

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



Dissertação

Triagem de compostos bioativos tendo como base a ativação do receptor de ecdisteroides usando células embrionárias S2 de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae)

Jissela Morayma Gaibor Garofalo

Pelotas, 2023

Jissela Morayma Gaibor Garofalo

Triagem de compostos bioativos tendo como base a ativação do receptor de ecdisteroides usando células embrionárias S2 de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae)

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

Orientador: Dr. Moises João Zotti

Pelotas, dezembro 2023

Triagem de compostos bioativos tendo como base a ativação do receptor de ecdisteroides usando células embrionárias S2 de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitossanidade (área de conhecimento: Entomologia), Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 18 de dezembro de 2023.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Moises João Zotti (Orientador)
Departamento de Fitossanidade FAEM/UFPeI
Doutor em Applied Biological Science pela Ghent University, UGENT, Bélgica

Dr. Deivid Araújo Magano
Doutor em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Professor da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

Profa. Dr. Danielle Ribeiro de Barros
Departamento de Fitossanidade FAEM/UFPeI
Doutora em Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Prof. Dr. Edison Zefa
Instituto de biologia FAEM/UFPeI
Doutor em Zoologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp)

Todo o meu esforço, o sacrifício diário adicionado à minha vontade em minha vida, dedico a Deus e meus pais.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Moisés João Zotti, pela orientação e ensinamentos ao longo da minha jornada.

A todos os colegas do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP-UFPeI) pelo auxílio e convivência nesse período.

A banca avaliadora, pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitossanidade (PPGFs) da UFPeI, por oportunizar a realização do curso de Mestrado.

A Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), instituição a qual me deu a oportunidade de formação.

Jissela Gaibor G.

A inteligência consiste não apenas no conhecimento, mas também na capacidade de aplicar o conhecimento na prática.

(Aristóteles)

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação da
Publicação

G237t Garofalo, Jissela Morayma Gaibor

Triagem de compostos biotipos tendo como base a ativação do receptor de ecdisteroides usando células embrionárias S2 de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae) [recurso eletrônico] / Jissela Morayma Gaibor Garofalo ; Moisés João Zotti, orientador. — Pelotas, 2023.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Docking molecular. 2. Hormônio esteróides. 3. Quimioinformática.
4. Metabólitos secundários. I. Zotti, Moisés João, orient. II. Título.

CDD 595.774

Resumo

GAIBOR-GAROFALO, Jissela Morayma. **Triagem de compostos bioativos tendo como base a ativação do receptor de ecdisteroides usando células embrionárias S2 de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae).** 2023. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Um dos maiores desafios da agricultura moderna é produzir alimentos seguros e suficientes para a população. Nas últimas cinco décadas, os inseticidas convencionais têm sido utilizados no controle dos insetos-praga agrícolas e suprir as necessidades de alimentos. Todos os praguicidas sintéticos e biológicos com mecanismo de ação conhecido atuam principalmente no nível proteico. As proteínas alvo ou de ligação conhecidas através da quimioinformática e biologia molecular podem contribuir para o desenvolvimento de novos inseticidas. Na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* as principais transições de desenvolvimento são induzidas por hormônios esteróides que regulam os processos biológicos de expressão gênica e fatores de transcrição. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a citotoxicidade e estabelecer a atividade agonista e antagonista de três moléculas sintéticas F2515-1557; F2515-2741 e F3406-3330, obtidos por triagem virtual e oito extratos de espécies vegetais: Canutillo, Pimenteiro brasileiro, Cravo, Neem, Cinamomo, Samambaia dentada, Samambaia brasileira, Aivenca, Cravo mourisco no EcR de células S2 de *D. melanogaster*. Para isso foi realizada análise da interação do receptor com moléculas sintéticas e experimentos de triagem com bioensaios de citotoxicidade, e através da expressão da luciferase nas células tratadas foi determinada a atividade agonista ou antagonista utilizando o hormônio natural de insetos 20E como controle. Os resultados encontrados no acoplamento de moléculas sintéticas apresentaram ligações com os aminoácidos Metionina (MET) e Treonina (THR), em posições semelhantes ou muito próximas de todas as moléculas, além das interações de van der Waals entre as moléculas e a proteína. Embora as moléculas utilizadas nos bioensaios não tenham apresentado efeitos agonistas ou antagonistas, o extrato da planta Samambaia brasileira apresentou efeito antagonista com inibição de 91,7% do hormônio 20-hidroecdisônio.

Palavras-chave: *docking* molecular; hormônio esteróides; quimioinformática; metabólitos secundários.

Abstract

GAIBOR-GAROFALO, Jissela Morayma. **Screening of bioactives compounds based on the activation of the ecdysteroid receptor using S2 embryonic cells of *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae).** 2023. 60 p. Dissertation (Master) - Graduation Program in Crop Protection, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

One of the biggest challenges of modern agriculture is producing safe and sufficient food for the population. Over the past five decades, conventional insecticides have been used to control agricultural insect pests and meet food needs. All synthetic and biological pesticides with a known mechanism of action act mainly at the protein level. Target or binding proteins known through chemoinformatics and molecular biology can contribute to the development of new insecticides. In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, the main developmental transitions are induced by steroid hormones that regulate the biological processes of gene expression and transcription factors. Thus, the objective of this research was to evaluate the cytotoxicity and establish the agonist and antagonist activity of three synthetic molecules F2515-1557; F2515-2741 and F3406-3330, obtained by virtual screening and eight extracts from plant species: Canutillo, Brazilian pepper, Clove, Neem, Cinnamon, Fern dentate, Brazilian fern, Aivenca, Clove in the EcR of S2 cells of *D. melanogaster*. To this end, analysis of the interaction of the receptor with synthetic molecules and screening experiments with cytotoxicity bioassays was carried out, and through the expression of luciferase in the treated cells, the agonist or antagonist activity was determined using the natural insect hormone 20E as a control. The results found in the coupling of synthetic molecules showed bonds with the amino acids Methionine (MET) and Threonine (THR), in similar or very close positions to all molecules, in addition to van der Waals interactions between the molecules and the protein. Although the molecules used in the bioassays did not show agonist or antagonist effects, the extract from the Brazilian Fern plant showed an antagonist effect with 91.7% inhibition of the hormone 20-hydroecdysonium.

Keywords: molecular docking; steroid hormone; chemoinformatics; secondary metabolites.

Lista de Figuras

Figura 1 Art. I - Compostos utilizados na triagem em células de diptera (S2)	27
Figura 2 Art. I - Arvore filogenética da relação do receptor ecdisone entre drosófila e outros gêneros.	30
Figura 3 Art. I - Design gráfico representando do modelo tridimensional do receptor de ecdisteroides	31
Figura 4 Art. I- Modelo de acoplamento molecular para as moléculas análogas com o receptor de ecdisteróides de díptera.	33
Figura 5 Art. I - Curvas sigmoides de dose-resposta referentes a atividade agonista de 20-Hidroxiectdisônio em células S2.	35
Figura 6 Art. I - Viabilidade celular das três moléculas em concentrações molares	36
Figura 7 Art. I - Efeito agonista (A) e antagonista (B) observada para as três moléculas nas linhagens celular S2, comparados com os controles o hormônio 20-hidroxiectdisonio e DMSO (Solvente de diluição das moléculas).	37
Figura 1 Art. II - Curvas sigmoides de dose-resposta referentes a atividade agonista de 20-Hidroxiectdisônio em células S2.	50
Figura 2 Art. II - Efeito agonista (A) e antagonistas (B) dos extratos vegetais em linhagem celular S2, comparados com o controle hormônio 20-hidroxiectdisoni.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 Art. I - Identificação das moléculas selecionadas no estudo segundo fórmula química, peso molecular, pureza inicial e solvente utilizado para diluição.....	27
Tabela 2 Art. I - Estimativas dos parâmetros do modelo log-logístico, ajustados para 20-hecdisonio.....	34
Tabela 3 Art. I - Atividade citotóxica de compostos nos bioensaios com a cultura celular S2.	36
Tabela 1 Art. II - Estimativas dos parâmetros do modelo log-logístico, ajustados para 20-Hecdisonio.	50
Tabela 2 Art. II - Viabilidade dos extratos utilizados no estudo de acordo com a concentração utilizada nos estudos posteriores.	51

Lista de abreviaturas e siglas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
20E	20-hidroxiectdisôna
A/B	Domínio de ativação transcricional
ANOVA	Análise de variância
EcR	Receptor ecdisona
GL	Graus de liberdade
GP	Glândula protoráxica
IGR	Regulador de crescimento de inseto
LBVS	Domínio de Ligação
Log	Logaritmo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NRs	Receptores nucleares
PPARS	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
RARS	Receptores para ácido retinóico
RX	Receptor retinóide x
SBVS	Virtual <i>Screening</i> baseado em estrutura
TRs	Receptores de hormônios tireoidianos
TV	Triagem virtual
USP	Proteína do ultraspiráculo
VDR	Receptor de vitamina D

Sumário

1. Introdução Geral	14
2. Revisão de Literatura	15
3. Artigo 1- Citotoxicidade de compostos químicos tendo como alvo o receptor de ecdisteroides em linhagem celular S2 de <i>Drosophila melanogaster</i> Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae)	23
3.1 Introdução.....	25
3.2 Material e métodos	26
3.3 Resultados	29
3.4 Discussão	29
3.5 Conclusões	38
3.6 Referências	39
4 Artigo 2- Prospecção de compostos vegetais tendo como alvo o receptor de ecdisteroides em linhagem celular S2 <i>Drosophila melanogaster</i> Meigen, 1830 (Diptera, <i>Drosophilidae</i>)	42
4.1 Introdução.....	44
4.2 Material e métodos.....	46
4.3 Resultados	49
4.4 Discussão.....	52
4.4 Conclusões	53
5 Considerações finais	56
6 Referencias gerais	57

1. Introdução Geral

Os pesticidas inorgânicos, botânicos e naturais surgiram à medida que a agricultura avançava em escala global. Foram utilizados principalmente durante os séculos XIX e XX para manter ou aumentar a produtividade das culturas agrícolas. Para controlar insetos-praga, foram desenvolvidos e utilizados nas últimas cinco décadas inseticidas convencionais de amplo espectro, como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Isso reduziu as perdas de rendimento agrícola (CASIDA; QUISTAD, 1998).

O conhecimento da fisiologia e biotecnologia ajuda no controle de insetos por meio de métodos biológicos e químicos, possibilitando a descoberta de novas moléculas com ação inseticida ambientalmente aceitável, tais como clorfenapir, indoxacarbe e metoxifenoazida. Outros, como o ciantraniliprole e o espinoteram, foram registrados. A indústria de pesticidas investigou aproximadamente 30 alvos para o desenvolvimento de inseticidas porque essas moléculas inseticidas agem sobre proteínas alvo (IRAC, 2016).

Todos os inseticidas com mecanismo de ação conhecidos atuam ao nível proteico, onde também agem os inseticidas biológicos. Essas proteínas são alvos conhecidos e sua identificação é crucial no planejamento racional de moléculas inseticidas. Avanços importantes em quimioinformática e biologia molecular no desenvolvimento de medicamentos têm contribuído para o surgimento de novos compostos ativos em pesticidas (DAS, 2016).

Os receptores nucleares (RN) são os mais abundantes entre os fatores de transcrição e desempenham um papel importante nos processos biológicos que regulam a expressão de genes alvo através de diversas vias ativadas pelos hormônios juvenis, ecdisteroides ou neuropeptídeos. Além disso, os RN são importantes moduladores transcricionais na diferenciação e desenvolvimento de insetos (WU; LOVERDE, 2021).

O receptor de ecdisteroides (EcR) pertence a uma superfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição dependentes de ligantes. O EcR está presente apenas em invertebrados e desempenha um papel central na regulação da expressão de uma ampla gama de genes durante o desenvolvimento e reprodução dos insetos. A entidade funcional é um heterodímero composto pelo EcR e proteína ultraspiráculo (USP), que é um

ortólogo do receptor X de retinóide de vertebrados (RXR) (BILLAS; MORAS, 2005).

Como seu espectro é limitado aos artrópodes, o desenvolvimento de agonistas/antagonistas de ecdisteroides é uma estratégia atraente para o controle de insetos. Atualmente, apenas quatro inseticidas comerciais de dibenzoilhidrazina estão disponíveis: tebufenozida, metoxifenozida, cromatofenozida e halofenozida (BLOOD *et al.*, 2012).

A biotecnologia celular aplicada ao desenvolvimento de um sistema de detecção de alto rendimento, que expressa endogenamente receptores nucleares utilizando culturas de células de insetos para o desenvolvimento de novos inseticidas, potencializa a descoberta de novas moléculas (ZOTTI *et al.*, 2013). Portanto, uma das vantagens da utilização da cultura celular é que a célula secreta o molde endógeno de todos os componentes necessários ao funcionamento do organismo (ZOTTI *et al.*, 2013). Além disso, a cultura celular do inseto pode ser utilizada como substituto para os bioensaios convencionais, nos quais todo o corpo do inseto é utilizado para avaliação.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a citotoxicidade e estabelecer a atividade agonista e antagonista das moléculas sintéticas F2515-1557, F2515-2741, F3406-3330 obtidas por triagem virtual, e de oito extratos de espécies vegetais: Canutillo, Pimenteiro brasileiro, Cravo, Neem, Cinamomo, Samambaia dentada, Samambaia brasileira, Aivenca, Cravo mourisco, no EcR e nas células S2 de *D. melanogaster*.

2. Revisão de Literatura

A importância do controle químico dos insetos-praga

No início da agricultura, o ser humano preocupava-se em proteger suas culturas contra fatores bióticos que poderiam afetar negativamente a produção. Até mesmo passagens bíblicas descrevem a destruição de colheitas por ervas daninhas, insetos e doenças (LAMBERTH *et al.*, 2013). Alguns problemas na agricultura podem ser resolvidos a longo prazo, mas com a população em constante aumento, estimada em 9,7 bilhão de pessoas até 2050, o maior desafio da agricultura moderna é fornecer alimentos seguros em quantidades suficientes para a população (NATIONS, 2023).

É de grande relevância para o planeta preservar as áreas nativas, essenciais para manter a biodiversidade. Portanto, as áreas agrícolas tornam-se limitadas e é importante otimizar áreas que ainda não foram exploradas para a agricultura (OERKE, 2006). Até 2032, estima-se um aumento de apenas 15% na produção agrícola devido à expansão da área cultivada (OCDE-FAO, 2023).

Os inseticidas e seus modos de ação

Neste século, os principais desafios para a gestão integrada de pragas serão a detecção de novas moléculas ambientalmente responsáveis, inseticidas racionalmente planejados e a utilização de novos métodos de controle de pragas. O conhecimento da fisiologia, toxicologia e biotecnologia dos insetos permite alcançar uma harmonização holística para reduzir o uso de pesticidas sintéticos na proteção das plantas (ZOTTI *et al.*, 2013).

