

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE**



**Dissertação**

**Triagem de compostos com base na ativação do receptor de  
ecdisteroides em culturas celulares e planejamento racional de moléculas  
inseticidas associado a ferramentas computacionais**

**Ciro Pedro Guidotti Pinto**

**Pelotas, 2017**

**Ciro Pedro Guidotti Pinto**

**Triagem de compostos com base na ativação do receptor de  
ecdisteroides em culturas celulares e planejamento racional de moléculas  
inseticidas associado a ferramentas computacionais**

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 de conhecimento entomologia)

Orientador: Dr. Anderson Dionei Grutzmacher

Coorientador: Dr. Moisés João Zotti

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

P659t Pinto, Ciro Pedro Guidotti

Triagem de compostos com base na ativação do receptor de ecdisteroides em culturas celulares e planejamento racional de moléculas inseticidas associado a ferramentas computacionais. / Ciro Pedro Guidotti Pinto ; Anderson Dionei Grutzmacher, orientador ; Moisés João Zotti, coorientador. — Pelotas, 2017.

66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Dibenzoilhidrazina. 2. 20-hidroxiectdisônio. 3. Ponasterona-a. 4. Tebufenozida. 5. Controle químico. I. Grutzmacher, Anderson Dionei, orient. II. Zotti, Moisés João, coorient. III. Título.

CDD : 632.9

Ciro Pedro Guidotti Pinto

Triagem de compostos com base na ativação do receptor de ecdisteroides em culturas celulares e planejamento racional de moléculas inseticidas associado a ferramentas computacionais

Trabalho de Dissertação aprovado, como requisito parcial, para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade.

Data da defesa: 23/03/2017

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Anderson Dionei Grutzmacher (orientador), Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz;

Prof. Dr. Leonardo Nora, Doutor em Biologia Molecular de Plantas pela "University of East Anglia";

Dr. Daniel Bernardi, Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz;

Prof. Dr. Jader Ribeiro Pinto, Doutor em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas.

## **Agradecimentos**

A Deus, pela fé e força de vontade que me proporcionou durante toda minha vida;

A minha família, que é a base de tudo;

A minha namorada Sabrina Ongaratto por todo o apoio e carinho;

A Universidade Federal de Pelotas (UFPel), instituição a qual tem sido minha casa pelos últimos doze anos;

A Universidade de Gent (UGent) por ter disponibilizado sua estrutura e materiais para o desenvolvimento parcial do projeto;

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade (PPGFs) pela oportunidade proporcionada a mim e meus colegas;

Ao Prof. Anderson Dionei Grutzmacher (UFPel- PPGFs), pela orientação e dedicação durante esta jornada;

Ao Prof. Moisés João Zotti (UFPel- PPGFs) pelo empenho prestado para que este projeto tenha obtido sucesso;

Ao Prof. Guy Smaghe (UGent) e demais colegas da UGent, pela amizade e suporte científico prestado no exterior;

A Dra. Mariane Rosenthal pela amizade e apoio técnico;

A Dra. Letícia Rickes, por todo o acompanhamento e ajuda prestada;

A toda a equipe do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP-UFPel) e do Laboratório de Agrozoologia (UGent) pela grande parceria.

A banca avaliadora, pela disponibilidade em contribuir com o trabalho;

A CAPES pelo financiamento;

A todo o corpo docente da UFPel, pela instrução e dedicação;

Aos colegas de pós-graduação os quais tenho compartilhado esta caminhada;

Enfim, a todos que de certa forma fizeram parte desta jornada.

## Resumo

PINTO, Ciro Pedro Guidotti. **Triagem de compostos com base na ativação do receptor de ecdisteroides em culturas celulares e planejamento racional de moléculas inseticidas associado a ferramentas computacionais. 2017 66f.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A biotecnologia celular aplicada é essencial para o Manejo Integrado de Pragas, através da aplicação de várias técnicas de alto desempenho, possibilita o planejamento racional de novos inseticidas. Os receptores nucleares são importantes alvos na busca de novos inseticidas, destacando-se o receptor de ecdisteroides como um dos alvos mais importantes atualmente. Este receptor é uma proteína cuja ativação artificial é mediada por moléculas (ligantes) que se ligam ao seu sítio ativo, causando assim um efeito agonista ou antagonista ao hormônio natural, o 20-Hidroxiectdisônio. Ferramentas computacionais são de fundamental importância para o entendimento da interação receptor/ligante, possibilitando assim, o design de novas moléculas. Com isto, esta pesquisa teve como objetivo estabelecer um protocolo para transfecção de células de insetos com um plasmídeo sensível à atividade de receptor de ecdisteroides, comparar a atividade de ecdisteroides e dibenzoilhidrazinas, e novos compostos organocalcogênicos (estruturalmente semelhantes a dibenzoilhidrazinas), entendendo seu mecanismo de ação com o uso de ferramentas computacionais. Os bioensaios consistiram na transfecção de células das linhagens S2 (Diptera) e SF9 (Lepidoptera) com o plasmídeo B.act.ere.luc., planejado para expressar a enzima luciferase frente à ativação do receptor de ecdisteroides das células. Foram avaliadas a atividade dos hormônios 20-hidroxiectdisônio e Ponasterona-A, do inseticida comercial tebufenozide (dibenzoilhidrazina) e de onze novas moléculas organocalcogênicas, em linhagens celulares. Foram preparadas curvas de dose resposta com os dois hormônios e a tebufenozida. Com as novas moléculas, foi investigada a citotoxicidade, efeito agonista e antagonista. Para a atividade antagonista, o parâmetro estabelecido para uma molécula possuir considerável efeito foi a redução de  $\geq 50\%$  da atividade, comparando à ação do hormônio isolado. Posteriormente foram usados modelos tridimensionais para investigar as interações entre os ligantes e o sítio ativo do receptor de ecdisteroides das ordens Diptera e Lepidoptera. Concluiu-se que é possível utilizar o presente sistema de triagem em células, na busca de novas moléculas com atividade no receptor de ecdisteroides. Em ambas as linhagens celulares,

Ponasterona-A foi a molécula mais ativa, sendo que na linhagem SF9, a tebufenozida se mostrou mais ativa quando comparada a 20-Hidroxiectdisônio. Das novas moléculas testadas, nenhuma apresentou efeito agonista, entretanto, efeito antagonista foi observado apenas em células de Lepidoptera, com padrões diferentes conforme o hormônio utilizado. As interações observadas entre o receptor e as moléculas antagonistas servirão como base para o design racional de novas moléculas inseticidas.

**Palavras-chave:** dibenzoilhidrazina; 20-Hidroxiectdisônio; Ponasterona-A; tebufenozida; controle químico

## Abstract

PINTO, Ciro Pedro Guidotti. **Cell-based screening system for ecdysone receptor activation and rational insecticide design with association of computational approaches.** 2017 66f. Dissertation (Master degree) – Post-Graduation Program in Phytosanitary, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Applied cellular biotechnology is essential for Integrated Pest Management, because through several high performance techniques, it allows the rational planning of new insecticides. Nuclear receptors are important targets in the research for new insecticides, and the ecdysteroid receptor is one of the most important targets nowadays. This receptor is a protein whose artificial transactivation is mediated by molecules (ligands) that bind to its active site, thus causing an agonist or antagonistic effect on the hormone 20-hydroxyecdysone. Computational tools are of fundamental importance for the understanding of receptor/ligand interactions, thus enabling the design of new molecules. The aim of this research was to establish a protocol for transfection of insect cells with a plasmid sensitive to the activity of the ecdysone receptor, to compare the activity of ecdysteroids and dibenzoylhydrazines, and new organocalcogenic molecules (similar to dibenzoylhydrazines) understanding its mechanism of action with computational tools. Bioassays consisted of the transfection of S2 (Diptera) and SF9 (Lepidoptera) cell lines with the plasmid B.act.ere.luc., designed to express the luciferase enzyme against the activation of the receptor. The activity of the hormones 20-hydroxyecdysone and Ponasterone-A, the insecticide tebufenozide (dibenzoylhydrazine) and eleven new molecules of dibenzoylhydrazines in cell lines were evaluated. Dose response curves were prepared with the two hormones and tebufenozide. With the new molecules, the cytotoxicity, agonist and antagonist effect on ecdysteroids was investigated. To investigate the antagonistic activity of the new molecules on the ecdysteroids, the parameter established for a molecule have a considerable effect was the reduction of  $\geq 50\%$  of the activity, comparing to the action of the isolated hormone. Finally, using three-dimensional models, the interactions between ligands and the active site of the Diptera and Lepidoptera ecdysone receptor were investigated. It was concluded that it is possible to find new molecules with activity in the insect ecdysone receptor. In both cell lines, Ponasterone-A was the most active molecule, and in SF9, tebufenozide was more active than 20-Hydroxyecdysone. Among the new dibenzoylhydrazines tested, none showed an agonist effect. Antagonistic effect was observed only in Lepidoptera cells, but with different



patterns according to the hormone used. The antagonistic activity observed from some new molecules can be due to the fitting of them in the binding site from the ecdysone receptor, blocking important ligation among receptor and hormone.

**Key-words:** dibenzoylhydrazine; 20-Hydroxyecdysone; Ponasterone-A; tebufenozide; chemical control

## Lista de Figuras

- Figura 1. Compostos esteroidais e não esteroidais utilizados na triagem em células de Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9). As moléculas enumeradas de 1 a 11 correspondem a novas moléculas organocalcogênicas, semelhantes a dibenzoilhidrazinas sintetizadas no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da UFPel, já a tebufenozida, 20-Hidroxiecdisonio e Ponasterona-A foram provenientes de marcas comerciais. Fonte: Pinto (2017)..... 27
- Figura 2. Linhagens celulares cultivadas, utilizadas para os ensaios. A- Células de *Spodopera frugiperda* (SF9) em frasco de 75cm<sup>2</sup>, utilizados para a manutenção de tais células. B- Células de *Drosophila melanogaster* (S2) em frascos de 25cm<sup>2</sup>, utilizados para a manutenção de tais células. Fonte: Pinto (2017)..... 29
- Figura 3. Diagrama representando o plasmídeo repórter contendo o gene da Luciferase. Fonte: Adaptado de Swevers et al. (2004)..... 30
- Figura 4. Colônias de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo B.act.ere.luc. em placa de petri contendo meio LB e ampicilina. Apenas bactérias que absorveram o plasmídeo foram capazes de formar colônias. Ao lado, fotodocumentação do PCR de colônia realizado com 20 colônias selecionadas. Fonte: Pinto (2017)..... 32
- Figura 5. Integridade do plasmídeo B.act.ere.luc. verificada em corrida eletroforética em gel de agarose (1%). Fonte Pinto (2017)..... 32
- Figura 6. Material utilizado para a transfecção de células. Placas de 24 poços contendo tratamentos com diferentes concentrações das moléculas. Fonte: Pinto (2017)..... 34
- Figura 7. Viabilidade celular das linhagens S2 e SF9 frente à exposição das novas moléculas (1-11) em três concentrações molares (0,0001; 0,00001 e 0,000001). Os controles positivos (C) foram as mesmas três concentrações de 20-Hidroxiexdisônio. O eixo Y representa as concentrações molares, as quais constituem cada bloco, dentro dos quais encontram-se as onze novas moléculas e o controle com 20-Hidroxiexdisônio. As barras representam o erro padrão das

	replicatas técnicas. Os asteriscos indicam diferença significativa da absorvância medida em comparação ao controle dentro de cada concentração (teste <i>t</i> , $p < 0,05$ ). Fonte: Pinto (2017).....	39
Figura 8.	Curvas sigmoides de dose-resposta referentes a atividade de dois ecdisteroides (20-Hidroxiectdisônio e Ponasterona-A) e de um agonista não esteroidal (Tebufenozida) em células S2 e SF9. Barras correspondem ao erro padrão da média ( $n = 4$ ). Fonte: Pinto (2017).....	40
Figura 9.	Efeito agonista observado para onze novas moléculas nas linhagens celulares S2 e SF9. A atividade agonista das moléculas na concentração de 100µM foram comparadas com a mesma concentração do hormônio 20-Hidroxiectdisônio (20H). Os asteriscos indicam diferença significativa da luminescência medida em comparação ao controle com 20-Hidroxiectdisônio (teste <i>t</i> , $p < 0,05$ ). Fonte: Pinto (2017).....	43
Figura 10.	Inibição da atividade dos ecdisteroides Ponasterona-A e 20-Hidroxiectdisônio em células SF9 frente à adição das novas moléculas. Em todos os tratamentos foi adicionado 100µM do hormônio, sendo que para os tratamentos que não o controle, foi adicionado 100µM das respectivas moléculas antes da adição do hormônio (~16 horas). O eixo Y representa a porcentagem de atividade hormonal, sendo o 100% representa a média da atividade máxima do hormônio. Fonte: Pinto (2017).....	44
Figura 11.	Inibição da atividade dos ecdisteroides Ponasterona-A e 20-Hidroxiectdisônio em células S2 frente à adição das novas moléculas. Em todos os tratamentos foi adicionado 100µM do hormônio, sendo que para os tratamentos que não o controle, foi adicionado 100µM das respectivas moléculas antes da adição do hormônio (~16 horas). O eixo Y representa a porcentagem de atividade hormonal, sendo o 100% representa a média da atividade máxima do hormônio. Fonte: Pinto (2017).....	45
Figura 12.	Design gráfico representando os quatro principais fatores transcricionais responsáveis pela ecdise dos insetos. Azul- Ultraespiráculo; Amarelo- Coativador fosfolipídico; Vermelho- Receptor de ecdisteroides; Verde- Ectdisônio. Fonte: Pinto (2017)..	46
Figura 13.	Diagrama dos receptores de ecdisteroides de Hemiptera (A- 1Z5X) complexado com Ponasterona-A e Lepidoptera (B- 3IXP) complexado com uma Dibenzoilhidrazina. A figura ilustra a estrutura similar de receptores de ecdisteroides de distintas ordens de Insecta. As doze diferentes α-hélices estão ilustradas com diferentes cores e enumeradas de H1-H12. Cada receptor também apresenta duas β-folhas, enumeradas de β1-β2. As letras N e C representam o terminal-C e terminal-N, respectivamente. Fonte: Pinto (2017).....	48

- Figura 14. Cavidade de ligação dos ecdisteroides dentro do receptor. Na imagem Ponasterona-A está ancorada no receptor de ecdisteroides de Lepidoptera (A) e Diptera (B). Os dois lobos localizados na porção superior da cavidade são indicados por um sol (lado esquerdo) e por uma estrela (lado direito). No receptor de Lepidoptera (A) é possível observar o lobo esquerdo saliente, sítio o qual ligam-se as dibendoilhidrazinas. Autor: Pinto (2017)..... 49
- Figura 15. Pontes de hidrogênio formadas pelos compostos esteroidais 20-Hidroxiectdisônio e Ponasterona-A no receptor de ecdisteroides de Lepidoptera (A) e Diptera (B). As linhas tracejadas em verde representam as pontes de hidrogênio enquanto que os aminoácidos da cavidade de ligação em que o esteroide se liga estão rotulados com sua sigla e numeração ordinal conforme o receptor. Autor: Pinto (2017)..... 50
- Figura 16. Sobreposição dos sítios de ligação de dibenzoilhidrazinas e ecdisteroides em receptor de ecdisteroides de Lepidoptera. Na figura A uma visão macro do receptor de ecdisteroides com as duas moléculas complexadas. Na figura B uma visão detalhada da sobreposição dos sítios de ligação. A área circulada em vermelho corresponde ao local exato onde ocorre a sobreposição dos sítios de ligação do anel A dibenzoilhidrazinas e da cadeia alifática ecdisteroides. Fonte: Pinto (2017)..... 51
- Figura 17. Interface gráfica da possível interação entre a tebufenozida e o receptor de ecdisteroides de *Drosophila melanogaster*. Está ilustrado o resultado da simulação da forma com que a tebufenozida se liga no receptor de ecdisteroides de Diptera. Foi realizada a sobreposição de tebufenozida e Ponasterona-A. Ressalta-se que não há a cavidade extra, como ocorre em lepidópteros. Na figura da direita estão as ligações hidrofílicas e hidrofóbicas que ocorrem entre tebufenozida e o receptor de ecdisteroides de Diptera. Autor: Pinto (2017)..... 52
- Figura 18. Interferência das interações entre os aminoácidos (AA's) do receptor e os ecdisteroides de Lepidoptera e os respectivos ecdisteroides, mediada pelas novas moléculas antagonistas. Os aminoácidos destacados em verde interagem tanto com as respectivas novas moléculas e o 20-Hidroxiectdisônio. Já os aminoácidos destacados em vermelho compartilham de interação com as novas moléculas e Ponasterona-A. Autor: Pinto (2017)..... 53

## 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..... 28
- Tabela 2. Atividade agonista de 20-Hidroxiecdisonio (20H), Ponasterona-A (Pona) e Tebufenozida (Tebu) em células embrionias de *D. melanogaster* (S2) e *S. frugiperda* (SF9)..... 42
- Tabela 3. Estruturas tridimensionais receptores nucleares de insetos, reveladas por difração de raio-X disponíveis no PDB (<http://www.rcsb.org/>)..... 46

## Sumário

1. Introdução geral .....	13
2. Revisão de Literatura .....	17
2.1. A Importância do controle químico de pragas .....	17
2.2. Inseticidas e seus modos de ação .....	17
2.3. Planejamento racional de inseticidas .....	19
2.4. Triagem de novas moléculas em receptores de ecdisteroides .....	21
2.5. Métodos computacionais.....	23
2.6. Validação da atividade inseticida de agonistas/antagonistas em teste de toxicidade <i>in vivo</i> . .....	24
3. Materiais e Métodos .....	26
3.1. Compostos químicos .....	26
3.2. Linhagens celulares .....	29
3.3. Plasmídeo repórter .....	30
3.4. Síntese de moléculas .....	33
3.5. Transfecção nas células.....	33
3.6. Viabilidade celular .....	34
3.7. Bioensaios para agonistas/antagonistas a ecdisteroides .....	36
3.8. Modelagem tridimensional (3D) de receptor de ecdisteroides de Diptera e Lepidoptera .....	37
4. Resultados e Discussão .....	38
5. Conclusões.....	56
6. Referências bibliográficas .....	57

## 1. Introdução geral

O desafio de produzir alimento e energia suficiente para suprir a demanda populacional, a qual sofre constante expansão, e a preocupação com a qualidade deste alimento, regem a necessidade potencializar a utilização das áreas agrícolas e de aumentar da eficiência no controle dos insetos-praga. No sentido de manter e/ou aumentar uma alta produtividade, os cultivos agrícolas devem ser protegidos das pragas, e para isso há um grande enfoque no desenvolvimento de ferramentas que visam controlar insetos, tais como controle químico com inseticidas, plantas geneticamente modificadas, resistência de hospedeiros, práticas culturais e controle biológico (RECHICIGL; RECHICIGL, 2000).

Existem inúmeros fatores que favorecem o estabelecimento e proliferação das pragas nos mais diversos agroecossistemas, devendo-se salientar as mudanças climáticas, que poderão fazer com que os insetos praga tenham mais gerações por ano, tornando seu ataque e dispersão mais intensos (LICHTFOUSE, 2010). As perdas potenciais sem a utilização de agroquímicos como medida de supressão de pragas podem chegar a 50% (DREWES et al., 2012), mas deve-se ressaltar que a eficiência do controle não depende do aumento no uso de pesticidas sintéticos, mas sim do uso de produtos adequados quando estes se fazem necessário.

O conhecimento da fisiologia de insetos, toxicologia e biotecnologia podem ajudar na harmonização holística do controle de pragas, utilizando tanto métodos biológicos e químicos. Desta forma, maneiras de reduzir o uso de pesticidas sintéticos, descobertas de novas moléculas ambientalmente aceitáveis, o desenvolvimento de inseticidas planejados de forma racional bem como o uso de novos métodos de controle de pragas serão os grandes desafios enfrentados pelo Manejo Integrado de Pragas (MIP) neste século.

