



CURSO DE FARMÁCIA

CORRELAÇÃO DA HEMATOFAGIA COM O PERFIL METABÓLICO E
MODELAGEM MOLECULAR VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE
POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA HEXOQUINASE EM *Rhodnius*
prolixus

Suzan Sayuri Hanai

Macaé
Maio, 2020



SUZAN SAYURI HANAI

Título: Correlação da hematófagia com o perfil metabólico e modelagem molecular visando a identificação de potenciais inibidores da enzima hexoquinase em *Rhodnius prolixus*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus Macaé* como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Nelilma Correia Romeiro

Co-orientadores: Prof. Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes, Dra. Helga Fernandes Gomes

Macaé
Maio, 2020



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por sempre ter me dado forças e me amparado nos momentos mais difíceis, me acalmando e me levantando a cada momento de desespero para um novo recomeço.

Agradeço a minha mãe **Sônia**, a quem dedico este trabalho, a pessoa responsável por eu ter chegado até aqui. Que esteve ao meu lado em todos os momentos me apoiando e mostrando que nada é impossível, que sonhou comigo um sonho que muitas vezes parecia impossível diante das circunstâncias das nossas vidas, que sempre me estendeu as mãos nos momentos mais difíceis dessa jornada e que nunca me deixou faltar amor e carinho mesmo à distância.

A minha irmã **Hiromi**, que caminhou comigo durante esses 5 anos lado-a-lado, se mantendo firme e sempre disposta a me socorrer a qualquer hora, mesmo diante das nossas dificuldades, agradeço pelo amor e afeto, e por tudo o que fez e faz por mim.

A minha orientadora, **Profa. Nelilma**, que sempre acreditou no meu potencial se mostrando muito paciente, atenciosa e disposta a me ajudar tanto na vida acadêmica, quanto na pessoal.

Ao meu orientador **Prof. Jorge** e minha co-orientadora **Profa. Helga**, que foram fundamentais para minha evolução nas práticas experimentais de bioquímica e conhecimentos teóricos iniciais.

Ao meu namorado **Lupis** que foi meu porto seguro e caminhou ao meu lado até o fim.

Aos meus amigos de sala, **Joyce, Lorena, Paula, Dryelle e Iasmim**, e ao meu grupo de turma **Vinícius, Patrícia, Igor, Lucas, Isabella, Rodrigo e Taís**, que foram essenciais para tornar essa caminhada mais leve e afetuosa.

A minha **Profa. e amiga Stella**, (que muitas vezes foi como uma mãe pra mim) do Laboratório Integrado de Computação Científica, que foi indispensável nessa reta final (sendo sempre muito atenciosa e carinhosa).

Ao Laboratório Integrado de Bioquímica Hatsaburo Masuda (**Profa. Flávia, Prof. Leonardo, Prof. José, Daniela, Carina, Ana Shaylla e Christiano**) que sempre estavam dispostos a ajudar.

Por fim, serei eternamente grata a todos que passaram em minha vida e contribuíram de alguma forma para a minha chegada até aqui.

Meu muito obrigado!



“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança”

Flavio Hugo Venturini / Renato Russo



RESUMO

O *Rhodnius prolixus* é hospedeiro intermediário de tripanossomatídeos, sendo apontado como um dos principais vetores da Doença de Chagas, é um *hemiptera* hematófago obrigatório, que pertence à família *Reduviidae* e tanto a quantidade quanto a qualidade do sangue ingerido afetam diretamente no desenvolvimento e na produção de ovos. O presente trabalho possui como objetivo levantar as características metabólicas desse inseto importantes para a reprodução e perpetuação da espécie, através da determinação de metabólitos em órgãos reprodutores e corpo gorduroso, tanto em machos quanto em fêmeas no estágio adulto. A Modelagem molecular visa complementar o estudo a partir da construção de modelos 3D de uma proteína de interesse e mapear as interações moleculares que ocorrem com um inibidor conhecido. Este trabalho constitui-se inicialmente por ensaios biológicos, onde foram utilizados como amostras para o levantamento das características metabólicas de órgãos como corpo gorduroso, ovário e testículo de *Rhodnius prolixus*. Amostras desses órgãos foram submetidas a dosagens de proteínas totais, glicose, glicogênio, triglicerídeos e as atividades enzimáticas da alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. Foi realizada a modelagem comparativa da hexoquinase de *R. prolixus*, validação dos modelos 3D, construção de ligantes e o *Docking* Molecular. Nos resultados apresentados foi verificado que em geral os insetos na condição alimentada e o tipo de órgão afetam a quantidade de metabólitos presentes em cada tecido. Foi possível observar que em fêmeas os ovários necessitam de uma maior demanda de alguns metabólitos devido à sua função de ovogênese. Na modelagem foi construído um modelo tridimensional da hexoquinase de *Rhodnius prolixus*, a partir da proteína molde 4foe.1B (Hexoquinase I humana recombinante tipo I co-cristalizada com Manose 6-Fosfato). O estudo de *docking* possibilitou identificar o modo de ligação e os tipos de interações que ocorrem *in silico* mediante a ligação entre o modelo 3D da proteína construída e o inibidor glifosato, apresentando interações por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Asp67, Ser429, Ser135, Thr71 e interação de Van der Waals com o resíduo Thr133. Essas interações foram conservadas comparadas com as interações entre o molde (4foe.1B) e o ligante co-cristalizado, presente na literatura. A partir desses resultados, foi possível mostrar as características de determinados metabólitos nesse inseto, e por meio da modelagem molecular auxiliar futuramente na busca por inibidores específicos para a hexoquinase de *Rhodnius prolixus*, por meio do conhecimento do sítio alvo dessa enzima.

