

## **SISTEMA DE TRIAGEM PARA AGONISTAS/ANTAGONISTAS COM BASE NA TRANSATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE ECDISTERÓIDES EM CÉLULAS DE *Drosophila melanogaster* (S2) E *Bombyx mori* (BM5)**

CIRO PEDRO GUIDOTTI PINTO<sup>1</sup>; MOISES JOÃO ZOTTI <sup>2</sup>; JULIANO DE BASTOS PAZINI<sup>3</sup>; RAFAEL ANTONIO PASINI<sup>4</sup>; RODOLFO VARGAS CASTILHOS<sup>5</sup>; ANDERSON DIONEI GRUTZMACHER<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas- pedrociro23@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas- moises.zotti@ufpel.edu.br

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas- julianopazzini@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas- rafa.pasini@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas- rvcastilhos@hotmail.com

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas- adgrutzm@ufpel.edu.br

### **1. INTRODUÇÃO**

Ecdisteróides, largamente distribuídos nos reinos animal e vegetal (LAFONT et al., 2002), são um grupo de hormônios esteróides que controlam os processos de muda e metamorfose em artrópodes (DINAN & HORMANN, 2005). Dentre estes, os hormônios ecdisônio e 20-hidroxi-ecdisônio (20E) são os mais conhecidos. Em 1970 foi realizada a primeira tentativa de síntese de moléculas com atividade análogas ao 20E, fato este que introduziu o termo terceira geração de inseticidas, como referindo-se ao potencial uso de hormônios de insetos como novos inseticidas. A estratégia era suportada, pois quando insetos recebiam tratamentos com ecdisteróides, distúrbios no desenvolvimento e crescimento eram observados levando-os a letalidade.

Desta forma, o desenvolvimento de moléculas tendo como alvo o receptor de ecdisteróides (EcR) tornou-se atrativo, pois compostos atuantes neste receptor ficam com o espectro restrito a insetos e outros artrópodes. Este fato permitiu o desenvolvimento de compostos agonistas de ecdisteróides com uma estrutura de benzoil-hidrazina, chamados tebufenozida, metoxifenozida, cromafenozida, halofenozida e fufenozida (SMAGGHE et al. 2012).

Atualmente, inseticidas comerciais com ação agonista para o EcR estão disponíveis, e compostos ecdisteróides ainda são alvo de estudo para desenvolvimento de novos inseticidas. O desenvolvimento racional de inseticidas inócuos para organismos não alvo depende da existência de receptores específicos nos insetos, como o caso do EcR, e de um robusto sistema de triagem de alto desempenho (HTS – *High throughput screening*).

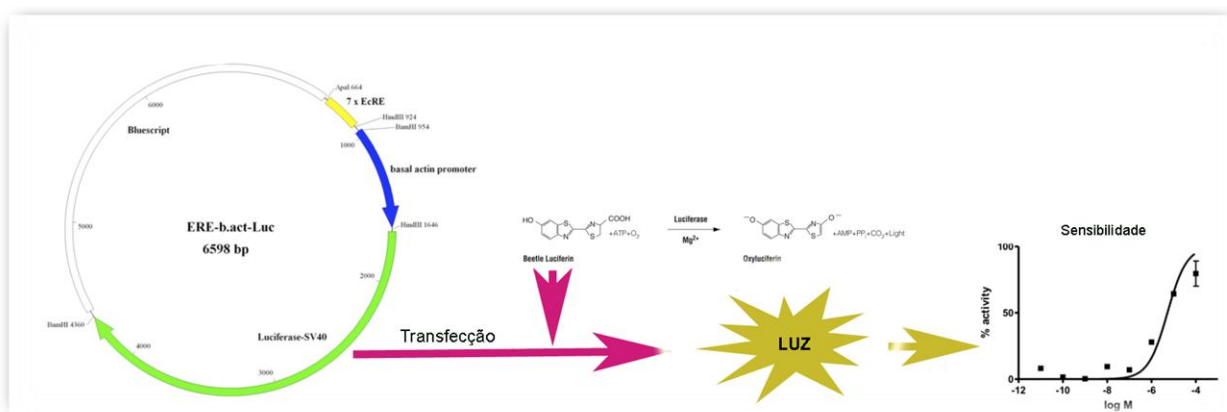
Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a possível atividade agonista/antagonista de moléculas sobre o EcR de Lepidoptera e Diptera por meio de um sistema de triagem, utilizando culturas celulares de *Drosophila melanogaster* (S2) e *Bombyx mori* (BM5), transfectadas com plasmídeo específico e reativo para agonistas/antagonistas do EcR.

