

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ORGÂNICA

TESE

**Estudo Semi-empírico da Interação de 20-
hidroxiecdisona e seus Agonistas Sintéticos com
Modelos de Homologia de Receptores de
Ecdisteróide (EcR)**

Ana Cristina Souza dos Santos

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

ESTUDO SEMI-EMPÍRICO DA INTERAÇÃO DE 20-
HIDROXIECDISONA E SEUS AGONISTAS SINTÉTICOS COM
MODELOS DE HOMOLOGIA DE RECEPTORES DE
ECDISTERÓIDE (EcR)

ANA CRISTINA SOUZA DOS SANTOS

Sob a Orientação do Professor

Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Philosophiae Doctor em Química
Orgânica, Área de Concentração
em Modelagem Molecular.

Seropédica, RJ
Outubro de 2002.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

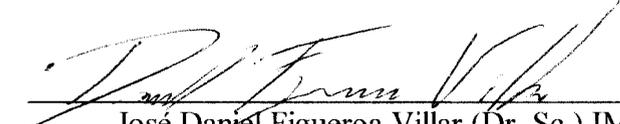
ANA CRISTINA SOUZA DOS SANTOS

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de Concentração em Modelagem Molecular, como requisito parcial para obtenção do grau de **Philosophiae Doctor**, em Química Orgânica.

TESE APROVADA EM 18/10/2002



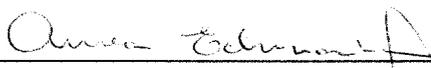
Carlos Mauricio Rabello Sant'Anna (Dr. Sc.) UFRRJ
(Orientador)



José Daniel Figueroa Villar (Dr. Sc.) IME



Mágaly Girão Albuquerque (Dr. Sc.) UFRJ



Aurea Echevarria (Dr. Sc.) UFRRJ



João Batista Neves da Costa (Dr. Sc.) UFRRJ



Carlos Rangel Rodrigues (Dr. Sc.) UFRJ



Clarissa Oliveira da Silva (Dr. Sc.) UFRRJ

*Ao meu querido filho Otávio, que me
faz acreditar num mundo melhor.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Mauricio R. Sant'Anna pela orientação segura, pela amizade e pela confiança demonstrada nesta longa jornada.

À minha família e ao Alvimar pelo amor, apoio e paciência.

Aos amigos Marco Soares e Walter Brasil pelo apoio, carinho e amizade.

À Heloisa Melo pela amizade e apoio possível.

Aos meus queridos alunos e ex-alunos pelas transformações promovidas a cada novo diálogo.

Aos professores do PPGQO da UFRuralRJ pela oportunidade concedida.

Aos professores e funcionários do DEQUIM pelo apoio e atenção recebidos.

Aos alunos do PPGQO da UFRuralRJ pela amizade.

À A. Gabriel pelo meu auto-resgate e por me levar a compreender que "todo ponto de vista é a vista de um ponto", pois para entender como alguém vê, é necessário saber como são seus olhos e qual sua visão de mundo.

Aos amigos Elizabete Cristina Ribeiro e Ernani Jardim por me lembrarem dos entardeceres, amanheceres, montanhas, sorvetes, rios, primaveras, outonos, chuvas, sol, rua, crianças que ainda tenho pela frente.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Posicionamento e Abordagem do Problema	1
1.2. A Regulação Endócrina do Crescimento e Desenvolvimento do Inseto	5
1.3. Relações Estrutura-Atividade	10
1.4. Os Receptores Nucleares (RNs)	14
1.5. A Modelagem de Biomacromoléculas	25
1.6. A Construção de Novos Ligantes	31
2. OBJETIVOS	34
3. METODOLOGIA	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Estudo comparativo entre as estruturas moleculares de 20E e as dibenzoilidrazinas RH-5992 e RH-2485.	38
4.2. Modelagem do Domínio de Interação com o Ligante (DIL) dos EcRs	41
4.2.1. Definição do sítio de interação com o ligante (SIL) dos modelos dos EcRs	45
4.3. As Interações do Ligante Natural (20E) na Cavidade de Interação com o Ligante (CIL)	47
4.4. As Interações das DBHs RH-5849 e RH-2485 na Cavidade de Interação ao Ligante (CIL)	49
4.5. Análise estrutural e diferenças energéticas para a interação de um grupo de DBHs utilizando o modelo de EcR de lepidóptero	55
4.6. Comparação das conformações das DBHs no modelo da CIL do EcR de lepidóptero	67
4.7. Proposta, análise estrutural e diferenças energéticas para a interação de novas DBHs utilizando o modelo de EcR de lepidóptero	71
5. CONCLUSÕES	78
6. BIBLIOGRAFIA	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cronologia dos inseticidas descobertos dando ênfase às classes químicas.	2
Figura 2. Impacto do DDT nos casos de malária na Itália.	3
Figura 3. Estruturas moleculares de hormônios de insetos e alguns de seus agonistas sintéticos.	4
Figura 4A. Estágios da metamorfose gradual de um percevejo.	5
Figura 4B. Estágios da metamorfose completa de um besouro.	6
Figura 5. Esquema representativo do modo de ação do hormônio 20E em nível molecular.	8
Figura 6. Cucurbitacinas com ação antagonista de 20E.	9
Figura 7. Sobreposição das estruturas de 20E e Cucurbitacina II.	9
Figura 8. Estruturas dos derivados de 20E e suas atividades biológicas.	11
Figura 9. Estrutura do ecdisteróide 20E e de derivados sintéticos com grupamentos substituintes, ligados a 22-0.	12
Figura 10. Série de DBHs estudada por OIKAWA et al., 1994a; NAKAGAWA et al., 1995 e SMAGGHE et al., 1999.	13
Figura 11. Esquema do procedimento para a superposição entre o composto 3 e 20E.	14
Figura 12. Esquema de representação dos RNs.	15
Figura 13. Comparação das seqüências das regiões conservadas C e E de EcR e de alguns membros representativos da grande família de receptores nucleares.	16
Figura 14. Alinhamento das seqüências dos domínios de interação com o ligante (DIL) de receptores de Ecdisteróide (EcRs).	19
Figura 15. Representação esquemática para os vários termos envolvidos na interação entre o ligante L e o receptor R.	24
Figura 16. Definição dos ângulos torcionais χ ψ ϕ e ω	29
Figura 17. Gráfico de Ramachandran do receptor de ácido retinóico (3LBD) extraído do banco de proteínas PDB.	30
Figura 18. <i>Manduca sexta</i> na forma larva e na forma adulta.	34
Figura 19. <i>Drosophila melanogaster</i> na forma larva e na forma adulta.	34
Figura 20. Estruturas químicas de 20E e das dibenzoilidrazinas, em destaque átomos comparados.	38
Figura 21. Sobreposição da estrutura química de 20E com RH-2485.	40
Figura 22. Sobreposição da estrutura química de 20E com RH-5992.	40
Figura 23. Alinhamento múltiplo de msEcR-DIL com as diferentes as proteínas utilizadas como moldes.	42
Figura 24. Alinhamento múltiplo de <i>dm</i> EcR-DIL com as diferentes as proteínas utilizadas como moldes.	43
Figura 25. Gráfico de Ramachandran para o Modelo de msEcR-DIL.	44
Figura 26. Gráfico de Ramachandran para o Modelo de <i>dm</i> EcR-DIL.	45
Figura 27. Aminoácidos que constituem o sítio ativo definido para os EcRs e o sítio ativo do RXR (2LBD/EXAA).	46
Figura 28. Aminoácidos que interagem com o ácido retinóico no sítio ativo do receptor.	40
Figura 29. Modelo da msEcR-CIL com 20E (azul), otimizado com o método PM3.	52

Figura 30. Modelo da msEcR-CIL com RH-2485 (azul), otimizado com o método PM3.	53
Figura 31. Representação dos complexos otimizados com o método semi-empírico PM3 para dmRcR-CIL e msEcR-CIL com RH-2485 (orientação I).	54
Figura. 32. Estruturas das DBHs utilizadas no estudo da correlação entre as diferenças energéticas no modelo de msEcR-CIL e os respectivos valores de pLD50 frente a <i>Spodoptera exigua</i> .	55
Figura 33. Representação esquemática de etapas hipotéticas do processo de hateração CIL/ligante, com os termos de variação de entalpia associados. Veja texto para detalhes.	56
Figura 34. Diagrama de energia relativa das conformações obtidas para depois da rotação e fixação da ligação N-N central e minimização do restante da molécula de RH-5849.	68
Figura 35. Diagrama de energia relativa das conformações obtidas para RH-2485 depois da rotação e fixação da ligação N-N central e minimização do restante da molécula (método PM3).	68
Figura 36. Conformações adotadas por RH-5849 e RH-2485 na CIL.	70
Figura 37. Estruturas das novas DBHs propostas, com promissor potencial inseticida, mimetizando a ação de 20E.	71
Figura 38. Modelo da msEcR-CIL com RURAL-1 para orientação I, otimizado com o método PM3.	74
Figura 39. Modelo da msEcR-CIL com RURAL-1 para orientação II, otimizado com o método PM3.	75
Figura 40. Modelo da msEcR-CIL com RURAL-2 para orientação I, otimizado com o método PM3.	76
Figura 41. Modelo da msEcR-CIL com RURAL-3 para orientação I, otimizado com o método PM3.	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Inseticidas naturais registrados nos EUA.	1
Tabela 2. Cargas, desvios médios e o RMS entre os pares de átomo de 20E, RH-5992 e RH-2485.	38
Tabela 3. Entalpias de interação calculadas para os complexos entre o ligante L (20E) e o modelos da cavidade de interação ao ligante (CIL) para <i>Manduca sexta</i> e <i>Drosophila melanogaster</i> .	48
Tabela 4. Distâncias das ligações hidrogênio entre os grupos de 20E e os aminoácidos dos modelos de EcR-CIL1 de <i>M. sexta</i> e <i>D. melanogaster</i> .	49
Tabela 5. Entalpias de interação calculadas para os complexos entre os ligantes L (RH-2485 e RH-5849) e o modelos da cavidade de interação ao ligante (CIL) para <i>M. sexta</i> e <i>D. melanogaster</i> .	50
Tabela 6. Distâncias das ligações hidrogênio entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos dos modelos de EcR-CIL de <i>M. sexta</i> e <i>D. melanogaster</i> .	51
Tabela 7. Entalpias de formação calculadas pelo método selni-elnprico PM3 para os complexos entre o modelo de msEcR-CIL e os ligantes (L) e os respectivos valores de pLD ₅₀ .	58
Tabela 8. Correlações entre os valores de ΔH_f^{int} e ΔH_f^{conf} com pLD ₅₀ para o complexos estudados pelo método PM3.	59
Tabela 9. Entalpias de formação calculadas pelo método semi-empírico AM1 para os complexos entre o modelo de msEcR-CIL e os ligantes (L) e os respectivos valores de pLD ₅₀ .	61
Tabela 10. Correlações entre os valores de ΔH_f^{int} ΔH_f^{conf} com pLD ₅₀ para o os complexos estudados pelo método AMI.	62
Tabela 11. Distâncias das ligações hidrogênio XHY entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos do modelo msEcR-CIL para os cálculos com PM3, na orientação I.	63
Tabela 12. Distâncias das ligações hidrogênio XHY entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos do modelo msEcR-CIL para os cálculos com PM3, na orientação II.	64
Tabela 13. Distâncias das ligações hidrogênio entre XHY os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos do modelo msEcR-CIL para os cálculos com AM1, na orientação I.	65
Tabela 14. Distâncias das ligações hidrogênio XH-Y entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos do modelo msEcR-CIL para os cálculos com AM1, na orientação II.	66
Tabela 15. Valores dos ângulos diedro (ϕ) entre as ligações C ₁ N ₂ N ₃ C ₄ das DBHs no modelo msEcR-CIL para os cálculos com PM3, orientações I e II.	67
Tabela 16. Entalpias de imcração calculadas pelo método semi-empírico PM3 para os complexos entre os ligantes (L) e o modelo da cavidade de hiteração com o ligante (CIL) para <i>M. sexta</i> .	72
Tabela 17. Distâncias das ligações hidrogênio entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos dos modelos de EcR-CIL, de <i>M. sexta</i> para os cálculos com PM3.	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ala- Alanina

Arg - Arginina

CIL Cavidade de Interação com o Ligante

DBH - Dibenzoilidrazina

DDT 2,2-di(p-clorofenil)-1,1,1-tricloro-etano

DID Domínio de Interação com o DNA

DIL- Domínio de Interação com o Ligante

DNA- Ácido desoxiribonucleico

EC50- Dose da droga (pesticida) necessária para atingir 50% do efeito biológico esperado

EcR Receptor de Ecdisteróide

EcR-CIL - Cavidade de Interação com o Ligante do Receptor de Ecdisteróide

EcR-DIL- Domínio de Interação com o Ligante do Receptor de Ecdisteróide

EcRE - Gene de expressão de 20E

EcR-SIL - Sítio de Interação com o Ligante do Receptor de Ecdisteróide

Gly- Glicina

HJ - Hormônio Juvenil

hRAR- Receptor humano de ácido retinóico

hTRb- Receptor humano do hormônio da tireóide

hVRD - Receptor humano da vitamina D

IC50- Concentração da substância requerida para atingir 50% do efeito inibitório, ou seja, representa a afinidade de ligação com o receptor, medida pela habilidade de competição com o agonista natural.

Ile - Isoleucina

Leu- Leucina

L - Ligante

Met - Metionina

PDB Protein Data Bank

Phe- fenilalanina

pLD50 - atividade biológica expressa em termos do valor do logarítmico de LD50 (dose da substância que causa a mortalidade em 50% das larvas de insetos testadas).

QSAR- Quantitative Structure-Activity Relationship

RN - Receptor nuclear

Ser- Serina

SIL- Sítio de interação com o ligante

Thr- Treonina

Tyr- Tirosina

USP - Proteína *ultaspiracle*

Val- Valina

20E - 20-hidroxiecdisona

RESUMO

As dibenzoilidrazinas RH-5849, RH-5992 e RH-2485 são agonista não esteroidais de 20-hidroxiecdisona (20E) e exerce seu efeito inseticida através da interação com o receptor de 20E (EcR). No entanto RH-5992 e RH-2485 são seletivamente tóxicos para lepidópteros.

O estudo da seletividade das DBHs RH-5992 e RH-2485 para lepidóptero envolveu a avaliação dos modelos do EcR de *Manduca Sexta*, um lepidóptero, e o EcR de *Drosophila melanogaster*, um díptero, cujas estruturas 3D foram construídas através de modelagem por homologia.

Os modelos gerados por homologia para os EcRs das duas espécies de insetos foram construídos a partir de estruturas cristalográficas de proteínas pertencentes a supertamília de receptores nucleares esteroidais, que incluem o receptores humano de ácido retnóico, vitamina D e o do hormônio da tiróide.

Os modelos resultantes do alinhamento múltiplo entre as proteínas apresentaram boa correlação entre as estruturas moldes e as proteínas-alvo, com aspecto bastante similar, sendo as mais importantes diferenças relatadas para a seqüência terminal.

A opção pelo estudo a partir do modelo inicial foi baseado no foco do trabalho, que se limita à CIL, região interna da proteína, identificada através das proteínas moldes utilizadas e que são consideradas regiões conservadas.

Após proposição do sítio de interação com o ligante (SIL) dos EcRs modelados, foi realizada uma avaliação prévia dos modelos através do atracamento de 20E na possível cavidade de interação com o ligante (CIL). As CILs de *M. sexta* e *D. melanogaster* foram definidas pelos aminoácidos que realmente poderiam interagir com o ligante. O mesmo procedimento foi envolvido com as DBHs.

Para avaliar as diferenças de interações nas CILs dos EcRs foram, consideradas a energia de interação e a geometria entre agonistas (ligantes) e as CILs, com o propósito de explicar a atividade e seletividade dessas moléculas frente ao receptor. Os cálculos de entalpia associado com as forças de interação entre os agonistas sintéticos e os aminoácidos nos modelos das CILs revelaram resultados concordantes com a atividade biológica das DBHs para as espécies Lepidóptera e Díptera.

O estudo da interação cavidade/ligante incluiu outras diferentes DBHs, através da busca de correlações entre os diferentes termos de energia envolvidos na interação no modelo da cavidade de interação do receptor de ecdisteróide de *M. sexta* (msEcR-CIL) e os valores de pLD₅₀ dos respectivos agonistas [SMAGGHE et al., 1999].

Novos ligames com possível potencial pesticida foram construídos após a identificação de grupos funcionais importantes para a atividade agonista de 20E. Os resultados de entalpia associado com as forças de interação entre os novos ligantes (RURAL-1, RURAL-2, RURAL-3) e os aminoácidos nos modelos das CILs revelaram resultados significativos, comparado aos resultados do complexo entre RH-2485 e a CIL do EcR de *M. sexta* (msEcR-CIL).

ABSTRACT

The dibenzoylhydrazines (DBHs) R11-5849, Rtt-5992 (tebulienozide), and RH-2485 (metoxifenozone) are non-steroidal agonists of 20-hydroxyecdysone (20E) insect hormone, that exert their insecticide effect by interaction with the 20E receptor (EcR). Tebulienozide and metoxifenozone are selectively toxic to lepidopteran species.

In this theoretical study, the DBHs were firstly evaluated by a comparison with the natural agonist (20E) structure. In the next step, the RH-2485 selectivity towards Lepidoptera was studied with models of EcRs of the Lepidoptera *Manduca Sexta*, and of the Diptera *Drosophila melanogaster*.

The 3D structures of both EcRs were constructed by homology modeling with the SWISS-MODEL server. The models were constructed from crystallographic coordinates of related proteins of the nuclear receptor super Family, which includes the human receptors of vitamin D, retinoic acid, and thyroid hormone.

The initial models, after a previous optimization by molecular mechanics, were simplified to an internal conserved region, the receptor ligand interaction site (LIS), identified by comparison with original template proteins.

After this step, it was implemented a rigid docking study of 20E inside the probable ligand interaction cavity (LIC) of the models. The *M. sexta* and *D. melanogaster* LICs were defined by the amino acids that could directly interact with the ligand. The same procedure was employed for the DBHs RH-5849 and RH-2485.

In order to evaluate the interaction pattern inside the EcR LICs, the enthalpy of interaction and the geometry of the ligand/LIC complexes were studied by the semiempirical approach. The calculated enthalpies associated with the interaction forces between the synthetic agonists and the amino acids of the LICs are in accordance with the experimental biological activity of the DBHs towards Lepidoptera and Diptera.

In the following step, an interaction study between the *M. sexta* LIC (msEcR-LIC) and 10 additional DBHs was implemented to search for correlations between calculated enthalpy values associated with the interaction and pLD₅₀ experimental values of the synthetic agonists [SMAGGHE et al., 1999].

New DBH ligands with potential pesticide activity were proposed after identification of the important groups for the EcR agonist activity. The interaction of the new ligands (RURAL-1, RURAL-2, and RURAL-3) with the msEcR-LIC amino acids resulted in quite favorable enthalpies, as compared to the known pesticides tebufenozide and metoxifenozone.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Posicionamento e Abordagem do Problema

O crescimento contínuo da população tem levado o homem a se confrontar com muitos problemas, entre os quais estão, de um lado, a fome e as doenças parasitárias, e de outro, a ameaçadora poluição ambiental. Nesta ordem, o aumento da oferta de alimentos, assim como o controle de doenças provocadas por parasitas que tenham os insetos como vetores, devem estar associados a processos de controle de pragas que diminuam os impactos ambientais.

Até a metade do século XVII, o controle de insetos era feito através da cata ou da lavagem das pragas. Os poucos defensivos químicos eram inorgânicos e incluíam o enxofre, o arsênico e, por último, a criolita e o ácido bórico, alguns dos quais ainda são largamente usados no controle de pragas. Estes compostos são geralmente venenosos, quando usados em grande quantidade. Os inseticidas naturais vieram depois e foram os de maior interesse para químicos e biólogos devido à complexidade estrutural, potência e seletividade. Entretanto, eram limitados na sua eficácia por serem fotossensíveis e também caros, na maioria das vezes. Piretro tem sido o mais importante inseticida natural utilizado por quase dois séculos, com um uso anual na década de 80 de mais de 300.000 toneladas de ingrediente ativo. A nicotina também teve grande importância, mas foi completamente substituída pelos inseticidas sintéticos. Atualmente, os inseticidas naturais mais usados, além do piretro, são: rotenona, riânia, sabadilla e neem, cujos ingredientes ativos são: rotenona, rianodina, veratridina e azadirachtina, respectivamente [FERREIRA et al., 2001] (Tabela 1). O mais expressivo programa de desenvolvimento de agroquímicos de origem biológica nos anos recentes tem sido para o uso de extrato de sementes de neem [CASIDA & QUISTAD, 1998].

Tabela 1. Inseticidas naturais registrados nos EUA [FERREIRA et al., 2001]

Inseticida	País de origem	Princípios ativos	% do princípio ativo	Uso do inseticida	US\$/Kg (1992)
Piretro	Quênia	Piretrinas, cinerinas (flores)	25	Doméstico	75
Rotenona	Peru	Rotenóides (raízes e tubérculos)	7,3	Jardins e alimentos orgânicos	3
Riânia	Trinidade	Alcalóides tipo rianodina (caule)	0,1	Alimentos orgânicos	3
Sabadilla	Venezuela	Alcalóides veratrínicos (sementes)	0,8	Alimentos orgânicos	8
Neem	Índia	Limonóides tipo azadirachtina (sementes)	25	Alimentos orgânicos	375

A descoberta de um inseticida orgânico sintético foi a grande meta na década de 30 do século XX. A indústria tinha muitos compostos cuja atividade biológica era desconhecida e precisava de um método de teste biológico que padronizasse com precisão o efeito da variação estrutural na atividade destas substâncias. Um sistema de síntese e varredura foi bem estabelecido e abriu uma nova era de pesticidas orgânicos sintéticos (Fig. 1), onde o grande destaque foi o DDT. Ativo contra uma grande variedade de pragas, o DDT foi utilizado com grande eficácia no combate aos transmissores do tifo e da malária, eliminando estas doenças em alguns países (Fig. 2), além de possuir um grande potencial no controle de pragas na agricultura [CASIDA & QUISTAD, 1998].

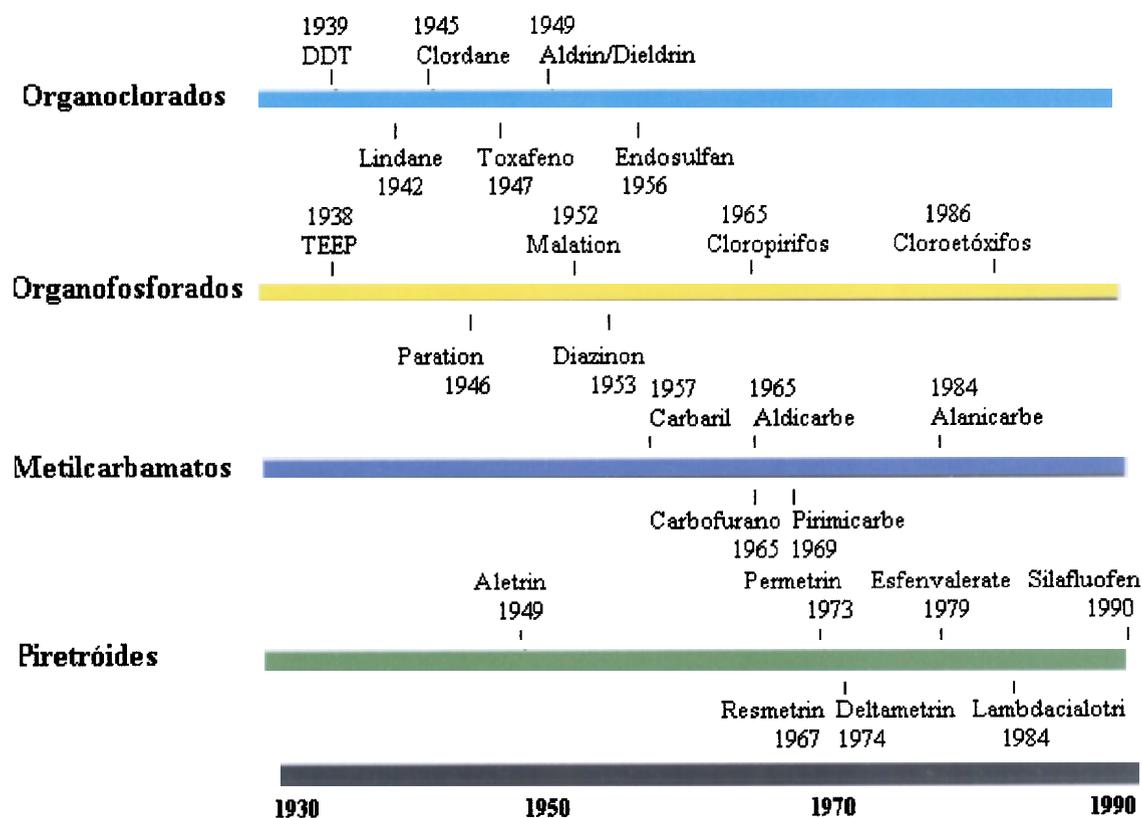


Figura 1. Cronologia dos inseticidas descobertos dando ênfase às classes químicas [CASIDA & QUISTAD, 1998].

No entanto, o estrondoso sucesso deste pesticida, que durou aproximadamente 40 anos, declinou quando o seu efeito fulminante sobre várias pragas começou a diminuir sensivelmente. Somando-se a isto, havia ainda o desequilíbrio ecológico causado, favorecendo o aparecimento de outras espécies que eram controladas naturalmente. Isso aconteceu, por exemplo, no Estado de São Paulo, onde a aplicação de organoclorados em lavouras de algodão favoreceu o aparecimento de ácaros rajado e vermelho; em lavouras de cana de açúcar, o Aldrin, um derivado do DDT, fez com que houvesse um aumento na população de pulgões. Este fenômeno também foi identificado para outros inseticidas sintéticos comumente usados, por exemplo, quando usado em citros, o Paration determinou o aumento do ácaro da ferrugem; no caso da batatinha, o uso do Carbaril aumentou a população de pulgões, etc. [SILVEIRA NETO, 1976].

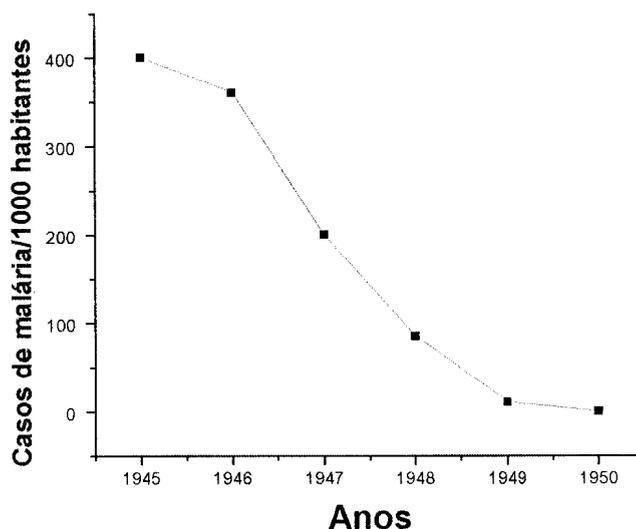


Figura 2. Impacto do DDT nos casos de malária na Itália [CASIDA & QUISTAD, 1998].

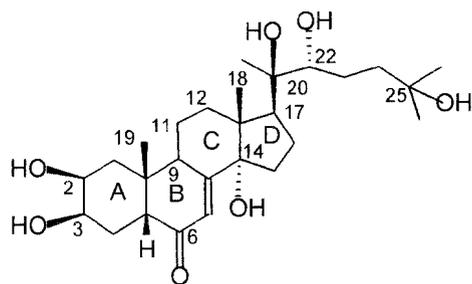
A aplicação de inseticidas de difícil degradação, como é o caso do DDT, pode trazer conseqüências desastrosas, tornando-se inseticidas remanescentes no ecossistema e causando intoxicações graves. Como exemplo clássico desse problema, cita-se o que ocorreu no lago Clear na Califórnia, EUA, onde se aplicou DDT a 0,014 ppm. para controle de uma mosquinha do gênero *Chaobarus*, muito comum neste lago e que incomodava os banhistas. Depois da aplicação, observou-se que o plâncton continha 5 p.p.m. do inseticida, os peixes que se alimentam de plâncton uma quantidade maior, os peixes gato (que se alimentam dos primeiros), tinham 20-220 ppm. e os mergulhões que se alimentam de peixes gato, de 1500-2500 ppm. na gordura, o que indica que o inseticida tinha se concentrado mais de 100.000 vezes. Como conseqüência, os mergulhões foram eliminados da região [BRANCO, 1990]. Daí todo cuidado e proibições que se fazem ao uso do DDT e outros organoclorados, que foram banidos dos EUA e de outros países na década de 70, embora ainda sejam utilizados em algumas partes do mundo [BRANCO, 1990].

A resistência aos pesticidas em populações de insetos é um outro grande problema no controle de pragas e doenças parasitárias. A gravidade do problema da resistência se estende aos danos provocados ao homem e ao meio ambiente, principalmente quanto ao aumento da quantidade de pesticida necessária para um novo controle. Por exemplo, na década de 70 já se tinha constatado no Brasil a resistência da lagarta rosca ao Aldrin, dos pulgões de batatinha ao Paration, do ácaro rajado a vários organofosforados, da broca da raiz do algodão aos organoclorados ciclodienos, da vaquinha da batatinha ao DDT, entre outros [SILVEIRA NETO, 1976].

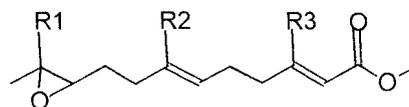
O surgimento de resistência acontece porque o controle de pragas e vetores com pesticidas submete as populações dos insetos a um processo de seleção Darwiniana e sobrevivência dos mais aptos [SCOTT, 1995]. Desta forma, "desenvolver resistência" significa, na verdade, aumentar a população dos insetos que são naturalmente resistentes ao pesticida.

Nas últimas décadas, pesquisas em agroquímicos resultaram na descoberta de uma nova classe de substâncias que mimetizam a ação de dois hormônios envolvidos no desenvolvimento e reprodução de insetos, o sesquiterpenóide hormônio juvenil (HJ) e o

ecdisteróide 20-hidroiecdisona (20E, ecdisona, hormônio de muda) (Fig. 3) [CASIDA & QUISTAD, 1998].



20-hidroiecdisona (20E)



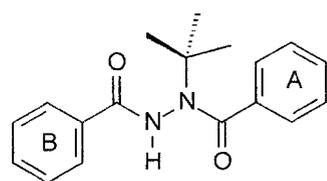
Hormônio Juvenil

HJ0: R1=Et, R2=Et, R3=Et

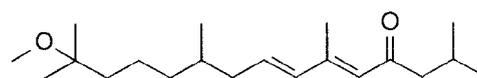
HJ1: R1=Et, R2=Et, R3=Me

HJ2: R1=Et, R2=Me, R3=Me

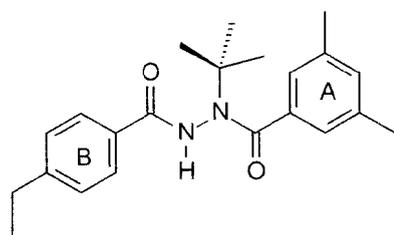
HJ3: R1=Me, R2=Me, R3=Me



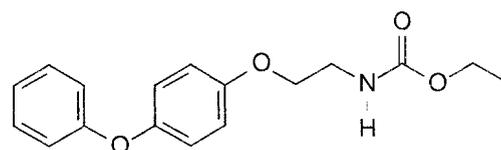
RH-5849



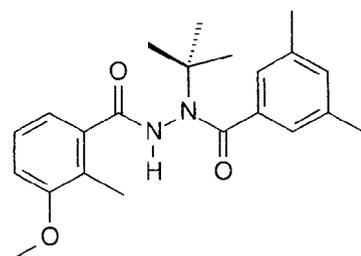
Metopreno



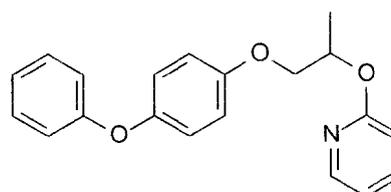
RH-5992 (tebufenozide)



Fenoxicarbe



RH-2485 (metoxifenozide)



Piriproxifen

Figura 3. Estruturas moleculares de hormônios de insetos e alguns de seus agonistas sintéticos.

Estes agroquímicos, denominados IGRs (Insect Growth Regulators, Reguladores de Crescimento de Insetos) apresentam baixa toxicidade para mamíferos e animais superiores, destacando-se o metopreno, agonista do receptor do HJ, e as dibenzoilidrazinas RH-5992 (tebufenozide) e RH-2485 (metoxifenozide), que mimetizam a ação do 20E (Fig.3) [CASIDA & QUISTAD, 1998]. A atividade destes pesticidas está associada com a interação com os receptores de hormônios específicos dos insetos, atuando, neste caso, na fase de desenvolvimento (muda) do inseto, sendo

pouco tóxicos para o inseto adulto. Uma outra característica de grande importância é o limitado espectro de ação de alguns destes pesticidas, sendo seletivos para determinadas espécies de inseto. Por exemplo, o metopreno apresenta toxicidade para coleópteros e lepidópteros, enquanto o RH-5992 é seletivamente tóxico para lepidópteros. Tais propriedades deram a estas substâncias a denominação de inseticidas seguros, de perfil ecotoxicológico benigno [DHADIALLA et al., 1998].

WILLIAMS (1967) chegou a propor que não poderia ocorrer resistência para substâncias inseticidas com ação hormonal, uma vez que se tratava de moléculas que mimetizariam o próprio hormônio. No entanto, parece que esta premissa não tem se mostrada verdadeira. Diferentes pesticidas com ação hormonal têm se revelado menos efetivos. Por exemplo, mutantes de *Drosophila melanogaster* têm apresentado resistência ao metopreno [WILSON & FABIAN, 1986]. Foi observada, originalmente no Sudoeste da França, perda na eficiência de RH-5992 para *Cidia pomonella*, amplificada pela resistência ao inibidor de síntese de quitina, diflubenzuron [SAUPHANOR & BOUVIER, 1995]. Entretanto, deve-se destacar que em outro estudo envolvendo a mesma espécie, que apresentava resistência à benzoilfeniluréia, um outro inibidor da síntese de quitina, não foi observada perda da susceptibilidade ao tebufenozide. [REGIROLI & MANARES1, 1997].

Apesar de ser inevitável que insetos "desenvolvam" resistência a quaisquer novos inseticidas, particularmente quando está envolvido um abuso da utilização dos mesmos, a resistência aos análogos do HJ e às dibenzoilidrazinas ainda demorarão a ser evidenciadas em programas de manejo. Adernais, RH-5992 e RH-2485 mostram-se bem ajustados à resistência e ao programa de manejo de pragas, além de apresentar alto nível de segurança para predadores e espécies parasitas dos insetos. Todavia, a ocorrência de resistência aos IGRs, em alguns casos, mostra a necessidade de uma compreensão mais detalhada do mecanismo de interação entre esses pesticidas e seus alvos biológicos.

1.2. A Regulação Endócrina do Crescimento e Desenvolvimento do Inseto

O desenvolvimento do inseto até a fase adulta ocorre através de mudas sucessivas que varia em função da espécie. O desenvolvimento pode se dar através da metamorfose gradual ou incompleta (desenvolvimento hemimetábolo), metamorfose completa (desenvolvimento holometábolo) e hipermetamorfose, quando ocorrem dois ou mais hábitos larvais e estruturais diferentes.

Na metamorfose incompleta ou gradual todos os estágios imaturos da eclosão ao adulto são semelhantes, diferenciando-se apenas pelo tamanho, maturidade sexual e, em alguns casos, as asas. São exemplos, os gafanhotos, as baratas, as cigarras e os percevejos (hemípteros) (Fig. 4A).

A metamorfose completa consiste em três estágios distintos (Fig. 4B). O estágio larval recém eclodido, que não tem asas, é exemplificado pela lagarta das borboletas, a larva das moscas e larva dos besouros. É um estágio ativo que se alimenta, embora o alimento seja geralmente muito diferente daquele do adulto. Em algumas espécies, larvas e adultos têm tipos diferentes de peças bucais. Por exemplo, as lagartas têm peças bucais mastigadoras, enquanto as borboletas têm peças bucais sugadoras.

