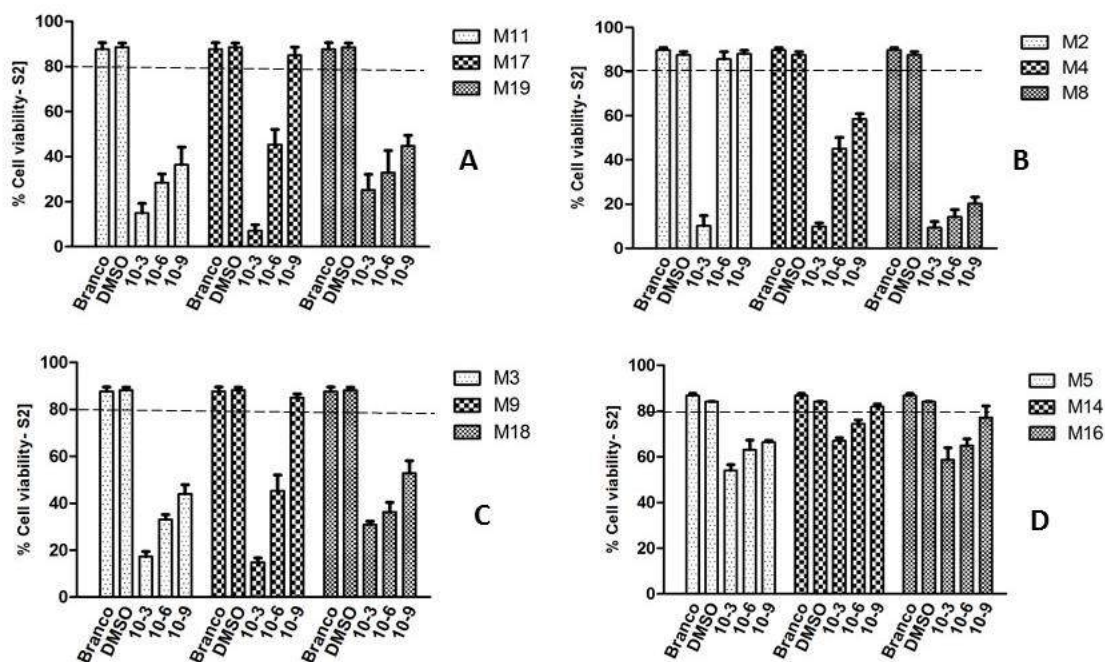


Figura 3: Viabilidade celular frente à exposição das novas moléculas em três concentrações molares ($0,0001$; $0,00001$ e $0,000001$). Os controles DMSO e meio celular, anova One Way Anova Figura A ($F= 1401,69$ gl= 4;GL resíduo= 30; $P<0.0001$); Figura B ($F= 386,66$ gl= 4;GL resíduo= 30; $P<0.0001$); Figura C ($F=$

886,68 gl= 4;GL resíduo= 30; $P<0.0001$), (teste t, $p<0,05$) Figura D ($F= 173,25$ gl= 4;GL resíduo= 30; $P<0.0001$), (teste t, $p<0,05$). Fonte: Machado (2019).

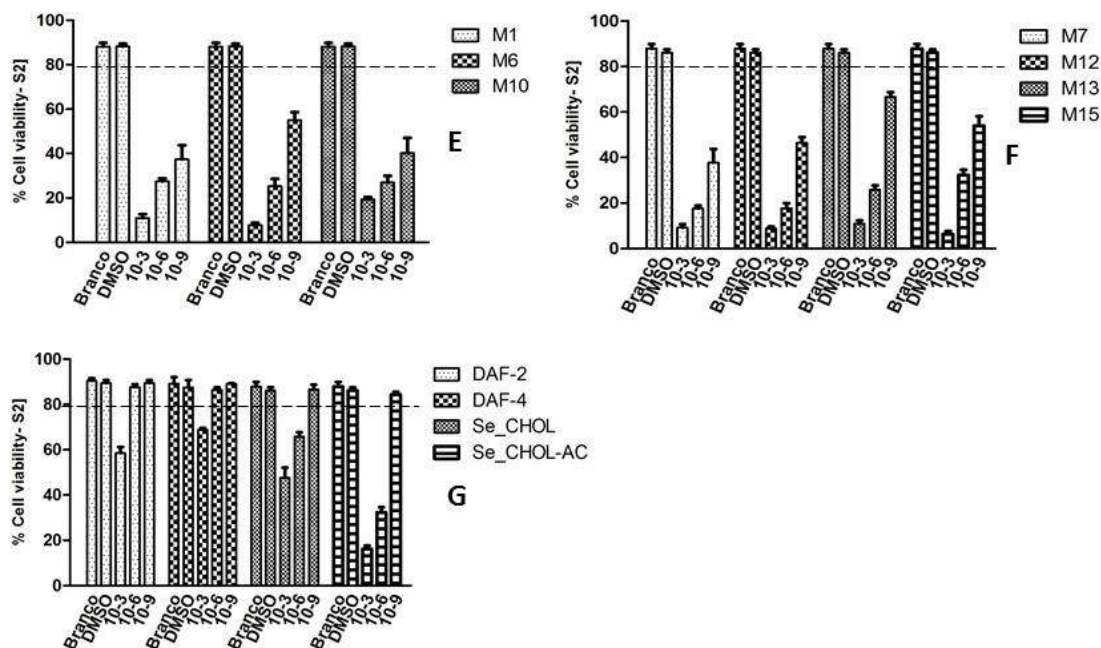


Figura 4: Viabilidade celular frente à exposição das novas moléculas em três concentrações molares (0,0001; 0,00001 e 0,000001). Os controles DMSO e meio celular. anova One Way Anova Figura E ($F= 1168,13$ gl= 4; GL resíduo= 30; $P<0.0001$); Figura F ($F= 2814,67$ gl= 4; GL resíduo= 40; $P<0.0001$); Figura G ($F= 911,35$ gl= 4; GL resíduo= 30; $P<0.0001$). Fonte: Machado (2019).