Palavras-chaves: Metabolismo energético, Modelagem Molecular, *Rhodnius prolixus*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fonte: Adaptado de (CDC, 2017). ...	14
Figura 2: Aspecto geral de triatomíneo (Hemiptera: Reduviidae) através da visão dorsal. Fonte: Adaptado de (ABAD-FRANCH <i>et al.</i> , 2013).....	15
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Rhodnius prolixus</i> . Diferentes estágios de desenvolvimento. As etapas de amadurecimento seguem na sequência: ovo (a), 1º estágio (b), 2º estágio (c), 3º estágio (d), 4º estágio (e), 5º estágio (f) e adultos (g). Fonte: Adaptado de SOUZA, 2016.	17
Figura 4: Quantidade de corpo gorduroso visivelmente verificada em <i>Rhodnius prolixus</i> (fêmeas) em 4 dias após alimentação.	18
Figura 5: O ovário de <i>Rhodnius prolixus</i> : O ovário foi dissecado 5 dias após repasto sanguíneo, espalhado em uma lâmina de vidro e fotografado. O ovário (A). A partir do hemiovário representado no lado direito da Fig. 2A, ovariolo mostrado em detalhes (B). Desenho em linhas esquematizando o ovariolo é mostrado em (C), a fim de representar as estruturas internas. (Huebner e Anderson, 1972 <i>apud</i> Atella <i>et al.</i> , 2005).	19
Figura 6: Fotografias comparando o sistema reprodutivo masculino de um macho adulto de <i>R. Prolixus</i> recém-emergido antes de ingerir uma refeição de sangue (A) e a de um macho adulto de dois meses que ingeriu mais de uma refeição de sangue e estava acasalando (B). Em C, os diferentes componentes de um lado do trato reprodutivo do macho mais velho são ilustrados após a separação. Símbolos em A: t, testículo; ta, glândula transparente anterior vazia; ponta de flecha branca, local onde o ducto deferente do testículo se liga à ponta anterior da glândula transparente anterior. Símbolos em B e em A com a adição de: ta, glândula transparente acessória anterior preenchida; tp, as duas glândulas acessórias posteriores; o, glândula opaca; eb, bulbo ejaculatório. Símbolos em C como em A e B com a adição de: gd, ducto comum das glândulas acessórias; vd, deferente sv, vesícula seminal, asterisco, cálice do ducto glandular. As barras de escala medem 1 mm (CHIANG <i>et al.</i> , 2013).	21
Figura 7: Fase preparatória da glicólise. Fonte: NELSON <i>et al.</i> , 2011.	24
Figura 8: Fase compensação da glicólise. Fonte: NELSON <i>et al.</i> , 2011.	25
Figura 9: Via das pentoses. Fonte: NELSON <i>et al.</i> , 2011.	26
Figura 10: Estrutura 2D do glicosato (1) e 6-O-fosfono-beta-D-manopiranosose (M6D)(2).	38

Figura 11: Diferenças na concentração de proteínas totais entre amostras de ovário e corpo gorduroso (CG) de fêmeas sob condições de 4 dias e 21 dias após a 1ª alimentação.	41
Figura 12: Diferenças na concentração de proteínas totais entre amostras de testículo e corpo gorduroso (CG) de machos sob condições de 4 dias e 21 dias após a 1ª alimentação.	41
Figura 13: Diferenças na concentração de glicose (mg/μL) entre ovário e corpo gorduroso (CG) em fêmeas sob condições de 4 dias e 21 dias após a 1ª alimentação.	43
Figura 14: Diferenças na concentração de glicose (mg/μL) entre testículo e corpo gorduroso (CG) em machos sob condições de 4 dias e 21 dias após a 1ª alimentação.....	44
Figura 15: Determinação de glicogênio em ovário e corpo gorduroso de fêmeas. ...	46
Figura 16: Determinação de glicogênio em testículo e corpo gorduroso de machos.	46
Figura 17: Determinação de triglicerídeos em ovário e corpo gorduroso de fêmeas.	48
Figura 18: Determinação de triglicerídeos em testículo e corpo gorduroso de machos.	48
Figura 19: Diferenças na atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST), mediante a sua concentração (U/mg proteína) ao longo de um período de 6 minutos, entre ovário e corpo gorduroso (GC) de fêmeas sob condições de 4 dias e 21 dias após 1ª alimentação.	50
Figura 20: Diferenças na atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST), mediante a sua concentração (U/mg proteína) ao longo de um período de 6 minutos, entre testículo e corpo gorduroso (GC) de machos sob condições de 4 dias e 21 dias após 1ª alimentação.	51
Figura 21: Diferenças na atividade enzimática de alanina aminotransferase (ALT), mediante a sua concentração (U/mg proteína) ao longo de um período de 6 minutos, entre ovário e corpo gorduroso (CG) de fêmeas sob condições de 4 dias e 21 dias após 1ª alimentação.	52
Figura 22: Diferenças na atividade enzimática de alanina aminotransferase (ALT), mediante a sua concentração (U/mg proteína) ao longo de um período de 6 minutos, entre testículo e corpo gorduroso (CG) de machos sob condições de 4 dias e 21 dias após 1ª alimentação.	52