No final do período larval, o jovem não se alimenta mais e torna-se quiescente. Esse estágio é chamado de pupa e é geralmente depositado em localizações protetoras (tais como o solo, um casulo ou tecidos vegetais). Durante a pupação, estruturas adultas se desenvolvem a partir de rudimentos embrionários (discos e brotos imaginiais) e, exceto nos neurópteros e nos besouros, estruturas larvais são mantidas no estágio adulto.

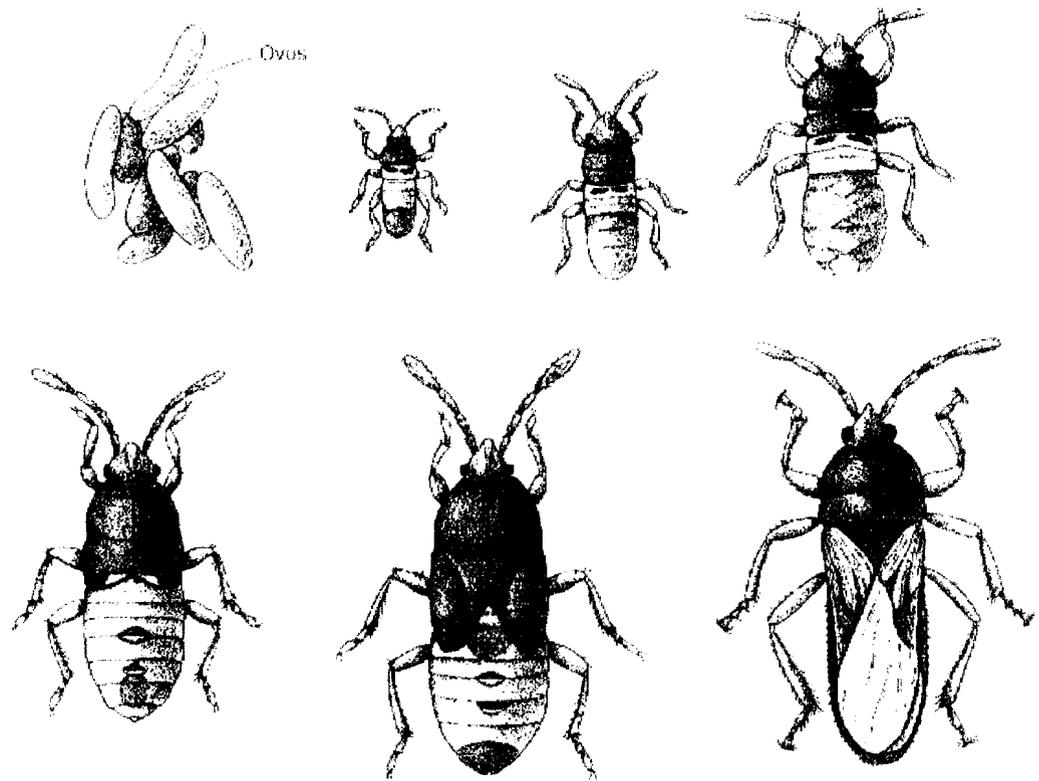


Figura 4A. Estágios da metamorfose gradual ou incompleta de um percevejo (Segundo ROSS, H. H. 1965, in: RUPPERT & BARNES, 1996).

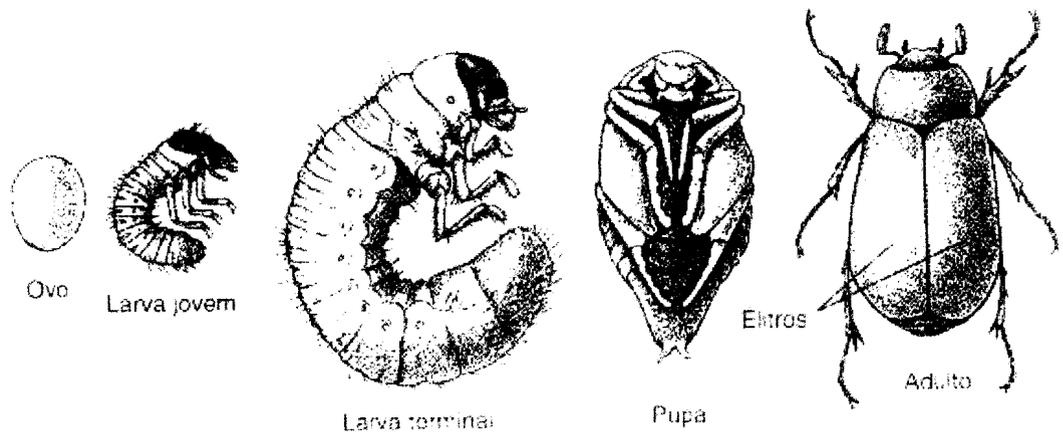


Figura 4B. Estágios da metamorfose completa de um besouro (Segundo ROSS, H. H. 1965, in: RUPPERT & BARNES, 1996).

O desenvolvimento holometábolo teve uma grande importância adaptativa na evolução das ordens superiores de insetos, pois as larvas podem utilizar diferentes fontes de alimentos, habitat e estilo de vida em relação aos adultos. Das 26 ordens de insetos vivos, 9 têm desenvolvimento holometábolo, mas essas 9 incluem cerca de 80% das espécies [RUPPERT & BARNES, 1996].

A transformação dos insetos imaturos em adultos reprodutivos ocorre através de controle endócrino. Uma secreção hormonal proveniente do cérebro estimula uma glândula no pró-tórax (glândula pró-torácica que produz o 20E). Durante os estágios larvais, os corpos alados do cérebro secretam o hormônio juvenil. Esse hormônio é responsável pela manutenção das estruturas larvais e inibe a metamorfose. O HJ pode exercer o seu efeito somente após o processo de muda ter sido iniciado. Ele, conseqüentemente, deve agir em conjunto com 20E. Quando o HJ se encontra presente em nível relativamente alto na hemolinfa do inseto, o resultado é uma muda de larva para larva. Quando o nível de HJ se encontra mais baixo, a muda é de larva para pupa, e na ausência do HJ, ocorre uma muda de pupa para adulto [RUPPERT & BARNES, 1996].

No momento em que a concentração de HJ diminui, aumenta a concentração de 20E na hemolinfa, iniciado o processo de muda de larva para pupa. Neste momento, a larva pára de se alimentar. Com o aumento da concentração de 20E, a epiderme é separada da cutícula velha (apólise) e forma-se o espaço ecdisal, constituído por um fluido de muda que contém enzimas quitinolíticas inativas. Este fluido será utilizado mais tarde para a digestão da endocutícula. Provisoriamente, as células da epiderme reorganizam-se para síntese de proteínas e da nova cutícula. Assim que a concentração de 20E decai, as enzimas do fluido de muda são ativadas, agindo somente na endocutícula, que em geral é completamente degradada; a exocutícula e a epicutícula não são afetadas e formam a exúvia (carapaça externa), que é descartada a cada muda. Após este processo, o fluido de muda é totalmente reabsorvido e, finalmente, quando a concentração de 20E decai ao nível basal, a cutícula velha é expulsa através do rompimento do velho tegumento ao longo de uma linha, a linha da ecdise, colocada ao longo do dorso do inseto, onde a cutícula solta-se mais rapidamente por ocasião da muda e a nova cutícula toma o seu lugar [REYNOLDS, 1987].

1.2.1. Base molecular de ação do 20E

Estudos recentes indicam que o alvo molecular de ação de 20E consiste de duas proteínas, o receptor do ecdisteróide (EcR) e a proteína *ultraspiracle* (USP) [YAO et al., 1993; WANG et al., 1998]. EcR e USP são membros da superfamília de receptores nucleares (RNs), que incluem, entre outros, o receptor do hormônio da tiróide, o receptor da vitamina D e o receptor do ácido retinóico [EVANS, 1988]. O esquema a seguir (Fig. 5) representa o modo de ação molecular de 20E. USP, uma proteína homóloga ao receptor de ácido retinóico, heterodimeriza com o receptor de ecdisteróide para formar um complexo funcional que vai mediar o efeito do hormônio 20E pela ativação do seu gene de expressão (EcRE). O complexo EcR/USP possui transcrição suprimida na ausência do ligante [CHERBAS et al., 1991].

Os RNs agem como fatores de transcrição, fazendo a mediação entre o hormônio e o gene de expressão através da dimerização com um segundo receptor nuclear, onde, a ligação do dímero com o gene de expressão ocorre apenas na presença do ligante [GRONEMEYER & LAUDET, 1995].

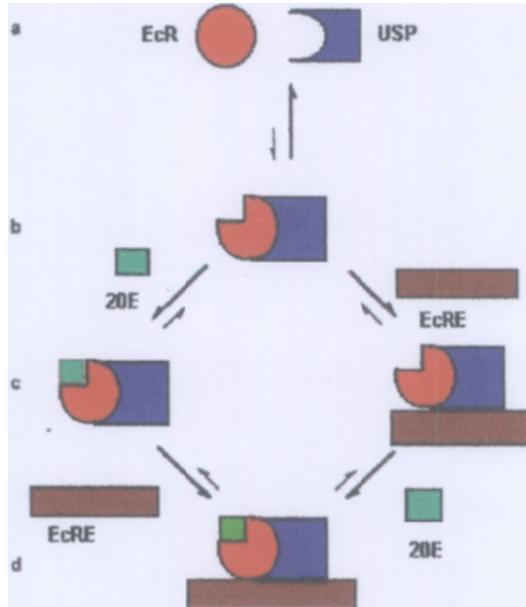


Figura 5. Esquema representativo do modo de ação molecular do hormônio 20E: a) as subunidades EcR e USP estão em equilíbrio com o heterodímero instável EcR/USP; b) a interação entre EcR e USP aumenta a afinidade de ligação de 20E com o receptor c) a ligação do ligante e/ou DNA (EcRE) ao complexo EcR/USP favorece a formação de um novo complexo EcR/USP estável e d) que traduz a codificação genética [CHERBAS et al., 1991].

1.2.2. Agonistas e antagonistas do receptor do hormônio 20-hidroxicdisona (20E)

1.2.2.1. Antagonistas esteroidais do receptor de 20E

Os agonistas e antagonistas de receptores de hormônios são ferramentas poderosas para a compreensão da ação molecular do hormônio. Antagonistas dos receptores de hormônios estrogênio, androgênio, progesterona e glicocorticóide foram identificados [HENDERSON et al., 1993; PARCZYK et al., 1996]. Para o ecdisteróide 20E, existem mais de 150 análogos estruturais de ação agonista, na forma de fitoecdisteróides, isolados de diferentes espécies de plantas [DINAN, 1995].

DINAN e colaboradores (1997) identificaram através de um programa de varredura, no qual foram utilizados extratos de diferentes plantas com potente atividade ecdisteroidal, substâncias antagonistas do receptor de 20E. As cucurbitacinas (Fig. 6), triterpenóides extraídos de *Iberis umbellata*, foram reportadas como sendo os primeiros antagonistas de receptor de 20E, agindo no receptor do ecdisteróide [DINAN et al., 1997].

Na comparação da atividade biológica das cucurbitacinas I a IV foi possível verificar que a presença ou ausência da dupla ligação Δ^1 não afeta, significativamente, a atividade antagonista, enquanto que a presença do grupo acetila em C-25 (I e III) aumentou a atividade. Por outro lado, VIII, que possui um grupo acetila em C-25, apresenta baixa atividade. No entanto, os grupos funcionais no anel A de VII e de VIII são diferentes dos de I e IV, o que levou à conclusão de que interações envolvidas nos extremos da molécula são de grande importância para a atividade antagonista [DINAN et al., 1997].

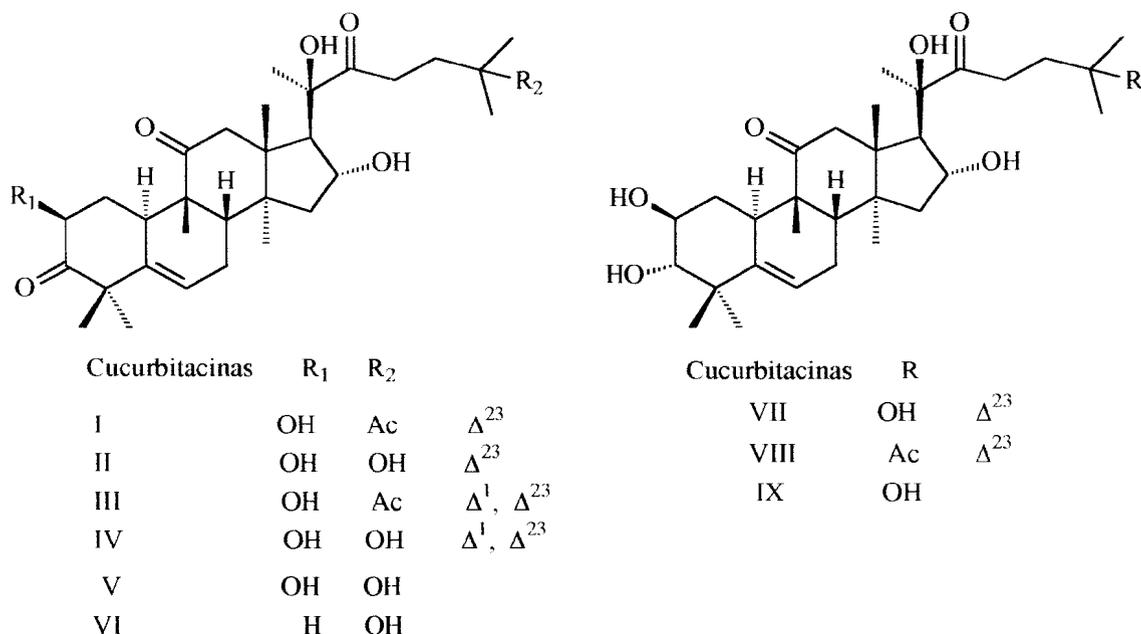


Figura 6. Cucurbitacinas com ação antagonista no receptor de 20E.

As estruturas de 20E e cucurbitacina II (Fig. 7) revelaram considerável sobreposição nas regiões dos anéis C e D quando os átomos que compõem estes anéis foram comparados através de suas sobreposições [DINAN et al., 1997].

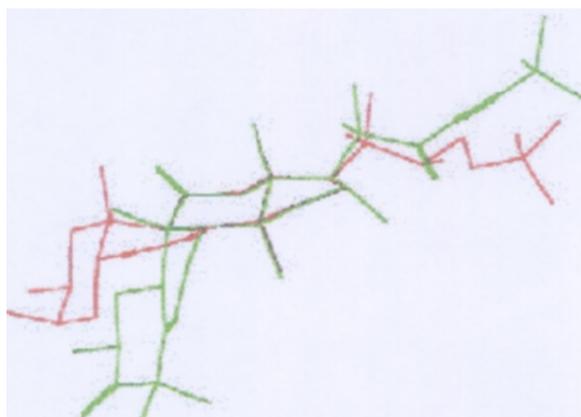


Figura 7. Sobreposição das estruturas de 20E (vermelho) e Cucurbitacina II (verde) [DINAN et al., 1997].

1.2.2.2. Agonistas não esteroidais do receptor de 20E: Dibenzoilidrazinas (DBHs)

O primeiro agonista não esteroidal sintético do receptor de ecdisteróide 20E foi a DBH RH-5849 (Fig 3). Subseqüentes modificações estruturais desta substância levaram ao desenvolvimento de novos análogos potentes. Destacam-se o RH5992 (tebufenozide) e o RH-2485 (metoxifenozide), comercializados com os nomes de Mimic e Intrepid, respectivamente (Fig 3) [DHADIALLA et al., 1998].

Foi verificado que RH-5992 induziu a muda precoce em todas as larvas de lepidópteros testadas, incluindo *Manduca sexta* e *Choristoneura fumiferana*. De modo

similar a 20E, Rtt-5992 induz o RNAm do receptor de hormônio 3 de *Manduca sexta* (MHR3), e suprime a proteína da cutícula de larva de 14 kDa (LCP-14), transcrita no quarto nível do DNA da epiderme de *M. sexta*, em cultura *in vitro*. O MHR3 é uma proteína que se liga ao DNA e que aparece na epiderme somente durante a muda, sendo um membro da superfamília de receptores de hormônios esteróides. O gene de MHR3 é diretamente induzido por 20-hidroxiecdisona (20E). Por sua vez, o gene de LCP-14 é expresso somente durante a fase de crescimento intermuda e é suprimido por uma proteína induzida por 20E durante a muda. Verificou-se também que a enzima DOPA descarboxilase (DDC), requerida na epiderme para a produção de dopamina, é um precursor importante para a esclerotização e o fim do processo da muda. Estes mecanismos foram observados tanto com RH-5992 como com 20E, *in vivo* e *in vitro*. No entanto, o análogo não esteroidal é dez vezes mais ativo que o hormônio natural e persiste na epiderme mais do que 20E, impedindo a conclusão da muda [RETNAKARAN et al., 1995].

Quando larvas de lepidópteros são tratadas com RH-5849 ou RH-5992 (tebufenozide), geralmente param de se alimentar e, após 4-16 horas, iniciam o processo de muda [RETNAKARAN et al., 1997; SMAGGHE et al., 1996; TATEISHI et al., 1993]. No entanto, a presença efetiva destes agonistas de 20E na hemolinfa do inseto impede o rompimento (ecdise) da carapaça externa, que ocorre somente quando a concentração de 20E decai ao nível basal [RETNAKARAN et al., 1995].

Efeitos degenerativos do tebufenozide na formação da nova cutícula foram observados em insetos da ordem dos lepidópteros [RETNAKARAN et al., 1997; SMAGGHE et al., 1996]. TATEISHI e colaboradores observaram que RH-5849 também induz a formação de uma dupla cutícula, que significa uma tentativa para promover a muda. Entretanto, a cutícula formada com RH-5849 é mais fina do que a induzida por 20E [TATEISHI et al., 1993].

Além do efeito larvicida, RH-5849 e RH-5992 têm também causado a redução da produção de ovos em vários insetos da ordem dos lepidópteros, coleópteros e dípteros [MONTHEAN & POTTER, 1992; SMAGGHE & DEGHEELE, 1994; WING & STAWECKI, 1988]. No entanto, RH-5992 e RH-2485 possuem um alto grau de toxidez seletiva para lepidópteros, sendo RH-2485 significativamente mais ativo do que RH-5992, agindo contra uma larga faixa de lepidópteros, pragas de algodão [ISHAAYA et al., 1995], milho e outros [TRISYONO & CHIPPENDALE, 1997].

Parece paradoxal a alta especificidade destas dibenzoilidrazinas, uma vez que muitos insetos utilizam o 20E como o hormônio de muda. Isto sugere que a atividade seletiva pode ser atribuída às diferenças no sítio ativo, ou seja, no domínio de interação com o ligante (DIL) dos EcRs. Selado assim é provável que outros agonistas de 20E possam ser produzidos para outros alvos, ou seja, outras ordens de insetos.

1.3. Relações Estrutura-Atividade

Estudos da relação entre a estrutura química e a atividade ("structure activity relationship", SAR) vêm sendo desenvolvidos para a avaliação das características essenciais para a atividade dos ecdisteróides e das DBHs.

1.3.1. Relações estrutura-afividade para os ecdisteróides

Embora os ecdisteróides não tenham propriedades biológicas, físicas e químicas necessárias para tornarem-se um agente efetivo no controle de pragas, análises de relações estrutura-atividade para ligantes naturais do receptor, em geral ecdisteróides, podem facilitar a identificação de agonistas e antagonistas viáveis para a comercialização [HARMATHA et al., 2002].

HARMATHA & DINAN (1997) compararam a atividade biológica de mais de 20 ecdisteróides naturais e quimicamente modificados (Fig. 8), cuja potência pode ser justificada pela interação do ligante ao DIL do receptor de ecdisteróide de *D. melanogaster*. Estes resultados contribuíram para a avaliação da hipótese de que o grupo hidroxila em C14 é fundamental para a atividade dos ecdisteróide [BERGAMASCO & HORN, 1980].

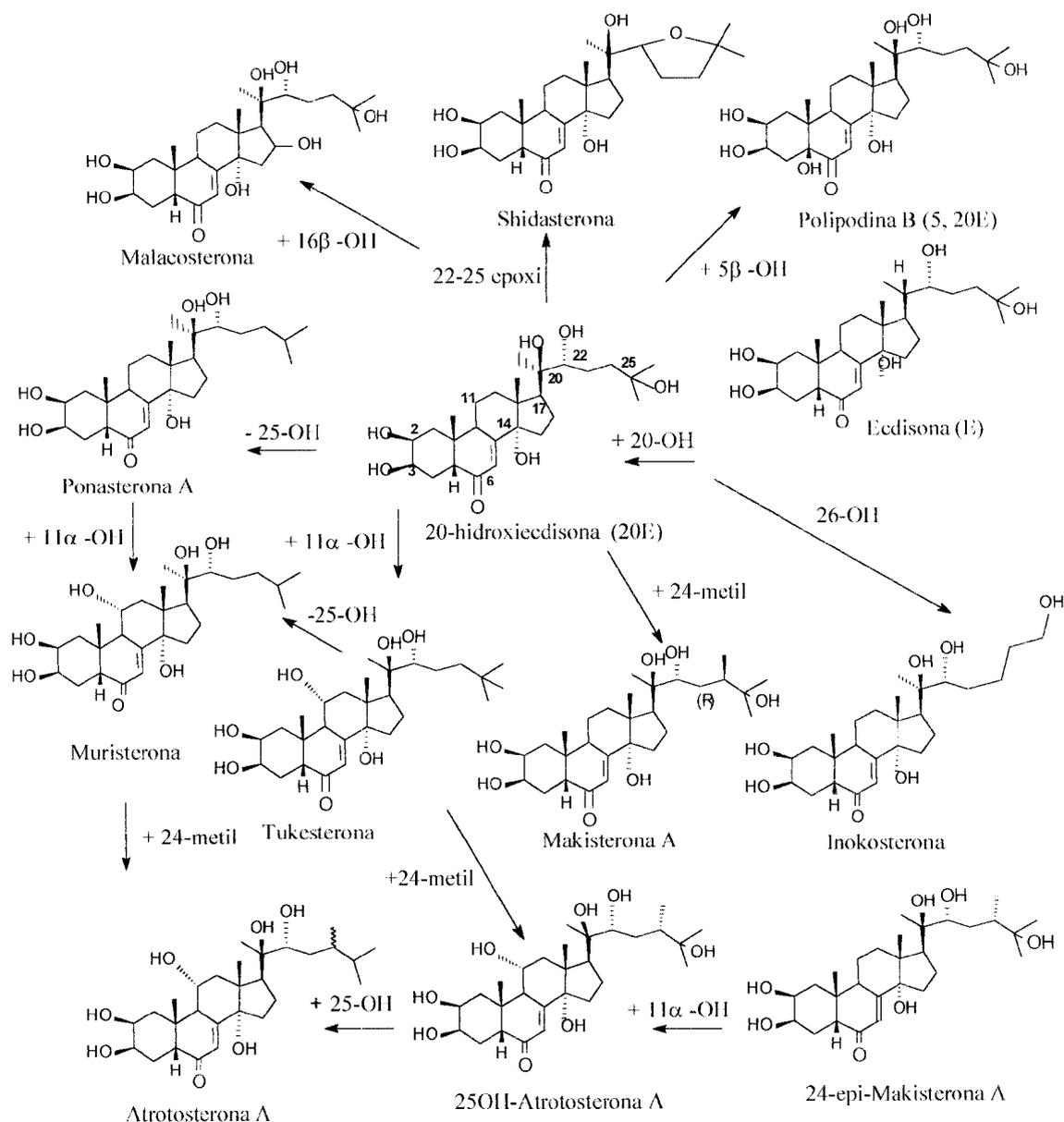


Figura 8. Estruturas dos derivados de 20E e suas atividades biológicas. Os valores de pIC_{50} (destacados em vermelho) baseia-se em ensaios com *D. melanogaster* [HARMATHA & DINAN, 1997].

No entanto, em um estudo recente, HARMATHA e colaboradores (2002) conseguiram sintetizar outros derivados de 20E, variando os substituintes em C14. Verificou-se que a inversão da hidroxila em C14 da posição α para a posição β diminui a atividade ecdisteroidal em 22.700 vezes. Entretanto, a substituição de α OH para α H em C14 (14 α H) não afeta de forma significativa a atividade. Por outro lado, o epímero 14 β H é 38 vezes menos ativo que o epímero 14 α H.

Isto significa que a relação entre os anéis C/D é mais importante do que a presença da 14-OH, que naturalmente apresenta-se na configuração, conforme o ecdisteróide 20E [BERGAMASCO & HORN, 1980]. Nos ecdisteróides onde os substituintes em C14 (-H, -OH ou -OOH) estão na posição, a junção entre os anéis C/D é *trans*.

Quando a configuração em C14 é *b* (-H ou -OH), a junção entre os anéis C/D é *cis*. Desta forma parece que a junção C/D *trans* é tão importante quanto a junção *cis* entre os anéis A/B para a atividade biológica dos ecdisteróides [HARMATHA et al., 2002].

BERGAMASCO & HORN (1980) também relataram que um outro requisito essencial para a atividade de muda dos ecdisteróides é a hidroxila em C22, na configuração R. Esta hipótese foi justificada pela ausência de atividade do epímero de 20E, o 22-S-hidroxil-20-ecdisteróide, frente a *Caliphora sp* [DINAN et al., 1999]. No entanto, recentemente, SUKSAMRARN e colaboradores (2002) verificaram que o grupamento hidroxila livre em C22 não é essencial para que um ecdisteróide apresente alta atividade de muda. A atividade de 22-O-ecdisteróide substituído pode ser equivalente ou maior do que 20E, desde que o substituinte apresente um grupo funcional que possa aumentar a atividade biológica, tal como foi verificado para os compostos 1 e 2 da Figura 9, que apresentam valores de EC50 iguais a $7,6 \times 10^{-6}$ M e $5,8 \times 10^{-6}$ M, respectivamente, enquanto que o de 20E é $1,6 \times 10^{-5}$ M. Os resultados também revelaram que a atividade não é sensível a fatores estéricos para a posição 22 [SUKSAMRARN et al., 2002].

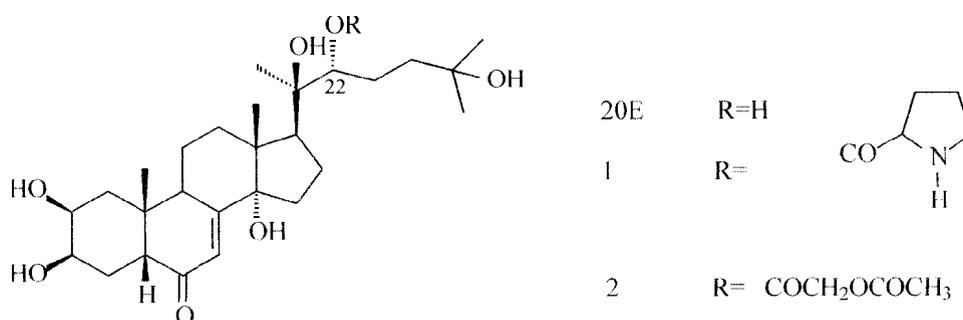
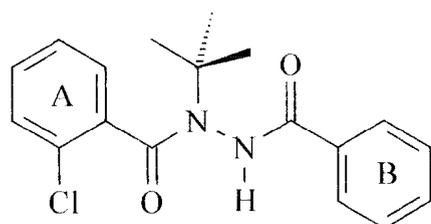


Figura 9. Estrutura do ecdisteróide 20E e de derivados sintéticos com grupamentos substituintes, ligados a 22-O [SUKSAMRARN et al., 2002].

1.3.2. Relações estrutura-atividade para as DBHs

Variações na substituição dos anéis A e B das DBHs (Fig. 10) mostraram que a atividade hormonal de muda para *Chilo suppressalis* aumenta com a hidrofobicidade da molécula e diminui com a introdução de substituintes volumosos no anel A e B. [OIKAWA et al., 1994a; NAKAGAWA et al., 19951].



Yn	pLD ₅₀	Yn	pLD ₅₀
H	6,37	2-F	5,62
4-F	6,22	2-Cl	6,05
4-Cl	5,88	2-Br	4,98
4-BR	6,18	2-I	4,97
4-I	6,38	2-CF ₃	5,51
4-CF ₃	6,19	2-NO ₂	4,86
4-CN	4,82	2-Ph	4,32
4-NO ₂	5,29	2-OMe	4,64
4-Me	6,22	2-SMe	4,74
4-Et	6,36	2,3-Cl ₂	6,23
4-n-Pr	5,44	2,4-Cl ₂	6,09
4-i-Pr	6,16	2,5-Cl ₂	4,90
4-Ph	5,55	2,6-Cl ₂	4,54
4-OMe	5,65	3,4-Cl ₂	5,97
3-F	6,43	3,5-Cl ₂	5,49
3-Br	5,92	2,3-Me ₂	6,11
3-I	5,25	2,4-Me ₂	6,04
3-CF ₃	5,59	2,5-Me ₂	4,75
3-CN	4,95	3,4-Me ₂	5,61
3-NO ₂	4,86	3,5-Me ₂	5,52
3-OMe	5,36		

Figura 10 Série de DBHs estudada por OIKAWA et al., 1994a; NAKAGAWA et al., 1995 e SMAGGHE et al., 1999.

Na série estudada, mameve-se o cloro na posição *orto* do anel A da DBH devido a sua característica hidrofóbica e retiradora de elétrons, que, conforme estudos de QSAR, aumentam a atividade biológica das DBHs [OIKAWA et al., 1994; NAKAGAWA et al., 1995], e variou-se os substituintes no anel B. Os resultados revelaram que substituição do anel B em *para* é mais efetiva para grupos pouco hidrofóbicos e não volumosos. O efeito estético de substituintes nas posições *meta* e *para* não foi verificado para os compostos 2,3 e 2,4 di-substituídos. Entretanto, o efeito estérico foi expressivo para os compostos 2,5, 2,6, 3,4 e 3,5 di-substituídos [SMAGGHE et al., 1999].

Resultados de QSAR 3D (Quantitative Structure-Activity Relationship 3D, Relação Quantitativa entre a Estrutura Tridimensional e a Atividade), utilizando CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis, Análise Comparativa dos Campos Moleculares) sugerem que o anel B das DBHs se sobrepõe com a cadeia lateral alquílica, equivalente à posição 17 de 20E (Fig. 11) [SHIMIZU et al., 1997].

SHIMIZU e colaboradores (1997) observaram que a substituição do anel B de RH-5992 (Fig. 3) por grupos alquílicos não afeta de forma significativa a atividade biológica. No entanto, a substituição do anel B resulta em um decréscimo na atividade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estes resultados levaram os autores a sugerirem que o grupo alquílico das novas benzoilidrazinas tem papel similar ao grupamento alquílico da cadeia lateral de 20E (Fig. 11), justificando assim a potente atividade das estruturas testadas. Por exemplo, o valor de pEC₅₀ para 3 (Fig. 11) é 8,05, significativamente próximo ao valor de RH-5992, que é igual a 8,94 [SHIMIZU et al., 1997].

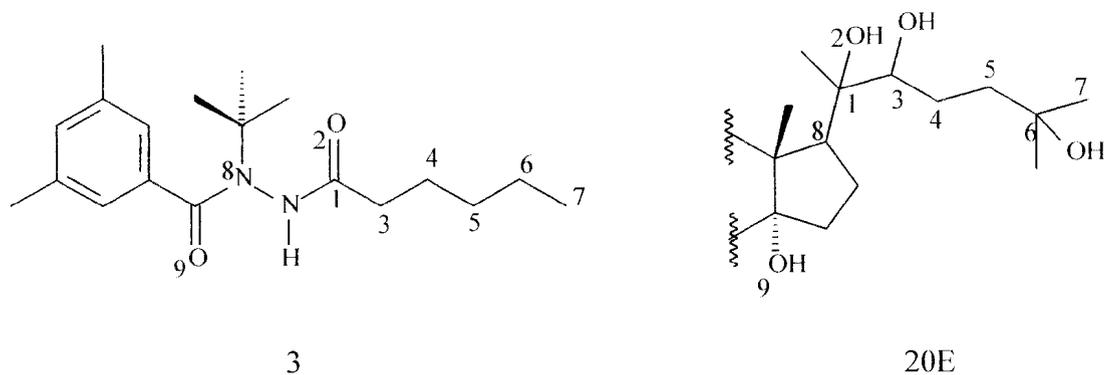


Figura 11. Esquema para comparação dos composto 3 e 20E [SHIMIZU et al., 1997]

SMAGGHE e colaboradores (1999) relataram a toxidez de uma série de DBHs, (Fig. 10) contra o lepidóptero *Apodoptera exigua* no estágio larval [SMAGGHE et al., 1996]. O estudo revelou também que estes agonistas apresentam comportamento similar para o lepidóptero *Chilo suppressalis* [OIKAWA et al., 1994a], com uma correlação entre os valores de pLD50 para as duas espécies igual a 0,92.

1.4. Os Receptores Nucleares (RNs)

Na produção de uma resposta biológica, uma substância química pode reagir ou interagir com uma biomacromolécula semi-rígida. Esta biomacromolécula pode ser uma enzima ou um receptor.

EHREMPREIS definiu receptor como um componente com as seguintes características [GEARIEN in FOYE, 1988]:

1. Receptor é uma biomacromolécula constituída por um sítio que contém propriedades quimicamente reconhecidas por uma substância específica;
2. A especificidade deste sítio por uma molécula endógena particular, agonista natural, é determinada geneticamente, tendo o receptor uma função geneticamente determinada;
3. A ligação com o agonista (molécula endógena ou um xenobiótico) causa perturbações específicas através de variações no estado do receptor ou em sua circunvizinhança, ou ambos, promovendo estímulos que darão origem a uma cadeia de eventos com o propósito de produzir uma resposta;
4. A iniciação da resposta pela ligação ao sítio do receptor não envolve quebra ou formação de ligações covalentes com o ligante, diferente do que ocorre na interação substrato/enzima. No entanto, muitas interações previstas entre ligantes e receptores podem também ser aplicadas para interação substrato/enzima.
5. O receptor é constituído por um sítio ativo, onde alguns aminoácidos específicos, quer seja através de suas cadeias laterais, quer seja através de suas ligações peptídicas, interagem com o ligante.

Os RNs compreendem uma grande família de reguladores de transcrição que possuem regiões altamente conservadas, como o domínio de interação com o DNA (DID), e regiões moderadamente conservadas, como o domínio de interação com o ligante (DIL)(Fig. 12). [EVANS, 1988]

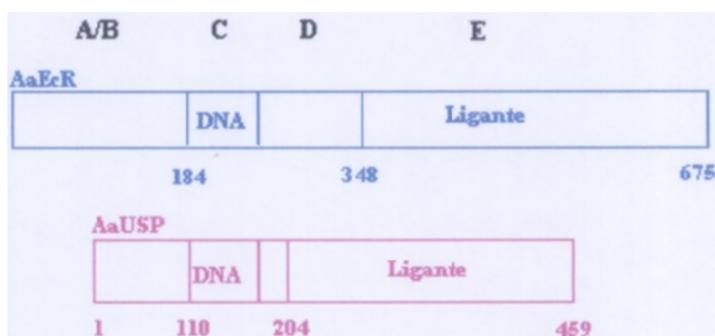


Figura 12. Esquema de representação dos RNs. A região C, próxima ao N-terminal, corresponde ao Domínio de Interação com o DNA (DID) enquanto que a região E, próxima ao C-terminal, corresponde ao Domínio de Interação com o Ligante (DIL), conforme a nomenclatura de Krust e colaboradores [KRUST et al., 1986]

Através de varreduras do genoma de *D. melanogaster*, o EcR foi identificado como possível membro da grande família de receptores nucleares [KOELLE et al., 1991]. O processo envolveu a comparação da seqüência de aminoácidos da proteína predita como EcR com a seqüência de membros da grande família de RNs e revelou que o EcR forma com estas proteínas dois domínios conservados, característicos dos RNs [EVANS, 1988; GREEN & CHAMBON, 1988].

A Figura 13 apresenta o alinhamento do EcR *D. Melanogaster* com demais membros representativos da grande família de RNs. A região correspondente ao DID encontra-se no quadro A da Figura, enquanto que a região correspondente ao DIL encontra-se no quadro C da Figura.

Os receptores foram divididos em três subfamílias. O EcR está inserido na subfamília que inclui o receptor do hormônio humano da tiróide (hTR β), o receptor humano da vitamina D (hVDR), E75A (proteína envolvida na metamorfose do inseto), o receptor humano de ácido retinóico (hRAR α), hear-1 (proteína humana relatada por erbA) e uma proteína de rato (mPPAR).