3.3.2. Atividade agonista do ecdisteróide

Os bioensaios repórter para expressar o gene luciferase em células S2 e SF9, foram obtidos a partir de uma curva dose-resposta com o hormônio natural 20 Hidroxiecdisônio e com fitoecdisteróides Ponasterona A (Figura 5). As curvas destes hormônios foram calculadas com auxílio do software GraphPad Prism, para avaliar atividade utilizou-se o hormônio natural 20 H ecdisônio específico de insetos e o fitoesteróide Ponasterona A, ambos ecdisteróides possuem uma excelente responsividade em linhagens de células da ordem Díptera e Lepidoptera transfectadas com o gene repórter plasmídeo ERE-b.act.luc (ZOTTI et al., 2013a). Os compostos esteroidais 20- Hidroxiecdisônio e Ponasterona-A, apresentaram padrões semelhantes para as duas linhagens, sendo que a Ponasterona-A se mostrou-se um excelente agonista (Figura 5). A EC₅₀ de 20-Hidroxiecdisônio foi 7,185 e 6,958 já de Ponasterona-A foi de 6,24 e 5,653 para células de díptera e lepidóptera, respectivamente (Tabela 1). Sendo assim, pode-

se observar que ambos esteroides, em ambas as linhagens celulares, apresentaram um padrão de atividade. O resultado obtido indica que tanto 20-Hidroxicdisônio como Ponasterona-A são inespecíficos para estas duas ordens de insetos.

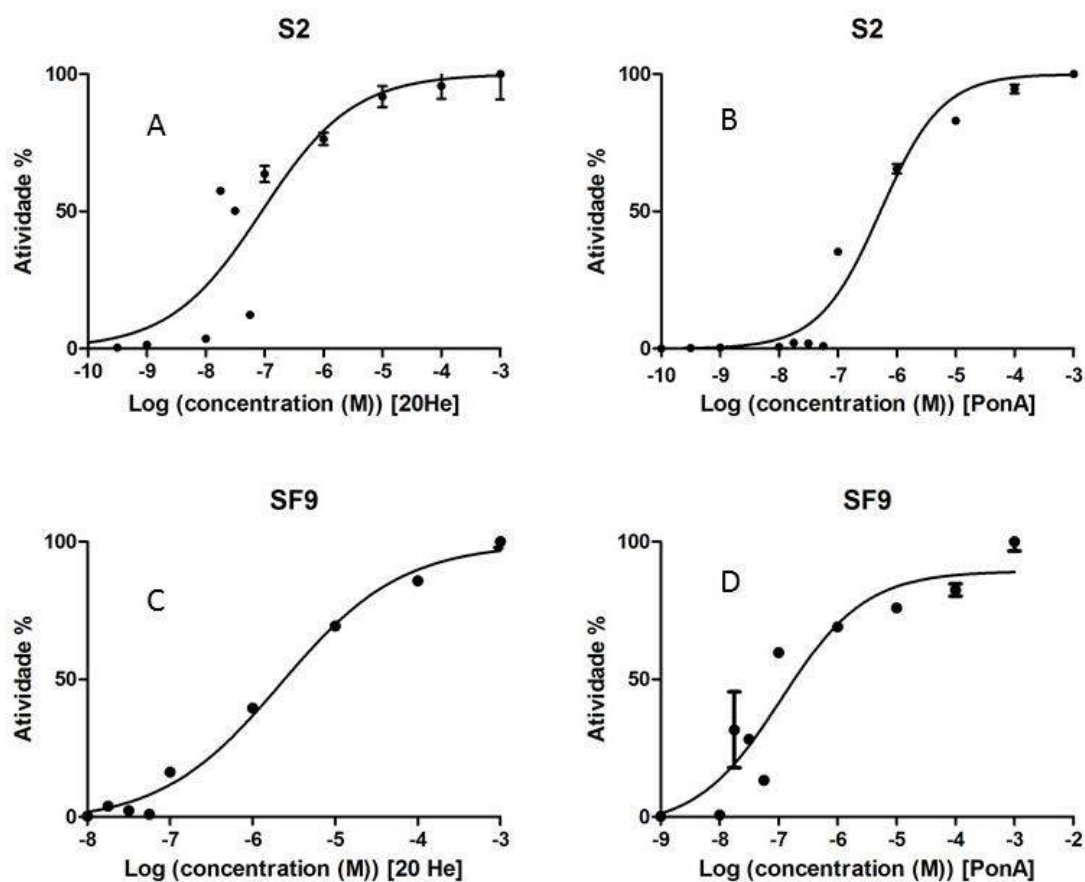


Figura 5: Curvas sigmóides de dose-resposta referentes a atividade de dois ecdisteróides em células S2 e SF9. Fonte: Machado (2019)

Compostos secundários obtidos de plantas, produzem propriedades semelhantes a atividade agonista ou antagonista do receptor ecdisteróides, em sua pesquisa Dinan (1999) identificou mais de 4500 espécies de plantas com potencial para servir de modelo para desenvolvimento de novos agentes de controle. A cyasterona é fitoesteróide, e apresentou atividade agonista em receptor de ecdisteróides de células S2 e Bm5 (Lepidoptera), mas a sua atividade é menor do que tebufenozida, o que inviabiliza o uso desta molécula para o desenvolvimento de novos inseticidas na indústria de agroquímicos (ZOTTI et al., 2013a). As plantas produzem compostos esteroidais com atividade

em receptor de ecdisteroides de insetos. Alguns compostos são ativos e podem competir ao sítio de ligação do ligante receptor de diptera e lepidoptera, sendo uma adaptação evolucionária em ordens de insetos (DINAN et al., 2001).

Tabela 2: Atividade agonista de 20-Hidroxiecdisonio (20H), Ponasterona-A (PonA).

	S2			SF9				
	-logEC50	95%IC		R2	-logEC50	95%IC		R2
20 H	7,185	-7.696	-6.675	0,8530	6,958	-7.331	-6.584	0,8901
PonA	6,424	-6.593	-6.255	0,9746	5,653	-5.792	-5.514	0,9908

Dados expressos em médias de resposta junto ao intervalo de confiança de 95% (ambos em -logEC50). R2 representa a precisão dos dados plotados na curva sigmoide.

Em relação à atividade agonista dos novos compostos organocalcogênicos, tanto em células S2 como em SF9 nenhuma apresentou efeito significativo quando comparado à concentração de 100 µM de 20-Hidroxiecdisonio e Ponasterona A (Figura 6). Os compostos foram testados na concentração máxima micro molar não tóxica para as culturas celulares (Tabela 3), a concentração dos hormônios padrão utilizada para esta linha de bioensaios, visto que concentrações maiores podem causar citotoxicidade nas células (Soin 2010). Como as concentrações utilizadas (tabela 3) não houve resposta, concluiu-se que as nove novas moléculas (Figura 6) não têm potencial de se tornarem agonistas comerciais, tanto para a linhagem celular de lepidoptera como para a linhagem celular de diptera, sendo economicamente inviável seguir as pesquisas, uma vez que é necessário várias otimizações nas estruturas químicas e que devem ser realizadas para talvez obter um resultado expressivo e tornar as moléculas ativas.