Alguns dos inseticidas utilizados com mecanismos de liberação descobertos há cerca de cinquenta anos, são geralmente tóxicos para muitos organismos e causam difícil degradação ambiental (DELANEY *et al.*, 2006). Os reguladores de crescimento são considerados mais seguros do que os inseticidas neurotóxicos de amplo espectro (DARVAS e POLGAR, 1998).

Os inseticidas, de acordo com seu mecanismo de ação, são classificados fisiologicamente e pela sua estrutura química em nervosos, musculares, de crescimento e desenvolvimento, respiratórios e digestivos (REZENDE-TEIXEIRA *et al.*, 2022).

A classificação dos modos de ação, de acordo com o Comitê Brasileiro de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC), proporciona aos agricultores produtos mais técnicos e profissionais para a saúde geral das culturas. Portanto, o manejo eficaz com inseticidas ajuda a minimizar o risco de resistência aos princípios ativos nas populações de insetos. Assim, temos miméticos hormonais juvenis, cujo mecanismo de ação é a regulação do crescimento com o princípio ativo piriproxifeno 7C, enquanto, ao nível do receptor ecdisteroides, temos agonistas das dibenzoilhidrazinas (IRAC, 2022).

Papel do EcR na regulação génica

Os hormônios esteróides induzem grandes transições de desenvolvimento em organismos multicelulares, como na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, um inseto modelo para identificar sinais peptídicos

devido à fácil manipulação que regula a síntese de 20-hidroxiecdisônio (KANNANGARA; MIRTH; WARR, 2021).

O 20-hidroxiecdisônio regula múltiplos processos biológicos, desde a expressão gênica e diferenciação morfogênica até a indução da expressão de uma combinação de fatores de transcrição. O mecanismo de regulação dos processos biológicos começa com o receptor nuclear EcR (receptor de ecdisteroides) USP (ultraspiráculo), que está acoplado ao hormônio que regula a transcrição de um grupo inicial de genes codificadores de proteínas (KANNANGARA; MIRTH; WARR, 2021).

O receptor de ecdisteroides, formado por EcR e USP, é um receptor nuclear heterodimérico. Nos insetos, o hormônio 20-hidroxiecdisônio (20E) é o principal regulador das transições de desenvolvimento da metamorfose. Quando ligado ao complexo EcR/USP, ele codifica fatores de transcrição (MELLO *et al.*, 2014).

Receptores nucleares

Consiste em uma superfamília de fatores de transcrição ativados por ligantes, os receptores nucleares (RN) regulam a expressão de genes relacionados ao crescimento, apoptose e metabolismo. Os RNs possuem domínios chamados A, B, C, D, E e F em sua estrutura. A região AB contém o primeiro domínio de ativação transcricional, a região C representa o domínio de ligação ao DNA, a região D contém a sequência de localização nuclear, a região E contém o domínio de ligação ao ligante em alguns RNs, e a região F está relacionada à modulação de sua atividade (ORTEGA-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2015).

Apenas 21 receptores foram encontrados no genoma da *Drosophila*, responsáveis pela regulação do metabolismo, homeostase, crescimento e desenvolvimento celular crucial, sendo separados de acordo com sua função e estrutura em sete grupos (RIBEIRO, 2019). A primeira subfamília NR1 compreende receptores de hormônios tireoidianos (TR), receptores de ácido retinóico (RARs), receptores de vitamina D (VDR), receptores de ecdisteroides (EcR) e receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs). A segunda família NR2 inclui receptores de retinóides e andrógenos (AR), enquanto na família NR4 contém os receptores do fator indutivo de crescimento nervoso B (NGFI-B). O fushi tarazu (FTZ) e fator 1 fushi tarazu (FTZ-F1) são esteroideogênicos de *Drosophila* encontrados na família RN5, uma sexta família

de RN6 carrega apenas o fator 1 nuclear de células germinativas (LAUDET, 1997; GERMAIN, 2006; WU; LOVERDE, 2011).

Os únicos receptores nucleares com estruturas resolvidas experimentalmente pertencem ao complexo heterodimérico EcR-USP (domínios E). Este complexo é ativado pela ligação do hormônio 20-hidroxiecdisônio (20E), produzindo um sinal endocrinológico crucial que inicia os processos de muda e metamorfose do exoesqueleto dos artrópodes (RIERA, 2018).

Funções gerais de dois receptores nucleares

Os receptores nucleares funcionam principalmente como fatores de transcrição ativados por ligantes. Isso ocorre porque uma região conservada dos domínios de ligação ao DNA dos RNs contém subdomínios que coordenam os íons zinco com resíduos de cisteína, permitindo que os RNs se liguem a áreas específicas de sequências promotoras de genes que reprimem ou ativam a transcrição (WEIKUM; LIU; ORTLUND, 2018)

A estrutura dos receptores nucleares indica que o LBD (domínio de ligação) é formado por um núcleo conservado de 12 hélices α , numeradas da hélice 1 (H1) à hélice 12 (H12), e uma folha β antiparalela curta de duas fitas (S1-S2), dispostos em formato de sanduíche de três camadas, gerando uma cavidade hidrofóbica conhecida como bolsa de ligação de ligante (LBP), que ancora ligantes naturais e moléculas com afinidade (BALAGUER; DELFOSSE; BOURGUET, 2019).

Triagem e desenvolvimento de novas moléculas

Os avanços na biologia molecular resultaram em um aumento significativo no número de células receptoras que foram descobertas e clonadas, uma vez conhecidos seus ligantes e mecanismos celulares, o desenvolvimento de medicamentos será aprimorado (STADEL *et al.*, 1997).

Em biologia molecular, um repórter é um gene construído e ligado à sequência reguladora de outro gene de interesse. Este gene repórter pode ser facilmente transfectado nas células de organismos, formando um sistema de triagem de compostos ativos (NAYLOR, 1999). A Triagem Virtual (TV) (*Virtual Screening*), aborda a utilização de algoritmos em bibliotecas de compostos químicos por meio de modelos computacionais, com a finalidade de avaliar ou selecionar moléculas com propriedades desejadas para a identificação de novos compostos bioativos de baixo custo. Os métodos utilizados para a TV são

baseados na estrutura LBVS (*Ligand-based Virtual Screening*) e SBVS (*Structure-based Virtual Screening*) (RODRIGUES, 2021).

Uma abordagem de triagem baseada na estrutura molecular envolve a ligação de ligantes específicos a uma categoria de proteínas, cujas características ou descrições do farmacóforo são usadas para examinar conexões entre os modelos ativos e os compostos químicos contidos no banco de dados (MA *et al.*, 2012).

No trabalho de desenvolvimento de um sistema de triagem virtual de alto desempenho (HTS), Eldridge *et al.* (2002) relatam os benefícios da descoberta de novos inseticidas, como a identificação de novos alvos de inseticidas e uma melhor compreensão do mecanismo de ação dos inseticidas comercializados. O primeiro inseto com genoma completamente sequenciado foi *Drosophila melanogaster* (DREWES *et al.*, 2012), em que são realizados numerosos estudos de genética e biologia molecular, incluindo pesquisas sobre o desenvolvimento de inseticidas baseados em receptores nucleares.

Planejamento racional de inseticidas com foco em receptores nucleares

Com o avanço tecnológico, tem sido possível aplicar metodologias computacionais com o propósito de ampliar a exploração de moléculas inseticidas. Duas metodologias são utilizadas para prospectar moléculas, baseadas em estruturas-alvo ou em ligantes conhecidos. Ambas as técnicas utilizam a Triagem Virtual (TV), que acelera a descoberta de novas moléculas em um curto período de tempo (VARGAS, J; BARROS, G; REBELLO, 2019).

O objetivo da TV é selecionar moléculas utilizando técnicas computacionais (*in silico*), baseadas na disponibilidade de um banco de dados com grandes quantidades de moléculas. Assim, a TV identifica estruturas com maior probabilidade de ligação a determinado receptor ou enzima (DA SILVA *et al.*, 2021).

Métodos computacionais

As estratégias computacionais utilizadas no planejamento de medicamentos têm experimentado rápido desenvolvimento, incorporando algoritmos e técnicas que contribuem para a compreensão da biologia. Através de procedimentos de bioinformática, é possível obter detalhes estruturais da sequência de aminoácidos de uma proteína, mesmo que sua estrutura não tenha

sido previamente elucidada, o que inclui a identificação de sítios de ligação (ARAÚJU, 2023). A simulação de biomoléculas é um método que ajuda a revelar o mecanismo molecular da proteína-alvo e novas perspectivas para o *design* de fármacos. Vários métodos são utilizados a partir de bibliotecas moleculares, sendo um deles o *docking molecular* e a Relação Quantitativa Estrutura-Atividade (QSAR) (DOS SANTOS; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2018).

O *docking* molecular é o método mais utilizado, que baseia sua abordagem na simulação do ajuste entre duas moléculas. A metodologia centra-se no conceito de “chave-fechadura” de Emil Fischer (1894), onde o substrato se encaixa adequadamente no sítio de ativação ou cavidade de ligação e ocorre a reação bioquímica. Ao longo dos anos, surgiram atualizações, como o “encaixe induzido”, que conclui que o *docking* molecular é um preditor da orientação e das interações formadas entre uma molécula em relação à outra (SANTOS, 2021).

Validação da atividade inseticida de agonistas/antagonistas em testes de toxicidade in vivo

Os inseticidas que afetam a regulação do crescimento através do receptor de ecdisteroides, como as dibenzoilhidrazinas e suas variantes, atuam como agonistas de ligação ao 20E no receptor de ecdisteroides (EcR). Isso resulta em descamação precoce, formação de cutícula distorcida e inibição do processo de alimentação nos estágios larvais de lepidopteros e dipteros (BARISCAN, 2019).

O agonista 20H, tebufenozida, induz irreversivelmente a expressão genética e seu modo de ação parece ser o mesmo do hormônio 20E, exceto que o processo de eliminação não é completo. O hormônio natural 20E aumenta ao máximo durante cada instar do inseto, durante sua ascensão expressa os genes regulados positivamente envolvidos no ciclo de muda, após o pico quando o hormônio é eliminado, os genes são regulados negativamente para completar o processo de muda. A tebufenozida parece estar fortemente ligada ao sítio de ligação e permanece não degradada, expressando apenas os genes regulados positivamente, deixando a larva num estado de muda incompleta (LEE *et al.*, 2016).

Citotoxicidade de extratos vegetais

É feita referência à utilização de material vegetal com propriedades inseticidas, sendo a toxicidade dirigida contra insetos atribuída à existência de metabólitos secundários com efeitos nocivos, classificados como ácidos graxos,

glicolípídios, fenóis aromáticos, aldeídos, alcaloides, cetonas, álcoois, terpenoides, flavonoides, limonoides, naftoquinonas, sacarídeos, éteres poliálcoois, saponinas e sapogeninas. Esses metabólitos podem manifestar diversos efeitos, como repelentes, ovicidas, inseticidas, interferir na alimentação, afetar a fertilidade e o crescimento dos insetos (WU, 2021; CORZO, 2012).

Os inseticidas botânicos teriam menor probabilidade de gerar resistência devido à alta biodiversidade de plantas que poderiam ser utilizadas como extratos vegetais. Nem sempre serão encontradas as mesmas concentrações com ação direta sobre o inseto. Plantas pertencentes às famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiatae e Canellaceae foram documentadas com atividade inseticida (BRAGA E SILVA; SATO; RAGA, 2019).

Certas substâncias de origem vegetal com propriedades inseticidas interferem no sistema neuroendócrino que controla a metamorfose, no metabolismo respiratório celular, bem como no sistema hormonal que controla a produção e liberação de ecdisteroides e 20-hidroxiectdisônio (BRAGA E SILVA; SATO; RAGA, 2019).

Artigo - Revista Neotropical Entomology

Citotoxicidade de compostos químicos tendo como alvo o receptor de ecdisteroides em linhagem celular S2 de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae)

GAIBOR-GAROFALO, Jissela Morayma; WEGNER, Juliana; ZOTTI, Moises.
João

3. Artigo 1- Citotoxicidade de compostos químicos tendo como alvo o receptor de ecdisteroides em linhagem celular S2 de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae)

¹GAIBOR, G. J. M; ¹WEGNER, J; ¹ZOTTI, M. J.1

Resumo: Os reguladores de crescimento de insetos (IGR) são considerados agentes pesticidas altamente adequados para enfrentar os desafios do século XXI. Durante o processo de muda dos insetos, os ecdisteroides e a quitinase podem alterar o processo de esfoliação, causando mortalidade de larvas ou pupas. *Drosophila melanogaster* é um dos insetos mais estudados na área de genética devido ao número de mutações que apresenta. Ferramentas de bioinformática, sistemas virtuais e *docking* molecular preveem a orientação das moléculas com um receptor correspondente a uma proteína e um ligante, sendo essas ferramentas essenciais para a descoberta de novos fármacos e inseticidas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de moléculas obtidas por triagem virtual e estabelecer a atividade agonista ou antagonista sobre o receptor ecdisteroides em células de *D. melanogaster*. Para isso, foi realizada a análise da interação do receptor com as moléculas. Em seguida, foram conduzidos experimentos de triagem com bioensaios de citotoxicidade utilizando as moléculas F2515-1557, F2515-2741 e F3406-3330. A atividade agonista e antagonista foi determinada pela expressão da luciferase em células tratadas. Os resultados encontrados no *docking* molecular mostraram ligações com os aminoácidos MET e THR, em posições similares ou muito próximas em todas as moléculas, além de entre 12 e 18 interações de van der Waals. No entanto, as moléculas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade não apresentaram efeito agonista ou antagonista.

Palavras-chave: *Docking* molecular; Muda; Ensaio repórter; Ligante.

Article 1- Cytotoxicity of chemical compounds targeting the ecdysteroid receptor in the S2 cell line of *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae)

¹GAIBOR, G. J. M; ¹WEGNER, J; ¹ZOTTI, M. J.1

Abstract: Insect growth regulators (IGR) are considered highly suitable pesticidal agents to face the challenges of the 21st century. During the insect molting process, ecdysteroids and chitinase can alter the exfoliation process, causing mortality of larvae or pupae. *Drosophila melanogaster* is one of the most studied insects in the field of genetics due to the number of mutations it presents. Bioinformatics tools, virtual systems and molecular docking predict the orientation of molecules with a receptor corresponding to a protein and a ligand, these tools being essential for the discovery of new drugs and insecticides. Thus, the objective of this work was to evaluate the cytotoxicity of molecules obtained by virtual screening and establish the agonist or antagonist activity on the ecdysteroid receptor in *D. melanogaster* cells. For this, the interaction of the receptor with the molecules was analyzed. Then, screening experiments with cytotoxicity bioassays were conducted using the molecules F2515-1557, F2515-2741 and F3406-3330. Agonist and antagonist activity was determined by luciferase expression in treated cells. The results found in molecular docking showed bonds with the amino acids MET and THR, in similar or very close positions in all molecules, in addition to between 12 and 18 van der Waals interactions. However, the molecules used in cytotoxicity tests did not show agonist or antagonist effects.