A região correspondente ao DID é formada por 66-68 aminoácidos, contendo 2 íons de zinco, formando duas estruturas parecidas com dedos (zinc finger), de grande importância na interação com o DNA [GREEN & CHAMBON, 1987; FREEDMAN et al., 1988]. Este domínio também é envolvido na dimerização do receptor [KUMAR & CHAMBON, 1988]. Todos os resíduos dos 19 membros da grande família de RNs conservados na região do DID, são também conservados no EcR.

Figura 13. Comparação das seqüências das regiões conservadas DID e DIL do EcR e de alguns membros representativos da grande família de receptores nucleares.

(A) Alinhamento da região do DID. Números à esquerda indicam a posição dos aminoácidos em relação às outras seqüências. Os pontos pretos indicam as três posições importantes que determinam a ligação ao DNA, especificando este domínio. (B) Percentual de identidade entre as seqüências correspondentes a região C (esquerda abaixo) e a região E (direita acima). (C) Alinhamento da região do DIL. As linhas horizontais indicam três áreas altamente conservadas deste domínio. A cor amarela, verde e azul, à esquerda, enfatiza a divisão dos receptores homólogos em três subfamílias. Nas colunas do alinhamento, os aminoácidos idênticos são mostrados na mesma cor. A cor magenta foi utilizada para os aminoácidos que são conservados em mais de uma subfamília.

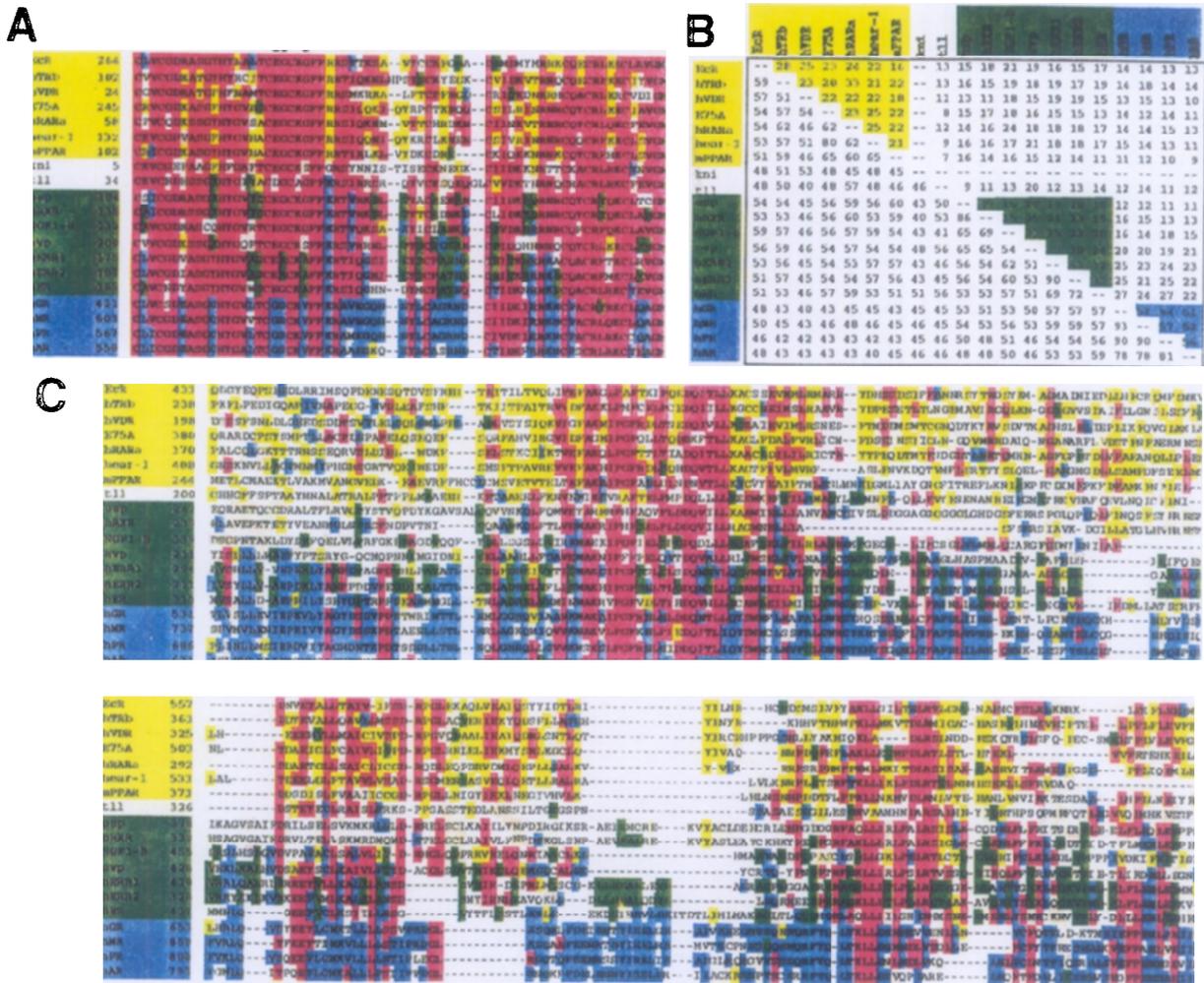


Figura 13. As seqüências mostradas são: EcR [KOELLE et al., 1991]; hTR β [WEINBERGER et al., 1986]; hVRD [BAKER et al., 1988]; E75A (proteína de *D. melanogaster*) [SEGRAVES & HOGNESS, 1990]; hRARA [GIGUERE et al., 1987]; hear-1 (proteína humana) [MIYAJIMA et al., 1989]; mPPAR [ISSEMAN & GREEN, 1990]; kni (proteína de *Drosophila knirps*) [NAUBER et al., 1988]; tll (proteína de *Drosophila tailles*) [PIGONI et al., 1990]; usp, (proteína *ultraspiracle* de *D. melanogaster*) [ORO et al., 1990]; hRXR (receptor de ácido retinóico) [MANGELSDORF et al., 1990]; NGFI-B (fator de crescimento de ratos) [MILBRANDT, 1988]; svp (proteína *seven-up* de *D. melanogaster*) [MLODZIK et al., 1986]; hERR1 e hERR2 [GIGUERE et al., 1988]; hER (receptor de estrogênio) [GREEN et al., 1986]; hGR (receptor de glicocorticóide) [HOLLENBERG et al., 1986]; hMR (receptor de mineralocorticóide) [ARRIZA et al., 1987]; hPR (receptor de progesterona) [MISRAHI et al., 1987]; hRA (receptor de androgênio) [LUBAHN et al., 1988].

O quadro B da Figura 13 mostra que, na comparação da seqüência de aminoácidos do EcR de *D. melanogaster* com cada um dos outros RNs, a identidade entre os aminoácidos é maior na região C do que na região E.

Estudos com o receptor de glicocorticóide, o receptor de estrogênio e o receptor do hormônio da tiróide identificaram três resíduos na região de DID (destacados na Figura 13, quadro A, com pontos pretos) que são determinantes na diferenciação da ligação destes receptores com o DNA específico. [DANIELSEN et al., 1989; MADER et al., 1989; UMESONO & EVANS, 1989]. As proteínas E75 e EcR de *D. melanogaster*, tal como o hRAR α , hTR β e o hVDR, têm estes três aminoácidos conservados nas mesmas posições [SCHÜLLE et al., 1990; UMESONO et al., 1988]. Sendo assim, é consenso que o EcRE (gene de expressão de EcR) é similar ao gene de expressão da vitamina D, do ácido retinóico e do hormônio da tiróide [CHLRBAS et al., 1991].

A região do DIL (Quadro C da Figura 13) possui aproximadamente 225 aminoácidos que funcionam como domínio de interação com o hormônio nos vertebrados [EVANS, 1988; GREEN & CHAMBON, 1988]. Este domínio também é importante na dimerização do receptor. [GUIOCHON-MANTEL et al., 1989; GLASS et al., 1989].

Três regiões altamente conservadas na região do DIL são destacadas com uma linha cheia (segmento de teta) no Quadro C da Figura 13. Cada segmento possui um grupo de resíduos conservados em todas ou quase todas as seqüências dos receptores. O EcR de *D. melanogaster* mostra, nestas regiões, alta similaridade com as proteínas membros da grande família de RNs e uma baixa similaridade com as outras proteínas de *D. melanogaster*. A conservação dos resíduos nestas regiões sugerem que EcR funciona como um receptor de hormônio, diferenciando-se das outras proteínas identificadas no inseto, que mostram similaridade na região do DID, mas não na região do DIL. É interessante notar que a região do DIL do EcR é mais similar para o receptor do hormônio da tiróide (hTR β).

Já foram identificadas as seqüências do EcR de algumas espécies de insetos da ordem Díptera, Lepidóptera, Coleóptera e Ortóptera e de um crustáceo. No entanto, a estrutura tridimensional da proteína ainda não foi determinada experimentalmente. Recentemente, foram propostos dois modelos estruturais do domínio de interação com o ligante (DIL) do EcR de *Chironomus tetans* (ctEcR), construídos a partir do DIL do receptor de ácido retinóico (hRAR α) e da vitamina D (hVDR), através da modelagem por homologia. Após atracamento do 20E e da DBH RH-2485 na cavidade de interação com o ligante (CIL), foi verificado um conjunto de interações que justificam a atividade do agonista sintético [WURTZ et al., 2000].

As seqüências dos domínios de interação com o ligante dos EcRs (EcR-DIL) apresentam boa conservação de identidade entre as diferentes espécies (54% dos resíduos idênticos). Entretanto, a identidade entre as espécies de uma mesma ordem é significativamente maior, por exemplo, entre os dípteros e os lepidópteros esta identidade é igual a 73% e 84%, respectivamente (Fig. 14). A Figura 14 apresenta o alinhamento das seqüências dos DILs de várias espécies [WURTZ et al., 2000].

Figura 14. Alinhamento das seqüências dos domínios de interação com o ligante (DIL) de receptores de Ecdisteróide (EcRs) para insetos da ordem díptero (d), lepidóptero (l), coleóptero (co), ortóptero(o), de um ácaro (t) e de uma crustácea (cr). As seqüências de RAR e VDR para espécie humana, cujas estruturas cristalográficas foram determinadas, também são incluídas. As abreviaturas dos organismos são: aa: *Aedes aegypti* (d) [CHO et al., 1995]; am: *Amblyomma americanum* (t) [GUO et al., 1988]; bm: *Bombyx mori* (l) [SWEVERS et al., 1995]; cc: *Ceratitis capitata* (d); ef: *Choristoneura fumiferana* (l) [KOTHAPALLI et al., 1995]; et: *Chironomus tentans* (d) [IMHOF et al., 1993]; dm: *Drosophila melanogaster* (d) [KOELLE et al., 1991]; hs: *Homo sapiens*; hv: *Heliothis virescens* (l) [JEPSON et al., 1996]; lc: *Lucilia cuprina* (d) [HANNAN & HILL, 1997]; lm: *Lucusta migratoria* (o); ms: *Manduca sexta* (l) [FUJIWARA et al., 1995]; up: *Uca pugilator* (cr) [CHUNG et al., 1998]; sc: *Sarcophaga crassipalpis* (l); tm: *Tenebrio molitor* (co) [MOUILLET et al., 1997]. As cores vermelho e cinza correspondem aos resíduos idênticos ou similares entre todas as seqüências de EcR (os grupos utilizados para resíduos similares são ILVM, FYW, TSCA, RK, DE e QN). Os resíduos idênticos entre todas as seqüências de EcR correspondem à cor verde. As cores azul e amarela indicam os resíduos conservados entre dípteros e lepidópteros, respectivamente.

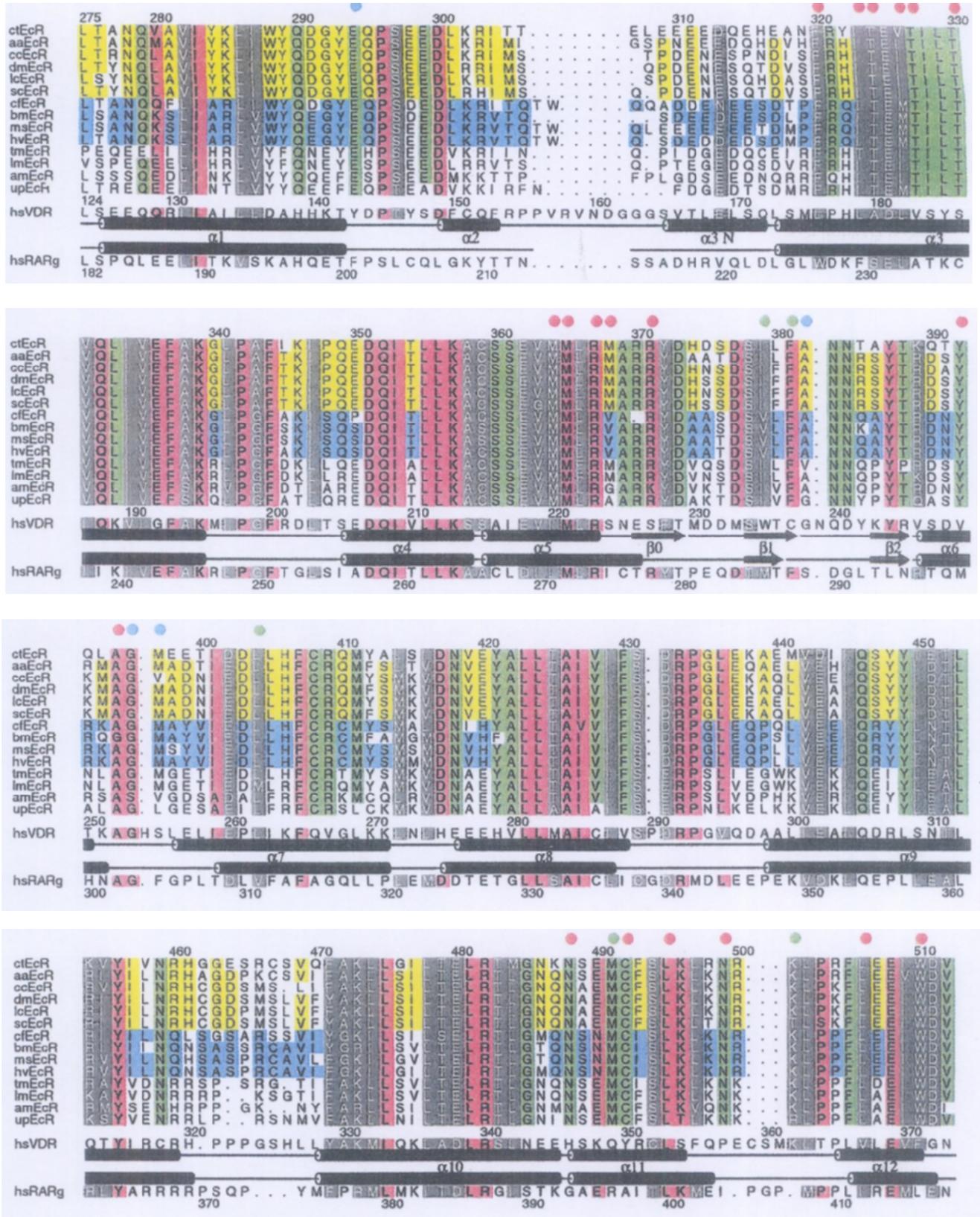


Figura 14. Especificações das abreviaturas na página anterior.

1.4.1. As Forças de Interação Receptor/Ligante

Para conhecer o mecanismo de ação de um ligante é importante compreender as forças de interação que liga o ligante ao receptor, uma vez que a lei de ação das massas não pode, sozinha, estimar a habilidade de pequenas doses de ligantes, estruturalmente específicas, em obter uma resposta pela combinação com tudo, ou praticamente, quase tudo do receptor apropriado

Os cálculos propostos por SILVERMAN (1992), apresentados a seguir, suportam a noção de que alguma coisa a mais que a ação das massas é requerida para descrever a interação ligante-receptor.

"Partindo do princípio de que um mol de um ligante contém $6,02 \times 10^{23}$ moléculas (número de Avogrado) e que a média do peso molecular de um ligante é de 200 g/mol, 1 mg do ligante contém $6,02 \times 10^{23} / 2,00 \times 10^5 = 3 \times 10^{18}$ moléculas de ligante. O organismo humano é composto de cerca de 3×10^{13} células. Desta forma, cada célula será "afetada" por aproximadamente $3 \times 10^{18} / 3 \times 10^{13} = 10^5$ moléculas de ligante. Uma célula de eritrócito, por exemplo, contém aproximadamente 10^{10} moléculas. Assumindo que o mesmo número de moléculas é encontrado em todas as células, então, para cada molécula de ligante existem $10^{10} / 10^5 = 10^5$ moléculas do corpo humano. Com esta razão de moléculas humanas para moléculas de ligante, Le Chatelier poderia lei grandes dificuldades em explicar como o ligante interage e forma um complexo estável com o receptor desejável" [SILVERMAN, 1992].

Forças Envolvidas no Complexo Ligante-Receptor

As forças envolvidas na interação do complexo ligante-receptor são as mesmas forças evidenciadas em todas as interações entre moléculas orgânicas, incluindo ligação covalente, interações iônicas (eletrostáticas), interação íon-dipolo e dipolo-dipolo, ligação hidrogênio, interações de transferência de carga, interações hidrofóbicas e interações de van der Waals ou forças de dispersão. Interações fracas só são possíveis quando as superfícies das moléculas estão próximas. Isto é, a força da ligação é dependente da distância. A formação de uma interação entre átomos ocorre com um decréscimo na energia, ou seja, ΔG é negativa [SILVERMAN, 1992]. A variação na energia livre é relatada pela constante de equilíbrio da ligação (K_{eq}) de acordo com a equação (1):

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_{eq} \quad (1)$$

Desta forma, na temperatura fisiológica (37° C), variações, na energia livre de 2 a 3 kcal/mol podem ter um grande efeito no estabelecimento de boas interações secundárias. De fato, um decréscimo no ΔG de 2.7 kcal/mol altera a constante de equilíbrio da equação de 1 para 100. Se a K_{eq} for somente 0,01 (isto é, 1% da mistura em equilíbrio na forma do complexo ligante-receptor), então um ΔG de interação de 5,45 kcal/mol pode deslocar a constante de equilíbrio de ligação para 100 (i.e., 99% na forma do complexo ligante-receptor).

Em geral, a formação de ligação entre um ligante e um receptor envolve interações não covalentes fracas e, conseqüentemente, os efeitos produzidos são reversíveis. Por causa disto, um ligante se tornará inativo quanto mais rápido sua concentração no fluido extracelular decrescer [SILVERMAN, 1992].

Algumas vezes, entretanto, o efeito produzido por um ligante pode persistir e tornar-se irreversível. Por exemplo, quando um ligante age seletivamente em um

organismo estranho ou célula tumoral para formar complexos irreversíveis com seus receptores, pode exercer uma ação tóxica por um período prolongado. Neste caso, a formação de ligação covalente será apropriada [SILVERMAN, 1992]

Nas sessões seguintes, os vários tipos de interação ligante-receptor serão apresentados. Estas interações se aplicam também a outros tipos de biomacromoléculas, como enzimas e DNA

Ligação Covalente

As interações intermoleculares envolvendo a formação de ligações covalentes são de elevada energia, entre 77-88 kcal/mol. Na temperatura usual dos sistemas biológicos (30-40°C), ligações que envolvem uma energia maior que 10 kcal/mol são dificilmente clivadas em processos não enzimáticos. Isso implica que complexos ligante-receptor envolvendo ligações dessa natureza são raramente desfeitos culminando com uma inibição enzimática irreversível ou inativação do sítio receptor.

Interações Iônicas (ou Eletrostáticas)

Os grupamentos básicos das cadeias laterais da arginina, lisina e, em menor extensão, histidina encontram-se protonados em um pH de 7,4 (pH fisiológico) e, conseqüentemente, produzem sítios catiônicos. Já os aminoácidos com grupamentos ácidos, tais como a cadeia lateral do ácido aspártico e do ácido glutâmico, encontram-se desprotonados nesse pH, provendo sítios aniônicos [SILVERMAN, 1992].

Nobre meio, os grupamentos dos ligantes e receptores serão mutuamente atraídos, se houver entre eles cargas opostas. Esta interação iônica pode efetiva a distâncias maiores do que aquelas requeridas em outros tipos de interação, podendo persistir por mais tempo. Uma simples interação iônica pode envolver um $\Delta G = -5$ Kcal/mol. Se a interação é reforçada por outras interações simultâneas, a interação íon poderá ser mais forte ($\Delta G = -10$ kcal/mol) e com maior persistência

Interações Íon-Dipolo e Dipolo-Dipolo

As ligações C-X em ligantes e receptores, quando X é um átomo eletronegativo, possuem uma distribuição assimétrica de elétrons, produzindo dipolos eletrônicos. Os dipolos em uma molécula de ligante podem ser atraídos por íons (interação íon-dipolo) ou por outros dipolos (interação dipolo-dipolo) no receptor, desde que as cargas de sinais opostos estejam devidamente alinhadas. Como a carga de um dipolo é menos do que a de um íon, uma interação dipolo-dipolo é mais fraca do que uma interação íon-dipolo [SILVERMAN, 1992].

Ligação de Hidrogênio

A ligação de hidrogênio é um tipo de interação dipolo-dipolo formada entre o hidrogênio de um grupo X-H, onde X é um átomo eletronegativo, e um outro átomo eletronegativo (Y) contendo um par de elétrons disponível. A ligação de hidrogênio só é significativa quando ocorre entre moléculas onde X e Y são N, O ou F. X desloca a nuvem eletrônica do hidrogênio fazendo com que ele adquira uma carga parcial positiva, que passa a ser fortemente atraído pelos pares de elétrons desdisponíveis de Y. A interação é representada por uma linha pontilhada, X H Y, para indicar que a ligação entre X e H é mantida, mas a "ligação" entre H e Y também ocorre. Quando X e Y são equivalentes, o hidrogênio pode ser compartilhado igualmente entre os dois grupos, X H Y.

As ligações de hidrogênio são as mais importantes interações não-covalentes existentes nos sistemas biológicos, sendo responsáveis pela manutenção das

conformações bioativas de mais de macromoléculas nobres, exemplo, α -hélice de proteínas e interações purinas-pirimidinas dos ácidos nucleicos [BARREIRO & FRAGA, 2001]

Forças de Dispersão

Estas forças de interação, conhecidas como forças de dispersão de London ou interações de van der Waals, caracterizam-se pela aproximação de moléculas apolares apresentando dipolos induzidos. Em geral, essas interações são de fraca energia (-0,5 a -1,0 kcal/mol) e ocorrem em função da polarização transitória de ligações de baixa polaridade ou apolares, como ligações carbono-hidrogênio ou carbono-carbono. Apesar de envolverem fracas energias de interação, as forças de dispersão são de extrema importância para o processo de reconhecimento molecular do ligante pelo sítio do receptor, uma vez que normalmente se caracterizam por interações múltiplas que, somadas, acarretam contribuições energéticas significativas [SILVERMAN, 1992].

Interações Hidrofóbicas

Tal como as forças de dispersão, as interações hidrofóbicas são individualmente fracas (aproximadamente 1 kcal/mol) e ocorrem em função da interação em cadeias ou subunidades apolares. Normalmente, as cadeias hidrofóbicas, presentes tanto no sítio receptor como no ligante, encontram-se organizadamente solvatadas por camadas de moléculas de água. A aproximação das superfícies hidrofóbicas promove o colapso da estrutura organizada da água, permitindo interação ligante-receptor às custas do ganho entrópico associado à desorganização do sistema. Em vista do grande número de subunidades hidrofóbicas presentes em peptídeos e ligantes, essa interação torna-se importante para o reconhecimento do ligante pelo receptor.

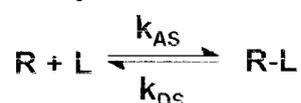
Interações cátion- π

A interação cátion- π é uma forte interação não covalente entre um cátion e o sistema π . Definida como uma importante força que dirige o processo de reconhecimento molecular do ligante pelo sítio do receptor, a interação cátion- π é observada em muitos sistemas biológicos, tais como o sítio de interação, da acetilcolinesterase e o alquilamina desidrogenase [TSUZUKI et al., 2000]

Inúmeras investigações experimentais e teóricas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de caracterizar estas interações [FELDER et al., 2001]. Medidas de energia de ligação entre cátion - benzeno e cátion - tolueno têm mostrado que, na fase gasosa, o cátion se liga preferencialmente ao composto aromático do que à água. Desta forma as cadeias laterais dos aminoácidos Trp, Phe e Tyr podem estabilizar uma carga positiva tão eficientemente como a solvatação pela água.

1.4.2. Modelos Quantitativos de Interação

A compreensão quantitativa do processo de reconhecimento molecular requer um modelo teórico que reflita o efeito das mudanças estruturais dos ligantes neste processo. Esquematicamente a interação entre o receptor R e o ligante L, um agonista ou um antagonista, pode ser representada pelo equilíbrio



onde R-L é o complexo receptor-ligante e K_{AS} é a constante do equilíbrio de associação do complexo, definida pela relação $K_{AS} = [RL]/[R][L]$. A constante do equilíbrio de

dissociação do complexo, K_{DS} , é o inverso de K_{AS} . Estas constantes se relacionam com a variação da energia livre ΔG da reação de acordo com

$$\Delta G = -RT \ln K_{AS} - RT \ln K_{DS} \quad (2)$$

Em Química Medicinal, a constante K_{DS} é geralmente denominada K_i (originalmente definida nas reações enzimáticas como a constante de inibição enzimática) Logo,

$$\Delta G = RT \ln K_i \quad (3)$$

Esta relação representa uma ponte entre o modelo teórico e a resposta biológica. As energias livres de interação devem ser estimadas se o que se deseja é uma pedição quantitativa das afinidades ligante-receptor, expressas nas medidas experimentais de K_i , como parte do processo de planejamento de ligantes, sejam eles fármacos ou agroquímicos. O caminho para este objetivo passa pela construção de um modelo computacional de atribuição de energia livre [AJAY & MURCKO, 1995].

No âmbito do *ajuste ao receptor*, as energias livres relativas de interação podem ser calculadas aplicando-se métodos de *perturbação de energia livre* ("free energy perturbation", FEP), derivados da mecânica estatística. Estes procedimentos são computacionalmente demorados, mas são efetivos quando as estruturas são conhecidas e relativamente pequenas [VADJA et al., 1994]. A aplicação deste procedimento não pode ser feita quando as estruturas envolvidas não são conhecidas, porque a realização de cálculos FEP repetidamente durante a exploração dos espaços conformacional, rotacional e translacional do complexo ainda está aquém das capacidades computacionais disponíveis [VADJA et al., 1994].

Um outro procedimento, que vem sendo utilizado na elaboração de moléculas bioativas é considerar a energia livre de interação como a soma de diferentes contribuições independentes (Figura 15), as quais são calculadas separadamente e somadas na chamada *equação-mestra* [AJAY & MURCKO, 1995]. Modelos com graus variáveis de complexidade para a atribuição da energia livre têm sido propostos, nos quais a energia de interação é aproximada por um potencial de energia livre empírico, isto é, por um conjunto de funções empíricas de energia livre (ou de seus componentes entálpico e entrópico) [NOVOTNY et al., 1989; WILLIAMS et al., 1991; SEARLE & WILLIAMS, 1992; SEARLE et al., 1992; HONIG et al., 1994; VADJA et al., 1994]. Estes modelos podem conter, por exemplo, termos de energia livre para as interações hidrofóbicas [JENCKS, 1969; RUCKENSTEIN, 1992; BLOZIIL & ENGBERTS, 1993] e eletrostáticas, para a variação da entropia de translação e rotação e para a contribuição da flexibilidade conformacional do ligante (Fig. 15).

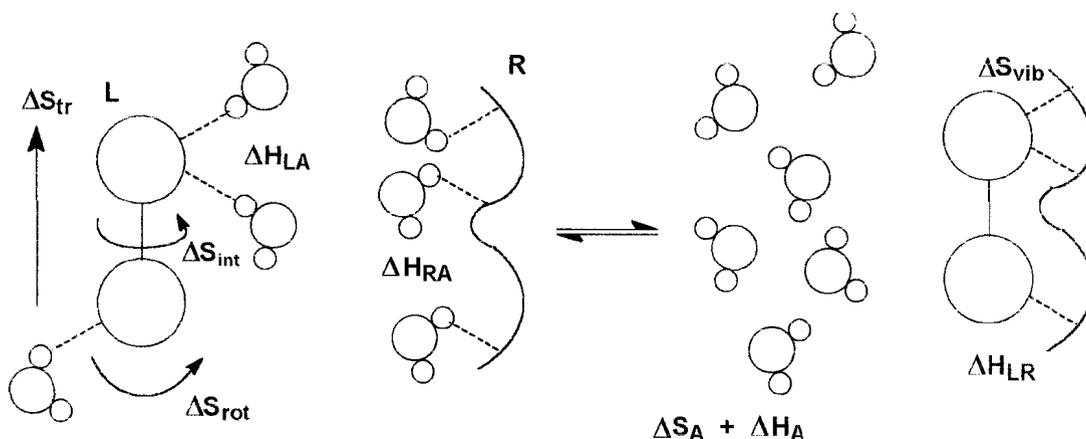


Figura 15. Representação esquemática para os vários termos envolvidos na interação entre o ligante L e o receptor R. ΔS_{Str} representa a entropia translacional do ligante no meio aquoso; ΔS_{rot} , a entropia rotacional; ΔS_{int} , a entropia rotacional interna. ΔH_{LA} e ΔH_{RA} são as entalpias de interação entre a água e o ligante e o receptor, respectivamente. ΔS_A e ΔH_A , representam as mudanças entrópica e entálpica, respectivamente, que acompanham a liberação das moléculas de água associadas inicialmente ao ligante e ao receptor. ΔS_{vib} é a entropia relacionada aos novos modos vibracionais resultantes da interação L-R. ΔH_{LR} é a entalpia de interação entre o ligante e o receptor. Os termos entálpicos podem incluir tanto interações favoráveis quanto desfavoráveis, como repulsões estéticas e mudanças conformacionais [ANDREWS et al., 1984].

A discussão anterior mostra as limitações dos modelos de *mapeamento do receptor* baseados exclusivamente nas posições dos núcleos atômicos. A superposição de estruturas leva em consideração apenas a *posição* de um átomo e não a sua *orientação*. A posição dos grupamentos biofóricos é um critério necessário, mas insuficiente para a distinção entre ligantes com altas e baixas afinidades [WANG et al., 1994]. Por exemplo, mesmo que a posição de um átomo de oxigênio de um ligante esteja correta de acordo com um determinado modelo biofórico, a ligação com um doador de ligação hidrogênio pode ser muito fraca caso a orientação de seus pares de elétrons não seja adequada. A orientação permite que se formem as interações específicas que participam da energia livre de interação e da constante de equilíbrio correspondente

Nos últimos anos, esforços foram feitos para explorar a ponte entre o ajuste baseado na estrutura e o mapeamento baseado nas propriedades visando a construção de modelos energéticos de interação que não necessitam levar em consideração todos os átomos do sistema [WANG et al., 1994; VEDANI et al., 1995; SANT'ANNA et al., 1997]. Uma das técnicas para a construção do sítio ativo em biorreguladores não-caracterizados que permite a determinação de energias livres de interação relativas e a chamada *modelagem de pseudo-receptores* [VEDANI et al., 1995]. A implementação deste procedimento baseia-se no conceito de que uma região relativamente pequena do receptor (o sítio de ligação) é responsável pela interação efetiva com o ligante.

No caso específico dos sistemas antígeno-anticorpo, por exemplo, resultados de avaliação de ΔG sugerem que a interação entálpica é mediada por, no máximo, 5 ou 6 aminoácidos no antígeno e no anticorpo [NOVOTNY et al., 1989]. No caso do antígeno não-protéico fosfocolina, praticamente apenas um resíduo de aminoácido responde pela interação entálpica [NOVOTNY et al., 1989]. Os demais resíduos de aminoácidos atuam por efeito estérico, orientando espacialmente os resíduos importantes. Do ponto de vista

entálpico, então, basta considerar um número pequeno de resíduos de aminoácido do receptor.

Estes resíduos de aminoácido podem ser aproximados por "sondas", moléculas pequenas capazes de reproduzir as forças de interação do biorregulador real. Desde que as "sondas" sejam representativas dos grupamentos reais oferecidos pelo biorregulador para interação com o ligante, a energia resultante de interação com as "sondas" estará relacionada com a energia de interação do sítio ativo do biorregulador [VEDANI et al., 1995]. O problema consiste na escolha destes resíduos, mas isto pode ser orientado por estudos comparativos de complexos ligante-receptor conhecidos e por resultados de SAR.

Os termos entálpicos envolvidos na interação entre o ligante e o biorregulador podem ser calculados diretamente por vários métodos. Estes métodos basicamente diferem quanto à natureza do campo de força, ou seja, do conjunto de funções de energia analítica e seus parâmetros numéricos associados. Os campos variam desde totalmente empíricos, como os utilizados pela mecânica molecular, até os puramente teóricos (métodos *ab initio*), passando pelos chamados métodos semi-empíricos [CLARK, 1986; GRANT & RICHARDS, 1995]. Como os métodos *ab initio*, os métodos semi-empíricos são baseados no formalismo da mecânica quântica, mas parte de seus parâmetros são obtidos experimentalmente [STEWART, 1990]. Isto permite que se evite o cálculo de um grande número de integrais e possibilita a aplicação dos métodos semi-empíricos a sistemas com um número maior de átomos [CLARK, 1986; STEWART, 1990a; GRANT & RICHARDS, 1995]. Os hamiltonianos semi-empíricos mais utilizados atualmente são os contidos nos pacotes AMPAC e MOPAC [STEWART, 1990], MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap) [DEWAR & THIEL, 1977], AMI (Austin Model 1) [DEWAR et al., 1985] e PM3 (Parameterized Method 3) [STEWART, 1989].

Como estes procedimentos se baseiam na distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos de um sistema molecular, suas aplicações permitem que se avalie não só as ligações químicas que determinam a estrutura molecular, como também as interações intermoleculares que se traduzem nos termos entálpicos envolvidos nas interações. O termo entrópico é determinado principalmente pelas restrições impostas pela interação entre o ligante e o receptor e traduzidas nos termos ΔS_{str} , ΔS_{rot} e ΔS_{int} da Figura 15 [SEARLE & WILLIAMS, 1992; SEARLE et al., 1992]. Estas variações podem ser aproximadas por expressões empíricas. Explicitando a constante relativa,

$$\frac{K_i^A}{K_i^B} = \exp\left(\frac{\Delta G_+^A - \Delta G_+^B}{RT}\right) \quad (4)$$

Caso uma das constantes seja conhecida, K_{Bi} por exemplo, as constantes absolutas K_i^A de uma série de substâncias podem ser determinadas a partir dos dados teóricos.

Uma aproximação alternativa à construção dos pseudo-receptores é viável quando estão disponíveis informações sobre a estrutura 3D de biomacromoléculas homólogas à biomacromolécula que se deseja estudar. Este assunto será tratado no item a seguir.

1.5. A Modelagem de Biomacromoléculas

Atualmente, estruturas 3D, especialmente de proteínas, podem ser determinadas experimentalmente através de diferentes métodos experimentais, como difração de raios-X e RMN. No entanto, estas medidas envolvem um tempo significativo, meses e em alguns casos, anos de trabalho. Desta forma, a determinação estrutural e ainda hoje

um desafio científico, caracterizando-se como o maior problema da biologia molecular estrutural. Não há um algoritmo capaz de simular a ação das leis físicas envolvidas no processo de enovelamento de cadeias polipeptídicas, responsável pela formação de estruturas de proteínas. A razão disso é a enorme complexidade em encontrar dentro do universo de conformações possíveis que sejam simultaneamente estáveis e funcionais, dentro de um razoável tempo computacional [SANTOS FILHO, 2000]. No entanto, é aqui que os métodos computacionais tomam lugar. Através da utilização de informações procedentes das estruturas biológicas existentes, é desenvolvida e validada a predição de estruturas desconhecidas.

1.5.1. Princípios da modelagem por homologia

O aumento de dados acerca da estrutura tridimensional e da seqüência das proteínas revelou que é relativamente pequeno o número de formas estruturais das proteínas. Isto reduz a escala do problema da modelagem. Há dois princípios que sustentam este argumento. O primeiro foi a observação de que uma certa proporção de genes recentemente seqüenciados foram relatados a partir de seqüências que já eram conhecidas no banco de seqüências de proteínas. Esta relação é definida como homologia, onde as evidências sugerem que as proteínas sejam relacionadas a um ancestral comum [GRANT & RICHARDS, 1995].

