



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E
BIOPROCESSOS
ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

IZABELA CRISTINA PEREIRA CAMPOS

**MODELAGEM E DOCKING MOLECULAR DA GLUTATIONA
S-TRANSFERASE EPSILON 2 DE *Aedes Aegypti*: POSSÍVEIS
IMPLICAÇÕES NA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS**

SUMÉ-PB

2017

IZABELA CRISTINA PEREIRA CAMPOS

**MODELAGEM E DOCKING MOLECULAR DA GLUTATIONA
S-TRANSFERASE EPSILON 2 DE *Aedes Aegypti*: POSSÍVEIS
IMPLICAÇÕES NA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Trindade Maia

**SUMÉ-PB
2017**

C198m Campos, Izabela Cristina Pereira.
Modelagem e *Docking* molecular da glutathione S-transferase épsilon 2 de *Aedes aegypti*: possíveis implicações na resistência a inseticidas químicos. / Izabela Cristina Pereira Campos. - Sumé - PB: [s.n], 2017.

65 f.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Trindade Maia.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia - Bioprocessos. 2. *Aedes aegypti*. 3. Modelagem comparativa. I. Título.

CDU: 616-036(043.1)

IZABELA CRISTINA PEREIRA CAMPOS

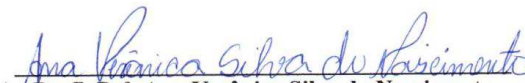
**MODELAGEM E DOCKING MOLECULAR DA GLUTATIONA
S-TRANSFERASE EPSILON 2 DE *Aedes Aegypti*: POSSÍVEIS
IMPLICAÇÕES NA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rafael Trindade Maia
UAEDUC /CDSA/UFCG
Orientador



Prof. Dr. Ana Verônica Silva do Nascimento
UAEB/CDSA/UFCG
Examinador 1



Prof. Dr. Cecir Barbosa de Almeida Farias
UAEP/CDSA/UFCG
Examinador 2

Aprovado em 14 de Setembro de 2017

SUMÉ – PB

**À Deus e aos meus amados pais,
Tarciso Campos e Ivonete Campos,
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me proteger a todo instante e por ter me abençoado com uma família maravilhosa;

Ao melhor pai do mundo, Tarciso Campos, eu só tenho a agradecer por tanto amor, cuidado e carinho. Meu eterno herói, obrigada por tudo;

À minha querida mãe, Ivonete Campos, exemplo de mulher guerreira e batalhadora. Obrigada por sempre estar ao meu lado me apoiando em todos os momentos. Mãe és minha inspiração;

À minha linda irmã, Itana Campos, amiga fiel, parceira, confidente. Obrigada por todo seu amor e cuidado, tu és meu orgulho;

Ao meu irmão, Isaac Campos, por sempre se preocupar comigo, me apoiando e ajudando sempre que pode;

A toda minha família, por todo o apoio e incentivo, pelo amor e por sempre acreditar em mim. Agradeço especialmente a todas minhas tias paternas;

À minha querida amiga-irmã, Rosilândia Almeida, pela amizade, palavras de apoio, conselhos, risadas, cumplicidade, pela convivência durante todo esse tempo de curso, enfim, por todos os momentos que passamos juntas. Rose, dizem que Deus coloca anjos em nossas vidas, na minha você é um deles. Obrigada por tudo;

As minhas amigas-irmãs de infância, Bruna Alves e Elma Ioná, que mesmo estando distante sempre estão prontas para me ajudar. Meninas, obrigada por tudo. Amo vocês;

As minhas queridas amigas, Vanessa de Oliveira, Joanny Bandeira e Edgleiga Feitoza por todo esse tempo de convivência, principalmente na reta final do curso, onde nossa amizade se fortaleceu ainda mais. Espero que nossa amizade perdure por muito tempo. Cada uma tem um lugarzinho especial no meu coração;

Ao Professor Dr. Rafael Trindade Maia, o qual eu tenho uma grande admiração como ser humano, por ser essa pessoa humilde e, principalmente, por ter me dado a oportunidade de

participar do projeto de Iniciação Científica que acabou resultando neste trabalho. Sou imensamente grata a ti. Muito obrigada;

Aos amigos/as: André, Adriano, Rafael, Arlene e Wagner, por me proporcionarem momentos divertidos, pelo apoio, mensagens de motivação, conversas e, principalmente, pela amizade;

A todos os meus colegas de turma pelo companheirismo, amizade e risadas durante todo esse período;

As professoras da banca, Prof^a. Dr. Cecir Barbosa de Almeida Farias e a Prof^a Dr. Ana Verônica Silva do Nascimento, pelas orientações, correções e auxílios. Agradeço em especial a professora Ana Verônica por ter me proporcionado a oportunidade de estágio. Cresci muito durante esse tempo que passei com a senhora. Obrigada por tudo;

Aos demais professores que fazem parte do corpo de docentes do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do CDSA/UFCG, contribuindo com seus ensinamentos para a minha formação acadêmica;

A equipe de funcionários que fazem parte do CDSA/UFCG. Especialmente a Melzinho, Cristiano, Afonso e João, pelas conversas e momentos de descontração. Agradeço também aos técnicos dos laboratórios pelos ensinamentos, em especial a Osvaldo e Allan;

Ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) e a Universidade Federal de Campina Grande (UFCG);

A cidade de Sumé por ter me acolhido durante todo esse tempo, cidade esta que tenho um carinho enorme;

E por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a minha formação.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4.13

RESUMO

As glutathionas S-transferases constituem uma superfamília de enzimas envolvidas em reações de desintoxicação celular em vários organismos. Na classe epsilon desta superfamília, a AaGSTE2 (glutathiona S-transferase epsilon 2 de *Aedes aegypti*) tem sido associado a resistência a diversos inseticidas químicos. O uso indiscriminado destes compostos químicos para o combate do mosquito transmissor de várias doenças, como a dengue, acabou selecionando uma variedade de insetos resistentes. A capacidade que estas enzimas apresentam de evoluírem também contribuiu para a ocorrência deste fenômeno. Considerando-se que a função de uma enzima está intimamente relacionada com sua estrutura tridimensional, ferramentas da bioinformática como modelagem por homologia vem sendo aplicado no estudo de elucidação de proteínas. Sendo assim, diante da disponibilidade da sequência desta enzima em banco de dados, o presente trabalho teve como objetivo construir um modelo para a AaGSTE2, através do uso de técnica computacional, utilizando o método de modelagem por homologia. A sequência de referência (molde) utilizada para construção do modelo foi uma glutathiona S-transferase classe epsilon de *Anopheles gambiae* por apresentar identidade de 71%, a mesma foi obtida no banco de dados PDB. O modelo foi construído com o auxílio do software *Swiss model* e validado através do programa PROCHECK. Com o auxílio do GHECOM também foi realizado uma busca dos aminoácidos que estariam participando do sítio catalítico da GST. Em seguida, com o modelo construído, foi realizado *docking* molecular com os compostos DDT, Carbaril e CDNB contra a GST no programa AUTODOCK 1.5.6, para verificação de possíveis conjugações entre os substratos e a enzima. Os resultados da modelagem e do *docking* molecular mostraram que a AaGSTE2 tem potencial de ligação com os inseticidas estudados. Assim, conclui-se que a metodologia usada na pesquisa poderá servir em estudos futuros para elucidação de proteínas. Como também é possível realizar estudos de *docking* molecular com outros tipos de inseticidas químicos com o modelo da enzima construído.

PALAVRAS-CHAVE: GST. Modelagem Comparativa. Atracamento molecular. Bioinformática.

ABSTRACT

Glutathione S-transferases are a superfamily of enzymes involved in cell detoxification reactions in wide range of organisms. In mosquito there are at least six classes of GSTs. In the epsilon class of this superfamily, AaGSTe2 (glutathione S-transferase epsilon 2 from *Aedes aegypti*) has been associated with resistance to various chemical insecticides. The indiscriminate use of these compounds to combat mosquitoes that transmit several diseases, such as dengue, ended up selecting a variety of resistant insects. The ability of these enzymes to evolve also contributed to the occurrence of this phenomenon. Considering that the function of an enzyme is closely related to its three-dimensional structure, bioinformatics tools such as homology modeling has been applied in the study of protein elucidation. Thus, due to the availability of the sequence of this enzyme in a database, the present work aimed to construct a model for AaGSTe2, by computational techniques, such as the homology modeling method. The reference sequence (template) used to construct the model was an epsilon S-transferase glutathione class of *Anopheles gambiae* for presenting 71% identity, the same was obtained in the PDB database. The model was built with the help of Swiss model software and validated through the PROCHECK program. With the help of GHECOM, a search of the amino acids that were participating in the GST catalytic site was also carried out. Then, with the model built, molecular docking was performed with DDT, Carbaryl and CDNB against GST in the AUTODOCK 1.5.6 program, to verify possible conjugations between the substrates and the enzyme. The results of modeling and molecular docking pointed a possible role of AaGSTe2 in insecticide resistance. Additionally, it can be conclude that the methodology used in the research may be useful in future studies to elucidate proteins. As it is also possible to perform molecular docking studies with other types of chemical insecticides with the model of the enzyme constructed.

KEY-WORDS: GST. Comparative modeling. Molecular docking. Bioinformatics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de transmissão da dengue.....	22
Figura 2 - Países e áreas de risco de transmissão da dengue, caracterizando uma maior incidência destes mosquitos nessas regiões.....	24
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	24
Figura 4 - Esquema da dinâmica estrutural e função proteica. O modelo pressupõe que a proteína apresenta um conjunto de conformações, onde o estado nativo PN interage com o ligante nativo N. Conformeros alternativos representam variações na estrutura, variações na cadeia lateral e loops de sítio ativo. Funções alternativas podem ser mediadas por conformerros menores (por exemplo, P4), como a interação promiscua com L*.....	27
Figura 5 - Representação da estrutura química da GSH, formado por glutamato, cisteína e glicina.....	29
Figura 6 - Representação esquemática de conjugação GSH-Xenobiótico. A letra “X” representa o substrato lipofílico. Em vermelho representa o grupo sulfidril da glutationa.....	30
Figura 7 - Reação de dehidrocloração do DDT catalisada pela GST.....	32
Figura 8 - Representação geral do processo de modelagem por homologia.....	34
Figura 9 - Formação do complexo proteína-ligante.....	35
Figura 10 - Alinhamento entre as sequências AaGSTE2 e AaGSTE.....	43
Figura 11 - Gráfico de Ramachandran para validação da AaGSTE2, obtido através da ferramenta PROCHECK, no servidor SWISS MODEL. Onde, 91.1% dos resíduos se encontram em regiões mais favoráveis (vermelho), 8,4% em regiões permitidas (amarelo), 0% em regiões generosamente permitidas (bege) e 0.5% em regiões não permitidas (branca).....	44
Figura 12 - Gráfico obtido do SWISS MODEL, para a AaGSTE2. No Anolea e Gromos, estão caracterizadas em verde as regiões em que os resíduos se encontram em conformações mais favoráveis; em vermelho em conformações menos favoráveis. O Gromos mostra o gradiente de curva de diversas cores, onde indicam baixa energia (azul) a vermelho (alta energia).....	45
Figura 13 - Valores de cada parâmetro avaliado por meio do QMEAN6.....	46
Figura 14 - Distribuição do <i>Z-score</i> . O “x” evidenciado no círculo amarelo representa o modelo da AaGSTE2.....	47

Figura 15 - Gráfico de distribuição do <i>Z-score</i>	48
Figura 16 - Visualização dos sítios de ligação calculados pelo GHECOM, dentro de um raio de 4Å. A cor vermelha representa o sítio 1, a cor azul escuro representa o sítio 2, a cor verde o sítio 3, a cor amarela o sítio 4 e a cor azul claro o sítio 5.....	52
Figura 17 - Complexo proteína-ligante para o carbaril. A cor vermelha representa a enzima, a azul os resíduos que interagem com o ligante, em laranja.....	56
Figura 18 - Identificação dos resíduos conjugado com o ligante Carbaril. A cor azul representa os resíduos de interação com o ligante, em laranja.....	56
Figura 19 - Complexo proteína-ligante para o CDNB. A cor vermelha representa a GST, em amarelo os átomos de interação com o ligante, em verde.....	57
Figura 20 - Identificação dos resíduos conjugado com o ligante CDNB. A cor amarela representa os resíduos de interação com o ligante, em verde.....	57
Figura 21 - Complexo proteína-ligante para o DDT. A cor vermelha representa a enzima, a cor amarela os resíduos de interação com o ligante, em verde.....	58
Figura 22 - Identificação dos resíduos conjugado com o ligante DDT. A cor amarela representa os resíduos de interação com o ligante, em verde.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência protéica da GSTE2 do <i>Aedes aegypti</i>	37
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas dos ligantes usados no <i>docking</i> molecular.....	39
Tabela 2 - Aminoácidos que constituem os sítios catalíticos da cadeia A da AaGSTE2 e suas respectivas posições, obtido através do software GHECOM.....	49
Tabela 3 - Aminoácidos que constituem os sítios catalíticos da cadeia B da AaGSTE2 e suas respectivas posições, obtido através do software GHECOM.....	50
Tabela 4 - Valores das energias de ligação, energias intermoleculares e caracterização dos resíduos e sua posições.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
DDT	<i>Dicloro-difenil-tricloroetano</i>
GST	Glutathione S-transferase
kDa	Unidade de medida de massa atômica
GSTE	Glutathione S-transferase classe Epsilon
AaGSTE2	Glutathione S-transferase classe Epsilon do <i>Aedes aegypti</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
AG	Algoritmo Genético
LGA	<i>Lamarckian Genetic Algorithm</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
ANOLEA	<i>Atomic Non-Local Environment Assessment</i>
GROMOS	<i>Groningen Molecular Simulation</i>
CHECOM	<i>Grid based HECOMi finder</i>
CDNB	1-chloro-2, 4-dinitrobenzene
QMEAN	<i>Quality Mean Score</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°N	Norte	Referente à direção
°S	Sul	Referente à direção
°C	Graus Celsius	Referente à unidade de temperatura
Å	<i>Angstrom</i>	Referente à unidade de medida
Ψ	Psi	Ângulo diedral
Φ	Fí	Ângulo diedral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 A DENGUE COMO PRINCIPAL ARBOVIROSE TROPICAL.....	22
3.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO <i>Aedes Aegypti</i>	23
3.3 USO DE INSETICIDAS QUÍMICOS COMO MEDIDA DE CONTROLE DO <i>Aedes Aegypti</i>	25
3.4 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS.....	26
3.5 GLUTATIONAS S-TRANSFERASES.....	27
3.5.1 Definição e Classificação	27
3.5.2 Estrutura e mecanismo de ação das GSTs citosólicas	28
3.5.3 Classe de GST citosólicas associada à resistência a inseticidas	30
3.6 DETOXIFICAÇÃO DE INSETICIDAS PELAS GSTs.....	30
3.6.1 Organoclorados (OCs)	31
3.6.2 Carbamatos	32
3.7 MODELAGEM POR HOMOLOGIA OU MODELAGEM COMPARATIVA.....	33
3.8 <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	34
4 METODOLOGIA	37
4.1 MODELAGEM DA AaGSTE2.....	37
4.1.1 Alinhamento e Construção do modelo da AaGSTE2	37
4.1.2 Validação do modelo	38
4.1.3 Caracterização dos sítios ativos	39
4.2 <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	39
4.2.1 Obtenção e preparação da estrutura dos ligantes	39
4.2.2 Simulação de <i>docking</i>	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 MODELAGEM DA AaGSTE2.....	42
5.1.1 Alinhamento e Seleção da sequência molde	42
5.1.2 Construção e Validação do modelo	43
5.1.3 Caracterização dos sítios ativos	48
5.2 <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	52
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A dengue ou febre do dengue configura-se como uma doença reemergente, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Esse cenário se agrava principalmente nos países tropicais devido às condições climáticas que acaba favorecendo a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

O *Aedes aegypti*, assim como outras espécies de mosquitos vetores possui origem silvestre e ao longo dos anos, devido à destruição do seu habitat natural ocasionada pelas pressões humanas, uma grande variedade deste culicídeo acabou se adaptando ao ambiente urbano passando a adquirir novos hábitos. Essa mudança propiciou uma grande afinidade deste mosquito pelo homem. O comportamento estritamente sinantrópico, antropofílico e hematofágico foi adquirido durante essa evolução. Devido a isto, a incidência das doenças transmitidas por este vetor aumentou drasticamente ao longo do tempo (NATAL, 2002). Por falta de vacinas e/ou medicamentos eficazes para o combate das enfermidades transmitidas por esse vetor, o controle das doenças passou a ser fortemente centralizado no mosquito (PAIVA, 2013).