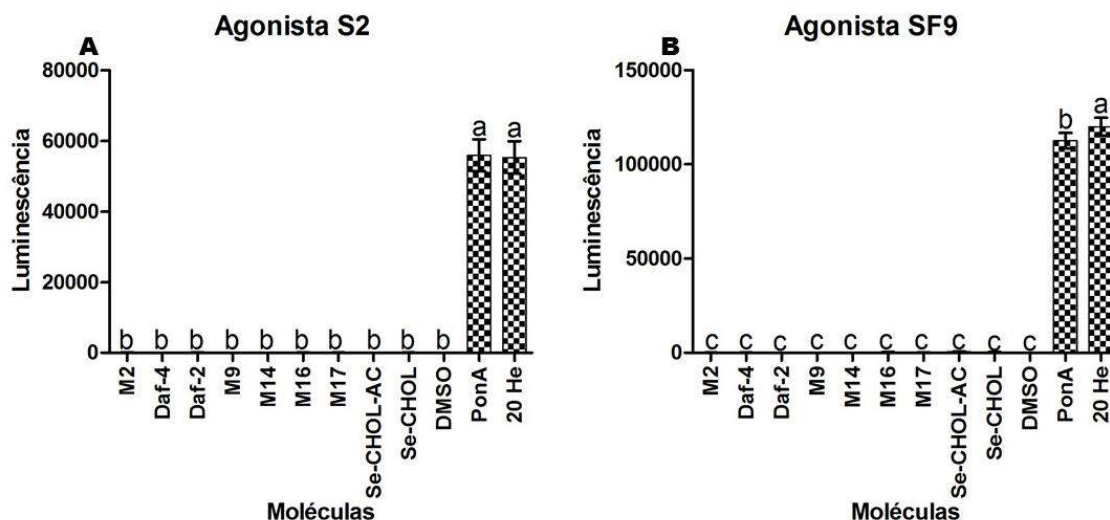


Figura 6: Efeito agonista observado para as nove novas moléculas nas linhagens celulares S2 (A) e SF9 (B). A atividade agonista das moléculas foram comparadas com a concentração de 100 μ M do hormônio 20-Hidroxicdisônio (20H), Ponasterona A e o DMSO (Solvente de diluição das moléculas) como controle. Os Valores que são seguidos por letras foram significativamente diferentes (teste tukey = 0,05). A diferença significativa do mensuramento da luminescência medida em comparação ao controle com 20-Hidroxicdisônio, anova One Way Anova. Bioensaios agonista S2 (F= 402,7, gl= 11; GL resíduo= 24; P<0.0001)e (teste tukey =.significativo P < 0.05), Agonista SF9(F= 1913, gl= 11; GL resíduo= 24; P<0.0001)e (teste t =.significativo P < 0.05).

A atividade agonista para o hormônio natural 20-Hidroxicdisônio e o fitoesteróide Ponasterona-A em ambas culturas celulares, não possuem diferença significativa (Figura 6). Sendo assim, para uma molécula não esteroide ter potencial de ser patenteada, espera-se uma resposta ao menos de 80% em comparação ao hormônio natural 20-Hidroxicdisônio ou ser semelhante.

Tabela 3: Atividades de compostos no bioensaios em cultura celular S2 e SF9 para agonistas do ecdisteróides.

Compostos	¹ Max. Conc.(M)	Atividade Agonista	² Citotoxicidade Conc.(M)	Fornecedor
M2	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	LabSOL
DAF-4	10 ⁻⁶	Inativo	10 ⁻³	Dr. Burton
DAF-2	10 ⁻⁶	Inativo	10 ⁻³	Dr. Burton
M9	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	LabSOL
M14	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	LabSOL
M16	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	LabSOL

M17	10^{-9}	Inativo	10^{-3} e 10^{-6}	LabSOL
SE-CHOL-AC	10^{-9}	Inativo	10^{-3} e 10^{-6}	Dra.Isabella
SE-CHOL	10^{-9}	Inativo	10^{-3} e 10^{-6}	Dra.Isabella
DMSO	*	Inativo	-----	Synth
PonaA	10^{-3}	Ativo	-----	Sigma Aldrich
20 He	10^{-3}	Ativo	-----	Sigma Aldrich

¹ máxima concentração Micro Molar. ² Teste Citotoxicidade celular concentração Micro Molar Tóxica para as linhagens celular. * Solvente utilizado para diluir as moléculas.

As moléculas agonistas do receptor ecdisteróides não esteroidais, como os análogos das dibenzoilhidrazinas representam um importante grupo de inseticidas no controle de insetos praga, seu modo de ação altamente seletivo e torna uma ferramenta útil para o controle de artrópodes pragas. No entanto, os análogos de DAH disponíveis no mercado são apenas altamente ativos contra Lepidoptera, com a exceção de halofenozida, que tem atividade contra coleópteros, bem como Lepidoptera. No entanto, estas moléculas inseticidas não esteróidal agonista comerciais, também têm uma certa atividade em diptera (SMAGGHE et al., 2012) sistemas de triagem baseado em repórter específico de dípteros foi desenvolvido a fim de descobrir e avaliar compostos que possuem atividade no receptor ecdisteróide agonista ou antagonista (DINAN et al.,2001).

3.3.3. Atividade antagonista do ecdisteróide

Em relação à atividade antagonista dos novos compostos organocalcogênicos, tanto em células S2 como em SF9 apenas duas moléculas apresentaram efeito significativo quando comparado à concentração de 100 μ M de 20- Hidroxiecdisônio e Ponasterona A (Figura 6). Os compostos foram testados na concentração máxima micro molar não tóxica para as culturas celulares (Tabela 4). O resultados obtidos da linhagem celular S2 (Figura 7 A) em comparação ao 20- Hidroxiecdisônio a molécula DAF-2 inibiu a luminescência do receptor nuclear em 29,91%, em que a molécula DAF-4 inibiu a luminescência do receptor nuclear expressivamente em 51,55%.Os resultados obtidos na linhagem celular SF9 (Figura 7 B) DAF- 2 inibiu a luminescência do receptor nuclear em 19,62 %, e a DAF-4 inibiu a luminescência do receptor em 35,14 %. Os compostos DAF-2 e DAF-4 são descritos como moduladores sintéticos DAF-12 e com potencial uso no controle de nematoides, o composto

DAF-2 e DAF-4 foram testados a sua atividade em células HEK-293T co-transfectado com um vetor de expressão codificando a luciferase gene repórter sob o controle do promotor Gal4 (DANSEY et al. 2015).