Keywords: Molecular docking; Change: Reporter essay; Ligand.

3.1 Introdução

Atualmente, o controle químico tornou-se a estratégia predominante para o manejo de insetos. No entanto, o uso extensivo de inseticidas sem a implementação de estratégias adequadas tem levado a um aumento significativo no surgimento de resistência, conforme observado por Xu *et al.*, 2020. Consequentemente, existe uma necessidade urgente de desenvolver novas moléculas inseticidas eficazes.

Drosophila é um modelo clássico *in vivo* para examinar a reprodução, sendo um organismo amplamente estudado em genética e embriologia (FU *et al.*, 2022). O gênero é caracterizado por mais de 2.000 espécies. Dentre elas, *D. melanogaster* é um dos insetos mais estudados na área de genética pela quantidade de mutações que apresenta, além de seu fácil desenvolvimento e manuseio em laboratório, o que possibilita seu estudo e análise (BARRERA, 2017).

Os reguladores de crescimento de insetos (IGRs) são considerados pesticidas altamente adequados para enfrentar os desafios do século XXI. Durante a fase de muda dos insetos, tanto o receptor de ecdisteroides quanto as quitinases podem alterar esse processo, resultando na morte das larvas ou pupas. No entanto, o progresso no desenvolvimento dos IGRs foi restringido devido à falta de complexidade estrutural suficiente nos análogos dos ecdisteroides (JIANG *et al.*, 2020).

Os desreguladores endócrinos são substâncias presentes no ambiente que alteram o controle homeostático da reprodução, assemelhando-se à ação dos hormônios endógenos (CHAN; CHU; CHAN, 2019). A muda em artrópodes é regulada por hormônios esteróides, sendo o mais comum o 20-hidroxiecdisonio (20E), que participa da regulação do crescimento dos insetos.

Os receptores nucleares são reguladores transcricionais dependentes de ligantes localizados no núcleo celular. Eles determinam a expressão específica do promotor e participam de vários processos fisiológicos (MUÑOZ-CABRERA; SANDOVAL-HERNÁNDEZ; ARBOLEDA, 2021).

O EcR possui as características estruturais de um receptor nuclear, consistindo em um domínio estrutural A/B (domínio de ativação transcricional), um domínio estrutural C (domínio de ligação de DNA), um domínio estrutural D (região dobradiça), um domínio estrutural E (ligação ao ligante) e um domínio estrutural F (modulador de atividade) (FENG *et al.*, 2023).

As dibenzoilhidrazinas RH-5992 (Tebufenozida), RH-0345 (Halofenozida), RH-2485 (Metoxifenozida), são agonistas não esteróides do 20E, que exibem sua atividade inseticida através da interação com proteínas receptoras de ecdisteroides. O primeiro agonista de ecdisteroides, uma dibenzoilhidrazina, foi descoberto por cientistas da *Rohn and Hass Company* em 1983 (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998).

Atualmente, as ferramentas de bioinformática, incluindo a técnica de *docking* molecular, têm a capacidade de prever a posição da molécula do ligante em relação à proteína (VEGA, 2018). Estas ferramentas adquiriram um papel fundamental na aceleração do processo de descoberta de novos fármacos e inseticidas (SERRANO, 2022).

O sistema de triagem virtual é um instrumento que permite a descoberta de novos compostos baseados em estruturas por meio de parâmetros computacionais, sendo o *docking* molecular eficaz para prever interações ligante-receptor (HARADA *et al.*, 2011). Assim, o objetivo deste artigo foi avaliar a citotoxicidade de moléculas obtidas por triagem virtual e estabelecer a atividade agonista ou antagonista sobre o receptor de ecdisteroides em células de *D. melanogaster*.

3.2 Material e métodos

3.2.1. *Docking*, modelagem tridimensional e análise de interação do receptor com as moléculas.

Para realizar o modelo do receptor de *D. melanogaster*, foram utilizadas as estruturas das proteínas dos receptores 1R1K (ligado à ponasterona A), 1R20 (ligado ao agonista sintético BYI06830) e 7BJV (ligado ao agonista sintético BYI09181) do inseto *Heliothis virescens*, 2NXX (ligada à ponasterona A) do inseto *Tribolium castaneum*, 1Z5X (complexado com ponasterona A) do inseto *Bemisia tabaci*, obtidas no Banco de Dados de Proteínas do Centro de Colaboração em Bioinformática Estrutural (RCSB-PDB). Em seguida, as sequências dos receptores foram copiadas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para realizar o alinhamento e a construção da árvore filogenética. As sequências dos nucleotídeos foram baixadas e carregadas na plataforma *Swiss model*, adicionando-se a sequência de *D. melanogaster* para realizar a modelagem. Usando o software *Discovery*, todas as sequências foram alinhadas novamente, realizando-se a construção do modelo homólogo. O software PyMOL, de Schrödinger (versão 1.7.4), foi usado para produzir a imagem tridimensional da interação ligante-proteína e visualizar a cavidade presente na estrutura, por onde ingressa o ligante. As estruturas tridimensionais dos compostos químicos foram obtidas do Banco de Dados Público de Produtos Químicos (PubChem), mantido pelo NCBI.

3.2.2. Experimentos de triagem de moléculas sintéticas

Os experimentos de triagem com moléculas foram realizados no Laboratório de Entomologia Molecular do Departamento de Fitossanidade, na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), em Pelotas-RS. A cultura celular do organismo-alvo (células embrionárias de *Drosophila melanogaster*, linhagem S2) foi gentilmente doada pelo Instituto Butantan (São Paulo). As células foram mantidas em meio de cultura *InsectXpress*[™] (Lonza®) em frascos de cultura celular de 25 cm² (KASVI®). Para a manutenção das células, foram realizadas subculturas, nas quais 0,5 ml do meio com as células foram transferidos para um novo frasco contendo 4,5 ml de meio de cultura (*Insect Express*[™]), e mantidas em incubação em estufa a uma temperatura constante de 27°C. Nos experimentos de triagem, foram testadas três moléculas análogas à tebufenozida fornecidas pela *Life Chemicals* (Kyiv, Ucrânia) (Figura 1 e Tabela 1). O hormônio ecdisteroide 20-hidroxiectdisônio (~95% de pureza) foi adquirido da *Sigma Aldrich* (Bornem, Bélgica).

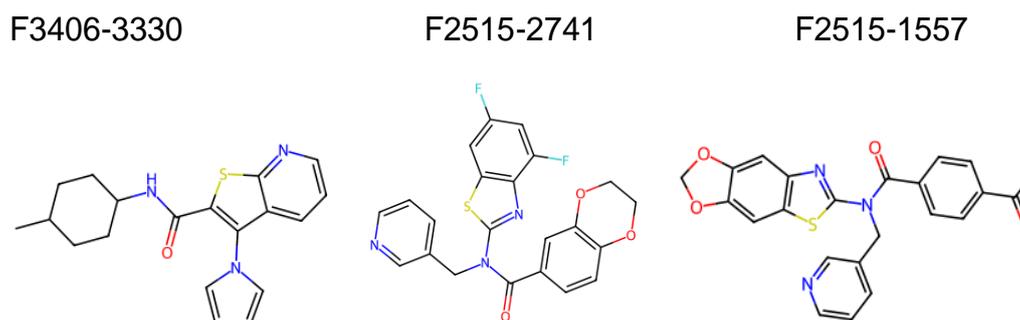


Figura 1 - Compostos utilizados na triagem em células de diptera (S2). Fonte: Gaibor (2023).

Tabela 1. Identificação das moléculas selecionadas no estudo de acordo com a fórmula química, peso molecular, pureza inicial e solvente utilizado para diluição.

Molécula	F.Q. ¹	P.M. ²	P.I (%) ³	Álcool absoluto	DMSO ⁴
20E ⁵	C27H44O7	480.64	~95	X	
F2515-1557	C23H17N3O4S	431.46	>90		X
F2515-2741	C22H15F2N3O3S	439.43	>90		X
F3406-3330	C19H21N3OS	339.45	>90		X

¹Fórmula química

⁴Dimetilsulfóxido

²Peso molecular

⁵20-Hidroiecdisônio

³Pureza inicial (%)

Moléculas que foram testadas no sistema de triagem na cultura celular S2, a viabilidade celular maior a 85%

3.2.3. Ensaios de citotoxicidade

Foram conduzidos estudos preliminares de citotoxicidade das moléculas sintéticas para determinar a concentração que apresentasse viabilidade superior a 85%, a qual foi selecionada para os experimentos *in vitro*. No estudo preliminar de citotoxicidade, a viabilidade celular inicial foi avaliada. As células foram dispersas no frasco de cultura utilizando uma pipeta de plástico. Em seguida, uma alíquota de 50 µl do meio de cultura contendo as células foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, 50 µl do corante *Trypan Blue* foram adicionados e misturados. Se as células estiverem mortas, o corante penetrará na membrana celular, tornando-as azuis, o que permite a contagem de células vivas e mortas.

Após a adição do corante, a contagem celular foi realizada com auxílio de um Hemocitômetro (placa de contagem). Uma alíquota de 10 µl das células em corante *Trypan Blue* foi adicionada aos quatro quadrantes da placa, e a contagem foi feita em um microscópio invertido (objetivo de 10x). Para determinar as concentrações com viabilidade celular requerida nos experimentos de triagem e para estabelecer o efeito máximo do 20E (limite superior de luminescência), foi preparada uma solução estoque do princípio ativo diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO). O 20E foi diluído em álcool etílico absoluto na concentração molar de 10⁻³ mM, e em seguida foram feitas diluições em série de 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ mM para formar a curva dose-resposta. No ensaio de citotoxicidade das moléculas, uma densidade aproximada de 500.000 células/ml foi adicionada em cada poço das placas de cultura celular. Para isso, foram

acrescentados 500 µl do meio de subcultura e, em seguida, 5 µl da diluição da molécula por poço. As placas foram incubadas por 24 horas a uma temperatura de 27°C. Após esse período, foi realizada a avaliação da viabilidade celular seguindo a metodologia descrita anteriormente.

3.2.4. Ensaio de triagem molecular

Para o experimento de triagem das moléculas, foram selecionadas concentrações com viabilidade celular superior a 85%, conforme determinado nos bioensaios de citotoxicidade das moléculas. Os experimentos foram estabelecidos com três réplicas e repetidos três vezes. Nos bioensaios de agonista, para induzir a expressão da luciferase nas células, foi realizada a clonagem do plasmídeo repórter. Para isso, a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) foi multiplicada. Para esta finalidade, foram adicionados em um tubo Falcon 5 ml de meio LB Broth e 5 µl de ampicilina. Em seguida, uma porção da colônia bacteriana foi retirada com uma ponteira esterilizada e transferida para o tubo Falcon preparado. O tubo foi incubado a 37°C por 16 horas, a 200 rpm, no agitador *Shaker*. Após esse período, o plasmídeo foi purificado utilizando o *kit* de purificação *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*. Para verificar a integridade do plasmídeo purificado, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose a 1% com uma amostra pura.

3.2.5. Transfecção celular

Na transfecção celular, utilizou-se uma placa de 24 poços. Assim, 500.000 células foram adicionadas a cada poço (500 µl de meio de cultura com densidade aproximada de 100.000 células/µl) e deixadas em repouso para aderirem ao fundo dos poços. Em seguida, o meio de transfecção foi preparado. Em um tubo Eppendorf de 1,5 ml, foram adicionados 497 µl de meio de cultura *Insect Express™*, 3 µl de reagente *Escort™ IV* e 100 ng de plasmídeo repórter para cada poço; a mistura foi vigorosamente homogeneizada com uma pipeta e deixada em incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, todo o meio de cultura dos poços da placa foi removido, deixando as células fixadas no fundo, e o meio de transfecção foi adicionado. As placas com células foram então incubadas por 5 horas a 27°C na estufa. Uma vez transcorrido o período de incubação das células, o meio de transfecção foi removido e 500 µl de meio de cultura *Insect Express* e 5 µl da molécula a ser testada, além de DMSO como controle (solvente), foram adicionados. A placa foi selada com papel *parafilm* e deixada em incubação por 24 horas a 27°C. Após esse período, as células foram ressuspensas em uma placa branca de 96 poços. Para cada poço da placa, adicionaram-se 100 µl de suspensão celular incubada com a molécula, seguidos por 100 µl de luciferase (*Kit Steady-Glo Luciferase Assay System*). Para a leitura da luminescência, a placa foi incubada por 5 minutos a 25°C de temperatura dentro do espectrofotômetro de microplacas *SpectraMax M3*.

Para os bioensaios antagonistas, foi empregada a mesma metodologia dos bioensaios agonistas, com as seguintes complementaridades: após a incubação das moléculas por 24 horas a 27°C, adicionaram-se 5 µl do hormônio 20-hidroxiectdisônio. As moléculas foram então submetidas a uma segunda incubação por 24 horas a 27°C. Após esse período, as etapas para

a leitura da luminescência foram retomadas. Para a medição da luminescência, a placa foi incubada por 5 minutos a 25°C dentro do espectrofotômetro de microplacas *SpectraMax M3*.

3.2.6. Análise estatística

Para estabelecer as diferenças nas médias dos experimentos de citotoxicidade, atividade agonista e antagonista, os dados foram submetidos ao teste F pelo método da ANOVA, analisando as repetições dos experimentos ao longo do tempo como fator aleatório. Em seguida, foi realizada a verificação da homocedasticidade utilizando o teste de Levene (pacote car, Fox e Weisberg, 2019), e a normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk (pacote nortest, Gross e Ligges, 2015), além da análise gráfica quantil-quantil (Q-Q) para avaliar a distribuição normal dos mesmos. Posteriormente, as diferenças estatísticas das médias foram avaliadas pelo intervalo de confiança de 95%, que estima o tamanho do efeito da probabilidade.