Uma das estratégias utilizadas para o combate do *Aedes aegypti* consiste no uso de inseticidas químicos, porém, o uso indiscriminado destes pesticidas tem levado ao desenvolvimento contínuo da resistência (OLIVEIRA, 2014). A resistência a inseticidas está associada à intensa pressão seletiva dos indivíduos que possuem alelos que conferem resistência (BRAGA; VALLE, 2007). Outro mecanismo que pode estar associado à resistência a inseticidas, é devido o fato de algumas enzimas apresentarem *evolutibilidade*, formando rearranjos estruturais, e assim, mudando sua forma estrutural e conseqüentemente sua função, havendo a possibilidade de se ligarem a diferentes substratos (TOKURIKI; TAWFIK, 2009). Esse conceito pode explicar a capacidade de algumas enzimas apresentarem potencial de metabolização de vários compostos, como é o caso das enzimas Glutathionas S-transferases (GSTs).

Essa superfamília de enzimas já é bastante estudada, sendo associada ao processo de detoxificação de compostos endógenos e exógenos em organismos eucariotos. A capacidade de metabolizar diversos componentes tóxicos hidrofílicos e hidrofóbicos, tais como: drogas, inseticidas e substratos tóxicos endógenos pela catálise da conjugação da GSH ao centro hidrofílico dos substratos se dá devido ao amplo espectro de especificidade que estas enzimas desenvolveram (OLIVEIRA, 2014).

As GSTs da classe epsilon (GSTE) constituem o grupo de enzimas mais importantes no papel de conferir resistência a organoclorados e carbamatos em diferentes espécies de insetos como no *Aedes aegypti*, *Anopheles culicifacies*, *An. stephensi*, *An. fluviatilis* e *Anopheles gambiae* (RANSON *et al.*, 2001; LUNJUAM *et al.*, 2005; CHIU *et al.*, 2008; MAIA, 2014). Sendo assim, ferramentas da bioinformática como as técnicas de modelagem e *docking* molecular vêm sendo bastante utilizadas para se desvendar o papel de proteínas detoxificadoras de inseticidas, como Glutathione transferases (BAUDRY *et al.*, 2003).

Assim, tendo em vista que a enzima Glutathione S-transferase classe Epsilon 2 de *Aedes aegypti* (AaGSTE2) ainda não tinha sua estrutura elucidada, mas sua sequência primária encontra-se disponível no banco de dados NCBI, o presente trabalho teve como objetivo construir um modelo tridimensional e válido para a AaGSTE2, através da técnica de modelagem comparativa ou modelagem por homologia. Assim, como também validá-lo e na sequência realizar simulações de *docking* com os compostos químicos, DDT, Carbaril e CDNB contra a GST.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Elucidar a estrutura da AaGSTE2 e seu modo de ligação com inseticidas químicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir um modelo tridimensional da AaGSTE2 utilizando o método de modelagem por homologia e validá-lo;
- Identificar complexos proteína-ligante através da técnica de *docking* molecular;
- Identificar qual inseticida apresentou uma menor energia livre de ligação;
- Identificar os aminoácidos da glutatona que interagem com os ligantes.

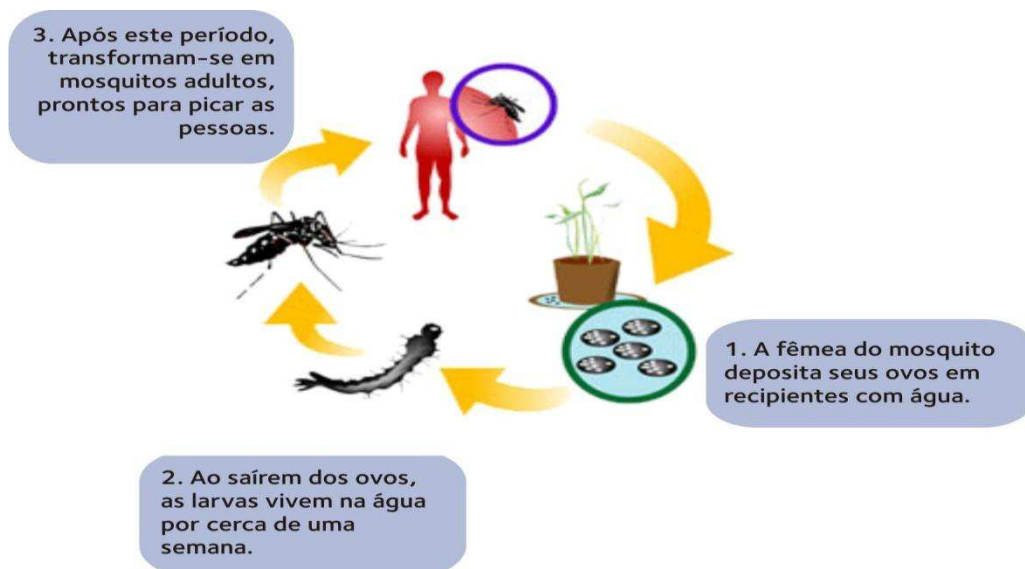
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A DENGUE COMO PRINCIPAL ARBOVIROSE TROPICAL

A dengue é classificada como uma das principais arboviroses tropicais que afeta o homem, e constitui-se como um sério problema de saúde pública no mundo (PORTAL DA SAÚDE, 2017). Segundo dados do portal da saúde (2017), nas últimas 5 décadas a incidência aumentou 30 vezes devido a expansão geográfica, chegando a habitar pequenas cidades e áreas rurais. Estima-se que, anualmente, aproximadamente 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas e que, 2,5 milhões de pessoas vivam em países onde o dengue é endêmico (BHAT *et al.*, 2013).

O ciclo de transmissão da dengue envolve dois hospedeiros: um hospedeiro vertebrado, o ser humano; e um hospedeiro artrópode, os mosquitos do gênero *Aedes* (Figura 1).

Figura 1: Ciclo de transmissão da dengue



Fonte: www.abeb.com.br

Dois tipos de mosquitos do gênero *Aedes* podem sustentar a transmissão do agente etiológico da dengue: o *Aedes aegypti*, um mosquito altamente domesticado e o *Aedes albopictus*. Entretanto, o *Aedes aegypti* classifica-se como principal vetor, devido a sua incidência ser maior em espaços urbanos, tornando-o mais próximo do homem (LIMA, 2009).

Também vale ressaltar que apesar da transmissão do agente etiológico ocorrer principalmente por meio da picada das fêmeas, outros tipos de transmissão podem ocorrer até mesmo quando estas ocorrências são consideradas muito raras. Já foram registrados casos de transmissão vertical, da gestante para o bebê, e por transfusão sanguínea (DIAS *et al.*, 2010; DUARTE, 2015).

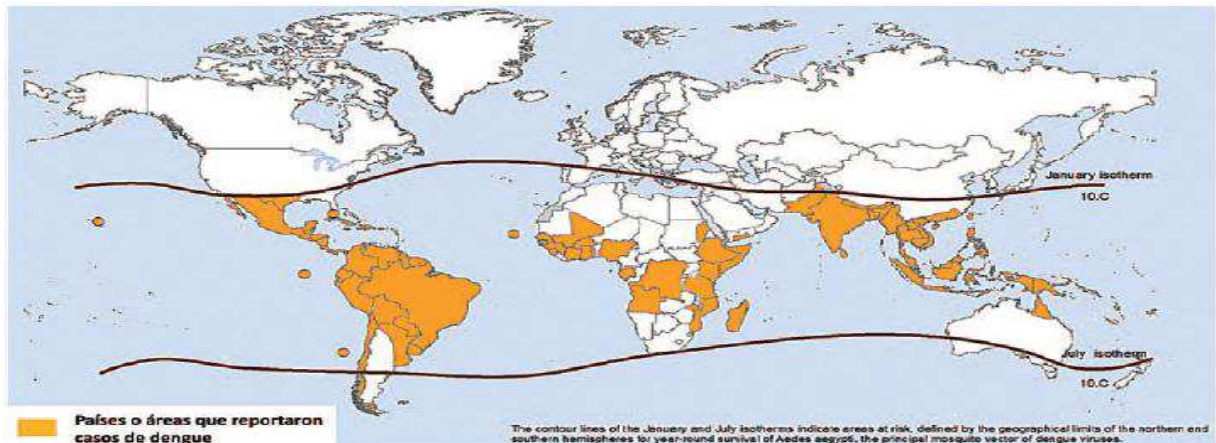
A dengue é a enfermidade viral transmitida por mosquito de mais rápida propagação no mundo. A prevalência e, principalmente a incidência desta doença, resulta em gastos elevadíssimos para as autoridades, devido aos custos provenientes das hospitalizações e tratamentos; campanhas e programas de combate ao vetor, educação e mobilização social, entre outros componentes. Além disso, existem também os custos pessoais gerados pela infecção, tais como por afastamento do trabalho no período de convalescência, tratamento, complicações e morte devido à infecção (ROMERO, 2014).

3.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Devido ao seu papel como transmissor da dengue, como já foi relatado neste trabalho, febre amarela (NATAL, 2002), Chikungunia (TAIUL, 2014) e zika vírus (WHO, 2016), o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é classificado como um dos principais problemas em saúde pública (BESERRA *et al.*, 2009).

Este culicídeo é originário da África, e assim como outras espécies desse gênero, tem origem silvestre (NELSON, 1986; ROMERO, 2014). Sendo notadamente descrito no Egito, o que lhe conferiu seu nome específico (*Aedes aegypti*), ele tem acompanhado o homem em sua permanente migração (BRAGA; VALLE, 2007). Sua distribuição ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, principalmente dentro dos limites de latitude 35°N e 35°S, correspondendo a uma isotérmica de verão de 10°C, figura 1. A preferência destes mosquitos por essas regiões é devido ao clima que estas apresentam, já que um ambiente mais quente e de altas pluviosidades favorece a sua reprodução (NELSON, 1986; ROMERO, 2014).

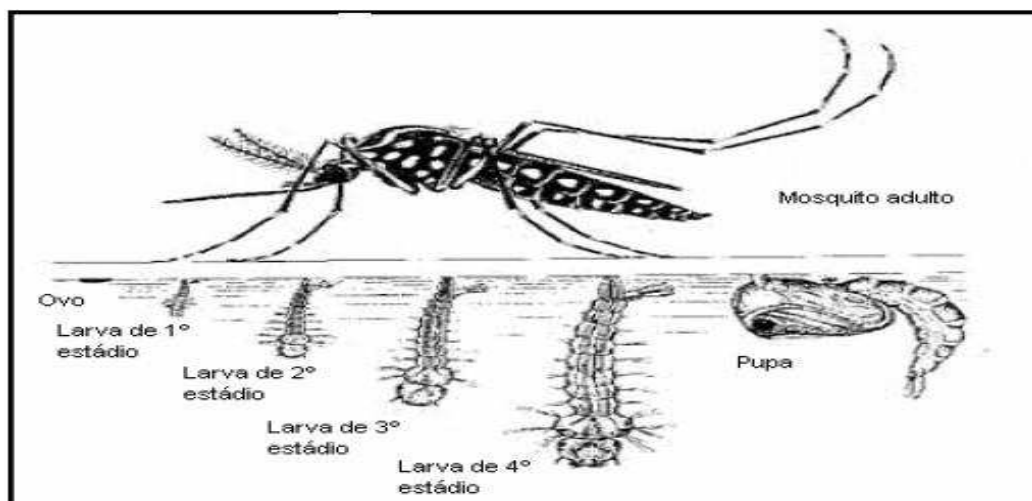
Figura 2: Países e áreas de risco de transmissão da dengue, caracterizando uma maior incidência destes mosquitos nessas regiões.



Fonte: Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica (2015)

Ao longo do tempo esta espécie foi se adaptando ao domicílio e peridomicílio humano e com isso os adultos passaram a habitar o interior das casas, ficando mais próximo do homem (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O ciclo biológico desta espécie é bem curto com duração de 15 a 30 dias, compreendendo as fases de ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (figura 2) (SANTOS, 2008). A proliferação das larvas ocorre principalmente em pequenas coleções de águas rasas e limpas no solo, recipientes artificiais e em locais sombreados (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 3: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*



Fonte: <http://deolhonoaedesaeegypti.blogspot.com.br/p/ciclo-de-vida.html>

O mosquito *Aedes aegypti* tem hábitos diurnos e, sua atividade alimentar inicia-se principalmente ao amanhecer e se estende durante todo o dia (ROMERO, 2014), apresentando, assim, picos de atividade hematofágica durante o período matutino e vespertino (SANTOS, 2008). O comportamento hematofágico desenvolvido por estes mosquitos está estritamente alusivo as fêmeas, já que estas se alimentam preferencialmente do homem, pois a albumina presente no sangue é necessária para a maturação dos ovos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

3. 3 USO DE INSETICIDAS QUÍMICOS COMO MEDIDA DE CONTROLE DO *Aedes aegypti*

Com a descoberta por volta do final do século XIX de que artrópodes e algumas espécies de insetos seriam os responsáveis pela transmissão de várias doenças graves, como o caso da dengue, e tendo em vista que medicamentos e/ou vacinas ainda não estavam disponíveis para a prevenção contra a maioria delas, a medida mais estratégica para o controle da transmissão das doenças passou a ser centralizado no combate ao vetor (ROZENDAAL, 1997).

Uma das estratégias utilizada para o controle de vetores consiste no uso de inseticidas químicos. Este tipo de manejo se baseia no uso de produtos químicos para eliminar ou controlar vetores e oferece como principais vantagens, a rapidez e a facilidade com que atuam (PAIXÃO, 2007). De acordo com Braga e Valle (2007), esta “é uma das metodologias mais adotada como parte do manejo sustentável e integrada para o controle de vetores em Saúde Pública”.

O uso deste método vem sendo adotado desde o século passado. Em relação ao *Aedes aegypti*, os primeiros programas de controle desse mosquito estavam voltados à febre amarela e foram iniciados em Cuba e no Panamá, onde as residências eram tratadas com piretrina e petróleo (OPS, 1995). Outros compostos, como o arsenito de cobre e o verde Paris, também foram usados no combate do mosquito por muitos anos. Porém, estes compostos apresentavam grandes desvantagens, como custo elevado, necessidade de repetidas aplicações e principalmente grau de toxicidade alto. Diante disso, outros tipos de inseticidas para substituir os já utilizados foram desenvolvidos (OLIVEIRA, 2014).