Figura 23: Sequência FASTA da hexoquinase parcial de <i>R. Prolixus</i> , disponível no NCBI.....	54
Figura 24: Sobreposição da Hexoquinase – <i>Rhpr</i> (modelo - magenta) com 4foe.1B (molde-ciano) ligados ao M6D - ligante (amarelo).....	57
Figura 25: Gráfico representando valor de <i>score-Z</i> calculado no ProSA-Web para o modelo (Hexoquinase – <i>Rhpr</i>) (A) e o molde (4foe.1B) (B).....	58
Figura 26: Gráfico da energia local dos resíduos calculado no ProSA-Web para o modelo (Hexoquinase – <i>Rhpr</i>) (A) e para o molde (4foe.1B)(B). Regiões verde-claro representando energia local de cada resíduo único e regiões verde-escuro representado a energia local suavizada atribuída a um átomo central com base em cada fragmento de 40 resíduos de aminoácidos.	58
Figura 27: Gráfico de Ramachandran do molde (A) e do modelo (B) obtidos pelo servidor <i>Rampage</i>	59
Figura 28: Modelo (magenta) ligado ao M6D (amarelo) e os respectivos aminoácidos presentes nas regiões desfavoráveis de acordo com o gráfico de Ramachandran.	60
Figura 29: Sobreposição entre a pose de ligação experimental do M6D (ciano) e melhor pose obtida por <i>redocking</i> (verde).....	62
Figura 30: Interações entre hexoquinase – <i>Rhpr</i> e o ligante M6D de melhor posição obtida no <i>redocking</i> , ilustrando as tabelas 3 e 4.	65
Figura 31: Interações entre hexoquinase – <i>Rhpr</i> e o ligante glifosato de melhor posição obtida no estudo de <i>docking</i> , ilustrando as tabelas 5 e 6.	67
Figura 32: Interação desfavorável entre oxigênio (aceptor) do resíduo de aminoácido Asp 67 da proteína e amina (aceptor) do ligante glifosato.	68



ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Dados do percentual de resíduos de aminoácidos em cada região do gráfico de Ramachandran.	60
Tabela 2: Resultado do redocking molecular utilizando as funções de score do programa Gold e o valor do RMSD para cada sobreposição da pose do ligante obtida.	61
Tabela 3: Tipos de interações verificadas após o redocking entre os aminoácidos do sítio alvo da hexoquinase – Rhpr com o ligante M6D.....	63
Tabela 4: Interações entre a hexoquinase de Rhpr e o M6D.	63
Tabela 5: Tipos de interações verificadas após o docking entre aminoácidos do sítio alvo da hexoquinase – Rhpr com o ligante glifosato.	65
Tabela 6: Interações entre a hexoquinase de Rhpr e o glifosato.....	66



LISTA DE ABREVIações

mL - Mililitro

°C – Graus Célsius

U – Unidade

µg – Micrograma

µL – Microlitro

M6D – 6-O-fosfono-beta-D-manopiranosose

Rhpr – *Rhodnius prolixus*

Asp – Aspartato

Ser – Serina

Thr – Threonina

Gly – Glicina

Arg – Arginina

Ile – Isoleucina

Asn – Asparagina

Leu – Leucina

Phe – Fenilalanina

PBS - Tampão fosfato-salino

BSA - albumina bovina sérica

TAGs - triacilgliceróis

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

HK – Hexoquinase

Glu – Glutamato

Gln – Glutamina

Pro - Prolina

Ala – Alanina



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 A doença de Chagas.....	13
1.2 A classe Insecta	14
1.3 <i>Rhodnius prolixus</i>	16
1.4 Corpo gorduroso	17
1.5 Ovogênese.....	18
1.6 Sistema reprodutor masculino	20
1.7 Metabolismo energético na reprodução.....	22
1.7.1 Metabolismo de carboidratos	23
1.7.2 Metabolismo de Aminoácidos.....	27
1.8 Modelagem Molecular	28
2. OBJETIVO GERAL.....	31
2.1 Objetivos específicos	31
3. JUSTIFICATIVA	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Experimental	33
4.1.1 Colônia de insetos.....	33
4.1.2 Grupos de insetos utilizados	33
4.1.3 Alimentação dos insetos	34
4.1.4 Condições para coletas de amostras	34
4.1.5 Obtenção e preparo de homogeneizados de tecidos	34
4.1.6 Determinação da concentração de proteínas	35
4.1.7 Determinação da concentração de glicose.....	35
4.1.8 Determinação da concentração de glicogênio	35
4.1.9 Determinação da concentração de triglicerídeos.....	36