### **2. METODOLOGIA**

As culturas celulares foram mantidas no Laboratório de Cultura Celular, Departamento de Fitossanidade da UFPel, a 27°C. Para as células S2 foi utilizado o meio de cultura HyQ SFX-Insect™, já as células de Bm5 foram mantidas em IPL-41, suplementada com soro fetal de bovino a 10%. Os produtos testados para validação do sistema foram ciasterona, inokosterona, castasterona, tebufenozida,

os quais foram obtidos a partir de doação da Rohm & Haas Co. (Spring House, PA) e o 20E foi comprado na Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

O ensaio foi realizado com o intuito de verificar a habilidade de transativação gênica nas células transfectadas com o plasmídeo ERE.bact.Luc (Figura 1). Desta forma as células foram transfectadas com o plasmídeo através de Lipofectina (Life Technologies, São Paulo, Brasil), seguindo método descrito anteriormente (MOSALLANEJAD & SMAGGHE, 2009). O plasmídeo transfectado possuía o gene responsável pela produção da enzima luciferase, a qual realiza a catalise de conversão da molécula luciferina em oxiluciferina. Placas com seis poços foram preenchidas com  $3 \times 10^6$  células de S2 ou  $2 \times 10^6$  células de Bm5. As células transfectadas foram incubadas a 27°C por 5 horas, logo após o meio de cultura foi removido e substituído por um novo meio.



**Figura 1.** Sistema utilizado para testar a atividade de compostos com atividade agonista/antagonista para o receptor ecdisteróides.

As células foram tratadas com as moléculas em teste com concentrações de 5–500  $\mu\text{M}$ . A solução celular para *D. melanogaster* foi preparada com densidade de  $2 \times 10^6$  células/ml e para *B. mori* utilizada a concentração de  $2-3 \times 10^5$  células/ml. Na sequência, 1  $\mu\text{l}$  da solução com o composto foi adicionada na placa de 96 poços, seguida de 100  $\mu\text{l}$  da solução celular. Para os testes de atividade agonista de ecdisteróides, a concentração de 500nM de 20-Hidroxi-ecdisona foi utilizada como controle positivo (SWEVERS et al., 2004).

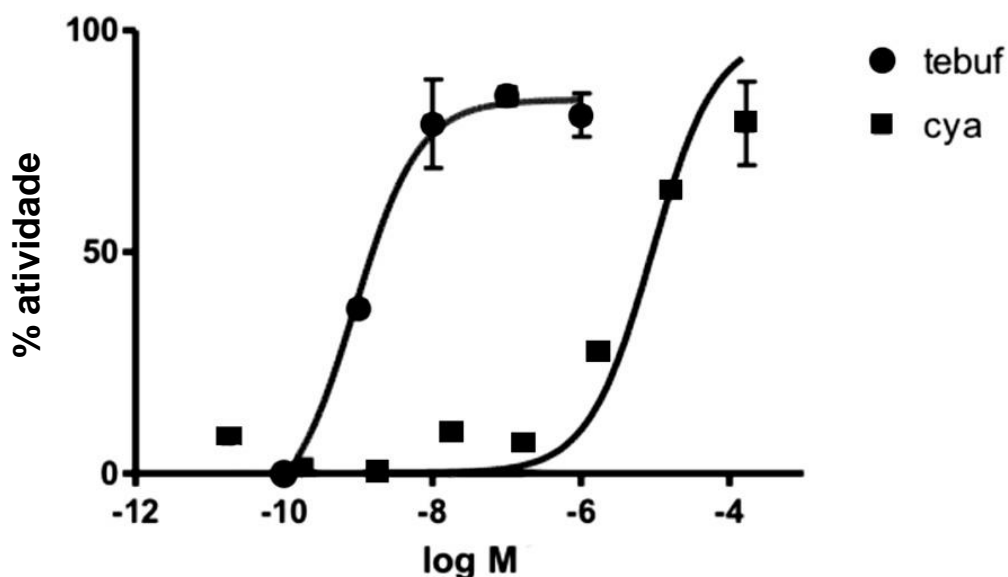
Steady-Glo (Promega, São Paulo, Brasil) foi utilizado para mensurar a expressão de luciferase. 100  $\mu\text{l}$  de substrato para luciferase foi adicionado em cada poço da placa e a luminescência foi mensurada em luminômetro (Hidex). Para cada concentração três repetições foram feitas, sendo que cada experimento foi repetido duas ou três vezes.