Atualmente existem aproximadamente 30 alvos de atuação dos inseticidas atuam. Conforme o Comitê de Ação à Resistência de Inseticidas (IRAC, 2016), os produtos são agrupados de acordo com seu modo de ação primário. Todos os inseticidas com mecanismo de ação conhecidos atuam em proteínas, válido também para inseticidas biológicos. Estas proteínas são

conhecidas como alvos, sendo que sua identificação é crucial no planejamento racional de uma molécula inseticida. Um dos reflexos da falta de novos mecanismos de ação consiste na a resistência de insetos a inseticidas sendo um dos maiores desafios na produção agrícola e a proteção da saúde animal e humana, com mais de 550 espécies de insetos catalogadas como resistentes (APRD, 2016).

A maioria das espécies resistentes a inseticidas apresentam importância agrícola, entretanto outros são de importância médica e/ou veterinária. A maioria dos casos reportados estão relacionados aos inseticidas do grupo dos organofosforados e organoclorados, pois, os quais têm sido intensamente usadas no controle de pragas há quase meio século (COATES et al., 2016). Um fato interessante de ser abordado é que a indústria farmacêutica tem aproximadamente 1000 alvos terapêuticos que podem ser utilizados no planejamento de novas moléculas (fármacos), enquanto que a indústria de agroquímicos tem aproximadamente 30 alvos sendo explorados (OCIO et al., 2014; IRAC, 2016).

Um objeto que tem sido foco de muitas pesquisas de novos inseticidas são os ecdisteroides, os quais são hormônios com função fundamental em diversos processos fisiológicos nos artrópodes, tais como embriogênese, muda, metamorfose, reprodução e diapausa (KAMIMURA et al., 2014).

O 20-Hidroxiecdisonio é o ecdisteroide mais representativo da classe insecta (ZOTTI et al., 2013a). A base molecular da ação de ecdisteroides envolve um complexo proteico heterodímero formado pelo receptor de ecdisteroides e ultraespiráculo, ambos fatores transcricionais pertencentes à superfamília de receptores nucleares proteicos (HILL et al., 2012). O complexo receptor de ecdisteroides/USP/ecdisteroide liga-se à elementos de resposta específicos, localizados em regiões promotoras do genoma, o que provoca uma “cascata” de indução de genes responsáveis pelo processo de ecdise (SWEVERS; SMAGGHE, 2016).

Há pouco mais de duas décadas, foram descobertas, a partir de produtos biosintéticos, moléculas não esteroidais com estrutura de diacilhidrazina ou dibenzoilhidrazina, que apresentaram atividade agonista aos ecdisteroides (WING, 1988). O desenvolvimento de agonistas/antagonistas a ecdisteroides, tornou-se uma estratégia atrativa no controle de artrópodes, uma



vez que compostos atuantes com tal modo de ação apresentam espectro restrito apenas aos artrópodes. Dentre as dibenzoilhidrazinas descobertas até hoje, apenas quatro são inseticidas comerciais, sendo estas: tebufenozida, methoxifenozida, chromatofenozida e halofenozida. Estas moléculas apresentam atividade sobre lepidópteros, sendo que halofenozida também tem atividade em coleópteros (SMAGGHE et al., 2012). Estudos estruturais demonstram que nos lepidópteros há uma extensão no sítio de ligação dos ecdisteroides, formando assim, uma segunda cavidade neste sítio do receptor de ecdisteroides (CARMICHAEL et al., 2005).

O desenvolvimento de moléculas tendo como alvo o receptor de ecdisteroides tornou-se atrativo, pois compostos atuantes neste receptor ficam com o espectro restrito a insetos e outros artrópodes. Este fato permitiu o desenvolvimento de compostos agonistas de ecdisteroides com uma estrutura de benzoil-hidrazina (não esteroidal), chamados tebufenozida, metoxifenozida, cromafenozida, halofenozida e fufenozida (SMAGGHE et al., 2012). Atualmente, inseticidas comerciais com estrutura não esteroidal (dibenzoilhidrazinas) ativos no receptor de ecdisteroides estão disponíveis no mercado, sendo que ecdisteroides ainda são alvo de estudo para desenvolvimento de novos inseticidas. O desenvolvimento racional de inseticidas inócuos para organismos não alvo depende da existência de receptores específicos nos insetos, como o caso do receptor de ecdisteroides, e de um robusto sistema de triagem de alto desempenho (*High throughput screening- HTS*).

A era da entomologia molecular e a clonagem de genes trouxe o conhecimento da estrutura e função de proteínas que são alvos no planejamento racional de novos inseticidas. Ainda, a genômica de insetos tem grande potencial para o desenvolvimento de estratégias aplicadas no controle de pragas. O grande marco histórico da genômica de insetos foi a publicação do trabalho de Adams et al. (2000), os quais revelaram o genoma completo de *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (Diptera: Drosophilidae). Atualmente, o sequenciamento de genomas consiste em uma técnica rotineira aplicada em muitos laboratórios de entomologia molecular. Como reflexo, atualmente estão disponíveis o genoma de 219 insetos, incluindo muitos insetos-praga que estão finalizados ou em andamento (NCBI, 2016).

A disponibilidade em acessar todo o genoma de uma espécie de inseto na tela do computador, contendo todos os genes, proteínas e processos interligados, é sem dúvida, uma grande oportunidade para entendermos de forma ampla estes animais. A manipulação desta informação, pode ser usada em estudos básicos como genética de populações, estudos sobre evolução ou filogenia, mapeamento gênico, e expressão gênica, ou ainda em outros temas extremamente aplicados como no planejamento racional de inseticidas. A biotecnologia celular de insetos pode ser aplicada no desenvolvimento de sistema de triagem de alto desempenho com a utilização de culturas celulares de insetos que expressem de maneira endógena os alvos em potencial para novos inseticidas, como os receptores nucleares (ZOTTI et al., 2013a). Desta forma, uma das vantagens da utilização de cultura celular é de que a célula secreta de forma endógena todos os componentes necessários para o funcionamento do organismo (ZOTTI et al., 2013b). Ainda, a cultura celular de insetos poderá ser utilizada de maneira substitutiva aos bioensaios convencionais, onde é utilizado o organismo inteiro do inseto para avaliação.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos: 1- estabelecer um protocolo para avaliar a atividade agonista/antagonista de moléculas sobre o receptor de ecdisteroides em células de Lepidoptera e Diptera por meio de um sistema de triagem; 2- comparar a atividade de diferentes hormônios e tebufenozida nas células com plasmídeo específico e reativo para agonistas/antagonistas do receptor de ecdisteroides; 3- Integrar conhecimentos de bioinformática estrutural para elucidar as interações ligante/receptor de ecdisteroides.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. A Importância do controle químico de pragas

Desde os primórdios da agricultura, o ser humano tem se preocupado em proteger suas lavouras contra os fatores bióticos que comprometem a produção. A devastação das lavouras causadas por plantas daninhas, doenças e insetos são documentadas inclusive em passagens bíblicas. Muitos dos problemas da agricultura poderiam ser resolvidos a longo prazo, mas com o constante aumento populacional, o qual estima-se uma população de 9 bilhões de pessoas em 2050 (LAMBERTH et al., 2013), permanece o maior desafio da agricultura moderna, o qual é fornecer alimento seguro e em quantidade suficiente para a população (WIEBE, 2009). As mudanças climáticas poderão fazer com que insetos praga tenham mais ciclos por ano, aumentando assim sua capacidade de infestação e dispersão. Outro fato importante de ressaltar é que as pragas poderão se adaptar a mais culturas de forma mais rápida, caso o clima for favorável (LICHTFOUSE, 2010).

É de suma importância para o planeta a preservação de áreas selvagens, essencial para a manutenção da biodiversidade, sendo assim, as áreas agriculturáveis se tornam limitadas, motivo o qual resplandece ainda mais a importância da otimização das áreas já exploradas pela agricultura (OERKE, 2006). Até 2020, estima-se um aumento de apenas 20% da produção agropecuária mundial decorrente da expansão da área explorada (PINSTRUP-ANDERSEN, 2000), assim, aumentar a produtividade nas atuais áreas agrícolas existentes é a estratégia mais sustentável. O MIP utiliza métodos tradicionais e modernos na proteção das culturas agrícolas, garantindo a produtividade das culturas no mundo todo, e assegurando a produção mundial de alimentos, pois sem o devido controle das pragas agrícolas, as perdas seriam incalculáveis (OERKE, 2006).

### 2.2. Inseticidas e seus modos de ação

O conhecimento da fisiologia de insetos, toxicologia e biotecnologia podem auxiliar na realização de uma harmonização holística no controle de pragas, utilizando métodos biológicos e químicos. Sendo assim, maneiras de reduzir o uso de pesticidas sintéticos na proteção de plantas, descoberta de

novas moléculas ambientalmente aceitáveis, inseticidas planejados de forma racional bem como o uso de novos métodos de controle de pragas serão os grandes desafios enfrentados pelo MIP neste século (ZOTTI et al., 2013b).

Estima-se um aumento no uso de inseticidas nos mais diversos agroecossistemas, sendo que este aumento provavelmente será mais acentuado nos países em desenvolvimento (SCHREINEMACHERS; TIPRAQSA, 2012). Contudo, o aumento na eficiência de controle não dependerá do aumento no uso de pesticidas sintéticos mas, exclusivamente, pelo uso de produtos adequados quando for necessário. Para esta proposta, uso de substâncias naturais e a melhoria das já existentes no desenvolvimento racional de moléculas com ação inseticida, seletiva para pragas com pouco ou nenhum efeito aos organismos não alvos e mamíferos deverão fazer parte das ferramentas utilizadas pelo MIP, maximizando assim, a flexibilidade, precisão e sustentabilidade da proteção dos cultivos (LAMBERTH et al., 2013).

Assim, a descoberta de novas moléculas com a formulação química melhorada, seguros para o ambiente, ativos para insetos-praga e atóxicos para insetos benéficos, mamíferos e organismos não alvos é de fundamental importância, para a continuidade da produção agrícola e das reservas de alimentos. Nos dias atuais parte dos inseticidas utilizados são aqueles com mecanismos de ação descobertos há quase 50 anos, geralmente tóxicos para muitos organismos não-alvo e de difícil degradação ambiental (DELANEY; CLARKE, 2006).

Nas últimas décadas inseticidas com princípio ativo e formulações melhoradas têm sido desenvolvidos, incluindo tebufenozida, piriproxifen, lufenuron, teflubenzuron e novaluron, os quais são alguns dos principais reguladores de crescimento disponíveis no mercado (ZOTTI et al., 2013a). Lufenuron, teflubenzuron, e novaluron são Benzoilfenilureas, também conhecidos como inibidores de síntese de quitina, sendo assim, seu modo de ação consiste em inibir a produção de quitina, o principal componente do exoesqueleto dos insetos (DHADIALLA et al., 2009). A tebufenozida interage com o receptor do hormônio de muda, induzindo a ecdise prematura e incompleta (SMAGGHE et al., 2013). O piriproxifen é um mímico do hormônio juvenil, este princípio ativo interfere o balanço hormonal e provoca uma forte

supressão da embriogênese, metamorfose e formação dos caracteres do inseto adulto (DHADIALLA et al., 2009).

O chlorantraniliprole atua como modulador dos receptores de rianodina no músculo dos insetos, provocando a liberação descontrolada de cálcio do retículo sarcoplasmático, causando uma forte contração muscular que leva o inseto à inanição (LAHM et al., 2007). Para os inimigos naturais, os reguladores de crescimento são considerados mais seguros do que os inseticidas neurotóxicos de largo espectro de ação devido a sua especificidade nos alvos bioquímicos decorrente do seu planejamento racional (DARVAS; POLGAR, 1998). Mesmo assim, a suposta segurança e compatibilidade para organismos benéficos devem ser avaliados com testes de seletividade, tanto para o registro de novos produtos como para utilização no MIP (BUENO; FREITAS, 2004).

### 2.3. Planejamento racional de inseticidas

Para subjugar os desafios da agricultura moderna, muitos enfoques multidisciplinares são necessários para o processo de desenvolvimento de novos agrotóxicos. Coletivamente estes enfoques formam a base para o design racional de inseticidas (MANDAL et al., 2009). O planejamento racional de inseticidas é essencialmente o inverso do método empírico. Inicialmente é identificado um alvo, uma proteína, um canal, então utilizando os princípios da química orgânica, mecânica molecular e computação, é realizada a síntese de compostos que potencialmente inibirão/competirão pelo alvo, finalmente os compostos serão testados em processo de triagem *in vivo* ou *in vitro* (BORDAS et al., 2003).

A maioria dos estudos de moléculas primárias de agroquímicos consistem basicamente em estudos preliminares. Este modo de pesquisa é limitado ao entendimento do modo de ação e sítios onde tais moléculas irão agir *in vitro*, assim como enzimas ou receptores (GOOSEY, 1992). Para alavancar a descoberta de novas moléculas, atualmente, muitas técnicas de triagem têm sido desenvolvidas. Com respeito aos aspectos que essas novas tecnologias visam, pode-se mencionar novos mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) (MINGYUE et al., 2013).

O alvo em que o agroquímico irá agir consiste de uma biomolécula que exerce de sinalização em alguma rota metabólica essencial para o correto desenvolvimento do inseto. Sendo assim, a identificação do alvo é o primeiro passo no desenvolvimento de inseticidas (MANDAL et al., 2009).

É desconhecido o quanto poderemos explorar o genoma dos insetos, tal como possíveis sítios bioquímicos alvos de inseticidas. A grande vantagem de explorarmos novos sítios bioquímicos para ação de inseticidas utilizando o genoma do inseto praga, consiste na capacidade de avaliar a toxicidade comparativa entre o organismo alvo e não alvo, ocorrendo assim à racionalização do inseticida. Atualmente o genoma total de dezenas de espécies de insetos, incluindo pragas como *Tribolium castaneum* (Herbst., 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), foram devidamente sequenciados e estão disponível para buscas de sequências e proteínas nos bancos de dados (NCBI, 2016).

A exploração de diferenças intrínsecas de cada alvo visa a especificidade da molécula planejada. Este procedimento direcionado exclusivamente para um alvo em específico, tal como um receptor nuclear ou uma enzima, tem contribuído para o desenvolvimento de procedimentos de triagem de alto desempenho. O sucesso desta estratégia é demonstrado pelos vários inseticidas reguladores de crescimento que interferem na regulação endócrina do crescimento. Os reguladores de crescimento podem interferir no desenvolvimento e reprodução (tebufenozida, metoxifenozida), mimetizar o hormônio juvenil (metopreno, fenozicarbe) e inibir a síntese de quitina (benzoilfenilureias). Ainda, surgiram outros que atuam especificamente no sistema nervoso, metabolismo de energia (piridilil) e nos músculos (neonicotinoides, espinosinas, avermectinas) (HILL et al., 2012).

Os ecdisteroides junto ao hormônio juvenil, regulam grande parte dos processos fisiológicos e bioquímicos durante o ciclo de vida em insetos. Estes hormônios coordenam os processos de muda e metamorfose, enquanto os hormônios juvenis decidem o resultado final do processo fisiológico. Novos inseticidas que mimetizam a ação de ecdisteroides, como o 20-Hidroxiectdisônio, e de hormônio juvenil, como o metopreno, foram desenvolvidos nas últimas três décadas (DHADIALLA et al., 1998).

A capacidade de testar grandes grupos de compostos contra possíveis sítios bioquímicos oferece vantagens na busca de novos inseticidas. Esta estratégia pode ser efetiva na busca de novos compostos ativos para um sítio bioquímico, onde apenas síntese de análogos não teve sucesso. Ainda, o acesso a grandes 'bibliotecas químicas' presentes em extratos de plantas-inseticida onde o pesquisador na busca de novos inseticidas, pode identificar os poucos que interagem com o alvo bioquímico, fornecendo aos cientistas novos 'esqueletos' moleculares possíveis de serem explorados. Este novo esqueleto poderá ser otimizado para uma maior potência sobre o inseto praga de interesse, ainda podemos utilizar suas características físico-químicas para racionalizá-lo tornando assim mais ativo para o organismo alvo e menos ativo para organismos não alvos (MERCIER; POWERS, 2005).

#### 2.4. Triagem de novas moléculas em receptores de ecdisteroides

Os avanços na biologia molecular têm conduzido a um surpreendente aumento no número de receptores inexplorados que foram descobertos e clonados, sendo que para estes, os ligantes e mecanismos celulares eram desconhecidos e agora são potenciais alvos para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas (STADEL et al., 1997). Pesquisas de agroquímicos a nível celular com alto desempenho iniciaram com várias espécies como modelo, cada qual escolhida com base na facilidade de acessar seu genoma ou interesse acadêmico.

Como já citado, o primeiro inseto com o genoma completamente sequenciado foi *D. melanogaster* (ADAMS et al., 2000), espécie na qual se realizam muitos estudos em genética e biologia molecular, incluindo pesquisas para desenvolvimento de inseticidas com base nos receptores nucleares.

Em biologia molecular, um repórter é um gene construído e ligado a sequência regulatória do outro gene de interesse. Certos repórteres são escolhidos pela sua fácil identificação nos organismos onde está sendo expresso, portanto usados para identificar se determinado gene está sendo expresso em células ou organismos (KOO et al., 2007). Estes genes repórter podem ser facilmente transfectado em células do organismo que se deseja fazer a triagem por compostos ativos. A confiabilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, adaptabilidade nos sistemas de triagem de compostos de alto

rendimento baseados em linhagens celulares transfectadas os tornam atrativos para investigação de mecanismos de interação ligante-receptor (NAYLOR, 1999). Sem dúvida a grande vantagem de utilizarmos células transfectadas com o repórter é que células secretam de forma endógena todos os componentes necessários para ativação e transativação do receptor tal como co-repressores e coativadores bem como possui toda a 'maquinaria' celular nativa da espécie em estudo.

Um sistema de triagem em células foi recentemente adaptado para o formato *High Throughput Screening* para o receptor de ecdisteroides, importante receptor nuclear presente em todos os 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., 2013b). Ainda foi adicionado a esse plasmídeo repórter sete cópias da sequência conhecida do elemento resposta do ecdisônio de *D. melanogaster*, sendo que esta interage com o receptor nuclear receptor de ecdisteroides em virtualmente todos os artrópodes.

Assim, devido ao fato de que todos os receptores de ecdisteroides de artrópodes são capazes de interagir com o mesmo elemento de resposta, tudo que é necessário para o desenvolvimento de um sistema de *screening* (triagem) em células tendo como alvo o receptor nuclear receptor de ecdisteroides, 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 triagem específico para uma ordem em particular ou espécie (ZOTTI et al., 2013a).

As dibenzoilhidrazinas foram os primeiros agonistas não esteroides atuantes no receptor do ecdisônio (WING; ALLER, 1990). Em muitas espécies de lepidópteros expostas para estes compostos inicia-se uma muda prematura, que é caracterizada pelo deslocamento da cápsula cefálica, ocluindo as peças bucais, prevenindo a alimentação (DHADIALLA et al., 1998).