Por volta dos anos 1940, um novo inseticida de efeito residual, passou a ser usado de forma revolucionária no combate de mosquitos em geral, o dicloro-difenil-tricloroetano

(DDT). Este inseticida apresentava como grande vantagem um efeito prolongado, pois, quando aplicado em tetos e paredes das casas, permanecia ativo contra insetos por vários meses (BRAGA; VALLE, 2007; PAIXÃO, 2007). Todavia, como populações de mosquitos foram se tornando resistente a este inseticida, como o caso do *Aedes aegypti*, outros compostos passaram a ser usados no manejo de vetores como forma alternativa (OPS, 1986). Produtos químicos do grupo dos carbamatos e organoclorados, por exemplo, são usados como inseticidas no controle de vetores até hoje (BISSET, 2002; FLORES *et al.*, 2004). Todos os inseticidas destes grupos são neurotóxicos, portanto, atuando sobre o sistema nervoso central dos mosquitos (FLORES *et al.*, 2004; BRAGA; VALLE, 2007; PAIXÃO, 2007).

3. 4 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS

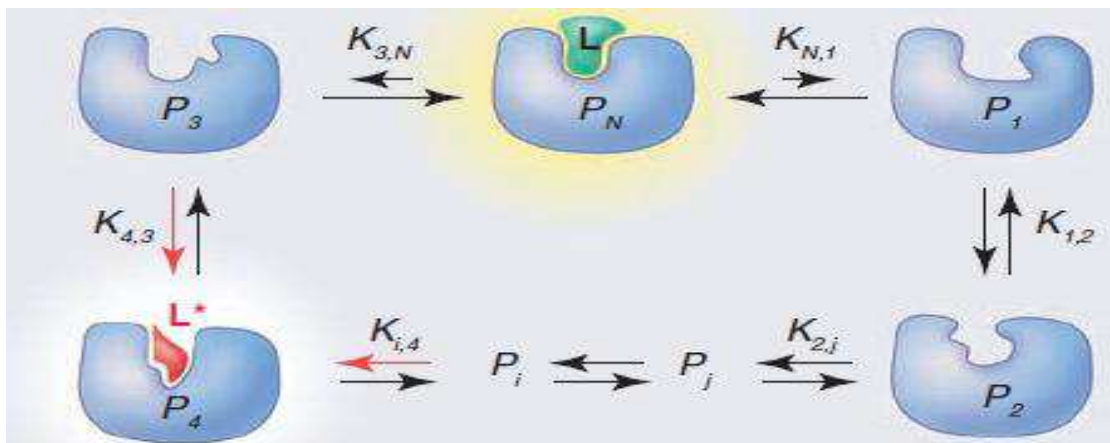
Os produtos químicos passaram a ser usados de forma tão indiscriminada e continuada no combate de vetores na área da saúde pública que com o tempo acabaram causando sérios problemas. O controle de mosquitos, então, passou a ser tornar bastante difícil, pois, o uso frequente destes compostos acabou provocando o aparecimento de populações de insetos resistentes. Para todas as classes de inseticidas tem sido constatada resistência, afetando profundamente o ressurgimento das doenças causadas por vetores (BROGDON; MCALLISTER, 1998; BRAGA; VALLE, 2007), já que os inseticidas ainda continuam sendo usados nos programas de controle, mesmo existindo outros meios alternativos (BRAGA; VALLE, 2007). Estima-se que mais de 450 espécies de artrópodes vetores tenham desenvolvido resistência (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2012; OLIVEIRA, 2014).

A resistência pode ser definida como a capacidade que uma determinada população de insetos possui em tolerar doses de um determinado tóxico, que quando aplicado em condição normal seria letal (MOHAMMED; ABDULSALAM; DEENI, 2015). Esse fenômeno caracteriza-se como uma causa genética. Dessa forma, uma determinada população de insetos pode apresentar uma proporção de indivíduos que apresentem alelos que lhes confirmam resistência a um determinado composto químico. Como estes pesticidas matam apenas alelos suscetíveis e não alelos resistentes, como resultado do uso intenso destes produtos químicos acaba surgindo cepas resistentes (BRAGA; VALLE, 2007).

Outro mecanismo que pode, hipoteticamente, estar relacionado a resistência é a habilidade que algumas proteínas têm de apresentar *evolutibilidade*, que é a capacidade destas fazerem rearranjos estruturais, mudando sua forma estrutural e conseqüentemente sua função,

assim, havendo a possibilidade de se ligarem a diferentes substratos (TOKURIKI; TAWFIK, 2009). Recentemente vem sendo apontadas várias evidências de que esta promiscuidade funcional das enzimas está diretamente relacionada com a flexibilidade da dinâmica de sua estrutura (TOKURIKI; TAWFIK, 2009). Deste ponto de vista, portanto, certas proteínas em seu estado nativo teriam a capacidade de se enovelarem por diferentes caminhos a fim de originarem um conjunto de subestruturas alternativas, capazes de se ligarem a diferentes ligantes (MAIA, 2014), figura 4:

Figura 4: Esquema da dinâmica estrutural e função protéica. O modelo pressupõe que a proteína apresenta um conjunto de conformações, onde o estado nativo P_N interage com o ligante nativo N . Conformêmeros alternativos representam variações na estrutura, variações na cadeia lateral e *loops* de sítio ativo. Funções alternativas podem ser mediadas por conformêmeros menores (por exemplo, P_4), como a interação promíscua com L^* .



Fonte: TOKURIKI e TAWFIK (2009)

3.5 GLUTATIONAS S-TRANSFERASES

3.5.1 Definição e Classificação

As Glutathione S-transferases (GST, EC 2.5.1.18) compreendem uma superfamília de enzimas multifuncionais, que participam do sistema de detoxificação de fase II em organismos eucariontes. São enzimas que catalisam vários compostos xenobióticos, incluindo inseticidas, em produtos solúveis (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; HAYES *et*

al., 2005). Esta família de proteínas encontra-se distribuída na natureza em três classes superiores e são codificadas por distintas famílias multigênicas, estando classificadas de acordo com sua localização dentro da célula (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; FROVA, 2006): GSTs citosólicas (ou solúveis), GSTs microssomais (associadas às membranas) e GST mitocondrial (FROVA, 2006). No entanto, até o momento apenas duas classes de GSTs foram encontradas em insetos, as citosólicas e microssomais (LUNJUAM *et al.*, 2007). Apesar de estarem presentes em insetos e desempenharem atividades catalíticas similares as citosólicas, as GSTs microssomais não se encontram envolvidas com a metabolização de inseticidas. Em contrapartida, as GSTs citosólicas encontram-se distribuídas em maior abundância em diversos organismos, como é o caso dos insetos (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

Atualmente, as GSTs estão aglomeradas em várias classes de acordo com vários critérios, tais como: identidade de sequência, estrutura física dos genes e presença de domínios conservados (FROVA, 2006). A subfamília das GSTs citosólicas está representada por pelo menos seis classes em insetos: sigma, delta, teta, omega, zeta, epsilon (RANSON *et al.*, 2001; LUMJUAN *et al.*, 2007), tendo sido encontrados membros destas seis classes de GST em culicídeos, como o vetor da malária *Anopheles gambiae* e na mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* (RANSON *et al.*, 2002). Delta e epsilon são exclusivos desse grupo. Elas compreendem mais de 65% de GSTs citosólicas encontradas nesses indivíduos (RANSON *et al.*, 2002). Além disso, essas duas classes englobam a maior parte de GSTs envolvidas no metabolismo de xenobióticos de insetos. As demais classes, teta, ômega, zeta e sigma, possuem uma distribuição bem mais ampla entre os grupos taxonômicos (WILDENBURG *et al.*, 1998).

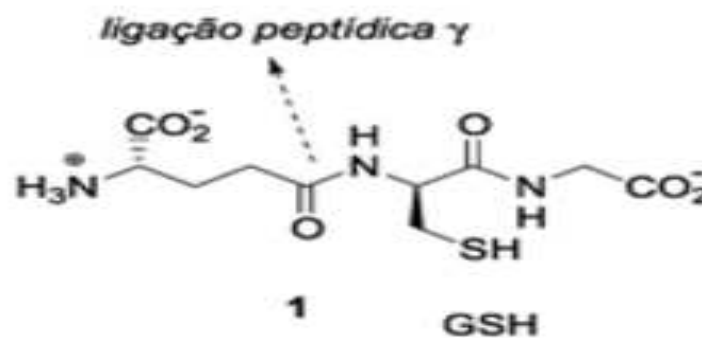
A nomenclatura das GSTs dos insetos consta de três partes: nome da espécie a qual esta faz parte; a própria classe GST e o número de acordo com a ordem de sua descoberta (CHE-MENDONZA *et al.*, 2009). Por exemplo, uma proteína identificada por AgGSTD1, significa que esta é uma GST de *Anopheles gambiae*, da classe Delta descoberta pela primeira vez (MAIA, 2014).

3.5.2 Estrutura e mecanismo de ação das GSTs citosólicas

As GSTs citosólicas são formadas por duas subunidades, cada uma medindo aproximadamente 25 kDa (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005), podendo ser

homodiméricas ou heterodiméricas (MANNERVIK; DANIELSON, 1988). A cadeia polipeptídica de cada monômero dobra-se em dois domínios (N-terminal e C-terminal), e estes se unem por uma alça. Cada domínio apresenta um sítio de ligação específico. O domínio N, composto de quatro folhas beta e três hélices, adota conformação semelhante ao domínio da tiorretóxina encontrado em muitas proteínas que se ligam as GSH ou cisteína. Essa região, mais conservada e altamente específica para este tripeptídeo, é constituída por a maioria dos resíduos envolvidos na ligação da glutathiona GSH (sítio G), figura 5. Já o domínio C, consiste de um número variável de alfas-hélices. Nesta região, situam-se os resíduos do sítio H ou sítio de ligação do substrato hidrofóbico eletrofílico. Essa estrutura apresenta uma maior especificidade e flexibilidade, podendo se ligar a vários substratos (SHEEHAN *et al.*, 2001; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

Figura 5: Representação da estrutura química da GSH, formado por glutamato, cisteína e glicina



Glutationa, γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina

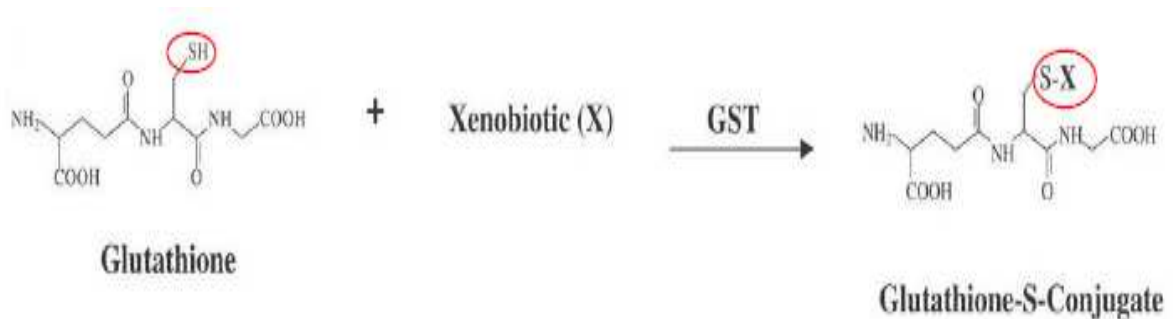
Fonte: HUBER (2008)

Em uma reação de conjugação catalisada por uma GST, uma molécula de GSH reduzida se combina com uma molécula de um composto específico (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005), geralmente citotóxico, que ao ligar-se ao grupamento eletrofílico, ocorrerá oxidação, passando do estado reduzido para o estado oxidado, e assim, resultando num componente mais solúvel em água e fácil de ser excretado (MAIA, 2014).

O processo ocorre da seguinte maneira (figura 6): o substrato lipofílico se liga ao sítio H, enquanto o resíduo do sítio G interage ativando o grupo sulfidril da glutathiona (evidenciado em vermelho na figura 6), e como consequência há a sua redução, gerando um ânion tiolato, onde este acaba adquirindo a capacidade de interagir com o substrato

hidrofóbico ligado ao sítio H da enzima. Esse processo de conjugação acaba neutralizando os domínios eletrofílicos do substrato e assim, tornando-os mais solúveis (HEMINGWAY *et al.*, 2004; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; MONTELLA; 2008).

Figura 6: Representação esquemática de conjugação GSH- Xenobiótico. A letra “X” representa o substrato lipofílico. Em vermelho representa o grupo sulfidril da glutatona.



Fonte: MEDEIROS (2011)

3.5.3 Classe de GST citosólicas associada à resistência a inseticidas

A classe Epsilon das GSTs (GSTE) citosólicas específica de insetos, compreende uma das subfamílias mais importantes em conferir resistência a compostos químicos, como por exemplo, organoclorados e organofosforados (LUJUAM, 2007) e, recentemente um estudo realizado por Ibtissem *et al.* (2012) com GSTs de *Octodrilus complanatus* comprovaram um papel dessas enzimas na resistência a carbamatos.

Em culicídeos, recentemente vários estudos comprovam um envolvimento direto de um membro da classe epsilon na resistência aos inseticidas, como o *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (STRODE, 2008; LUNJUAM, 2011; RIVERON, 2014; HELVECIO, 2014). As sequências da classe epsilon de *Aedes aegypti* já foram anotadas (LUNJUAM *et al.*, 2007) e encontram-se disponíveis em bases de dados como *genbank* e *vectorbase*.

3.6 DETOXIFICAÇÃO DE INSETICIDAS PELAS GSTs

A grande capacidade das GSTs apresentar atividade de detoxificação de xenobióticos, como, por exemplo, os inseticidas, implica diretamente na metabolização destes compostos (MAIA, 2014). Na literatura, há diversos estudos que comprovam o envolvimento destas

enzimas na detoxificação de várias classes destes inseticidas. No presente trabalho os compostos investigados fazem parte do grupo dos organoclorados e carbamatos.

3.6.1 Organoclorados (OCs)

Os organoclorados são hidrocarbonetos clorados, portanto, constituídos por carbono, hidrogênio e cloro (YOGUI, 2002; BRAGA; VALLE, 2007) e estão distribuídos em quatro grupos: difenil-alifáticos, hexaclorociclohexanos, ciclodienos e policloroterpenos (WARE; WHITACRE, 2004; OLIVEIRA, 2014).

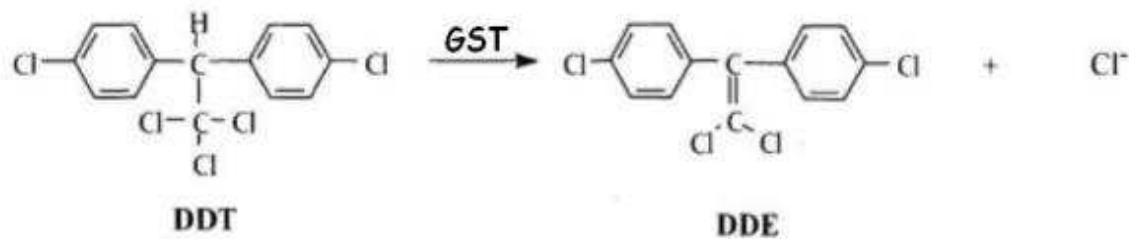
Tratando-se dos compostos do grupo difenil-alifáticos, no qual o DDT faz parte, estes foram os primeiros inseticidas a serem usados no controle de pragas em larga escala (YOGUI, 2002). O entomologista suíço, Dr. Paul Muller, foi o responsável pela descoberta da propriedade deste composto como inseticida, em 1939, chegando a ganhar o Prêmio Nobel de Medicina, em 1948. Seu uso estava voltado para o controle da malária, febre amarela e muitas outras doenças vetadas por insetos (WARE; WHITACRE, 2004). De acordo com Oliveira (2014 apud BECKER *et al.*, 2010), apesar do modo de ação do DDT ainda não ter sido definido, é notório que este age no canal de sódio, provavelmente abrindo-o e mantendo aberto, assim, destruindo o equilíbrio de íons sódio e potássio dos axônios. Em consequência, a transmissão dos impulsos nervosos de insetos e mamíferos são interrompidos. Seu efeito está diretamente correlacionado com a temperatura negativa: quanto mais baixa a temperatura ambiente for, mais tóxico se torna para insetos (WARE; WHITACRE, 2004).