4.1.10 Determinação da atividade de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.....	36
4.1.11 Análise estatística	36
4.2 Modelagem Molecular	36
4.2.1 Modelagem Comparativa da proteína de <i>R. prolixus</i>	36
4.2.2 <i>Docking</i> molecular.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Experimental – Dosagens de metabólitos.....	40
5.1.1 Determinação de proteínas totais.....	40
5.1.2 Determinação de Glicose	43
5.1.3 Determinação de Glicogênio	45
5.1.4 Determinação de triglicerídeos.....	47
5.1.5 Determinação das atividades enzimática da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)	49
5.2 Modelagem Molecular	54
5.2.1 Predição de estrutura tridimensional (3D) da hexoquinase por modelagem comparativa.....	54
5.2.2 Estudo de <i>docking</i> molecular	61
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

A Doença de Chagas é uma doença parasitária transmitida por insetos vetores da ordem hemíptera, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A doença foi caracterizada por Carlos Chagas, quando iniciou suas pesquisas em 1907, no interior do Estado de Minas Gerais – Brasil – onde verificou a existência abundante de um inseto grande, popularmente conhecido por barbeiro, que vivia nas palhoças da região. Estudando a biologia do inseto, verificou seu comportamento hematofágico, adaptação ao domicílio e hábitos noturnos (CHAGAS, 1909).

A distribuição espacial da doença é limitada, primariamente, ao continente americano, em virtude da distribuição do vetor ser restrita ao mesmo. Por isso, a Doença de Chagas também é denominada de Tripanossomíase Americana (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. COORDENAÇÃO-GERAL DE DESENVOLVIMENTO DA EPIDEMIOLOGIA EM, 2017). É considerada uma doença tropical negligenciada, sendo endêmica em 21 países nas Américas, embora a migração de pessoas infectadas possa transportar a doença para países não endêmicos americanos e do mundo. Globalmente, estima-se que 8-10 milhões de pessoas estejam infectadas por *T.cruzi* e que cerca de 90-100 milhões de pessoas estejam em risco de infecção. Além disso, cerca de 12.500 mortes por ano podem ser atribuídas à Doença de Chagas (PINAZO *et al.*, 2015).

Atualmente, existem cerca de 12 milhões de portadores da doença crônica nas Américas, e cerca de 2 a 3 milhões no Brasil (FIOCRUZ, 2013). Embora a mortalidade tenha diminuído significativamente, a doença pode causar conseqüências irreversíveis e crônicas nos sistemas cardíaco, digestório e nervoso. Estima-se que 65 milhões de pessoas nas Américas vivem em áreas de exposição e estão em risco de contrair a doença (ONU, 2019).

A forma de transmissão mais conhecida (Figura 1) é através das fezes infectadas dos triatomíneos logo após a picada do inseto, que acontece pelo contato do homem suscetível com as excretas contaminadas dos triatomíneos, que, ao picarem os vertebrados, costumam defecar após o repasto, eliminando formas

infectantes do parasito, que penetram pelo orifício da picada, mucosas ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar (SCHMUNIS e YADON, 2010).

Os principais vetores são dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (Hemiptera; Reduviidae). No entanto, outros 12 gêneros têm transmitido a doença entre os animais por quase 10 milhões de anos. Mais de 150 espécies de triatomíneos e 100 espécies de mamíferos mantêm a infecção por *T. cruzi* na natureza. A distribuição de vetores e de *T. cruzi* nas Américas estende-se desde os Estados Unidos até a Argentina e Chile (SCHMUNIS e YADON, 2010).