As proteínas homólogas são derivadas de um mecanismo evolucionário de duplicação do gene. As mutações á elas associadas levam a divergências moleculares e, conseqüentemente, à formação de famílias protéicas. Estas famílias protéicas se caracterizam pela manutenção de regiões e estruturas conservadas

Em função do número de mutações envolvidas, as seqüências homólogas podem ser aproximadamente idênticas, semelhantes ou dessemelhantes. Conseqüentemente, a semelhança entre as seqüências de aminoácidos em proteínas homólogas é menos preservada que a semelhança estrutural. Ou seja, estruturas de proteínas homólogas se conservam durante a evolução porque a estrutura ancestral comum é crucial para a função específica de cada proteína.

O segundo princípio baseia-se no fato de que algumas proteínas, consideradas como modernas na escala evolutiva, são constituídas a partir de unidades individuais de dobramentos, que são replicadas a partir de seqüências diversas, algumas vezes multiplicadas como cópias. Estas proteínas podem novamente dobrar em um número limitado de formas originando modelos de proteínas [GRANT & RICHARDS, 1995].

A importância em se resguardar a idéia da relação entre seqüências e estruturas é que toda a informação necessária para a definição da estrutura tridimensional da proteína é codificada através de sua seqüência.

Atualmente, a ferramenta mais bem sucedida para a predição de estrutura tridimensional é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem baseada em estruturas conhecidas (knowledge-based protein modeling) [BAJORATH et al., 1993; JOHNSON et al., 1994; ROST & SANDER, 1996]. Esta abordagem baseia-se em algumas conclusões gerais obtidas a partir de observações acumuladas ao longo dos anos sobre a arquitetura de proteínas, de estruturas determinadas experimentalmente. Alguns padrões gerais têm sido observados com certa freqüência: [GRANT & RICHARDS, 1995]

- a) Proteínas com seqüências de aminoácidos semelhantes geralmente apresentam estruturas tridimensionais semelhantes;
- b) Homologia entre seqüências de aminoácidos implica em semelhança estrutural;
- c) Proteínas homólogas sempre apresentam regiões interiores conservadas (muito semelhantes) e regiões externas ("loops") variáveis.

Uma outra característica de grande importância que enquadram as proteínas, com seqüências de aminoácidos não muito semelhantes, dentro de uma certa família protéica, é que as dissimilaridades mais pronunciadas aparecem geralmente em regiões da superfície da proteína. Nestas regiões, mesmo as propriedades físico-químicas das cadeias laterais mudam freqüentemente. Já os resíduos localizados no interior das proteínas variam menos freqüentemente, Isto significa que geralmente resíduos constituintes do interior protéico e, conseqüentemente, elementos de estruturas secundárias, permanecem altamente conservados dentro de uma família de proteínas homólogas [SANTOS FILHO, 2000].

As proteínas que pertencem à superfamília de receptores nucleares, classificadas como proteínas homólogas, não apresentam, em sua grande maioria, seqüências de aminoácidos muito semelhantes, principalmente entre as diferentes espécies. No entanto, caracterizam-se por manter regiões específicas conservadas, conforme relatado no item 1.4.

Em resumo, as conformações "médias" de proteínas homólogas parecem ter sido altamente conservadas durante a evolução. Este fato é a base para o desenvolvimento da modelagem de proteínas por homologia.

1.5.2. O processo de modelagem de proteínas por homologia

1.5.2.1. O alinhamento

A primeira etapa de um processo de modelagem por homologia é a identificação de pelo menos uma proteína de estrutura tridimensional conhecida, que funcionará como o molde para a determinação da estrutura da proteína-alvo.

Quando se conhece a família da proteína-alvo, a busca do melhor molde deve ser feita dentro de uma única família protéica. Assim, por exemplo, se o objetivo é modelar um EcR e só se conhece sua seqüência de aminoácidos, o caminho racional seria buscar um molde adequado dentro do grupo dos EcRs armazenados em um banco de dados de proteínas, como por exemplo, o PDB [<http://www.rcsb.org/pdb/>, BERSTEIN et al., 1977; BERMAN et al., 2000].

Quando dispõe-se de uma seqüência de aminoácidos, mas não se conhece sua família protéica, a maneira mais simples é fazer uma varredura em um banco de dados de seqüências de aminoácidos de estruturas existentes no PDB, comparando-as com a seqüência da proteína-alvo, com auxílio de algoritmos tais como BLAST [ALTSCHUL et al., 1990] e FASTA [PEARSON & LIPMAN, 1988]. Além disto, banco de dados de seqüências de aminoácidos podem ser utilizados, como o *GenBank* [BENSON et al., 1994] ou o *SWISS-PROT* [BAIROCH & APWEILLER, 2000].

Um outro critério para a definição da proteína molde são os valores de resolução, fator-R e fator-B, fundamentais para a qualidade do modelo da proteína-alvo

As medidas gerais para a qualidade de estruturas de proteínas determinadas por cristalografia são a resolução e o fator-R. Quanto melhor a resolução da proteína, melhor o número de observações experimentais diferentes derivadas dos dados de difração e, conseqüentemente, maior a precisão da estrutura da proteína. A resolução das proteínas armazenadas no PDB geralmente está na faixa de 1 e 4 Å [SANTOS FILHO, 2000]. O fator-R é a medida de concordância entre a estrutura tridimensional (calculada) da proteína, derivada do melhor mapa de densidade eletrônica possível, e a estrutura cristalina "real" da proteína. O fator-R pode ser determinado comparando-se as amplitudes de reflexões de raios-X obtidas experimentalmente e as amplitudes calculadas para a estrutura da proteína que mostra melhor concordância com o mapa de densidade eletrônica. Quanto melhor a concordância entre as amplitudes experimental e calculada, melhor a concordância entre as estruturas derivada e cristalina [SANTOS

FILHO, 2000]. Geralmente, considera-se como estruturas mais confiáveis aquelas que apresentam resolução igual ou melhor que 2,0/Å e fator-R abaixo de 20%

O fator-B, também conhecido como fator de Debye-Waller ou fator de temperatura, é uma medida da extensão do grau de desordem estática e térmica em cada região da estrutura [JOHNSON et al., 1994]. Quanto maior o fator-B numa dada região da proteína, maior a sua deslocalização dinâmica e, conseqüentemente, menor o grau de certeza nas coordenadas espaciais desta região. Geralmente o fator-B é expresso através de uma escala de cores, onde os extremos vermelho e azul significam região com maior e menor fatores-B, respectivamente. Na maioria dos casos, os maiores valores de fator-B são encontrados em regiões de "loops", as regiões mais flexíveis da proteína [SANTOS FILHO, 2000].

Uma vez definidos os moldes potenciais, a segunda etapa consiste de um alinhamento múltiplo da seqüência alvo com as seqüências de todos os possíveis moldes. Se este alinhamento for feito entre proteínas de uma mesma família, crescem, as chances de se obter maior precisão. O alinhamento é essencialmente uma descrição da correspondência espacial entre os resíduos de aminoácidos da proteína-alvo e dos moldes potenciais.

De um modo geral, para seqüências com número de resíduos acima de 80, se o grau de identidade entre as seqüências da proteína-alvo e a de um dos moldes potenciais for igual ou superior a 25%, é muito provável que suas estruturas tridimensionais sejam semelhantes e, conseqüentemente, a estrutura tridimensional da proteína-alvo poderá ser utilizada para a modelagem por homologia da proteína-alvo [ROST & SANDER 1996]. Neste caso, a maior parte das incertezas encontra-se nas regiões de loops. É interessante citar que se o grau de identidade entre as seqüências for superior a 60%, o nível de precisão do modelo resultante é da magnitude da de uma estrutura predita experimentalmente.

1.5.2.2. Geração das coordenadas dos modelos

A localização espacial do maior número possível de átomos da proteína-alvo é feita em função do alinhamento de seqüências de resíduos de aminoácidos. Geralmente, o modo mais utilizado na modelagem de elementos de estrutura secundária da proteína-alvo é determinar, pela inspeção do alinhamento múltiplo, qual das estruturas-molde apresenta o maior grau de identidade com a estrutura-problema. Esta estrutura-molde é utilizada na construção da proteína-alvo. Troca-se os resíduos do molde principal que sejam diferentes dos resíduos correspondentes a proteína-alvo, de modo a obter os resíduos desejados.

Outra alternativa é a utilização de todas as estruturas usadas no alinhamento para o processo de modelagem da proteína-alvo. Neste caso, obtém-se uma estrutura (híbrida) média para os elementos de estrutura secundária da proteína-alvo, que será utilizada na construção do modelo global [TAYLOR et al., 1994].

Como os moldes selecionados não contêm informações estruturais sobre as "loops" (regiões não-conservadas estruturalmente) e sobre muitas das cadeias laterais da estrutura-alvo, essas unidades precisam ser construídas em etapas consecutivas.

Os "loops" são, geralmente, modelados utilizando-se o algoritmo descrito por JONES & THIRUP (1986). Cada "loop" é definido com base em seu comprimento (número de resíduos constituintes), e na geometria dos "átomos âncora", os carbonos-dos quatro resíduos que o antecedem e dos quatro resíduos que o seguem. Os fragmentos que correspondem à definição do "loop" específico são extraídos de estruturas do PDB se os desvios dos mínimos quadrados (rms) calculados para os "átomos âncora" for inferior a um valor específico pré-determinado. Além disto,

somente fragmentos que não se sobrepõem com partes vizinhas da estrutura são considerados como possíveis candidatos a "loops". Os fragmentos possíveis são ordenados de acordo com seus valores de rms e com seus graus de similaridade com a seqüência de resíduos constituintes da proteína-alvo. A melhor combinação é adicionada entre os "átomos âncora", formando um laço para o modelo.

Faz-se necessário complementar a modelagem dos "loops" utilizando técnicas de análise conformacional, já que nem sempre chega-se a soluções convincentes, principalmente para "loops" grandes com mais de 8 resíduos. "Loops" modelados com esse critério são selecionados de acordo com a exposição de grupos hidrofóbicos na superfície e energias conformacionais relativas.

Tal como nos "loops", as conformações de cadeias laterais têm sido previstas a partir de dados experimentais conformacionais. Essa modelagem pode ser feita através da utilização de bibliotecas de rotâmeros permitidos de cadeias laterais (χ_n), obtidas de estruturas do PDB de alta resolução. A Figura 16 mostra, esquematicamente, a definição de rotâmeros de cadeias laterais (χ_n) e dos demais ângulos torcionais Ψ , ϕ e ω encontrados em proteínas.

Essa biblioteca fornece as probabilidades para rotâmeros de cadeias laterais (χ_n) dependentes dos ângulos conformacionais (Ψ e ϕ) da cadeia principal, assim como do tipo de resíduo. Essa metodologia justifica-se pela significativa correlação existente entre ângulos diedros de cadeias laterais (χ_n) e os ângulos da cadeia principal (Ψ e ϕ).

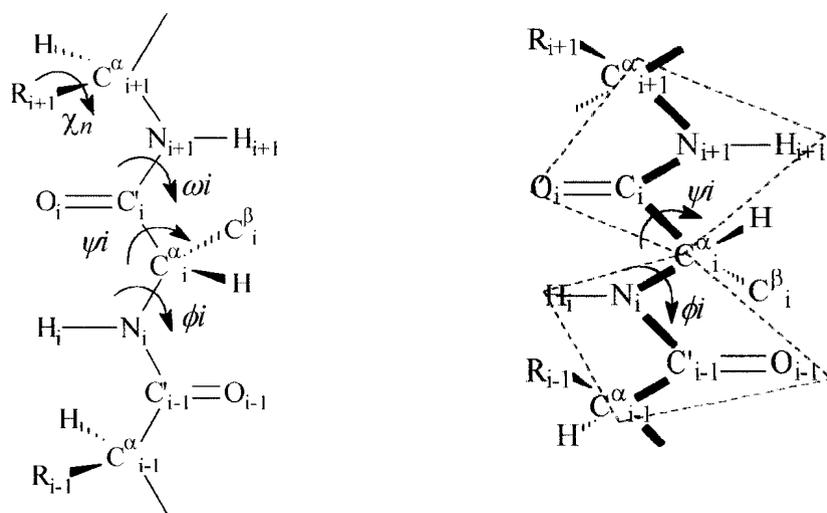


Figura 16. Definição dos ângulos torcionais χ , Ψ , ϕ e ω em uma cadeia polipeptídica completamente distendida, onde todos os ângulos são de 180° (esquerda acima). ω_1 é definido como a rotação em torno da ligação C_i-N_{i+1} . A ligação peptídica, normalmente *trans* tem $\omega_1 = 180^\circ$. ϕ_1 é definido como a rotação em torno da ligação $N_i - C\alpha_i$, e Ψ_1 é definido como a rotação em torno da ligação $C_i^\alpha - C_i'$ (direita acima). χ_n é definido como a rotação em torno da cadeia lateral, por exemplo, $R_{i+1} - C_{i+1}^\alpha$, [FERSHT, 1998].

1.5.3. Otimização do modelo

Uma vez definido o arcabouço geral do modelo desejado, com as coordenadas espaciais de todos os átomos determinados, parte-se para a otimização da geometria do sistema. Interações desfavoráveis entre átomos não ligados por ligações covalentes precisam ser minimizadas por meio de cálculos de mecânica e dinâmica molecular. Como regra geral, tais cálculos precisam ser mantidos num mínimo, pois cálculos muito

extensivos podem desviar excessivamente o sistema de seu molde original [GRANT & RICHARDS, 1995].

1.5.4. Validação do modelo

A última etapa do processo de modelagem de proteína por homologia consiste na análise da confiabilidade da estrutura gerada. Esta é uma tarefa necessária e, ao mesmo tempo, difícil, pois a qualidade do modelo depende de um elevado número de propriedades, em diferentes níveis da organização estrutural.

Um importante indicador da qualidade estereoquímica de uma proteína é a distribuição dos ângulos torcionais da cadeia principal, ϕ e ψ (Fig 16) [FERSHT, 1998]. A distribuição de todos os ângulos ϕ e ψ podem ser examinados através do gráfico de Ramachandran (Fig. 17).

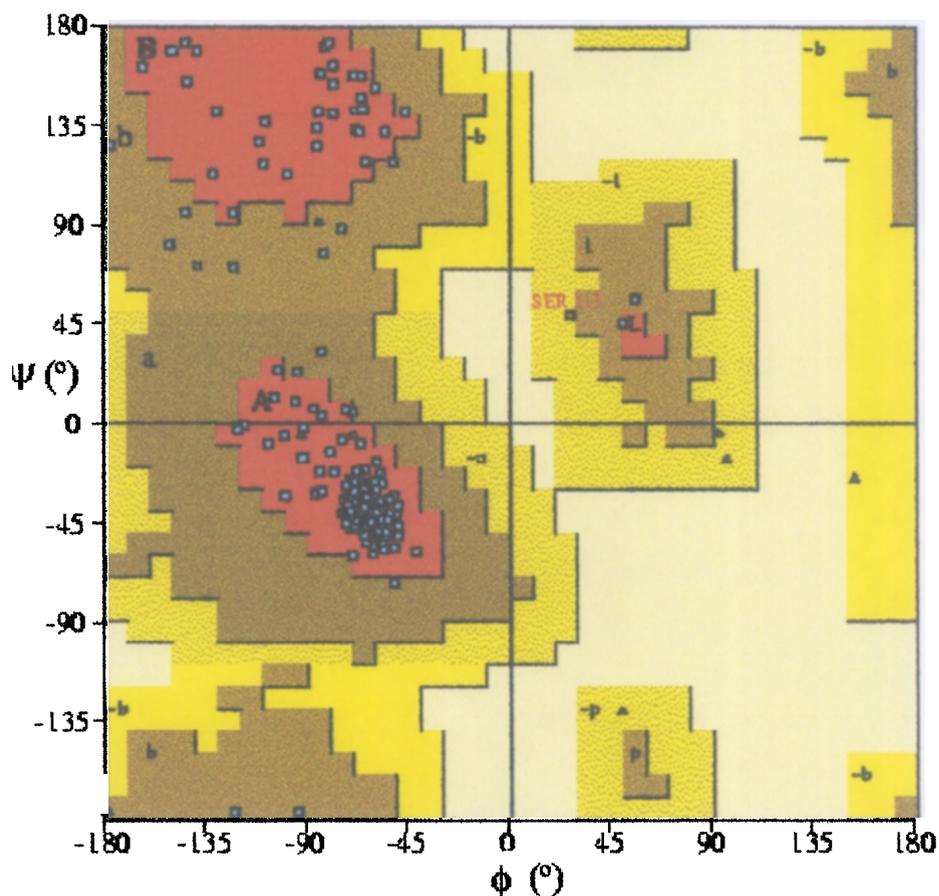


Figura 17. Gráfico de Ramachandran do receptor de ácido retinóico (3LBD) [KLAHOLZ et al., 1998] extraído do banco de proteínas PDB [<http://www.rcsb.org>].

Se a proteína apresentar resíduos de aminoácidos com problemas estereoquímicos, eles estarão em regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran. Somente os resíduos prolina (Pro) e glicina (Gly), por apresentarem características estereoquímicas singulares, podem ocupar qualquer região do gráfico de Ramachandran, devendo ser analisados à parte. A percentagem de resíduos que ocupam regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran é uma das melhores maneiras de avaliar a estereoquímica de um modelo de proteína. Um modelo ideal deve apresentar mais de 90% dos resíduos nas regiões permitidas. A Figura 17 mostra o gráfico de Ramachandran do receptor de ácido retinóico (código no PDB: 3LBD), correspondente

à região do domínio de interação com o ligante [KLAHOLZ et al., 1998]. Nele, os resíduos de glicina são identificados por triângulos. As regiões mais escuras, vermelha e laranja, correspondem às combinações dos ângulos ϕ e ψ mais favoráveis e favoráveis, respectivamente. As regiões mais claras (amarela e creme) são regiões menos favoráveis do gráfico e o resíduo aí presente (Ser215) é identificado com letras vermelhas. A análise do gráfico mostra que 95,3% dos resíduos de aminoácidos da proteína estão em regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran.

1.6. A Construção de Novos Ligantes

O estudo das estruturas de moléculas bioativas (ligantes), seus receptores e as interações entre eles são utilizados para encontrar o melhor caminho para potencializar uma determinada atividade biológica ou dar indicações de qual molécula seria mais interessante para sintetizar.

Estudos empíricos envolvendo a atividade biológica de diferentes ligantes são de grande importância para o desenvolvimento dos métodos de QSAR. Estas técnicas podem ser consideradas como uma extensão dos métodos usados em química orgânica para prever as relações entre a energia livre e as constantes de Hammett [GRANT & RICHARDS, 1995]. A ideia envolvida no método de QSAR é relacionar a atividade biológica às propriedades das moléculas. Estas propriedades podem ser definidas pelo volume (efeito estérico), pela lipofobicidade, ou efeitos eletrônicos relacionados às constantes de Hammett. Entretanto, a metodologia envolvida no método de QSAR pode levar a uma proposta de ligante com atividade biológica razoável, porém ativo somente a altas concentrações. Este seria um resultado oposto ao desejado, mas a distorção dos resultados não pode ser atribuída apenas à análise de QSAR, pois a natureza dos dados farmacológicos não traz a discriminação entre os diferentes efeitos da molécula.

1.6.1. Inferindo o sítio do receptor

Apesar dos avanços tecnológicos que permitem a caracterização de muitas estruturas de proteínas, o problema ainda permanece, pois muitos dos alvos de interação com o bioligante são receptores de membrana e de pouco conhecimento até o momento. Estudos por meio de microscopia eletrônica tem permitido a visualização de fatores estruturais que algumas vezes mostram-se um bom caminho para prover as coordenadas destes receptores. Desta forma, a natureza do receptor pode ser inferida pela estrutura de ligantes conhecidos. Este procedimento é conhecido como *aproximação por análogos ativos* [GRANT & RICHARDS, 1995].

O melhor ponto de partida, quando se tenta derivar um modelo de receptor a partir do conhecimento do agente ativo (bioligante), será a alta afinidade de uma molécula com pequena flexibilidade conformacional. Ela pode servir para definir a orientação espacial das unidades importantes da molécula. Entende-se por unidades importantes aquelas que apresentam grupos funcionais que podem fazer interações significativas com o receptor, isto é, grupos doadores e aceptores de ligação hidrogênio, grupos hidrofóbicos volumosos (indicação de uma cavidade hidrofóbica para o sítio de ligação), entre outros. Se a série de moléculas ativas contém uma estrutura rígida, tem-se um molde sobre os quais outras moléculas podem ser construídas. Se todas as moléculas têm a mesma flexibilidade conformacional, temos duas opções; ou assume-se que a conformação do bioligante será a conformação de menor energia e se tenta sobrepor as estruturas, ou, alternativamente, representa-se cada molécula por um conjunto de conformações abaixo de uma certa energia e escolhe-se a melhor estrutura da série.

Após a obtenção da melhor série de bioligantes, duas informações podem ser obtidas: o biofóro e o tamanho do sítio do receptor. O biofóro é definido em cada caso por um conjunto de elementos estruturais comuns extraídos a partir da estrutura de sobreposição.

A segunda informação é o volume do receptor, o qual é obtido pela aplicação da aproximação por análogos ativos. Primeiramente é necessária a superposição de uma série de moléculas ativas. Caso estas sobreposições sejam possíveis, podemos supor que cada uma das moléculas de bioligantes ligue ao mesmo sítio no receptor e numa mesma orientação, então, o volume acessível do sítio de ligação deve ser capaz de acomodar o volume de van der Waals total dos bioligantes. Algumas vezes o estudo pode envolver uma série conhecida de bioligantes inativos, Neste caso, assume-se que algumas unidades das estruturas moleculares, os elementos biofóricos, podem ser sobrepostos. A subtração de um volume pelo outro indicará a região ocupada unicamente pelas moléculas ativas. Estes resultados fornecem informações sobre as forças estéricas que podem atuar no sítio do receptor, indicando de que forma pode ser feita a otimização da estrutura. Mutuamente, volumes ocupados somente por moléculas inativas podem implicar em conflitos com o receptor e, então, modificações nesta direção podem ser desfavoráveis. Com o advento da computação gráfica, métodos de aproximação por análogos ativos têm sido largamente utilizados para prover novas estruturas com potencial atividade biológica [GRANT & RICHARDS, 1995]. Infelizmente, uma grande parte das informações são ignoradas quando se consideram apenas os elementos biofóricos e o volume total, pois muito pouco pode ser deduzido sobre as interações mais sutis entre as outras partes da molécula e o receptor. Entretanto, apesar desta deficiência, o método tem sido usado como ponto de partida de muitos programas industriais de descoberta de novas drogas [GRANT & RICHARDS, 1995].

1.6.2. Mapeando o receptor

As circunstâncias mais promissoras para iniciar um estudo do planejamento de bioligantes são aquelas onde é conhecida a estrutura detalhada do receptor. A estrutura do receptor pode ser definida experimentalmente através de raios-X ou RMN, ou ser uma estrutura derivada por modelagem por homologia, usando os métodos descritos no item 1.5. Usualmente, as estruturas experimentais são sempre preferidas, mas alguns cuidados devem ser tomados para garantir que a conformação correta seja mantida. Se o trabalho envolver estruturas modeladas podem aparecer certas imprecisões que são inerentes do produto modelado, Com estes dados pode-se proceder ao mapeamento do receptor e inferir sobre o suposto sítio ativo. Entretanto, o ideal é ter uma estrutura tridimensional do alvo da droga, pois esta informação revela quais resíduos são importantes para desencadear a atividade. Se o sítio de ligação não é conhecido, as técnicas de mapeamentos do receptor podem ser utilizadas em toda a estrutura, usando como referência estudos de mutação ou qualquer outra informação avaliada [GRANT & RICHARDS, 1995].

Se tomarmos como ponto de partida a situação hipotética onde conhecemos a estrutura do receptor e a posição do substrato natural ou a sinalização de moléculas no sítio ativo, duas questões podem ser apresentadas antes do planejamento do novo bioligante. Uma é se o bioligante bloqueia o receptor (um antagonista ou inibidor), neste caso, devemos identificar que partes da molécula podem ser modificadas por substituintes alternativos sem afetar as propriedades de ligação, isto é, devemos olhar para os bioisómeros potenciais. A outra trata de dirigir a atenção para o restante da região obtendo uma idéia de onde e quais grupos funcionais podem ser incorporados ao

bioligante a fim de potencializar sua atividade felizmente, ambas questões podem ser desenvolvidas usando aproximações simples

O método mais simples e sistemático, que forma a base de muitas variantes, é a investigação das interações energéticas entre os grupos sondas representativos e a proteína. Uma vez que a proteína e os grupos sondas são mantidos rígidos, a energia contida envolve somente termos intermoleculares do tipo: eletrostático, van der Waals e ligação hidrogênio, mas outras formulações complexas podem ser usadas [GRANT & RICHARDS, 1995].

1.6.3. O método de atracamento

O uso de interações gráficas para manipular a posição do ligante no sítio ativo da proteína alvo envolve um procedimento automático e cada vez mais capaz de afetar uma varredura nos dados moleculares [GRANT & RICHARDS, 1995].

A princípio, os algoritmos de atracamentos seguem um modelo similar. Usualmente, o primeiro estágio é representar a molécula pela superfície acessível ao solvente. Partindo de um número de diferentes orientações relativas, as duas moléculas, o ligante e a proteína alvo podem ser conduzidas juntas. As forças de direção envolvem movimentos simples como o de translação e rotação da estrutura, ou, alternativamente, uma molécula pode ser movida pela ação de um campo de força de outra molécula. Rápidas convergências a um mínimo de energia podem ser alcançadas gradualmente pela simulação do abaixamento da temperatura. Com efeito da baixa temperatura, lentamente a extensão do movimento do ligante decresce sucessivamente. Em todos estes casos a energia intermolecular pode ser avaliada usando uma função de energia de van der Waals somado à função eletrostática de energia [GRANT & RICHARDS, 1995].

Existem outros métodos de atracamento de ligantes no sítio dos respectivos receptores e, em quase todos eles, os programas computacionais tratam as duas moléculas como entidades rígidas, e isto é visto como uma grande deficiência destes métodos. No entanto, a solução deste problema é feita através da definição de uma geometria de partida [GRANT & RICHARDS, 1995].

2. OBJETIVOS

Resultados recentes de nosso grupo de trabalho demonstram a aplicabilidade da modelagem molecular como uma ferramenta para o estudo dos mecanismos de ação de agroquímicos [SANT'ANNA et al. 2002; SANTOS & SANT'ANNA, 2002].

O nosso interesse pelas DBHs é encorajado pelo alto grau de toxidez e seletividade de RH-5992 e RH-2485 e por apresentarem alto nível de segurança para predadores que atuam como inimigos naturais das pragas e mamíferos.

Para compreender a ação destes agonistas, o primeiro objetivo do nosso trabalho consistiu no uso da modelagem molecular para avaliação das DBHs através da comparação com o agonista natural (20E), de modo a fornecer informações sobre as estruturas, para se identificar possíveis pontos dessa molécula que fossem importantes para interação com o EcR.

Como segundo objetivo, buscou-se identificar, através da modelagem molecular, diferenças nos modos de interação das DBHs com o sítio ativo dos EcRs de duas espécies de insetos. Desta forma, o trabalho envolveu estudos com o EcR de *Manduca sexta*, um lepidóptero, e o EcR de *Drosophila melanogaster*, um díptero, cujas estruturas 3D foram construídas através de modelagem por homologia, já que nenhuma estrutura 3D de EcR foi experimentalmente definida. No estudo, foi possível identificar grupos funcionais importantes para a atividade agonista e sugerir, numa 3ª etapa, novos ligantes de EcR que se mostraram candidatos promissores para o desenvolvimento de novos pesticidas.

Nas Figuras 18 e 19 são apresentados os lepidópteros *M. sexta* e *D. melanogaster*, respectivamente.

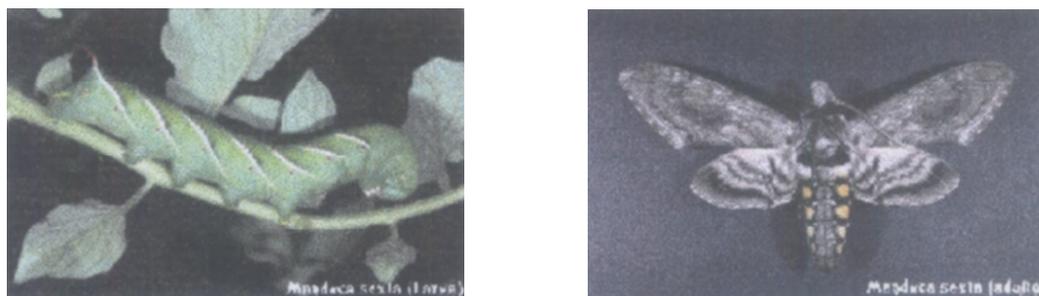


Figura 18. *Manduca sexta* na forma larva e na forma adulta, respectivamente.



Figura 19. *Drosophila melanogaster* na forma larva e na forma adulta, respectivamente.

3. METODOLOGIA

3.1. Modelagem dos Ligantes

A estrutura de 20E foi construída com o programa PC *Spartam Plus* [HEHRE et al., 1997] e otimizada utilizando o método semi-empírico PM3 [STEWART, 1989] do programa Mopac 6.0 [STEWART, 1992] para Windows até a norma de gradiente 0005 kcal/(Å ou rad).

Para a modelagem das DBHs, também construídas com o programa PC *Spartam Plus*, utilizamos a estrutura de 20E como "molde", girando-se os principais ângulos diedros das estruturas das DBHs, até se alcançar ângulos com valores próximos aos de 20E. A adoção deste procedimento é justificada pela pequena semelhança entre as estruturas de 20E e a das DBHs e pela liberdade conformacional das DBHs. A otimização das estruturas envolveu também o método semi-empírico PM3 (STEWART, 1989) do programa Mopac 6.0. Todos os cálculos foram feitos em computadores Pentium 150 MHz ou Pentium II 333 MHz, otimizando-se as estruturas até a norma de gradiente inferior a 0,008 kcal/(Å ou rad). As estruturas otimizadas foram caracterizadas de maneira inequívoca como mínimos de energia pela análise das respectivas matrizes de Hess.

As estruturas de 20E e das DBHs RH-2485 e RH-5992 foram comparadas utilizando-se o módulo "Search-Compare" do programa INSIGHT II 98.0 [Molecular Simulations Inc] em uma estação de trabalho Silicon Graphics O2.

3.2. Obtenção das Estruturas 3D do EcR de *M. sexta* e de *D. melanogaster*.

A estrutura tridimensional dos EcRs foram obtidas através da modelagem de proteínas por homologia, utilizando o Servidor *SWISS-MODEL* [PEITSCH, M. C., 1995], disponível na internet [<http://www.expasy.ch/>].

A modelagem iniciou-se com a identificação de possíveis proteínas-molde baseadas em suas similaridades com as seqüências de aminoácidos do domínio de interação com o ligante do receptor de ecdisteróide de *M. sexta* (msEcR-DIL) e de *D. melanogaster* (dmEcR-DIL), descrita na forma de Um arquivo *FastA* [PEARSON, W.R., 1988]. isto foi feito através de uma busca automática em bancos de dados de seqüências de resíduos de proteínas com estruturas tridimensionais conhecidas, disponível no próprio servidor, usando as ferramentas de alinhamento dos programas *BLAST* [ALTSCHUL, S. F., 1990] e *FastA* [PEARSON, W. R., 1988].

Todas as proteínas moldes foram co-cristalizadas com os agonistas naturais ou sintéticos e suas estruturas foram determinadas através de Raio-X

Na sobreposição das estruturas tridimensionais dos EcRs (modeladas pelo servidor *SWISS-MODEL*) com as proteínas-molde, utilizando o programa *Swiss Pdb Viewer* [GUEX & PEITCH, 1997], verificou-se que as regiões de inserções não necessitaram ser alteradas, pois não havia formação de falsas ligações correspondentes às lacunas que são geradas no alinhamento, As regiões de "loops" por serem poucas e não corresponderem ao provável sítio ativo dos receptores, não foram modeladas.

3.3. A Definição do Sítio de Interação com os Ligantes (SIL) dos EcRs.

Na delimitação do sítio de interação com os ligante (SIL) dos EcRs foram realizadas sobreposições entre as estruturas de cada EcR e as respectivas proteínas moldes, verificando-se a possível região onde o ligante poderia situar-se. Constatamos nestas observações que a região do sítio das diferentes proteínas moldes são equivalentes. Como uma primeira simplificação, definimos o SIL dos EcRs pelos

aminoácidos correspondentes àqueles que nas estruturas moldes estivessem até 6,0 Å do ligante, conforme as estruturas 3D obtidas do Protein Data Bank (PDB) [BERNSTEIN et al., 1997; BERMAN ET AL. 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>]

Os modelos do SIL dos EcRs inicialmente recortados eram formados por cerca de quarenta aminoácidos. Como esperado, foi possível observar que a região definida como provável SIL de EcR apresentava uma cavidade onde possivelmente poderia instalar-se o hormônio 20E e os agonistas sintéticos.

3.4. A Inserção dos Ligantes Natural (20E) e Sintéticos (DBHs) nos Modelos dos SILs.

Através do programa INSIGHT II 98.0 (Molecular Simulations Inc.) os ligantes natural (20E) e sintéticos (DBHs) foram, manualmente, atracados na cavidade do sítio ativo dos EcRs. O processo de atracamento foi realizado com os sítios e os ligantes rígidos, sendo orientado pela variação das energias eletrostática e de van der Waals do sistema. Orientações diferentes dos ligantes foram avaliadas por tentativas no interior da cavidade do sítio.

Os conformeros para os agonistas sintéticos (DBHs) e natural (20E) escolhidos como uma possível geometria inicial para a etapa de atracamento foram definidos após otimização com o método semi-empírico PM3, de acordo com o descrito no item 3.1.

O efeito da conformação do ligante na estabilidade do complexo foi considerado pela rotação de ângulos diedros dos agonistas de modo a se estabelecer o maior número possível de ligações hidrogênio com os resíduos dos aminoácidos. Para 20E, a rotação dos ângulos diedros envolveu a cadeia lateral próxima ao anel D, enquanto que para as DBHs, as ligações localizadas entre os anéis aromáticos foram rotacionadas.

Em seguida, o complexo foi refinado por otimização a um gradiente menor que 1,0 kcal/Å, ou rad) com o campo de força CVFF [OSGUTHORFE et al., 1988]. Um gradiente menor não foi usado para se evitar grandes deslocamentos nas posições originais dos aminoácidos, visto que esta otimização foi efetuada sem restrições em nenhuma posição atômica. Os maiores ajustes da geometria foram observados somente para as cadeias laterais dos aminoácidos adjacentes ao ligante e para a própria molécula do ligante. O RMS resultante da comparação de todos os átomos da proteína, antes e depois da inclusão do ligante, foi em todos os casos menor do que 0,6 Å.

Todos os cálculos foram feitos em estações Silicon Graphics O2.

3.5. A Modelagem das Cavidades de interação com o Ligante dos EcRs

Para possibilitar a aplicação do cálculo semi-empírico, foi implementada uma nova simplificação do sítio ativo onde manteve-se somente os aminoácidos que realmente poderiam se envolver diretamente em interações com o ligante, após análise das estruturas anteriormente otimizadas. O novo modelo de sítio simplificado foi definido como cavidade de interação com o ligante (CIL). Os complexos formados pelo ligante e a CIL foram convertidos com o programa *Babel 1.6* [WALTERS & STAHL, 1996] em um arquivo de entrada para o programa de cálculos semi-empíricos MOPAC 6.0. Os complexos foram otimizados até a norma de gradiente inferior a 0,5 kcal/(Å, ou rad) com o Hamiltoniano PM3 [STEWART, 1989] e, para comparação, com o Hamiltoniano AMI [DEWAR et al., 1985], ambos do programa MOPAC 0.0 [STEWART, 1992] para Windows, em microcomputadores Pentium II 333 MHz. Foi considerada uma carga igual a +3 em função das três argininas presentes nos complexos, uma vez que no pH fisiológico estas espécies estariam protonadas. O termo MMOK foi aplicado devido as ligações peptídicas.

Durante os cálculos semi-empíricos, os átomos das cadeias laterais dos aminoácidos e das moléculas dos ligantes, assim como todos os átomos de hidrogênio, permaneceram completamente livres para adotarem conformações de baixa energia. Os átomos das ligações peptídicas tiveram de ser mantidos fixos para se evitar grandes modificações na forma da CIL em consequência de flutuações de resíduos de aminoácidos durante a otimização.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Estudo comparativo entre as estruturas moleculares de 20E e as dibenzoilidrazinas RH-5992 e RH-2485.