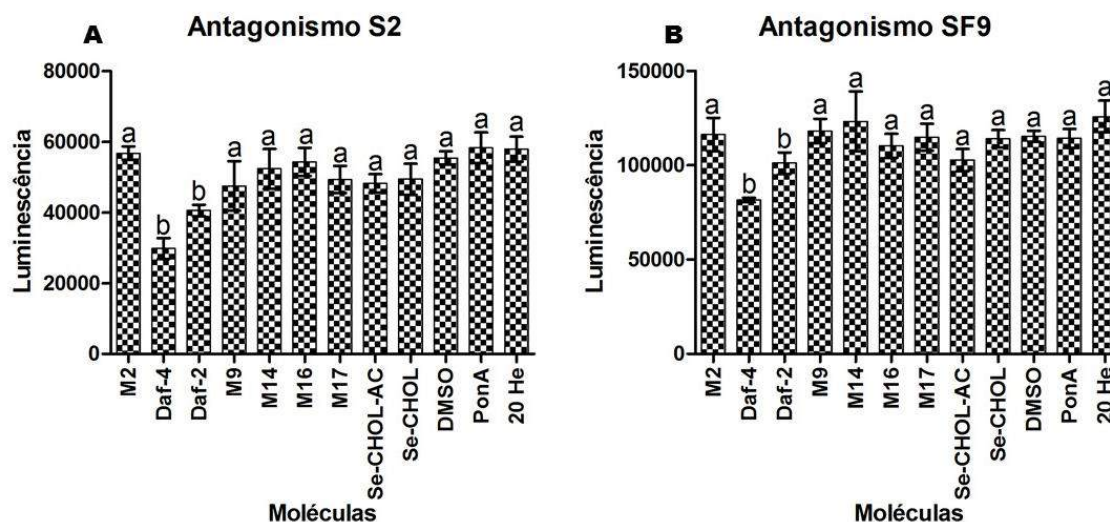


Figura 7: Efeito antagonista observado para as nove novas moléculas nas linhagens celulares S2 (A) e SF9 (B). A atividade antagonista das moléculas foram comparadas com a concentração de 100 μ M do hormônio 20-Hidroxiciclodiol (20H), Ponasterona A e o DMSO (Solvente de diluição das moléculas) como controle. Os Valores que são seguidos por letras foram significativamente diferentes (teste tukey = 0,05). A diferença significativa do mensuramento da luminescência medida em comparação ao controle com 20-Hidroxiciclodiol, anova One Way Anova. Bioensaios antagonista S2 (F= 12,87, gl= 11; GL resíduo= 24; P<0.0001) e (teste tukey =.significante P < 0.05), Antagonista SF9 (F= 7,634, gl= 11; GL resíduo= 24; P<0.0001)e (teste tukey =.significante P < 0.05).

Tabela 4: Atividades de compostos no bioensaios em cultura celular S2 e SF9 para antagonista do ecdisteróides.

Compostos	¹ Max. Conc.(M)	Atividade Antagonista	² Citotoxicidade Conc.(M)	Fornecedor
M2	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	LabSOL
DAF-4	10 ⁻⁶	Ativo	10 ⁻³	Dr. Burton
DAF-2	10 ⁻⁶	Ativo	10 ⁻³	Dr. Burton
M9	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	LabSOL
M14	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	LabSOL
M16	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	LabSOL
M17	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	LabSOL
SE-CHOL-AC	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	Dra.Isabella
SE-CHOL	10 ⁻⁹	Inativo	10 ⁻³ e 10 ⁻⁶	Dra. Isabella
DMSO	*	Inativo	-----	Synth

PonaA	10 ⁻³	Inativo	-----	Sigma Aldrich
20 He	10 ⁻³	Inativo	-----	Sigma Aldrich

¹ máxima concentração Micro Molar. ² Teste Citotoxicidade celular concentração Micro Molar Tóxica para as linhagens celular. * Solvente utilizado para diluir as moléculas.

Bioensaios em culturas celulares de insetos, visando atividade antagonista do receptor nuclear, são, no geral, escassos (DINAN e HORMANN, 2005; SOIN et al., 2009; ZOTTI et al., 2013a). Com avanço da bioinformática, que usa um banco de dados de mais de 2 milhões de compostos, procedeu-se a uma triagem virtual baseada em forma e poder de ativação do ligante ao ECR. Para identificar novos compostos não esteroidais semelhantes ao fitoesteróide ligante da Ponasterona A em resposta ao EcR. O parâmetro estabelecido para uma molécula antagonista ter um efeito aceitável de inibição de no mínimo 50% da atividade hormonal (HARADA et al., 2011). Entretanto, a escassez de trabalhos focados em bioensaios antagonista, consideramos em nosso trabalho, compostos que obtiveram no mínimo 15% de inibição do receptor nuclear para as duas linhagens celulares S2 e SF9. Dinan et al. (2001) em um dos seus principais trabalhos em linhagem celular BII, proveniente de *D. melanogaster*, identificou 36 moléculas que apresentam efeito antagonista, sendo estas moléculas alcaloides, brassinosteroides, cardenolides, bufadienolides, curcubitacins, picracinas, flavonoides, lignanas, limonoides, fenilalcaloiodes, saponinase vitasteroides, todos compostos secundários extraídos de plantas.

Existe compostos esteroidais, como por exemplo a castasterona que apresenta afinidade a receptores de ecdisteroides e células S2 da ordem diptera e células BM5 da ordem lepidóptera, uma vez que os sítios de ligação são semelhantes ao contrário do que ocorre em relação às dibenzoilhidrazinas (ZOTTI et al., 2013a). Hetru et al. (1986) constatou-se que a castasterona é capaz de causar antagonismo ao hormônio natural 20-Hidroxiecdisonio em *Phormia terranova* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae). Compostos extraídos a partir de sementes de *Carex pendula* (Cyperaceae), inibiu o receptor nuclear apresentando uma atividade antagonista em células diptera (MENG et al. 2001). Isto demonstra um vasto repertório de compostos não esteroidais,

semelhante às dibenzoilhidrazinas, com a capacidade de inibir a atividade de receptores nuclear de insetos em diversas ordens de insetos.

3.3.4. Modelagem tridimensional de Diptera e Lepidoptera EcR-LBD

A análise virtual mostra que a formação estrutural do sítio de ligação do receptor ecdisteróides, ocorre dentro do receptor uma ligação em parte da cadeia alifática do ecdisônio em um largo lobo localizado na extremidade superior do sítio, similarmemente observável tanto no receptor diptera e lepidóptera (Figura 6). Entretanto, ao compararmos estruturalmente os receptores de ecdisteróides de diptera (Figura 8 A) e lepidoptera (figura 8 B), é possível observar que existe na ordem lepidópteros uma segunda cavidade na região superior do sítio, ausente no receptor de dipteros. Esta segunda cavidade forma uma espécie de segundo sítio de ligação. Em seu trabalho Soin et al. (2010), comprovou que é nesta segunda cavidade em que o anel Benzênico das dibenzoilhidrazinas se ligam, fazendo com que estas moléculas apresentem atividade expressiva em lepidópteros.