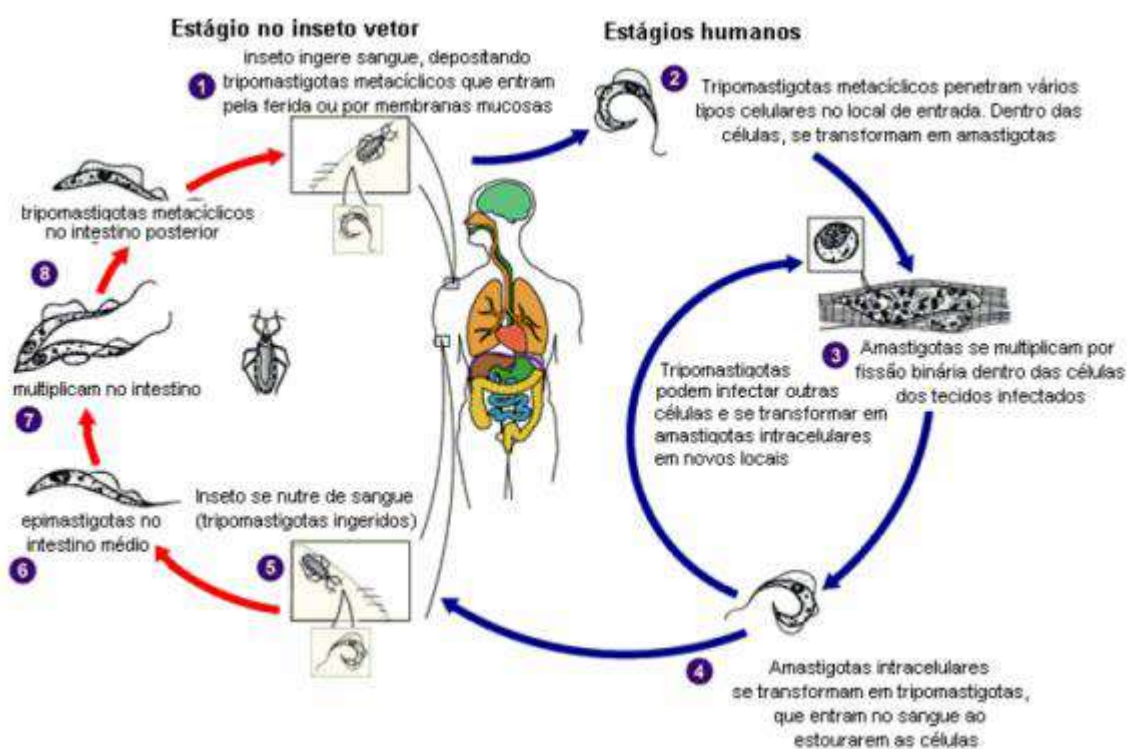


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Adaptado de (CDC, 2017).

1.2 A classe Insecta

O filo Arthropoda é um dos mais bem sucedidos do reino Animalia, apresentando uma grande diversidade de representantes. É estimado que existam no mundo algo entre 1 e 10 milhões de espécies diferentes de insetos artrópodes. A grande biodiversidade desta classe pode ser explicada pelo bem sucedido processo

de adaptação dos seus representantes aos mais diferentes ecossistemas terrestres. Características como a postura de ovos resistentes às variações ambientais, presença de asas e o desenvolvimento de diferentes hábitos alimentares, tais como fitofagia, zoofagia e hematofagia, garantem a sua sobrevivência (SILVA *et al.*, 2007).

A hematofagia é um hábito importante dos insetos para a humanidade, uma vez que esta permite a contaminação e transmissão de diversos parasitas para seus hospedeiros. Os insetos hematófagos encontram-se distribuídos em 4 principais ordens: *Diptera*, *Hemiptera*, *Phthiraptera* e *Siphonaptera* (LEHANE, 2005).

A ordem *Hemiptera* abrange cerca de 60.000 espécies, constituindo-se no grupo dominante de insetos de desenvolvimento direto, quando o ovo eclode nasce um inseto semelhante ao estágio adulto. Pertencem a esta ordem os conhecidos barbeiros, percevejos, pulgões, cigarras e outros. Dentro desta ordem há três famílias que apresentam a maior parte dos insetos hematófagos, que são as famílias: *Cimicidae*, *Polyctenidae* e *Reduviidae* (LEHANE, 2005).

Os insetos da família *Reduviidae*, principalmente os insetos pertencentes à subfamília *Triatominae*, são insetos que apresentam como características comprimento de 0,5 a 4,5 centímetros, manchas amareladas ou alaranjadas nas margens do abdômen, no protórax (segmento inicial do tórax) e na base das asas; apresentam corpo amarronzado ou preto; cabeça alongada com pescoço proeminente; dois olhos proeminentes; quatro antenas segmentadas inseridas na cabeça; uma probóscide sob a cabeça e apresenta formato triangular, visto de cima (Figura 2) (LEHANE, 2005).

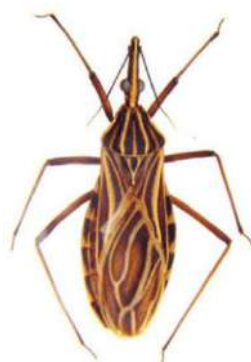


Figura 2: Aspecto geral de triatomíneo (Hemiptera: Reduviidae) através da visão dorsal.

Fonte: Adaptado de (ABAD-FRANCH *et al.*, 2013).

1.3 *Rhodnius prolixus*

R. prolixus é um *Hemiptera* hematófago obrigatório, que pertence à família *Reduviidae*. Este inseto possui cinco estágios de ninfa, após os quais se torna adulto, provido de asas e maturidade sexual (Figura 3). Cada muda, assim como cada ciclo reprodutivo, são sincronizados por uma única alimentação, na qual o inseto ingere uma quantidade de sangue equivalente a até dez vezes seu próprio peso (FRIEND, 1965). Tanto a quantidade quanto a qualidade do sangue ingerido afetam diretamente no desenvolvimento e produção de ovos de *R. prolixus* (FRIEND, 1965; VALLE *et al.*, 1987).

Por volta do terceiro dia após a alimentação, os ovários encontram-se repletos de ovócitos, sendo a postura realizada por volta do sexto dia e a eclosão das ninfas verificada no período de dez a vinte dias após o repasto sanguíneo. Após a alimentação, o animal segue um período de jejum prolongado, que pode chegar a alguns meses (BUXTON, 1930). Nos insetos hemimetábolos, o indivíduo pré-adulto é muito semelhante, morfologicamente, ao indivíduo adulto.