Os dados foram apresentados em percentual de resposta, comparado ao tratamento com 500nM de 20E (controle positivo).  $\text{EC}_{50}$  (valores médios de concentração efetiva para indução gênica) e  $\text{IC}_{50}$  (valores médios de concentração inibitória) com confiabilidade de 95% foram calculados com Prismv4 (GraphPad, La Jolla, CA). A precisão dos dados foi avaliada baseada nos valores  $R^2$  do modelo de curva sigmoide.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos pela transativação do EcR indicaram que a ciasterona apresentou atividade agonista em células de *D. melanogaster*. Verificou-se também que a atividade da ciasterona foi cinco e cem vezes menor que

tebufenozida e 20-hidroxi-ecdisona (20E), respectivamente. Em células Bm5, a atividade da ciasterona foi similar àquela verificada em S2, mas o efeito da tebufenozida, molécula específica para a ordem Lepidoptera, foi dez mil vezes maior do que observado com ciasterona (Figura 2).



**FIGURA 2.** Atividade agonista de tebufenozida (tebuf) e ciasterona (cya) em células Bm5.

Inúmeros agonistas de ecdisteróides já foram identificados, normalmente com uma concentração efetiva ( $EC_{50}$ ) em torno de  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  M em células B<sub>II</sub> (*D. melanogaster*), no entanto estudos de atividade agonista em receptores de ecdisteróides são relativamente escassos (DINAN & HORMANN, 2005). No presente estudo, contudo, a castasterona apresentou atividade antagonista em células de *D. melanogaster* (Tabela 1). É bastante evidente que esta atividade é consideravelmente superior do que em células de *B. mori*, sugerindo uma ação específica em dípteros.

**TABELA 1.** Atividade antagonista de 20-Hidroxi-ecdisônio (20E), tebufenozida e três novos esteróides em células S2 e Bm5.

Tratamentos	S2	Bm5
	$IC_{50}$ (95% CL; $R^2$ ) ( $\mu$ M)	$IC_{50}$ (95% CL; $R^2$ ) ( $\mu$ M)
20E	Inativo	Inativo
Tebufenozida	Inativo	Inativo
Ciasterona	Inativo	Inativo
Inokosterona	Inativo	Inativo
Castasterona	0,039 (-; 0,97)	18 (-; 0,97)

Dados obtidos como valores médios com intervalo de confiança de 95% e o  $R^2$  como precisão dos dados inseridos no modelo de curva sigmóide Prism v4.

A baixa atividade agonista da ciasterona, quando comparada à tebufenozida, indica a necessidade da utilização de altas concentrações para se obter o efeito esperado. Isto torna esta molécula comercialmente inviável, além disso, a ciasterona mostrou-se pouco específica, pois desencadeou transativação gênica tanto em células S2 quanto em Bm5.

No sistema desenvolvido por DINAN & HORMANN (2005), as células expressam respostas aos ecdisteróides de várias formas, sendo que as mais típicas são o alongamento e agregação (COURGEON, 1972). Desta forma, os resultados dependem de avaliações da proliferação e/ou mudança na morfologia, aglutinação e comprimento das células (CHERBAS, 1980), que na maioria dos casos, são de difícil mensuração. Assim, sistemas baseados na transativação do EcR são mais eficientes para a triagem de agonistas/antagonistas do hormônio natural.

#### 4. CONCLUSÕES

Ciasterona, o único composto testado com atividade agonista, apresentou um efeito várias vezes inferior quando comparado a molécula inseticida utilizada comercialmente, a tebufenozida. A castasterona apresentou forte atividade antagonista em células S2, apresentando assim, potencial para o desenvolvimento de novos inseticidas específicos para o EcR, ausente em humanos e mamíferos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHERBAS, L.; YONGE, C. D.; CHERBAS, P.; WILLIAMS, C. M. The morphological response of Kc-H cells to ecdysteroids: hormonal specificity. **Wilhelm Roux's Archives of Developmental biology**, New York, v.189 p.1-15, 1980.

COURGEON, A. M. Action of insect hormones at the cellular level. Morphological Changes of a diploid cell line of *Drosophila melanogaster*. **Experimental Cell Research**, Stockholm, v.74 p.327-336, 1972.

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

LAFONT, R.; HARMATHA, J.; MARION-POLL F.; DINAN, L.; WILSON I. D. 2002 **The ecdysone handbook**, 3ª edition, on-line. Acessado em 15 de mai. 2015. Online. Disponível em: <http://ecdysone.org>.

MOSALLANEJAD, H. & SMAGGHE, G. Biochemical mechanisms of methoxyfenozide resistance in the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. **Pest Management Science**, v.65, p.736-737, 2009.

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

SWEVERS, L.; KRAVARITI, L.; CIOLFI, S.; XENOU-KOKOLETSI, M.; RAGOUSSIS, N.; SMAGGHE, G.; NAKAGAWA, Y.; MAZOMENOS, B.; IATROU, K. A cell-based high-throughput screening system for detecting ecdysteroid agonists and antagonists in plant extracts and libraries of synthetic compounds. **FASEB Journal**. v.18p.134-136, 2004.