A catalisação de organoclorados por GSTs podem ocorrer através de duas reações de hidrocarbonetos halogenados: conjugação com o GSH e dehidroclorinação (TANG; TU, 1994). No caso do DDT, a reação de dehidroclorinação é a principal via de detoxificação para este inseticida (HAYES; WOLF, 1988), sendo este mecanismo de resistência mais presente em mosquitos (BROWN, 1986; HEMINGWAY, 2000). Essa atividade que as GST podem apresentar é conhecida como dehidroclorinase ou DDTase, como assim também pode ser chamada (HEMINGWAY *et al.*, 2004).

Na reação (figura 7), o grupamento tiol (S⁻) gerado no sítio ativo da GSH remove um átomo de hidrogênio da molécula de DDT, e como resultado há a eliminação de um átomo de cloro. Esse processo acaba gerando um metabólito menos tóxico, o DDE (Diclorodifenilcloroetano) (HEMINGWAY *et al.*, 2004). No final da reação, os níveis de GSH não se alteram isto porque ela atua mais como um co-fator em vez de conjugado (LIPKE;

CHALKLEY, 1962; CLARK; SHAMAAN, 1984). Vários estudos relacionam o aumento da resistência ao DDT a um aumento na taxa de dehidrocloração por GSTs em diferentes espécies de insetos, em *Anopheles dirus* (PRAPANTHADARA *et al.*, 1996, 2000b), *Aedes aegypti* (GRANT *et al.*, 1991) e *An. gambiae* (RANSON *et al.*, 2001; ORTELLI *et al.*, 2003).

Figura 7: Reação de dehidrocloração do DDT catalisada pela GST



Fonte: MEDEIROS (2011)

3.6.2 Carbamatos

Já os carbamatos constituem o grupo de inseticidas derivados do ácido carbâmico (WARE; WHITACRE, 2004). Segundo Faria (2009, apud CASIDA e QUISTAD, 1998), estes compostos foram descobertos nos Estados Unidos, em 1954. Um dos primeiros compostos deste grupo a ser comercializado foi o carbaril, introduzido em 1956 (WARE; WHITACRE, 2004). Apesar de ter um curto poder residual, os carbamatos possuem efeito letal rápido sobre os insetos (BRAGA; VALLE, 2007). Já é conhecido que os inseticidas deste grupo atuam inibindo a enzima Acetilcolinesterase (AChE), envolvendo a reação de carbamilação. Além disso, os carbamatos são potentes inibidores das aliesterases e apresentam seletividade pronunciada contra AChE de diferentes espécies (WARE; WHITACRE, 2004).

Apesar de não estar bem definido o mecanismo de metabolização dos inseticidas deste grupo pelas GSTs, vários estudos comprovam que esta enzima desempenha um papel na metabolização destes compostos, contribuindo para a resistência a estes produtos químicos. Por exemplo, em um estudo realizado por Qin e colaboradores (2012), relacionando uma classe de GST de *L. migratoria manilensis* com a detoxificação do carbaril, os mesmos observaram que estas enzimas apresentavam um papel significativo na metabolização do

composto estudado. No ano seguinte, estes mesmos autores realizaram um estudo com quatro classes de GSTs de *Locusta migratoria* por ensaios e recombinação e, diante dos resultados eles observaram que estas enzimas realmente apresentam um papel significativo na detoxificação do carbaril (QIN *et al.*, 2013).

3.7 MODELAGEM POR HOMOLOGIA OU MODELAGEM COMPARATIVA

Devido a mutações, relacionadas ao mecanismo de evolução genética, divergências moleculares podem ocorrer e, conseqüentemente, formar famílias de proteínas com estruturas semelhantes. Sendo assim, proteínas que derivam de um ancestral comum são chamadas de homólogas (HÖLTJE *et al.*, 1997) e, mesmo apresentando sequências um pouco diferentes, elas tendem a ser semelhantes em sua forma (KHOURI, 2002).

Durante o processo de evolução, as estruturas 3D das proteínas se mantêm conservadas, principalmente os resíduos funcionais quem tem como papel manter o desempenho e manutenção das funções específicas (RIGDEN; MELLO, 2002). Elucidar a estrutura de uma proteína é essencial para seu estudo, visto que, as funções desempenhadas por estas estão totalmente dependentes de sua estrutura terciária. Sendo assim, ferramentas da bioinformática já vêm sendo bastante usadas para tentar desvendar diversos mecanismos moleculares, como por exemplo, uso da técnica de modelagem (SOUZA, 2008).

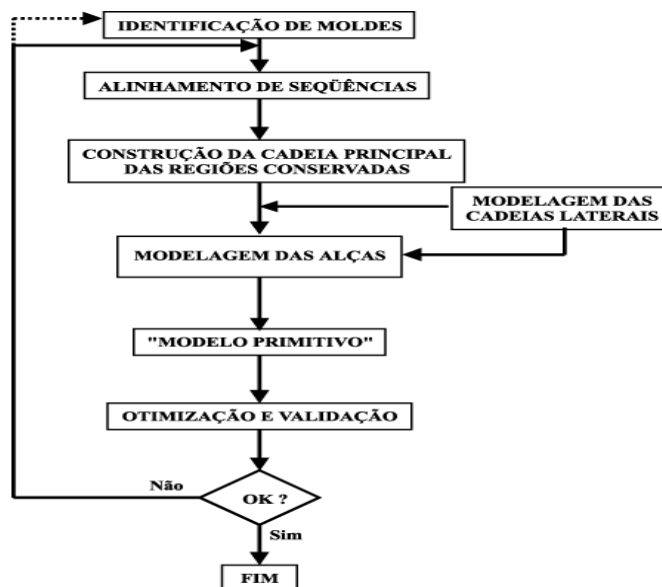
A modelagem por homologia ou modelagem comparativa, consiste em uma técnica computacional utilizada para elucidação de modelos tridimensionais de proteínas, baseando-se no conceito de evolução molecular, partindo do princípio de que proteínas semelhantes que apresentam sequências com alta identidade de aminoácidos exibem estruturas tridimensionais semelhantes (CAVASOTTO; PHATAK, 2009). Desse modo, depois que uma proteína homóloga for identificada, esta poderá ser modelada usando uma proteína molde que possua uma identidade sequencial >30 % e boa resolução (DIAS; TAVEIRA, 2011; MAIA, 2014).

Tal método é de bastante interesse na construção de novos modelos, pois o número de estruturas resolvidas experimentalmente ainda é bastante lento se comparado ao número de sequências que são depositadas em banco de dados (SODERO, 2011). Apesar dos consideráveis avanços das metodologias utilizadas para elucidação de modelos tridimensionais de moléculas, muitos problemas básicos ainda persistem. Há classes de proteínas que são bastante difíceis de determinar a sua estrutura tridimensional tornando-se um grande desafio para a sua elucidação pelos métodos convencionais, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (FILHO; ALENCASTRO, 2003). Além disso, a elucidação de

novas estruturas alvos é de extrema importância para compreensão de fenômenos biológicos a nível molecular (SODERO, 2011).

Geralmente, o processo de obtenção de uma estrutura protéica por modelagem por homologia consiste basicamente de quatro etapas: (1) identificação e seleção de proteínas-molde; (2) alinhamento das sequências de resíduos; (3) construção do modelo e (4) validação do modelo construído (figura 8) e, para cada etapa existe um grande número de métodos, programas e softwares (FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Figura 8: Representação geral do processo de modelagem por homologia



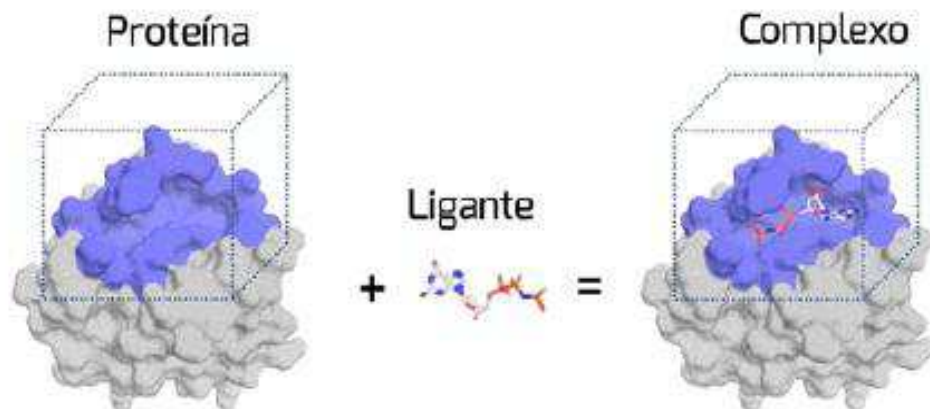
Fonte: Filho e Alecanstro (2003)

3.8 DOCKING MOLECULAR

Compreender e determinar o modo como as macromoléculas se interagem (principalmente proteínas e ácidos nucleicos) ou entre macromoléculas e ligantes, nos permite entender como a maioria dos mecanismos e processos celulares funcionam. Nesse contexto, diversas ferramentas computacionais são utilizadas para este fim. A técnica denominada *docking* molecular vem sendo cada vez mais utilizada na área da saúde e biotecnologia, a fim de tentar compreender interações físico-químicas entre biomoléculas (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

Um processo de simulação de *docking* ou atracamento molecular permite avaliar a conformação e orientação de um ligante no sítio de ligação da molécula-alvo, propondo a estrutura de um complexo receptor-ligante (SODERO, 2011), figura 9. De acordo com Jorgensen (1991), o *docking* molecular pode ser analogamente comparado a um modelo de chave fechadura, onde se busca desvendar a melhor orientação da chave para obter o melhor encaixe, de forma efetiva. Todavia, levando em consideração de que as moléculas podem se moldar durante o processo devido sua flexibilidade, a analogia de encaixe “mãe em luva” se torna mais adequada.

Figura 9: Formação do complexo proteína-ligante



Fonte: GUEDES; MAGALHÃES; DADENNE (2014)

Dezenas de métodos eficazes encontram-se disponíveis para a realização de simulações de *docking*, incorporando diferentes maneiras de representação molecular, avaliação de energia e busca de melhores conformações (MORRIS, 2009).

Basicamente, a metodologia de *docking* molecular necessita de dois componentes principais: um algoritmo de busca e uma função de pontuação de energia (*scoring function*). Os algoritmos de busca são usados para explorar os campos que possuem menor energia livre de encaixe dos ligantes. As pontuações de energias utilizadas durante o processo avaliam a qualidade desses encaixes orientando o método de busca para as melhores conformações (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2013).

Há diversos programas que pode ser empregado para o cálculo de pontuação de energia, o Autodock é um deles (MORRIS *et al.*, 1998). Este programa utiliza o método de busca estocástica ou randômica (KITCHEN *et al.*, 2004), empregando os algoritmos genéticos

(AG) para busca de conformações. Tal método baseia-se nos mecanismos de evolução natural e da genética (RODRIGUES *et al.*, 2004). O processo ocorre da seguinte forma: o algoritmo se inicia com uma dada população de indivíduos que apresentam possíveis soluções. Cada indivíduo dessa população é avaliado de acordo com uma função de avaliação e a cada geração novos indivíduos são formados por meio de combinações, seja por cruzamentos ou mutações. Se o critério de parada do AG for satisfeito, o algoritmo para apresentando as melhores soluções, caso contrário, o ciclo é repetido até que o objetivo seja alcançado (PINHO *et al.*, 2013).

Dois tipos de algoritmos geralmente são utilizados pelo AutoDock, o Monte Carlo e o algoritmo genético Lamarckiano (LGA – Lamarckian Genetic Algorithm). O LGA, em específico, segundo Magalhães *et al.* (2011), é um algoritmo híbrido com um método de busca local. A cada geração uma porcentagem significativa da respectiva população é escolhida aleatoriamente para aplicação na busca local. O indivíduo resultante é escolhido substituindo o indivíduo original. Segundo Morris (1998), este é um dos algoritmos mais eficientes, confiável e bem sucedido.

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Campina Grande, no laboratório de informática do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido.

4.1 MODELAGEM DA AaGSTE2

A sequência primária utilizada para a construção do modelo tridimensional da GSTE2 do *Aedes aegypti* pelo método de modelagem por homologia (quadro 1) foi obtida na base de dados do NCBI - National Center for Biotechnology Information - (Número de acesso: AAEL007951-PA).

Quadro 1: Sequência protéica da GSTE2 do *Aedes aegypti*

```
MTKLILYTLHVSPPCRAVELCAKALGLELEQKTVNLLTKEHLTPEFMKMNPQHTVPVLLDDNGTIV
CESHAIMIYLVSKYGKDDSLYSKELVKQAKLNAALHFESGVLFRARLRFVCEPILFAGGSEIPADR
AEYVQKAYQLLEDTLVDDYIVGNSLTIADFSCVSSVSSIMGVIPMDKEKFPKIYGWLDRLKALPY
YEAANGSGAEQVAQFVLSQKEKNAQKA
```

Fonte: Base de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

4.1.1 Alinhamento e Construção do modelo da AaGSTE2

Obtido a sequência primária da proteína alvo (AaGSTE2), o próximo passo consistiu na identificação da proteína molde homóloga (*template*). Para isso, foi realizado um alinhamento entre sequências contra um banco de dados. A sequência primária da AaGSTE2 foi submetida ao programa de busca BLASTp (*Basic Local Alingment Search Tool*), contra o banco de dados PDB - *Protein Data Bank* - (<http://www.rcsb.org/pdb>) (RSCB, 2005), disponível no site do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O BLAST é uma ferramenta online que permite que você insira uma sequência (nucleotídeos ou aminoácidos) em formato de texto (*FASTA*), e este compara a sequência inserida contra um banco de dados, buscando por sequências similares (ALTSCHUL, 1990).

Foi selecionada como *template* (molde), a estrutura cristalográfica da AaGSTE do *Anopheles gambiae* (PDB 2IL3) (WHANG, 2008), por apresentar um alto grau de identidade (71%) e similaridade (88%).

Com o auxílio do servidor via web SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (GUEX; PEITSCH, 1997; ARNOLD *et al.*, 2006; KIEFER *et al.*, 2009), foi realizada a modelagem da AaGSTE2. O SWISS MODEL trata-se de uma ferramenta online que utiliza a técnica de corpos rígidos para a construção do modelo (PACHECO, 2009). As coordenadas atômicas do *template* foram salvos em arquivo *.pdb* pra posterior análise da qualidade estrutural.

4.1.2 Validação do modelo

A avaliação da qualidade estrutural foi realizada por meio dos programas PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993), ANOLEA (MELO; FEYTMANS 1998) e GROMOS (<http://www.gromos.net/>).