Devido à pequena semelhança entre as estruturas, a comparação entre elas envolveu apenas alguns pares de átomos escolhidos de modo arbitrário, tendo como critério a semelhança química entre os constituintes de cada par. Os desvios nas posições dos átomos destacados na Figura 20, os desvios médios e o RMS entre os pares de átomo são apresentados na Tabela 2 para os conformeros que tiveram melhor sobreposição.

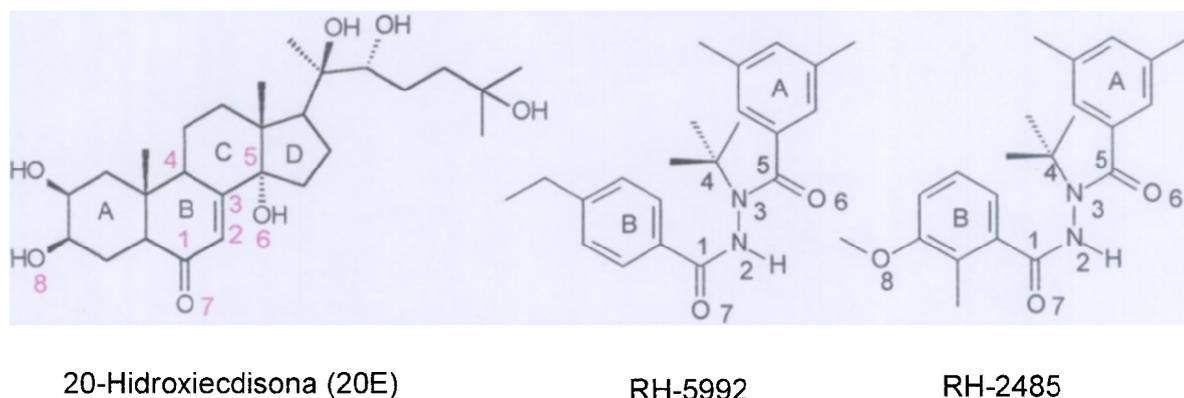


Figura 20. Estruturas químicas de 20E e das dibenzoilidrazinas, em destaque átomos comparados.

Tabela 2. Cargas, desvios médios e o RMS entre os pares de átomo de 20E, RH-5992 e RH-2485.

	20E	RH-5992	Desvio	RH-2485	Desvio
	Carga	Carga	Å	Carga	Å
C	0,322	C1 0,311	0,77	C1 0,318	0,15
C	-0,229	N2 -0,045	0,58	N2 -0,060	0,41
C	-0,006	N3 -0,137	0,25	N3 -0,084	-
C	-0,054	C4 0,003	0,31	C4 0,024	-
C	0,129	C5 0,355	0,29	C5 0,328	0,48
O	-0,314	O6 -0,301	0,30	O6 -0,309	0,48
O	-0,319	O7 -0,362	0,21	O7 -0,359	0,38
O	-0,317	O8 -	-	O8 -0,191	0,34
Desvio Médio			0,39	0,37	
RMS			0,43	0,39	

Os confôrmeros de RH-2485 e RH-5992 com melhor sobreposição o com 20E diferiram respectivamente em 2,37 e 3,58 kcal/mol nas suas entalpias de formação em comparação com os mínimos obtidos inicialmente. O melhor confôrmero de RH-2485 não apresentou boa sobreposição com a inclusão dos átomos N3 e C4, mas a retirada destes átomos e a inclusão do átomo O8 da metoxila levaram a uma boa sobreposição com 20E. O melhor confôrmero de RH-5992 permitiu uma boa sobreposição com 20E considerando-se todos os átomos de C1 até 07. Estes resultados sugerem que as estruturas RH-5992 e RH-2485 podem alcançar conformações com boa semelhança estrutural com 20E com um baixo gasto de energia. A boa sobreposição com a inclusão do átomo O8 da metoxila de RH-2485 sugere que esse átomo seja um ponto adicional de interação dessa molécula com o receptor de ecdisteróide, funcionando como possível aceptor de ligação hidrogênio na interação com proteínas. No hormônio progesterona, o oxigênio nesta posição equivale ao oxigênio da carbonila do anel A, conforme observamos na comparação com 20E.

A especificidade da interação com o hormônio deriva, em parte, da forma com que a porção hidrofóbica se agrega a cavidade do receptor e dos resíduos que envolvem as metilas 18 e 19, para o caso dos hormônios esteróides [WILLIAMS & SIGLER 1998]. No receptor de progesterona, tal como no receptor de glucocorticóide e androgênio, a especificidade do hormônio parece estar vinculada ao grupo carbonila do anel A. [WILLIAMS & SIGLER, 1998]. Por doação de uma ligação hidrogênio, através de uma molécula de água situada no sítio ativo, os átomos de oxigênio do grupo amida de Gln725 e o grupo guanidínio de Arg766 estabelecem interações com a carbonila do anel A da progesterona, que sustentam e estabilizam a orientação do hormônio na cavidade do sítio [WILLIAMS & SIGLER, 1998]. No receptor de estrogênio, o grupo amida é substituído por um grupo ácido carboxílico de um ácido glutâmico, que se liga a hidroxila em C-3 [BRZOZOWSKI et al., 1997]. Estes dados somam-se à hipótese de que o ponto adicional em RH-2485 seja de grande importância, o que pode explicar a sua maior atividade em comparação a RH-5992.

Deve-se destacar, contudo, que partes significativas das estruturas não apresentam correspondência, mostrando a possibilidade de que o agonista natural e os agonistas sintéticos possam interagir de modo significativamente diferente com o EcR (Figs 21 e 22).

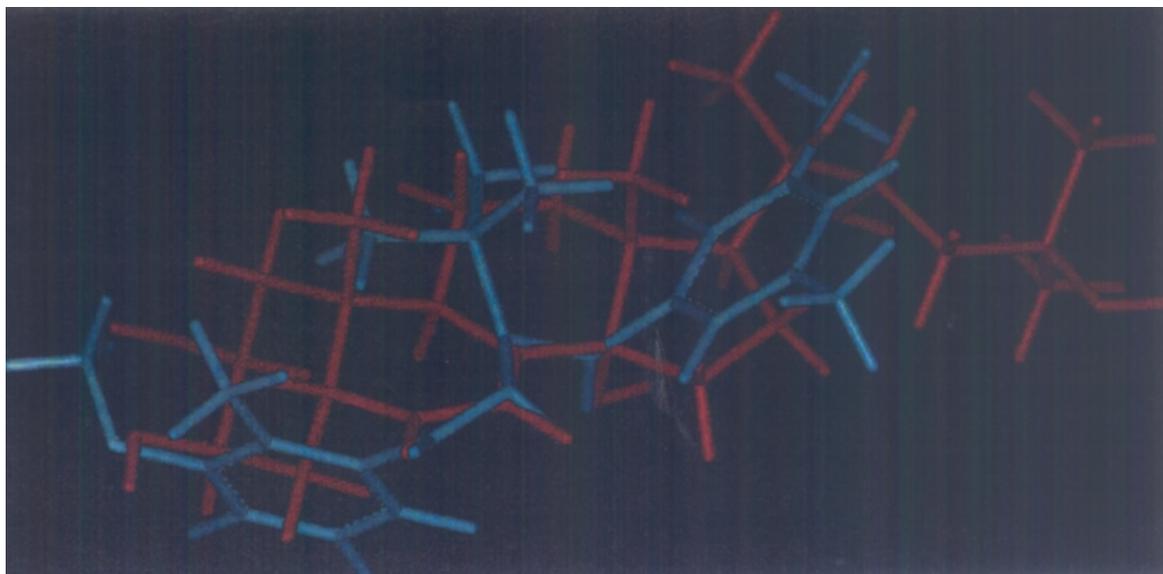


Figura 21. Sobreposição da estrutura química de 20E (vermelho) com RH-2485(azul)

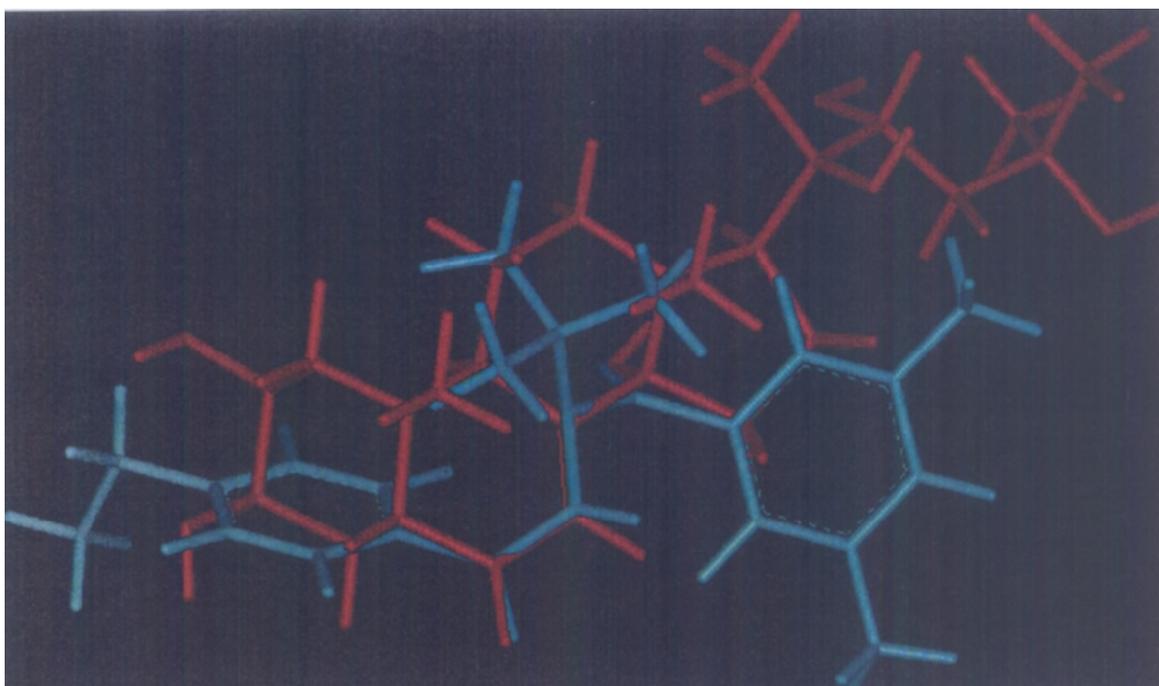


Figura 22. Sobreposição da estrutura química de 20E (vermelho) com RH-5992 (azul)

4.2. Modelagem do Domínio de Interação com o Ligante (DIL) dos EcRs.

As seqüências primárias do receptor de ecdisteróide de *Manduca sexta* (msEcR) (código: P49883) e de *Drosophila melanogaster* (dmEcR) (código: P34021) foram localizadas no banco de proteínas SWISS-PROT [<http://www.expasy.ch/sprot>]. A seqüência de msEcR foi determinada por FUJIWARA e colaboradores e é formado por 556 aminoácidos [FUJIWARA et al., 1995], enquanto que a seqüência de dmEcR foi primeiramente definida por KOELLE e colaboradores, sendo constituída por 781 aminoácidos [KOELLE et al., 1991].

A potencial região correspondente ao domínio de interação com o ligante (DIL) do EcR de *Manduca Sexta* (msEcR-DIL) e de *Drosophila melanogaster* (dmEcR-DIL), foi obtida no próprio provedor, na forma de arquivo *FastA* e encaminhada ao servidor a fim de que identificássemos possíveis proteínas que pudessem ser utilizadas como moldes.

A identificação dos moldes adequados, armazenados no *PDB*, foi feita através do próprio Servidor *SWISS-MODEL*, que remete automaticamente os códigos das possíveis proteínas-moldes, conforme a identidade com as proteínas-alvo.

Os critérios de escolha das proteínas moldes foram o percentual de identidade e a resolução de cada proteína encontrada. A escolha recaiu sobre os receptores humanos de ácido retinóico (RXR) (código PDB = 1EXA; resolução: 1,59 Å, fator-R: 20,9%), (código PDB = 1FCY, resolução: 1,30 Å, fator-R:13,3%), (código PDB = 2LBD; resolução: 2,0 Å, fator-R: 21%), e (código PDB = 4LBD; resolução: 2,40 Å, fator-R: 18,3%), para msEcR-DIL, e os receptores humanos de vitamina D (código: 1DB1A; resolução:1,8 Å; fator-R: 19,1%), do ácido retinóico (códigos: 3LBD,4LBD e 2LBD) e do hormônio da tiróide (código: IBSX; resolução: 3,7 Å; fator-R: 25%), para dmEcR-DIL.

O índice de identidade entre os EcR-DILs e as proteínas moldes variaram de 30 a 36%. Para o modelo de msEcR-DIL, o maior percentual de identidade foi relatado para o RXR (1EXA), com 36,62%, enquanto que para dmEcR-DIL o maior percentual de identidade foi de 33,3% com o receptor do hormônio da tiróide (1BSXB). No entanto, em ambos modelos, o RXR aparece como proteína molde, sendo que o 2LBD é um receptor ligado ao ácido retinóico todo *trans*, 3LBD aparece ligado ao ácido 9-*cis*-retinóico e 4LBD aparece ligado a um agonista do ácido retinóico.

Decidimos utilizar as cinco estruturas como moldes para modelagem de msEcR-DIL e de dmEcR-DIL, com o propósito de obter estruturas que envolvessem uma melhor média e, em consequência disto, melhor qualidade do modelo. As Figuras 24 e 25 mostram o alinhamento múltiplo dos respectivos modelos de EcR-DIL.

Na inspeção dos modelos resultantes do alinhamento múltiplo entre as proteínas verificou-se que havia correlação entre as estruturas moldes e as proteínas-alvo, e que o aspecto era totalmente similar, sendo as mais importantes diferenças relatadas para a seqüência terminal (Figs. 23 e 24).

A etapa seguinte envolveria a modelagem dos *loops* dos modelos dos EcR-DILs que ocorrem, principalmente, em regiões de inserções e deleções, sendo necessário modelá-los com o auxílio do banco de *loops* do programa Swiss-PDBViewer. No entanto, optou-se por não fazê-lo, uma vez que essas regiões correspondem às regiões mais externas das proteínas e, naquele momento, o foco do trabalho se limitava à CIL, região interna da proteína, identificada através das proteínas moldes utilizadas.

msEcR	310					EEEE	EETDMPFRQI
1EXAA	182	LSPQLEELI-	KVSKAHQETF	PSLCQLGKYT	TNSS--AD-R	VQLDLGLWD-	
2LBDA	182	LSPQLEELIT	KVSKAHQETF	PSLCQLGKYT	TNSS--ADHR	VQLDLGLWDK	
1fcya	182	ASPQLEELIT	KVSKAHQETF	PSLCQLGKYT	TNSS--ADHR	VQLDLGLWDK	
4lbda	182	LSPQLEELIT	KVSKAHQETF	PSLCQLGKYT	TNSS--ADHR	VQLDLGLWDK	
msEcR	324	--TEMTILTV	QLIVEFAKGL	PGFSKISQSD	QITLLKASSS	-EVMMLRVAR	
1EXAA	230	F-SELATKCI	IKIV-FAKRL	PGFTGLSIAD	QITLLKAA-L	-DILMLRICT	
2LBDA	230	F-SELAT-CI	IKIVEFAKRL	PGFTGLSIAD	QITLLKAACL	-DILMLRICT	
1fcya	230	F-SELATKCI	IKIVEFAKRL	PGFTGLSIAD	QITLLKAACL	-DILMLRIC	
4LBDA	230	-FSELATKCI	IKIVEFAKRL	PGFTGLSIAD	QITLLKAACL	-DILMLRICT	
msEcR	371	RYDAATDSVL	FANNQAYTRD	NYRKAGMSYV	I EDLLHFCRC	MYSMSMDNVH	
1EXAA	278	RYTPEQDTMT	FSDGLTLNRT	QMHNAGFGPL	TDLVFAFAGQ	LLPLEMDDTE	
2LBDA	278	RYTPEQDTMT	FSDGLTLNRT	QMHNAGFGPL	TDLVFAFAGQ	LLPLEMDDTE	
1fcya	278	RYTPEQDTMT	FSDGLTLNRT	QMHNAGFGPL	TDLVFAFAGQ	LLPLEMDDTE	
4LBDA	278	RYTPEQDTMT	FSDGLTLNRT	QMHNAGFGPL	TDLVFAFAGQ	LLPLEMDDTE	
msEcR	421	YALLTAIV-I	FSDRPGLEQP	LLVEEIQRYY	LKTLRVYILN	QHSASPRCAV	
1EXAA	328	TGLLSAI-LI	-GDRMDLEEP	EKVDKLQEPL	LEALRLYARR	RRPSQP----	
2LBDA	328	TGLLSAICLI	CGDRMDLEEP	EKVDKLQEPL	LEALRLYARR	RRPSQP----	
1fcya	328	TGLLSAICLI	CGDRMDLEEP	EKVDKLQEPL	LEALRLYARR	RRPSQP----	
4LBDA	328	TGLLSAICLI	CGDRMDLEEP	EKVDKLQEPL	LEALRLYARR	RRPSQP----	
msEcR	470	LF-GKILG-V	LTELRTLGT-	-QNSNMCISL	KLKN-RKLPP	FLEEIWD --	
1EXAA	374	Y-FPRML-KI	-TDLR--G--	TKGAERAITL	KMEIPGPMPP	LIREMLE---	
2LBDA	374	YMFPRMLMKI	-TDLR--GIS	TKGAERAITL	KMEIPGPMPP	LIREMLENPP	
1fcya	374	YMFPRMLMKI	-TDLR--GIS	TKGAERAITL	KMEIPGPMPP	LIREMLE --	
4LBDA	374	YMFPRMLMKI	-TDLR--GIS	TKGAERAITL	KMEIPGPMPP	LIREMLEN -	

Figura 23. Alinhamento múltiplo de *msEcR*-DIL com EXAA/1fcya (RXR gama, região do DIL [KLAHOLZ et al, 2000]); 2LBDA (RXR gama, região do DIL [RENAUD et al., 1998]) e 4LBD (RXR gama, região do DIL [KLAHOLZ et al, 1998]). Os resíduos conservados são mostrados em vermelho (resíduos idênticos) e em azul (resíduos com propriedades semelhantes).

Para verificar a validade dos modelos de *EcR*-DILs obtidos, utilizou-se como ferramenta gráficos de Ramachandran (Figs. 25 e 26), obtidos através do Programa Swiss PDB Viewer. Nele, os resíduos de glicina são identificados por quadrados. As regiões delimitadas pelas faixas amarelas e azuis, correspondem às combinações dos ângulos ϕ e ψ das ligações peptídicas mais favoráveis e favoráveis, respectivamente.

A análise do gráfico mostra que os modelos de *msEcR*-DIL e *dmEcR*-DIL têm, respectivamente, 95,30% e 97,45% dos resíduos de aminoácidos das proteínas em regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran, indicando a boa qualidade das estruturas modeladas.

<i>dmEcR</i>	316	TDVSFR	HITEITILTV	QLIVEFAKGL	PAFTKIPQED	QITLLKACSS
3LBDA	221	QL--DLGLWD	KFSELATKCI	IKIVEFAKRL	PGFTGLSIAD	QITLLKAAACL
4LBDA	221	QL--DLGLWD	KFSELATKCI	IKIVEFAKRL	PGFTGLSIAD	QITLLKAAACL
2LBDA	221	QL--DLGLWD	KFSELATKCI	IKIVEFAKRL	PGFTGLSIAD	QITLLKAAACL
1DB1A	221	LS--QLSMLP	HLADLVSYSI	QKVIGFAKMI	PGFRDLTSED	QIVLLKSSAI
1BSXB	265	----DLEAFS	HFTKIITPAI	TRVVDFAKKL	PMFCELPCEP	QIILLKGCMM
<i>dmEcR</i>	362	EVMMLRMARR	YDHSSDSIFF	A-NNRSYTRD	SYKMAG-MAD	NIEDLLHFRCR
3LBDA	269	DILMLRICTR	YTPEQDTMTF	S-DGLTLNRT	QMHNAGFGPL	-TDLVFAFAG
4LBDA	269	DILMLRICTR	YTPEQDTMTF	S-DGLTLNRT	QMH-NAGFGP	LTDLVFAFAG
2LBDA	269	DILMLRICTR	YTPEQDTMTF	S-DGLTLNRT	QMHNAGFGPL	-TDLVFAFAG
1DB1A	269	EVIMLRSNES	FTMDDMSWTC	GNQDYKYRVS	DVTKAGHSLE	LIEPLIKFQV
1BSXB	311	EIMSLRAAVR	YDPESETLTL	N-GEMAVTRG	QLKNGG-LGV	VSDAIFDLGM
<i>dmEcR</i>	410	QMF5MKVDNV	EYALLTAIVI	FS-DRPGLEK	AQLVEAIQSY	YIDTLRIYIL
3LBDA	317	QLLPLEMDDT	ETGLLSAICL	ICGDRMDLEE	PEKVDKLQEP	LLEALRLYAR
4LBDA	317	QLLPLEMDDT	ETGLLSAICL	ICGDRMDLEE	PEKVDKLQEP	LLEALRLYAR
2LBDA	317	QLLPLEMDDT	ETGLLSAICL	ICGDRMDLEE	PEKVDKLQEP	LLEALRLYAR
1DB1A	319	GLKKLNLHEE	EHVLLMAICI	VSPDRPGVQD	AALIEAIQDR	LSNTLQTYIR
1BSXB	359	SLS3FNLDDT	EVALLQAVLL	MSSDRPGLAC	VERIEKYQDS	FLLAFEHYIN
<i>dmEcR</i>	459	N-RHCGDSMS	LVFY-AKLLS	ILTELRTLGN	QNAEMCFSLK	LKNRKL ---
3LBDA	367	R-RR--PSQP	Y-MF-PRMLM	KITDLRGIST	KGAERAITLK	M-EIPGP-MP
4LBDA	367	R-RR--PSQP	Y-MF-PRMLM	KITDLRGIST	KGAERAITLK	M-EIPG-PMP
2LBDA	367	R-RR--PSQP	Y-MF-PRMLM	KITDLRGIST	KGAERAITLK	ME-IPG-PMP
1DB1A	369	CRHP--P---	P-LLYAKMIQ	KLADLRSINE	EHSKQYRCLS	FQPECSMKL
1BSXB	409	Y-RK--HHVT	H-FW-PKLLM	KVTDLRMIGA	CHASRFLHMK	VE-CPTLFP

Figura 24. Alinhamento múltiplo de *dmEcR*-DIL com: 3LBD/4LBD (RXR gama [KLAHOLZ et al., 1998]); 2LBD (RXR gama [RENAUD et al, 1998]); 1DB1A (receptor de vitamina D [ROCHEL et al., 2000]) e 1BSXB (receptor do hormônio da tireóide [WAGNER et al, 1995]). Os resíduos conservados são mostrados em vermelho (resíduos idênticos) e em azul (resíduos com propriedades semelhantes).

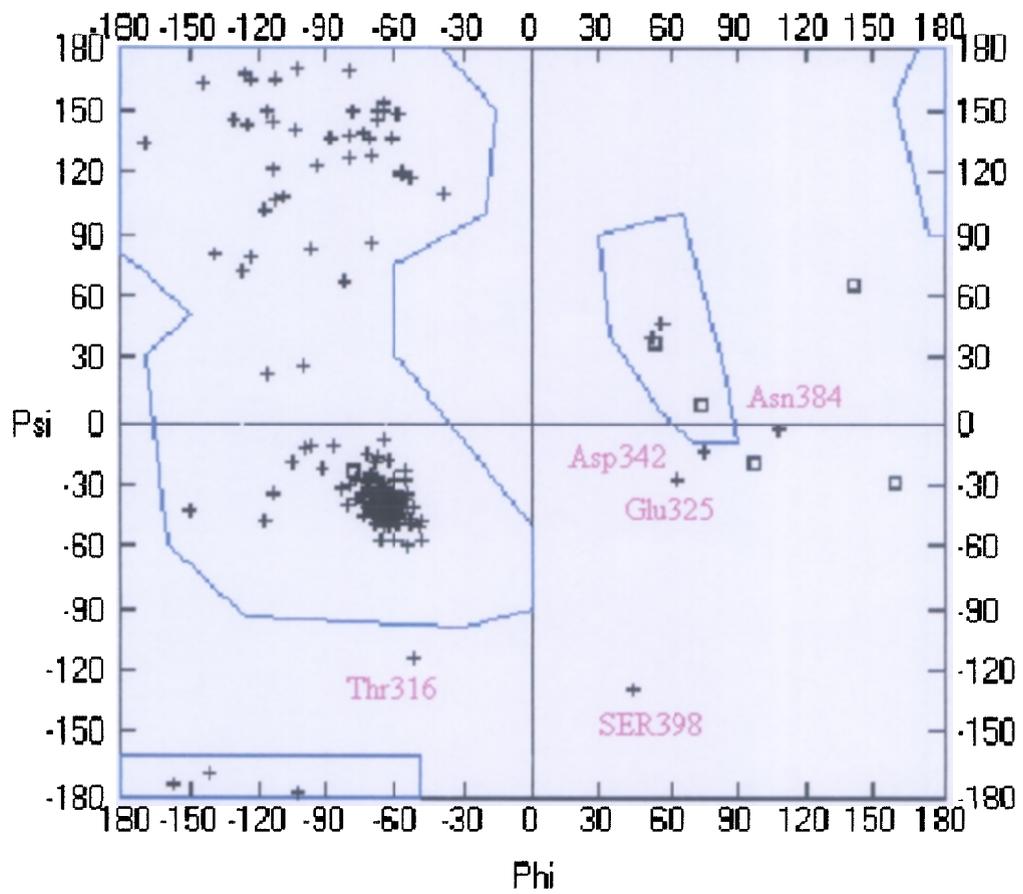


Figura 25. Gráfico de Ramachandran para o Modelo de *msEcR-DIL*.

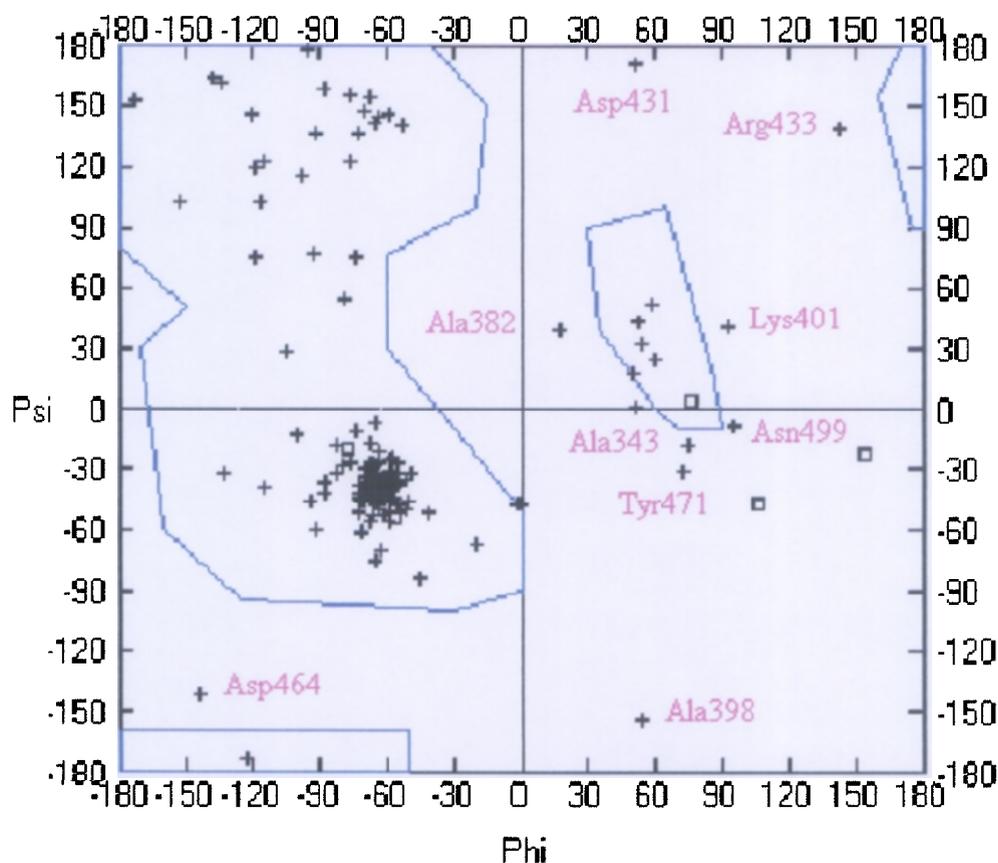


Figura 26. Gráfico de Ramachandran para o Modelo de *dmEcR-DIL*.

4.2.1. Definição do sítio de interação com o ligante (SIL) dos modelos dos EcRs

A definição da região dos sítios de interação com os ligantes dos EcRs (*msEcR-SIL* e *dmEcR-SIL*) foi realizada através da comparação dos aminoácidos que fazem parte do sítio ativo das proteínas moldes, uma vez que estes receptores foram cristalizados com o agonista natural ou sintético.

Observamos que, na sobreposição das proteínas moldes com as proteínas modeladas (*msEcR-DIL* e *dmEcR-DIL*), a região correspondente ao sítio ativo nas proteínas moldes ocupavam a mesma região nas proteínas modeladas.

Verificamos, após algumas tentativas, que os SILs poderiam ser bem representados pelos aminoácidos que tinham pelo menos um átomo até 6,0 Å de distância dos ligantes. Em seguida, identificamos, através do alinhamento múltiplo das seqüências dos aminoácidos das proteínas, os resíduos correspondentes aqueles selecionados para a delimitação do sítio ativo dos EcRs.

Os arquivos resultantes eram constituídos por alguns aminoácidos que se distanciavam muito da suposta cavidade de interação e foram retirados. Desta forma, alguns aminoácidos equivalentes, por exemplo, aqueles que mostram-se importantes para a interação com o ácido retinóico [RENAUD et al., 1995], conforme o alinhamento, não aparece nos modelos de sítio ativo definidos para os EcRs (Fig. 27).

Os aminoácidos do modelo do sítio ativo definido para os EcRs são, na sua maioria, hidrofóbicos. Os resíduos polares comuns para os dois modelos são Thr324, Thr327 Thr330, Arg367, Arg370. Avg371, Tyr392, Asn488, Cys492, Asn499 Lys490 e Lys501. Os resíduos polares não comuns, presentes no sítio atiro de *D. melanogaster*, são His322, Gln332, Glu362, Tyr387, Lys393 e Arg500.

Os modelos de SIL dos EcRs definidos a partir das estruturas modeladas foram minimizados com o campo de torça CVFF [OSGUTHORFE et al., 1988] do programa INSIGHT II 98,0 [Molecular Simulation Inc] até norma de gradiente inferior a 1 kcal/(Å ou rad), com todos os átomos livres. Esta etapa da otimização teve como objetivo reduzir repulsões estéricas e buscar conformações de melhor energia para modelo inicial

Ambos os modelos de sítio ativo foram usados para o atracamento de 20E e dos agonistas sintéticos do receptor de 20E.

4.3. As Interaçõedo Ligante Natural (20E) na Cavidade de hiteração com o Ligante (CIL)

Embora os modelos dos EcRs-DIL tenham sido desenvolvidos para estudos do modo de interação das DBHs com os EcRs, decidimos primeiramente avaliar como o modelo interagiria com 20E. para depois analisarmos a interação com os ligantes sintéticos, menores e mais flexíveis O caminho adotado é justificado pelo fato de ser o agonista natural uma molécula volumosa e com uma baixa flexibilidade conformacional na parte central de sua estrutura, caracterizando-o como um teste crítico para o modelo

Durante o procedimento de atracamento manual, observamos que eram possíveis duas orientações na inserção do agonista ao sítio de interação com o ligante (SIL) definido para *D. melanogaster* e *M. sexta* uma com o anel A do ecdisteróide próximo a entrada da cavidade de interação com o ligante (orientação I) e a outra com a cadeia lateral ao anel D próxima a esta entrada (orientação II), Depois de um refinamento, utilizando o método de mecânica molecular, o modelo de SIL dos EcRs foram simplificados para que pudéssemos aplicar o método de cálculo semi-empírico. Mantivemos apenas os aminoácidos que poderiam fazer interações significativas com o ligante. Os resíduos escolhidos para *D. melanogaster* foram: Ile323, Thr324, Ile326, Thr327 Thr330, leu333, Ser361 Met364, Met365, Arg367, Met368, Arg370, Arg371, Phe381 Tyr392 e Met397, para *M. Sexta*, os aminoácidos foram Thr324, Met326, Thr327, Leu329, Thr330. Leu333, He334, Ser361, Met364 Met365, Arg367, Val368, Arg370. Arg371, Phe381 e Ala382.

Os modelos de sítio ativo simplificados passam, a ser definidos como cavidade de interação com o ligante (CIL). Sendo assim, resolvemos denominar como msEcR-CILI e dmEcR-CILI a cavidade de interação para o agonista natural (20E) para *M. sexta* e *D. melanogaster*, respectivamente (composta por um maior número de resíduos), e msEcR-CIL2 e msEcR-CIL2 a cavidade de interação para os agonistas sintéticos (DB Hs) para *M. sexta* e *D. melanogaster*. respectivamente.

Nenhum dos resíduos selecionados caem em regiões desfavoráveis do gráfico de Ramachandran, ver Figuras 20 (pag.45) e 25 (pag. 44).

Para avaliar o conjunto das forças de interações presentes nos complexos modelados, determinamos a entalpia de interação entre o ligante e a CIL usando a fórmula

$$\Delta H_f^{\text{int}} = \Delta H_f (\text{CIL} \bullet \text{L}) - [\Delta H_f (\text{CIL})^* + \Delta H_f (\text{L})^*] \quad (5)$$

onde $\Delta H_f(\text{CIL} \bullet \text{L})$ representa o calor de formação para o complexo CIL/20E otimizado, e a soma $\Delta H_f(\text{CIL})^* + \Delta H_f(\text{L})^*$, se refere a soma dos calores, de formação de CIL e 20E,

respectivamente, com a mesma conformação complexo, isto é, este calor de formação foi determinado por um cálculo SCF simples componentes separados dos complexos otimizados. O valor de ΔH_f^{int} não representa a entalpia de interação completa, pois esta deveria também incluir termos associados com a variação conformacional e aqueles que acompanham a liberação das moléculas de água. No interação estabelecidas entre ligante e receptor. A Tabela 3 mostra que, para ambos os modelos, a entalpia de interação mais favorável está associada à orientação I do ligante na CIL. Entretanto, a preferência para esta orientação é menos expressiva para o caso de *msEcR-CIL1*, comparando-se aos valores de ΔH_f^{int} para *dmEcR-CIL1*.

Deve-se destacar que no modelo de EcR para o díptero *Chironomus tetans* (*ctEcR-DIL*), definido através de modelagem por homologia, utilizando como molde o receptor da vitamina D, WURTZ e colaboradores (2000) também observaram uma orientação similar, com o anel A de 20E próximo às cadeias laterais de Arg367 e Arg371 estabelecendo interações do ligação hidrogênio

Tabela 3. Entalpias de interação calculadas para os complexos entre o ligante (20E) e O modelos da cavidade de interação ao ligante (CIL) para *Manduca sexta* e *Drosophila melanogaster*.

Modelo	Ligante ^c	ΔH_f^a			$\Delta H_f^{int\ a\ b}$
		CIL•L	CIL* ^d	L* ^d	
<i>msEcR-CIL1</i>	20E-I	-514,12	-135,60	-333,42	-45,10
	20E-II	-525,44	-153,10	-330,29	-42,05
<i>dmEcR-CIL1</i>	20E-I	-490,33	-108,99	-327,84	-53,50
	20E-II	-487,06	-107,02	-336,75	-43,29

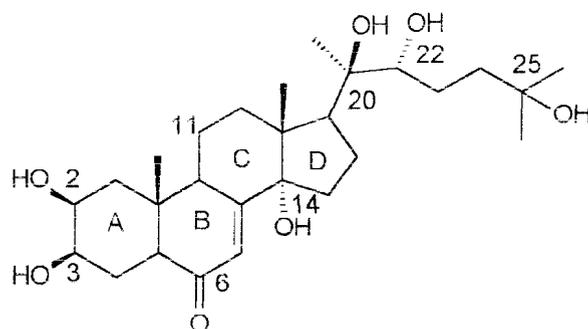
^a kcal/mol

^b calculado pela fórmula: $\Delta H_f^{int} = \Delta H_f(CIL\bullet L) - [\Delta H_f(CIL)* + \Delta H_f(L*)]$

^c orientação do ligante na cavidade do domínio de ligação ao ligante

^d ΔH_f determinado a partir da mesma conformação do complexo.