Várias moléculas de dibenzoilhidrazinas foram desenvolvidas, incluindo tebufenozida, methoxifenozida, cloromafenozida e halofenozida. Apesar do fato que a maioria dos insetos utilizam 20-Hidroxiecdisonio como hormônio natural, a suscetibilidade para inseticidas não esteróides agonistas do ecdisônio demonstra especificidade para certas espécies. Por exemplo, halofenozida e RH-5849 apresentam grande atividade para coleópteros, tal como para



*Lepinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) (SMAGGHE; DEGHELLE, 1993), enquanto cloromafenzida, tebufenzida e metoxifenzida apresentam potência extremamente baixa para coleópteros (SMAGGHE; DEGHELLE, 1994). Entretanto, cloromafenzida, tebufenzida e methozifenzida são, no geral, altamente tóxicos para os insetos da ordem Lepidoptera (SMAGGHE et al., 1999). Todos esses inseticidas são inativos para hemípteros, tal como *Bemisia tabaci* (Genn., 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) (GRAHAM et al., 2007), e desta forma não podem ser usados para o controle de certos insetos-praga. A estrutura tridimensional do receptor de ecdisteroides de *B. tabaci* foi resolvida por Carmichael et al. (2005), e as coordenadas atômicas estão disponíveis no banco de dados de proteínas (PDB) sob número 1z5x. Desta forma a exploração de novas moléculas não esteroides agonistas do ecdisônio ou análogos das atuais já utilizadas poderão ser exploradas com maior segurança e confiança em receptor de ecdisteroides de diversas ordens de insetos.

## 2.5. Métodos computacionais

Com o rápido crescimento dos estudos envolvendo biologia molecular e biologia estrutural, o design molecular com softwares se tornou de grande valia para o entendimento das reações bioquímicas e para o design racional de agroquímicos (GONG et al., 2012). Com esta nova estratégia é possível a projeção de compostos com características definidas e complementares ao local de atuação evitando os altos custos na síntese experimental exploratória de grande número de substâncias. Nos últimos anos os avanços nas áreas de genômica e bioinformática têm permitido a identificação de genes que codificam para centenas de milhares de proteínas muitas delas alvos potenciais para o desenvolvimento de moléculas. Interessante que todas as ferramentas computacionais bem como o aspecto farmacodinâmico utilizados para planejamento de pesticidas são praticamente os mesmos daqueles utilizados na química medicinal (BORDAS et al., 2003).

Os estudos baseados no ligante incluem a relação quantitativa entre estrutura e atividade ou QSAR (*Quantitative structure-activity relationships*) e a relação quantitativa tridimensional entre estrutura e atividade (3D-QSAR), incluindo a análise molecular comparativa ou CoMFA (*comparative molecular*

*field analysis*) e a análise molecular comparativa de índices de similaridade, ou CoMSIA (*comparative molecular similarity indices analysis*) (JITONNOM, 2014). Desta forma, tanto métodos estruturais como os baseados no ligante, são poderosas ferramentas computacionais utilizadas na descoberta de agroquímicos e no entendimento das relações entre estruturas e atividade para os vários inseticidas existentes (SAINI; KUMAR, 2014).

Os chamados “modelos *in silico*” têm sido utilizados para o design e descoberta de fármacos desde os anos 70. Também, têm ocorrido uma mudança dramática na pesquisa de agroquímicos ao longo dos anos, se tornando assim, multidisciplinar e convergindo ao ponto em que a pesquisa de agroquímicos e fármacos não diferenciam drasticamente. Na década de 90 foram desenvolvidos sistemas de triagem de alto desempenho, química combinatória, design com base em estruturas químicas, triagem virtual de compostos químicos em receptores específicos e vários outros enfoques de grande importância acadêmica (LAMBERTH et al., 2013).

A identificação de especificidades moleculares é indispensável para a obtenção de dados precisos das atividades bioquímicas de organismos, especialmente de compostos que tenham atividade no mesmo alvo biológico. Conformações tridimensionais revelam interações críticas de ligantes, sendo que para a obtenção de tal informação, a estrutura tridimensional do receptor deve estar disponível (SCHLEIFER, 2012).

A descoberta do complexo proteína/ligante é uma ferramenta computacional, quem vem se tornando muito importante na descoberta de agroquímicos. O chamado “Molecular docking” é utilizado para prever a atividade do complexo ligante/alvo e a interação dos mesmos (RIPPHAUSEN et al., 2010). O ponto chave da utilização de ferramentas computacionais está na agilidade da identificação virtual de moléculas com potencial inseticida, reduzindo assim os custos da pesquisa e aumentando extremamente a rapidez na identificação de moléculas (BREDEL; JACOBY, 2004).

## 2.6. Validação da atividade inseticida de agonistas/antagonistas em teste de toxicidade *in vivo*.

As dibenzoilhidrazinas comerciais registradas no Brasil (tebufenozida, metoxifenozida e cromatofenozida) exercem sua atividade induzindo

prematuramente a ecdise em lepidópteros, levando o inseto à morte por dissecação e inanição (NAKAGAWA, 2005). Algumas horas após a aplicação de um agonista sobre a lagarta, no caso dos lepidópteros, a larva para de se alimentar e o processo de apólise é iniciado na epiderme larval, similarmente ao que acontece frente à ação hormônio natural 20-Hidroxiectdisônio (SMAGGHE et al., 2013).

Devido suas propriedades químicas, as dibenzoilhidrazinas não são eliminadas facilmente do organismo do inseto, tornando o processo de ecdise ininterrupto, colapsando organismo do inseto. Assim, larvas tratadas com agonistas a ecdisteroides tornam-se estagnadas no processo de ecdise e morrem dissecação e inanição, sendo que uma característica deste mecanismo de ação é a formação de cutícula dupla (SWEVERS; SMAGGHE, 2016). Uma vez que o receptor de ecdisteroides de lepidópteros é ativado pelas dibenzoilhidrazinas com eficiência, as lagartas são bastante sensíveis às aplicações destas moléculas. Contudo, produtos à base de halofenozida também agem no controle de coleópteros (SMAGGHE et al., 2013).

O MIP é um amplo conceito que envolve diversas áreas da agricultura, sendo que atualmente a biologia molecular pode ser inserida em tal conceito. Muitos inseticidas têm se tornado ineficazes no controle de artrópodes pragas em decorrência da inadequada utilização dos produtos disponíveis no mercado, causando assim, uma série de complicações de ordem toxicológica e ambientais. O design racional de inseticidas abrange diversas áreas da biologia molecular e bioinformática, cujo intuito é buscar compostos com ação em alvos específicos. Conforme características físico-químicas dos receptores s, é possível descobrir o modo de ação de novas moléculas de acordo com as interações no sítio ativo de tais receptores. Um dos principais receptores nucleares que se têm estudado são os receptores de ecdisteroides. Tal receptor pode ser ativado com moléculas sintéticas específicas e análogas à hormônios naturais, como o 20-Hidroxiectdisônio, levando o organismo da praga ao colapso. As instituições de pesquisa têm empregado esforços para buscar moléculas ativas em receptores de ecdisteroides, sendo que futuramente, poderão haver mais opções para o controle químico e racional de pragas, conformando assim, uma agricultura cada vez mais ambientalmente aceitável e sustentável.

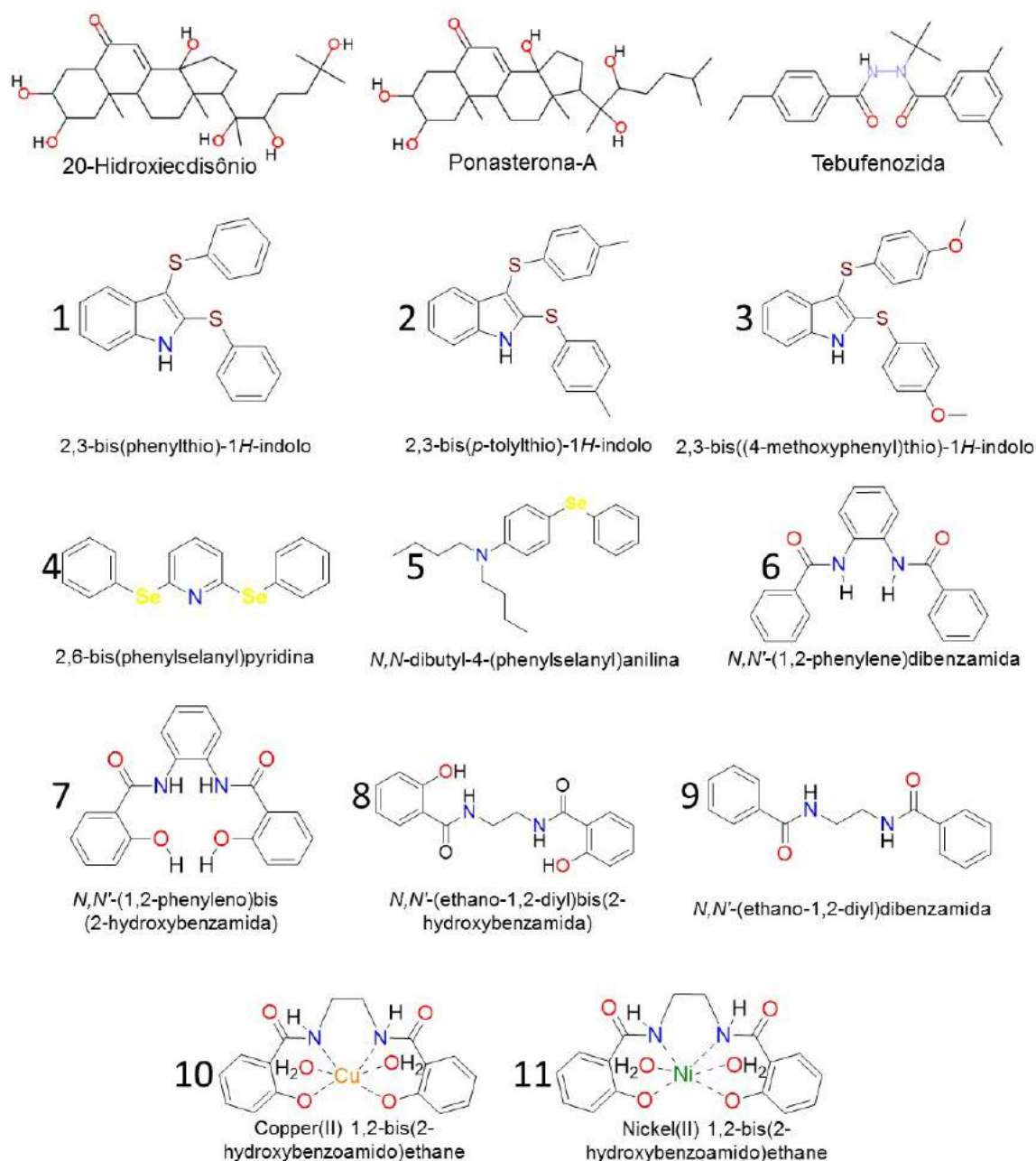
### 3. Materiais e Métodos

A metodologia descrita no presente trabalho foi adaptada de Zotti et al. (2013a) e Soin et al. (2010a). O estabelecimento do protocolo de triagem e a viabilidade celular frente a adição das moléculas foi realizado no Laboratório de Agrozoologia da Faculdade de Engenharia da Biociência da Universidade de Gent, West Flanders, Bélgica. Os experimentos com os hormônios, tebufenozida e de triagem de novas moléculas nas culturas celulares de Diptera e Lepidoptera foram estabelecidos no Laboratório de Agrozoologia da Universidade de Gent e no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas. Para cada linhagem celular utilizada, adaptações metodológicas específicas foram determinadas. As moléculas foram testadas em sua forma de ingrediente ativo, pois se encontravam na forma pura. Foi determinada a atividade das moléculas no receptor de ecdisteroides das células com uso de um plasmídeo repórter, sendo que a interação foi elucidada utilizando-se estruturas tridimensionais dos receptores.

#### 3.1. Compostos químicos

Onze novas moléculas de organocalcogênicos (estruturalmente semelhantes a dibenzoilhidrazinas com ~95% de pureza) foram sintetizadas e purificadas no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LabSOL) da Universidade Federal de Pelotas. Os ecdisteroides Ponasterona-A ( $\geq 65\%$  de pureza) e 20-Hidroxiecdisonio (~95% de pureza) foram comprados da Sigma-Aldrich (Bornem, Bélgica) enquanto que a tebufenozida (~99% de pureza) foi cedido pelo Laboratório de Agrozoologia da Universidade de Gent. 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 dimetilsulfoxido (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 e tebufenozida, os quais foram necessárias diversas concentrações para confecção de curvas dose-resposta.



**Figura 1.** Compostos esteroidais e não esteroidais utilizados na triagem em células de Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9). As moléculas enumeradas de 1 a 11 correspondem a novas moléculas organocalcogênicas, semelhantes a dibenzoilhidrazinas sintetizadas no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da UFPel, já a tebufenozida, 20-Hidroxiectdisônio e Ponasterona-A foram provenientes de marcas comerciais. Fonte: Pinto (2017)

**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.

Molec.	F.Q. <sup>1</sup>	Nome Químico	M.M. <sup>2</sup> (g/mol)	P.I.(%) <sup>3</sup>	Solvente
<b>Tebuf.</b> <sup>4</sup>	C22H28N2O2	<i>N</i> -tert-butyl- <i>N'</i> -(4-ethylbenzoyl)-3,5-dimethylbenzohidrazida	352,479828	99	Álcool <sup>7</sup>
<b>20H</b> <sup>5</sup>	C27 H44 O7	2 A,3 A,14 A,20 A,22,25-Hexahidroxy-7-cholesten-6-one	480,648621	95	Álcool
<b>PonA</b> <sup>6</sup>	C27H44O6	Cholest-7-en-6-one,2,3,14,20,22-pentahidroxy-, (2b,3b,5b,22R)	464.643000	≥65	Álcool
<b>1</b>	C20H15NS2	2,3-bis(phenylthio)-1 <i>H</i> -indolo	333,479000	95	Álcool
<b>2</b>	C22H19NS2	2,3-bis( <i>p</i> -tolylthio)-1 <i>H</i> -indolo	361,533000	95	Álcool
<b>3</b>	C22H19NO2S2	2,3-bis((4-methoxyphenyl)thio)-1 <i>H</i> -indolo	393,533000	95	DMSO <sup>8</sup>
<b>4</b>	C17H13NSe2	2,6-bis(phenylselanyl)piridina	389,218000	95	Álcool
<b>5</b>	C20H27NSe	<i>N,N</i> -dibutyl-4- (phenylselanyl)anilina	360,403000	95	Álcool
<b>6</b>	C20H16N2O2	<i>N,N'</i> -(1,2-phenylene)dibenzamida	316,362000	95	DMSO
<b>7</b>	C20H16N2O4	<i>N,N'</i> -(1,2-phenylene)bis(2-hidroxybenzamida)	348,362000	95	DMSO
<b>8</b>	C16H16N2O4	<i>N,N'</i> -(ethano-1,2-diyl)bis(2-ydroxybenzamida)	300,317993	95	Álcool
<b>9</b>	C16H16N2O2	<i>N,N'</i> -(ethano-1,2-diyl)dibenzamida	268,318024	95	DMSO
<b>10</b>	C16H27CuN2O6	Copper(II) 1,2-bis(2-hidroxybenzoamido)ethane	406,951874	95	DMSO
<b>11</b>	C16H27N2NiO6	Nickel(II) 1,2-bis(2-hidroxybenzoamido)ethane	402,115875	95	DMSO

<sup>1</sup>Fórmula química

<sup>5</sup>20-Hidroxiectdisônio

<sup>2</sup>Massa Molar

<sup>6</sup>Ponasterona-A

<sup>3</sup>Pureza inicial (%)

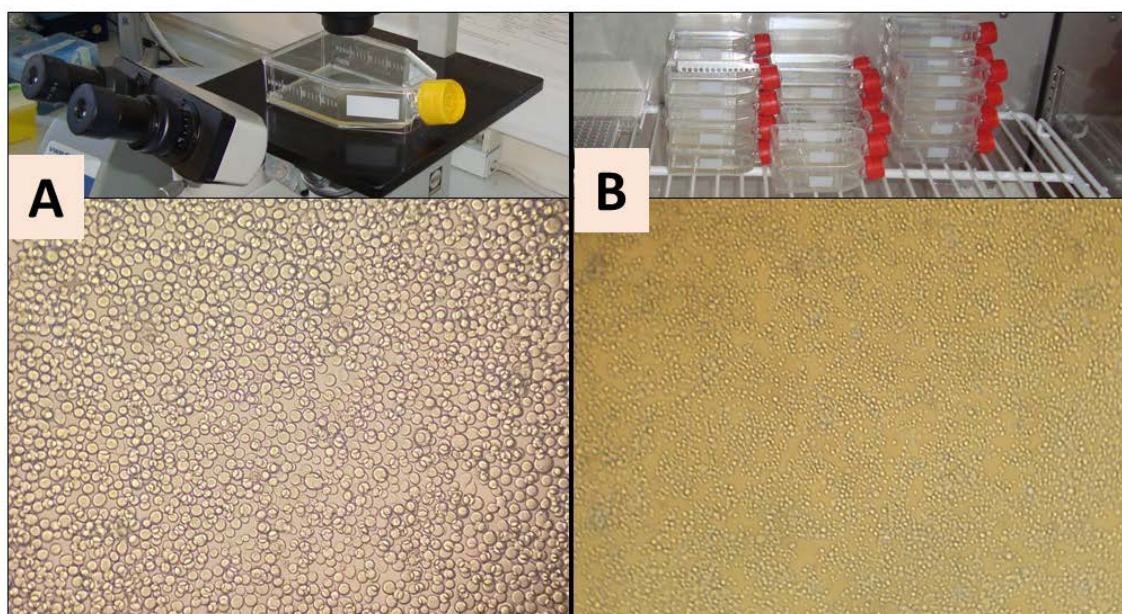
<sup>7</sup>Etanol Absoluto (100%)

<sup>4</sup>Tebufenozida

<sup>8</sup>Dimetilsulfóxido

### 3.2. Linhagens celulares

As culturas celulares foram obtidas de coleção estabelecida no Departamento de Fitossanidade da Universidade de Ghent (Bélgica). 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 SF900<sup>TM1</sup> (GIBCO®, Invitrogen) em frascos de meio de cultura de 75cm<sup>2</sup> (Figura 2A). Já as células S2, provenientes de células embrionárias de *D. melanogaster*, foram mantidas em incubadora a 27°C, em meio de cultura InsectXpress<sup>TM2</sup> (Lonza®) em frascos de 25cm<sup>2</sup> (Figura 2B). A qualidade das células foi monitorada com uso de microscopia óptica com o microscópio invertido Olympus IX53, e lente com aumento de 40x. Frascos diferentes foram usados, pois as linhagens celulares apresentam células de tamanho bastante distintos (Figura 2). Assim, como as células SF9 são maiores, é necessário um frasco grande para se obter a quantia necessária de células para os ensaios, ressaltando que para cada ensaio utilizaram-se células de apenas um frasco para se obter maior exatidão na contagem de células.



**Figura 2.** Linhagens celulares cultivadas, utilizadas para os ensaios. A- Células de *Spodoptera frugiperda* (SF9) em frasco de 75cm<sup>2</sup>, utilizados para a manutenção de tais células. B- Células de *Drosophila melanogaster* (S2) em frascos de 25cm<sup>2</sup>, utilizados para a manutenção de tais células. Fonte: Pinto (2017).