O ovo apresenta uma coloração alaranjada após a ovoposição e avermelhada no final do desenvolvimento embrionário. Após a eclosão, o inseto passa por cinco estágios ninfais e chega à fase adulta. A ninfa do quinto estágio apresenta brotos de asas cuja formação se completa na fase adulta. O ovo apresenta uma coloração alaranjada após a ovoposição e avermelhada no final do desenvolvimento embrionário. Após a eclosão, o inseto passa por cinco estágios ninfais e chega à fase adulta. A ninfa do quinto estágio apresenta brotos de asas cuja formação se completa na fase adulta (SOUZA, 2016).

Todos os estágios de vida possuem o mesmo hábito alimentar em, destacando-se que as formas imaturas têm igual potencial para transmitir a doença, o que torna esta espécie um vetor por excelência. Estas características, somadas à grande facilidade de reprodução e ao curto ciclo de vida, os posicionam como modelos ideais para o desenvolvimento de ensaios experimentais (MURY, 2010).

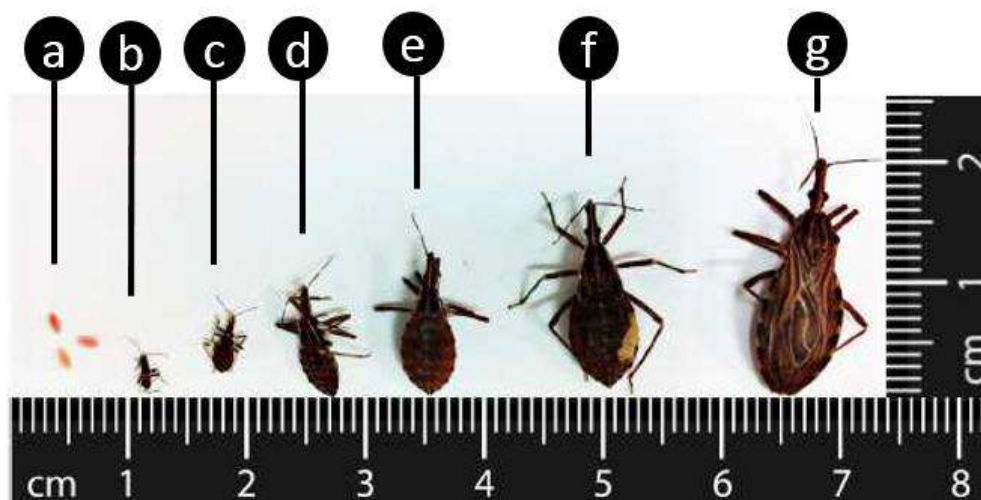


Figura 3: Ciclo de vida de *Rhodnius prolixus*. Diferentes estágios de desenvolvimento. As etapas de amadurecimento seguem na sequência: ovo (a), 1º estágio (b), 2º estágio (c), 3º estágio (d), 4º estágio (e), 5º estágio (f) e adultos (g). Fonte: Adaptado de SOUZA, 2016.

1.4 Corpo gorduroso

O corpo gorduroso desempenha um dos principais papéis na vida dos insetos, essencialmente no armazenamento e na utilização de energia. É um tecido dinâmico, que está envolvido em múltiplas funções metabólicas, e age como depósito central para o excesso de nutrientes. Portanto, é um órgão de grande atividade biossintética e metabólica. As células do corpo gorduroso não apenas controlam a síntese e a utilização de reservas de energia - gordura e glicogênio, mas também sintetizam a maioria das proteínas da hemolinfa e dos metabólitos circulantes.

Grandes quantidades de proteínas relevantes, como proteínas de armazenamento usadas como reservatório de aminoácidos para a morfogênese ou vitelogeninas para maturação do ovo, são segregadas pelo corpo gorduroso (BROOKS, 1985). A maior parte do metabolismo do inseto ocorre nesse órgão, incluindo o metabolismo de lipídeos e carboidratos, a síntese proteica e o metabolismo de aminoácidos e nitrogênio.

O corpo gorduroso também possui como função armazenar e liberar energia em resposta às demandas energéticas do inseto. Os insetos armazenam reservas de

energia sob a forma de glicogênio e triglicérides nos adipócitos, a principal célula do corpo gorduroso. Os adipócitos de insetos podem armazenar uma grande quantidade de reservas de lipídios, tais como gotículas lipídicas citoplasmáticas. O metabolismo lipídico é essencial para o crescimento e a reprodução, e fornece energia necessária durante períodos prolongados sem alimentação (ARRESE e SOULAGES, 2010).

Considerando-se que muitos tecidos de insetos têm análogos em vertebrados, o corpo gorduroso se diferencia por ser um órgão exclusivo dos insetos, relativamente grande e distribuído ao longo do corpo destes, preferencialmente sob o tegumento e em torno do intestino e do órgão reprodutivo. O corpo gorduroso é estruturalmente heterogêneo e apresenta diferenciação regional que pode ser distinguida morfológicamente. Embora algumas funções do corpo gorduroso estejam presentes em todo o tecido, outras são predominantemente localizadas em certas regiões (HAUNERLAND e SHIRK, 1995).