A Tabela 4 apresenta a distância da ligação hidrogênio entre o ligante e os resíduos nos modelos da CIL, para os complexos calculados. Os resultados aparecem em concordância com os resultados do entalpia. Quando o ligante é introduzido com a orientação I, ligações hidrogênio adicionais são formadas em comparação com a orientação II: uma para a *msEcR-CIL1* e duas para *UmEcR-CIL1*. Além das ligações hidrogênio, forças de dispersão entre 20E e grupos apolares dos aminoácidos devem contribuir para a formação do complexo receptor ligante, Foi observado que grupos metilas do ligante estão em contato com grupos apolares das cadeias laterais dos aminoácidos. No caso de *msEcR-CIL*, estes aminoácidos são Thr324, Thr330, Val368, Phe381 e Ala382; para *dmEcR-CIL 1*, Ile323, Arg367, Met368 e Tyr392.



20-Hidroxicodisona (20E)

Tabela 4. Distâncias das ligações hidrogênio entre os grupos de 20E e os aminoácidos dos modelos de EcR-CIL 1 de *M. sexta* e *D. melanogaster* (ligações entre o hidrogênio e o heteroátomo).

Modelo de msEcR-CIL1				
Resíduos	Thr327	Thr330	Arg367	Arg371
	OH	OH	NH ₂	NH ₂
20E I*	20-OH		6-C=O	2-OH
Distância (Å)	2,49		1,80	1,78
20E II*		14-OH	25-OH	
Distância (Å)		2,68	2,42	
Modelo de dmEcR-CIL 1				
Resíduos	Thr327	Thr330	Arg367	Arg371
	OH	OH	NH ₂	NH ₂
20E I*	22-OH	14-OH	2-OH	6-C=O
Distância (Å)	2,67	2,03	2,36	2,49
20E II*		14-OH	25-OH	
Distância (Å)		2,65	2,54	

* orientação do ligante dentro CIL (veja texto para detalhes)

4.4. As Interações das DBHs RH-2485 e RH-5849 na Cavidade de Interação ao Ligante (CIL)

Tal como para o agonista natural, duas orientações de baixa energia puderam ser encontradas para as DBHs dentro dos modelos de EcR-DIL, as orientações I e II. Estas orientações foram definidas através de um procedimento de atracamento manual, onde o anel aromático da DBH anel B ou anel A, respectivamente, está localizado próximo à entrada da cavidade do SIL.

As DBHs, diferente do agonista natural, são moléculas muito flexíveis que podem adotar várias conformações dentro das CILs. A conformação mais estável obtida para as DBHs foi inicialmente utilizada para a sua inserção na CIL. Após inspeção visual, os ângulos diedros dos ligantes foram girados manualmente para permitir a formação de ligações hidrogênio adicionais com as cadeias laterais dos aminoácidos. Para o estudo semi-empírico de interação das DBHs, o modelo simplificado do EcR-DIL, foi novamente redefinido, através da remoção dos aminoácidos que estavam muito distantes do ligante para estabelecer interações significativas. O novo modelo para *M. sexta* com as DBHs (msEcR-CIL2) teve a retirada dos aminoácidos Ile334, Ser361 Met365, enquanto que o novo modelo para *Drosophila melanogaster* (dmEcR-CIL2) teve a retirada de Ile323, Thr324 e Ler, 333.

A Tabela 5 traz a descrição das entalpias de interação dos complexos calculados Para ambos modelos de EcR, a entalpia de interação é mais negativa quando a orientação I é adotada pelas DBHs para interação com a cavidade do receptor, o que sugere que esta orientação permite um maior número interações intermoleculares favoráveis. Embora a interação de um ligante com o receptor seja determinada por uma série de termos entálpicos e entrópicos [ANDREWS et al., 1985], é interessante observar que a entalpia de interação calculada correlaciona-se com a atividade tóxica e a seletividade das DBHs. RH-2485 é mais ativa do que RH-5849 [DADHIALI, A E CARLSON, 1998; ISHAAYA et al., 1995] e, de fato, a entalpia de interação calculada com ambos modelos revela que a primeira DBH tem uma interação mais favorável. Além disso, RH-2485, seletivamente tóxico para lepidópteros, tem entalpia de interação com a CIL de *M. sexta* 11,81 Kcal/mol mais estável do que com a CIL de *D. melanogaster*. No caso da orientação I, as entalpias de interação de RH-5849 em ambos os receptores são muito próximas (1,01kcal/mol mais estável para CIL de *M. sexta*), o que está de acordo com a ausência de seletividade deste composto.

Tabela 5. Entalpias de: interação calculadas para os complexos entre os ligantes L (RH-2485 e RH-5849) e o modelos da cavidade de interação ao ligante (CIL) para *M. sexta* e *D. melanogaster*.

Modelo	Ligante ^c	ΔH_f^a			$\Delta H_f^{int\ a,b}$
		CIL•L	CIL* ^d	L* ^d	
<i>msEcR</i> -CIL2 Lepidóptero	RH-2485I	-268,23	-155,73	-64,03	-48,47
	RH-2485II	-233,88	-131,66	-64,71	-37,51
	RH-5849I	-196,89	-165,69	-6,07	-25,13
	RH-5849II	-177,68	-151,36	-6,93	-19,39
<i>dmEcR</i> -CIL2 Díptero	RH-2485I	-207,40	-106,89	-63,85	-36,66
	RH-2485II	-201,34	-117,40	-64,19	-19,76
	RH-5849I	-144,03	-115,65	-4,26	-24,12
	RH-5849II	-116,29	-102,28	-2,38	-11,62

^a kcal/mol

^b calculado pela fórmula: $\Delta H_f^{int} = \Delta H_f(CIL \cdot L) - [\Delta H_f(CIL)^* + \Delta H_f(L)^*]$

^c orientação do ligante na cavidade do domínio de ligação ao ligante.

^d ΔH_f determinado a partir da mesma conformação do complexo.

Uma possível razão para a orientação I ser energeticamente mais favorável pode ser observada na Tabela 6, onde as distâncias das ligações hidrogênio para os complexos são apresentadas. Um grande número de fortes ligações hidrogênio é observado para os ligantes nas CILs quando adotam aquela orientação. É interessante observar que o presente modelo sugere que a metoxila de RH-2485 como um grupo importante para a atividade, porque ela age como um ponto de interação adicional em ambos os receptores, por meio de uma ligação hidrogênio com o grupo guanidina de Arg370. Para a orientação II não se observa interação por ligação hidrogênio da metoxila de RH-2485 em qualquer dos modelos.

Uma comparação das estruturas dos complexos de RH-2485 em ambas CILs mostra que o agonista em *dmEcR*-CIL está localizado na parte mais profunda do modelo, onde ele interage por um menor número de ligações hidrogênio com o receptor, e de característica menos efetiva, ou seja, mais fracas (Tabela 6). É interessante observar que o grupo *t*-butil de RH-2485 está envolvido por um maior número de grupos apolares em *msEcR*-CIL2 do que em *dmEcR*-CIL2. A cavidade hidrofóbica onde o grupo *t*-butil está acomodado é definida por Met326, Leu329, o grupo metila de

Thr330, Leu333 e Ala382; no caso de *dmEcR-CIL2*, a cavidade hidrofóbica é definida por Ile326 e pelos grupos metílicos de Thr327, Thr330 e Phe381. Comparando os modelos de *msEcR-CIL* com 20E e com RH-2485, é possível verificar uma região que acomoda o grupo *t*-butil da DBH, que deve envolver interações favoráveis, do tipo forças de dispersão. No modelo com 20E, esta região é parcialmente ocupada pela metila 18 do ligante natural (Figs. 29 e 30). Entretanto, é difícil avaliar a quantidade de entalpia que cada interação apolar-apolar contribui para o ΔH_f^{int} e uma possível participação do grupo *t*-butil na seletividade de RH-2485 para lepidópteros deve ser considerada com cautela.

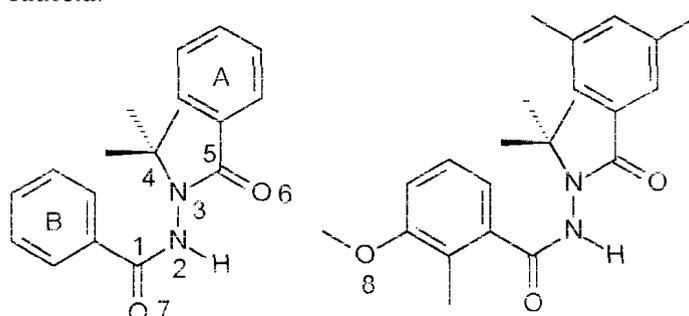


Tabela 6. Distâncias das ligações hidrogênio entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos dos modelos de EcR-CIL de *M. sexta* e *D. melanogaster* (ligações entre o hidrogênio e o heteroátomo).

<i>msEcR-CIL2</i> Lepidóptero						
Resíduos	Arg367	Arg370	Arg371		Thr330	
	NH1	NH2	NH2	HNε	OH	
RH-2485I*	O7	O8	O6	O6		
Distância (Å)	1,79	2,62	2,68	2,45		
RH-2485II*				O6	H(N2) O7	
Distância (Å)				2,80	2,85 1,82	
RH-5849I*				O7		
Distância (Å)				2,64		
RH-5849II*					H(N2) O7	
Distância (Å)					2,84 3,24	
<i>dmEcR-CIL2</i> Diptero						
Resíduos	Arg367	Arg370	Arg371		Met364	
	NH1	NH2	NH2	HNε	S	CO
RH-2485I*	O7	O8				
Distância (Å)	2,51	3,11				
RH-2485II*			O6			H(N2)
Distância (Å)			2,80			3,14
RH-5849I*	O7			O7	H(N2)	
Distância (Å)	2,38			2,64	3,29	
RH-5849II*						H(N2)
Distância (Å)						2,86

*orientação do ligante dentro CIL (veja texto para detalhes)

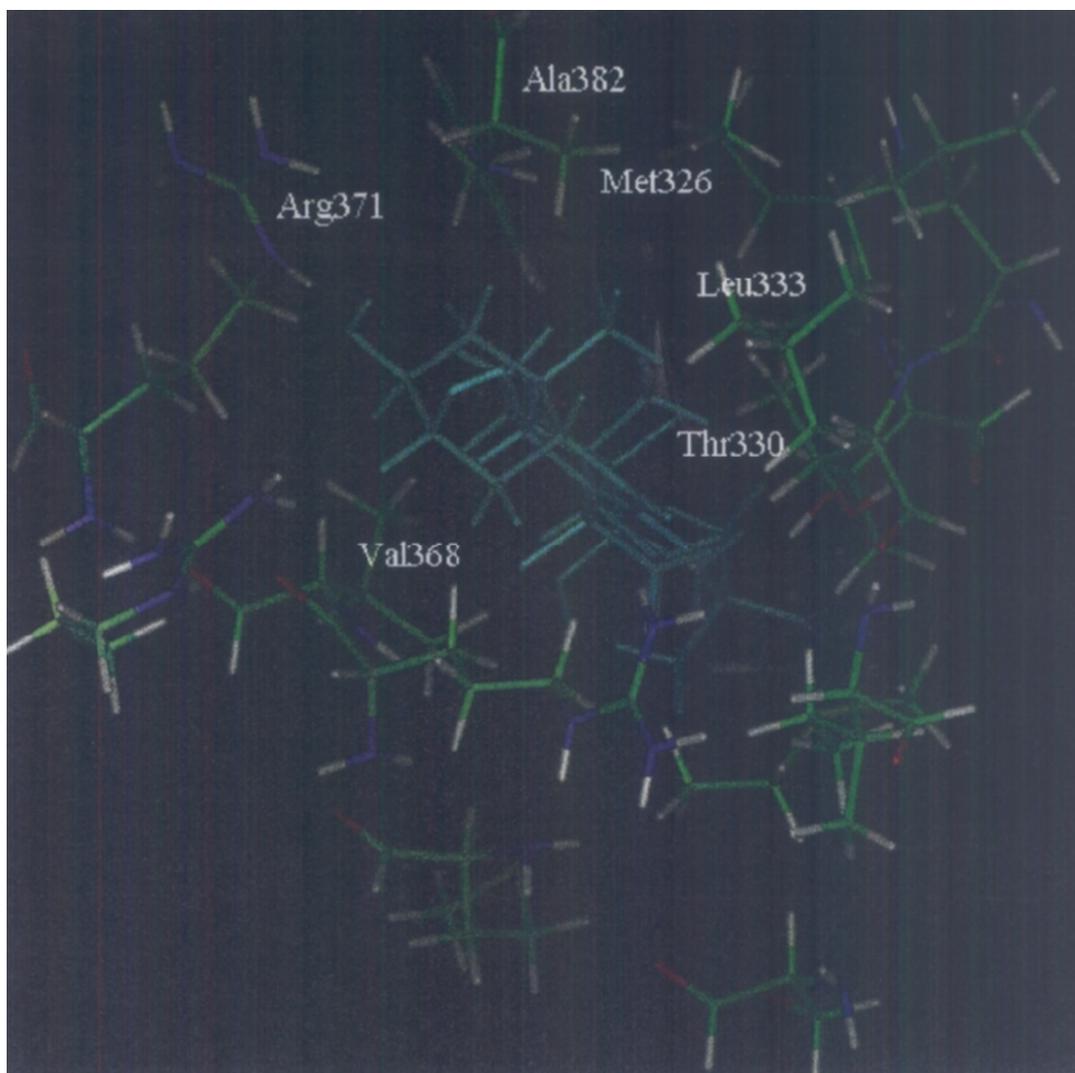


Figura 29. Modelo da *msEcR-CIL* com 20E (azul), otimizado com o método PM3 (orientação I). Código de cores dos átomos: verde = C, vermelho = O, azul escuro = N, amarelo = S e branco = H.

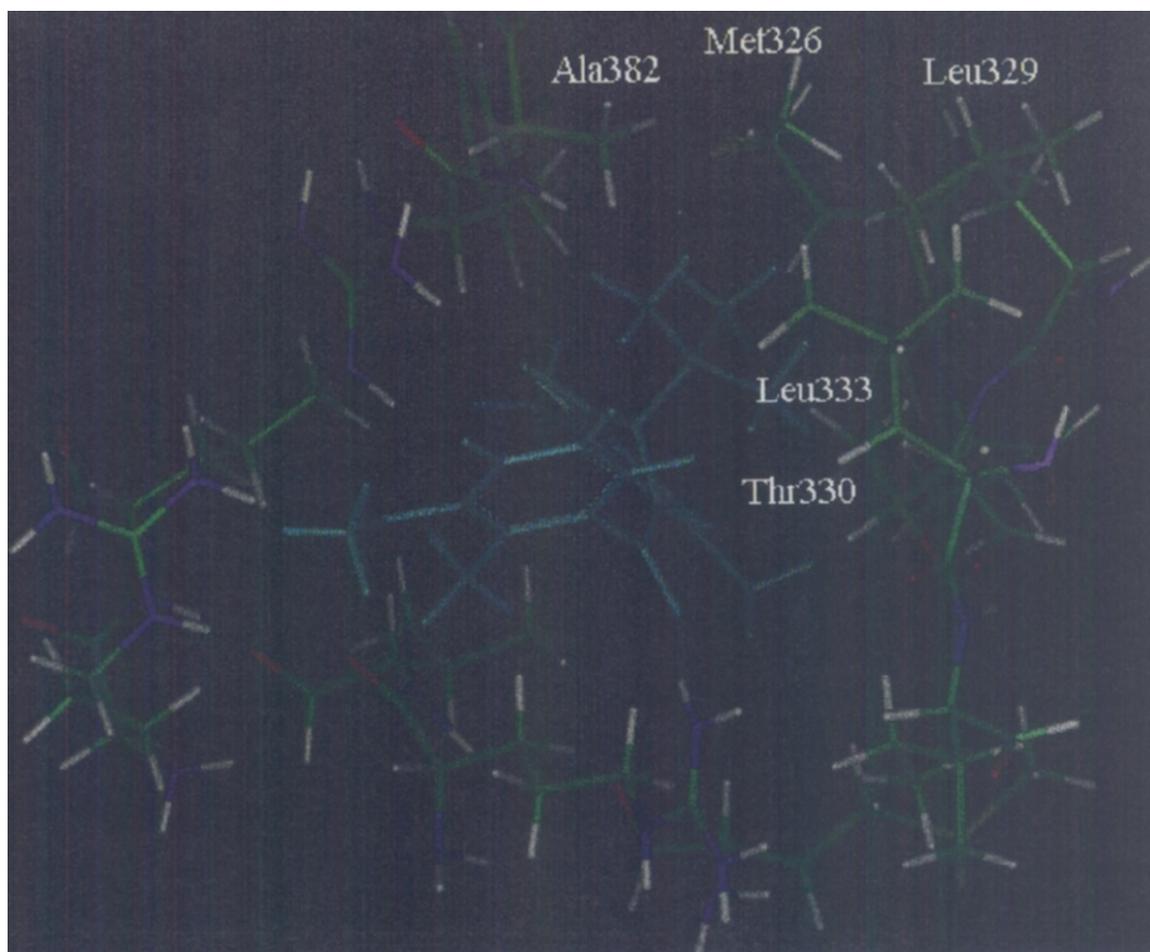


Figura 30. Modelo da *msEcR-CIL* com RH-2485 (azul), otimizado com o método PM3 (orientação I). Código de cores dos átomos representados na Figura: verde = C, vermelho = O, azul escuro = N, amarelo = S e branco = H.

Uma possível explicação para as diferentes posições de RH-2485 nas cavidades de ambos os modelos de EcR é sugerida através da comparação das estruturas otimizadas dos complexos agonista/receptor (Fig. 31). Verifica-se que em *msEcR-CIL2*, o anel 3,5-dimetil substituído do ligante está localizado próximo à cavidade hidrofóbica definida pelas cadeias laterais de Met326, Phe381 e Val368, mas, em *dmEcR-CIL2*, o anel é deslocado para dentro desta cavidade. Este deslocamento é provocado pelo fato de que, em *D. melanogaster*, Met326 é substituída por Ile326 e Val368 é substituída por Met368. Wurtz e colaboradores (2000) sugeriram que a presença de um resíduo de isoleucina ou valina na posição 326 em Díptera e Coleóptera gera contatos estéricos entre estes resíduos em um dos anéis de RH-5992, o que justifica a baixa atividade nestas espécies. Analogamente, propomos que RH-2485 não ocupa a mesma posição dentro de *msEcR-CIL2* porque a cavidade hidrofóbica definida pela cadeia lateral de Ile326, Phe381 e Met368 é também muito pequena para aceitar o anel 3,5-dimetil substituído do ligante (Fig. 31). Comparando os volumes de van der Waals dos resíduos 326 e 368 em ambas as cavidades de CILs, é possível observar que a Met368 em *dmEcR-CIL2* impede a acomodação do anel 3,5-dimetil substituído na cavidade de interação com o ligante.

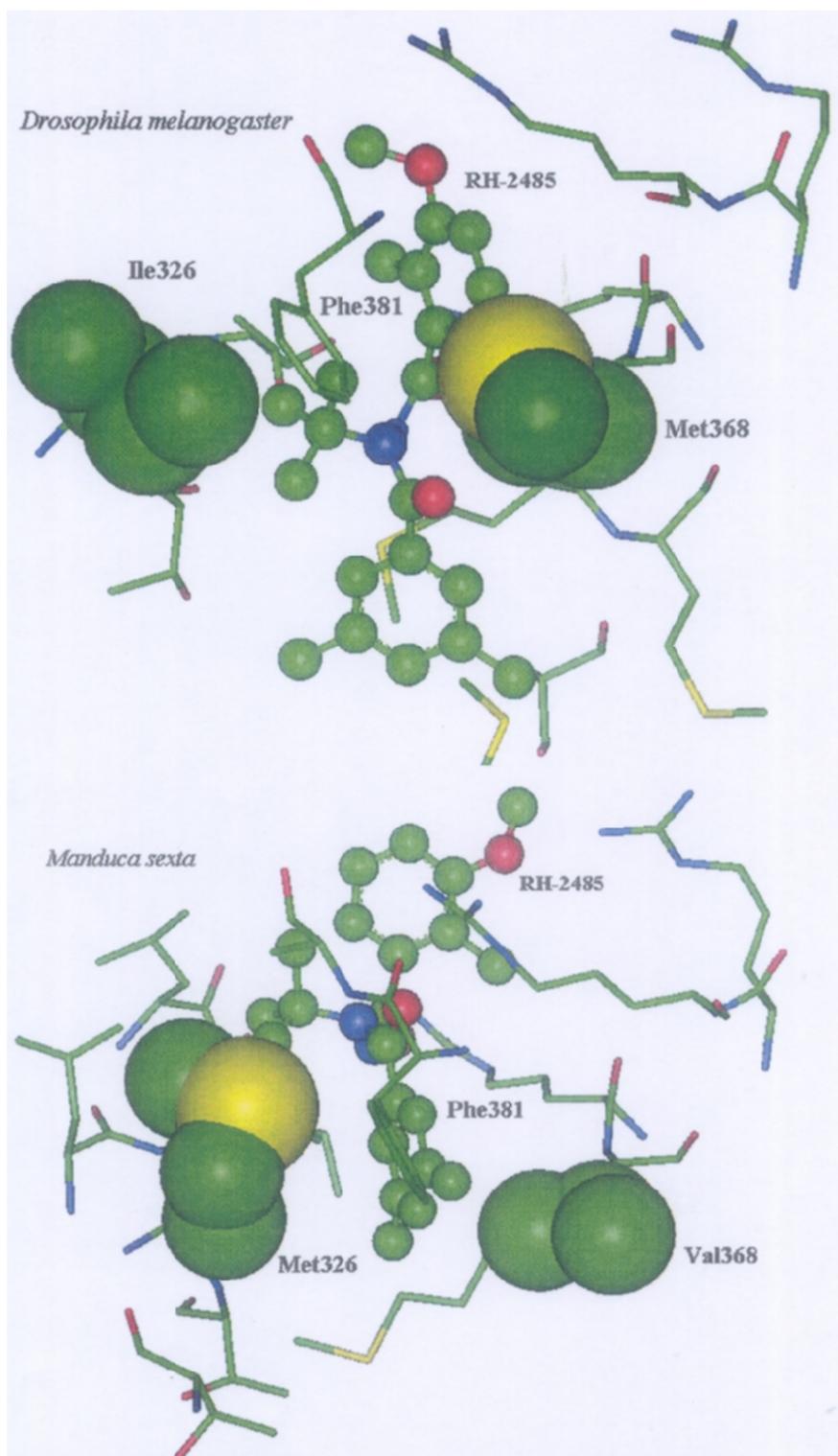


Figura 31. Representação dos complexos otimizados com o método semi-empírico PM3 para *dmRcR-CIL* e *msEcR-CIL* com RH-2485 (orientação I). Os átomos de hidrogênio foram omitidos. Os ligantes estão representados na forma de bolas e bastão e os resíduos 326 e 368 pelos seus raios de van der Waals.

4.5. Análise estrutural e diferenças energéticas para a interação de um grupo de DBHs utilizando o modelo de EcR de lepidóptero.

O estudo da interação cavidade/ligante envolvendo diferentes DBHs, através da correlação entre as diferenças energéticas no modelo de msEcR-CIL e os valores de pLD₅₀, foi desenvolvido com RH-2485, RH-5992, RH-5849 e a série das 1-*t*-butil-1-(2-cloro-henzoil)-2-(benzoil substituído)hidrazinas (Fig. 32)

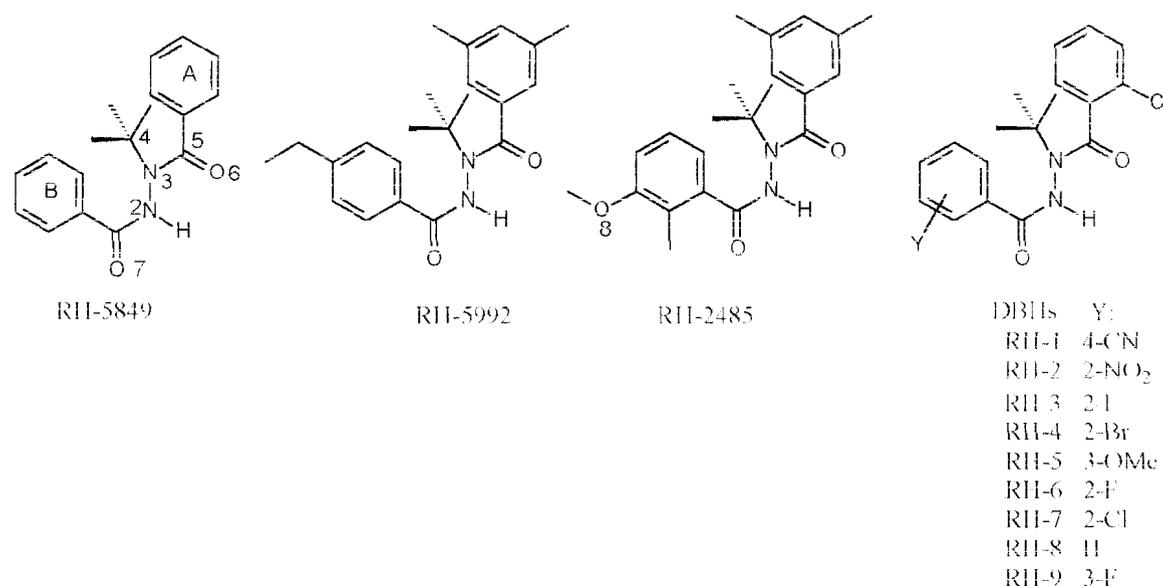


Figura. 32. Estruturas das DBHs utilizadas no estudo da correlação entre as diferenças energéticas no modelo de msEcR-CIL e os respectivos valores de pLD₅₀ frente a *Spodoptera exigua*.

No estudo realizado por SMAGGHE e colaboradores (1999), a toxidez destas substâncias frente ao lepidóptero da espécie *Spodoptera exigua*, no estágio larval, mostrou-se muito semelhante ao comportamento para o lepidóptero da espécie *Chilo suppressalis* [OIKAWA et al., 1994], apresentando correlação linear igual a 0,92 entre os valores de pLD₅₀ para as duas espécies [SMAGGHF. et al., 1999]. Estes resultados são justificados pelo fato destas espécies fazerem parte da mesma linha evolutiva, guardando consigo características genéticas muito próximas, o que pode ser identificado na elevada conservação de aminoácidos dos EcRs, que é de 84% entre os lepidópteros. Desta forma é provável que o mecanismo de ação destes compostos seja similar entre as diferentes espécies de lepidópteros e que as diferenças energéticas e estruturais calculadas pelo modelo de msEcR-CIL, possam permitir correlações com os valores de pLD₅₀ das DBHs.

A escolha dos ligantes envolveu exclusivamente a variação na atividade, conforme os valores de pLD₅₀, pois os efeitos eletrônicos dos substituintes não são predominantes para a atividade do aganista, prevalecendo efeitos de caráter estético. Esta observação sugere a limitação da análise do problema pela consideração apenas das estruturas isoladas dos ligantes, indicando a necessidade da avaliação do processo com um modelo que inclua a interação do receptor com os ligantes.

Conforme descrito na Introdução, muitos termos entálpicos e entópicos estão envolvidos no fenômeno do reconhecimento entre o receptor e o ligante (veja Fig. 15) A avaliação teórica do conjunto destes termos envolveria um investimento computacional proibitivo no âmbito do planejamento de molécula bioativas. Nossa proposta, então é reduzir ao máximo o conjunto de termos a ser avaliado, mas ainda assim obter informações significativas com relação ao mecanismo de ação das DBHs,

que possam ser úteis no planejamento de novos ligantes. Do ponto de vista da entalpia, o termo que deve ter uma contribuição mais significativa é o $\Delta H_{I,R}$ (Fig. 15), a entalpia de interação entre o ligante e o receptor. Conceitualmente, podemos considerar este termo como constituído por dois outros termos, o custo entálpico para as mudanças conformacionais que acontecem durante o ajuste induzido das estruturas do receptor e do ligante (ΔH_f^{conf}) e a entalpia associada com o estabelecimento de interações intermoleculares entre as estruturas (ΔH_f^{int}) como, por exemplo, ligações hidrogênio, interações dipolo-dipolo e forças de dispersão (Fig. 33).

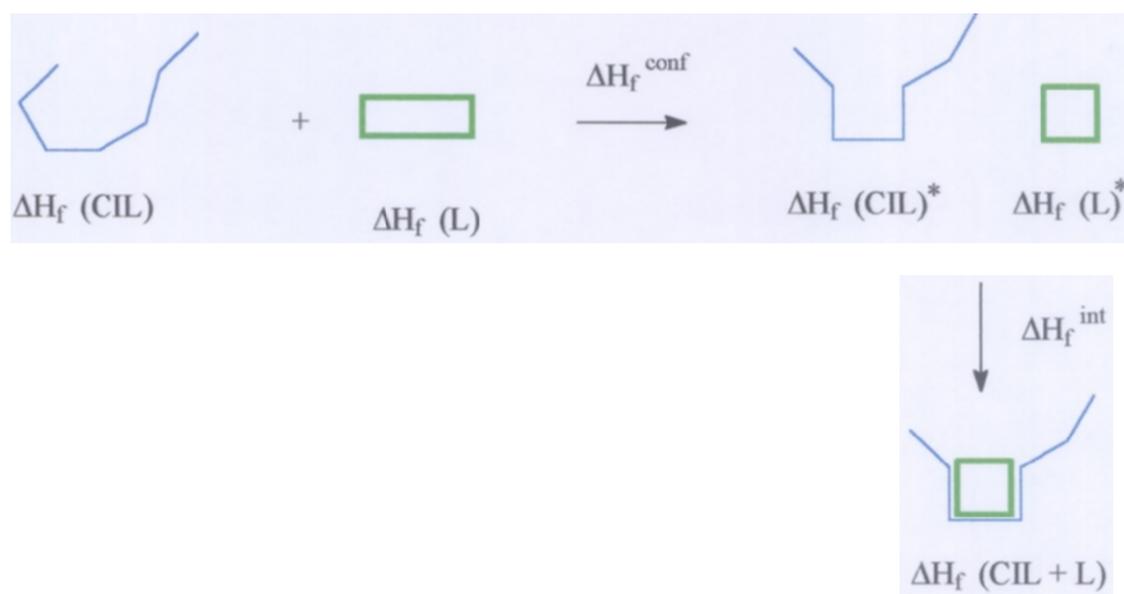


Figura 33. Representação esquemática de etapas hipotéticas do processo de interação CIL/ligante, com os termos de variação de entalpia associados. Veja texto para detalhes.

Neste trabalho, utilizamos a modelagem pelo método semi-empírico para avaliar teoricamente esses dois termos entálpicos, no caso da interação entre o EcR e seus agonistas. Pela Figura 33,

$$\Delta H_f^{int} = \Delta H_f(CIL \cdot L) - [\Delta H_f(CIL)^* + \Delta H_f(L)^*] \quad (5)$$

$$\Delta H_f^{conf} = [\Delta H_f(CIL)^* + \Delta H_f(L)^*] - [\Delta H_f(CIL) + \Delta H_f(L)] \quad (6)$$

onde

$\Delta H_f(CIL)^*$ é o calor de formação de CIL na conformação adotada após a inserção do ligante (cálculo de 1SCF da CIL após retirada do ligante do complexo otimizado);

$\Delta H_f(L)^*$ é o calor de formação do ligante na conformação adotada após a inserção na CIL (cálculo de 1SCF do ligante após a retirada do ligante do complexo otimizado);

$\Delta H_f(CIL)$ é o calor de formação da CIL otimizada.;

$\Delta H_f(L)$ é o calor de formação do ligante otimizado;

$\Delta H_f(CIL \cdot L)$ é o calor de formação do complexo otimizado entre a CIL e ligante.

A Tabela 7 traz a descrição das entalpias de interação e da mudança conformacional dos complexos calculados com o método semi-empírico PM3, para as duas orientações na cavidade do ligante. Com exceção da DBH que tem um grupo ciano (CN) na posição 4 do anel B, todas as demais entalpias de interação são mais negativas quando a orientação I é adotada pelas DBHs, para a interação com a cavidade do receptor. Estes dados confirmam a sugestão apresentada anteriormente, de que a orientação I permite um maior número de interações intermoleculares favoráveis. Da mesma forma, a entalpia de conformação também revelou valores de ΔH_f^{conf} menos positivos para a orientação I. Desta forma, a associação receptor/ligante quando esta orientação é adotada, além de estabelecer mais interações favoráveis, tem um menor custo conformacional.

É interessante observar que a entalpia de interação apresenta correlação significativa com os valores de pLD_{50} das DBHs, com R igual a -0,82 para a orientação I e -0,79 para a orientação II, quando os cálculos envolvem o método PM3 (Tabela 8). Entretanto, o valor de 5,82 para o desvio padrão quando a orientação I é adotada, sugere que o modelo tem dificuldades em diferenciar, através dos cálculos de entalpia, agonistas com pequenas variações estruturais e de toxicidade muito próximas. Este é um resultado esperado, uma vez que a interação do ligante com o receptor é também determinada por outros termos entálpicos e entrópicos [ANDREW et al., 1985], que não são avaliados através da metodologia desenvolvida neste trabalho.

Tabela 7. Entalpias de formação calculadas pelo método semi-empírico PM3 para os complexos entre o modelo de *msEcR*-CIL e os ligantes (L) e os respectivos valores de pLD_{50} .

Orientação	Ligante ^b	pLD_{50}	CIL•L	CIL* ^c	ΔH_f^a		L	ΔH_f^{in}	ΔH_f^{conf}	
					L* ^c	CIL				
I	RH-1	Y = 4CN	4,82	-163,15	-168,78	22,12		20,31	-16,49	7,62
	RH-2	Y = 2NO ₂	4,86	-195,78	-156,24	-13,19		-17,45	-26,35	22,61
	RH-5849		4,91	-196,89	-165,69	-6,07		-9,90	-25,13	12,73
	RH-3	Y = 2I	4,97	-158,40	-161,93	21,08		16,74	-17,55	17,00
	RH-4	Y = 2Br	4,98	-184,48	-160,54	1,18		-3,26	-25,12	18,49
	RH-5	Y = 3OMe	5,36	-236,06	-160,08	-46,86		-52,21	-29,12	19,86
	RH-6	Y = 2F	5,62	-236,44	-160,58	-50,38	-174,59	-55,68	-25,48	19,31
	RH-7	Y = 2Cl	6,05	-197,83	-160,69	-12,99		-18,46	-24,15	19,35
	RH-8	Y = H	6,37	-186,61	-154,34	-9,44		-14,47	-22,83	25,28
	RH-9	Y = 3F	6,43	-238,78	-160,38	-52,35		-57,18	-26,05	19,04
	RH-5992		7,07	-239,80	-156,15	-38,32		-42,81	-45,33	22,93
RH-2485		8,27	-268,23	-155,73	-64,03		-72,92	-48,47	27,95	
II	RH-1	Y = 4CN	4,82	-140,94	-145,46	28,95		20,31	-24,43	37,77
	RH-2	Y = 2NO ₂	4,86	-173,00	-141,80	-12,95		-17,45	-18,25	37,29
	RH-5849		4,91	-177,68	-151,36	-6,93		-9,90	-19,39	26,20
	RH-3	Y = 2I	4,97	-146,70	-151,20	21,34		16,74	-16,84	27,99
	RH-4	Y = 2Br	4,98	-162,81	-144,59	-0,24		-3,26	-17,98	33,02
	RH-5	Y = 3OMe	5,36	-215,20	-143,69	-47,81		-52,21	-23,70	35,30
	RH-6	Y = 2F	5,62	-215,89	-144,04	-52,09	-174,59	-55,68	-19,76	34,14
	RH-7	Y = 2Cl	6,05	-179,86	-144,13	-14,71		-18,46	-21,02	34,21
	RH-8	Y = H	6,37	-176,73	-145,33	-10,98		-14,47	-20,42	32,85
	RH-9	Y = 3F	6,43	-216,60	-144,16	-53,11		-57,18	-19,33	34,50
	RH-5992		7,07	-206,94	-136,57	-33,92		-42,81	-36,45	46,91
RH-2485		8,27	-233,88	-131,66	-64,71		-72,92	-37,51	51,14	

^a kcal/mol; ^b orientação do ligante na cavidade do domínio de ligação ao ligante; ^c ΔH_f determinado a partir da mesma conformação do complexo.

Tabela 8. Correlações entre os valores de ΔH_f^{int} e ΔH_f^{int} com pLD_{50} para os complexos estudados pelo método PM3.