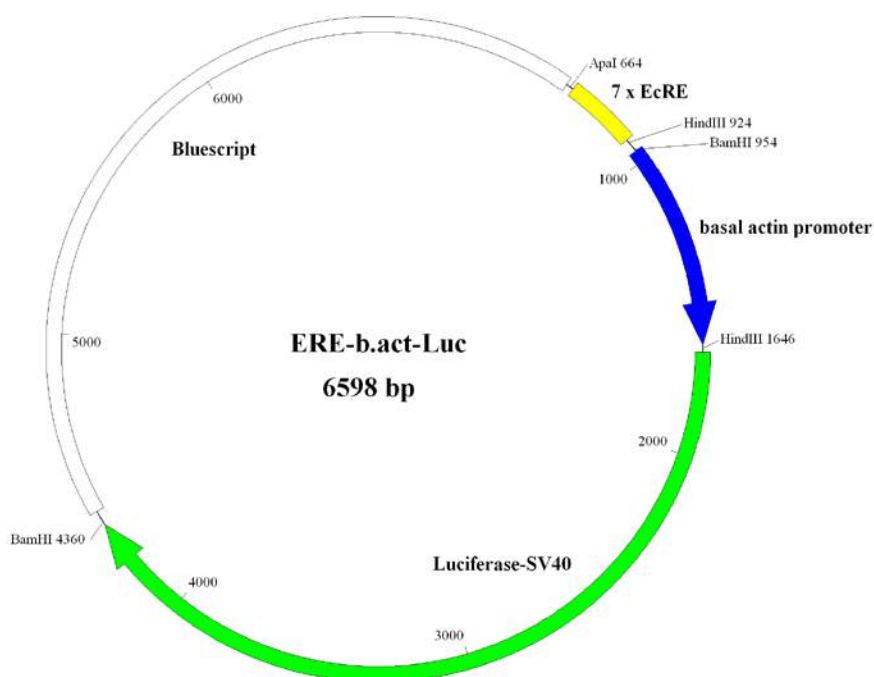
<sup>1</sup> Meio de cultura específico para células de Lepidoptera à base de carboidratos, lipídios, proteínas de baixo peso molecular (<10.000 g/mol) e L-Glutamina.

<sup>2</sup> Meio de cultura inicialmente desenvolvido para células de Lepidoptera, mas cujo uso foi adaptado para Diptera. Composto por carboidratos, lipídios, aminoácidos e L-Glutamina.



### 3.3. Plasmídeo repórter

O princípio dos ensaios consiste na indução da expressão da enzima luciferase nas células pela ativação do receptor de ecdisteroides. O gene repórter utilizado foi o da enzima luciferase, proveniente do vagalume *Photinus pyralis* (Linnaeus, 1767) (Coleoptera: Lampyridae). O plasmídeo repórter utilizado contém um promotor basal de actina (B.act.) precedido por sete cópias do elemento de resposta ao ecdisônio do gene *Drosophila hsp27* (ere.), seguidos do gene repórter do vagalume (luc.) (B.act.ere.luc) e um sinal de terminação (Figura 3) (SWEVERS et al., 2004).



**Figura 3.** Diagrama representando o plasmídeo repórter contendo o gene da Luciferase.  
Fonte: Adaptado de Swevers et al. (2004).

O plasmídeo repórter B.act.ere.luc, além do que foi descrito, possui um gene que degrada o antibiótico ampicilina, possibilitando assim, clonar o mesmo em bactérias competentes. Para a clonagem utilizou-se bactérias da espécie *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885) (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) sepa DH5 $\alpha$  pelo método do choque térmico, conforme Froger e Hall, (2007). A clonagem de plasmídeos em *E. coli* usando o choque térmico é uma técnica básica em biologia molecular. Tal técnica consiste na



inserção do plasmídeo em uma cepa de bactérias competentes, induzindo a multiplicação das mesmas com o plasmídeo inserido.

Após uma breve incubação das bactérias com o plasmídeo no gelo, a mistura foi aquecida drasticamente a 42°C por 45 segundos, então levada novamente para o gelo. Meio SOC<sup>3</sup> (Invitrogen™) foi adicionado às bactérias transformadas e transferido para uma incubadora a 37°C por 30 minutos sob agitação (250rpm). Logo após as bactérias foram adicionadas à uma placa de petri com meio de cultura com ampicilina. Desta forma, apenas as bactérias transformadas se multiplicam e formaram colônias na placa de petri. Para confirmar que as colônias da placa continham o plasmídeo B.act.ere.luc, foi feito um PCR de colônia com colônias escolhidas aleatoriamente (Figura 4).

Como a confirmação do plasmídeo foi realizada por meio de PCR (*Polimerase chain reaction*- Reação em cadeia da polimerase), foram desenhados *primers* específicos para o gene da luciferase (nº acesso M65067.1), cujas sequências foram: *Forward*- CCAGGGATTTTCAGTCGATGT; e *Revrse*- GCCAGTATCCGGAATGATTT, cujo amplicom foi desenhado para aproximadamente 250 pares de bases (pb) (Figura 4).

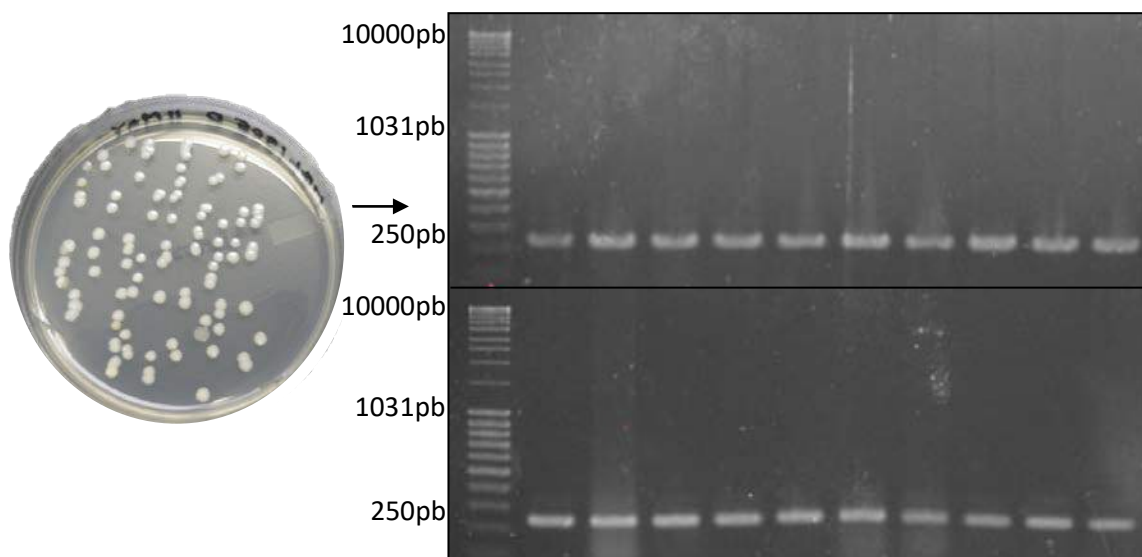
Cada reação de PCR foi composta por 1 µL de tampão e 0,3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µL de dNTP, 0,7 µL de cada *primer*, 0,05 µL de Taq DNA polimerase e 0,4 µL de amostra de cDNA, e água ultrapura até completar o volume de 12 µL. As reações foram submetidas à amplificação em termociclador. O programa utilizado se baseou em: desnaturação inicial a 94°C por 15 minutos, seguida de 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 0,5 minutos, anelamento a 50°C por 0,5 minutos e extensão a 72°C por 0,5 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de todas as reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), utilizando como marcador o Ladder 1kb (Invitrogen™). Foram aplicados 4µL de produto da PCR no gel, o qual foi corado com 2µL de GelRed, e visualizado em fotodocumentador.

Após constatado que as colônias selecionadas continham o plasmídeo B.act.ere.luc., foi realizada a multiplicação das bactérias. Este procedimento foi realizado, com o uso de uma ponteira esterilizada, retirando uma porção das

---

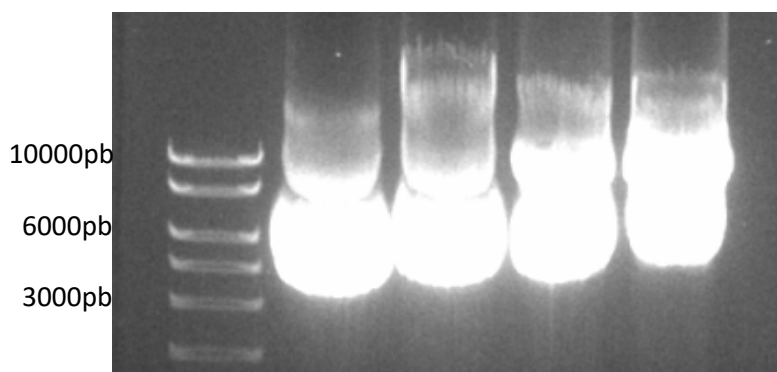
<sup>3</sup>Meio de cultura para crescimento bacteriano, composto por: 2% Triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM glicose.

colônias e levando para um tubo plástico com 5ml de meio LB Broth<sup>4</sup> (Sigma-Aldrich) e 7,5 µl de ampicilina. Após uma incubação de aproximadamente 16 horas à 37°C, o plasmídeo foi purificado com o kit de purificação Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).



**Figura 4.** Colônias de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo B.act.ere.luc. em placa de petri contendo meio LB e ampicilina. Apenas bactérias que absorveram o plasmídeo foram capazes de formar colônias. Ao lado, fotodocumentação do PCR de colônia realizado com 20 colônias selecionadas. Fonte: Pinto (2017).

Por fim, para constatar a integridade do plasmídeo purificado, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% com a amostra pura. O que se espera é uma banda de aproximadamente 6500 pares de bases (pb), tamanho correspondente ao do plasmídeo (Figura 5).



**Figura 5.** Integridade do plasmídeo B.act.ere.luc. verificada em corrida eletroforética em gel de agarose (1%). Fonte: Pinto (2017).

<sup>4</sup> Composição para um litro: 10g de peptona140, 5g de extrato de levedura e 5g de NaCl.

### 3.4. Síntese de moléculas

As moléculas organocalcogênicas (planejadas *de novo*), foram sintetizadas no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa– LASOL. O procedimento de síntese foi conduzido como descrito por Coleman (1967); Oikawa et al. (1994) e Nakagawa et al. (1998). As estruturas foram identificadas pelo espectro de RMN e pureza confirmada pelo ponto de solidificação.

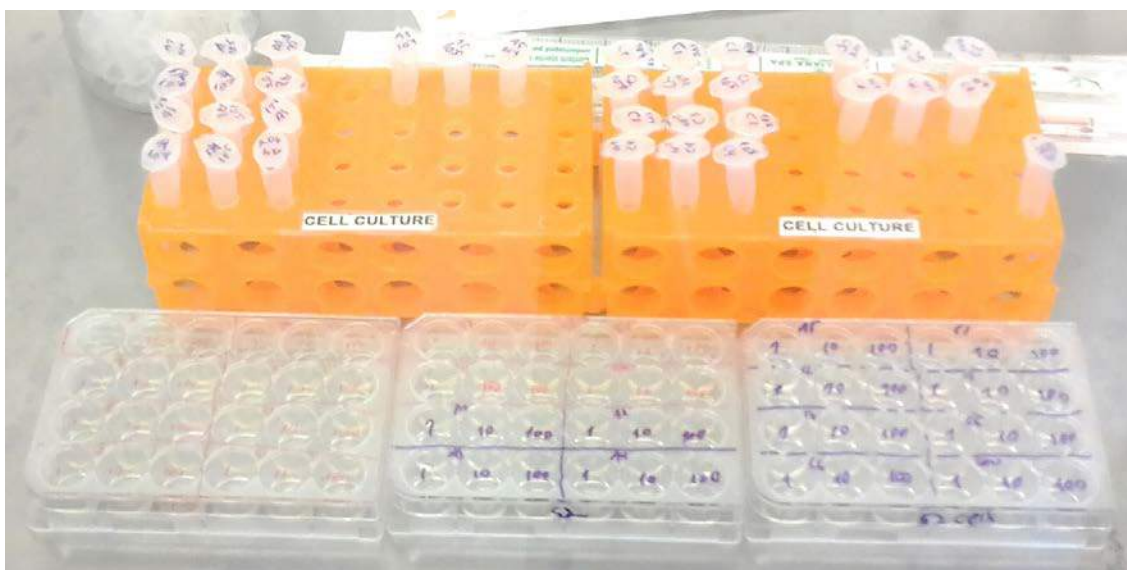
### 3.5. Transfecção nas células

Os compostos químicos foram testados por sua habilidade de ativarem ou inibirem a transcrição do gene da luciferase em células transfectadas de Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9), induzível pela ativação do receptor de ecdisteroides. Uma transfecção transiente com o plasmídeo repórter, por meio do reagente de transfecção Escort™ IV (Sigma-Aldrich®), foi realizada nas células antes da exposição aos compostos químicos.

Para a transfecção de células utilizou-se uma placa de 24 poços, sendo que cada poço recebeu um tratamento com a devida molécula, os quais depois foram divididos em quadruplicata em placas brancas de 96 poços para a leitura da luminescência. O número desejado de células para cada poço foi de 500.000 e 300.000, para S2 e SF9, respectivamente. A contagem de células foi realizada com a ajuda de um hemocítômetro e Trypan Blue (Sigma-Aldrich). As células mortas adquirem uma coloração azul bastante intenso, o que permite a contagem das células vivas/ml e avaliação da viabilidade das mesmas. A viabilidade celular mínima desejada foi de 95%. Para os ensaios com viabilidade celular frente à adição de compostos químicos também foi utilizado o reagente PrestoBlue® (Invitrogen), o qual será descrito na sequência. Após a contagem de células, com uma micropipeta, 500µl do meio de cultura com correspondente número de células foi adicionado em cada poço da placa de 24 poços (Figura 6).

Enquanto as células decantavam e aderiam ao fundo dos poços, o meio de transfecção era preparado. A descrição da preparação do meio de transfecção foi realizada considerando apenas um poço, mas os volumes e recipientes utilizados devem ser adequados conforme a quantidade de

tratamentos. Para células S2, primeiramente se adicionou 497  $\mu\text{l}$  de meio de cultura em um eppendorf, seguido por 3 $\mu\text{l}$  do reagente Escort<sup>TM</sup>IV e 100 ng do plasmídeo repórter, por fim, é importante misturar vigorosamente a reação com uma pipeta. A reação ficou em repouso à temperatura ambiente de 30 a 45 minutos. Para células SF9, utilizou-se 496  $\mu\text{l}$  de meio de cultura, 4  $\mu\text{l}$  de reagente Escort<sup>TM</sup>IV e 300 ng de plasmídeo, demais procedimentos de pipetagem e incubação seguiram os mesmos.



**Figura 6.** Material utilizado para a transfecção de células. Placas de 24 poços contendo tratamentos com diferentes concentrações das moléculas. Fonte: Pinto (2017).

Após aproximadamente uma hora, período de preparo repouso do meio de transfecção, as células estavam aderidas ao fundo dos poços, desta forma, com uma micropipeta o meio de cultura foi retirado e substituído pelo meio de transfecção. As células ficaram em repouso por um período de 5 horas com o meio de transfecção, período suficiente para o plasmídeo penetrar nas células. Com as células transfectadas após o período de repouso, o meio de transfecção foi removido e substituído por meio de cultura novo (sem reagente e plasmídeo).

### 3.6. Viabilidade celular

Algumas moléculas não esteroidais podem ser extremamente tóxicas para as células, reduzindo a resposta das mesmas frente a adição de um agonista (SOIN et al., 2010a). Desta forma, antes de iniciar os procedimentos de transfecção, deve-se investigar se a molécula pode causar efeitos adversos

às células. As células foram contadas conforme citado anteriormente e acondicionadas em placas de 24 poços com iguais volumes e número de células. A viabilidade inicial foi mensurada com o Tryplan Blue, reagente o qual é capaz de penetrar na membrana celular caso estas estejam mortas, conferindo uma coloração azul escuro às mesmas. Como a contagem celular inicial foi superior a 95%, foi dado procedimento aos testes de viabilidade celular, onde utilizou-se o reagente Presto Blue™ (Invitrogen) para investigar se as novas moléculas eram citotóxicas. O Presto Blue é um indicador de viabilidade celular que utiliza o poder de redução das células vivas para quantificar a atividade fisiológica, sendo que os dados por este método são obtidos por absorvância (HANCOCK et al., 2012).

Logo após 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. Terminado o período de incubação, as células foram resuspendidas e transferidas para uma placa de 96 poços de cor negra. Cada poço recebeu 90 µl da suspensão com células e 10 µl do reagente Presto Blue™ (Invitrogen). O controle positivo foi um tratamento com  $\geq 95\%$  de células vivas e com adição de 1µL de 20-Hidroxiectdisônio nas três respectivas concentrações. Um ensaio prévio foi realizado com 100% de células mortas para averiguar o limite inferior dos números de absorvância, sendo que estes dados não constam no presente trabalho por serem irrelevantes. O parâmetro estipulado pelo autor para a não utilização de uma concentração ou molécula foi a redução da viabilidade celular abaixo de 85%. Este parâmetro foi estimado com ensaios prévios onde observou-se que com mais de 15% de células mortas há interferência na luminescência.

Cada tratamento foi realizado em quadruplicata técnica, sendo que cada experimento foi reproduzido pelo menos 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 v4 (GraphPad Software Inc. La Jolla, Ca).

### 3.7. Bioensaios para agonistas/antagonistas a ecdisteroides

As células transfectadas foram tratadas com ecdisteroides, tebufenozida ou 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 ecdisteroides, maior a luminescência.

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 ou Ponasterona-A 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 da placa de 96 poços com as células, 100 µl do substrato de luciferase. O mensuramento foi realizado com o luminômetro Tecan™ M200 (UGent) ou Vitor™ X5 (UFPel). Cada tratamento foi realizado em quadruplicata técnica, sendo que cada experimento foi realizado pelo menos 3 vezes. Respectivas  $EC_{50}$  (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  $R^2$ . 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  $\geq 50\%$  a luminescência quando comparado ao controle positivo com 20-Hidroxiectdisônio ou Ponasterona-A.

### 3.8. Modelagem tridimensional (3D) de receptor de ecdisteroides de Diptera e Lepidoptera

Neste trabalho foi investigada a atividade de tebufenozida, onze organocalcogênicos estruturalmente semelhantes às Dibenzoilhidrazinas e os hormônios 20-Hidroxiecdisonio e Ponasterona-A em receptores de ecdisteroides de Diptera e Lepidoptera (Figura 1). Para a habilidade destas moléculas ativarem o receptor do ecdisônio, como já citado, foram utilizados um representante da ordem Lepidoptera (SF9) e um de Diptera (S2). Assim, as estruturas tridimensionais dos compostos químicos foram usadas para construir o modelo de 3D-QSAR, que descreve a atividade das dibenzoilhidrazinas e dos hormônios ao ecdisônio. Em geral, 3D-QSAR é utilizado não apenas para desenvolver novas moléculas, mas também para entender o modo de ação de compostos a nível molecular (NAKAGAWA et al., 2009). Os compostos que não apresentaram atividade foram excluídos das análises virtuais.

O modo com que as dibenzoilhidrazinas e hormônios se ligam em 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, 2016), 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<sup>®</sup>, com o uso do software Discovery Studio<sup>®</sup> e Chimera<sup>®</sup>.