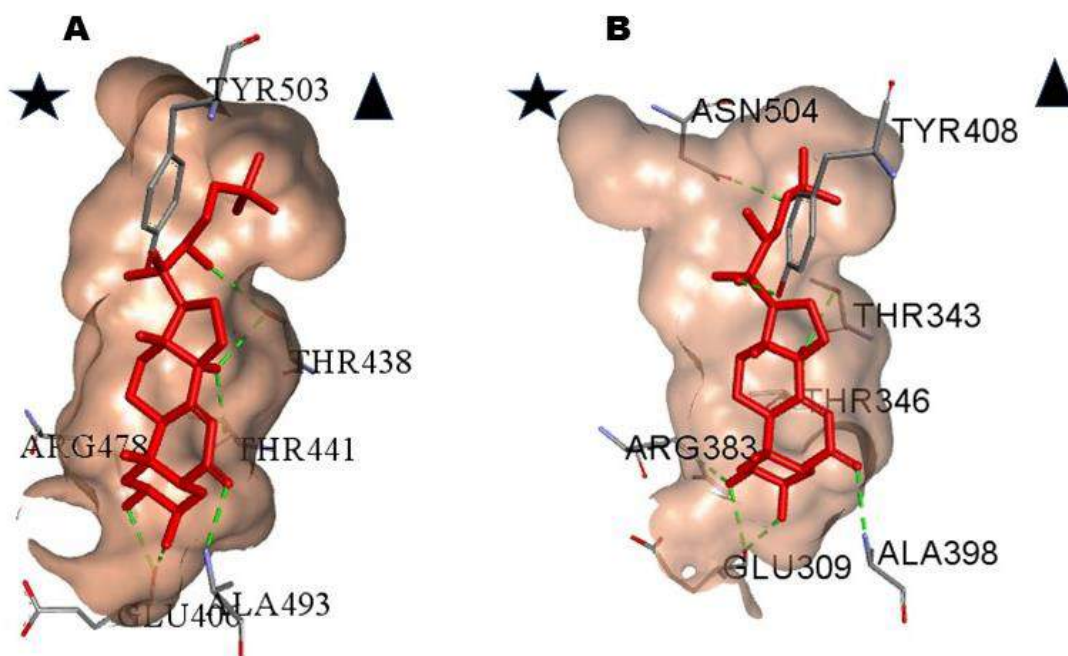


Figura 8: Cavidade de ligação dos ecdisteróides dentro do receptor. Na imagem 20-Hidroiecdisônio ancorada no receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster* (A) e *Heliothis virescens* (B). Os dois lobos localizados na porção superior da cavidade estão indicados por uma estrela (lado esquerdo) e por um

triângulo (lado direito). No receptor de Lepidoptera (B) é possível observar o lobo esquerdo saliente, sítio o qual ligam-se as dibenzoilhidrazinas. Autor: Machado (2019).

3.3.5 Modelagem tridimensional dos compostos DAF-2 e DAF-4

Com base nos resultados obtidos nos bioensaios de atividade agonista e antagonista, foram realizadas simulações virtuais das interações das moléculas DAF-2 e DAF-4 no receptor de ecdisteróides de diptera e lepidoptera, únicos compostos que apresentaram atividades nos bioensaios “in vitro”. O receptor de *D. melanogaster* ainda não foi elucidado pelo método de difração de raio-X. Existem ferramentas computacionais que podem modelar a estrutura quaternária de proteínas com base no alinhamento da sequência de aminoácidos de outras espécies, servindo de modelo. Para a modelagem do receptor de ecdisteróides de *D. melanogaster* no presente estudo, foi utilizado o Swiss-Model ou Modelo Suíço, ferramenta a qual consiste em um sistema automatizado para modelagem de estruturas (BIASINI et al. 2014) As simulações foram realizadas no receptor nuclear *D. melanogaster* e *Heliothis virescens*, respectivamente (Figura 9) para o composto DAF-2 e (Figura 10) compostos DAF-4.

Interface gráfica da possível interação entre a molécula DAF-2 e o receptor de ecdisteróides de *D. melanogaster* (Figura 9 A). Está ilustrado o resultado da simulação da forma com que a DAF-2 se liga no receptor de ecdisteróides de diptera inibindo os aminoácidos THR-467 e o aminoácido MET-508 e formando duas pontes de hidrogênio. A molécula DAF-2 em interação com o receptor ecdisteróides *H. virescens* (Figura 9 B), forma duas pontes de hidrogênio e inibe o aminoácido THR-343 e o aminoácido ARG-387.

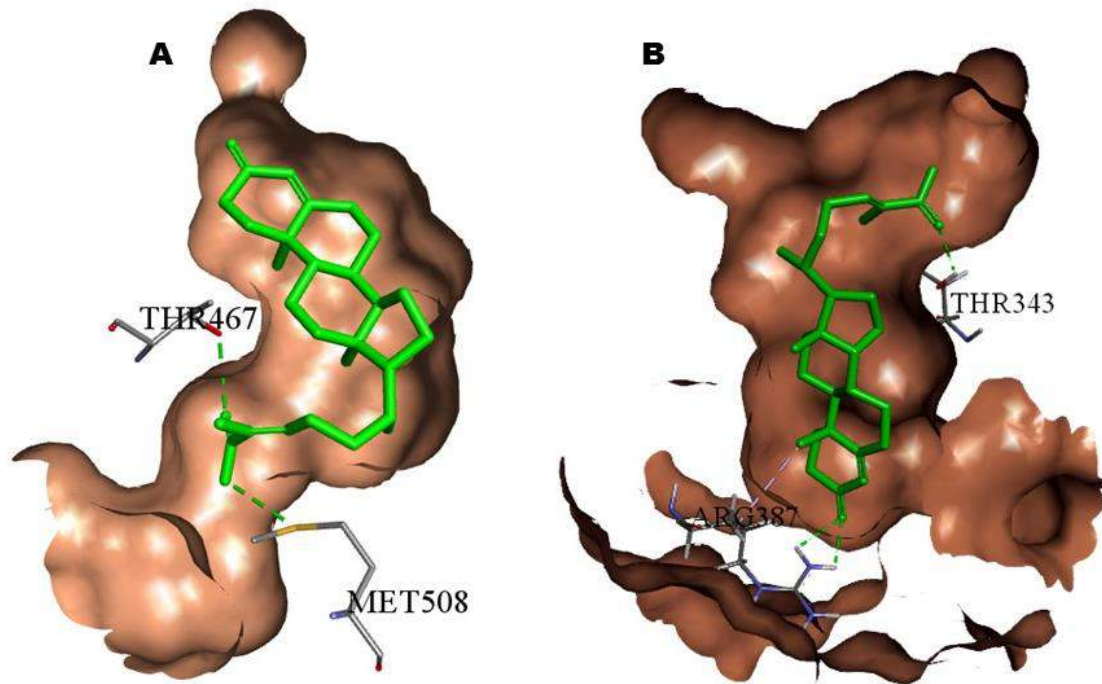


Figura 9: DAF-2 Interface gráfica da possível interação entre a molécula DAF-2 e o receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster* (A) e *Heliothis virescens* (B). Está ilustrado o resultado da inibição dos aminoácidos THR467 e MET- 508 em receptor de ecdisteróide de díptera e inibição dos aminoácidos THR-343 e ARG-387 em receptor ecdisteróide de lepidóptera. Autor: Machado (2019).