Na curva dose-resposta, após a confirmação de homocedasticidade e normalidade, foi construída a regressão não-linear do tipo logarítmico usando o modelo log-logístico de quatro parâmetros proposto por Knezevic *et al.*, (2007) (Equação 1).

$$y = c + \left\{ \frac{d - c}{(1 + \exp(\exp(b(\log \log(x) - \log \log(e))))))} \right\} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, y é a expressão da luminescência, x é a dose de 20-hidroxiciclodisônio; “ c ”, “ b ”, “ d ” “ e ” são parâmetros da curva, de modo que “ c ” é o limite inferior, “ b ” é a declividade, “ d ” é o limite superior, e “ e ” é o ponto de inflexão da curva (dose que proporciona 50% de resposta da variável (IC⁵⁰)). Após de realizar o teste de ajuste do modelo, foi determinada a IC⁵⁰ usando a função *ED* do pacote DRC (Ritz *et al.* 2015). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software estatístico R 4.0.2 (R CoreTeam 2023).

3.3 Resultados

3.3.1 Análises de acoplamento das interações e modelagem tridimensional da interação do receptor com as moléculas.

Para examinar a relação do receptor de ecdisteroides de *D. melanogaster* e outros insetos, foi criada uma árvore filogenética construída com base nas sequências dos insetos selecionados (Figura 2). As relações estatísticas de identidade foram superiores a 97%, com a probabilidade (*E-value*) inferior a 2.00E-86. Portanto, todos os artrópodes relacionados na filogenia foram selecionados para a modelagem tridimensional do receptor (Figura 3).

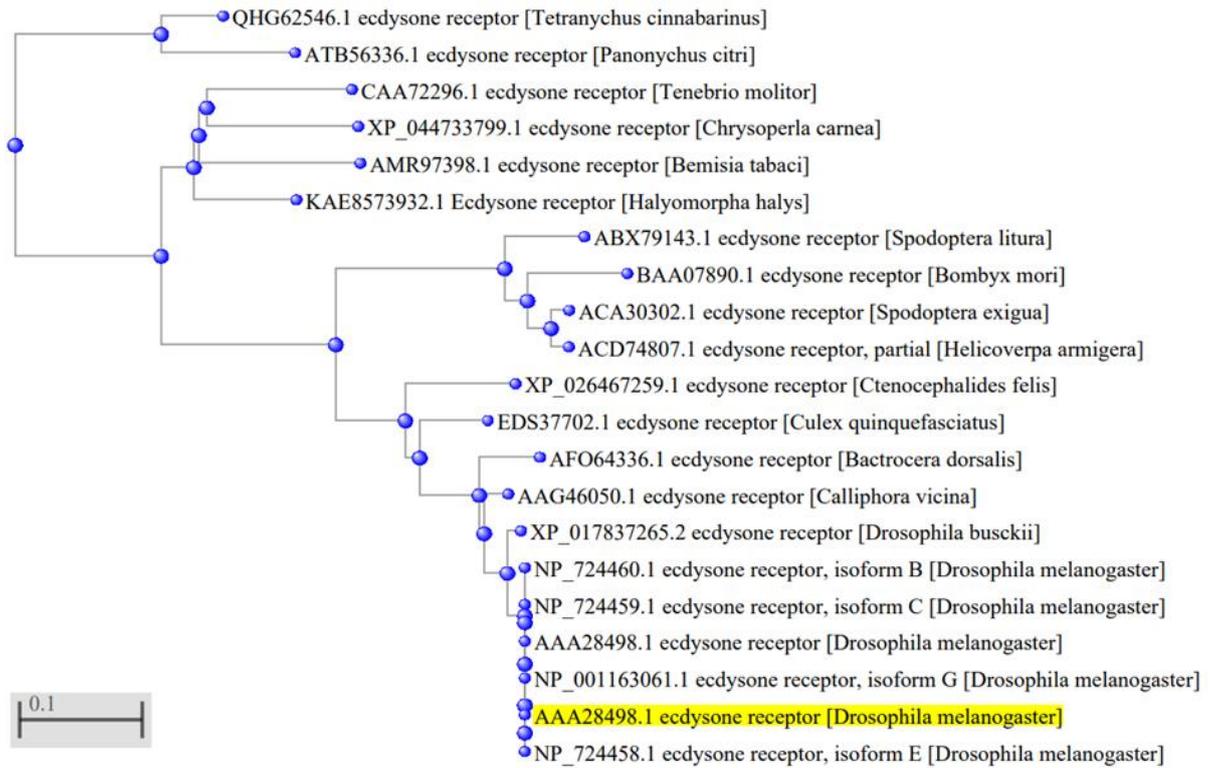


Figura 2 - Arvore filogenética da relação do EcR entre *Drosophila* e outros gêneros, Fonte NCBI,2023. FAEM/UFPel, Capão do Leão, 2023.

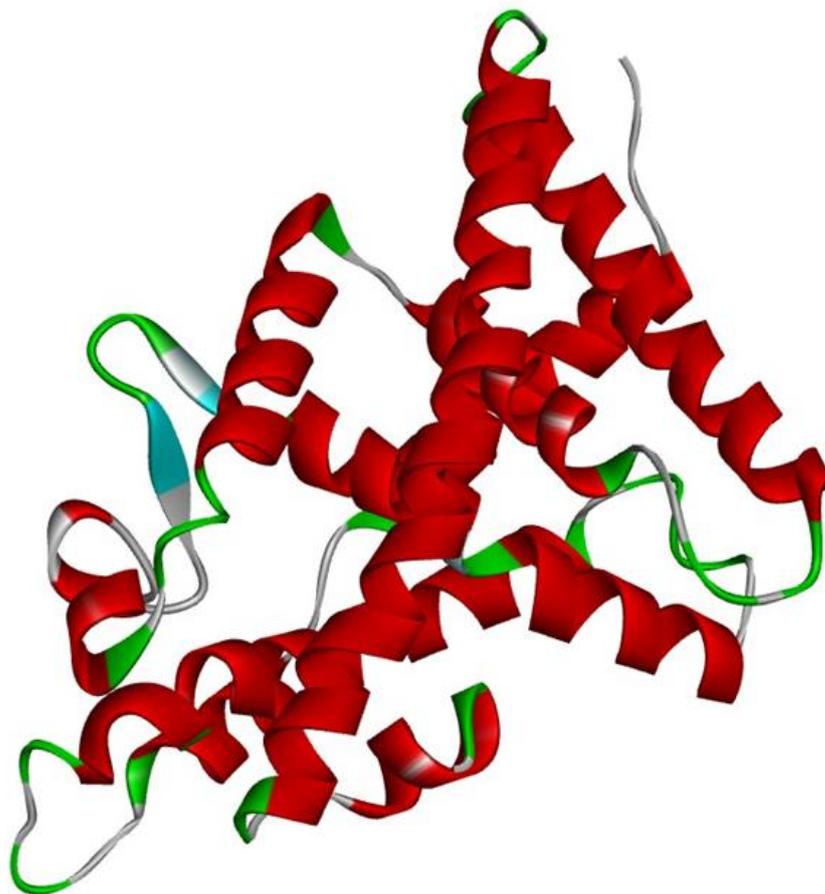


Figura 3 - *Design* gráfico representando o modelo tridimensional do receptor de ecdisteroide de *Drosophila*. FAEM/UFPel, Capão do Leão, 2023.

A análise tridimensional virtual mostra as moléculas testadas neste estudo ligando-se dentro do bolso de ligação, onde ocorre a interação ligante-proteína (Figura 4). A formação da ligação dos ecdisteroides ocorre dentro do receptor de ecdisteroides ao longo do lobo em parte da cadeia alifática (MACHADO *et al*, 2019).

Ao acoplar tridimensionalmente o receptor de ecdisona homólogo de dipteros com a molécula F2515-1557 e simular a interação ligante-proteína, observou-se uma união de ponte de hidrogênio com THR52, a uma distância de 3.46 Å, uma ligação Pi-stacked com TRP238 de 3.46 Å e uma ligação Pi-Alkyl com MET92, com distância de 3.46 Å, além de 18 interações de van der Waals (Figura 4 A1, B1).

Na interação ligante-proteína com a molécula F2515-2741, observou-se uma ligação de ponte de hidrogênio com THR52 a uma distância de 3.47 Å, duas ligações halogenadas em ASN128 e ASN216 com 3.47 Å e 4.59 Å, respectivamente, uma ligação Pi-sulfur com TYR120 de 6.80 Å e três ligações Alkyl ou Pi-Alkyl em ARG95, ILE51 e MET92, com distâncias de 5.75 Å, 6.61 Å e 5.36 Å, respectivamente (Figura 4 A2, B2).

As ligações da molécula F3306-3330 com o receptor de ecdisteroides formaram uma ligação de ponte de hidrogênio com THR52 a uma distância de 3.46 Å, ligações Pi-sigma em MET125 com 5.98 Å e cinco ligações Alkyl ou Pi-Alkyl em PHE109, ILE54 e LEU230, com 5.41

Å, 4.29 Å e 5.26 Å, respectivamente. ILE51 apresentou duas interações, com distâncias de 6.62 Å e 5.42 Å. Além disso, foram detectadas 12 interações de van der Waals (Figura 4 A3, B3).

Como pode ser observado, todas as moléculas apresentaram ligação com os aminoácidos MET e THR, nas mesmas posições ou em posições muito próximas. Além disso, as ligações do aminoácido ILE foram encontradas com as moléculas F2515-2741 e F3306-3330 na mesma posição. A ligação de ponte de hidrogênio foi a força intermolecular mais forte encontrada nas três moléculas, nas posições 52 e 55, gerando atração eletrostática, assim como as ligações Alkyl ou Pi-Alkyl encontradas nas moléculas F2515-2741 e F3306-3330 (Figura 4).

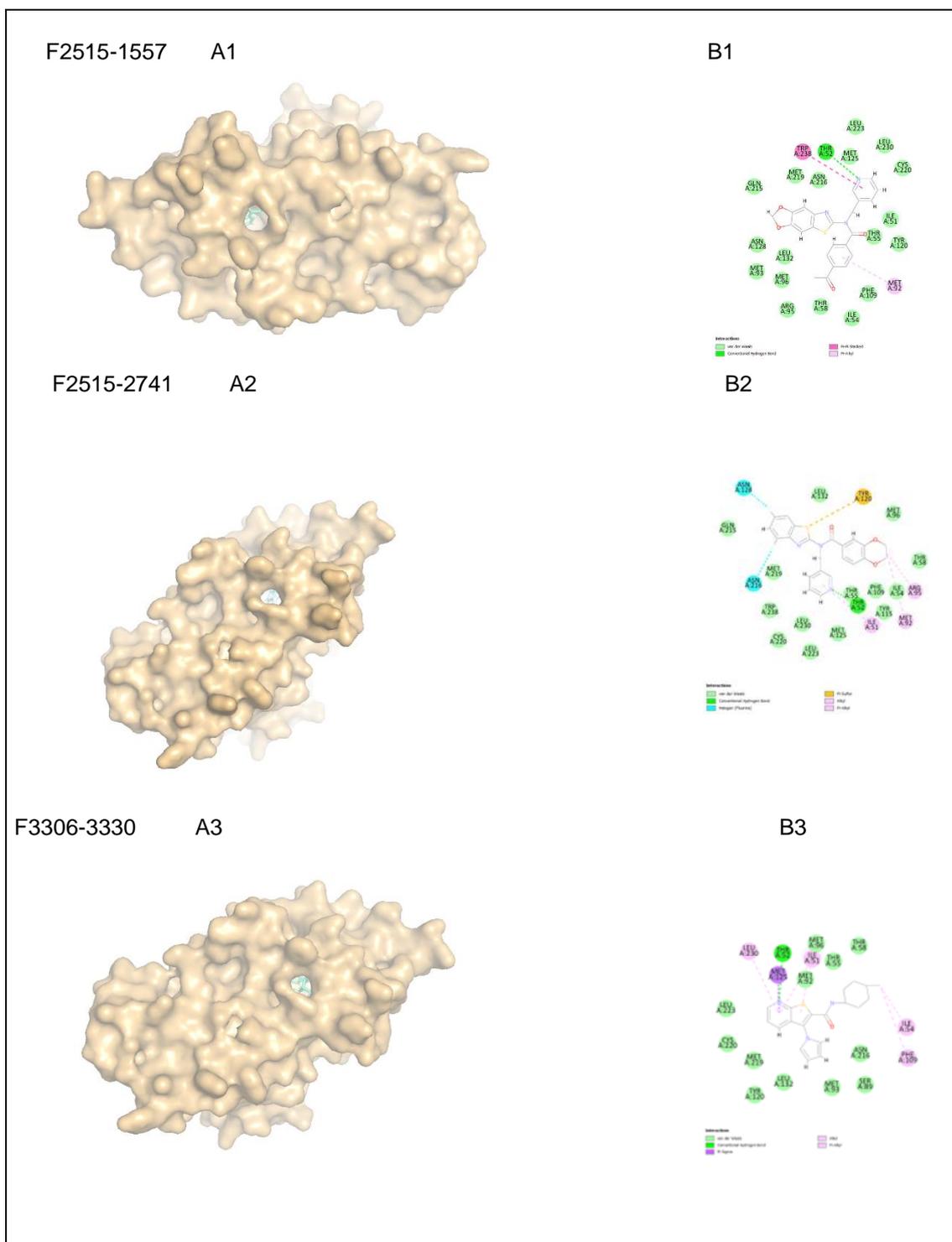


Figura 1 - Modelo de acoplamento molecular para as moléculas análogas com o receptor de ecdisteroides de diptera. Figuras a1, a2, a3, mostram a cavidade de ligação dos ecdisteroides com as moléculas complexadas dentro do receptor. As figuras b1, b2, b3, representam a estrutura 2D das interações ligando-receptor. Ligações em verde claro sinalizam ligações de van der Waals; ligações em verde limão sinalizam pontes de hidrogênio; ligações em rosa claro indicam ligações Pi-alkil; ligações em rosa obscuro mostram ligações Alquil; ligações em laranja sinalizam ligações Pienxofre; ligações roxas indicam ligações Pi-signa; ligações em azul indicam halogênio. FAEM / UFPel, Capão do Leão, 2023.

3.3.2 Experimentos de triagem de moléculas sintéticas

Nos bioensaios repórter da atividade agonista de ecdisteroides, observou-se na Tabela 2 que houve significância experimental para a atividade do 20E. Na Figura 5, mostrando o EC50 estimado com a molécula 20-hidroxiectdisônio com um valor de 4.05E-06 e um intervalo de confiança de 95% de probabilidade entre 3.33E-06 e 4.77E-06.

A máxima expressão do receptor de ecdisteroides foi uma luminescência aproximada de 29339.3 para a dose de 10^{-3} mM, expressando o receptor das células diptera (50% de luminescência igual a 17453.7) com a dose de 3.33E-06 mM, correspondendo ao intervalo inferior do EC50 da curva (Figura 5). A dose do hormônio natural 20-hidroxiectdisônio que foi usada nos bioensaios repórter para expressar o gene de luciferase em células S2 como testemunha foi de 10^{-3} mM, correspondendo ao intervalo superior do EC50 da curva dose-resposta.