#### 4. Resultados e Discussão

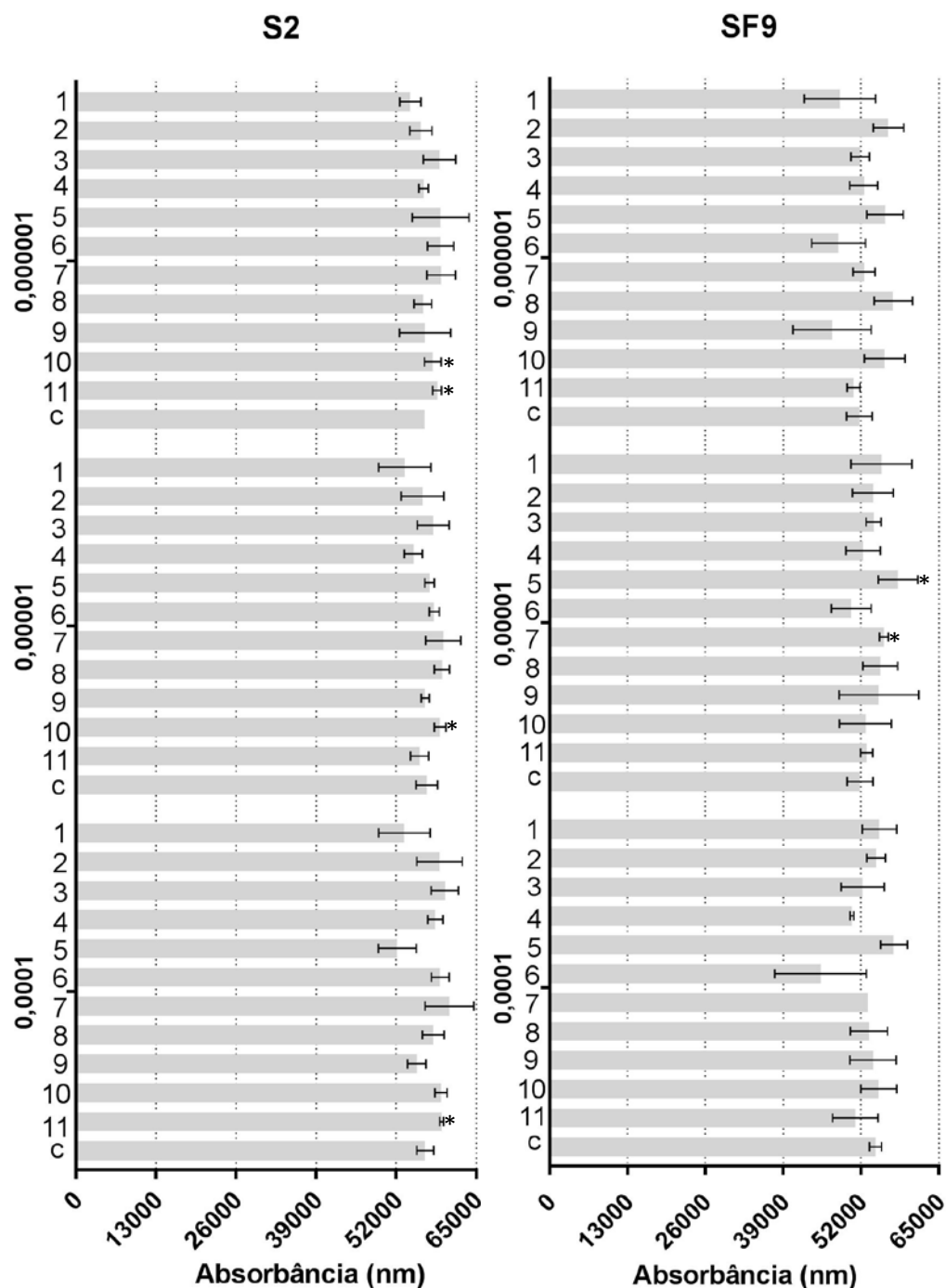
As células foram expostas à três diferentes concentrações das novas moléculas de organocalcogênicos, por 24 horas, para averiguação se há citotoxicidade. Nas células S2 nenhum dos compostos reduziu a viabilidade celular, mas observou-se um aumento da absorbância para os compostos 10 e 11 em distintas concentrações (Figura 7). Isto é um indicativo de atividade antagonista, uma vez que compostos com essa atividade tendem a aumentar a leitura de absorbância se comparado a compostos com efeito agonista (SOIN et al., 2010a). Já para as células SF9, foram os compostos 5, e 7 que aumentaram sensivelmente as leituras de absorbância quando comparado ao hormônio 20-Hidroxiectdisônio (Figura 7).

Além do método com mensuramento de absorbância, a atividade de agonistas a ecdisteroides, viabilidade e densidade celular pode ser averiguada simplesmente por microscopia. Tipicamente, células expostas a agonistas do ectdisônio tendem a se alongarem e formarem aglomerados, mas deve-se salientar que outros compostos também têm capacidade de induzirem o alongamento de células (BRAECKMAN, et al., 1997).

Em estudo realizado no início da década de 2000, Hormann et al. (2003) calcularam a  $EC_{50}$  de 97 dibenzoilhidrazinas, resultado que contrasta com estudo mais recente de Soin et al., (2010b). Este último autor, fazendo uso do mesmo repórter, testou várias de dibenzoilhidrazinas, sendo que destas, muitas tiveram atividade extremamente baixa ou nula em receptores de ecdisteroides de Diptera e Lepidoptera, inclusive para compostos que Hormann et al. (2003) foram capazes de calcular  $EC_{50}$ . O motivo pelo qual muitas moléculas não mostram efeito em bioensaios é devido à combinação de inespecificidade e citotoxicidade. Outra possibilidade é que alguns compostos podem ser citotóxicos ao mesmo tempo que possuem atividade agonista, o que irá superestimar a atividade agonista de um composto em triagens baseadas na inibição da proliferação celular (MOSALLANEJAD et a., 2008).

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, a dibenzoilhidrazina com conhecida atividade agonista testada, a tebufenozida, é mais ativa em receptor de ecdisteroides de células de lepidópteros quando comparado às células de dípteros (Figura 8).



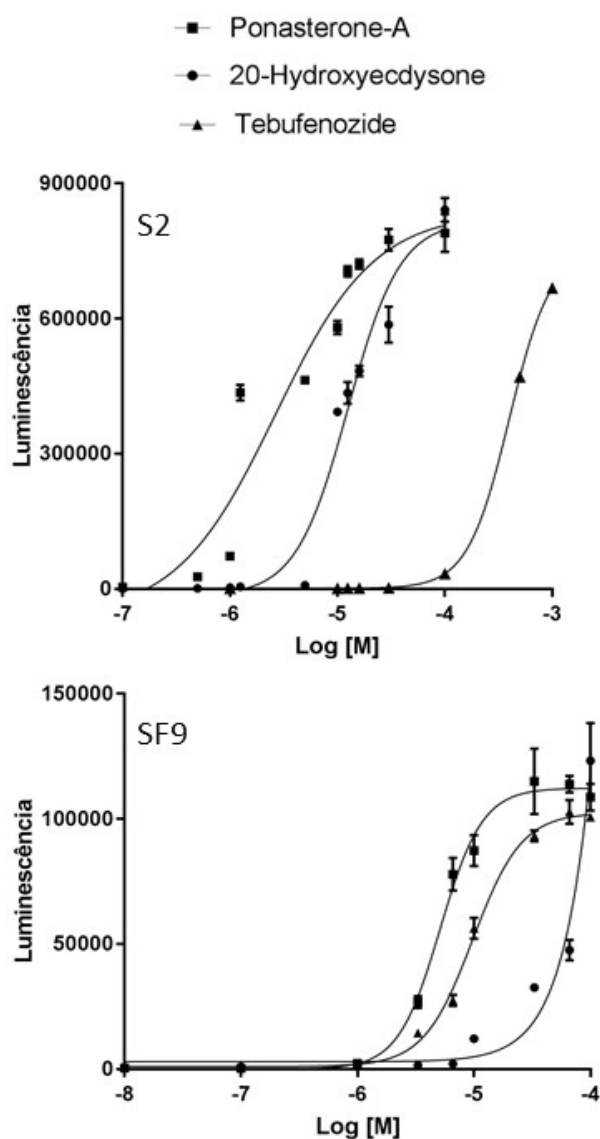


**Figura 7.** Viabilidade celular das linhagens S2 (Diptera) e SF9 (Lepidoptera) frente à exposição das novas moléculas (1-11) em três concentrações molares (0,0001; 0,00001 e 0,000001). Os controles positivos (C) foram as mesmas três concentrações de 20-Hidroxiectdisônio. O eixo Y representa as concentrações molares, as quais constituem cada bloco, dentro dos quais encontram-se as onze novas moléculas e o controle com 20-Hidroxiectdisônio. As barras representam o erro padrão das replicatas técnicas. Os asteriscos indicam diferença significativa da absorbância medida em comparação ao controle dentro de cada concentração (teste  $t$ ,  $p < 0,05$ ). Fonte: Pinto (2017).

O  $EC_{50}$ , expresso na forma de  $-\log EC_{50}$ , da tebufenozida em S2 foi 3,4, já em SF9 obteve-se uma  $EC_{50}$  de 5,1, ou seja,  $EC_{50}$  nas células de Lepidoptera foi quase cem vezes maior do que em células de Diptera (Tabela 2). Um importante detalhe a ressaltar é que a concentração para ativação

máxima do receptor de ecdisteroides por tebufenozida em Diptera foi na ordem dos milimolares para ativar o equivalente a 80% do observado nos hormônios, o que ressalta a alta inespecificidade desta molécula para insetos desta ordem.

As dibenzoilhidrazinas disponíveis no Brasil são registradas apenas para lepidópteros (AGROFIT, 2017), apesar disso, na Europa há moléculas deste grupo registradas também para coleópteros (SMAGGHE; SWEVERS, 2012). Apesar do baixo espectro de ação destes inseticidas sobre ordens que não Lepidoptera e alguns coleópteros, com o resultado das pesquisas e parcerias nesta área, é possível buscar análogos às Dibenzoilhidrazinas que possam atuar nas mais diversas ordens da classe Insecta (WING, 2016).



**Figura 8.** Curvas sigmóides de dose-resposta referentes a atividade de dois ecdisteroides (20-Hidroxiectidisonio e Ponasterona-A) e de um agonista não esteroidal (Tebufenozida) em células S2 e SF9. Barras correspondem ao erro padrão da média ( $n= 4$ ). Fonte: Pinto (2017).

Mesmo com a especificidade das ddibenzoilhidrazinas comerciais em lepidópteros, como atestado no presente trabalho, estudos com larvas de *Anopheles gambiae* Giles, 1926 (Diptera: Culicidae), constataram que metoxifeozida apresentou toxidez de oito e quatorze vezes maior do que tebufenozida e RH-5849, respectivamente (BECKAGE et al., 2004). Entretanto, estudos recentes divergem mostrando que esta atividade é muitas vezes menor (MOROU et al., 2013). Isto levanta um alerta sobre a importância da padronização metodológica para estudos de toxicologia, uma vez que dados devem ser reproduzidos com acurácia, gerando um conhecimento preciso e aplicável.

Existem dibenzoilhidrazinas que são ativas em ordens que não lepidópteros, principalmente coleópteros. Além disso, resultados obtidos recentemente demonstram, na prática, que a aplicação de certas dibenzoilhidrazinas para o combate de pragas da ordem Diptera, é uma possibilidade ainda inexplorada por falta de estudos ou tentativas (MOROU et al., 2013).

Outro ponto importante a ressaltar é a correlação entre estudos *in vitro* e *in vivo*, uma vez que se espera que as moléculas ativas em células apresentem efeito semelhante quando testadas em organismos inteiros. Um estudo anterior demonstra que várias moléculas com capacidade de ativar o complexo receptor de ecdisteroides/ultraespiráculo em células SI2, derivadas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae), não foram efetivas quando testadas *in vivo* (organismo inteiro), sendo que apenas uma molécula mostrou efeito (SOIN et al., 2010b).

Diferentemente da tebufenozida, que apresentou padrões diferentes de agonismo nas linhagens de células testadas, os compostos esteroidais 20-Hidroxiecdisoniô e Ponasterona-A, apresentaram padrões semelhantes para as duas linhagens, sendo que a Ponasterona-A se mostrou um poderoso agonista (Figura 8). A  $EC_{50}$  de 20-Hidroxiecdisoniô foi 4,90 e 4,21, já de Ponasterona-A foi de 5,57 e 5,27 para células de Diptera e Lepidoptera, respectivamente (Tabela 2). Sendo assim, pode-se observar que o fitoecdisteroide Ponasterona-A, em ambas as linhagens celulares, apresentou um padrão de aproximadamente dez vezes mais ativo do que o 20-Hidroxiecdisoniô. Tal

resultado indica que tanto 20-Hidroxicdisônio como Ponasterona-A são inespecíficos para estas duas ordens de insetos.

**Tabela 2.** Atividade agonista de 20-Hidroxicdisônio (20H), Ponasterona-A (PonA) e Tebufenozida (Tebu) em células embrionais de *D. melanogaster* (S2) e *S. frugiperda* (SF9).

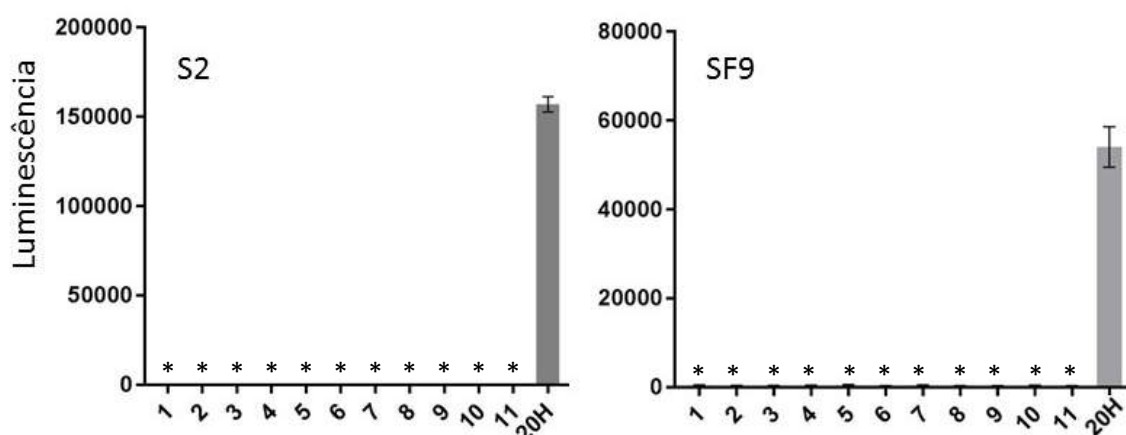
	S2			SF9		
	-logEC <sub>50</sub>	95%IC	R <sup>2</sup>	-logEC <sub>50</sub>	95%IC	R <sup>2</sup>
<b>20H</b>	4,90	4,78-4,98	0,964	4,21	4,12-4,28	0,889
<b>PonA</b>	5,57	5,30-5,85	0,920	5,27	5,24-5,31	0,984
<b>Tebu</b>	3,4	3,38-3,41	0,999	5,01	4,99-5,03	0,994

Dados expressos em médias de resposta junto ao intervalo de confiança de 95% (ambos em -logEC<sub>50</sub>). R<sup>2</sup> representa a precisão dos dados plotados na curva sigmoide.

Apesar de o 20-Hidroxicdisônio ser o ecdisteroide mais representativo da classe insecta, observou-se que há fitoecdisteroides, como Ponasterona-A, com um poder de ativação maior do que o próprio hormônio ecdisteroide dos insetos. Os fitoecdisteroides são encontrados em aproximadamente 6% das espécies de plantas analisadas até o momento, sendo que quase 500 ecdisteroides foram identificados nos reinos da natureza (ECDYBASE, 2017). Os chamados micoecdisteroides provêm de algumas espécies do reino fungi, mas não se sabe ao certo se os próprios fungos os produzem como uma forma de defesa contra artrópodes ou se eles absorvem e modificam os fitoecdisteroides do substrato em que se desenvolvem (DINAN, 2009).

Alguns fitoecdisteroides, como a cyasterona, apresentam atividade agonista em receptor de ecdisteroides de células S2 e Bm5 (Lepidoptera), mas tal atividade é várias vezes menor do que tebufenozida, o que inviabiliza o uso desta molécula para fins comerciais (ZOTTI et al., 2013a). A capacidade das plantas em produzir compostos esteroidais com atividade em receptor de ecdisteroides de insetos pode ser uma adaptação evolucionária, sendo que a atividade destes compostos pode variar dentre as ordens de insetos (DINAN et al., 2001). Fitormônios com atividade análoga aos ecdisteroides, quando absorvidos no mesêntero dos insetos, podem representar uma barreira significativa contra a predação por parte de fitófagos não adaptados, causando um efeito similar às dibenzoilhidrazinas, ou seja, a ecdise precoce e morte por inanição (BOWERS, 2012).

Em relação à atividade agonista dos novos compostos organocalcogênicos, tanto em células S2 como em SF9 nenhuma apresentou efeito significativo quando comparado à mesma concentração de 20-Hidroxicdisônio (Figura 9). Os compostos foram testados na concentração máxima de 100 $\mu$ M por ser uma concentração padrão para esta linha de bioensaios, além de que concentrações maiores podem causar citotoxicidade nas células. Como nesta concentração não houve resposta, conclui-se que as onze novas moléculas não têm potencial de se tornarem agonistas comerciais, tanto para Lepidoptera como para Diptera, sendo que várias otimizações nas estruturas devem ser realizadas para talvez tornar as moléculas ativas. A ativação máxima de tebufenozida foi de aproximadamente 80% da observada em 20-Hidroxicdisônio e Ponasterona-A em ambas culturas celulares. Sendo assim, para uma molécula não esteroideal ter potencial de ser patenteada, espera-se uma resposta ao menos semelhante a tebufenozida.

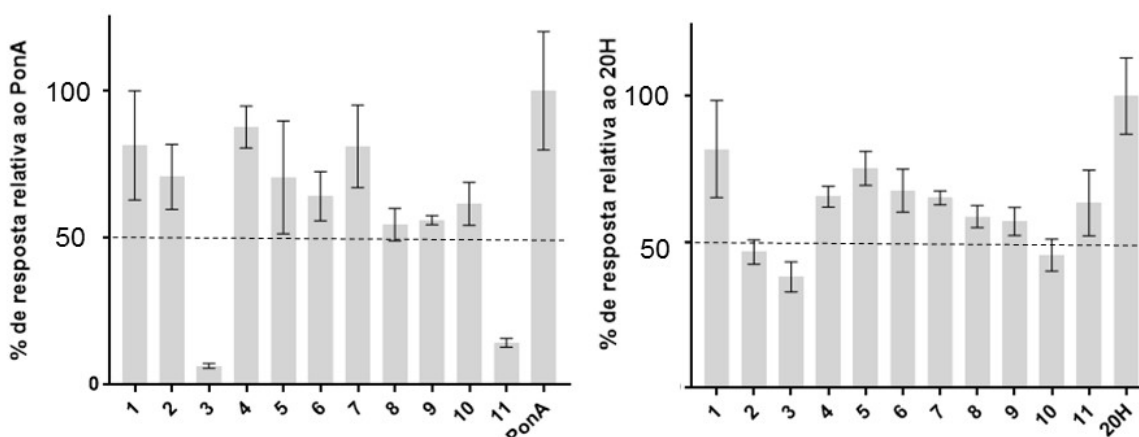


**Figura 9.** Efeito agonista observado para as onze novas moléculas nas linhagens celulares S2 e SF9. A atividade agonista das moléculas na concentração de 100 $\mu$ M foram comparadas com a mesma concentração do hormônio 20-Hidroxicdisônio (20H). Os asteriscos indicam diferença significativa da luminescência medida em comparação ao controle com 20-Hidroxicdisônio (Teste *t*,  $p < 0,05$ ). Fonte: Pinto (2017).

A maioria dos estudos com receptores de ecdisteroides visam a busca de compostos agonistas, sendo que bioensaios para atividade antagonista são, no geral, escassos (DINAN; HORMANN, 2005; ZOTTI et al., 2013a). Apesar do resultado pouco promissor para a capacidade de agonismo das moléculas novas, observou-se efeito antagonista significativo nas moléculas 3 e 11 em Ponasterona-A e 2, 3 e 10 para 20-Hidroxicdisônio na linhagem celular SF9 (Figura 10). O parâmetro estabelecido para uma molécula antagonista ter um

efeito aceitável é a inibição de  $\geq 50$  da atividade hormonal (Harada et al., 2011). É notável que a atividade antagonista observada apenas em células SF9, de Lepidoptera, corrobora com a conhecida especificidade de compostos não esteroidais, especialmente dibenzoilhidrazinas, para tal ordem de insetos. Em células S2 não foi observada redução considerável da atividade hormonal frente à adição das novas moléculas (Figura 11).