Interface gráfica da possível interação entre a molécula DAF-4 e o receptor de ecdisteróides de *D. melanogaster* (Figura 10 A). Está ilustrado o resultado da simulação da forma com que a DAF-4 se liga no receptor de ecdisteróides de díptera inibindo os aminoácidos ARG-511 e formando uma ponte de hidrogênio. A molécula DAF-4 em interação com o receptor ecdisteróides *H. virescens* (Figura 10 B), forma duas pontes de hidrogênio e inibe o aminoácido ASN-504 e o aminoácido ARG-387.

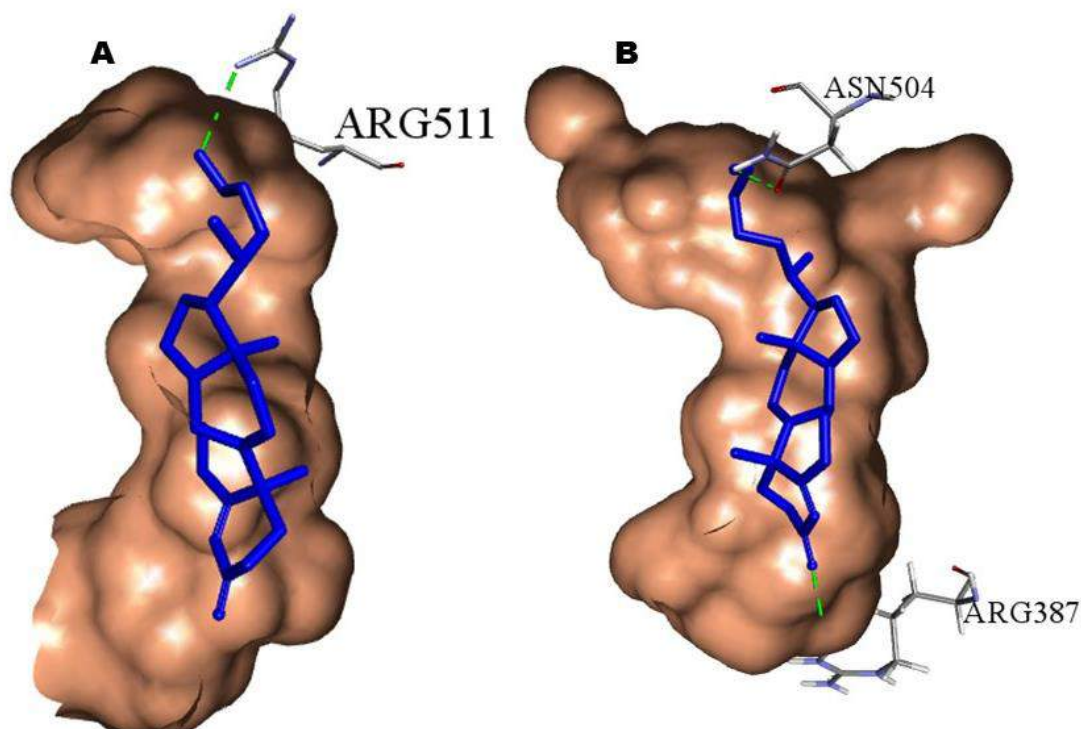


Figura 10: Interface gráfica da possível interação entre a molécula DAF-4 e o receptor de ecdisteróides de *Drosophila melanogaster* (A) e *Heliothis virescens* (B). Está ilustrado o resultado da inibição dos aminoácidos ARG-511 em receptor de ecdisteróide de díptera e inibição dos aminoácidos ASN-504 e ARG-387 em receptor ecdisteróide de lepidóptera. Autor: Machado (2019).

Com o uso de ferramentas computacionais, permitindo a triagem massiva compostos químicos in silico, Harada et al. (2011) em seu trabalho buscou moléculas semelhantes nas características físico-químicas do fitoesteróide Ponasterona A. Para sua pesquisa utilizou um banco de dados de 2,1 milhões de moléculas, com base em parâmetros pré-estabelecidos, os autores identificaram 24 compostos que foram melhor classificados e posterior encaminhado a síntese orgânica. Dos 24 compostos apenas 3 compostos possuem atividade antagonista.

Em sua pesquisa in silico Deng et al. (2016) utilizou a triagem virtual para modificar radicais das moléculas já existentes as dibenzoihidrazinas e com base em parâmetros pré-estabelecidos e classificados a partir das simulações, sintetizou 38 moléculas, e apenas uma molécula apresentou atividade semelhante a tebufenozida em lagartas da ordem Lepidoptera. É importante

salientar que ensaios de atividade inseticida in silico (Triagem virtual), in situ (biotecnologia celular) e in vivo (insetos) podem ocorrer diferenças dos compostos em ensaios in vivo, visto que em insetos o seu organismo é complexo e possuem enzimas com capacidade de detoxificar compostos químicos (SWEVERS e SMAGGHE, 2016).

3.4. Conclusões

O sistema de triagem em células é eficaz para testar uma quantidade massiva de compostos esteroidais e não esteroidais. Os hormônios 20-Hidroxiectdisônio e a Ponasterona-A possuem padrões de atividade similares nas duas linhagens celulares utilizadas. As moléculas DAF-2 e DAF-4 são antagonistas ao hormônio 20-Hidroxiectdisônio em células de Diptera (S2) e células de lepidóptera (SF9). As interações observadas servirão como base para o design racional de novas moléculas inseticidas

3.5. Referências

BIASINI, M.; et. Al. Swiss-model: modeling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v.42, n.1 p.252-258, 2014.

BILLAS, I. M. L.; IWEMA, T.; GARNIER, J. M.; MITSCHLER, A.; ROCHEL, N.; MORAS, D. Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor. **Nature**, v.426, p.91-96, 2003.

DANSEY, M. V. et al. Synthetic DAF-12 modulators with potential use in controlling the nematode life cycle. **Biochemical Journal**, v. 465, n. 1, p. 175-184, 2015.