	Orientação	R	SD
ΔH_f^{int}	I	-0,82	5,82
	II	-0,79	4,18
ΔH_f^{conf}	I	0,72	3,95
	II	0,77	4,73

É possível observar que apesar de 1-*t*-butil-1-(2-cloro-benzoil)-2-benzoil hidrazina (Y = H) ser, aproximadamente, 4 vezes mais ativa do que RH-5849, o valor da entalpia de interação para o complexo com RH-5849 é 2,30 kcal/mol mais favorável quando a orientação I é adotada. No entanto, para a orientação II, os valores de ΔH_f^{int} mostram-se em acordo com os valores de pLD_{50} , sugerindo, neste caso, que possivelmente, a orientação II é mais favorecida do que a orientação I (Tabela 7).

Outras observações merecem destaque, como por exemplo, o alto valor de ΔH_f^{int} para o complexo com RH-1 e RH-3 na orientação I. Diferente das demais DBHs, na conformação adotada por RH-1 na CIL, os anéis aromáticos do ligante se dispõem na forma aproximadamente ortogonal. Nesta disposição, o grupo *t*-butila é parcialmente deslocado, tornando as interações com Met326, Leu329, o grupo metila de Thr330, Leu333 e Ala382 pouco efetivas. Para RH-3, provavelmente, pelo fato do iodo ser um átomo volumoso, as interações promovidas na CIL devem ser pouco favoráveis. É também interessante observar que para a orientação I, a ligação hidrogênio entre O7 de RH-5849 e HNe (Arg371) de msEcR-CIL2 difere muito pouco do valor encontrado em RH-8 (Tabela 11). Este fato justifica a pequena diferença de entalpia de interação para estas DBHs, mostrando-se discordantes com a atividade tóxica.

Por outro lado, a variação da posição do substituinte revelou correlações bastantes significativas entre ΔH_f^{int} e a atividade tóxica das DBHs. Por exemplo, para a orientação I, RH-6 e RH-9 apresentaram ΔH_f^{int} igual a -25,48 e -26,05 Kcal/mol, respectivamente, e valores de pLD_{50} 5,62 e 6,43, respectivamente (Tabela 7). Este resultado pode ser justificado pelo fato de que o flúor na posição 3 do anel B promove uma interação adicional, através de uma ligação hidrogênio com o grupo guanidínio de Arg367. É interessante observar que a ΔH_f^{int} da DBH equivalente, sem substituinte no anel B, é menos favorável do que a RH-9 (com o flúor na posição 3 do anel B), correlacionando-se com a atividade tóxica destes agonistas e sustentando a sugestão apresentada anteriormente, de que no presente modelo, a posição 3 do anel B age como um ponto de interação adicional entre o ligante e receptor.

No entanto, RH-5 que apresenta atividade tóxica maior do que RH-5849 e menor do que RH-6, possui ΔH_f^{int} igual a -29, 12 kcal/mol, que é apenas menos favorável do que RH-5992 e RH-2485. Estes resultados expressam que outros fatores podem ser mais significativos para a atividade tóxica dessas DBHs.

Para o método PM3, a correlação entre os valores de pLD_{50} e a entalpia de conformação é menos significativa do que a correlação com a entalpia de interação, revelando melhor correlação para a orientação II (Tabela 8). Isto sugere que a energia fornecida nas interações é o fator mais importante na diferenciação das DBHs.

Analisando os valores das entalpias para o método AM1 (Tabelas 9 e 10), podemos observar que todos os valores de entalpia de interação são mais negativos quando a orientação I é adotada pelas DBHs, para a interação com a cavidade do receptor. Da mesma forma, a entalpia de conformação revelou valores menos positivos para a orientação I, com exceção de RH-5992 e RH-2485.

Tabela 9. Entalpias de formação calculadas pelo método semi-empírico AM1 para os complexos entre o modelo de *msEcR*-CIL e os ligantes (L) e os respectivos valores de pLD_{50} .

Orientação	Ligante ^b	pLD_{50}	CIL•L	CIL* ^c	ΔH_f^a		L	ΔH_f^{int}	ΔH_f^{conf}	
					L* ^c	CIL				
I	RH-1	Y = 4CN	4,82	-175,59	-214,43	47,80		42,76	-8,96	14,66
	RH-2	Y = 2NO ₂	4,86	-199,66	-211,05	28,76		19,47	-17,37	22,29
	RH-5849		4,91	-205,59	-215,31	21,55		17,86	-11,83	12,43
	RH-3	Y = 2I	4,97	-178,13	-208,29	42,08		34,30	-11,92	23,54
	RH-4	Y = 2Br	4,98	-191,11	-208,40	29,43		19,71	-12,14	25,37
	RH-5	Y = 3OMe	5,36	-244,88	-208,51	-16,83	224,05	-23,68	-19,54	20,39
	RH-6	Y = 2F	5,62	-245,58	-209,37	-22,14		-31,88	-14,07	24,42
	RH-7	Y = 2Cl	6,05	-204,60	-208,88	16,23		6,79	-11,95	24,61
	RH-8	Y = H	6,37	-199,26	-206,82	18,68		11,03	-11,12	24,88
	RH-9	Y = 3F	6,43	-249,56	-208,34	-25,14		-33,39	-16,08	23,96
	RH-5992		7,07	-238,38	-201,27	-8,39		-10,92	-28,72	32,13
	RH-2485		8,27	-265,55	-199,35	-28,79		-40,65	-37,41	38,26
II	RH-1	Y = 4CN	4,82	-147,21	-193,81	49,26		42,76	-2,66	36,74
	RH-2	Y = 2NO ₂	4,86	-166,15	-190,53	27,03		19,47	-2,65	41,08
	RH-5849		4,91	-185,11	-199,52	21,17		17,86	-6,76	27,84
	RH-3	Y = 2I	4,97	-161,13	-196,60	39,42		34,30	-3,95	32,57
	RH-4	Y = 2Br	4,98	-174,90	-196,69	26,67		19,71	-4,88	34,32
	RH-5	Y = 3OMe	5,36	-225,19	-196,94	-19,97	224,05	-23,68	-8,28	30,82
	RH-6	Y = 2F	5,62	-228,87	-197,01	-25,70		-31,88	-6,16	33,22
	RH-7	Y = 2Cl	6,05	-189,03	-196,78	13,44		6,79	-5,69	33,92
	RH-8	Y = H	6,37	-178,85	-189,61	17,15		11,03	-6,39	40,56
	RH-9	Y = 3F	6,43	-229,10	-197,03	-27,31		-33,39	-4,76	33,10
	RH-5992		7,07	-212,51	-195,69	-7,47		-10,92	-9,35	31,81
	RH-2485		8,27	-242,43	-196,34	-36,14		-40,65	-9,95	32,22

^a kcal/mol; ^b orientação do ligante na cavidade do domínio de ligação ao ligante; ^c ΔH_f determinado a partir da mesma conformação do complexo.

Tabela 10. Correlações entre os valores de ΔH_f^{int} e ΔH_f^{conf} com pLD_{50} para os complexos estudados pelo método AM1.

	Orientação	R	SD
ΔH_f^{int}	I	-0,81	5,18
	II	-0,74	1,68
ΔH_f^{conf}	I	0,84	3,82
	II	Não houve correlação significativa	

Os resultados com o método AMI são bem semelhantes aos obtidos com o PM3. As diferenças mais significativas envolvem, por exemplo, os valores de entalpia de interação do complexo com RH-1, mais favorável para a orientação I. No entanto, é possível observar que a molécula também deixa de realizar interações entre O7 e HNε (Arg371) (Tabela 12). A análise das estruturas revelou o mesmo comportamento quando o método PM3 foi empregado.

Também merece destaque os resultados de entalpia de interação para o complexo com o ligante RH-2, cujo valor é bem mais negativo do que o complexo com o ligante RH-8. A diferença de entalpia entre os complexos é de -6,25 kcal/mol com o método AMI e de -3,52 kcal/mol com PM3. O baixo valor de ΔH_f^{int} pode ser justificado pela ligação hidrogênio que o grupo nitro estabelece com HNε (Arg371). Contudo, a ligação hidrogênio entre O7 e HNε (Arg371) mostra-se menos efetiva na CIL (Tabelas 11 e 13), pois os efeitos provocados pelo grupo nitro na posição 2 do anel B, deslocam o ligante para uma outra posição na CIL. A maior diferença de entalpia entre os complexos para os valores calculados pelo método de AM1, deve-se ao fato de que a ligação hidrogênio entre o grupo nitro (NO₂) do ligante e HNε, (Arg371) é mais efetiva.

Os cálculos com o semi-empírico AMI também revelaram correlações significativas entre a entalpia de interação dos complexos e os valores de pLD_{50} das DBHs, com R igual a -0,81 para a orientação I e -0,74 para a orientação II.

No entanto, o resultado da correlação entre entalpia de conformação calculada com o método AMI dos complexos estudados e os valores de pLD_{50} para os ligantes revelou valor de R igual a 0,84 para orientação I e ausência de correlação para a orientação II.

Tabela 11. Distâncias das ligações hidrogênio XH...Y entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos do modelo *msEcR-CIL* para os cálculos com PM3, na orientação I.

Ligante	XH	Y	Distância XH...Y
RH-1	NH1 (Arg367)	4CN (B)	3,39
RH-2	HNε (Arg371)	2NO ₂ (B)	3,04
RH-5849	HNε (Arg371)	O7	2,64
RH-3	HNε (Arg371)	2I (B)	3,76
	HNε (Arg371)	O7	2,90
RH-4	HNε (Arg371)	2Br (B)	3,44
	HNε (Arg371)	O7	2,6
RH-5	NH1 (Arg367)	OMe (B)	2,68
	HNε (Arg371)	O7	2,57
	HNε (Arg371)	O7	2,61
RH-7	HNε (Arg371)	O7	2,60
RH-8	HNε (Arg371)	O7	2,59
RH-9	NH1 (Arg367)	3F	1,78
	HNε (Arg371)	O7	2,60
RH-5992	NH1 (Arg367)	O7	2,54
	NH2 (Arg371)	O6	2,67
	HNε (Arg371)	O6	1,85
RH-2485	NH1 (Arg367)	O7	1,79
	NH2 (Arg370)	O8	2,62
	NH2 (Arg371)	O6	2,68
	HNε (Arg371)	O6	2,45

Tabela 12. Distâncias das ligações hidrogênio XH...Y entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos do modelo *msEcR-CIL* para os cálculos com PM3, na orientação II.

Ligante	XH	Y	Distância XH...Y
RH-1	OH (Thr330)	H(N2)	2,45
	NH2 (Arg371)	2C1 (A)	2,96
	HNε (Arg371)	O6	3,08
RH-2	OH (Thr330)	H(N2)	2,84
RH-5849	OH (Thr330)	H(N2)	2,84
	OH (Thr330)	O7	3,24
RH-3	OH (Thr330)	H(N2)	2,58
	OH (Thr330)	O7	3,57
RH-4	OH (Thr330)	H(N2)	2,82
	OH (Thr330)	O7	3,57
RH-5	OH (Thr330)	H(N2)	2,69
	OH (Thr330)	O7	3,44
	HNε (Arg371)	O6	3,48
RH-6	OH (Thr330)	H(N2)	2,46
	HNε (Arg371)	O6	3,08
RH-7	OH (Thr330)	H(N2)	2,46
	OH (Thr330)	O7	3,54
	HNε (Arg371)	O6	3,47
RH-8	OH (Thr330)	H(N2)	2,80
RH-9	OH (Thr330)	H(N2)	2,13
	OH (Thr330)	O7	3,17
	OH (Thr330)	H(N2)	3,18
RH-5992	OH (Thr330)	O7	1,80
	HNε (Arg371)	O6	2,83
	OH (Thr330)	H(N2)	2,85
RH-2485	OH (Thr330)	O7	1,82
	HNε (Arg371)	O6	2,80

Tabela 13. Distâncias das ligações hidrogênio entre XH...Y os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos do modelo *msEcR-CIL* para os cálculos com AM1, na orientação I.

Ligante	XH	Y	Distância XH...Y
RH-1	NH1 (Arg367)	4CN (B)	3,28
RH-2	HNε (Arg371)	2NO ₂ (B)	2,76
RH-5849	HNε (Arg371)	O7	2,33
RH-3	HNε (Arg371)	2I (B)	3,33
	HNε (Arg371)	O7	2,90
RH-4	HNε (Arg371)	2Br (B)	3,34
	HNε (Arg371)	O7	2,38
RH-5	NH1 (Arg367)	OMe (B)	2,08
	HNε (Arg371)	O7	2,26
RH-6	HNε (Arg371)	O7	2,26
RH-7	HNε (Arg371)	O7	2,32
	HNε (Arg371)	Cl (A)	3,28
RH-8	HNε (Arg371)	O7	2,39
RH-9	NH1 (Arg367)	3F	2,08
	HNε (Arg371)	O7	2,30
RH-5992	NH1 (Arg367)	O7	1,99
	NH2 (Arg371)	O6	2,08
	HNε (Arg371)	O6	2,11
RH-2485	NH1 (Arg367)	O7	2,14
	NH2 (Arg370)	O8	2,18
	NH2 (Arg371)	O6	2,25
	HNε (Arg371)	O6	2,07

Tabela 14. Distâncias das ligações hidrogênio XH...Y entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos do modelo *msEcR-CIL* para os cálculos com AM1, na orientação II

Ligante	XH	Y	Distância XH...Y
RH-1	OH (Thr330)	H(N2)	2,14
RH-2	OH (Thr330)	H(N2)	2,21
RH-5849	OH (Thr330)	O7	3,48
	OH (Thr330)	H(N2)	2,15
	OH (Thr330)	O7	3,19
RH-3	HNe (Arg371)	O6	3,53
	OH (Thr330)	H(N2)	2,24
RH-4	OH (Thr330)	O7	3,48
	OH (Thr330)	H(N2)	2,20
RH-5	OH (Thr330)	O7	3,43
	OH (Thr330)	H(N2)	2,14
RH-6	OH (Thr330)	O7	3,18
	OH (Thr330)	H(N2)	2,21
RH-7	OH (Thr330)	O7	3,25
	OH (Thr330)	H(N2)	2,18
RH-8	OH (Thr330)	O7	3,35
	OH (Thr330)	H(N2)	2,21
RH-9	OH (Thr330)	O7	3,27
	OH (Thr330)	H(N2)	2,69
RH-5992	OH (Thr330)	O7	3,17
	OH (Thr330)	H(N2)	2,13
RH-2485	OH (Thr330)	O7	3,49
	OH (Thr330)	H(N2)	2,23

4.6. Comparação das conformações das DBHs no modelo da CIL do EcR de lepidóptero

Ao analisar a conformação das DBHs na CIL constatamos que as DBHs estudadas podem apresentar duas conformações do tipo "torcida", uma com valor do ângulo diedro (ϕ) CO-N-N-CO entre 115° e 135°; a outra com valor de ϕ entre - 120° e - 135° (Tabela 15).

Tabela 15. Valores dos ângulos diedro (ϕ) entre as ligações C₁N₂N₃C₄ das DBHs no modelo *msEcR-CIL* para os cálculos com PM3, orientações I e II.

Ligantes	ϕ -I	ϕ -II
RH-1	95,5	130,4
RH-2	126,9	115,4
RH-5849	116,1	127,7
RH-3	122,0	122,6
RH-4	129,1	122,0
RH-5	118,7	127,3
RH-6	127,1	127,6
RH-7	125,6	128,7
RH-8	130,3	124,3
RH-9	129,0	128,0
RH-5992	-124,4	132,6
RH-2485	-130,4	126,4

A análise conformacional da estrutura cristalina de RH-5849 e RH-5992 revelaram uma forma ortogonal "torcida", tomando como referência a hidrazina central que está ligada aos grupos *cis* amida e *t*-butil (Fig. 34) [CHAN et al., 1990; HSU et al., 1887]. WURTZ e colaboradores (2000), ao estudarem a barreira rotacional entre a ligação N-N de RH-5849 pelo método computacional RI-DFT [Brode et al., 1993], verificaram duas classes conformacionais com mínimos de energia, a primeira formada por estruturas com valores de ϕ entre 35 e 135° e a outra com valores de ϕ entre -35 e -135° (Fig. 34). No estudo, o ângulo diedro (ϕ) CO-N-N-CO foi girado através de incrementos de 15°, com variação de 0° a 360°, mantendo-se o ângulo ϕ fixado durante cada otimização estrutural. Os resultados revelaram barreiras rotacionais que variaram de 10 a 18 kcal/mol. As conformações com ângulos negativos correspondem à estrutura cristalina. A outra conformação, designada por "torcida", pode ser obtida através de uma rotação de aproximadamente 180° da amida *trans* substituída [WURTZ et al., 2000].

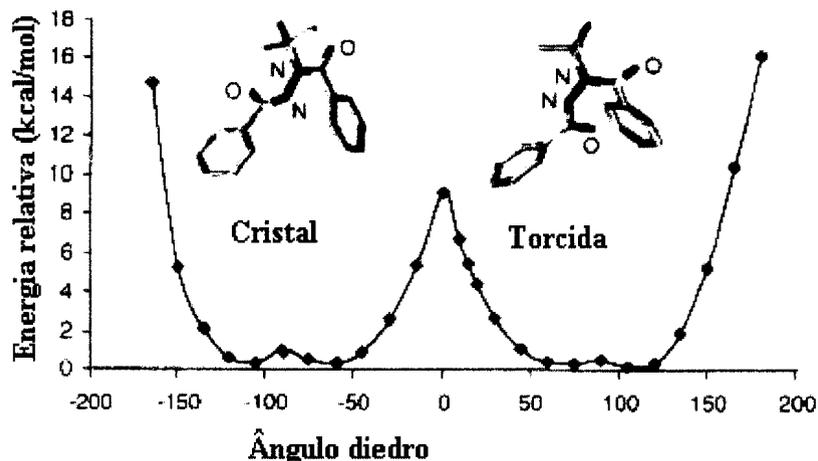


Figura 34. Diagrama de energia relativa das conformações obtidas para depois da rotação e fixação da ligação N-N central e minimização do restante da molécula de RH-5849. O mínimo da esquerda corresponde à conformação da estrutura cristalina e o mínimo à direita corresponde à conformação "torcida" [WURTZ et al., 2000].

Ao estudarmos a barreira rotacional para RH-2485 utilizando o método semi-empírico PM3, onde também giramos o ângulo diedro (ϕ) CO-N-N-CO através de incrementos de 15° , com variação de 0° a 360° , mantendo-se o ângulo ϕ fixado, constatamos o mesmo tipo de comportamento observado por WURTZ e colaboradores (Fig. 35).

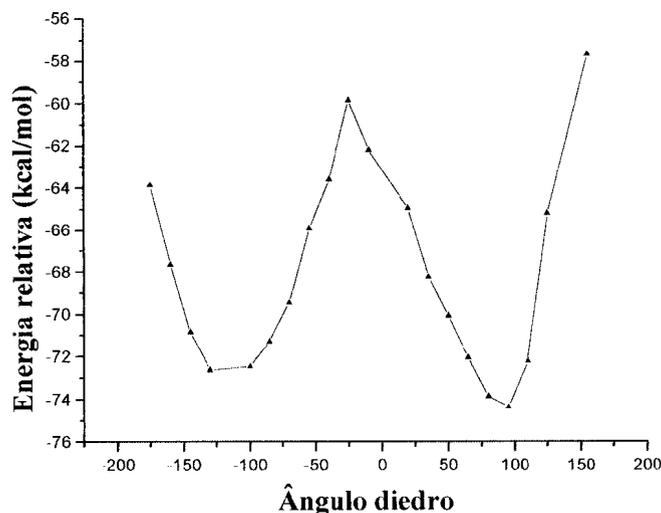


Figura 35. Diagrama de energia relativa das conformações obtidas para RH-2485 depois da rotação e fixação da ligação N-N central e minimização do restante da molécula (método PM3).

Estes resultados concordam com os estudos realizados por REYNOLDS & HORMANN (1996), onde, através de cálculos teóricos, utilizando o método *ab initio* MP2/6-31+G**, os autores determinaram a energia mínima para as estruturas de N,N-diformilidrazina, N-metil-N,N'-diformilidrazina e N, N'-dimetil-N,N'-diformilidrazina. Estes cálculos mostraram que a energia mínima é conferida a uma estrutura não planar em que o par de elétrons livre do nitrogênio é essencialmente perpendicular ao outro. Entretanto, a energia requerida para (Z,Z)-diformilidrazina adotar a conformação planar, identificada na estrutura cristalina, é menor do que 1 kcal/mol. Tal fato foi justificado pela ligação hidrogênio intramolecular entre o grupo HN e o oxigênio da carbonila na estrutura planar.

Quando uma ou ambas configurações da amida são invertidas (Z,E; E,E), ou quando os nitrogênios são substituídos, estas ligações hidrogênio são perdidas e a estrutura planar torna-se menos estável em relação ao rotâmero "torcido". Com exceção de N,N'-diformilidrazina, as barreiras rotacionais são grandes. Por exemplo, a barreira rotacional para metil-N,N'-diformilidrazina é de 5 kcal/mol enquanto para N, N'-dimetil-N,N'-diformilidrazina é de 19 kcal/mol.

A tendência das diacilidrazinas substituídas assumirem estruturas do tipo "torcida" tem importantes implicações nas propriedades dinâmicas e estruturais para os agonias não esteroidais de 20E [REYNOLDS & HORMANN, 1996]. Desta forma, a função do grupo *t*-butil seria a de promover mudanças conformacionais nas estruturas das DBHs para que possam permitir interações significativas na CIL. Apesar de nenhuma parte em 20E mostrar-se "corresponder" ao grupo *t*-butil das DBHs que está localizado na mesma cavidade hidrofóbica, foi possível perceber que a cavidade ocupada por este grupamento manteve-se constante na maioria dos complexos estudados, diferenciando quanto aos tipos de orientação do ligante. No entanto, nos complexos formados por RH-5992 e RH-2485, o grupo *t*-butil parece estar envolvido por um número maior de grupamentos hidrofóbicos, permitindo interações favoráveis do tipo van der Waals.

No estudo realizado, observa-se que apenas as DBHs RH-2485 e RH-5992 são capazes de adotar no modelo de CIL para *M. sexta*, a conformação equivalente à estrutura cristalina, as demais apresentam comportamentos próximos ao de RH-5849 (veja Tabela 15 e Fig. 36).

Comparando os complexos formados por RH-5849 e RH-2485 e RH-5992 com orientação 1 na CIL, verificamos que, no caso de RH-5849, a carbonila ligada ao anel B (CO7) interage com o resíduo de Arg371 (distância C=O HN=2,65 Å) (Tabelas 11 e 13). No caso de RH-2485, essa carbonila gira e interage com Arg367, do lado oposto na CIL (distância. C=O HN=1,79Å). Aparentemente, esse giro acontece para permitir que também o oxigênio (O8) interaja com Arg370 (distância C=O HN=2,63 Å).

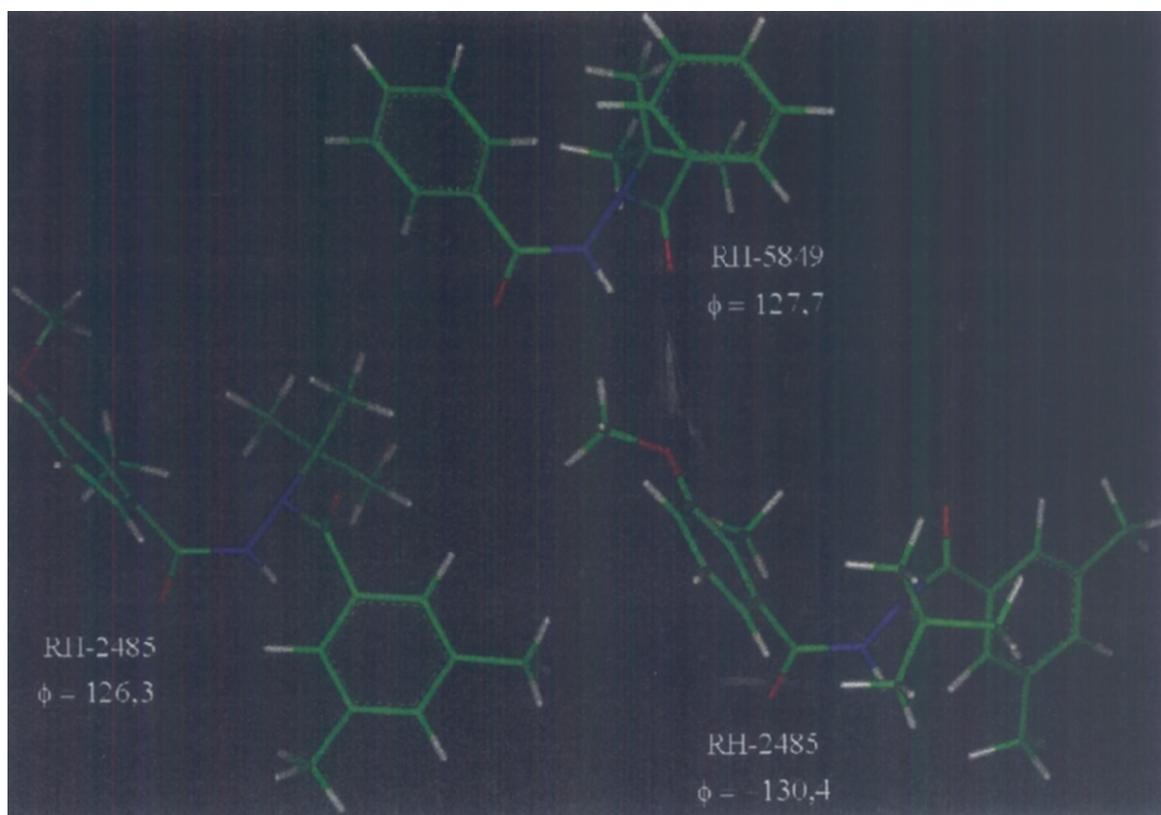


Figura 36. Conformações adotadas por RH-5849 e RH-2485 na CIL. Código de cores dos átomos representados na figura: verde = C, vermelho = O, azul escuro = N, amarelo = S e branco = H.

A interação da carbonila ligada ao anel B com Arg371, no caso do complexo com RH-5849, também parece estar relacionada com a posição mais interna do ligante dentro da CIL. Mesmo que o ângulo ϕ de RH-2485 fosse girado para um valor próximo ao encontrado para RH-5849, na orientação I, a distância entre a carbonila (CO7) e Arg371 ficaria muito maior, além de se perder a interação entre o oxigênio (O8) e Arg370.

No caso do complexo formado por RH-5992, a carbonila ligada ao anel B também interage com Arg367 (distância. C=O \cdots HN = 2,55 Å).

O conjunto desses resultados mostra que a influência do grupo *t*-butil na interação das DBHs RH-2485 e RH-5992 com EcR vai além de interações diretas, fixando a conformação dos agonistas no interior da CIL e permitindo o estabelecimento de outras interações.

4.7. Proposta, análise estrutural e diferenças energéticas para a interação das novas DBHs utilizando o modelo de EcR de lepidóptero.

A análise dos resultados das interações no modelo da CIL do EcR de *M. sexta* nos levou a proposição das estruturas RURAL-1, RURAL-2 e RURAL-3 como possíveis candidatos a novos pesticidas com ação reguladora de crescimento de inseto mimetizando ação de 20E. A proposição destas estruturas foi baseada em critérios de interações prováveis entre as mesmas e os aminoácidos constituintes de msEcR-CIL. Desta maneira, RURAL-1 foi proposto com base no argumento que para o anel A, a substituição 3, 5 é de grande importância para as interações na CIL e que o anel B deve apresentar na posição 3 um grupo que estabeleça interações do tipo ligação hidrogênio com Arg370. A proposta de um grupamento metilenodioxi é somada a possibilidade do produto poder ser derivado do piperonal, um produto natural e com razoável acesso. RURAL-2, que também pode ter o outro grupamento benzoíla (anel A) derivado do piperonal, foi proposto no sentido de verificar se o grupamento metilenodioxi seria capaz de conferir à molécula orientação na CIL próxima à observada para os compostos com os substituinte nas posições 3, 5 do anel A, apesar do metilenodioxi ocupar as posições 3, 4. Para RURAL-3 a proposta foi de adicionar a um dos substituintes do anel A, posição 3 ou 5, um grupo que pudesse estabelecer interações com outros resíduos, no caso com Thr330.

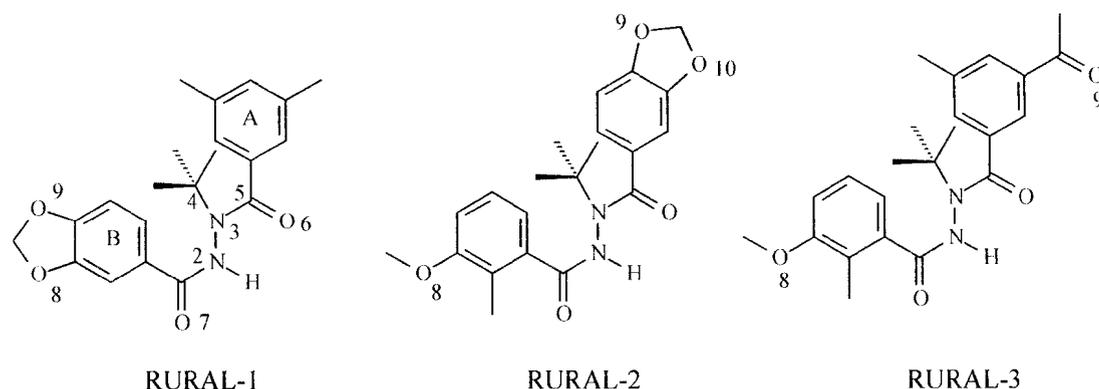


Figura 37. Estruturas das novas DBHs propostas, com promissor potencial inseticida, mimetizando a ação de 20E

Para análise estrutural e das diferenças energéticas para a interação de novas DBHs utilizando o modelo de EcR do lepidóptero, realizamos os mesmos procedimentos desenvolvidos no item 4.5.

A tabela 16 traz a descrição das entalpias de interação e de conformação dos complexos calculados com o método semi-empírico PM3, para as duas orientações dos ligantes (novas DBHs) na CIL. Na tabela 17 foram destacadas as ligações hidrogênio entre os ligantes e os resíduos dos aminoácidos da CIL para as orientações I e II.

Tabela 16. Entalpias de interação calculadas pelo método semi-empírico PM3 para os complexos entre os ligantes (L) e o modelo da cavidade de interação com o ligante (CIL) para *M. sexta*.

Orientação	Ligante ^c	ΔH_f			ΔH_f^{int}	ΔH_f^{conf}
		CIL•L	CIL* ^c	L* ^c		
I	RURAL-1	-283,15	-155,79	-82,62	-91,38	-44,94
	RURAL-2	-308,91	-156,09	-113,16	-116,25	-39,6
	RURAL-3	-303,41	-156,84	-94,77	-103,47	-51,8
II	RURAL-1	-252,96	-136,43	-82,92	-91,38	-33,59
	RURAL-2	-274,70	-134,63	-108,80	-116,25	-31,27
	RURAL-3	-271,15	-131,04	-96,06	-103,47	-44,05

Os complexos formados por RURAL-1 e RURAL-3 apresentaram valores de ΔH_f^{int} (entalpia de interação), apesar de RURAL-2 possuir um maior número de pontos adicionais de interação. Analisando as interações formadas nos complexos com as novas DBHs para a orientação I, foi possível confirmar que a substituição 3, 5 no anel B é de grande importância, pois ao comparar o complexo formado por RURAL-2 com os demais complexos, verificou-se que o grupo *t*-butil foi parcialmente deslocado na CIL, perdendo as interações com os grupamentos hidrofóbicos desta. Este deslocamento é justificado pela possibilidade do ligante estabelecer interações do tipo ligação hidrogênio entre o O10 do grupamento metilenodioxí com Arg371 (Tabela 17 e Fig.39).

As entalpias de interação são mais negativas quando a orientação I é adotada pelas novas DBHs, para a interação com a cavidade do receptor. Por outro lado, os valores da entalpia de conformação são menos positivos para a orientação I. Estes dados estão de acordo com os observados anteriormente e confirmam o fato da orientação I permitir o maior número de interações intermoleculares favoráveis e menores custos conformacionais.

RURAL-1 e RURAL-3 apresentaram valores de entalpia de interação com msEcR-CIL bastante próximos a RH-2485, destacando-se RURAL-3, que apresenta valores mais favoráveis para ΔH_f^{int} e ΔH_f^{conf} (Tabela 16), sugerindo que estas estruturas são potenciais novos bioligantes do msEcR., apesar da interação prevista entre a carbonila do grupamento cetona na posição 3 do anel A e a hidroxila de Thr330 não ter sido observada. As interações do tipo ligação hidrogênio envolvidas nos complexos com as novas DBHs foram também equivalentes às observadas com RH-2485, variando muito pouco as distâncias das ligações hidrogênio entre os ligantes e os resíduos dos aminoácidos (Tabela 17 e Figs. 38, 39, 40 e 41).

Tabela 17. Distâncias das ligações hidrogênio entre os grupos dos agonistas sintéticos e os aminoácidos dos modelos de EcR-CIL de *M. sexta* para os cálculos com PM3.

ORIENTAÇÃO I			
Ligante	XH	Y	Distância XH...Y
RURAL-1	NH1 (Arg367)	O7	1,79
	NH2 (Arg370)	O8 (metilenodioxí)	2,67
	HNε (Arg371)	O6	2,38
	NH2 (Arg371)	O6	2,67
RURAL-2	NH1 (Arg367)	O7	1,77
	NH2 (Arg370)	O8	2,89
	NH2 (Arg371)	O6	2,45
	HNε (Arg371)	O10 (metilenodioxí)	3,24
RURAL-3	NH1 (Arg367)	O7	1,81
	NH2 (Arg370)	O8	2,74
	NH2 (Arg371)	O6	2,70
	HNε (Arg371)	O6	2,49
ORIENTAÇÃO II			
Ligante	XH	Y	Distância XH...Y
RURAL-1	OH (Thr330)	H(N2)	2,70
	OH (Thr330)	O7	1,82
	HNε (Arg371)	O6	2,86
RURAL-2	OH (Thr330)	H(N2)	2,74
	OH (Thr330)	O7	3,13
	HNε (Arg371)	O6	2,54
	NH1 (Arg367)	O10	2,99
RURAL-3	OH (Thr330)	H(N2)	2,74
	OH (Thr330)	O7	1,82
	HN2 (Arg371)	O9	1,79
	HNε (Arg371)	O6	2,95

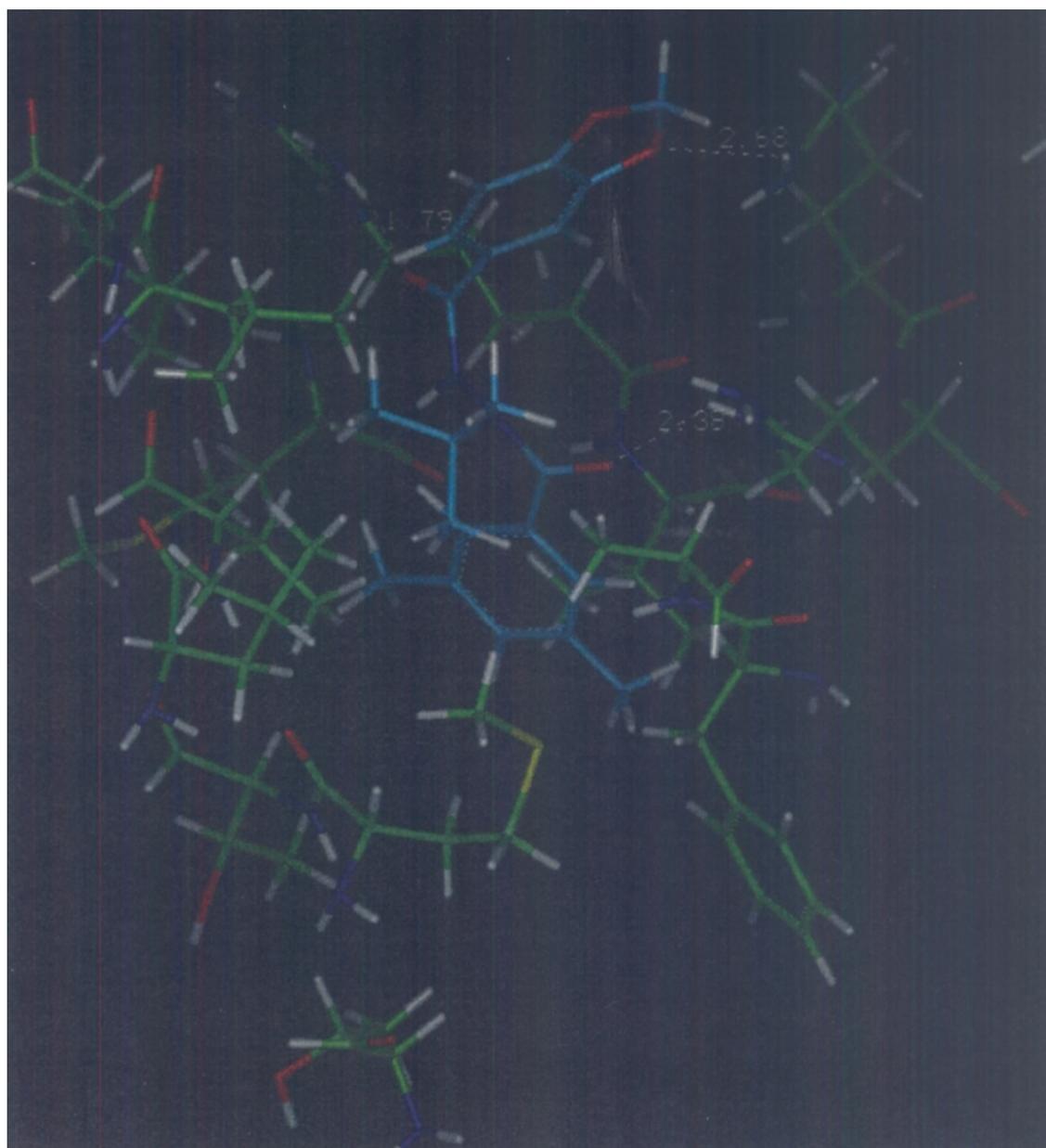


Figura 38. Modelo da *msEcR-CIL* com RURAL-1 (em azul) para orientação I, otimizado com o método PM3. Em destaque, algumas das principais ligações hidrogênio do complexo.