Um dos principais trabalhos a respeito de moléculas com efeito antagonista em receptores de ecdisteroides é de autoria de Dinan et al. (2001), onde constam dados de uma triagem de vários compostos na linhagem celular B<sub>11</sub>, proveniente de *D. melanogaster*. Neste trabalho o autor identificou 36 moléculas que apresentaram efeito antagonista, sendo estas moléculas alcaloides, brassinosteroides, cardenolides, bufadienolides, curcubitacins, picracinas, flavonoides, lignanas, limonoides, fenilalcaloiodes, saponinase vitasteroides, todos compostos secundários extraídos de plantas.

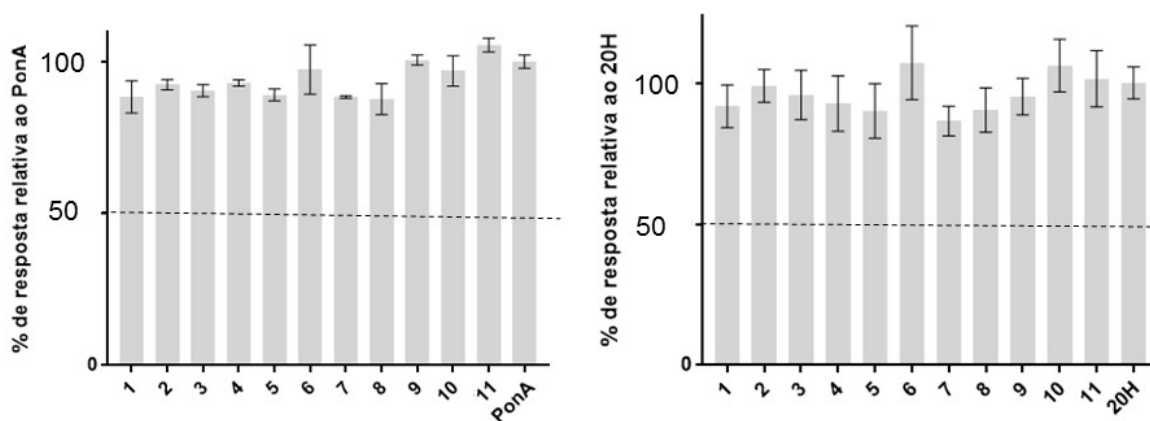


**Figura 10-** Inibição da atividade dos ecdisteroides Ponasterona-A e 20-Hidroxiectdisônio em células SF9 frente à adição das novas moléculas. Em todos os tratamentos foi adicionado 100 $\mu$ M do hormônio, sendo que para os tratamentos que não o controle, foi adicionado 100 $\mu$ M das respectivas moléculas antes da adição do hormônio (~16 horas). O eixo Y representa a porcentagem de atividade hormonal, sendo o 100% representa a média da atividade máxima do hormônio. Fonte: Pinto (2017).

Enquanto a atividade agonista é a consequência da interação entre sítio de ligação do receptor de ecdisteroides e o seu ligante, o antagonismo pode ser consequência da interação com outros sítios dentro do receptor, além da possível interação com outras proteínas na cascata de transativação. Dinan e Hormann (2005) levantaram as seguintes hipóteses para os mecanismos de ação de moléculas antagonistas: (1) interferência na entrada do ecdisteroide na

célula; (2) Interação com o sítio ativo do receptor, impedindo mudanças conformacionais e o correto funcionamento das cascatas de indução hormonal; (3) Interferência na interação receptor de ecdisteroides/ultraespiráculo; (4) bloqueio da ligação entre receptor e ligante e; (5) bloqueio da síntese proteica.

Alguns compostos esteroidais, como a castasterona, podem apresentar afinidade muito maior a receptores de ecdisteroides de células de dípteros do que de lepidópteros, uma vez que os sítios de ligação são semelhantes, ao contrário do que ocorre em relação às dibenzoilhidrazinas (ZOTTI et al., 2013a). Castasterona também é capaz causar o antagonismo ao hormônio 20-Hidroxicdisônio em *Phormia terranova* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae) (HETRU, et al., 1986).



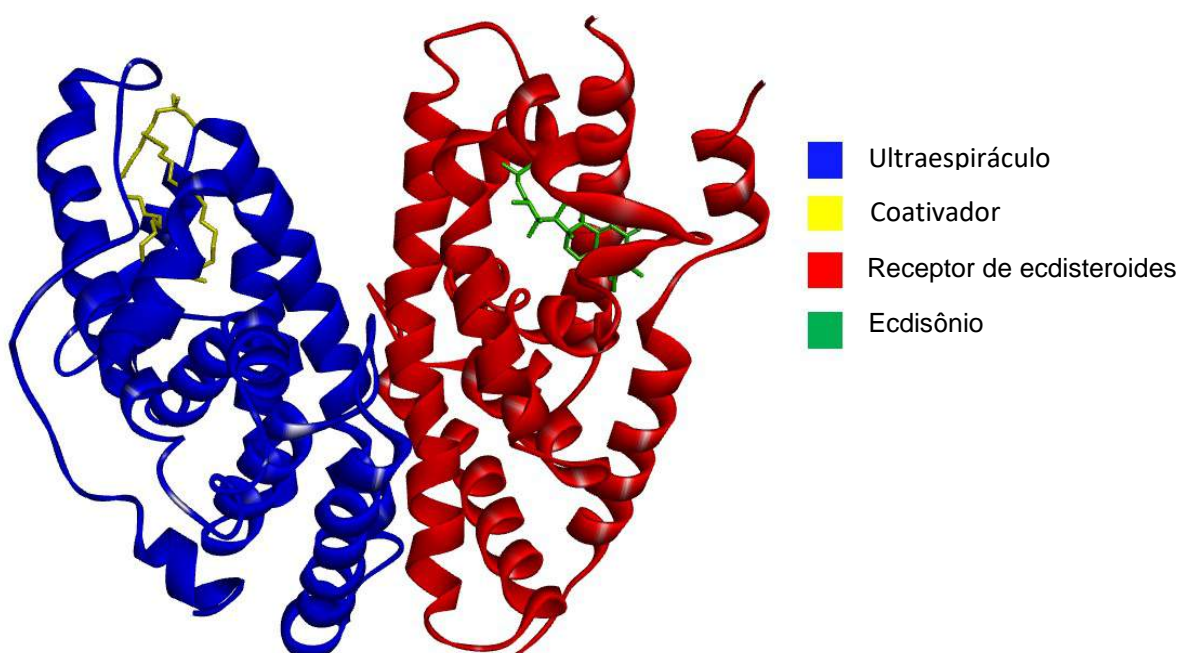
**Figura 11-** Inibição da atividade dos ecdisteroides Ponasterona-A e 20-Hidroxicdisônio em células S2 frente à adição das novas moléculas. Em todos os tratamentos foi adicionado 100 $\mu$ M do hormônio, sendo que para os tratamentos que não o controle, foi adicionado 100 $\mu$ M das respectivas moléculas antes da adição do hormônio (~16 horas). O eixo Y representa a porcentagem de atividade hormonal, sendo o 100% representa a média da atividade máxima do hormônio. Fonte: Pinto (2017).

Os oligostibebons são compostos fenólicos oligoméricos do resvatrol com conhecida atividade antibiótica, e encontrados em Ciperaceas (SOTHEESWARAN; PASUPATHY, 1993). Tais compostos são capazes de competir pelo sítio ativo com Ponasterona-A e 20-Hidroxicdisônio, gerando uma considerável atividade antagonista em células de dípteros (MENG et al., 2001). Isto demonstra que além de dibenzoilhidrazinas, existem outros compostos não esteroidais com capacidade de inibir a atividade de receptores de ecdisteroides.

A muda e metamorfose dos insetos é controlada por quatro principais fatores transcricionais (Figura 12): Ultraespiráculo, receptor de ecdisteroides,

coativadores e o ecdisônio. Para que uma molécula seja ativa no receptor de ecdisteroides, é necessário que a mesma, de alguma forma, interaja com os aminoácidos de sítios de ligação, especialmente no sítio dos ecdisteroides. O conhecimento estrutural de um receptor de ecdisteroides é de fundamental importância para o planejamento racional de inseticidas com base neste receptor nuclear, uma vez que é possível desenhar moléculas específicas para um determinado sítio ativo.

O ultraespiráculo é uma proteína que faz parte da superfamília de receptores nucleares, cujas funções são mediar a resposta dos ecdisônios junto ao receptor de ecdisteroides, ligar-se aos elementos de resposta, morfogênese ocular, fertilização, morfogênese do córion, desenvolvimento torácico dos adultos, dentre outros (CAO et al., 2015; FOULK, et al., 2013). Para o presente trabalho, a atividade do ultraespiráculo não é relevante, pois a ligação do ecdisônio se dá unicamente no receptor de ecdisteroides. Apesar disso, é possível realizar ensaios semelhantes, com ligantes desenhados para interagir exclusivamente no ultraespiráculo.



**Figura 12.** Design gráfico representando os quatro principais fatores transcripcionais responsáveis pela ecdise dos insetos. Azul- Ultraespiráculo; Amarelo- Coativador fosfolipídico; Vermelho- Receptor de ecdisteroides; Verde- Ecdisônio. Fonte: Pinto (2017).

O receptor de ecdisteroides também é uma proteína pertencente à superfamília dos receptores nucleares. Atualmente existem oito receptores de ecdisteroides cujas estruturas foram desvendadas por difração de raio-X,



conforme a Tabela 3 (PDB, 2016). Dentre as ordens que pertencem estas estruturas estão Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera e Phthiraptera.

Com a análise das estruturas tridimensionais dos receptores de ecdisteroides disponíveis, pode-se observar que suas estruturas quaternárias são, no geral, muito semelhantes, sendo compostas por doze  $\alpha$ -hélices e duas  $\beta$ -folhas, exemplificados na Figura 13 com a estrutura de Hemiptera complexada com Ponasterona-A (1Z5X) e de Lepidoptera complexada com BYI08346 (3IXP). Desta forma, é fundamental reconhecer que a estrutura primária das proteínas, principalmente no sítio de ligação, e as cavidades que os aminoácidos formam é o que define a especificidade de cada receptor por diferentes ligantes.

**Tabela 3.** Estruturas tridimensionais receptores nucleares de insetos, reveladas por difração de raio-X disponíveis no PDB (<http://www.rcsb.org/>).

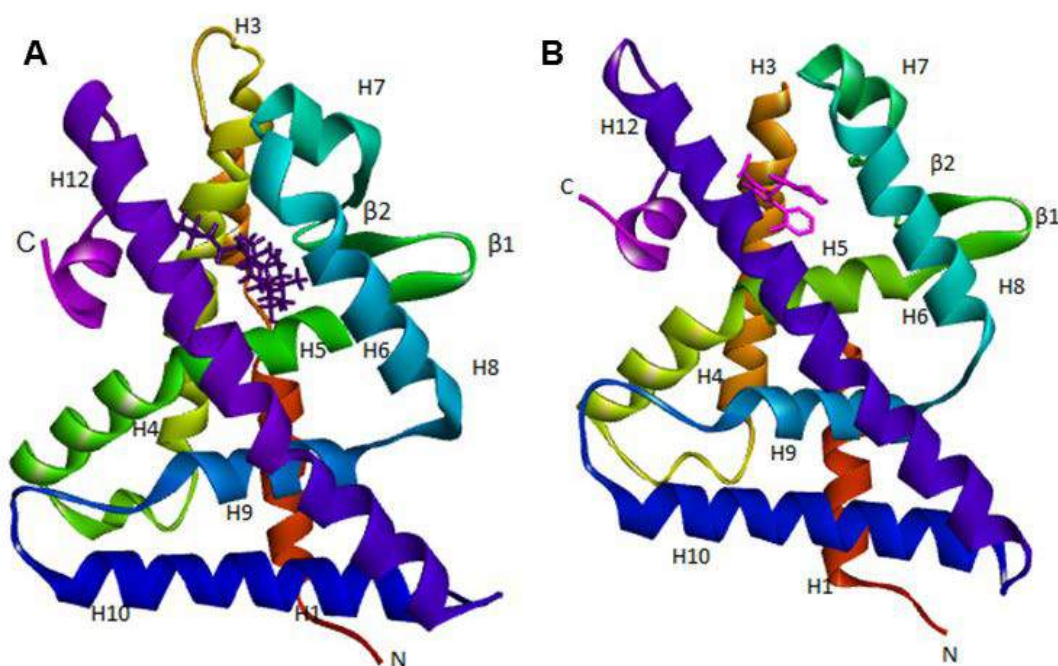
Receptor	Código	Espécie	Ligante	Autor
EcR/USP <sup>1</sup>	4OZR	<i>B. ovis</i>	Metilenolactam <sup>6</sup>	Ren et al. (2014)
EcR/USP	4OZT	<i>B. ovis</i>	PonA <sup>2</sup>	Ren et al. (2014)
EcR/USP	3IXP	<i>H. virescens</i>	BYI08346 <sup>3</sup>	Billas et al. (2003)
EcR/USP	2NXX	<i>T. Castaneum</i>	PonA	Iwema et al. (2007)
EcR/USP	2R40	<i>H. virescens</i>	20H <sup>4</sup>	Browning et al. (2007)
EcR/USP	1Z5X	<i>B. tabaci</i>	PonA	Carmichael et al. (2005)
EcR/USP	1R1K	<i>H. virescens</i>	PonA	Billas et al. (2003)
EcR/USP	1R20	<i>H. virescens</i>	BYI06830 <sup>5</sup>	Billas et al. (2003)
USP	1HG4	<i>D. melanogaster</i>	Ácido fosfatídico <sup>6</sup>	Clayton et al. (2001)

<sup>1</sup>Receptor de ecdisteroides/Ultraespiráculo      <sup>4</sup>20-Hidroxiectidônio  
<sup>2</sup>PonasteronaA      <sup>5</sup>Dibenzoilhidrazina  
<sup>3</sup>Dibenzoilhidrazina      <sup>6</sup>Coativador

O receptor de *D. melanogaster* ainda não foi revelado pelo método de difração de raio-X, o que dificulta o design de moléculas neste alvo. Mesmo assim, existem ferramentas computacionais que podem elucidar a estrutura quaternária de proteínas com base no alinhamento da sequência de aminoácidos em estrutura de receptores de outras espécies. Para a modelagem do receptor de ecdisteroides 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

tridimensionais de proteínas a partir de sequências de aminoácidos homologas (BIASINI et al., 2014).

O receptor de ecdisteroides de *D. melanogaster* foi modelado com base na homologia de aminoácidos do receptor de *Bivicola ovis* (Linnaeus, 1758) (Phthiraptera: Trichodectidae) (4OZT), o qual a apresentou o maior grau de identidade (70%). Para o estudo do receptor de lepidópteros, utilizou-se o receptor de *H. virescens*, o qual consta na Tabela 3.

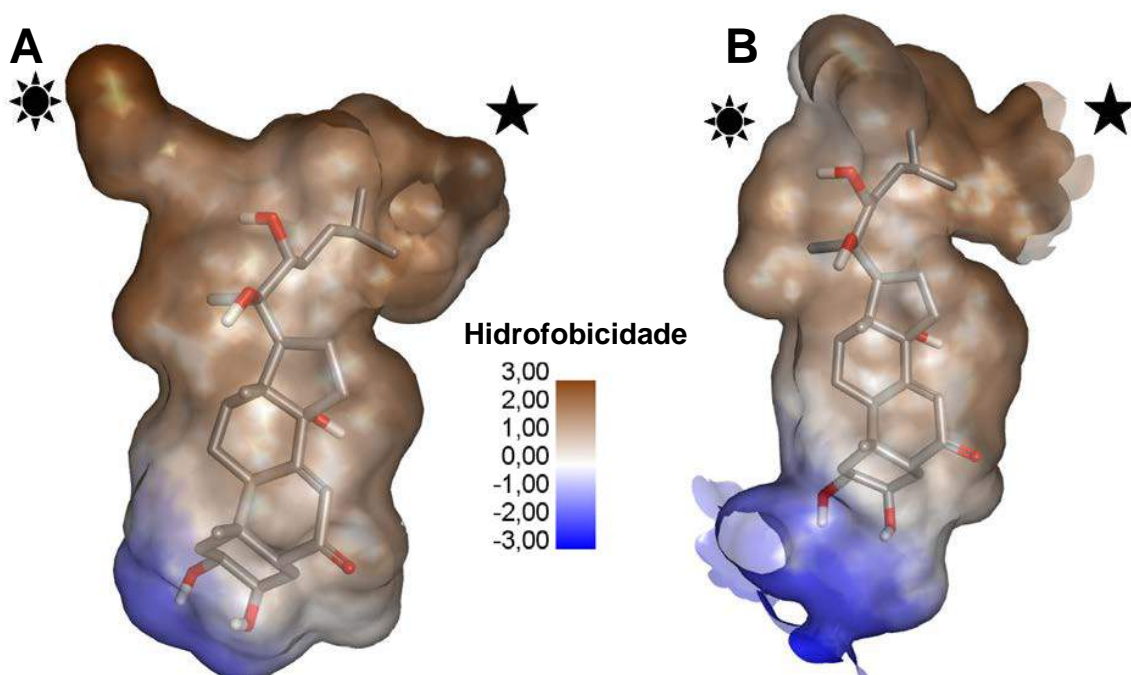


**Figura 13.** Diagrama dos receptores de ecdisteroides de Hemiptera (A- 1Z5X) complexado com Ponasterona-A e Lepidoptera (B- 3IXP) complexado com uma Dibenzoilhidrazina. A figura ilustra a estrutura similar de receptores de ecdisteroides de distintas ordens de Insecta. As doze diferentes  $\alpha$ -hélices estão ilustradas com diferentes cores e enumeradas de H1-H12. Cada receptor também apresenta duas  $\beta$ -folhas, enumeradas de  $\beta$ 1- $\beta$ 2. As letras N e C representam o terminal-C e terminal-N, respectivamente. Fonte: Pinto (2017).

A análise estrutural do sítio de ligação dos ecdisteroides dentro do receptor mostra uma ligação por parte da cadeia alifática do ecdisônio em um largo lobo localizado na extremidade superior do sítio, similarmente observável tanto no receptor de Diptera como de Lepidoptera (Figura 14). Mesmo assim, ao compararmos estruturalmente os receptores de ecdisteroides de Diptera e Lepidoptera, é possível observar que nos lepidópteros há uma segunda cavidade na região superior o sítio, ausente no receptor de dípteros. Esta segunda cavidade forma uma espécie de segundo sítio de ligação. De acordo

com Soin et al. (2010a), é nesta segunda cavidade em que o anel B das dibenzoilhidrazinas se liga, fazendo com que estas moléculas sejam ativas apenas em lepidópteros.