O conjunto de programas do PROCHEK fornece uma avaliação detalhada tanto da qualidade estereoquímica global da estrutura protéica, quanto de cada resíduo. Este utiliza para a avaliação informações de estruturas resolvidas e com resolução de 2.0 Å (LASKOWSKI *et al.*, 1993). A avaliação estereoquímica da estrutura é baseada em cima de diversos parâmetros, como: ângulos torcionais das cadeias laterais, da cadeia principal, interações entre átomos, energias das ligações de hidrogênio, entre outros (PACHECO, 2009). O programa gera o Diagrama de Ramachandran e este determina os ângulos torcionais ϕ (Psi) e ψ (Phi) dos resíduos da estrutura.

Outro programa utilizado pra avaliar o modelo foi o ANOLEA (*Atomic Non-Local Environment Assessment*), também encontrado no Swiss model. De acordo com Melo e Feytmans (1998), o método realiza o somatório de energia das interações atômicas não-locais, dentro de um raio de 7Å para cada um dos resíduos, gerando uma pontuação para cada aminoácido e, assim, através do processo é obtido um perfil de energia para a estrutura protéica.

O campo de força GROMOS (Gronigen Molecular Simulation), por sua vez, realiza o cálculo da energia para cada aminoácido no eixo Y (VAN GUNSTEREN *et al.*, 1996).

4.1.3 Caracterização dos sítios ativos

Com a estrutura em formato *.pdb* e com auxílio da ferramenta GHECOM (*Grid-based HECOM ifinder*), um servidor online disponível em (<http://strcomp.protein.osaka-u.ac.jp/ghecom/>) foi possível fazer uma busca dos possíveis sítios ativos da proteína construída. O servidor utiliza um algoritmo que identifica bolsões profundos e rasos numa estrutura protéica através da morfologia da superfície e de ferramentas de probabilidade.

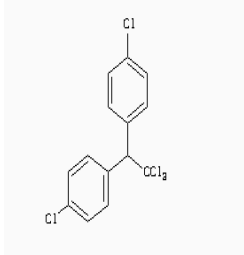
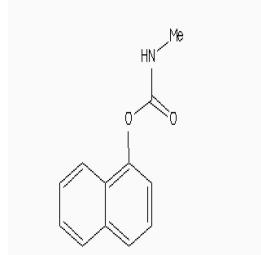
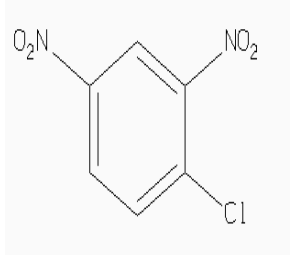
Com os resultados obtidos foi possível compará-los com os resultados do *docking* molecular.

4.2 DOCKING MOLECULAR

4.2.1 Obtenção e preparação da estrutura dos ligantes

A estrutura dos respectivos ligantes inseticidas (tabela 1) foi obtida do banco de dados ZINC *database* (<http://zinc.docking.org/>), com formato de arquivo *mol2*.

Tabela 1: Estruturas dos ligantes usados no *docking* molecular

Inseticida	DDT	Carbaril	CDNB
Estrutura			
Código de acesso	ZINC01530011	ZINC00001090	ZINC01540301

Fonte: ZINC *database* (<http://zinc.docking.org/>)

Os arquivos em formato *.mol2* foram convertidos pra o formato *.pdbqt* usando o software AutoDock 1.5.6 (<http://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>).

Parâmetros de cargas *Gasteiger* (GASTEIGER; MARSILI, 1980) necessário aos cálculos de potência foram adicionados ao ligante e os hidrogênios polares foram retirados. O modelo da AaGSTE2 em formato *pdb* também foi convertido para o formato *.pdbqt*, adicionou-se cargas *Kollman* (WEINER *et al.*, 1984) e hidrogênios. Este processo de preparação das estruturas, tanto do receptor quanto dos ligantes, consiste no primeiro passo do processo de simulação de *docking*.

4.2.2 Simulação de *docking*

Para a realização dos cálculos de *docking* neste trabalho, foi utilizado o programa AutoDock 1.5.6 (<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>). Este software foi escolhido, por permitir realizar estudos de simulação de *docking* com pequenas moléculas identificando como estas se ligam a estruturas 3D. O mesmo consiste em dois programas principais: o AutoDock que através de um conjunto de grades de pontos (*grids*), descreve os mapas de afinidade na molécula alvo e o AutoGrid que pré-calcula esses *grids* (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2016).

O método utilizando a estratégia de grades (*grids*) permite realizar o cálculo das energias eletrostáticas e de van der Waals, ou seja, as energias de interação intermolecular proteína-ligante. O *grid* é representado por uma malha de pontos tridimensionais com tamanho e formato dado em função de três dimensões (dx dy e dz). Cada ponto é armazenado o potencial total eletrostático e de van der Waals. O cálculo da energia é obtido através da interpolação dos valores armazenados nos oito pontos do *grid* e o centro da grade de energia pode ser posicionado em qualquer parte da estrutura, a fim de obter os melhores resultados (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

Neste trabalho, a grade de energia foi definida e centrada atingindo quase toda a estrutura protéica para a análise em geral da estrutura, com o *grid* estabelecido em 126 x 126 x 126 angstroms, nas dimensões dos eixos X, Y e Z, assim, gerando o mapa para os ligantes.

Ainda, o método empregado consistiu no *docking* semirrígido, onde os ligantes tiveram suas estruturas mantidas flexíveis e o receptor sua estrutura rígida. Neste tipo de *docking* (semirrígido), é possível considerar a flexibilidade do ligante onde este é modificado através de torções internas, nesse aspecto, todos os graus de liberdade do ligante (translacionais, rotacionais e conformacionais - ângulos diédricos) são considerados (MUKESH; RAKESH, 2011; GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

O Algoritmo Genético (GA) Lamarckiano implementado no programa AutoDock foi utilizado para identificação do espaço configuracional do ligante e junto com este foi utilizado o método Goodford para o cálculo de energia de interação intermolecular receptor-ligante (GOODFORD, 1985).

Os parâmetros de simulação usados pelo Algoritmo Genético Lamarckiano foram: 10.000 réplicas, população com 150 indivíduos, 1.500.000 análise de energias, 27.000 gerações e taxas de mutação e crossing-over de 0,02 e 0,08. Por fim, dez possíveis conformações diferentes foram obtidas, e analisadas no VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MODELAGEM DA AaGSTE2

5.1.1 Alinhamento e Seleção da sequência molde

Através do alinhamento local realizado com o algoritmo BLASTp para a identificação da proteína molde (*template*), foi possível selecionar o *template* que apresentou maior valor de identidade estrutural (71%) e similaridade (88%). A enzima selecionada foi a AaGSTE de *Anopheles gambiae* (PDB: 2IL3), com resolução estrutural cristalográfica de 2.2 Å. A homologia apresentada entre as enzimas AaGSTE2 (proteína alvo) e GSTE do *Anopheles gambiae*, possibilitou que esta última fosse utilizada como molde para a construção do modelo estrutural da proteína alvo. Segundo Silva (2007), a proteína que apresenta um valor percentual acima de 30% de identidade seqüencial com aquela que será modelada (proteína-alvo), é considerada significativa e poderá ser usada como molde para a modelagem da proteína problema.

Ainda, através do pareamento entre as sequências foi possível obter o valor estatístico do *e-value* ($1e-123$) o que indica que há probabilidade (1×10^{-123}) de o alinhamento ter sido casual, ou seja, resultando em um alinhamento bastante significativo. Tratando-se de uma sequência curta, o valor estatístico do *e-value* é considerado bom, visto que quanto mais próximo de zero for, maior é a confiabilidade da predição (mais confiável o resultado do alinhamento), ressalta Amaral e colaboradores (2007). Os resultados revelaram ainda valor do *gap* igual a 0, o que significa que não houve nenhuma inserção ou deleção de algum aminoácido em uma das duas sequências comparadas, e o *hit* de *score* de 353 *bits*. Alinhamentos que apresentam *score* acima de 200 *bits* são considerados de ótima qualidade, evidencia Maia (2014).

A figura 10 representa o alinhamento entre a sequência alvo (Query) e a sequência molde (Sbjct). Os aminoácidos que não são idênticos foram substituídos e são representados pelo sinal (+), e mesmo estes não sendo idênticos eles pontuam positivamente; tais aminoácidos representam as regiões conservadas.

Figura 10: Alinhamento entre as sequências AaGSTE2 e AaGSTE

Query	1	MTKLILYTLHVSPPCRAVELCAKALGLELEQKTVNLLTKEHLTPEFMKMNPOHTVPVLDD	60
Sbjct	1	M+ L+LYTLH+SPPCRAVEL AKALGLELEQKT+NLLT +HL PEF+K+NPQHT+PVLDD	60
Query	61	NGTIVCESHAIMIYLVSKYKDDSLYSKELVKQAKLNAALHFESGVLFARLRFVCEPILF	120
Sbjct	61	NGTI+ ESHAIMIYLV+KYGKDDSLY K+ VKQA++N+ALHFESGVLFAR+RF+ E ILF	120
Query	121	AGGSEIPADRAEYVQKAYQLLEDTLVDDYIVGNSLTIADFSCVSSVSSIMGVIPMDKEKF	180
Sbjct	121	G S+IP DR EYVQK+Y+LLEDTLVDD++ G ++TIADFSC+S++SSIMGV+P+++ K	180
Query	181	PKIYGWLDRLKALPYEEAANGSGAEQVAQFVLSQKEKNAQ	220
Sbjct	181	P+IY W+DRLK LPYEE ANG G + +FVL++KE+NA+ PRIYAWIDRLKQLPYEEAANGGGTDLGKFLAKKEENAK	220

Fonte: Construído com dados da pesquisa

5. 1. 2 Construção e Validação do modelo

Construído o modelo como descrito na metodologia, a etapa seguinte consistiu na avaliação da qualidade estrutural do modelo elucidado da AaGSTE2 sendo realizado no PROCHECK 3.0 e o mesmo gerou como resultado o gráfico de Ramachandran.

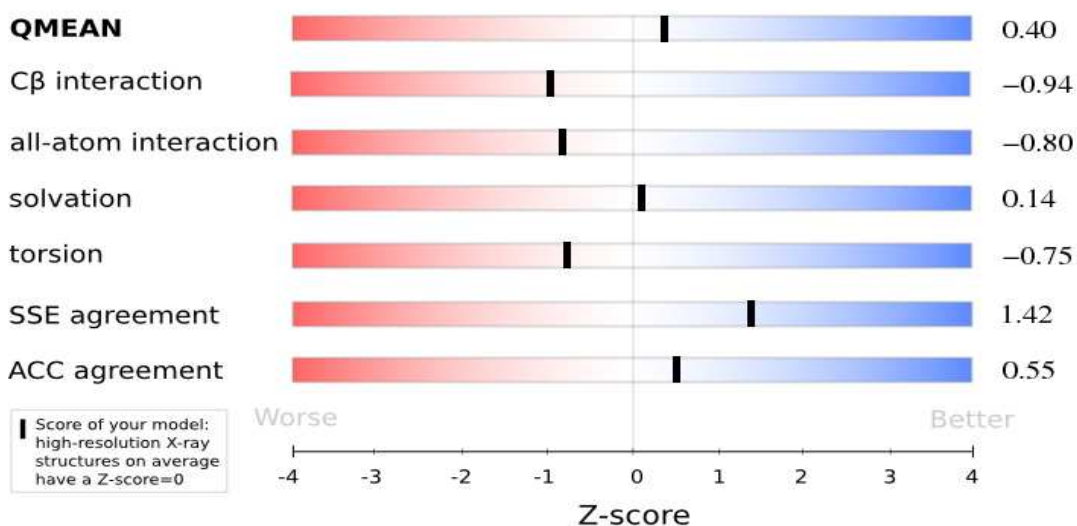
Da análise do gráfico (figura11), 91.1% dos resíduos encontra-se em regiões favoráveis (A, B, L), 8,4% em regiões permitidas (amarelo), 0% em regiões generosamente permitidas (bege) e apenas 0.5% dos resíduos em regiões não permitidas (branca). Para ser considerado um bom modelo, o resultado do gráfico de Ramachandran deve apresentar na região mais favorável (A, B, L) mais de 90% dos resíduos, desconsiderando-se os resíduos que não fazem parte desta região (fazem parte das regiões desfavoráveis), pois não possuem relevância para o cálculo da avaliação, por apresentarem padrões estereoquímicos diferentes dos outros resíduos (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

Diante desse critério, podemos averiguar que a escolha do *template* reflete muito na qualidade estrutural do modelo, já que a construção do novo modelo enzimático é baseada nas coordenadas atômicas da molécula molde. A utilização de *templates* com baixa identidade pode acabar gerando modelos não significativos. Analisando o nosso modelo construído observa-se que a maioria dos resíduos encontra-se nas regiões favoráveis do gráfico, como mostra os dados da porcentagem, indicando uma boa qualidade da estrutura. Poucos são os resíduos que não fazem parte das regiões consideradas favoráveis e estes correspondem aos resíduos de glicina, prolina e leucina, provavelmente por não possuírem estruturas estáveis.

A análise dos campos de força ANOLEA e GROMOS para o nosso modelo construído, indica que a maior parte dos resíduos exibe energia negativa (participam das regiões energeticamente favoráveis), apresentando valores estáveis. A maior parte destes resíduos são os mesmos encontrados também no diagrama de Ramachandran, o que implica afirmar que a estrutura do modelo é bastante significativa.

Ainda, foi possível avaliar a qualidade absoluta do modelo por meio do QMEAN6, revelando um *Z-score* de 0.79. A função QMEAN6 estima a qualidade global e o *score* é calculado com base em uma combinação linear de seis parâmetros, também evidenciados figura 13, comparando tais parâmetros do modelo computacional com estruturas de alta resolução que foram resolvidas por cristalografia de raios-X, depositadas no banco de dados PDB (BENKERT *et al.*, 2008; BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011). Se o *score* do modelo for próximo a das estruturas do banco de dados, este pode ser considerado de ótima qualidade (BENKERT *et al.*, 2008; 2009). Estes mesmos autores afirmam que um bom modelo (melhor qualidade), é aquele que apresenta valores de QMEAN próximo de 1,0.

Figura 13: Valores de cada parâmetro avaliado por meio do QMEAN6



Fonte: Construído com dados da pesquisa

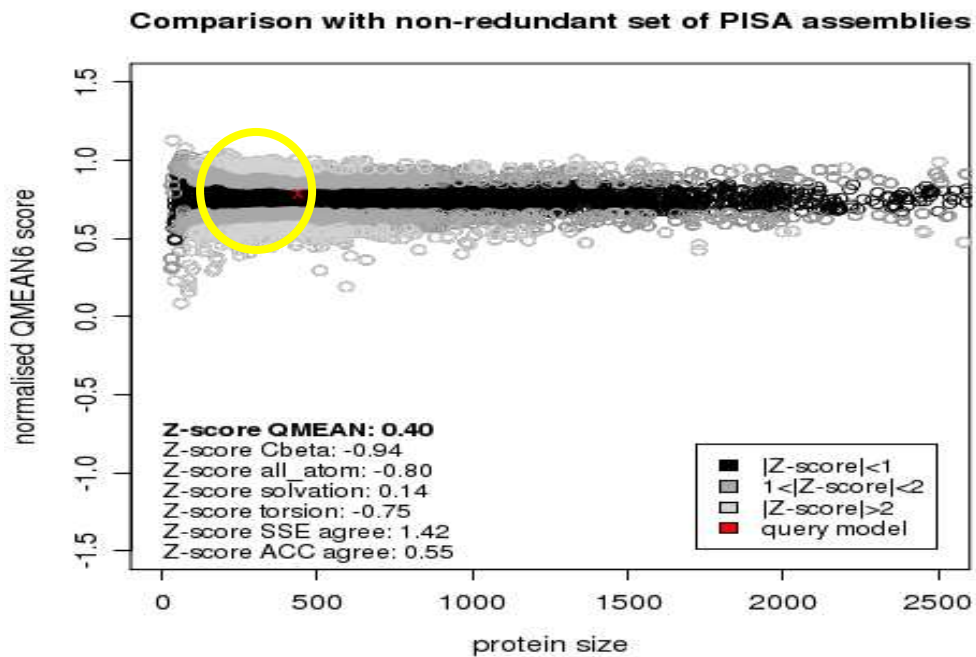
Uma análise mais detalhada do *Z-score* pode ser observada na figura 14. Na distribuição, observa-se que o modelo determinado (representado por um “x” vermelho) encontra-se na faixa preta, isso implica dizer que, quanto mais próximo da faixa estiver o modelo, menor é o desvio padrão. Como verifica Benkert (2008), na distribuição, o gráfico dá um valor de desvio padrão do *Z-score* em relação aos valores esperados das estruturas

experimentais, ou seja, o valor do *Z-score* indica se a qualidade estrutural do modelo exibe um desvio padrão significativo em relação às “estruturas nativas”.