Tabela 2. Estimativas dos parâmetros do modelo log-logístico, ajustados para 20-hidroxiectdisônio.

Parâmetros	Estimativa	Std. Erro	t-valor	p-valor
<i>B</i>	-1.58E+00	1.14E-01	-13.87	2.587e-08 ***
<i>C</i>	9.07E+01	4.84E+02	0.19	0.8547 ^{ns}
<i>D</i>	3.00E+04	3.55E+02	84.51	< 2.2e-16 ***
<i>E</i>	4.05E-06	3.29E-07	12.32	8.843e-08 ***

Erro padrão residual: 839,04

^{ns} Não existe diferença significativa de acordo com o teste F ($P < 0,05$).

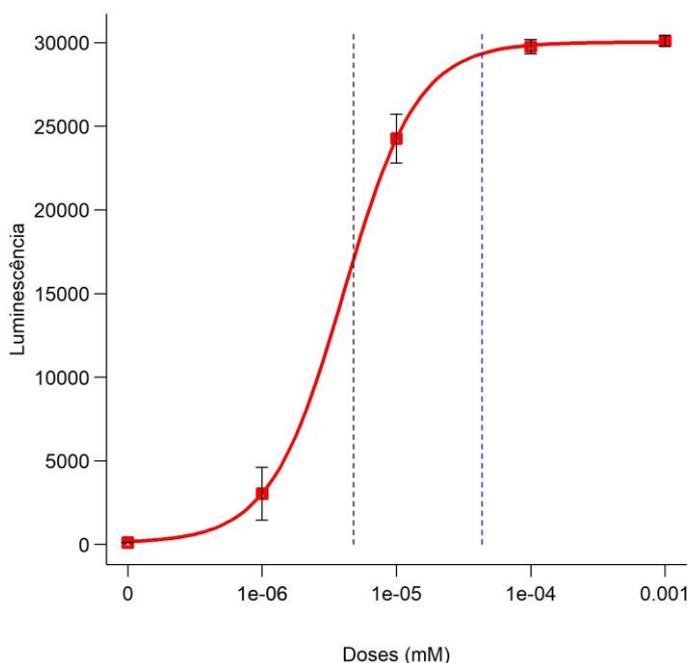


Figura 5 - Curva sigmoide de dose-resposta referente a atividade agonista de 20-hidroxicicdisônio em células S2. FAEM / UFPel, Capão do Leão, 2023.

O composto 20-hidroxicicdisônio apresentou padrões semelhantes aos mostrados por PINTO (2017) e MACHADO (2022), usando em células S2 de díptera e S9 de lepidóptera. O 20E é um ecidisteróide específico de insetos possui uma grande resposta em linhagens de células da ordem díptera e lepidoptera (ZOTTI, 2013).

O ensaio de citotoxicidade das moléculas sobre a linhagem celular S2 de *D. melanogaster* determinou que as concentrações das moléculas, na concentração de 10^{-3} , apresentaram viabilidade igual ou superior a 85%, exceto a concentração de $1E-01$ da molécula F2515-2741, que apresentou uma viabilidade inferior a 66.00% (Figura 6). Foram selecionadas para o experimento de triagem as concentrações que estão listadas na Tabela 3, visando à busca de atividade agonista ou antagonista.

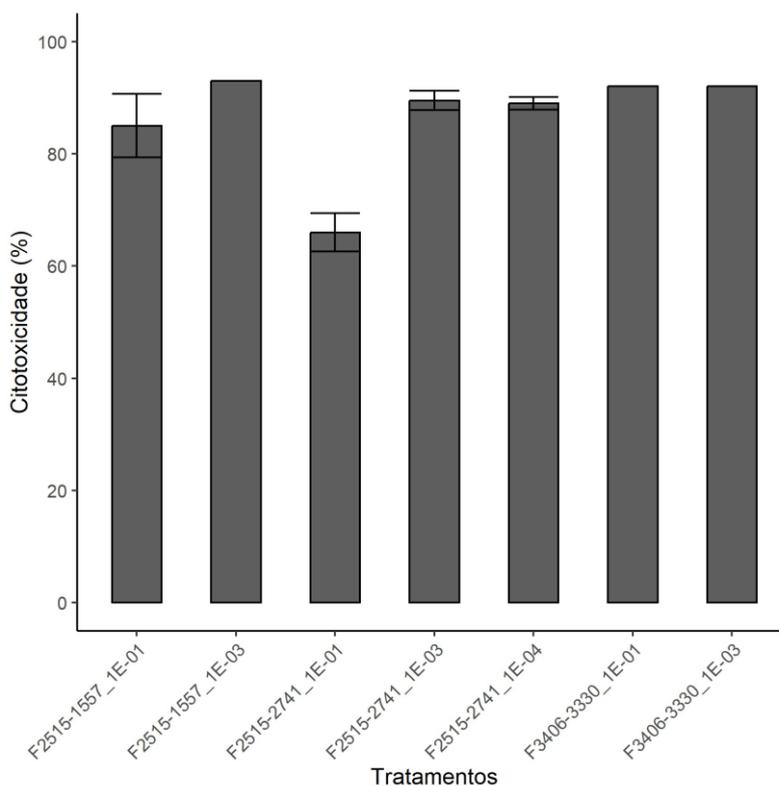


Figura 6 - Viabilidade celular das três moléculas em concentrações molares. FAEM / UFPel, Capão do Leão, 2023.

Tabela 3. Atividade Citotóxica de compostos nos bioensaios com a cultura celular S2.

Compostos	Atividade	¹ Citotoxicidade Conc.(mM)	Fornecedor
F2515-2741	Inativo	10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}	Life Chemicals
F2515-1557	Inativo	10^{-1} , 10^{-3}	Life Chemicals
F3406-3330	Inativo	10^{-1} , 10^{-3}	Life Chemicals

¹Teste de citotoxicidade celular concentração miliMolar

Algumas moléculas não esteroidais podem apresentar citotoxicidade parcial em certas concentrações micromolares, ou ser extremamente citotóxicas, interferindo na viabilidade (SOIN *et al.*, 2010). Para a triagem molecular, são selecionadas as concentrações micromolares que demonstraram uma viabilidade de no mínimo 80% (SWEVERS *et al.*, 2004).

As propriedades toxicológicas e citotóxicas de substâncias químicas, por meio de testes *in vitro*, tornam-se uma alternativa competitiva para o estudo do modo de ação dos inseticidas, que envolve uma combinação de múltiplos processos, incluindo fatores genéticos, metabólicos e imunológicos.

Em relação à atividade agonista das moléculas, nenhuma apresentou efeito comparado com 20-hidroiecdisônio (Figura 7). Os compostos foram testados na concentração milimolar não tóxica para as culturas celulares (Tabela 3). Quanto à atividade antagonista das moléculas, em células S2,

nenhuma apresentou efeito inibitório comparado com o controle 20-hidroxiecdisônio (Figura 7). Assim, podemos observar que a molécula F2515-1557-4, mostrou resultados similares ao 20-hidroxiecdisônio.

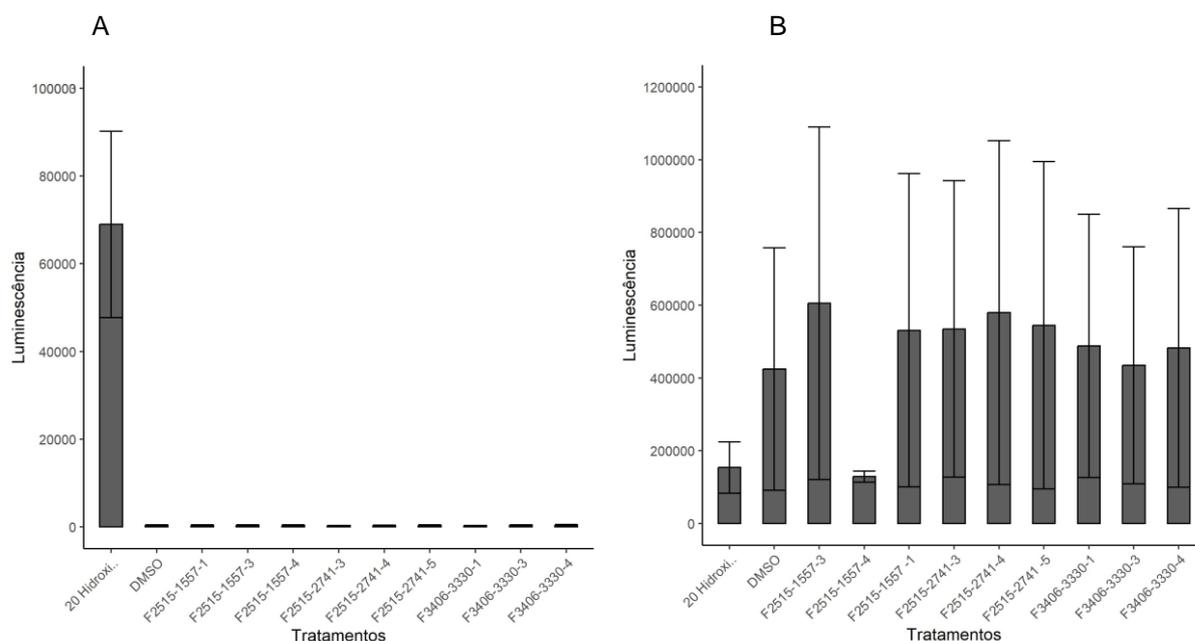


Figura 7 - Efeito agonista (A) e antagonista (B) observada para as três moléculas nas linhagens celular S2, comparados com os controles o hormônio 20-hidroxiecdisônio e DMSO (Solvente de diluição das moléculas). Intervalo de confiança $P < 0.05$. FAEM / UFPel, Capão do Leão, 2023.

Um motivo pelo qual muitas das moléculas não apresentaram atividade que supere ao 20E é porque são análogas à tebufenozida, que apresenta atividade em lepidopteros, mas é pouco ativa no receptor de ecdisteroides de dipteros. As moléculas não esteroidais, como os análogos das dibenzoilhidrazinas, representam um importante grupo de inseticidas no controle de insetos praga. Seu modo de ação altamente seletivo torna-se uma ferramenta útil para o controle de artrópodes praga. A especificidade das dibenzoilhidrazinas com a praga alvo parece paradoxal, uma vez que a maioria dos insetos usa o 20E como hormônio da muda. No entanto, pode ser possível descobrir agonistas de ecdisteroides com novas propriedades químicas e diferentes especificidades de pragas.

3.4. Discussão

A compreensão da interação molecular entre agonistas e seus receptores constitui o desenvolvimento de novos fármacos. Glukhova et al. (2017) destacam avanços recentes na biologia estrutural, fornecendo estruturas de receptores de alta resolução em estados ativos e inativos, ressaltando a importância da conformação na função receptor-ligante. Essas descobertas impulsionaram o desenvolvimento de técnicas avançadas de triagem molecular receptor-ligante, permitindo o desenho de novas moléculas com propriedades inseticidas específicas baseadas na compreensão detalhada dessas interações.

A relevância desses estudos reside na capacidade de desenhar bibliotecas de moléculas-alvo e realizar análises *in silico*, facilitando a exploração de interações moleculares entre uma ampla variedade de biomoléculas sintéticas. Mohanty e Mohanty (2023) sublinham o papel crucial do

acoplamento de servidores *web* no avanço deste campo, fornecendo ferramentas computacionais confiáveis que ajudam a interações moleculares complexas, o que é crítico para aplicações farmacêuticas.

No entanto, a citotoxicidade de algumas moléculas não esteróides apresenta desafios significativos. Soin et al. (2010) alertam sobre a citotoxicidade parcial ou extrema de certas concentrações micromolares, o que requer a seleção cuidadosa de concentrações para triagem molecular que mantenham a viabilidade celular acima de 80%, segundo Swevers et al. (2004). Essa abordagem é essencial para identificar compostos com potencial terapêutico sem efeitos adversos significativos.

A descoberta de novos agonistas ecdisteroides não esteróides, conforme relatado por Dhadialla, Carlson e Le (1998), ilustra a possibilidade de induzir alterações morfológicas específicas em células de *Drosophila melanogaster*, o que representa um avanço significativo na compreensão e manipulação da atividade hormonal. Esse tipo de pesquisa abre novos caminhos para o desenvolvimento de agrotóxicos atóxicos e específicos, aproveitando a diferença de atividade de compostos como a tebufenozida entre lepidoptera e diptera, destacada por Morou (2013) e Pinto (2017).

A literatura científica revela uma ampla gama de agonistas dos receptores de ecdisona, desde hormônios endógenos de invertebrados até pesticidas não tóxicos, refletindo a diversidade de abordagens possíveis na concepção de agentes de controle. Porém, como aponta Machado (2019), apesar do potencial dos compostos não esteroidais e dos fitosteróides, os bioensaios em cultura de células que exploram a atividade antagonista dos receptores nucleares permanecem limitados, sugerindo a necessidade de mais pesquisas neste campo.

Em resumo, a interação entre agonistas e receptores, e o desenho de moléculas baseadas nestes princípios, representa uma área promissora para o desenvolvimento de terapias e agentes de controle mais seletivos e seguros. A investigação futura deve centrar-se na superação de desafios relacionados com a citotoxicidade, expandindo os bioensaios para melhor compreender as interações receptor-ligando e explorando o potencial dos compostos não esteróides e fitosteróides em aplicações farmacêuticas e agrícolas.

3.5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que as moléculas sintéticas F2515-2741 e F3306-3330 demonstraram interações significativas com aminoácidos específicos, sugerindo potenciais sítios de ligação importantes para o desenvolvimento de inseticidas. No entanto, apesar dessas interações promissoras, as moléculas testadas não apresentaram atividade agonista ou antagonista nos bioensaios conduzidos neste estudo. Portanto, é crucial realizar estudos adicionais para caracterizar melhor essas moléculas e explorar sua eficácia em diferentes sítios de ligação e ordens de insetos. Esses achados destacam a necessidade contínua de investigar novas abordagens e compostos para o desenvolvimento de inseticidas eficazes e seletivos, visando mitigar os desafios enfrentados na agricultura moderna.

3.6. Referências

BARRERA, G. A. Evaluación del efecto de 6 extractos vegetales acuosos de plantas sobre la repelencia y mortalidad de la mosca *Drosophila melanogaster*. (Diptera: *drosophilae*), 2017.

CHAN, Y. H.; CHU, K. H.; CHAN, K. M. Ecdysteroid-mimicking compounds act as both agonists and antagonists to the crustacean ecdysone receptor. **Chemosphere**, v. 237, p. 124-551, 2019. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.124551](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124551)

DHADIALLA, T. S.; CARLSON, G. R.; LE, D. P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annu. Rev. Entomol**, v. 43, p. 545–569, 1998.