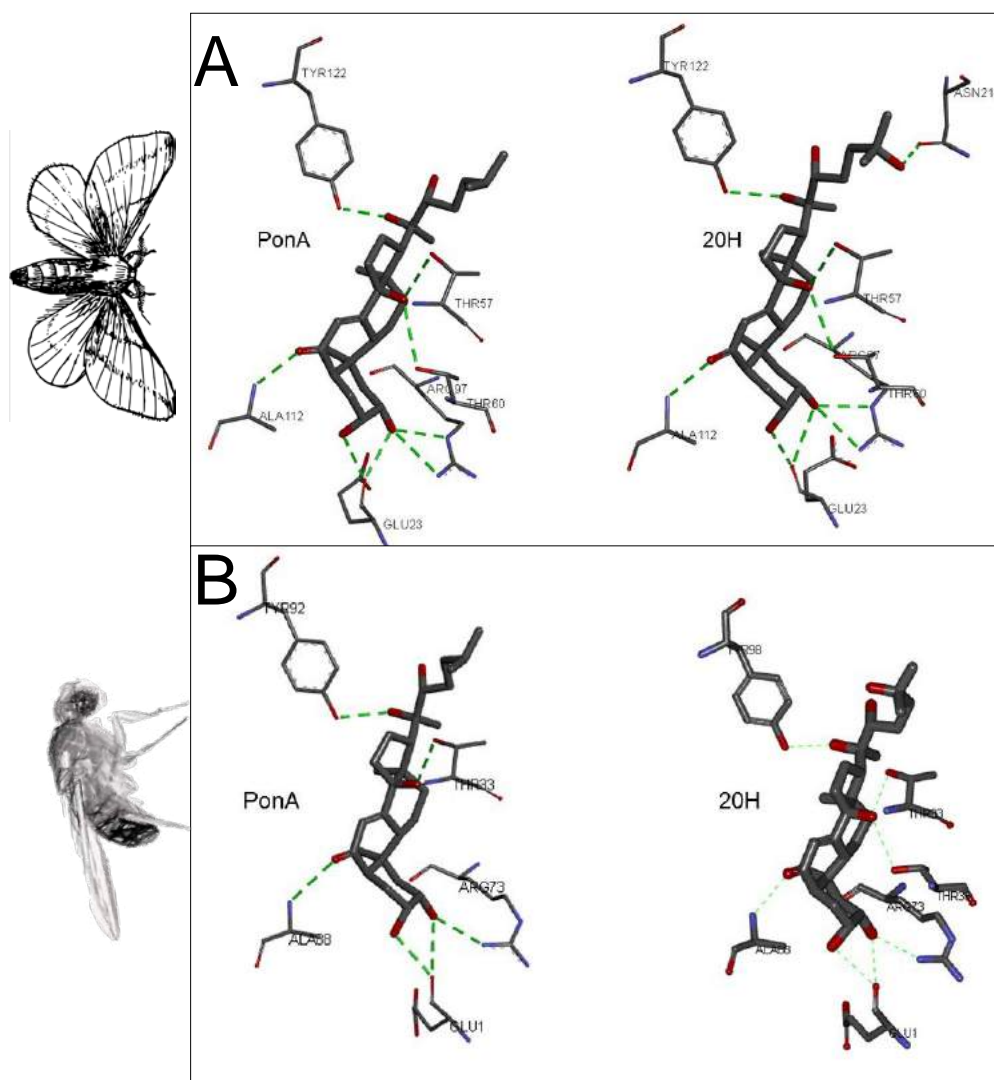
A forma com que Ponasterona-A e 20-Hidroxicdisônio se ligam nos receptores é análoga, sendo que 20-Hidroxicdisônio forma mais pontes de hidrogênio do que a Ponasterona-A, tanto em Lepidoptera como em Diptera (Figura 15). Mesmo isto sugerindo uma atividade maior, estas pontes de hidrogênio adicionais em 20-Hidroxicdisônio são neutralizadas por uma maior desolvatação dentro do sítio (BROWNING et al., 2007). Observando os modelos gerados virtualmente é possível constatar que o mesmo padrão de ligações que ocorrem em Lepidoptera, ocorre em Diptera, ou seja, 20-Hidroxicdisônio forma mais pontes de hidrogênio do que Ponasterona-A. Provavelmente ocorra maior desolvatação em Diptera também, uma vez que conforme dados obtidos neste trabalho, Ponasterona-A apresentou uma  $EC_{50}$  dez vezes superior ao 20-Hidroxicdisônio, semelhante ao observado em Lepidoptera (Figura 8).



**Figura 14.** Cavidade de ligação dos ecdisteroides dentro do receptor. Na imagem Ponasterona-A está ancorada no receptor de ecdisteroides de Lepidoptera (A) e Diptera (B). Os dois lobos localizados na porção superior da cavidade estão indicados por um sol (lado esquerdo) e por uma estrela (lado direito). No receptor de Lepidoptera (A) é possível observar o lobo esquerdo saliente, sítio o qual ligam-se as dibenzoilhidrazinas. Autor: Pinto (2017).

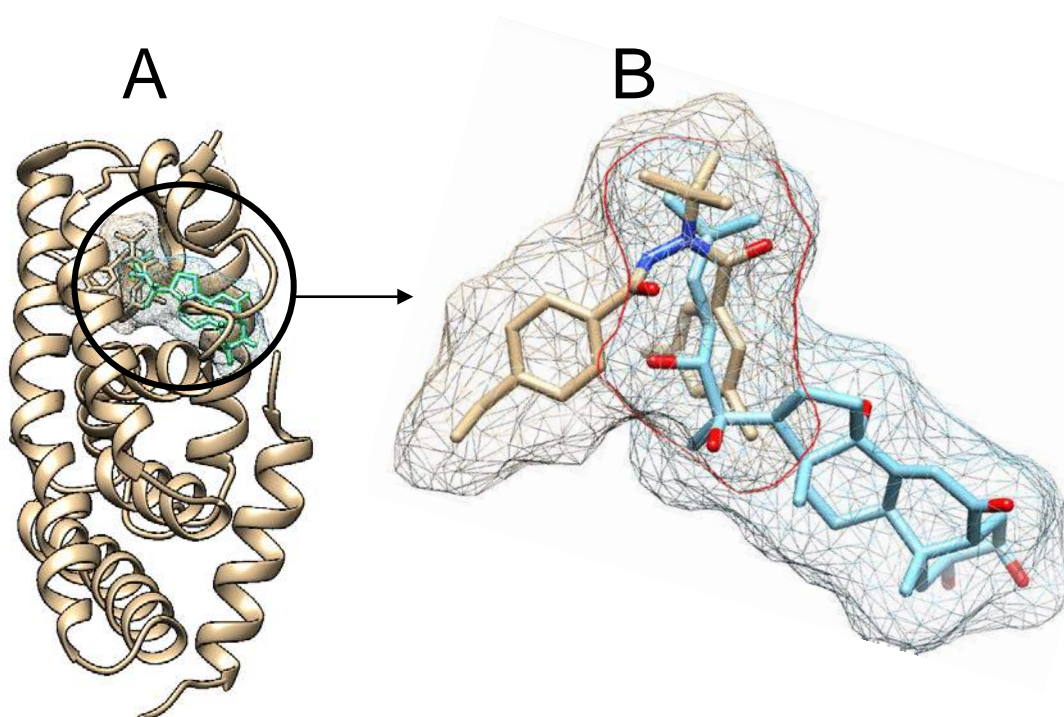
Uma vez que a diferença na atividade agonista entre compostos esteroidais e não esteroidais é atribuída aos diferentes locais de ligação no

mesmo sítio, a primeira evidência estrutural foi obtida por estudos comparativos baseados na cristalografia molecular dos complexos de receptores de ecdisteroides (BILLAS et al., 2003). A comparação dos sítios de ligação do receptor de ecdisteroides revela uma diferença considerável no local de ancoragem de tebufenozida e Ponasterona-A, em que ocorre apenas uma sobreposição parcial dos sítios. No presente estudo, as moléculas foram ancorados virtualmente em um receptor sem ligante e sobrepostos nas mesmas coordenadas, o que se observou foi a sobreposição dos sítios (Figura 16), corroborando com os dados descritos por Billas et al. (2003) e Harada et al. (2011).



**Figura 15.** Pontes de hidrogênio formadas pelos compostos esteroidais 20-Hidroxiccdisônio e Ponasterona-A no receptor de ecdisteroides de Lepidoptera (A) e Diptera (B). As linhas tracejadas em verde representam as pontes de hidrogênio enquanto que os aminoácidos da cavidade de ligação em que o esteroide se liga estão rotulados com sua sigla e numeração ordinal conforme o receptor. Autor: Pinto (2017).

Pôde-se constatar que a sobreposição ocorre nos locais onde se ancoram a cadeia alifática do ecdisteroide e o anel A da tebufenozida. Em contraste ao receptor de Lepidoptera, o receptor de Diptera carece do segundo lobo no sítio de ligação. Desta forma, não há um espaço para que as dibenzoilhidrazinas se liguem com força suficiente em receptores de ecdisteroide de Diptera. Além deste segundo lobo de ligação, o receptor de ecdisteroide de Lepidoptera apresenta maior flexibilidade, facilitando a interação com ligantes (BILLAS et al., 2003).

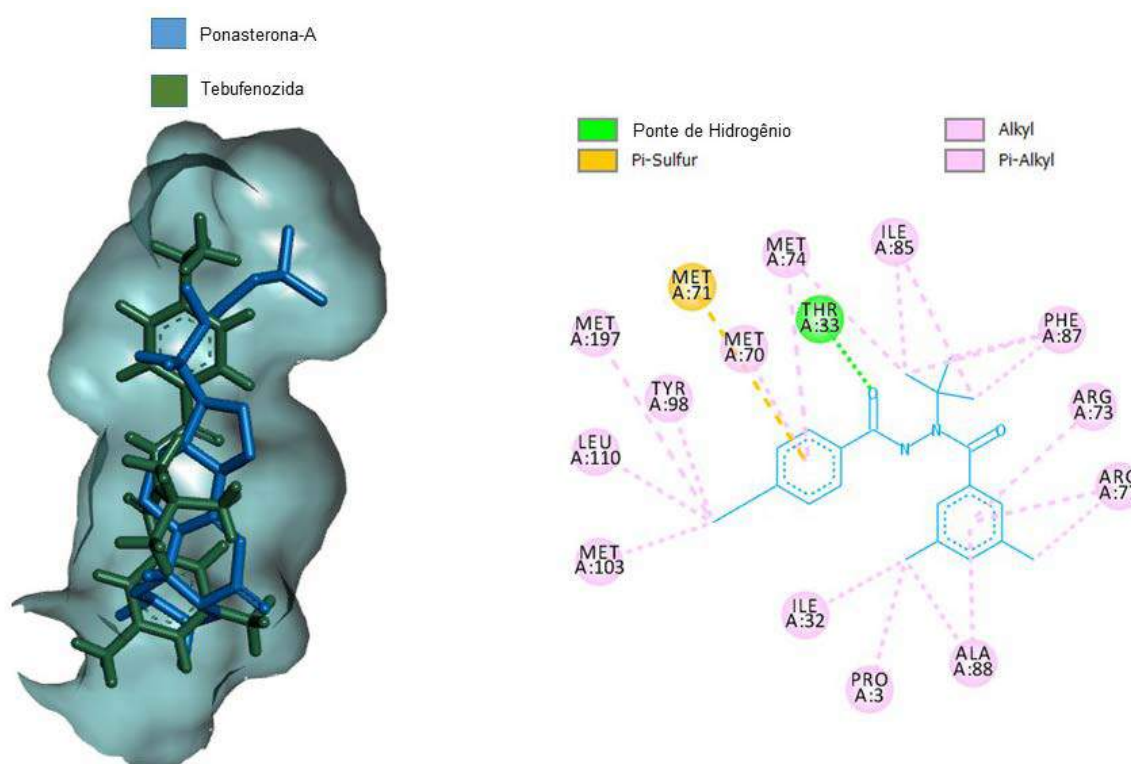


**Figura 16.** Sobreposição dos sítios de ligação de dibenzoilhidrazinas e ecdisteroide em receptor de ecdisteroide de Lepidoptera. Na figura A uma visão macro do receptor de ecdisteroide com as duas moléculas complexadas. Na figura B uma visão detalhada da sobreposição dos sítios de ligação. A área circulada em vermelho corresponde ao local exato onde ocorre a sobreposição dos sítios de ligação do anel A dibenzoilhidrazinas e da cadeia alifática ecdisteroide. Fonte: Pinto (2017).

Mesmo necessitando de uma alta concentração para obtenção de um resultado significativo, conforme os dados encontrados neste trabalho, a tebufenozida foi capaz de acionar o receptor de ecdisteroide em células S2 em aproximadamente 80% do observado nos hormônios (Tabela 2). Com os modelos 2D e 3D gerados, foi elucidada a possível forma com que a tebufenozida se liga ao receptor de ecdisteroide de Diptera, sobreposta a Ponasterona-A para comparação (Figura 17). Existem várias ligações



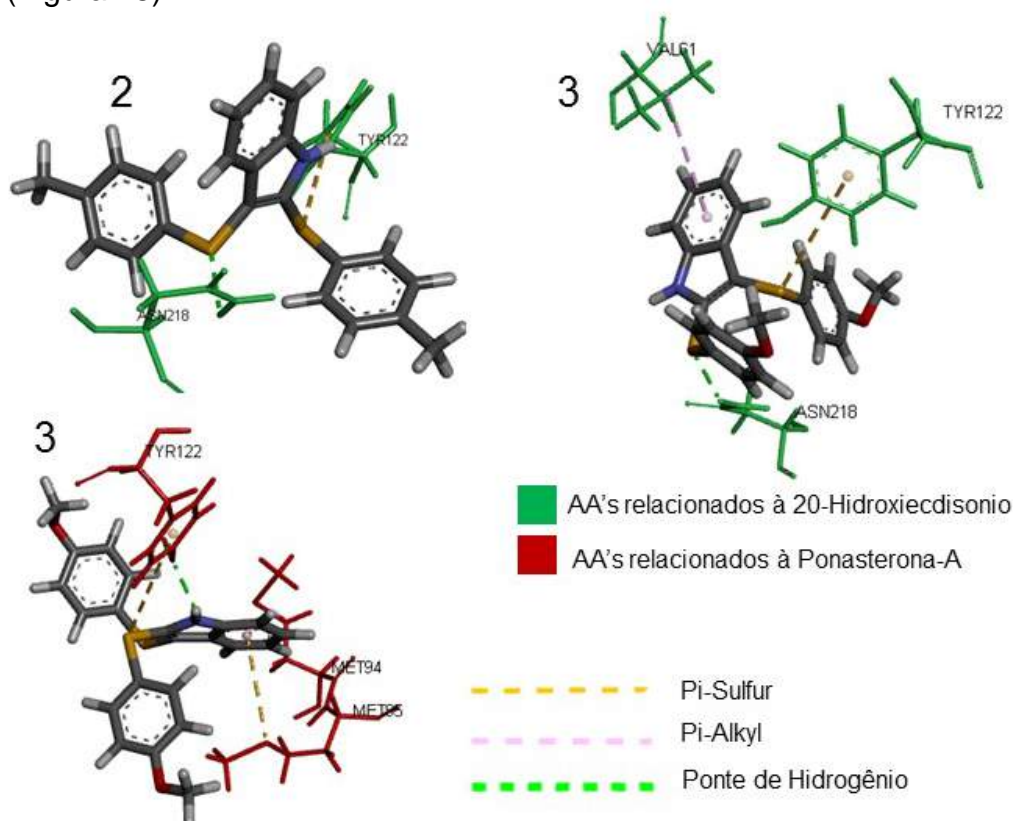
hidrofóbicas que ocorrem durante a ancoragem da molécula em um receptor, apesar disso, a atividade de uma molécula está diretamente relacionada às pontes de hidrogênio formadas, ressaltando os casos em que ocorre desolvatação, como ocorre em 20-Hidroxiecdisterona. Foi observada a formação de apenas uma ponte de hidrogênio entre a tebufenozida e o aminoácido THR33 do receptor de ecdisteroide de *D. melanogaster*. Para um melhor entendimento das interações entre dibenzoilhidrazinas e receptores de ecdisteroide de dípteros, seria muito interessante a revelação da estrutura cristalina do complexo receptor de ecdisteroide/ultraespiráculo complexada a um análogo de dibenzoilhidrazina, por difração de raio-X.



**Figura 17.** Interface gráfica da possível interação entre a tebufenozida e o receptor de ecdisteroide de *Drosophila melanogaster*. Está ilustrado o resultado da simulação da forma com que a tebufenozida se liga no receptor de ecdisteroide de Diptera. Foi realizada a sobreposição de tebufenozida e Ponasterona-A. Ressalta-se que não há a cavidade extra, como ocorre em lepidópteros. Na figura da direita estão as ligações hidrofílicas e hidrofóbicas que ocorrem entre tebufenozida e o receptor de ecdisteroide de Diptera. Autor: Pinto (2017).

Com base nos resultados obtidos nos bioensaios de agonismo e antagonismo, foram realizadas simulações virtuais das interações das novas moléculas no receptor de ecdisteroide de Lepidoptera, uma vez que apenas nesta ordem foi observada atividade. As simulações foram realizadas na cavidade de ligação das dibenzoilhidrazinas com as moléculas 2, 3 e 10,

comparando com um receptor complexado com 20-Hidroxiecdisonio, e com as moléculas 3 e 11, comparando a um receptor complexado com Ponasterona-A (Figura 18).



**Figura 18.** Interferência das interações entre os aminoácidos (AA's) do receptor de ecdisteroides de Lepidoptera e os respectivos ecdisteroides, mediadas pelas novas moléculas antagonistas. Os aminoácidos destacados em verde interagem tanto com as respectivas novas moléculas e o 20-Hidroxiecdisonio. Já os aminoácidos destacados em vermelho compartilham de interação com as novas moléculas e Ponasterona-A. Autor: Pinto (2017).

Dentre as simulações computacionais realizadas, as moléculas 10 e 11 não ancoraram adequadamente ao sítio de ligação determinado, o que indica que provavelmente estas moléculas estão interagindo em outras regiões do receptor. Já as moléculas 2 e 3 se ancoraram de forma satisfatória para inferências. A principal hipótese levantada, neste caso, é que uma vez que a molécula se liga a um determinado aminoácido, o ecdisteroide não será capaz de se ligar ao mesmo local neste aminoácido, conformando assim o efeito antagonista. Pode-se observar na Figura 18 que as moléculas 2 e 3 ligaram-se ao aminoácido TYR122, eliminando assim, uma importante ponte de hidrogênio entre um aceptor da cadeia alifática do ecdisteroide e o receptor. As moléculas 2 e 3 ligaram-se ao aminoácido ASN218, impedindo a formação de pontes de

hidrogênio com 20-Hidroxiectdisônio. A Ponasterona-A forma uma ligação hidrofóbica com o aminoácido MET94, mas pode-se observar que a molécula 3 formou uma ponte Pi-Sulfur com tal aminoácido. É notável que em todos os casos em que houve antagonismo, houveram ligações Pi-Sulfur, sendo este um indício de que tal ligação pode inibir a ação dos ecdisteroides, impedindo que os mesmos se liguem adequadamente ao sítio de ligação.

Além do entendimento das interações entre ligantes e receptores, as ferramentas computacionais permitem uma triagem massiva de compostos químicos *in silico*. Harada et al. (2011), fazendo uso das características físico-químicas de Ponasterona-A, fizeram uma triagem em um banco de dados de 2,1 milhões de moléculas. Destas milhões de moléculas, com base em parâmetros pré-estabelecidos, os autores selecionaram 24 para a sintetização, sendo que apenas três apresentaram atividade antagonista à incorporação de hidrogênio em receptores de ecdisteroides de células de Lepidoptera e Coleoptera.

Com um enfoque diferente, Deng et al. (2016) substituíram virtualmente radicais de moléculas de dibenzoilhidrazinas e com base nos resultados obtidos nas simulações, sintetizaram 38 moléculas, das quais apenas uma apresentou atividade semelhante ao tebufenozida em *Mythimna Separata* Walker, 1865 (Lepidoptera: Noctuidae). É importante ressaltar que podem haver grandes diferenças de respostas em ensaios de atividade inseticida *in silico* (virtual), *in situ* (nível celular) e *in vivo* (organismo inteiro), uma vez que organismos inteiros têm maior dificuldade de absorver as moléculas e possuem maior capacidade de detoxificar compostos químicos do que apenas células (SWEVERS; SMAGGHE, 2016).

O presente trabalho reportou o estabelecimento com sucesso de um sistema triagem com base na transfecção de células S2 e SF9 (Diptera e Lepidoptera, respectivamente) e ativação dos receptores de ecdisteroides para a descoberta de agonistas ou antagonistas a ecdisteroides, o que possibilitará futuramente a investigação de diversas moléculas nestes e em outros receptores nucleares de insetos. Além disso, comparou-se a atividade de diferentes ecdisteroides e de uma dibenzoilhidrazina comercial em ambas as linhagens celulares, onde foram observados padrões que podem ser explicados com a análise estrutural das interações receptor/ligante. A partir de



tal análise estrutural, compostos poderão ser desenhados e testados sucessivamente, buscando-se sempre um composto que seja passível de ser aplicado na agricultura. Com as ferramentas computacionais, foi investigado a forma como ocorrem as interações entre os receptores de ecdisteroides e os compostos esteroidais e não esteroidais.