Um *Z-score* abaixo de 1 indica uma estrutura de qualidade excelente, avalia Benkert (2008). Sendo assim, o *Z-score* do QMEAN6 de 0.79, pode ser considerado um bom valor, quanto menor, mais significativo é o modelo. Assim, o valor do QMEAN obtido para o modelo construído pode ser considerado significativo.

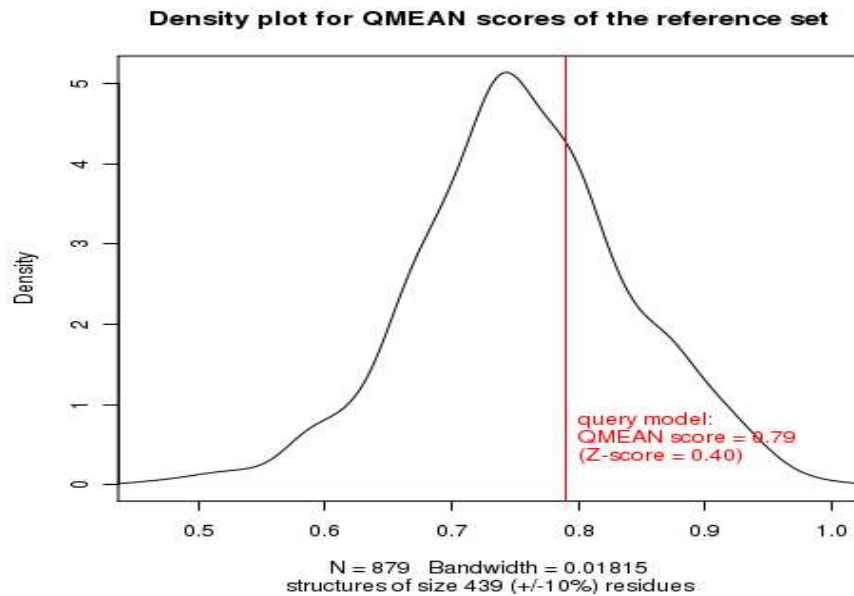
Também podemos analisar o valor do *Z-score* através da distribuição do gráfico da figura 15.

Figura 14: Distribuição do *Z-score*. O “x” evidenciado no círculo amarelo representa o modelo da AaGSTE2



Fonte: Construído com dados da pesquisa

Figura 15: Gráfico de distribuição do *Z-score*



Fonte: Construído com dados da pesquisa

Essa etapa de avaliação da qualidade do modelo, tanto global como local, realizado com o auxílio do programa PROCHECK se faz bastante necessário, pois, através dos resultados gerados é possível averiguar se o modelo realmente apresenta ser significativo. O valor do *Z-score* (0.79), por exemplo, revelou um desvio padrão bastante considerável sendo considerado baixo, indicando que a enzima tende a estar próxima do valor da média ou um valor esperado, para ser considerado de boa qualidade.

5. 1. 3 Caracterização dos sítios ativos

Através da análise no GHECOM, identificamos os resíduos que constitui os sítios catalíticos da AaGSTE2.

A contagem dos aminoácidos que fazem parte dos possíveis sítios ativos da proteína estão evidenciados nas tabelas abaixo (2 e 3). Na figura 16, encontra-se representado a enzima e os respectivos sítios catalíticos. O cálculo foi realizado dentro de um raio de 4 Å.

Tabela 2: Aminoácidos que constituem os sítios catalíticos da cadeia A da AaGSTE2 e suas respectivas posições, obtido através do software GHECOM.

Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3	Sítio 4	Sítio 5
THR A 8	ASP A 82	SER A 12	LYS A 3	VAL A 163
LEU A 9	ASP A 83	PRO A 13	LER A 6	SER A 164
HIS A 10	SER A 84	PRO A 14	VAL A 18	VAL A 166
VAL A 11	LEU A 85	ARG A 110	GLU A 19	SER A 167
SER A 12	TYR A 86	LEU A 111	LER A 20	SER A 168
PRO A 13	SER A 87	ARG A 112	CYS A 21	ILE A 169
PRO A 14	LYS A 88	PHE A 113	ALA A 22	MET A 170
CYS A 15	VAL A 91	VAL A 114	LYS A 23	GLY A 171
ARY A 16	LYS A 92	CYS A 115	ALA A 24	THR A 186
ALA A 17	GLN A 93	GLU A 116	LEU A 25	LEU A 187
VAL A 18	ALA A 94	ILE A 118	GLY A 26	ASN A 188
VAL A 34	LYS A 95	LEU A 119	LEU A 27	LEU A 190
ASN A 35	LEU A 96	PHE A 120	GLU A 28	LYS A 191
LEU A 36	ASN A 97	SER A 165	LEU A 29	ALA A 192
LEU A 37	ASP A 147	VAL A 166	GLU A 30	TYR A 195
THR A 38	TYR A 149	SER A 167	GLN A 31	TYR A 196
MET A 49	ILE A 150	SER A 168	LYS A 32	GLU A 197
ASN A 50	VAL A 151	ILE A 169	ALA A 198	ALA A 198
PRO A 51	GLY A 152	MET A 170	ALA A 199	ASN A 200
GLN A 52	ASN A 153	GLY A 171	ASN A 200	GLY A 201
HIS A 53	SER A 154	VAL A 172		SER A 202
THR A 54	LEU A 155	ILE A 173		GLY A 203
VAL A 55	THR A 156	PRO A 174		ALA A 204
PRO A 56	ILE A 157	GLY A 203		GLU A 205
VAL A 57		ALA A 204		GLN A 206
VAL A 65		GLU A 205		
CYS A 66		GLN A 206		
GLU A 67		VAL A 207		
SER A 68		ALA A 208		
HIS A 69		GLN A 209		
ALA A 70		PHE A 210		
ILE A 71		VAL A 211		
MET A 72		LER A 212		
LEU A 96				
PHE A 102				
GLU A 103				
SER A 104				
GLY A 105				
LEU A 107				
PHE A 108				
ALA A 109				

ARG A 110				
LEU A 111				
ARG A 112				
PHE A 113				
VAL A 114				
CYS A 115				
GLU A 116				
PRO A 117				
ILE A 118				
LEU A 119				
PHE A 120				
ALA A 121				
PHE A 160				
SER A 161				
CYS A 162				
VAL A 163				
SER A 164				
SER A 165				
VAL A 166				
SER A 167				
SER A 168				
ILE A 169				
GLN A 206				
VAL A 207				
ALA A 208				
GLN A 209				
PHE A 210				
VAL A 211				
LEU A 212				

Fonte: Construído com dados da pesquisa

Tabela 3: Aminoácidos que constituem os sítios catalíticos da cadeia B da AaGSTE2 e suas respectivas posições, obtido através do software GHECOM.

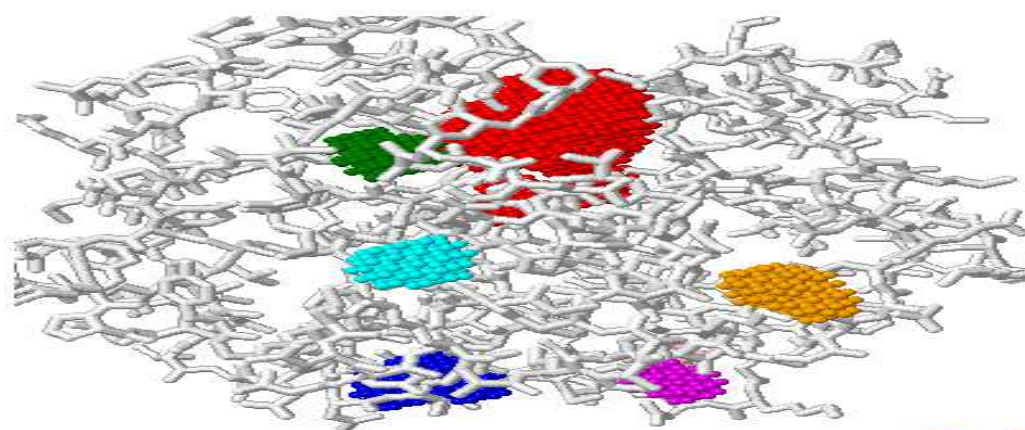
Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3	Sítio 4	Sítio 5
THR B 8	ASP B 82	GLY B 105	VAL B 134	SER B 12
LEU B 9	ASP B 83	VAL B 106	GLN B 135	PRO B 13
HIS B 10	SER B 84	LEU B 107	LYS B 136	PRO B 14
VAL B 11	LEU B 85	PHE B 108	ALA B 137	ARG B 16
SER B 12	TYR B 86	ALA B 109	TYR B 138	ALA B 17
PRO B 13	SER B 87	ARG B 110	GLN B 139	ARG B 110
PRO B 14	LYS B 88	VAL B 114	LEU B 140	LER B 11
CYS B 15	GLU B 89	GLU B 132	VAL B 172	ARG B 112
ARG B 16	LEU B 90	TYR B 133	ILE B 173	PHE B 113

ALA B 17	VAL B 91	VAL B 134	PRO B 174	VAL B 114
VAL B 34	LYS B 92	GLN B 135	MET B 175	CYS B 115
ASN B 35	GLN B 93	LYS B 136	ASP B 176	GLU B 116
LEU B 36	ALA B 94	ALA B 137	LYS B 177	LEU B 119
LEU B 37	LYS B 95	TYR B 138	GLU B 178	PHE B 120
THR B 38	LEU B 96	GLN B 139	LYS B 179	SER B 164
GLU B 40	ASN B 97	SER B 164	PHE B 180	SER B 165
HIS B 41	TYR B 149	SER B 165	PRO B 181	VAL B 166
LEU B 42	ILE B 150	VAL B 166		SER B 167
THR B 43	VAL B 151	SER B 167		SER B 168
PHE B 46	GLY B 152	SER B 168		ILE B 169
ASN B 50	ASN B 153	ILE B 169		MET B 170
PRO B 51	SER B 154	MET B 170		GLY B 171
GLN B 52	LEU B 155	GLY B 171		VAL B 172
HIS B 53	THR B 156	VAL B 172		ILE B 173
THR B 54	ILE B 157	ILE B 173		GLY B 203
VAL B 55	ALA B 158	PRO B 174		ALA B 204
PRO B 56	ASP B 159			GLU B 205
VAL B 57				GLN B 206
VAL B 65				VAL B 207
CYS B 66				ALA B 208
GLU B 67				GLN B 209
SER B 68				PHE B 210
HIS B 69				VAL B 211
ALA B 70				LEU B 212
SER B 104				
LEU B 107				
PHE B 108				
ALA B 109				
ARG B 110				
LEU B 111				
AGR B 112				
PHE B 113				
VAL B 114				
CYS B 115				
GLU B 116				
PRO B 117				
ILE B 118				
LEU B 119				
PHE B 120				
SER B 167				
SER B 168				
ILE B 169				
GLN B 206				
VAL B 207				
ALA B 208				
GLN B 209				
PHE B 210				

VAL B 211				
LEU B 212				
GLN B 214				

Fonte: Construído com dados da pesquisa

Figura 16: Visualização dos sítios de ligação calculados pelo GHECOM, dentro de um raio de 4Å. A cor vermelha representa o sítio 1, a cor azul escuro representa o sítio 2, a cor verde o sítio 3, a cor amarela o sítio 4 e a cor azul claro o sítio 5.



Fonte: Dados da pesquisa

A exploração dos possíveis sítios ativos da enzima nos permite uma maior visualização das regiões de hidrofobicidade da proteína. Vale lembrar que as regiões hidrofóbicas tendem a situar-se no interior da proteína, enquanto que as hidrofílicas ficam na superfície, assim, há uma maior tendência dos sítios ativos se situarem em regiões de alta hidrofobicidade, como ficam no interior da proteína é onde possibilita menos exposição ao solvente ou a outras interferências. Diante disso, podemos observar que os aminoácidos que estão participando dos possíveis sítios ativos realmente se localizam na parte central da proteína, entre as subunidades.

Os aminoácidos explorados pelo GHECOM também serviram para ser comparados com os resultados do *docking* molecular.

5.2 DOCKING MOLECULAR

Das dez possíveis conformações para cada complexo gerado pelo AutoDock, a conformação que apresentou menor energia de ligação para cada ligante foi analisada no estudo. Na tabela 5, está representado os valores das energias e os respectivos aminoácidos da

AaGSTE2 que estariam interagindo com os ligantes (DDT, Carbaril e CDNB). A visualização destes complexos foi realizada no programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

Através da análise dos resultados provenientes do *docking* molecular também é possível identificar qual composto (ligante) apresenta maior probabilidade de interação com a molécula receptora, ressalta Coutinho e Morgan (2007).

Tabela 4: Valores das energias de ligação, energias intermoleculares e caracterização dos resíduos e suas posições.

Composto	Energia livre de ligação (kcal/mol)	Energia intermolecular (kcal/mol)	Resíduos de interação e posições
Carbaril	-4.81	-5.40	SER 77 TYR 86 LYS 88 GLN 93 ILE73 ASP83
CDNB	-6.70	-7.29	TYR 86 LYS 92 LYS 95 LEU 96 VAL 151 ASN 153 SER 154 THR 156
DDT	-5.65	-6.54	GLU 116 PHE 120 ALA 121 ASP 129 LEU 132 LYS 136

Fonte: Dados da pesquisa

Analisando a tabela, observa-se que a menor energia de ligação (-6.70 kcal/mol) para os complexos formados foi a do CDNB. Vale ressaltar que este é um composto utilizado como modelo padrão para pesquisas com GST de diversas classes de insetos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Contudo, através da simulação de *docking* com este inseticida foi possível analisar se a AaGSTE2 também desempenharia atividade de conjugação com o determinado composto e, diante dos resultados, constata-se que o ligante possui uma grande

afinidade pela molécula receptora, sugerindo assim, a interação enzima-ligante. Os aminoácidos que possivelmente estariam participando do sítio catalítico da AaGSTE2, também estão de acordo com os resultados do GHECOM.

A segunda menor energia de ligação observada foi para o complexo AaGSTE2-DDT (-5.65kcal/mol). Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Maia (2014), onde o mesmo trabalhando com GSTs da classe epsilon do *Anopheles gambiae* obteve valores de energia livre de ligação para o DDT e as três enzimas estudadas, entre -5.13 e -7.68 kcal/mol.