FENG, Y. et al. In Vitro Binding Effects of the Ecdysone Receptor–Binding Domain and PonA in *Plutella xylostella*. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1426, 2023.

Fox, J. Weisberg, S. *An R Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA. 2019. Disponível em: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>

FU, B. et al. Ginsenosides improve reproductive capability of aged female *Drosophila* through mechanism dependent on ecdysteroid receptor (ECR) and steroid signaling pathway. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 964-069, 2022.

GLUKHOVA, A. et al. Structure of the Adenosine A1 Receptor Reveals the Basis for Subtype Selectivity. **Cell**, v. 168, n. 5, p. 867-877, 2017.

GRAHAM, L. D. et al. Ligand binding by recombinant domains from insect ecdysone receptors. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 6, p. 611–626, 2007.

GROSS, J.; Uwe Ligges. *Nortest: Tests for Normality*. 2015. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=nortest>

HARADA, T. et al. Virtual screening for ligands of the insect molting hormone receptor. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, n. 2, p. 296–305, 2011. <https://doi.org/10.1021/ci100400k>

HE, X. et al. Insect Cell-Based Models: Cell Line Establishment and Application in Insecticide Screening and Toxicology Research. **Insects**, v. 14, n. 2, 2023.

HU, X. et al. Identification of novel agonists and antagonists of the ecdysone receptor by virtual screening. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 81, p. 77–85, 2018.

JIANG, B. et al. New lead discovery of insect growth regulators based on the scaffold hopping strategy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 21, p. 127-500, 2020.

KNEZEVIC, SZ.; STREIBIG JC & RITZ C. Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology*, n. 21, p. 840-848, 2007.

LAFONT, R.; MATHIEU, M. Steroids in aquatic invertebrates. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 16, n. 1, p. 109–130, 2007.

MACHADO, M. et al. Insecticide compounds selection based on activation of ecdysteroid receptors in Diptera (S2) and Lepidoptera (Sf9) cell lines. **Australian Journal of Crop Science**, v. 16, n. 8, p. 1030–1037, 2022.

MOHANTY, M; MOHANTY, P. S. Molecular docking in organic, inorganic, and hybrid systems: a tutorial

review. **Monatshefte Fur Chemie**, v. 154, n. 7, p. 1, 2023.

MUÑOZ, J.; SANDOVAI, A.; Arboleda, G. Type II nuclear receptors with potential role in Alzheimer disease. **Molecular aspects of medicine**, v. 78, 2021.

NAKAGAWA, Y. Nonsteroidal Ecdysone Agonists. **Vitamins and Hormones**, v. 73, p. 131–173, 2005.

PINTO, P. 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.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 2015.

SCHERRER, B. et al. Hyperspectral imaging and neural networks to classify herbicide-resistant weeds. **Journal of Applied Remote Sensing**, v. 13, n. 04, p. 1, 2019.

SERRANO, A. Enhancing Molecular Docking with Deep Q-Networks. p. 1, 2022.

SOIN, T.; SWEVERS, L.; KOTZIA, G.; IATROU, K.; JANSSEN, CR.; 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 Manag Sci**. 66(11):1215–1229, 2010.

SONG, Y. et al. Ecdysone Receptor Agonism Leading to Lethal Molting Disruption in Arthropods: Review and Adverse Outcome Pathway Development. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 8, p. 4142, 2017.

SWEVERS, L.; KRAVARITI, L.; CIOLFI, S.; XENOU-KOKOLETSI, M.; RAGOSSIS, 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. **FASEB J**. 18(1):134–136, 2004.

VEGA, C. I. **Ludificación de Docking Molecular para acelerar el diseño de fármacos**. 2018.

XU, J. et al. ABCC2 participates in the resistance of *Plutella xylostella* to chemical insecticides. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 162, p. 52–59, 2020.

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

Artigo - Revista Insect Science

Artigo 2- Prospecção de compostos vegetais tendo como alvo o receptor de ecdisteroides em linhagem celular S2 *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, *Drosophilidae*)

GAIBOR-GAROFALO, Jissela Morayma; WEGNER, Juliana; ZOTTI, Moises. João

4. Artigo 2- Prospecção de compostos vegetais tendo como alvo o receptor de ecdisteroides em linhagem celular S2 *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, *Drosophilidae*)

¹GAIBOR, G. J. M; ¹WEGNER, J; ¹ZOTTI, M. J.

Resumo: Nos últimos 60 anos, com a crescente demanda por produção de alimentos, houve um aumento significativo no uso de produtos químicos sintéticos para controle de pragas. Essa prática tem levantado preocupações devido à presença de resíduos em alimentos e água, além de seus potenciais efeitos colaterais, tem havido um impulso no desenvolvimento de bioinseticidas à base de extratos vegetais derivados de plantas. Os ecdisteroides desempenham um papel fundamental na regulação do desenvolvimento e da fisiologia dos insetos, como hormônios naturais derivados da modificação enzimática do colesterol pelas enzimas p450. Esses compostos regulam processos vitais como a metamorfose e a alimentação. Algumas plantas contêm fitoecdisteróides, que são análogos dos hormônios esteróides dos artrópodes. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de extratos vegetais de diversas espécies, incluindo Canutillo, Pimenteiro brasileiro, Cravo, Neem, Cinamomo, Samambaia dentada, Samambaia brasileira, Aivenca, Cravo mourisco. Além disso, buscou-se estabelecer a atividade agonista ou antagonista desses extratos sobre o receptor de ecdisteroides em células S2 de *D. melanogaster*. Para isso, foram conduzidos experimentos de triagem, bioensaios de citotoxicidade e análises da expressão da luciferase em células. Os resultados obtidos indicaram que os extratos vegetais testados não apresentaram efeito citotóxico sobre as células de *D. melanogaster*. No entanto, foi observado um efeito antagonista em células tratadas com o extrato de Samambaia brasileira na concentração de 10^{-1} , resultando em uma inibição significativa (91,57%) da atividade do hormônio 20E. Esses achados destacam o potencial dos extratos vegetais, especialmente o de Samambaia brasileira, como agentes alternativos no controle de pragas de insetos.

Palavras-chave: Resistência; Toxicidade; Gene repórter; Bioinseticida

*Artigo a ser submetido a Revista Insect Science, ¹Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, CEP 96160-000, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: jissegodly@hotmail.com; Departamento de Fitossanidade Universidade Federal de Pelotas.

Article 2- Prospecting for plant compounds targeting the ecdysteroid receptor in the S2 cell line *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae)

¹GAIBOR, G. J. M; ¹WEGNER, J; ¹ZOTTI, M. J.

Abstract: Over the past 60 years, with increasing demand for food production, there has been a significant increase in the use of synthetic chemicals for pest control. This practice has raised concerns due to the presence of residues in food and water, in addition to its potential side effects, there has been a boost in the development of bioinsecticides based on plant-derived plant extracts. Ecdysteroids play a fundamental role in regulating insect development and physiology, as natural hormones derived from the enzymatic modification of cholesterol by p450 enzymes. These compounds regulate vital processes such as metamorphosis and feeding. Some plants contain phytoecdysteroids, which are analogues of arthropod steroid hormones. Therefore, the objective of this study was to evaluate the cytotoxicity of plant extracts from several species, including Canutillo, Brazilian Pepper, Clove, Neem, Cinnamon, Dentated Fern, Brazilian Fern, Aivenca, Moorish Clove. Furthermore, we sought to establish the agonistic or antagonistic activity of these extracts on the ecdysteroid receptor in S2 cells of *D. melanogaster*. To this end, screening experiments, cytotoxicity bioassays and analyzes of luciferase expression in cells were conducted. The results obtained indicated that the tested plant extracts did not present a cytotoxic effect on *D. melanogaster* cells. However, an antagonistic effect was observed in cells treated with Brazilian Fern extract at a concentration of 10⁻¹, resulting in a significant inhibition (91.57%) of the 20E hormone activity. These findings highlight the potential of plant extracts, especially Brazilian fern, as alternative agents in the control of insect pests.

Keywords: Resistance; Toxicity; Reporter gene; Bioinsecticide

4.1. Introdução

As plantas, tanto em seu estado natural quanto em culturas agrícolas, estão constantemente expostas a diversas ameaças provenientes de uma variedade de organismos. Aproximadamente 18% a 20% das perdas na produção agrícola são atribuídas a danos diretos por insetos, afetam especialmente culturas de alto valor na produção agrícola bruta, incluindo arroz, milho, trigo, soja, tomate, batata, cana-de-açúcar, vegetais, uvas e maçãs (OSDAGHI, 2020).

No reino animal pertencente ao filo Arthropoda, existem cerca de 5,5 milhões de espécies de insetos. Estima-se que aproximadamente metade desses insetos se alimente de plantas. Importantes pragas agrícolas, hortícolas e florestais são encontradas principalmente nas ordens: Orthoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Hemiptera e Thysanoptera (COOLEN; DER-MOLEN MAGDA; WELTE, 2022).

O constante aumento da população mundial tem impulsionado a produção de alimentos, visando garantir a segurança alimentar. Como resultado, tem havido um aumento no uso de produtos químicos sintéticos para o manejo de pragas. No entanto, isso teve repercussões negativas devido aos efeitos da presença de resíduos agroquímicos nos alimentos, a contaminação da água, ou desenvolvimento de resistência em pragas (SEIBER *et al.*, 2014). Esse cenário promoveu o desenvolvimento de métodos ecológicos alternativos, como o uso de extratos vegetais bioinseticidas, tornando-se um campo promissor no desenvolvimento agrícola (LOPES *et al.*, 2020).

Os extratos de plantas contêm grande variedade de compostos naturais usados em todo o mundo para controlar diferentes pragas. Um exemplo é a Azadiractina, um composto de origem natural obtido da *Azadirachta indica*, que possui propriedades inseticidas e antibacterianas (AMEER *et al.*, 2022). Extratos vegetais possuem propriedades tóxicas para insetos-praga, interferindo na oviposição, crescimento e reprodução (MAGIEROWICZ; GÓRSKA-DRABIK; SEMPRUCH, 2020). Os terpenoides apresentam efeitos sinérgicos, ou seja, a interação de diversos princípios ativos para produzir um efeito combinado e apresentar toxicidade aos insetos (MALATHI; THAMIZHSERAN, 2021).

No reino vegetal, cerca de 5% a 6% das espécies contêm fitoecdisteróides, que são compostos semelhantes aos hormônios esteróides dos artrópodes. Esses

compostos têm a capacidade de regular a metamorfose, inibir a alimentação e atuar como repelentes devido ao seu mau odor ou efeitos irritantes (VALVERDE-RODRIGUEZ; MILTAO; CAMPOS-ALBORNOZ, 2021).

A maioria das plantas possui atividade inseticida em nível larval; segundo estudos, um composto larval atua por absorção através da cutícula, trato respiratório ou por ingestão através do trato gastrointestinal (OVIEDO PRIETO; GONZÁLEZ-OLIVA, 2015).

Plantas pertencentes aos gêneros *Pteridium* e *Polypodium* são fontes de ecdisteroides e ponasterona, enquanto no gênero *Ajuga reptans*, a ciasterona e a ecdisterona são encontradas em menores quantidades (CARLOS *et al.*, 2011).

Da mesma forma, as plantas apresentam atividade inseticida envolvendo análogos de metabólitos secundários com enzimas que atuam diretamente na síntese e armazenamento de neurotransmissores, comprometendo a ativação e liberação de receptores e enzimas responsáveis pela transdução de sinal (LEYVA *et al.*, 2017). Os ecdisteroides desempenham um papel fundamental na regulação do desenvolvimento e da fisiologia de insetos e outros artrópodes. Componentes das vias de sinalização dos ecdisteroides foram selecionados como alvos no desenvolvimento de reguladores de crescimento de insetos (IGRs) (OKAMOTO; YAMANAKA, 2021).

Especificamente, moléculas não esteróides derivadas de ácido dicarboxílico (DAH) que têm como alvo o receptor de ecdisteroide (EcR) têm sido utilizadas como reguladores de crescimento de insetos (IGRs) eficazes para várias espécies. Atualmente, existem cinco IGR baseados em DAH comercializados como inseticidas: tebufenozida, metoxifenozida, halofenozida e cromafenozida (NAKAGAWA; HENRICH, 2009).

Os ecdisteroides são hormônios naturais que induzem a muda em insetos e se originam da transformação enzimática do colesterol pelas enzimas p450 (KOOLMAN; BECKER; KARLSON, 1989). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar extratos vegetais com capacidade de estimular o receptor de ecdisteroides, utilizando um sistema de gene repórter introduzido em células S2 de *D. melanogaster*.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Experimentos de triagem dos extratos vegetais

Os experimentos de triagem com extratos vegetais foram realizados no Laboratório de Entomologia Molecular do Departamento de Fitossanidade, na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Pelotas, RS. A cultura celular do organismo-alvo (células embrionárias de *D. melanogaster* S2) foi doada pelo Instituto Butantan (São Paulo). A linhagem celular é mantida em meio de cultura *InsectXpress*TM (*Lonza*®) em frascos de cultura celular de 25 cm² (KASVI®). Para a manutenção das células, foram realizadas subculturas, retirando 0,5 ml de meio com as células e transferindo-as para um novo frasco com 4,5 ml de meio de cultura (*Insect Express*TM). As células são mantidas em incubação na estufa a uma temperatura de 27°C.

4.2.2. Extratos Vegetais

Para a elaboração dos extratos foram escolhidas plantas nativas do Brasil: Canutilho (*Piper hispidum* Sw), Pimenteiro brasileiro (*Schinus terebinthifolia* Raddi.), provenientes de plantas coletadas em Tangará da Serra (MT); os extratos de Cravo (*Syzygium aromaticum* L.) e Neem (*Azadirachta indica* A.Juss.), cedidos pelo Laboratório de Ecologia de Insetos; Cinamomo (*Melia azedarach* L.) proveniente de Herval (RS); Samambaia dentada (*Christella dentata* H.Lév.), de Nova Petrópolis (RS); Samambaia brasileira (*Neoblechnum brasiliense* Desv.), coletada no campus Capão do Leão; e o extrato de Aivenca (*Adiantum capillus-veneris* L.), coletado em Pelotas. O Cravo mourisco (*Tagetes patula* L.) foi cedido pelo Laboratório da DCTA-UFPel. Nos experimentos de triagem foram testados nove extratos. Para a produção dos extratos, as amostras de folhas das plantas foram secas à temperatura ambiente por uma semana. Em seguida, as folhas foram trituradas em moinho elétrico no Laboratório de Grãos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Pelotas, RS. Posteriormente, as amostras em pó foram colocadas em frascos de vidro âmbar e foi adicionado metanol como solvente, na proporção de 200 mg de pó das amostras para cada cinco volumes de metanol. Essa mistura foi deixada a temperatura de 32°C, a 200 rpm, por cinco dias em um agitador *Shaker* no laboratório de interação planta-patógeno da UFPel. Após esse período, foi filtrado e submetido à evaporação em um rotaevaporador a 60°C, para

separação do extrato do solvente. Em seguida, foi realizada uma diluição estoque dos extratos em álcool absoluto para ser armazenados e usados nos testes. A solução estoque, inicialmente na concentração de 200 mg/ml, foi diluída para as concentrações de 20 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,0002 mg/ml, para ensaio de citotoxicidade.