DENG, X. L. et al. Design, synthesis and biological activity of novel substituted pyrazole amide derivatives targeting EcR/USP receptor. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 4, p. 566-570, 2016.

DHADIALLA, T. S.; CALSON, G. R.; LE, D. P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annual Review Entomology**, v.43 p.545-569, 1998.

DINAN, L. et al. Assessment of natural products in the *Drosophila melanogaster* BII cell bioassay for ecdysteroid agonist and antagonist activities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.58, n.2, p.321-342, 2001.

DINAN, Laurence; HORMANN, Robert E.; FUJIMOTO, Ted. An extensive ecdysteroid CoMFA. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 13, n. 2, p. 185-207, 1999.

DINAN, L.; HORMANN. Ecdysteroid agonists and antagonists. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Eds): **Comprehensive molecular Insect Science**. **Elsevier Pergamon Press**, Amsterdam, 2005, p.197-242.

HARADA, T. et al. Virtual screening for ligands of the insect molting hormone receptor. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 2, p. 296-305, 2011.

HETRU, C.; ROUSSEL, J. P.; MORI, K.; NAKATANI, Y. Activité antiectostéroïde de Brassinostéroïdes. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.302, p.417-420, 1986.

KOELLE, M. R. et al. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. **Cell**, v. 67, n. 1, p. 59-77, 1991.

MANGELSDORF, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, 1995.

MENG, Y.; BOURNE, P. C.; WHITING, P.; ŠIK, V.; DINAN, L. Identification and ecdysteroid antagonist activity of three oligostilbenes from the seeds of *Carex pendula* (Cyperaceae). **Phytochemistry**, v.57, n.3, p.393-400, 2001.

NIJHOUT, H. Frederik; EMLEN, Douglas J. Competition among body parts in the development and evolution of insect morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 7, p. 3685-3689, 1998.

PDB. Protein Data Base, Online. Disponível em <http://www.rcsb.org>. Acessado em 05 de dezembro de 2018.

SMAGGHE, G.; GOMEZ, L. E.; DHADIALLA, T. S. Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. In: DHADIALLA, T.S.(Ed.) **Advances in Insect Physiology**. Academic Press, 2012. v. 43, p. 163-249.

SOIN, T. et al. Towards Coleoptera-specific high-throughput screening systems for compounds with ecdysone activity: development of EcR reporter assays using weevil (*Anthonomus grandis*)-derived cell lines and in silico analysis of ligand binding to *A. grandis* EcR ligand-binding pocket. **Insect biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 8, p. 523-534, 2009.

SOIN, T. et al. Comparison of the activity of non-steroidal ecdysone agonists between dipteran and lepidopteran insects, using cell-based EcR reporter assays. **Pest Management Science**, v.66, n.11, p.1215-1229, 2010.

SWEVERS, L.; SMAGGHE, G. Cell-based screening systems for developing novel insecticides: insights from the ecr-reporter paradigm. In: HOROWITZ, A.

R; ISHAAYA, I. (Eds.): Advances in insect control and resistance management. **Springer** International Publishing, 2016. p.191-204.

SWEVERS, Luc et al. A cell-based high-throughput screening system for detecting ecdysteroid agonists and antagonists in plant extracts and libraries of synthetic compounds. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 1, p. 134-136, 2004.

WYATT, G. R.; DAVEY, K. G. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. In: EVANS, P.D.(Ed.) **Advances in insect physiology**. Academic Press, 1996. p. 1-155.

YAO, T. et al. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. **Nature**, v. 366, n. 6454, p. 476, 1993.

ZOTTI, M.J. et al. A cell-based reporter assay for screening for EcR agonist/antagonist activity of natural ecdysteroids in Lepidoptera (Bm5) and Diptera (S2) cell cultures, followed by modeling of ecdysteroid-EcR interactions and normal mode analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 3, p. 309-320, 2013a.

ZOTTI, M. J.; GRUTZMACHER, A. D.; LOPES, I. H.; SMAGGHE, G. Comparative effects of insecticides with different mechanisms of action on *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): lethal, sublethal and doseresponse effects. **Insect Science**, v.20, n.6, p.743-752, 2013b.

4 Conclusões Gerais

Conclui-se que os bioensaios repórter baseados em células EcR testados é útil para a triagem de compostos com atividade agonistas do ecdisteroides e atividades antagonistas. Este sistema é muito promissor para o desenvolvimento de novos inseticidas.

Os hormônios 20-Hidroxicdisônio e a Ponasterona-A possuem padrões de atividade similares nas duas linhagens celulares utilizadas.

Os nove compostos testados no sistema de triagem não apresentaram atividade agonista do receptor ecdisteroides.

Os compostos DAF-2 e DAF-4 apresentaram atividade antagonista inibindo atividade do receptor nuclear de ecdisteroides.

Referências

- ADEYEMI, M. H. The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: A review. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, n. 11, p. 243-246, 2010.
- ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1269-1304, 2001.
- BERTRAND, S. et al. Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 10, p. 1923-1937, 2004.
- BIALECKI, M. et al. Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. **Developmental Cell**, v. 3, n. 2, p. 209-220, 2002.
- BILLAS, I. M. et al. The structure and function of ecdysone receptors. In: SMAGGHE, G. (Ed.) **Ecdysone: structures and functions**. Springer, Dordrecht, 2009. p. 335-360.
- BILLAS, I. M.; MORAS, D. Ligand-binding pocket of the ecdysone receptor. **Vitamins & Hormones**, v. 73, p. 101-129, 2005.
- BONNETON, F.; CHAUMOT, A.; LAUDET, V. Annotation of *Tribolium* nuclear receptors reveals an increase in evolutionary rate of a network controlling the ecdysone cascade. **Insect biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 416-429, 2008.
- BOURGUET, W. et al. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 377, 1995.
- CARMICHAEL, J. A. et al. The X-ray structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand-binding domain comparison with a lepidopteran ecdysone receptor ligand-binding domain and implications for insecticide design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 23, p. 22258-22269, 2005.
- CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annual review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1998.
- CHEN, J.; TURNER, P. C.; REES, H. H. Molecular cloning and induction of nuclear receptors from insect cell lines¹. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 6, p. 657-667, 2002.
- DAS, S. K. Screening of Bioactive Compounds for Development of New Pesticides: A Mini Review. **Universal Journal of Agricultural Research** v.4, n.1, p. 15-20, 2016.

DE ROSNY, E. et al. DHR51, the *Drosophila melanogaster* homologue of the human photoreceptor cell-specific nuclear receptor, is a thiolate heme-binding protein. **Biochemistry**, v. 47, n. 50, p. 13252-13260, 2008.

DHADIALLA, T. S.; CALSON, G. R.; LE, D. P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annual Review Entomology**, v.43 p.545-569, 1998.