Com a energia de ligação apresentando valor negativo, implica afirmar que é termodinamicamente favorável as moléculas estarem formando um complexo. Esta interação do grupo triclorometil do DDT com a molécula receptora explica a afinidade deste tipo inseticida pela enzima estudada, sugerindo assim, a possibilidade desta classe de GST metabolizar este composto. Estes resultados corroboram com os estudos de Lumjuan e colaboradores (2005), onde os mesmos trabalhando com GSTs da classe epsilon de *Aedes aegypti* observaram que enzimas desta classe podem apresentar potencial para metabolizar este tipo de inseticida.

Em relação ao carbaril, o complexo formado apresentou a maior energia de ligação (-4.81kcal/mol) dentre os inseticidas estudados. No trabalho de Amador e colaboradores (2016), onde estes utilizando uma metodologia semelhante com objetivo de analisar a interação do herbicida Metsulfuron com uma GST de arroz, os mesmos obtiveram um valor de energia de ligação de -3,74 kcal/mol, bem mais alto que o do nosso estudo. Porém, apesar do valor da energia ser um pouco maior para o carbaril, a mesma foi negativa indicando uma proximidade deste composto com a GSH.

Vários outros trabalhos utilizando esta metodologia foram realizados: simulações de *docking* através do AutoDock foi proposto por Abreu (2015), para verificar a atividade de uma proteína PR-5 de *Poncirus trifoliata*, onde esta apresentou atividade de beta-glucanase. Braz (2016) também utilizou esta mesma metodologia para investigar *in silico* a interação do monoterpeno 4-terpineol com o receptor GABA_A. Estudo de simulação molecular também foi proposto por Ferreira (2014) para investigar a interação de uma proteína quinase da família CK2 com dois tipos de inibidores, o TBB (4,5,6,7-tetrabromo-1Hbenzotriazol) e o DMAT (2-dimetilamino-4,5,6,7- tetrabromo-1H-benzimidazol). Neste último estudo, a energia livre de ligação entre os complexos formados foi entre -5.9 e -6.0 kcal/mol, valor semelhante para o complexo formado entre o DDT-GSH.

Essa diversidade de estudos desenvolvidos através da metodologia de *docking* revela a importância que este método apresenta na compreensão do modo de interação entre várias

moléculas, além de reforçar as várias aplicabilidades desta técnica. Também, vale ressaltar que apesar do *docking* ser uma técnica necessária de predição entre o modo de ligação proteína-ligante, outras estratégias como a simulação de dinâmica molecular deve ser associado a este método, a fim de obter uma melhor caracterização das energias de interação. Vale salientar também, que apesar deste método ser de grande importância no estudo de interações moleculares, se faz necessária a realização de testes *in vivo* e *in vitro*, pois, estes complementam o entendimento destes mecanismos.

Ainda, através da análise da tabela 5 podemos observar os possíveis aminoácidos da proteína que interage com o ligante. Comparando estes aminoácidos com os obtidos através do software GHECOM, podemos observar que tais resíduos são os mesmos. Assim, podendo indicar que estes são resíduos âncoras, e que estão participando dos sítios catalíticos da AaGSTE2.

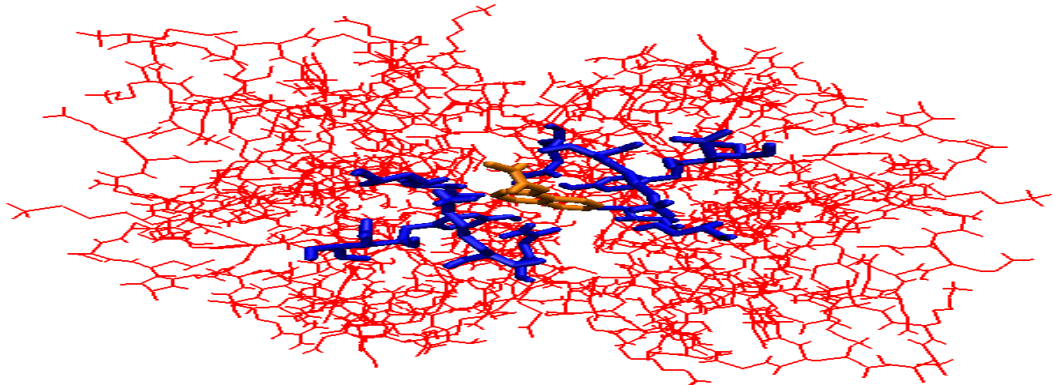
O aminoácido tirosina na posição 86 (TYR 86), como pode ser observado na mesma tabela, interage tanto com o inseticida CDNB, quanto com o Carbaril, reforçando a probabilidade deste aminoácido estar participando de um possível sítio de ligação. Este mesmo resíduo também foi observado nos resultados do GHECOM. Contudo, a participação deste aminoácido no sítio catalítico pode ser devido à natureza hidrofóbica do mesmo.

Os resultados de simulações de *docking* mostraram que a enzima possui afinidade pelos três inseticidas estudados de natureza diferente: DDT, Carbaril e CDNB, propondo os complexos enzima-ligante, porém, melhor se ligando ao DDT. Essa capacidade de interação com diferentes substratos pode ser explicada devido à desordem funcional que estas enzimas apresentam. O conceito de *evolutibilidade* (TOKUKURI; TAWFIK, 2009) aplicado a estas enzimas, também é um fator que deve ser levado em conta nos processos de evolução das moléculas, pois estes fatores podem estar diretamente relacionados com a capacidade de mosquitos destas espécies resistirem a inseticidas químicos. Sendo assim, medidas alternativas para o controle desta espécie de mosquito devem ser adotadas, a fim de tentar minimizar essa problemática.

Na sequência de figuras abaixo, podemos observar com mais detalhe os complexos enzima-ligante gerados, sendo estes obtidos através do *software* VMD (*Visual Molecular Dynamics*). O cálculo para todos os complexos foi realizado dentro de um raio de 4 Å.

O primeiro complexo formado com o Carbaril pode ser observado na figura 17. Em vermelho está representada a estrutura da glutathione S-transferase; em azul, os átomos que estão próximos aos resíduos de aminoácidos que interagem com o ligante, em laranja.

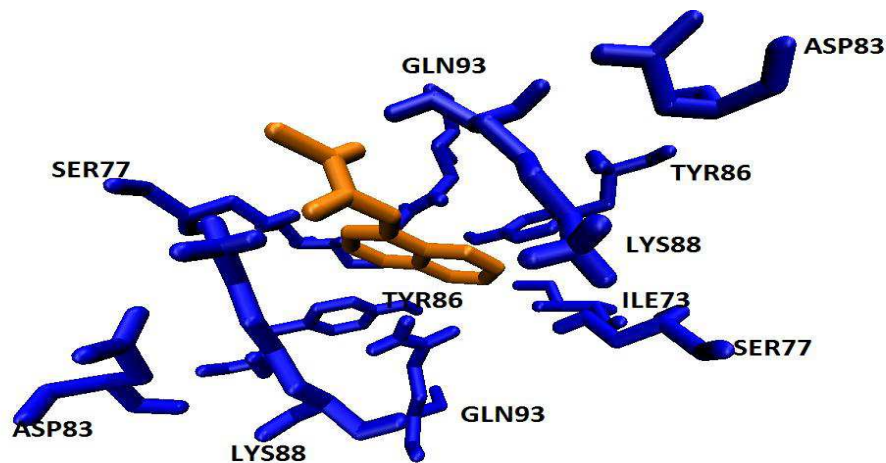
Figura 17: Complexo proteína-ligante para o carbaril. A cor vermelha representa a enzima, a azul os resíduos que interagem com o ligante, em laranja



Fonte: Obtida no programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*)

A figura 18, está evidenciada o ligante carbaril sobreposto no sítio ativo da AaGSTe2, com identificação dos resíduos.

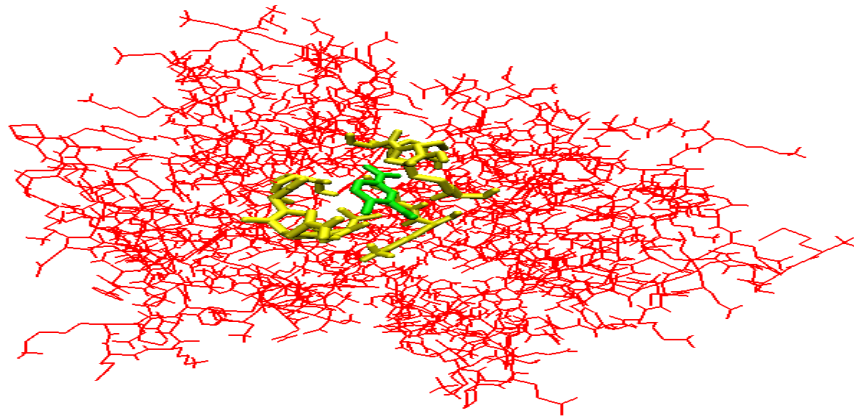
Figura 18: Identificação dos resíduos conjugado com o ligante Carbaril. A cor azul representa os resíduos de interação com o ligante, em laranja



Fonte: Obtida no programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*)

Também, podemos observar na figura 19, o complexo formado contra o CDNB. Em vermelho está representada a estrutura da glutationa Stransferase; em amarelo, os átomos dos resíduos que estão interagindo com o ligante, em verde.

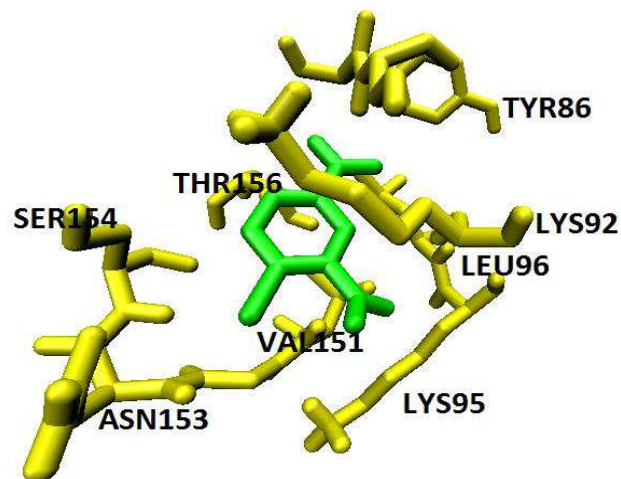
Figura 19: Complexo proteína-ligante para o CDNB. A cor vermelha representa a GST, em amarelo os átomos de interação com o ligante, em verde



Fonte: Imagem obtida no programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*).

Na figura 20, podemos observar mais detalhado o ligante CDNB sobreposto no sítio ativo, com identificação dos resíduos.

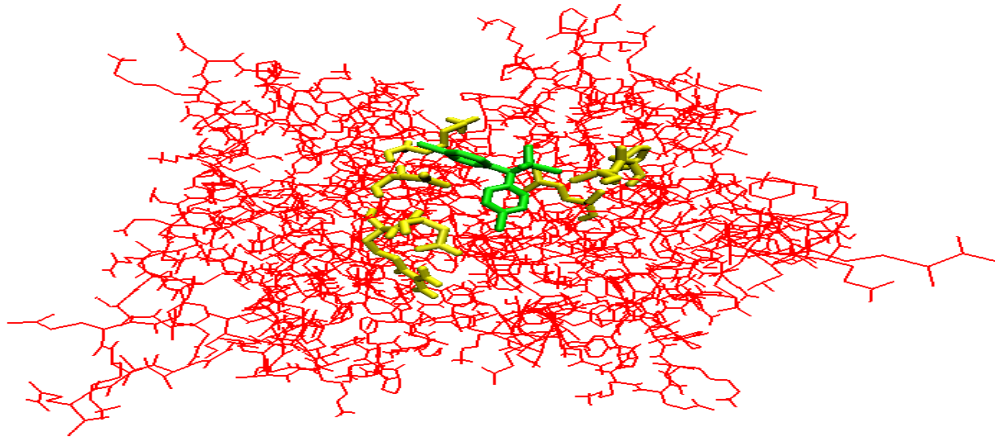
Figura 20: Identificação dos resíduos conjugado com o ligante CDNB. A cor amarela representa os resíduos de interação com o ligante, em verde



Fonte: Imagem obtida no programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*).

Por fim, na figura 21 podemos observar o complexo formado com o DDT. Em vermelho está representado a estrutura da glutathion s transferase; em amarelo, os átomos que estão próximos aos resíduos de aminoácidos que estão interagindo com o ligante, em verde.

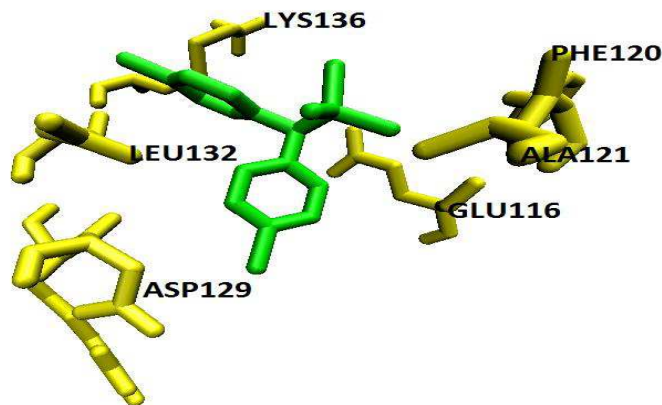
Figura 21: Complexo proteína-ligante para o DDT. A cor vermelha representa a enzima, a cor amarela os resíduos de interação com o ligante, em verde



Fonte: Imagem obtida no programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*).

E na figura 22, encontra-se o ligante DDT sobreposto no sítio ativo, com identificação dos resíduos.

Figura 22: Identificação dos resíduos conjugado com o ligante DDT. A cor amarelo representa ao resíduos de interação com o ligante, em verde



Fonte: Imagem obtida no programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*)

6 CONCLUSÕES

- O modelo construído é válido e confiável e, apresenta uma boa qualidade e estabilidade estrutural.
- As simulações de *docking* mostraram que a enzima apresenta potencial de ligação aos inseticidas estudados, DDT, carbaril e CDNB.
- Diante dos dados levantados, o estudo se mostra de grande importância, uma vez que, com o modelo da AaGSTe2 construído é possível realizar outros estudos com esta enzima, como análise de *docking* contra outros inseticidas.
- A metodologia usada na pesquisa poderá servir em estudos futuros para elucidação de proteínas.
- Além de se tratar de enzimas envolvidas com mecanismos de resistência, as GSTs são candidatas promissoras a alvos de inibição gênica, portanto, os dados levantados a respeito de suas dinâmicas estruturais e funcionais poderão ser utilizados futuramente no campo da biotecnologia para o desenvolvimento de novas técnicas de controle de vetores.

REFERÊNCIAS

ABREU, R. A. **Caracterização funcional e estrutural comparativa *in silico* de uma proteína PR-5 do tipo taumatina de *Poncirus trifoliata***. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé - PB. 2015.

ALTSCHUL, S. F.; WARREN, G.; WEBB, M.; MAYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** v. 215. p. 403-410, 1990.

AMADOR, V. C.; MELO, G. G.; CAMPOS, I. C. P.; BRAZ, L. C. C.; MAIA, R. T. **Evidência *in silico* de detoxificação do herbicida Metsulfuron por uma GST de arroz**. In: Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino, 1, 2016, Campina Grande. Anais. Campina Grande: Editora Realize, 2016.