4.2.3. Ensaio de citotoxicidade

Foram realizados estudos preliminares de citotoxicidade dos extratos para determinar a concentração com viabilidade superior a 85%, que foi selecionada para ser usada nos experimentos de triagem. No estudo preliminar de citotoxicidade, foi avaliada a viabilidade celular inicial. Para isso, as células foram dispersas dentro do frasco de cultura com uma pipeta de plástico. Em seguida, uma alíquota de 50 µl de meio de cultura contendo as células foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, foi adicionado 50 µl do corante *Trypan Blue* e misturado. Caso as células estivessem mortas, o corante penetrava na membrana celular, resultando em uma coloração azul que permitia a distinção entre células vivas e mortas. A contagem celular foi realizada com o auxílio de um Hemocitômetro (placa de contagem), adicionando uma alíquota de 10 µl das células em corante *Trypan Blue* e analisando-as em um microscópio invertido (objetivo de 10x). No ensaio de citotoxicidade dos extratos, foi ajustada uma densidade de aproximadamente 500.000 células/ml em cada poço das placas de cultura celular. Para isso, foram adicionados 500 µl de subcultura e, em seguida, 5 µl de cada extrato por poço. As placas foram deixadas em incubação por 24 horas a uma temperatura de 27°C. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada seguindo a metodologia descrita anteriormente.

4.2.4. Ensaio de triagem dos extratos

Para o experimento de triagem dos extratos, utilizando a expressão da luciferase em células, foram selecionadas concentrações com viabilidade superior a 85% com base nos bioensaios de citotoxicidade dos extratos. Os experimentos foram conduzidos com três replicatas e três repetições ao longo do tempo. Nos bioensaios agonistas, para induzir a expressão da luciferase em células, foi realizada a clonagem do plasmídeo repórter. Para isso, a bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*) foi multiplicada, adicionando-se 5 ml de meio LB Broth e 5 µl de ampicilina em um tubo Falcon. Em seguida, uma porção da colônia foi retirada com uma ponteira esterilizada e transferida para o tubo Falcon preparado. O tubo foi então incubado a 37°C por 16

horas a 200 rpm em um agitador *Shaker*. Após esse período, o plasmídeo foi purificado utilizando o *kit* de purificação *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*. Para verificar a integridade do plasmídeo purificado, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% com uma amostra pura.

4.2.5. Transfecção celular

Na transfecção celular, uma placa de 24 poços foi utilizada, com 500.000 células adicionadas a cada poço (500 µl de meio de cultura com densidade aproximada de 100.000 células/µl), deixando-as em repouso para aderir ao fundo dos poços. Em seguida, o meio de transfecção foi preparado: 497 µl de meio de cultura *Insect Express™*, 3 µl de reagente *Escort™ IV* e 100 ng de plasmídeo repórter foram adicionados a um tubo Eppendorf de 1,5 ml. A mistura foi vigorosamente homogeneizada com uma pipeta e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o meio de cultura dos poços da placa foi removido, deixando as células fixadas no fundo, e o meio de transfecção foi adicionado. As placas com células foram incubadas por 5 horas a 27°C na estufa para ocorrer o processo de transfecção. Após a incubação das células, o meio de transfecção foi removido e 500 µl de meio de cultura *Insect Express* e 5 µl de cada extrato a ser testado foram adicionados, além de álcool como controle não ativo (solvente). A mistura foi homogeneizada com uma pipeta, a placa foi selada com papel *parafilm* e deixada em incubação por 24 horas a 27°C. Após esse período, as células foram ressuspensas em uma placa branca de 96 poços, com 100 µl de suspensão celular incubada com o extrato e 100 µl de luciferase (Kit *Steady-Glo Luciferase Assay System*) para cada poço da placa. Para a leitura da luminescência, a placa foi incubada por 5 minutos a 25°C dentro do espectrofotômetro de microplacas *SpectraMax M3*. Para os bioensaios antagonistas, foi realizada a mesma metodologia dos bioensaios agonistas descritos anteriormente, com a adição de 5 µl do hormônio 20-hidroxiectdisônio após a incubação dos extratos por 24 horas a 27°C, seguido por uma segunda incubação das moléculas por mais 24 horas a 27°C. Após esse período, as etapas para a leitura da luminescência foram continuadas.

4.2.6. Análise estatística.

Para estabelecer as diferenças nas médias dos experimentos de citotoxicidade, atividade agonista e antagonista, os dados foram submetidos ao teste F através do

método da ANOVA, analisando as repetições dos experimentos no tempo como um fator aleatório. Em seguida, foi realizada a verificação da homocedasticidade utilizando o teste de Levene (pacote car, Fox e Weisberg, 2019), e a normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk (pacote nortest, Gross e Ligges, 2015), juntamente com o gráfico quantil-quantil (QQ) para verificar a distribuição normal dos mesmos. Após isso, as diferenças estatísticas das médias foram apreciadas pelo intervalo de confiança de 95%, que estima o tamanho do efeito da probabilidade.

Na curva dose-resposta, após a confirmação da homocedasticidade e normalidade, foi construída a regressão não linear do tipo logarítmico utilizando o modelo log-logístico de quatro parâmetros proposto por Knezevic *et al.* (2007) (Equação 1).

$$y = c + \left\{ \frac{d - c}{(1 + \exp(\exp(b(\log \log(x) - \log \log(e))))} \right\} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, y é a expressão da luminescência, x é a dose de 20-hidroxicdisônio; “ c ”, “ b ”, “ d ” “ e ” são parâmetros da curva, de modo que “ c ” é o limite inferior, “ b ” é a declividade, “ d ” é o limite superior, e “ e ” é o ponto de inflexão da curva (dose que proporciona 50% de resposta da variável (IC^{50})). Após realizar o teste de ajuste do modelo, foi determinada a IC^{50} usando a função *ED* do pacote DRC (Ritz *et al.* 2015). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software estatístico R 4.0.2 (R CoreTeam 2023).

4.3. Resultados

4.3.1. Experimentos de triagem de extratos vegetais

Nos bioensaios repórter da atividade agonista de ecdisteroides, observou-se na Tabela 1 que houve significância experimental para a atividade do 20E. Na Figura 1, mostrando o EC_{50} estimado com a molécula 20-hidroxicdisônio com um valor de $4.05E-06$ e um intervalo de confiança de 95% de probabilidade entre $3.33E-06$ e $4.77E-06$. A máxima expressão do receptor de ecdisteroides foi uma luminescência aproximada de 29339.3 para a dose de 10^{-3} mM, expressando o receptor das células diptera (50% de luminescência igual a 17453.7) com a dose de $3.33E-06$ mM, correspondendo ao intervalo inferior do EC_{50} da curva (Figura 1). A dose do hormônio natural 20-hidroxicdisônio que foi usada nos bioensaios repórter para expressar o

gene de luciferase em células S2 como testemunha foi de 10^{-3} mM, correspondendo ao intervalo superior do EC50 da curva dose-resposta.

Tabela 1. Estimativas dos parâmetros do modelo log-logístico, ajustados para 20-hidroxiectdisônio.

Parâmetros	Estimativa	Std. Erro	t-valor	p-valor
<i>B</i>	-1.58E+00	1.14E-01	-13.87	2.587e-08 ***
<i>C</i>	9.07E+01	4.84E+02	0.19	0.8547 ^{ns}
<i>D</i>	3.00E+04	3.55E+02	84.51	< 2.2e-16 ***
<i>E</i>	4.05E-06	3.29E-07	12.32	8.843e-08 ***

Erro padrão residual: 839,04

^{ns} Não existe diferença significativa de acordo com o teste F ($P < 0,05$).

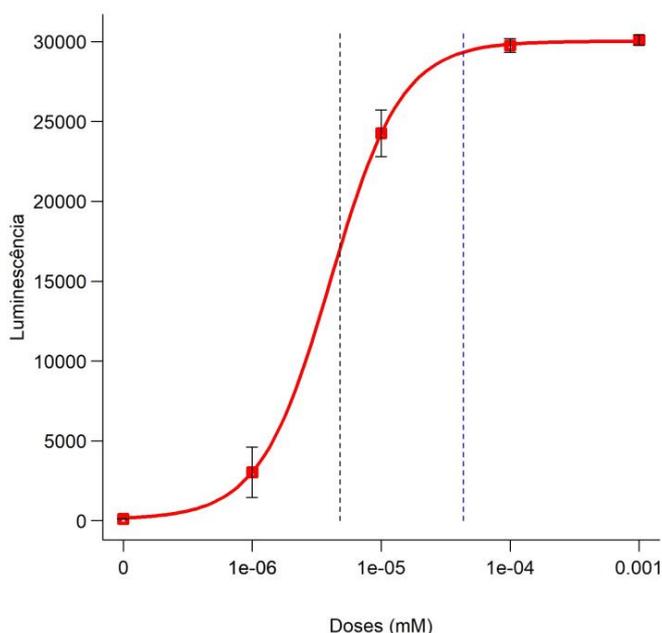


Figura 1 - Curva sigmoide de dose-resposta referente a atividade agonista de 20-hidroxiectdisônio em células S2. FAEM / UFPEl, Capão do Leão, 2023.

Quando a linhagem celular S2 de *D. melanogaster* foi exposta aos bioensaios de citotoxicidade dos extratos vegetais, observou-se que apresentarão viabilidade celular superior a 91%. Portanto, as concentrações usadas nos experimentos posteriores estão mostradas na tabela 2.

Tabela 2: Viabilidade dos extratos utilizados no estudo de acordo com a concentração utilizada nos estudos posteriores.

Extrato	Citotoxicidade Conc.(mg)	Porcentagem
Canutilho	10^{-6}	$96.3 \pm 1.5^*$
Cravo	10^{-3}	98.0 ± 0.0
Pimenteiro brasileiro	10^{-3}	98.0 ± 0.0
Cinamomo	10^{-3}	97.7 ± 0.6
Cravo mourisco	10^{-3}	91.0 ± 1.0
Samambaia dentada	10^{-3}	94.7 ± 3.5
Samambaia brasileira	10^{-1}	91.7 ± 1.5
Neem	10^{-3}	96.3 ± 1.5
Aivenca	10^{-3}	95.7 ± 3.2

* Desvio padrão

Na atividade agonista, nenhum dos extratos testados na concentração selecionada apresenta efeito comparável ao 20-hidroxicdisônio (Figura 2A). Na atividade antagonista, o extrato de Samambaia brasileira, na concentração de 10^{-1} apresentou efeito antagonista, reduzindo 91.57% a atividade do receptor na presença de 20-hidroxicdisônio (Figura 2B). Em relação aos demais extratos, não apresentaram efeito significativo.

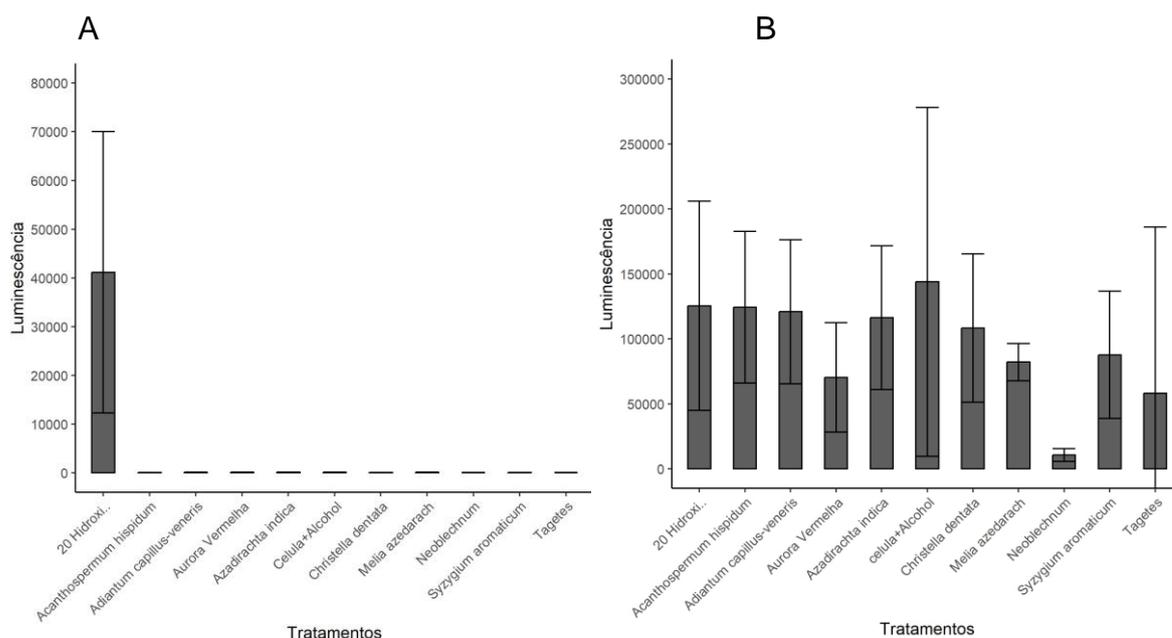


Figura 2- Efeito agonista (A) e antagonistas (B) dos extratos vegetais em linhagem celular S2, comparados com o controle hormônio 20-hidroxicdisônio. Intervalo de confiança $P < 0.05$. FAEM / UFPel, Capão do Leão, 2023.

4.4. Discussão

No campo da pesquisa científica, o estudo de moléculas antagonistas e seu efeito na regulação hormonal de insetos constitui um campo de interesse devido ao seu potencial de aplicação no desenvolvimento de inseticidas biorracionais. Harada et al. (2011) estabelecem que, para que uma molécula antagonista seja considerada eficaz, ela deve inibir pelo menos 50% da atividade hormonal. Essa premissa lança as bases para a exploração de compostos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas, que possuem propriedades análogas aos hormônios encontrados nos insetos, capazes de alterar seu desenvolvimento e sobrevivência.