Figura 4: Quantidade de corpo gorduroso visivelmente verificada em *Rhodnius prolixus* (fêmeas) em 4 dias após alimentação.

1.5 Ovocênese

O ovário do *R. prolixus* (Figura 5) é do tipo teleotrófico meroístico, sendo composto por dois hemi-ovários, cada um formado por sete ovaríolos, conectados a um oviduto comum. Os ovários contêm células que ficam presas ao ápice de cada ovaríolo e são conectadas aos oócitos em desenvolvimento por cordões tróficos fibrilares nutritivos (WIGGLESWORTH, 1972 apud ATELLA *et al.*, 2005). No processo

de ovogênese os folículos brotam do trofário, sofrem crescimento pré-vitelogênico através de transferência citoplasmática e então começa a vitelogênese quando, por absorção de proteínas de vitelo, apresentam aumento do tamanho (ATELLA *et al.*, 2005).

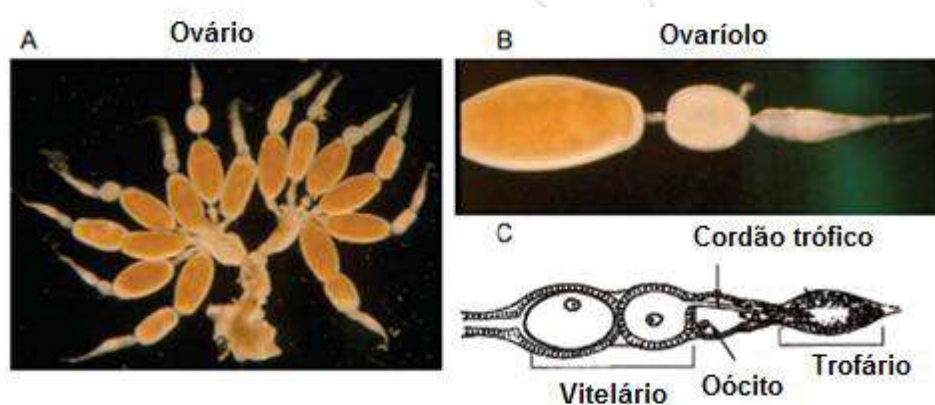


Figura 5: O ovário de *Rhodnius prolixus*: O ovário foi dissecado 5 dias após repasto sanguíneo, espalhado em uma lâmina de vidro e fotografado. O ovário (A). A partir do hemiovário representado no lado direito da Fig. 2A, ovariolo mostrado em detalhes (B). Desenho em linhas esquematizando o ovariolo é mostrado em (C), a fim de representar as estruturas internas. (Huebner e Anderson, 1972 *apud* Atella *et al.*, 2005).

A fêmea provê o ovo com ingredientes orgânicos e inorgânicos necessários para a construção do embrião (STEWART e THOMPSON, 1993). No momento da oviposição, tudo que é requerido para o desenvolvimento do embrião já foi adicionado ao ovo, com exceção de oxigênio para o metabolismo aeróbio e, em algumas espécies, água (RAHN *et al.*, 1975). Grandes quantidades de proteínas, lipídios e açúcares são incorporados nos ovócitos em crescimento durante a ovogênese. A principal proteína de reserva dos ovos de artrópodes é a vitelina, a qual é derivada de um precursor hemolinfático, a vitelogenina. A vitelogenina é adquirida pelos ovócitos através de endocitose mediada por receptor e é acumulada em estruturas chamadas grânulos de vitelo (SAPPINGTON e RAIKHEL, 1998).

Em insetos, aminoácidos derivados da alimentação sanguínea são utilizados por células do corpo gorduroso para a síntese de proteínas do vitelo. Tais proteínas sintetizadas pelo corpo gorduroso são então secretadas na hemolinfa e subsequentemente absorvidas pelos ovários, sendo depositadas nos ovócitos. Este processo é denominado vitelogênese (RAIKHEL e DHADIALLA, 1992). A função da vitelina é suprir o desenvolvimento do embrião com aminoácidos, e sua utilização está relacionada à ação de proteases específicas (FAGOTTO, 1990; LOGULLO *et al.*, 1998; YAMAMOTO e TAKAHASHI, 1993). Em alguns casos, a vitelina também poderá ser mobilizada para o desenvolvimento do estágio de ninfa para primeiro estágio (ATELLA *et al.*, 2005).

A deposição sequencial de componentes do vitelo durante a ovogênese em *R. prolixus* foi observada paralelamente a dois processos de crescimento do comprimento tanto dos folículos ovarianos como dos ovócitos. A primeira fase de crescimento linear foi associada com a incorporação equicalórica (em quantidades equivalentes em calorias) e sincrônica (simultânea) de lipídios e proteínas aos ovócitos. A segunda fase linear de crescimento foi caracterizada pela incorporação rápida e tardia de glicogênio aos ovócitos, glicogênio que é sintetizado pelo próprio ovário (BRINGEL *et al.*, 2003).