ESCRIVA, H.; BERTRAND, S.; LAUDET, V. The evolution of the nuclear receptor superfamily. **Essays in Biochemistry**, v. 40, p. 11-26, 2004.

FISK, G. J.; THUMMEL, C. S. Isolation, regulation, and DNA-binding properties of three *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 23, p. 10604-10608, 1995.

GHANIM, M.; ISHAAYA, I. Insecticides with novel modes of action: mechanism and resistance management. In: AMIARD-TRIQUET, C.; RAINBOW, P. S.; ROMEO, M. (Eds.) **Tolerance to Environmental Contaminants**. CRC Press, 2011. p. 390-412.

GRONEMEYER, H; GUSTAFSSON, J.; LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 950, 2004.

HENRICH, V. C.; RYBCZYNSKI, R.; GILBERT, L. I. Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: mechanisms and models in insect development. In: LITWACK, G. (Ed.) **Vitamins & Hormones**. Academic Press, 1998. p. 73-125.

HILL, R. J.; GRAHAM, L. D.; TURNER, K. A.; HOWELL, L.; TOHIDIESFAHANI, L. D.; FERNLEY, R.; GRUSOVIN, J.; REN, B.; WINKLER, P.; LAWRENCE, M. C. Insect growth disruptors. In: DHADIALLA, T. S. (Ed.), **Advanced in Insect Physiology**. Elsevier, Oxford, 2012, p.299–352.

HOFFMANN, K. H.; LORENZ, M. W. Recent advances in hormones in insect pest control. **Phytoparasitica**, v. 26, n. 4, p. 323-330, 1998.

HORNER, M. A.; CHEN, T.; THUMMEL, C. S. Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. **Developmental biology**, v. 168, n. 2, p. 490-502, 1995.

ISMAN, M. B.; MIRESMALLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 197-204, 2011.

IRAC. Inseticide Resistance Action Committee. Inseticide modes of action (2016), online. Disponível em: Acessado< <https://www.irc-online.org/modes-of-action/> > em 08 de novembro de 2018.

IWEMA, T. et al. Structural and functional characterization of a novel type of ligand-independent RXR-USP receptor. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 16, p. 3770-3782, 2007.

KOBAYASHI, M. et al. Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 9, p. 4814-4819, 1999.

LAUDET, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 3, p. 207-226, 1997.

LAUDET, V.; BONNETON, F. Evolution of nuclear hormone receptors in insects. Evolution of nuclear hormone receptors in insects. In: LAWRENCE I. G.; KOSTAS, L.; SARJEET, S. G. (Eds.) **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier Pergamon, 2005. v.3 p. 287–318.

MAGLICH, J. M. et al. Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. **Genome Biology**, v. 2, n. 8, p. 1-7, 2001.

MARKOV, G.; BONNETON, F.; LAUDET, V. What does evolution teach us about nuclear receptors? In: BUNCE, C.; CAMPBELL, M. (Eds) **Nuclear Receptors**. Springer: Dordrecht, 2010. v.8, p. 15-29.

MAZID, S.; KALITA, J. C.; RAJKHOWA, R. C. A review on the use of biopesticides in insect pest management. **Int J Sci Adv Technol**, v. 1, n. 7, p. 169-178, 2011.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. Annual review of **Plant Biology**, v. 63, p. 431-450, 2012.

MIYAMOTO, T. et al. The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 181, n. 1-2, p. 229-238, 2001.

MORAS, D.; GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 384-391, 1998.

NAKAGAWA, Y.; HENRICH, V. C. Arthropod nuclear receptors and their role in molting. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 21, p. 6128-6157, 2009.

ÖSTBERG, T. et al. A triple mutant of the *Drosophila* ERR confers ligand-induced suppression of activity. **Biochemistry**, v. 42, n. 21, p. 6427-6435, 2003.

RASK-ANDERSEN, M.; ALMÉN, M. S.; SCHIÖTH, H. B. Trends in the exploitation of novel drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 8, p. 579, 2011.

RENAUD, J. et al. Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 681, 1995.

SCHWABE, J. W. et al. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 567-578, 1993.

SEGRAVES, W. A.; HOGNESS, D. S. The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. **Genes & Development**, v. 4, n. 2, p. 204-219, 1990.

SMAGGHE, G.; GOMEZ, L. E.; DHADIALLA, T. S. Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. In: DHADIALLA, T.S.(Ed.) **Advances in Insect Physiology**. Academic Press, 2012. v. 43 p. 163-249.

SOIN, T. et al. Towards Coleoptera-specific high-throughput screening systems for compounds with ecdysone activity: development of EcR reporter assays using weevil (*Anthonomus grandis*)-derived cell lines and in silico analysis of ligand binding to *A. grandis* EcR ligand-binding pocket. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 8, p. 523-534, 2009.

SOIN, T. et al. Comparison of the activity of non-steroidal ecdysone agonists between dipteran and lepidopteran insects, using cell-based EcR reporter assays. **Pest Management Science**, v. 66, n. 11, p. 1215-1229, 2010.b

STONE, B. L.; THUMMEL, C. S. The *Drosophila* 78C early late puff contains E78, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor superfamily. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 307-320, 1993.

SWEVERS, L.; ITO, K.; IATROU, K. The BmE75 nuclear receptors function as dominant repressors of the nuclear receptor BmHR3A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 44, p. 41637-41644, 2002.

SWEVERS, L.; SMAGGHE, G. Cell-Based Screening Systems for Developing Novel Insecticides: Insights from the EcR-Reporter Paradigm. In: RAMI, A.; ISHAAYA, H. (Eds.) **Advances in Insect Control and Resistance Management**. Springer, Cham, 2016. p. 191-204.

SWEVERS, Luc et al. A cell-based high-throughput screening system for detecting ecdysteroid agonists and antagonists in plant extracts and libraries of synthetic compounds. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 1, p. 134-136, 2004.

TAN, A.; PALLI, S. R. Identification and characterization of nuclear receptors from the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 430-439, 2008.

VÖGTLI, M. et al. High-level transactivation by the ecdysone receptor complex at the core recognition motif. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 10, p. 2407-2414, 1998.

WHITE, K. P. et al. Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 114-117, 1997.

WILSON, T. G. The molecular site of action of juvenile hormone and juvenile hormone insecticides during metamorphosis: how these compounds kill insects. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 2-3, p. 111-121, 2004.

ZOTTI, M.J. et al. A cell-based reporter assay for screening for EcR agonist/antagonist activity of natural ecdysteroids in Lepidoptera (Bm5) and Diptera (S2) cell cultures, followed by modeling of ecdysteroid-EcR interactions and normal mode analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 3, p. 309-320, 2013a.