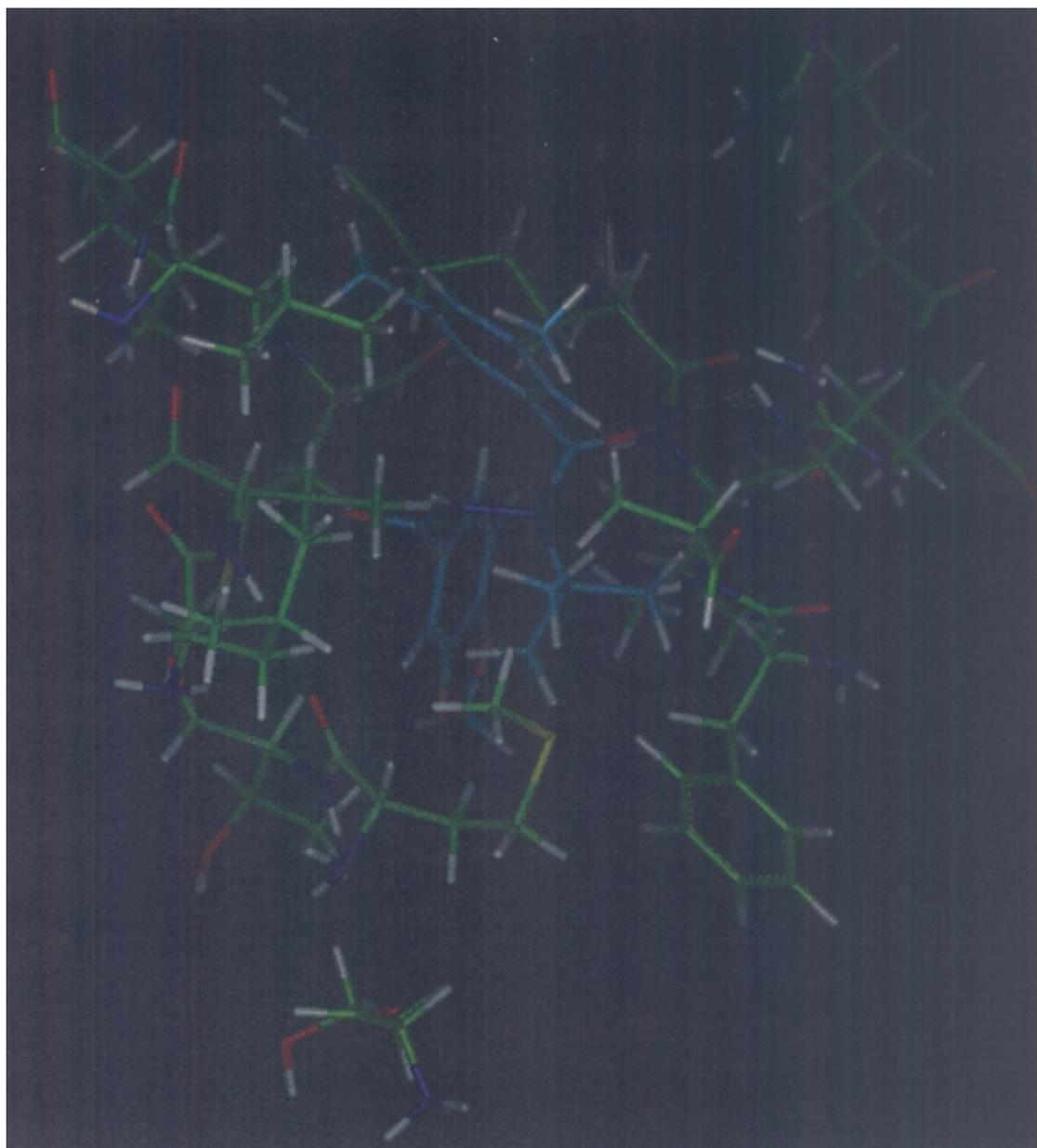


Figura 39. Modelo da *msEcR-CIL* com RURAL-1 (em azul) para orientação II, otimizado com o método PM3. Em destaque, algumas das principais ligações hidrogênio do complexo. Código de cores dos átomos: verde = C, vermelho = O, azul escuro = N, amarelo = S e branco = H.

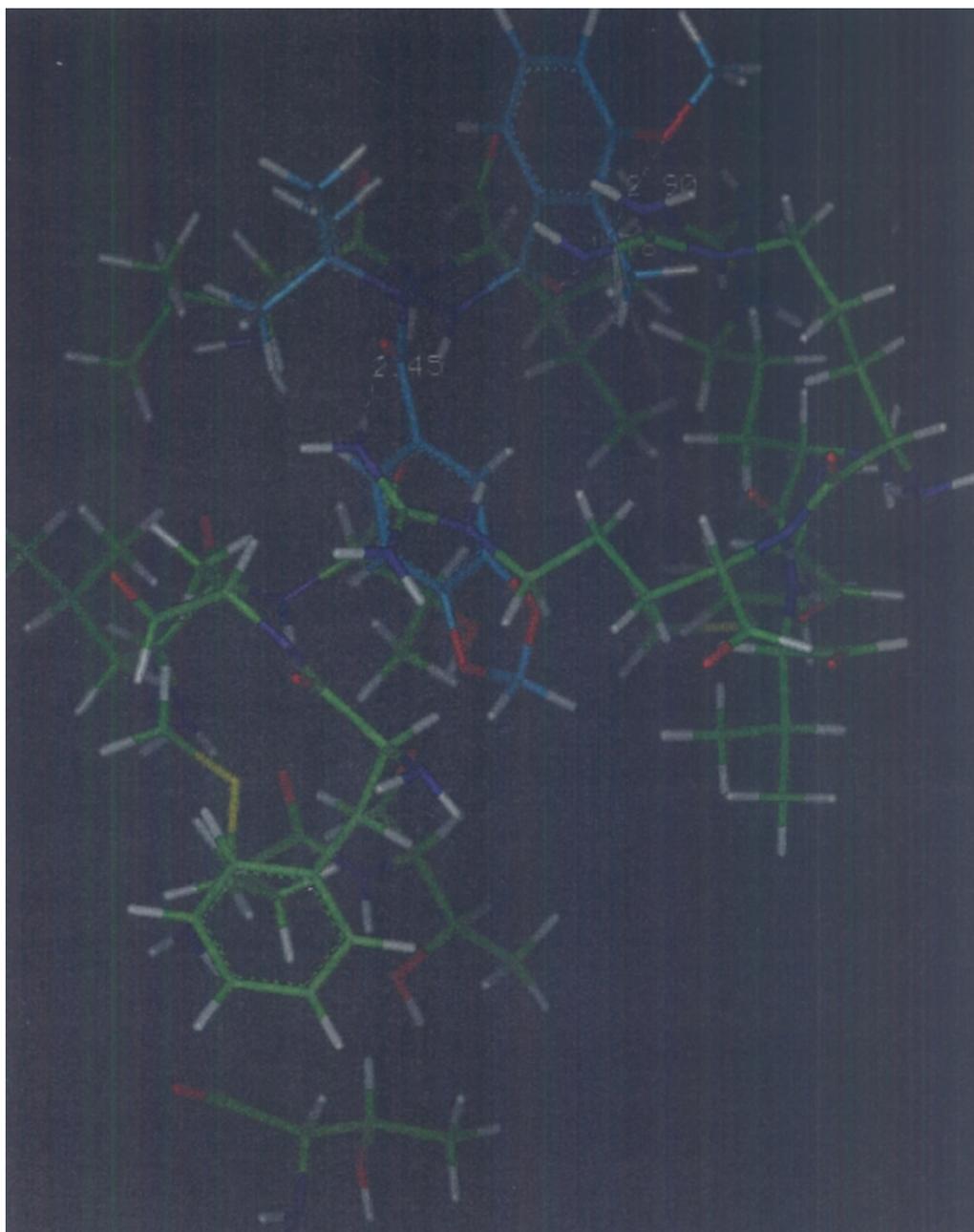


Figura 40. Modelo da *msEcR-CIL* com RURAL-2 (em azul) para orientação I, otimizado com o método PM3. Em destaque, algumas das principais ligações hidrogênio do complexo. Código de cores dos átomos: verde = C, vermelho = O, azul escuro = N, amarelo = S e branco = H.

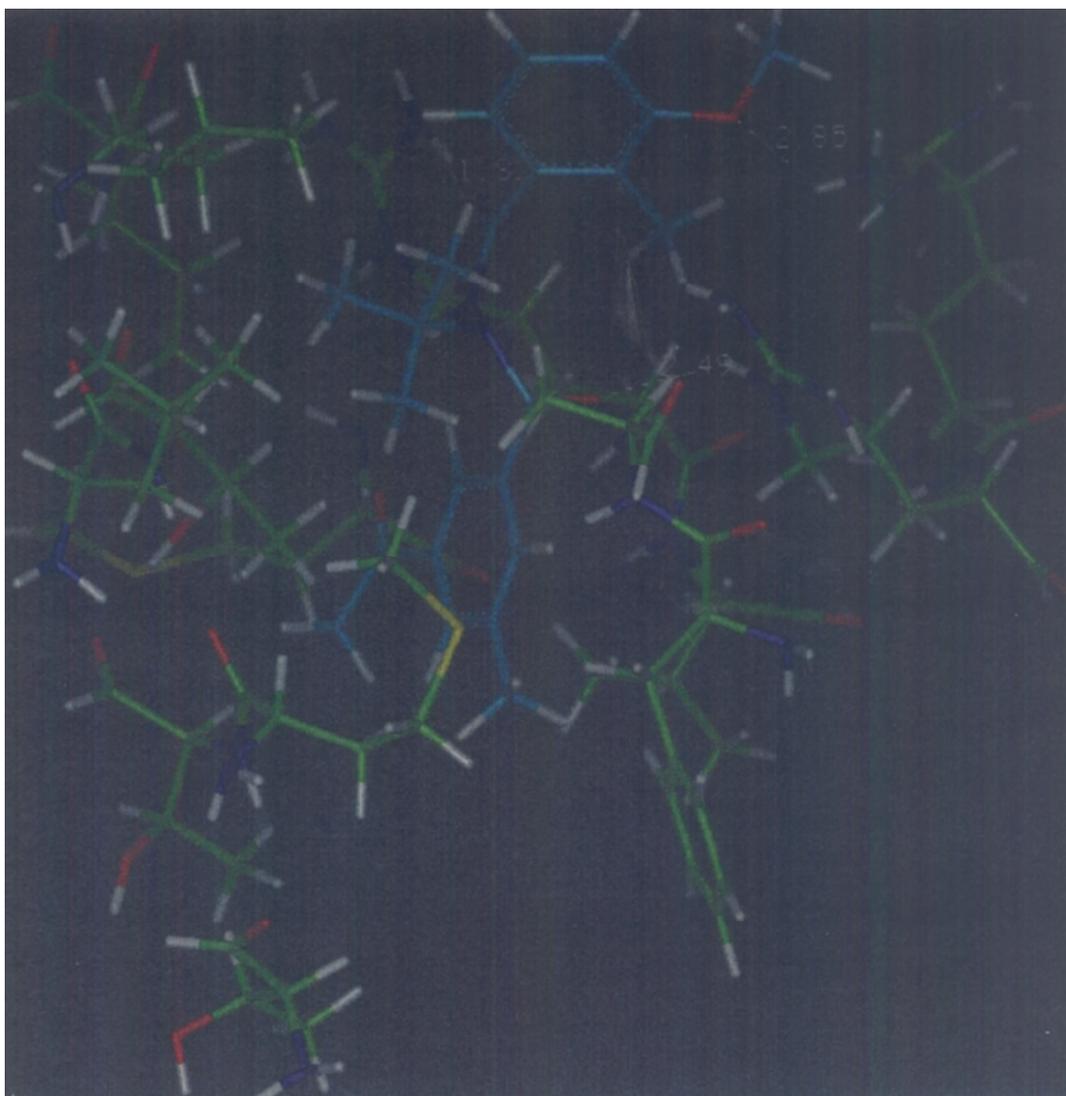


Figura 41. Modelo da *msEcR-CIL* com RURAL-3 (em azul) para orientação I, otimizado com o método PM3. Em destaque, algumas das principais ligações hidrogênio do complexo. Código de cores dos átomos: verde = C, vermelho = O, azul escuro = N, amarelo = S e branco = H.

5. CONCLUSÕES

A comparação entre agonistas natural e sintéticos, através da sobreposição das estruturas otimizadas, utilizando a modelagem molecular, revelou que partes significativas das estruturas não apresentaram correspondência, sugerindo limitações nos estudos baseados exclusivamente na estrutura dos ligantes.

O uso de cálculos semi-empírico, em modelos de homologia de EcR-CILs de *M. sexta* e *D. Melanogaster*, mostrou-se bastante adequado, em termos das informações e velocidade de cálculo, ao estudo da interação dos bioligantes com o receptor.

Os valores de entalpias, avaliados pelo método semi-empírico para a interação dos agonistas natural e sintéticos revelaram-se favoráveis em ambos os receptores.

O agonista natural (20E) pode ser acomodado na cavidade do receptor com duas orientações, mas energeticamente mais favorável quando o complexo é formado com o anel-A do ecdisteróide próximo à cavidade de entrada do receptor. No caso dos agonistas sintéticos, duas orientações também foram encontradas, mas energeticamente mais favorável quando o complexo é formado com o anel-B das dibenzoilidrazinas próximo a cavidade de entrada do receptor.

Análises de características estruturais dos complexos com RH-2485 e RH-5849 sugerem que o anel 3,5-dimetil substituído é essencial para a seletividade contra lepidópteros, porque, no receptor do díptero (*D. Melanogaster*), estes substituintes promovem interações estéticas com a cadeia lateral dos aminoácidos não comuns com o receptor de lepidóptero (*M. sexta*). Esta interação estérica obriga, aparentemente, o agonista a adotar uma posição na CIL, onde ele interage com o receptor através de forças intermoleculares mais fracas do que aquelas que podem ser estabelecidas no receptor de lepidóptero.

A correlação entre a entalpia de interação calculada dos complexos formados pela CIL do msEcR com os ligantes (DBHs) e os respectivos valores de pLD₅₀ [SMAGGHE et al., 1999] foi bastante significativa. Sendo assim, podemos considerar que o modelo representa de forma satisfatória os dados empíricos.

Nos resultados de entalpia de interação dos complexos estudados nenhum substituinte em qualquer posição do anel B pareceu realmente interferir na atividade das DBHs. Destaca-se apenas a DBH com flúor na posição *meta*, que é a mais ativa da série. O flúor em *meta* realiza ligação hidrogênio com Arg367. O mesmo não é observado para a posição *orto*, sustentando a sugestão de que, no presente modelo, a posição 3 do anel B, age como um ponto de interação adicional entre o ligante e receptor.

Como observado no modelo de EcR-DIL de *C. tetans* proposto por Wurtz e colaboradores, nenhuma parte em 20E mostrou-se "corresponder" ao grupo *t*-buril das DBHs que está localizado na mesma cavidade hidrofóbica [WURTZ et al., 2000]. No entanto, este grupamento apresenta importante papel para as conformações adotadas pelas dibenzoilidrazinas, que vão implicar nas propriedades dinâmicas e estruturais para o agonistas não esteroidais de 20E.

Novos ligantes propostos (RURAL-1 e RURAL-3) apresentaram valores de entalpia de interação com msEcR-CIL bastante próximos a RH-2485 e superiores a RH-5992, destacando-se RURAL-3, que apresentou valores mais favoráveis para ΔH^{int} e ΔH^{conf} . As interações do tipo ligação hidrogênio envolvidas nos complexos com as novas DBHs foram também equivalentes às observadas com RH-2485, variando muito pouco as distâncias das

ligações. O valor menos favorável da entalpia de interação para RURAL-2 deve-se, provavelmente, à ausência das metilas na posição 3, 5 do anel B.

6. BIBLIOGRAFIA

- AJAY, & MURCKO, M.A. *J. Med. Chem.* 38, 4953, 1995.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. *J. Mol. Biol.*, 215, 403, 1990.
- ANDREW, P.R., CRAIK, D.J. & MARTTIN, J.L. *J. Med. Chem.*, 27, 1648, 1984.
- ARRIZA, J.L., WEINBERGER, C., CERELLI, G., GLASER, T.M., HANDELIN, B.L., HOUSMAN, D.E. & EVANS, R.M. *Science*, 237, 268, 1987.
- BAIROCH, A. & APWEILER, R. *Nucleic Acids Res.*, 28, 45, 2000.
- BAJORATH, J., STENKAMP, R. & ARUFFO, A. *Protein Science*, 2, 1798-1810, 1993.
- BAKER, A.R., MCDONNELL, D.P., HUGHES, M., CRISP, T.M., MANGEISDORF, D.J., HAUSSIER, M.R., PIKE, J.W., SHINNE, J. & O'MALLEY, B.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3294-3298, 1988.
- BARREIRO, E.J. & FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal*. Porto Alegre:ARTMED, 2001.
- BENSON, D.A., BOGUSKI, M., LIPMAN, D.J. & OSTELL, J. *GENBANK. Nucleic Acids Res.*, 22, 3441, 1994.
- BERGAMASCO, R. e HORN, D.H.S. The biological activities of ecdysteroids and ecdysteroid analogues. In: Hoffmann, J.A. (Ed), *Progress in ecdysone Research*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 299-324, 1980. (In HARMATHA et al., 2002)
- BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I. N., & BOURNE, P. E. *Nucl. Acids Res.*, 28, 235, 2000.
- BERSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F., WILLIAMS, G. J. B., MEYER, JR. E. F., BRICE, M. D., RODGERS, J. R., KENNARD, O., SCHIMANOUCI, T. & TASUMI, M. *J. Mol. Biol.*, 112, 535, 1977.
- BLOZIIL, W. & ENGBERTS, J.B.F.N. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 1545, 1993.
- BRANCO, S.M. *Natureza e Agroquímicos*. São Paulo: Editora Moderna, 1990.
- BRODE, S., HORN, H., EHRIG, M., MOLDRUP, D., RICE, J.E. & AHLRICHS, R. *J. Comput. Chem.*, 14, 1142, 1993.
- BRYANT, S. H. e LAWRENCE, C. E. *Proteins. Struct. Funct. Genet.*, 16, 92, 1993.

BRZOZOWSKI, A. M., PIKE, A. C. W., DAUTER, Z., HUBBARD, R. E., BONN, T., ENGSTRÖM, O., ÖHMAN, L., GREENE, G. L., GUSTAFSSON, J-A e CARAQUIST, M. *Nature*, 389, 753, 1997.

CASIDA, J. E. & QUISTAD G.B. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 1, 1998.

CHERBAS, L., LEE, K. & CHERBAS, P. *Genes Dev.*, 5, 120, 1991.

CHO, W.L. ZAPITSKAYA, M.Z., RAIKHEL, A.S. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, 25, 19, 1995.

CHAN, T.H., ALI, A., BRITTEN, J.F., THOMAS, A.W., STRUNZ, G.M. SALONIUS, A. *Can. J. Chem.* 68, 1178, 1990.

DANIELSEN, M., HINCK, L., & RINGOLD, G.M. *Cell*, 57, 1131, 1989.

CLARCK, T. *A Handbook of Computacional Chemistry: a practical guide to chemical structure an energy calculations*. New York, John Wiley & Sons, 1985.

DEWAR, M J. S., ZOEBISCH, E. G., HEALY, E. F. & STEWART, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902, 1985.

DEWAR, M.J.S., ZOEBISCH, E.G., HEALY, E.F., STEWART, J.J.P. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902, 1985.

DEWAR, M.J.S. & THIEL, W. *J. Am. Chem.Soc.*, 99, 4899, 1977.

DHADIALLA, T. S., CARLSON, G.C. & LE, D.P. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 545, 1998.

DINAN, L., HORMANN, R.E. & FUJIMOTO, T. *J. Comput. -Aided Mol. Design.*, 13, 185, 1999. (In HARMATHA et al, 2002).

DINAN, L. *Eur. J. Entomol.*, 92, 271, 1995.

DINAN, L., WHITING, P., GIRAULT, J-P, LAFONT, R., DHADIALA, T.S., CRESS, D.E., MUGAT, B., ANTONIEWSK, C. & LEPESANT, J-A. *Biochem. J.*, 327, 643, 1997.

EVANS, R. M. *Science*, 240, 889, 1988.

FELDER, C., JIANG, H-L., ZHU, W-L., CHEN, K-X., SILMAN, I., BOTTI, S.A. & SUSSMAN, J.L. *J. Phys. Chem. A.*, 105, 8, 1326, 2001.

FERREIRA, T. J. B., CORRÊA, A.G. & VIEIRA, P. C. (Orgs). *Produtos Naturais no Controle de Insetos*. São Carlos: EdUFSCar, 2001, Capítulo 2.

FERSHT, A. *Structure, Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzime Catalysis Protein Folding*. New York: W. H. Freeman, 1998, Chapter 1.

- FINKELSTEIN, A.V. & REVA, B. A. *Nature*, 351, 497, 1991
- FREEDMAN, L.P., LUISI, B.F., KORSZUN, Z.R., BASAVAPPA, R., SIGLER, P.B. & YAMAMOTO, K.R. *Nature*, 334, 543, 1988.
- FUJIWARA, J. JINDRA, M., NEWITT, R., PALLI, S.R., HIRUMA, K. & RIDDIFORD, L.M. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25, 845, 1995.
- GEARIEN, J.E. Receptor Site Theory. In: FOYE, W.O. (Editor) *Principles of Medical Chemistry*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989, Cap. 6, p.119-128.
- GIGUERE, V. ONG, E.S., SEGUI, P. & EVANS, R.M. *Nature*, 330, 624, 1987.
- GLASS, C.K., LIPKIN, S.M., DEVARY, O.V. & ROSENFELD, M.G. *Cell* 59, 697-708, 1989.
- GRANT G. H. e RICHARDS, W.G. *Computational Chemistry*. New York, Oxford Science Publications, 1995.
- GREEN, S. & CHAMBOM, P. *Trends Genet.*, 4, 309, 1988.
- GRONEMEYER, H. & LAUDET, V. *Protein Profile*, 2, 1173, 1995.
- GUEx, N. & PEITSCH, M. C. *Electrophoresis*, 18, 2714, 1997.
- GUIOCHON-MANTEL, A., LOOSFELT, P., SAR, S., ATGER, M. PERROT-APPLANAT, M., & MIGROM, E. *Cell*, 57, 1147, 1989.
- GUO, X., HARMON, M.A., LAUDET, V., MANGELSDORF, D.J., PALMER, M.J., *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 27, 945, 1998.
- HANNAN, G.N. & HILL, R.J. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27, 479, 1997.
- HARMATHA, J., DINAN, L. & LAFONT, R. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 181, 2002.
- HARMATHA, J. & DINAN, L. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 35: 219, 1997.
- HEHRE, W. J.; YU, J. & KLUNZINGER, P. E. Wavefunction, Inc, 18401 von Karman Ave, Irvine, CA 92612.
- HENDERSON, B.E., ROSS, R.K. & PILE, M.C. *Science*, 259, 633, 1993.
- HOLLENBERG, S.M., WEINBERGER, C. ONG, E.S., CERELLI, G., ORO, A., LEBO, R., THOMPSON, E.B., ROSENFELD, M.G. & EVANS, R.M. *Nature*, 318, 635, 1986.
- HONIG, B., SHARP, K. 7 YANG, A.S. *J Phys. Chem.*, 97, 1101, 1993.

- HSU, A.C., FUJIMOTO, T.T. DHADIALA, T.S., *ACS Symp Ser*, 658, 206, 1997.
- IMHOF, M.O. RUSCONI, S. & LEZZI, M. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23, 115, 1993.
- ISHAAYA, I., YABLONSKI, S., HOROWITZ, A.R. *Phitoparasitica*, 23, 139, 1995.
- ISSEMANN, I. & GREEN, S. *Nature*, 347, 645, 1990.
- JENCKS, W.P. *Catalysis in chemistry and Enzimology*. New York: Mcgraw-Hill Book Company, 1969.
- JOHNSON, M.S., SRINIVASAN, N., SOWDHAMINI, R. & BLUNDELL, T.L. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 29, 1-68, 1994.
- JONES, D.T., TAYLOR, W.R. & THORNTON, J-M. *Nature*. 358, 86, 1992
- JONES, T.A. & THIRUP, S. *EMBO J.*, 5, 819, 1986.
- KLAHOLZ, B.P., MITSCHLER, A. & MORAS, D. *J.Mol.Biol.*, 302, 155 2000.
- KLAHOLZ, B.P., RENAUD, J-P, MITSCHLER, A., ZUSI, C., CHAMBON, P., GRONEMEYER, H. & MORAS, D. *Nat. Struct. Biol.*, 5, 199, 1998.
- KOELLE, M.R., TALBOT, W.S., SEAGRAVES, W.A., BENDER, M.T., CHERBAS, P., HOGNESS, D.S. *Cell*, 67, 59, 1991.
- KUMAR, V. & CHAMBON, P. *Cell*, 55, 145, 1988.
- KRUST, A., GREEN, S., ARGOS, P., KUMAR, V., WALTER, P., BORNERT, J.M. & CHAMBON, P. *EMBO J.*, 5, 891, 1986.
- LUBAHN, D.B., JOSEPH, D.R., SAR, M., TAN, J., HIGGS, H.N., LARSON, R.E., FRENCH, F.S. & WILSON, E.M. *Mol Endocrinol.*, 2, 1265, 1988.
- MADER, S., KUMAR, V. DE VERNEUIL, H. & CHAMBON, P. *Nature*, 338, 271, 1989.
- MANGELSDORFT, D.J., ONG, E.S., DYCK, J.A. & EVANS, R.M. *Nature*, 345, 224-229, 1990.
- MISRAHI, M., ATGER, M. D'AURIOL, L., LOOSFELT, H., MERIEL, C., FRIDIANSKY, F., GUIOCHON, M.A., GALIBERTF, P. & MILGROM, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 740, 1987.
- MLODZIK, M., HIROMI, Y., WEBER, U., GOODMAN, C.S. & RUBIN, G.M. *Cell*, 60, 211-224, 1990.

MIYAJIMA, N., HORIUCHI, R., SHIBURA, Y., FUKUSHIGE, S., MATSUBARA, K., TOYOSHIMA, K. & YAMAMOTO, T. *Cell*, 57, 31, 1989.

Molecular Simulations Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA92121-3752 USA.

MORNTHEAN, C. & POTTER, D.A. *J. Econ. Entomol.*, 85, 507, 1992.

MOUILLET, J.F., DEELBEEQUE, J.P. QUENNEDY, B. DELACHAMBRE, *Eur. J. Biochem.*, 248, 856, 1997.

NAUBER, U., PANKRATZ, M.J., KIENLIN, A., SEIFERT, F., KLEMM, U. & JACKIE, H. *Nature*, 336, 489, 1988.

NAKAGAWA, Y., OIKAWA, N., NISHIMURA, K., KURIHARA, N. & UENO, T. *Steroids*, 60, 401, 1995.

NOVOTNY, J., BRUCCOLERI, R.E. & SAUL, F. A. *Biochemistry*, 28, 4735, 1989.

OIKAWA N, NAKAGAWA Y, NISHIMURA K, UENO T. e FUJITA T. *Pestic. Sci.*, 41, 139, 1994a.

OIKAWA , N., NAKAGAWA, Y., NISHIMURA, K., UENO, T. & FUJITA, T. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 48, 135, 1994b.

ORO, A.E., ONG, E.S., MARGOLIS, J.S., POSAKONY, J.W., MCKEOWN, M. & EVANS, R.M. *Nature*, 336, 493, 1988.

PARCZYK, K. & SCHNEIDER, M.R. *J. Cancer Res. Clin.Oncol.*, 122, 383, 1996.

PEARSON, W.R. & LIPMAN, D.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2444, 1988.

PIGNONI, F., BALDARELI, R.M., STEINGRIMSSON, F., DIAZ, R.J. PATAPOUTIAN, A., MERINA, J.R. & LENGYEL, J.A. *Cell*, 62, 151, 1990.

REGIROLI, G. & MANARESI, M. *Inf. Fitopetolon.*, 5, 60, 1997.

RENAUD, J.P., ROCHEL, N., RUFF, M., VIVAT, V., CHAMBON, P., GRONEMEYER, H., MORAS, D. *Nature*, 378, 681. 1995.

RETNAKARAN, A., MACDONALD, A., TOMKING, W.L., DAVIS, C.N., BROWNWRINGHT, A.J. & PALLI, S. R. *J Insect Physiol.*, 43, 55, 1997.

RETNAKARAN, A., HIRUMA, K., PALLI, S.R. & RIDDIFORD, L. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25, 109-117, 1995.

REYNOLDS, C.H. & HORMANN, R.E., *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 9395, 1996.

- REYNOLDS, S.E. *Pestic. Sci.*, 20, 131-46, 1987.
- ROCHEL, N., WURTZ, J.M., MITSCHLER, A., KLAHOLZ, B., MORAS, D. *Mol. Cell*, 5, 173, 2000.
- ROST, B. & SANDER, C. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 25, 113, 1996.
- RUCKENSTEIN, E. *Colloids and Surfaces*, 65, 95, 1992.
- RUPPERT, E.E. & BARNES, R.D. *Zoologia de Invertebros*. São Paulo: ROCA, 1996.
- SANT'ANNA, C.M.R., SOUZA, V. P. & ANDRADE, D.S. *Intern. J. Quantum Chem.*, 87, 311, 2002.
- SANT'ANNA, C.M.R., BICCA DE ALENCASTRO, R. & BARREIRO, E.J. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, 429, 217, 1998.
- SANTOS, A.C.S. & SANT'ANNA, C.M.R. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, 585, 61, 2002.
- SANTOS FILHO, O. A. *Modelagem da di-hidrofolato redutase do plasmodium falciparum, QSAR-3D pela metodologia do campo de força de energia livre e QSAR-4D*. Rio de Janeiro, 2000, 159p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Militar de Engenharia.
- SAUPHANOR, B. & BOUVIER, J.C. *Pestic. Sci.*, 45, 369, 1995.
- SCHÜLE, R., UMESONO, K., MANGELSDORF, D.J., BOLADO, J., PIKE, J.W. & EVANS, R. M. *Cell*, 61, 497, 1990.
- SCOTT, J. A. *Florida Entomology*, 78, 399, 1995.
- SEGRAVES, W. A. & HOGNESS, D. *Genes Dev.* 4, 204, 1990.
- SILVEIRA NETO, S. *Manual de Ecologia de Insetos*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1997.
- SIPLI, M. J. e WEITCHUS, S. *Proteins. Struct. Funct. Genet.* 13, 258, 1992.
- SEARLE, M.S. & WILLIAMS, D.H. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10690, 1992.
- SEARLE, M.S., WILLIAMS, D.H. & GEHARD, U. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10697, 1992.
- SHIMIZU, B., NAKAGAWA, Y., HATTORI, K., NISHIMURA, K., KURIHARA, N. & UENO T. *Steroids*, 62, 638, 1997.
- SILVERMAN, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Action*. California. Academic Press, Inc., 1992.

- SMAGGHE, G., NAKAGAWA, Y., CARTON, B., MOURAD, A.K., FUJITA, T. E & TIRRY, L. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 41, 42, 1999.
- SMAGGHE, G., VINUELA, E., BUDIA, F. & DEGHEELE, D. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32, 121, 1996.
- SMAGGHE, G. & DEGHEELE, D. *J. Insect Physiol.*, 41, 971, 1995.
- SMAGGHE, G. & DEGHEELE, D. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 25, 227, 1994.
- STEWART, J.J.P. *J. Comput. Chem.*, 10, 209, 1989.
- STEWART, J.J.P. *J. Comp. -Aided Mol. Des.*, 4, 1-105, 1990.
- STEWART, J. J. P., QCPE 455, Indiana University, Bloomington, EUA, 1992 (Programa).
- SUKSAMRARN, A., PATTANAPRATEEP, P., TANACHATCHAIRATANA, T., HARITAKUN, W., YNGYONGNARONGKUL, B. & CHIMINOI, N. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 32, 193, 2002.
- SWEVERS, L., DREVET, J.R., LUNKE, M.D. & LATROU, K. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 25, 857-866, 1995.
- TAYLOR, W.R., FLORES, T.P., ORENGO, C.A. *Protein Sci.*, 3, 1858, 1994.
- TRISYONO, A. & CHIPPENDALE, M. *J. Econ. Entomol.*, 90, 1486, 1997.
- TSUZUKI, S., YOSHIDA, M., UCHIMARU, T. & MIKAMI, M. *J. Phys. Chem. A*, 105, 4, 769, 2001.
- TATEISH, K., KIUCHI, M. & TAKEDA, S. *Appl. Entomol. Zoo.*, 28, 177, 1993.
- UMESONO, K., GIGUERE, V., GLASS, C.K. ROSENFELD, M.G. & EVANS, R.M. *Nature*, 336, 262, 1988.
- VADJA, S., WENG, Z., ROSENFELD, R. & DELESI, C. *Biochemistry*, 33, 13977, 1994.
- VEDANI, A., ZBINDEN, P., ZINDER, J.P. & GREENIDGE, P.A. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 4987-4994, 1995.
- WAGNER, R.L., DARIMONT, B.D., APRILETTI, J.W., STALLCUP, M.R., KUSHNER, P.J., BAXTER, J.D., FLETTERICK, R.J., YAMAMOTO, K.R. *Genes Dev.*, 12, 3343, 1998.
- WALTERS, P. E STAHL, M. University of Arizona, Arizona, EUA, 1996 (Programa)

WANG, S. MILNE, G.W.A., NICKLAUS, M.C., MARQUEZ, V.F., LEE, J. & BLUMBERG, P.M. *J Med. Chem.*, 37, 1326, 1994.

WEINBERGER, C., THOMPSON, C.C., ONG, E.S., LEBO, R., GRUOL, D.J. & EVANS, R.M. *Nature*, 324, 641-646, 1986.

WILLIAMS, C.M. *Biol. Bull. Woods Hole*, 121, 572, 1967.

WILLIAMS, D.H., COX, J.P.L., DOIG, A.J., GARDNER, M., GEHARD, U., KAYE, P.T., LAL, A.R., NICHOLLS, I.A., SALTER, C.J. & MITCHELL, R.C. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 7020, 1991.

WING, K.D., STAWECKI, R.A. & CARLSON, G.R. *Science*, 241, 470, 1988.

WILSON, T.G. & FABIAN, J. *Dev. Biol.*, 118, 190, 1986.

WILLIAMS, S. P. & SINGLER, P. B. *Nature*, 393, 392, 1998.

WURTZ, J-M., BENOIT, GUILLOT, B., FAGART, J., MORAS, D., TIETJEN, K. & SCHINDLER, M. *Protein Science*, 9, 1073, 2000.