Em adição, analisou-se virtualmente as interações que podem ter causado efeito antagonista das novas moléculas em células de Lepidoptera, onde foi detalhado como ocorrem as interações agonistas e antagonistas. Todos os enfoques deste trabalharam visaram o aperfeiçoamento do design racional de inseticidas com base na ativação dos receptores de ecdisteroides. É importante ressaltar que esta pesquisa não visa descobrir moléculas para aumentar a utilização de produtos químicos para o controle de artrópodes praga na agricultura, mas sim, buscar alternativas viáveis para diversificar, cada vez mais, as opções para implantação em um Manejo Integrado de Pragas sustentável, eficiente e ecologicamente aceitável.

## 5. Conclusões

O sistema de triagem em células é eficaz para testar uma quantidade massiva de compostos esteroidais e não esteroidais.

Ponasterona-A é mais ativa do que 20-Hidroxiecdisonio, mas os padrões de atividade são similares nas duas linhagens celulares utilizadas.

Tebufenozida foi mais ativo do que 20-Hidroxiecdisonio em linhagem de Lepidoptera.

As moléculas 2,3-bis(*p*-tolylthio)-1*H*-indolo, 2,3-bis((4-methoxyphenyl)thio)-1*H*-indolo, Copper(II) e Nickel(II) 1,2-bis(2-hydroxybenzoamido)ethane e Nickel(II) 1,2-bis(2-hydroxybenzoamido)ethane são antagonistas ao hormônio 20-Hidroxiecdisonio em Lepidoptera.

As interações observadas servirão como base para o design racional de novas moléculas inseticidas.

## 6. Referências bibliográficas

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P. G.;...;GEORGE, R. A. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v.287, n.5461, p.2185-2195, 2000.

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, online. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit>>. Acessado em 15 de janeiro de 2017.

APRD. Arthropod Pesticide Resistance Database, online. Disponível em: <<http://www.pesticideresistance.com/>>. Acessado em 15 de dezembro, 2016.

BECKAGE, N. E.; MARION, K. M.; WALTON, W. E.; WIRTH, M. C.; TAN, F. F. Comparative larvicidal toxicities of three ecdysone agonists on the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles gambiae*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 57, n. 3, p. 111-122, 2004.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. 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.

BORDAS, B.; KOMÍVES, T.; LOPATA, A. Ligand-based computer-aided pesticide design. A review of applications of the CoMFA and CoMSIA methodologies. **Pest Management Science**, v.9, n.4, p.393-400, 2003.

BOWERS, W. S. Insect hormones and antihormones in plants. In: ROSENTHAL, G. A.; BERENBAUM, M.R (Eds). **Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites**. Academic Press, Toronto, 2012, p.431-456.

BRAECKMAN, B.; SIMOENS, C.; RZEZNIK, U.; RAES, H. Effect of sublethal doses of cadmium, inorganic mercury and methylmercury on the cell morphology of an insect cell line (*Aedes albopictus*, C6/36). **Cell Biology International**, v.21, n.12, p.823-832, 1997.

BREDEL, M.; JACOBY, E. Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. **Nature Reviews Genetics**, v.5, n.4, p.262-275, 2004.

BROWNING, C.; MARTIN, E.; LOCH, C.; WURTZ, J. M.; MORAS, D.; STOTE, R. H.; DEJAEGERE, A. P.; BILLAS, I. M. Critical role of desolvation in the binding of 20-Hydroxyecdysone to the ecdysone receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.45, p.32924-32934, 2007.

BUENO, A. F.; FREITAS, S. Effect of the insecticides abamectin and lufenuron on eggs and larvae of *Chrysoperla externa* under laboratory conditions. **BioControl**, v.49, p.277-283, 2004.

CAO, J.; LIU, Y.; YANG, Y.; ZHANG, H.; LI, Z.; YANG, Q.; ZHANG, S.; ZHANG, Q.; LIU, X. Molecular characterization and functional analysis of the ultraspiracle (U.SP) in the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Olethreutidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.190, n.7. p.54-62, 2015.

CARMICHAEL, J. A.; LAWRENCE, M. C.; GRAHAM, L. D.; PILLING, P. A.; EPA, V. C.; NOYCE, L.; LOVRECZ, G.; WIKLER, D. A.; PAWLAK-SKRZECZ, A.; EATON, R. E.; HANNAN, G. N.; HILL, R. J. The X-ray structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand binding domain. **Journal of Biology Chemistry**, v.280, n.23 p.258-269, 2005.

CLAYTON, G. M.; PEAK-CHEW, S. Y.; EVANS, R. M.; SCHWABE, J. W. The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.4, p.1549-1554, 2001.

COATES, B. S.; ALVES, A. P.; WANG, H.; ZHOU X.; NOWATZKI, T.; CHEN, H.; RANGASAMY M.; ROBERTSON, H. M.; WHITFIELD, C. W.; WALDEN, K. K.; KACHMAN, S. D.; FRENCH, B. W.; MEINKE, L. J.; HAWTHORNE, D.; ABEL, C. A.; SAPPINGTON, T. W.; SIEGFRIED, B. D.; MILLER, N. J. Quantitative trait locus mapping and functional genomics of an organophosphate resistance trait in the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Insect Molecular Biology**, v.25, n.1, p.1-15, 2016.

COLEMAN, G. H. Organic synthesis. In: GILMAN, H. (Ed.): **Organic synthesis collective**; Wiley: New York, 1967; v.1, p.442-458.

DARVAS, B.; POLGAR, L. A. Novel type insecticides: specificity and effects on non-target organisms. In: ISHAAVA, I.; DEGHEELE, D. (Eds): **Insecticides with novel modes of action**. Springer, Berlin, 1998, p.188-259.

DELANEY, J.; CLARKE E. Modern agrochemical research. **Drug Discovery Today**, v.11, p.17-18, 2006.

DENG, X. L.; XIE, J.; LI, Y. Q.; YUAN, D. K.; HU, X. P.; ZHANG, L.; YANG, X. L. 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.

DHADIALLA, T. S.; RETNAKARAN, A.; SMAGGHE, G. Insect growth and development disrupting insecticides. **Comprehensive Insect Molecular Science**, v.6, p.55-116, 2009.

DINAN, L.; BOURNE, P. C.; MENG, Y.; SARKER, S. D.; TOLENTINO, R. B.; WHITING, P. 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, L.; HORMANN. Ecdysteroid agonists and antagonists. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Eds): **Comprehensive molecular insect science**. Elsevier Pergamon Press, Amsterdn, 2005, p.197-242.

DINAN, L. The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: what use are they? **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.72, n.3, p 126-141, 2009.

DREWES, M.; TIETJEN, K.; SPARKS, T. High-throughout screening in agrochemical reserach. In: **Modern Methods in Crop Protection Research**. Wiley, 2012, p.3-46.

ECDYBASE. The Ecdysone Handbook, online. Disponível em: <<http://ecdybase.org/>>. Acessado em 13 de janeiro de 2016.

FOULK, M. S.; WAGGENER, J. M.; JOHNSON, J. M.; YAMAMOTO, Y.; LIEW, G. M.; URNOV, F. D.; YOUNG, Y.; LEE, G.; SMITH, H. H.; GERBI, S. A. Isolation and characterization of the ecdysone receptor and its heterodimeric partner ultraspiracle through development in *Sciara coprophila*. **Chromosoma**, v.122, n.1-2, p.103-119, 2013.

FROGER, A; HALL, J. E. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. **Journal of Visualized Experiments**, v.s/n, n.6, p.253, 2007.

GONG, J.; LIU, X.; CAO, X.; DIAO, Y.; GAO, D.; LI, H.; QIAN, X. PTID: an integrated web resource and computational tool for agrochemical discovery. **Bioinformatic**, v.29, n.2, p.292-294, 2012.

GOOSEY, M. W. Towards the rational design of crop protection agents. **Pesticides Science**, v.34, n.4, p.313-320, 1992.

GRAHAM, L. D.; JOHNSON, W. M.; PAWLAK-SKRZECZ, A.; EATON, R. E.; BLIESE, M.; HOWELL, L.; HANNAN, G. N.; HILL, R. J. Ligand binding by recombinant domains from insect ecdysone receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, n.6, p.611-626, 2007.

HANCOCK, M. K.; HERMANSON, S. B.; DOLMAN, N. J. A quantitative TR-FRET plate reader immunoassay for measuring autophagy. **Autophagy**, v.8, n.8, p.1227-1244, 2012.

HARADA, T.; NAKAGAWA, Y.; OGURA, T.; YAMADA, Y.; OHE, T.; MIYAGAWA, H. 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 antiecdysteroïde de Brassinosteroides. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.302, p.417-420, 1986.

HILL, R. J.; GRAHAM, L. D.; TURNER, K. A.; HOWELL, L.; TOHIDI-ESFAHANI, 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.

HORMANN, R. E.; DINAN, L.; WHITING, P. Superimposition evaluation of ecdysteroid agonist chemotypes through multidimensional QSAR. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 17, n. 2-4, p. 135-153, 2003.

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

IWEMA, T.; BILLAS, I. M.; BECK, Y.; BONNETON, F.; NIERENGARTEN, H.; CHAUMOT, A.; RICHARDS, A.; LAUDET, G.; MORAS, D. 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.

JITONNOM, J. Computer-aided pesticide design: A short review. In: CHANDRASEKAR, R.; TYAGI, B. K.; GUI, Z. Z.; REECK, G. R. (Eds), **Short views on insect biochemistry and molecular biology**, 2014, v.2, p.685-707.

KAMIMURA, M.; MATSUMOTO, H.; KIUCHI, M.; ITO, Y.; FUJIWARA, H.; SHINODA, T. Development of a cell-based assay for ecdysteroid quantification using an early ecdysteroid-inducible gene promoter. **Applied Entomology and Zoology**, v. 49, n. 3, p. 443-452, 2014.

KOO, J.; KIM, Y.; KIM, J.; YEOM, M.; LEE, I. C.; NAM, H. G. A GUS/Luciferase fusion reporter for plant gene trapping and for assay of promoter activity with Luciferin-dependent control of the reporter protein stability. **Plant and Cell Physiology**, v.48, n.8, p.1121-1131, 2007.

LAHM, G. P.; STEVENSON, T. M.; SELBY, T. P.; FREUDENBERGER, J. H.; DUBAS, C. M.; SMITH, B. K.; CORDOVA, D.; FLEXNER, L.; CLARK, E. C.; BELLIN, A. C.; HOLLINGSHAUS, J. G. Rynaxypyr<sup>TM</sup>. A new anthranilic diamide insecticide acting at the ryanodine receptor. In: OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P. W. **Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety**, 2007, p.111-120.

LAMBERTH, C.; JEANMART S.; LUKSCH, T.; PLANT A. Current chalanges and trends in the discovery of agrochemicals. **Smarter Pest Control**, v. 341, p.741-742, 2013.

LICHTFOUSE, E. Climate change, society issues and sustainable agriculture. In: LICHTFOUSE, E. D. (Ed.) **Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms**. Series Sustainable Agriculture Reviews, Springer. 2010, p.229-232.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **European Journal of Pharmacology**, v.625, p.90-100, 2009.

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.

MERCIER, K. A.; POWERS, R. Determining the optimal size of small molecule mixtures for highthroughput NMR screening. **Journal Biomolecular NMR**, v.31 p.243-258, 2005.

MINGYUE, Z.; XIAN, L.; YUAN, X.; HONGLIN, L.; CHENG, L.; HUALIANG, J.; Computational methods for drug design and discovery: focus on China. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.34, n.10, p.549-559, 2013.

MOROU, E.; LIRAKIS, M.; PAVLIDI, N.; ZOTTI, M.; NAKAGAWA, Y.; SMAGGHE, G.; VONTAS, J.; SWEVERS, L. A new dibenzoylhydrazine with insecticidal activity against *Anopheles* mosquito larvae. **Pest Management Science**, v.69, n.7, p.827-833, 2013.

MOSALLANEJAD, H.; SOIN, T.; SWEVERS, L.; IATROU, K.; NAKAGAWA, Y.; SMAGGHE, G. Non-steroidal ecdysteroid agonist chromafenozide: gene induction activity, cell proliferation inhibition and larvicidal activity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 2, p. 70-76, 2008.

NAKAGAWA, Y. Nonsteroidal ecdysone agonists. **Vitamins and Hormones** v.73, p.131-173, 2005.

NAKAGAWA, Y.; HATTORI, K.; SHIMIZU, B. I.; AKAMATSU, M.; MIYAGAWA, H.; UENO, T. Quantitative structure–activity studies of insect growth regulators xiv. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship of ecdysone agonists including dibenzoylhydrazine analogs. **Pesticide Science**, v.53, n.4, p.267-277, 1998.

NAKAGAWA, Y.; HORMANN, R. E.; SMAGGHE, G. SAR and QSAR studies for in vivo and in vitro activities of ecdysone agonists. In: SMAGGHE, G. (Ed.), **Ecdysteroids structures and functions**. Springer, Berlin, 2009 p.475–509.

NAYLOR, L. H. Reporter gene technology: The future looks bright. **Biochemical Pharmacology**, v.58, n.5, p.749-757, 1999.



NCBI. National Center for Biotechnology Information, online. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)>. Acessado em 15 de dezembro, 2016.

OCIO, E. M.; RICHARDSON, P. G.; RAJKUMAR, S. V.; PALUMBO, A.; MATEOS, M. V.; ORLOWSKI, R.; ... EINSELE, H. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). **Leukemia**, v.28, n.3, p.525-542, 2014.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agriculture Science**, v.144 p.31-43, 2006.

OIKAWA, N.; NAKAGAWA, Y.; NISHIMURA, K.; UENO, T.; FUJITA, T.; Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators. X. Substituent effects on larvicidal activity of 1-tert-1-2-chlorobenzoyl-2-substituted benzoylhydrazines against *Chilo suppressalis* of potent derivatives. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.48, p.135-144, 1994.

PDB. Protein Data Base, Online. Disponível em <http://www.rcsb.org>. Acessado em 10 de Janeiro de 2016.

PINSTRUP-ANDERSEN, P. The future world food situation and the role of plant diseases, online (2000). Disponível em: <<http://www.scisoc.org/>>. Acessado em 16 de Janeiro de 2016.

RECHICIGL, J. E.; RECHICIGL, N. A. **Insect pest management: Techniques for enviromental protection**. Lewis Publishers, New York, 2000, p.401.

REN, B.; PEAT, T. S.; STRELTSOV, V. A.; POLLARD, M.; FERNLEY, R.; GRUSOVIN, J.; LOVREZCZ, G. O. Unprecedented conformational flexibility revealed in the ligand-binding domains of the *Bovicola ovis* ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle (USP) subunits. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v.70, n.7, p.1954-1964, 2014.

RIPPHAUSEN, P.; NISIUS, B.; PELTASON, L.; BAJORATH, J. Quo vadis, virtual screening? A comprehensive survey of prospective applications. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.53, n.24, p.8461-8467, 2010.

SAINI, V.; KUMAR, A. Computer aided pesticide design: A rational tool for supplementing DDT lacunae. **Chemical Science Transactions**, v.3, p.676-688, 2014.

SCHLEIFER, K. J. Computational approaches in agricultural research. In: JESCHKE, P.; SCHIRMER, U.; WITSCHER, M (Eds.): **Modern methods in crop protection research**. Wiley, 2012, p.21-41.

SCHREINEMACHERS, P.; TIPRAQSA, P. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy**, v.37, n.6, p.616-626, 2012.

SMAGGHE, G.; DEGHELLE, D. Metabolism, pharmacokinetics and toxicity of the first nonsteroidal ecdysteroid agonist RH-5849 on *Spodoptera exempta* (Walker), *Spodoptera exigua* (Hubner), and *Lepinotarsa decemlineata* (Say). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.46, p.149-160, 1993.

SMAGGHE, G.; DEGHELLE, D. Action of the nonsteroidal ecdysteroid mimic, RH-5992 on insects of different orders. **Pesticide Science**, v.42, p.85-92, 1994.

SMAGGHE, G.; NAKAGAWA, Y.; CARTON, B.; MOURAD, A. K.; FUJITA, T.; TIRRY, L. Comparative ecdysteroid action of ring-substituted dibenzoylhydrazines in *Spodoptera exigua*. **Archives Insect Biochemistry and Physiology**, v.41, n.1, p.42-53, 1999.

SMAGGHE, G.; GOMEZ, L. E.; DHADIALLA, T.S. The bisacylhydrazine insecticides for selective pest control, In: DHADIALLA, T. S. (Ed.), **Advanced in insect physiology: Insect growth disruptors**. Oxford: Elsevier, 2012, p.163-249.

SMAGGHE, G.; SWEVERS, L. Cell-based screening systems for insecticides, In: ISHAAYA, I; PALLI, S.; R.; HOROWITZ, A. R. (Eds.) **Advanced Technologies for Managing Insect Pests**. Springer Netherlands, 2013. p.107-134.

SMAGGHE, G.; GOMEZ, L. E.; DHADIALLA, T. S. The bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. **Advances in Insect Physiology**, v.43, p.163-251, 2013.

SOIN, T.; SWEVERS, L.; KOTZIA, G.; IATROU, K.; JANSSEN, C. R.; ROUGÉ, P.; HARADA, T.; NAKAGAWA, Y.; SMAGGHE, G. 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, 2010a.

SOIN, T.; DE GEYTER, E.; MOSALLANEJAD, H.; IGA, M.; MARTÍN, D.; OZAKI, S.; SMAGGHE, G.; SWEVERS, L. Assessment of species specificity of moulting accelerating compounds in Lepidoptera: comparison of activity between *Bombyx mori* and *Spodoptera littoralis* by in vitro reporter and in vivo toxicity assays. **Pest Management Science**, v.66, n.5, p.526-535, 2010b.

SOTHEESWARAN, S.; PASUPATHY, V. Distribution of resveratrol oligomers in plants. **Phytochemistry**, v.32, n.5, p.1083-1092, 1993.

STADEL, J. M.; WILSON, S.; BERGSMA, D. J. Orphan G-protein-coupled receptors: A neglected opportunity for pioneer drug discovery. **Trends Pharmacology Science**, v.18, p.430-437, 1997.

SWEVERS, L.; KRAVARITI, L.; CIOLFI, S.; XENOU-KOKOLETSI, M.; RAGOUSSIS, N.; SMAGGHE, G.; NAKAGAWA, Y.; MAZOMENOS, B.; IATROU, K. 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.

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.

WIEBE, K. Insights from an expert meeting in: **OECD Global Forum on Agriculture**, Paris. FAO, 2009.

WING, K. D. It takes a team: reflections on insecticide discoveries, toxicological problems and enjoying the unexpected. **Pest Management Science**, v.s/n, n.s/n, p.s/n, 2016.

WING, K. D. RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. **Science**, v.241, n.4864, p.467-469, 1988.

WING, K. D.; ALLER, H. E.; Ecdysteroid agonists as novel insect growth regulators. In: CASIDA, J. E. (ed.): **Pesticides and alternatives: Innovative chemical and biological approaches to pest control**, Elsevier, Amsterdam, 1990, p.251-257.

ZOTTI, M. J.; GEYTER, E.; SWEVERS, L.; BRAZ, A. S.; SCOTT, L. P. B.; ROUGÉ, P.; COLL, J.; GRUTZMACHER, A. D.; LENARDAO, E. J.; SMAGGHE,

G . 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, p.23-33, 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 dose-response effects. **Insect Science**, v.20, n.6, p.743-752, 2013b.