ANOLEA: **Atomic Non-Local Environment Assessment**. Disponível em: <<http://melolab.org/anolea/>> Acessado em 15/06/2017

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOO, P. J.; SCHEWEDE, T. **The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling**. *Bioinformatics*, v.22, p.195-201, 2006.

Autodock 1.5.6 Disponível em: <<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>> Acesso em: 15/06/2017.

Autogrid. Disponível em: <http://autodock.scripps.edu/wiki/AutoGrid>. Acesso em: 15/06/2017.

BAUDRY, J. L. I. W.; PAN, L.; BERENBAUM, M. R.; SCHULER, M. A. Molecular docking of substrates and inhibitors in the catalytic site of CYP6B1, an insect cytochrome P450 monooxygenase. **Protein Engineering**, vol.1, n.6, 8 pp, 2003.

BECKER, N. P. D. *et al.* **Mosquitoes and their control**. New York: Springer, 2 ed. 577 p. 2010.

BESERRA, E. B.; FREITAS, E. M. de.; SOUZA, J. T. de.; FERNANDES, C. R. M.; SANTOS, K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v.99 (3), p.281-285, 2009.

BLAST: Basic Local Alignment Tool. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> Acesso em: 15/06/2017.

BISSET, J. A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.54 (3), p.202-219, 2002.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes Aegypti*: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v.16 (4), p.279-293, out-dez, 2007.

BRAZ, L. C. C. **Investigação *In silico* da interação do monoterpeno 4-terpineol com receptor GABA_A**. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé - PB. 2016.

BROWN, A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Jour. Am. Mosq. Control. Assoc.** v.2, p.123-140, 1986.

BROGDON, W. G.; McAllister, J. C. Insecticide resistance and vector control. In; **Emerging Infectious Diseases**. v.23, 1998.

BHAT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature Reviews**. v. 496, Abril, 2013.

CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Reviews, Drug Discovery Today**, v.14, n.13/14, July 2009.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide: Past, present, or Future? **Ann. Rev. Entomol.** v43, p.1-16, 1998.

CONSOLI, R. A. G. B; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importancia Sanitaria no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.

CHE-MENDOZA, A. R.; PENILLA, P.; RODRÍGUEZ, D. A. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 8 (8), p. 1386-1397, 2009.

CHIU, T.; WEN, Z.; RUPAUPASINGHE, S. G.; SCHULER, M. A. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. **PNAS**, vol.105, n.26, July, 2008.

CLARK, A. G; SHAMAAN, N. A. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. **Pestic. Biochem.Physiol.** v. 22, p. 249-261, 1984.

Dengue: Aspectos Epidemiológicos, Diagnóstico e Tratamento. Ministério da Saúde. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

DIAS, S. F.; TAVEIRA, C. C. Homologia de proteínas como ferramenta na construção de novos fármacos. **Cenarium Farmacêutico**, Ano 4, n. 4, p.1-17, Maio/Nov 2011.

DIAS, L. B. A.; ALMEIDA, S. C. L. de.; HAES, T. M. de.; MOTA, L. M.; FILHO, J. S R. **Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento**. Medicina (Ribeirão Preto), v.43 (2), p. 143-52, 2010.

DUARTE, F. **Dengue: sintomas, formas de contágios e outras dúvidas sobre a doença**. Portal EBC, 2015. Disponível em:< <http://www.ebc.com.br/noticias/saude/2015/05/dengue-sintomas-formas-de-contagio-e-outras-duvidas>>. Acesso em: 15/06/2017.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Blackwell Publishing, Ltd. Mini review. **Insect Molecular Biology**, v.14 (1), p.3-8, 2005.

FILHO, O. A. S.; ALECANSTRO, R. B. Modelagem de Proteínas por Homologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. **Quim. Nova**, vol. 26, n. 2, p.253-259, 2003.

FLORES, A.V. *et al.* Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**. vol.7, n. 2, p 111-125, 2004.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, v.23, p.149-169, 2006.

GASTEIGER J, MASILI M. TETRAHEDRON. 1980; 36: 3219-3228. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040402080801682>. Acesso em: 15/06/2017.

GHECOM 1.0: Grid-based HECOMi finder. Disponível em: <<http://strcomp.protein.osaka-u.ac.jp/ghecom/>> Acesso em: 15/06/2017.

GOODFORD, P. J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. **Journal of Computational Chemistry** 1985; 28:849--857.

GRANT, D.F; DIETZE, E.C; HAMMOCK, B.D. Glutathione S-transferase isozymes in *Aedes aegypti*: purification, characterization, and isozyme specific regulation. **Insect. Biochem.** v.4, p.421-433, 1991.

GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S. de.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Advances in Biophysics in Latin America**, p.1-13, 2013.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: *An* environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v.18, p.2714-2723, 1997.

GUIA BRASILEIRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. v. 1. 447p. Brasília, 1998.

HAYES, J. D; WOLF, C.R. **Role of glutathione transferase in drug resistance**. In: Sies H, Ketterer B (eds) *Glutathione conjugation: Mechanisms and Biological Significance*. Academic Press, London: Academic Press, 1988. p. 315-355.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v.45, p.51–88, 2005.

HABEEB, S. K. M. Comparative Molecular Modeling of Insect Glutathione S-Transferases. **International Journal of Computer Applications**, v.14 (5), p.16–22, 2011.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Mini review Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p.1009-1015, 2000.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N. J.; McCARROL, L.; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 653-665, 2004.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 30. p.1009-1015, 2005.

HELVECIO, E. **Caracterização funcional do gene da Glutathione-S-Transferase Epsilon 2 (GSTE2) em *Aedes aegypti***. Dissertação de mestrado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 74 p. Recife, 2014.

HÖLTJE, H.-D.; FOLKERS, G. **Molecular Modeling: Basic Principles and Applications**; Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Timmerman, H., eds.; VCH: Weinheim, 320p, 1997.

IBTISSEM, Z. *et al.* Potential toxicity of an insecticide of the family of carbamates on a bioindicator model of the pollution the earthworm *Octodrilus complanatus*. **Annals of Biological Research**. v.3, n.11, p.5367–5373, 2012.

JORGENSEN, W. L. Rusting of the lock and key model for protein ligand binding. **Science**, v. 254, p. 954-955, 1991.

KARUNAMOORTHY, K.; SABESAN, S. Insecticide resistance in insect vectors of disease with special reference to mosquitoes: a potential threat to global public health. **Health Scope**, Iran, v. 2, n. 1, p. 4-18, 2012.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and Scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews**. v. 3. p. 935-949, Nov, 2004.

KIEFER, F. *et al.* The SWISS MODEL. Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**.v.37, 2009.

KHOURI, C. M. B. **Modelos Escondidos de Markov para Classificação de Proteínas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pernambuco, p. 1-115, 2002.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**. v. 26, part 2, p.283-291, 1993.

LIMA, M. R. Q. **Avaliação de testes de captura de antígeno NS1 para diagnóstico precoce das infecções por dengue**. Dissertação de mestrado. Instituto Oswaldo Cruz. 128p. Rio de Janeiro, 2009.

LIPKE, H.; CHALKLEY, J. Glutathione, oxidized and reduced, in some dipterans treated with 1,1,1-trichloro-2,2-di-(*p*-chlorophenyl) ethane. **The Biochemical Journal**. v.85, n. 1, p.104-109, 1962.

LOW, W. Y. *et al.* Molecular evolution of glutathione S-transferases in the genus *Drosophila*. **Genetics**, v.177, n.3, p.1363–75, 2007.

LUMJUAN, N.; McCARROLL, L.; PRAPANTHADARA, L.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.35 p.861–871, 2005.

LUMJUAN, N.; RAJATILEKA, S.; CHANGSOM, D.; WICHEER J.; LEELAPAT, P.; PRAPANTHADARA, L.; SOMBOON, P.; LYCETT, G.; RANSON, H. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p.203-209, 2011.

LUMJUAN, N.; STEVENSON, B. J.; PRAPANTHADARA, L.; SOMBOON, P.; BROPHY, P. M.; LOFTUS, B. J.; SEVERSON, D. W.; RANSON, H. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, p.1026–1035, 2007.

MAIA, R. T. **Análise *in silico* e polimorfismo genético das glutathione s-transferases da classe epsilon de *Anopheles gambiae* (diptera: culicidae): possíveis implicações na resistência a inseticidas químicos.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco- Pós-graduação em Biologia Animal. p.1-153, Recife, 2014.

MANNERVIK, B.; DANIELSON, U. H. Glutathione Transferases - Structure and Catalytic Activity. **CRC Critical Reviews in Biochemistry**, v.23, n.3 p. 283, 1988.

MELO, F; FEYTMANS, E. Assessing Protein Structures with a Non-local Atomic Interaction Energy. **Journal of molecular biology**. 277(5), p.1141, 1998.

MOHAMMED, B. R.; M ABDULSALAM, Y.; DEENI, Y.; Insecticide resistance to *Anopheles* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Nigeria: A review. **International Journal of Mosquito Research**, v 2(3), p. 56-63, 2015.

MONTELLA, I. R.; **Estudos dos mecanismos bioquímicos da resistência a inseticidas em diferentes populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do Brasil.** Tese de Pós-doutorado. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, p. 1-92, 2008.

MORRIS, G. M. *et al.* Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**. v.19, n.14, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v.30, n. 16, 2009.

MUKESH, B.; RAKESH, K. Molecular Docking: A Review. **IJRAP**, 2(6): 1746-1751, 2011.

NATAL, D. **Bioecologia do *Aedes Aegypti*.** *Biológico*, São Paulo, v.64, n.2, p.205-207, jul./dez., 2002. (Palestra).

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 15/06/2017.

NELSON; MICHAEL, J. *Aedes aegypti*: Biology and Ecology. Organização Pan-Americana da Saúde. 50p, 1986.

OLIVEIRA, I. F. de. **Caracterização molecular de membros de Glutathione S-transferases da classe epsilon em processos biológicos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco - Pós-Graduação em Biologia Animal do Centro de Ciências Biológicas. p. 1-103, 2014.

ORTELLI, F. *et al.* Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide resistance locus from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **The Biochemical Journal**. 373 (Pt 3), p.957-963, 2003.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Disponível em:<<http://www.paho.org/bra/>>. Acesso em: 10/05/2017.

PAIXÃO, K. S. **Avaliação do controle químico de adultos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de Fortaleza por meio de métodos convencionais e das armadilhas BG-Sentinel® e MosquiTRAP®**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2007.

PACHECO, A. G. M.; **Modelagem molecular comparativa e estudos de acoplamento molecular da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora pernicioso***. **Dissertação** de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana - Pós- Graduação em Biotecnologia, 2009.

PINHO, A. F. *et al.*; **Algoritmos genéticos**: fundamentos e aplicações, 2013.

PRAPANTHADARA, L. *et al.* Purification and characterization of a major glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* (species B). **Insect, biochemistry and molecular biology**. v.26, p.277-285, 1996.

PRAPANTHADARA, L. *et al.* Isoenzymes of glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* species B: the purification, partial characterization and interaction with various insecticides. **Insect, biochemistry and molecular biology**. v.30, p.395-403, 2000b.

PORTAL DA SAÚDE. Ministério da Saúde, 2017. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/>>. Acesso em: 15/06/2017.

PDB. Protein Data Bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4cof>>. Acesso em 15/06/2017.

QIN, G.; JIA, M.; LIU, T.; ZHANG, X.; GUO, Y.; ZHU, K. Y.; MA, E.; ZHANG, J. Heterologous expression and characterization of a sigma glutathione S-transferase involved in carbaryl detoxification from oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). **J Insect Physiol** 58(2): 220–227, 2012.

QIN, G. *et al.* Characterization and Functional Analysis of Four Glutathione S-Transferases from the Migratory Locust, *Locusta migratoria*. **PLoS ONE**. v.8, n.3, 2013.

RANSON, H. *et al.* Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in DDT resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Biochemical Journal**. 359(2), p. 295-304, 2001.

RIGDEN, D. J.; MELLO, L. V. Computacional de Proteínas. **Revista Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**. vol.4, n. 25, p. 64-70, 2002.

RIVERON, J. M.; YUNTA, C.; IBRAHIM, S. S.; DJOUAKA, R. IRVING, H.; MENZE, B. D.; ISMAIL, H. M.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H.; ALBERT, A.; WONDJ, C.S. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. **Genome Biology**, v.15: R27, p.20, 2014.

RODRIGUES, F. L.; LEITE, H. G.; SANTOS, H. N.; SOUZA, A. L. S.; SILVA, G. F. Metaheurística algoritmo genético para solução de problemas de planejamento florestal com restrições de integridade. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.28, n.2, p.233-245, 2004.

ROMERO, I. C. **A gestão de doenças infecto-contagiosas: o impacto do dengue na saúde pública**. Monografia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Ciências Biológicas, p.1-58, Araraquara, 2014.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M. V.; UNGER, M. F.; COLLINS, F. H.; FEYEREISEN, R. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. **Science- The Mosquito Genome: Anopheles gambiae**, v.298, p.179-181, 2002.

ROZENDAAL, J. A.; Vector control. Methods for use by individuals and communities. **World Health Organization**. Geneva, 1997.

SANTOS, M. A. V. M. **Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)**: Estudos populacionais e estratégias integradas para controle vetorial em municípios da região metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007. Tese de doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Fundação Oswaldo Cruz. 220p. Recife, 2008.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Review Article. biochemical Society**, v.360, p.1-16, 2001.

SILVA, V. B. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 149 p. Ribeirão Preto, 2007.

SODERO, A. C. R. **Modelagem molecular de aspartil proteases de Schistosoma mansoni (SmAPs) para o desenvolvimento de potenciais moléculas esquistossomicidas**. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. 162p. Rio de Janeiro, 2011.

STRODE, C.; WONDJI, C. S. DAVID, J. P.; HAWKES, N. J.; LUMJUAN, N.; NELSON, D. R.; DRANE, D. R.; KARUNARATNE, S.H.P. P.; HEMINGWAY, J.; IV, W. C. B.; RANSON, H. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, p.113–123, 2008.

TAUIL, P. L. **Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, p. 867-871, 2002.

TANG, A. H; TU, C. P. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S transferase D1 and D2. **Journal of Biological Chemistry**. v.269, n.45, p.27876-27884, 1994.

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. Autodock. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/>>. Acesso em: 15/06/2017.

TOKURIKI, N.; TAWFIK, D. S. Protein Dynamism and Evolvability. **Science**, vol. 394, 2009.

VAN GUNSTEREN, W. F. S. R.; BILLETER. **Biomolecular Simulations: The GROMOS 96 Manual and User Guide**. Zürich, VdF Hochschulverlag ETHZ, 1996.

VMD: Visual Molecular Dynamics. Disponível em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>> Acesso em: 15/06/2017.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **An Introduction to Insecticides (4 th edition)**. University of Minnesota. 6^a ed, 2004.

WEINER SJ, et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J. Am. Chem. Soc.** 1984; 106: 765-784. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00315a051>. Acesso em: 15/06/2017.

WILDENBURG, G., LIEBAU, E.; HENKLE- DUHRSEN, K. *Onchocerca volvulus*: ultrastructural localization of two glutathione S-transferases. **Exp. Parasitol.** v.88, p.34-42, 1998.

WHANG, Y.; QIU, L.; RANSON, H.; LUMJUAN, N.; HEMINGWAY, J.; SETZER, W. N.; MEEHAN, E. J.; CHEN, L. Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT- detoxifying activity. **J. Struct. Biol**, 2008.

WHO. World Health Organization. *Aedes aegypti* report, 2016.

ZINC. A database of commercially available compounds. Disponível em: <<http://zinc.docking.org/>>. Acesso em: 15/06/2017.