A diversidade de moléculas com atividade hormonal nas plantas vai desde sesquiterpenos alifáticos ou monocíclicos até substâncias esteróides polihidroxiladas, classificadas por Sláma (1969) por sua atividade hormonal juvenil em insetos e atividade semelhante à ecdisona. Porém, o entendimento da biossíntese, função e processo de isolamento dessas moléculas em plantas, como a molécula do 20E, ainda é limitado. Pesquisas com *D. melanogaster* identificaram enzimas e moléculas intermediárias na via de biossíntese e inativação do 20E, sugerindo uma função específica para o gene CYP71D443 em raízes de *Ajuga* sp. (Tsukagoshi et al., 2016).

Estudos adicionais revelaram a presença de compostos como cucurbitacinas, oligostilbenos, vitanólidos, fenilalcanóides e certos alcaloides com atividades antagonistas do 20E, demonstrando o seu potencial através de bioensaios celulares (Zou et al., 2018). No entanto, a avaliação *in vivo* destes antagonistas como inseticidas biorracionais permanece inexplorada, destacando uma oportunidade significativa para pesquisas futuras.

A triagem de compostos secundários de plantas revela sua capacidade de atuar como agonistas ou antagonistas no receptor de ecdisteroides. Dinan (1999) identificou um extenso catálogo de espécies de plantas com potencial para o desenvolvimento de agentes de controle biológico, enquanto pesquisas subsequentes demonstraram a eficácia de fitosteróides como a ciasterona em receptores específicos de ecdisteroides em células de insetos (Zotti et al., 2013). Além disso, foi documentada a capacidade de certos compostos não esteróides, extraídos de sementes de *Carex pendula*, de inibir receptores nucleares em dípteros, oferecendo um novo espectro de possibilidades para o controle de pragas (Meng et al., 2001).

Essas descobertas destacam a rica diversidade de compostos naturais com potencial para o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas mais seletivas e sustentáveis. No entanto, a complexidade de sua ação e a necessidade de estudos adicionais para compreender plenamente o seu mecanismo de ação e eficácia *in vivo* continuam a ser desafios cruciais neste campo de investigação (HARADA *et al.*, 2011). As plantas também possuem um número diversificado de moléculas análogas aos hormônios encontrados nos insetos, que são capazes de impedir a sincronização do desenvolvimento, bem como suprimir sua capacidade de sobrevivência e reprodução. Os sesquiterpenos alifáticos ou monocíclicos foram classificados como substâncias com atividade hormonal juvenil em insetos e substâncias esteróides polihidroxiladas com atividade hormonal em ecdisona (SLÁMA, 1969).

4.5. Conclusões

Dos nove extratos testados, foi observado efeito antagonista em células de diptera com o extrato de Samambaia brasileira, na concentração de 10^{-1} , resultando em uma inibição de 91,57% do hormônio 20-hidroxiectdisônio. Sugere-se a identificação e caracterização dos metabolitos secundários para isolar e detectar a molécula responsável pelo efeito antagonista, uma vez que o metabolito pode servir como base para o *design* racional de novas moléculas inseticidas em estudos futuros.

4.6. Referencias

- AMEER, H. et al. 2022. Efficacy of Botanical Plant Extracts on the Population Dynamics of Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera; Aphididae). **Journal of Bioresource Management**, v. 9, n. 2.
- CARLOS, A. H. L. et al. 2011. Insect Growth Regulatory Activity of *Blechnum chilense*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 8.
- DINAN, L.; HORMANN, R. E.; FUJIMOTO, T. 1999. An extensive ecdysteroid CoMFA. *J Comput Aided Mol Des.* 13(2):185–207.
- Fox, J. Weisberg, S. 2019. *An R Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA. Disponível em: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
- GROSS, J.; Uwe Ligges. 2015. *Nortest: Tests for Normality*. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=nortest>
- HARADA, T. et al. 2011. Virtual screening for ligands of the insect molting hormone receptor. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, n. 2, p. 296–305.
- KOOLMAN, J.; BECKER, J.; KARLSON, P. 1989. Ecdysone: from chemistry to mode of action.
- KNEZEVIC, S.Z.; STREIBIG, J.C.; RITZ, C. 2007. Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology* 21, 840-848.
- LEYVA, M. et al. 2017. Plantas con actividad insecticida: una alternativa natural contra mosquitos. **Revista biomédica**, v. 28, n. 3, p. 139–181.
- LOPES, A. I. F. et al. 2020. Cytotoxic Plant Extracts towards Insect Cells: Bioactivity and Nanoencapsulation Studies for Application as Biopesticides. **Molecules**, v. 25, n. 24.
- MAGIEROWICZ, K.; GÓRSKA-DRABIK, E.; SEMPRUCH, C. 2020. The effect of *Tanacetum vulgare* essential oil and its main components on some ecological and physiological parameters of *Acrobasis advenella* (Zinck.) (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 162, p. 105–112.
- MALATHI, H.; THAMIZHSERAN, N. 2021. Evaluation of the Cytotoxic Effects of Thorn Extracts from Medicinal Plants on the sf21 Cell Line. **Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)**, v. 15, n. 1, p. 22.
- MENG, Y.; BOURNE, P.C.; WHITING, P.; SIK, V.; DINAN, L. 2001. Identification and ecdysteroid antagonist activity of three oligostilbenes from the seeds of *Carex pendula* (Cyperaceae). *Phytochemistry.* 57(3):393–400.

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

OKAMOTO, N.; YAMANAKA, N. 2021. Transporter-mediated ecdysteroid trafficking across cell membranes: A novel target for insect growth regulators. **Journal of Pesticide Science**, v. 46, n. 1, p. 23.

OVIEDO, P. R.; GONZÁLEZ, O. L. 2015. Lista nacional de plantas invasoras y potencialmente invasora en la República de Cuba. *Bissea*, v. 9, p. 1–88.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. 2015. Dose-response analysis using R. *PLoS ONE*, v. 10, n. 12.

SEIBER, J. N. et al. 2014. Biopesticides: state of the art and future opportunities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 48, p. 11613–11619.

SLÁMA, K. 1969. PLANTS AS A SOURCE OF MATERIALS WITH INSECT HORMONE ACTIVITY. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 12, n. 5, p. 721–728.

TAHA-SALAI, L. et al. 2020. Biological activity of *Ajuga reptans* extracts against the African cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *bioRxiv*, p. 2020.03.12.988428.

TSUKAGOSHI, Y. et al. 2016. Functional characterization of CYP71D443, a cytochrome P450 catalyzing C-22 hydroxylation in the 20-hydroxyecdysone biosynthesis of *Ajuga reptans* roots. *Phytochemistry*, v. 127, p. 23–28.

VALVERDE-RODRIGUEZ, A.; MILTAO.; CAMPOS-ALBORNOZ, E. 2021. Extractos vegetales en la reducción de las infestaciones de *Dasiops spp* en el cultivo de granadilla. *Manglar*, v. 18, n. 1, p. 15–20.

ZOTTI, M. et al. 2013. 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.

ZOU, C. et al. 2018. Cucurbitacin B acts a potential insect growth regulator by antagonizing 20-hydroxyecdysone activity. *Pest management science*, v. 74, n. 6, p. 1394–1403.

5. Considerações finais

Embora as moléculas avaliadas neste estudo não tenham demonstrado efeitos agonistas ou antagonistas nos bioensaios realizados, a utilização da modelagem computacional *in silico* permitiu a seleção e a análise econômica de moléculas com potencial atividade, representando uma abordagem economicamente viável para a pesquisa de novos inseticidas.

É importante ressaltar a necessidade de novos estudos direcionados à identificação e caracterização dos metabólitos secundários presentes em Samambaia brasileira que exibiram efeito antagonista nos experimentos. Esses metabólitos podem representar uma via promissora para a síntese racional de moléculas de inseticidas alternativas, contribuindo para a diversificação das opções no manejo integrado de pragas. Essa abordagem é crucial para garantir a segurança da diversidade biológica nas culturas e no meio ambiente.

A eficácia do sistema de triagem em células para testar tanto moléculas químicas quanto extratos vegetais destaca a importância de expandir essa pesquisa para avaliar uma variedade de insetos de diferentes ordens. Isso poderia fornecer *insights* valiosos sobre a eficácia dessas substâncias em diferentes contextos ecológicos e biológicos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais abrangentes e eficazes de controle de pragas.

6. Referencias gerais

ALVES, M. et al. QUIMIOINFORMÁTICA: UMA INTRODUÇÃO. **Química Nova**, v. 41, n. 2, p. 202–212, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/K6fzXSJWRGLmqzkbfbBsqrj/>

BALAGUER, P.; DELFOSSE, V.; BOURGUET, W. Mechanisms of endocrine disruption through nuclear receptors and related pathways. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 7, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.04.008>

BARISCAN, I. Lethal and Sublethal Effects of Three Insect Growth Regulators on *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **University of Georgia**, 16f, p. 2019. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/0dc14a35e4bd47aafdf6d966b6b936f2/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>

BRAGA E SILVA, S; SATO, Me; RAGA, A. Uso de extratos naturais no controle de insetos, com ênfase em moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). **O Biológico**, v. 81, n. 1, p. 1–30, 2019.

BILLAS, I. M.L.; MORAS, D. Ligand-binding pocket of the ecdysone receptor. **Vitamins and hormones**, v. 73, p. 101–129, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16399409/>

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: Past, present, or future. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 1–16, 1998.

CORZO, F. L. et al. Toxicity of Porella chilensis Sesqui- and Diterpenoids against Larvae of the Corn Pest *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 5, p. 414–419, 2012.

DA SILVA, J. L. et al. Introdução a Triagem Virtual. **BIOINFO - Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**, 2021.

DAS, S. K. Screening of Bioactive Compounds for Development of New Pesticides: A Mini Review. **Universal Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 1, p. 15–20, 2016. Disponível em: <http://www.hrpub.org>

DELANEY, J. et al. Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 17–18, p. 839–845, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/6852331_Modern_agrochemical_research_a_missed_opportunity_for_drug_discovery

DISRAELI, A. Modelagem computacional das interações da integrina $\alpha 4 \beta 1$ humana com ligantes como ferramenta ao planejamento de fármacos. Universidade Federal

Do Ceará Centro De Ciências Agrárias Departamento De Engenharia De Pesca Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia De Recursos Naturais, p. 29, 2023.

DOS SANTOS, R. N.; FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Practices in Molecular Docking and Structure-Based Virtual Screening. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 1762, p. 31–50, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29594766/>

FINGER, D. S. et al. Nuclear Receptors Linking Physiology and Germline stem cells in *Drosophila*. **Vitamins and hormones**, v. 116, p. 327, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8063499/>

GERMAIN, P. et al. Overview of nomenclature of nuclear receptors. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 4, p. 685–704, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17132848/>.

MA, X. H. et al. Virtual screening methods as tools for drug lead discovery from large chemical libraries. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 32, p. 5562–5571, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23016548/>

IRAC. Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas. In: **Comité De Acción Contra La Resistencia A Insecticidas**, v. 6, p. 7–11, 2022.

KAMIYAMA, T.; NIWA, R. Transcriptional Regulators of Ecdysteroid Biosynthetic Enzymes and Their Roles in Insect Development. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 823418, 2022.

KANNANGARA, J. R.; MIRTH, Ch. K.; WARR, C. G. Regulation of ecdysone production in *Drosophila* by neuropeptides and peptide hormones. **Open Biology**, v. 11, n. 2, 2021. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsob.200373>

LAUDET, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. **Journal of molecular endocrinology**, v. 19, n. 3, p. 207–226, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9460643/>

LIU, Xi. et al. 20-Hydroxyecdysone (20E) Primary Response Gene E93 Modulates 20E Signaling to Promote *Bombyx* Larval-Pupal Metamorphosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 45, p. 27370–27383, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26378227/>

MACHADO, R. M. R. Seleção de compostos com base na ativação dos receptores ecdisteróides em linhagens celular Diptera (S2) e Lepidoptera (SF9). p. 18, 2019.

MELLO, T. R. P. et al. Developmental regulation of ecdysone receptor (EcR) and EcR-controlled gene expression during pharate-adult development of honeybees (*Apis*

mellifera). **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 120-401, 2014.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31–43, 2006.

ORTEGA-DOMÍNGUEZ, B. et al. Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. TIP. Revista especializada en **ciencias químico-biológicas**, v. 18, n. 2, p. 131–143, 2015. Disponible em: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2015000200131&lng=es&nrm=iso&tlng=es

PINSTRUP-ANDERSEN, P. The future world food situation and the role of plant diseases. Canadian **Journal of Plant Pathology**, v. 22, n. 4, p. 321–331, 2000. Disponible em: https://www.researchgate.net/publication/261669306_The_future_world_food_situation_and_the_role_of_plant_diseases

REZENDE-TEIXEIRA, P. et al. What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. **Environmental Pollution**, v. 300, p. 118-983, 2022.

RIERA, Ximena. Identificación y producción de un receptor nuclear perteneciente a una nueva subfamilia en *Echinococcus granulosus*. Universidad de la República Uruguay, p. 14, 2018.

RODRIGUES, G. C. S. Identificação de novos potenciais inseticidas e antivirais utilizando ferramentas computacionais e banco de dados de produtos naturais. p. 45, 2021. Disponible em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/23360>.

SANTOS, L. H. Docagem molecular: em busca do encaixe perfeito e acessível. In: BIOINFO - REVISTA BRASILEIRA DE BIOINFORMÁTICA E BIOLOGIA COMPUTACIONAL, v. 1, p. 2, 2021.

SCHNEIDER, G. Virtual screening: an endless staircase. Nature reviews. Drug discovery, v. 9, n. 4, p. 273–276, 2010. Disponible em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20357802/>

SEVER, R.; GLASS, Ch. K. Signaling by Nuclear Receptors. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 5, n. 3, 2013. Disponible em: </pmc/articles/PMC3578364/>

VARGAS, J; BARROS, G; REBELLO, F. Introducao a genese de fármacos. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, p. 16, 2019.

WEIKUM, E. R.; LIU, X.; ORTLUND, E. A. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. **Protein Society**, v. 27, n. 11, p. 1876–1892, 2018. Disponible em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30109749/>

WU, L. et al. Fitness of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* to three solanaceous

vegetables. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 20, n. 3, p. 755–763, 2021.

WU, W; LOVERDE, Ph. T. Identification and evolution of nuclear receptors in Platyhelminths. *PLOS ONE*, v. 16, n. 8, p. 250-750, 2021. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0250750>

WU, W.; LOVERDE, Ph. T. Nuclear hormone receptors in parasitic helminths. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 334, n. 1–2, p. 56–66, 2011.

YAMANAKA, N. Ecdysteroid signalling in insects—From biosynthesis to gene expression regulation. **Advances in Insect Physiology**, v. 60, p. 1–36, 2021.

ZOTTI, M. et al. 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, 2013.