1.6 Sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino em Reduviidae é bilateralmente simétrico e cada lado consiste em um testículo e quatro glândulas acessórias (Figura 6). O testículo está localizado lateralmente na região central do abdômen e é fornecido pela traqueia conectada aos troncos traqueais anexados aos espiráculos 3, 4 e 5 homolaterais. Em insetos adultos emergidos recentemente, os testículos estão bem desenvolvidos e se estendem entre os Segmentos 3 e 4 abdominais. À medida que amadurecem, aumentam em perímetro e comprimento e preenchem grande parte da cavidade abdominal do segmento 1-2 ao segmento 5. Os espermatozoides percorrem do testículo para baixo do ducto deferente para serem armazenados na vesícula seminal antes de serem entregues na vagina por meio do bulbo ejaculatório (CHIANG *et al.*, 2013).

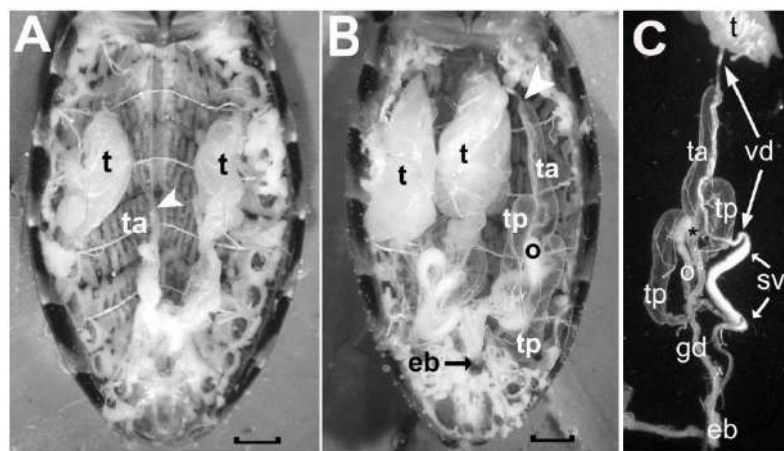


Figura 6: Fotografias comparando o sistema reprodutivo masculino de um macho adulto de *R. Prolixus* recém-emergido antes de ingerir uma refeição de sangue (A) e a de um macho adulto de dois meses que ingeriu mais de uma refeição de sangue e estava acasalando (B). Em C, os diferentes componentes de um lado do trato reprodutivo do macho mais velho são ilustrados após a separação. Símbolos em A: t, testículo; ta, glândula transparente anterior vazia; ponta de flecha branca, local onde o ducto deferente do testículo se liga à ponta anterior da glândula transparente anterior. Símbolos em B e em A com a adição de: ta, glândula transparente acessória anterior preenchida; tp, as duas glândulas acessórias posteriores; o, glândula opaca; eb, bulbo ejaculatório. Símbolos em C como em A e B com a adição de: gd, ducto comum das glândulas acessórias; vd, deferente sv, vesícula seminal, asterisco, cálice do ducto glandular. As barras de escala medem 1 mm (CHIANG *et al.*, 2013).

As glândulas acessórias produzem dois conjuntos morfologicamente distintos de secreções que o macho entrega à fêmea depois de colocar o sêmen na vagina. Durante a cópula, essas duas secreções são entregues uma após a outra (DAVEY, 1959). A primeira secreção liberada após o sêmen tem uma aparência opaca e é produzida e armazenada na glândula opaca. A segunda secreção é de aparência transparente e constitui a maior do esperma. Este material transparente é fabricado e armazenado em três glândulas acessórias transparentes. Uma glândula transparente estende sua extremidade cega anteriormente e duas se estendem posteriormente. As bases dessas glândulas convergem para o cálice do ducto da glândula, e esse ducto

da glândula comum transporta suas secreções para o bulbo ejaculatório (Figura 6) (CHIANG *et al.*, 2013).

Ao contrário dos testículos, que são totalmente formados no momento que ocorre a muda para adulto, as glândulas acessórias nos insetos recém-emergidos aparecem como pequenos sacos achatados. Após a alimentação, eles aumentam sua circunferência e se estendem longitudinalmente à medida que ficam cheios de material excretor. No macho mais velho, a glândula transparente anterior se estica ao lado de seu testículo correspondente e sua ponta anterior permanece estruturalmente associada ao ducto deferente, conforme indicado pela comparação da ponta da seta branca no inseto mais jovem com a do macho mais velho (CHIANG *et al.*, 2013).

Machos não alimentados recentemente emergidos não acasalam e, para garantir a cópula, os machos adultos precisam ser alimentados alguns dias antes do acasalamento. Essa observação, juntamente com a aparência das glândulas acessórias no macho não alimentado, sugere que a falta de material das glândulas acessórias, e não a ausência de espermatozóides, atrasa o comportamento de acasalamento (CHIANG *et al.*, 2013).

1.7 Metabolismo energético na reprodução

Os ovíparos enfrentam embriogênese na ausência de fornecimento exógeno de nutrientes. Nesse caso, os nutrientes maternos são acumulados nos oócitos femininos durante a oogênese (FAGOTTO, 1990; SAPPINGTON e RAIKHEL, 1998). Na oogênese dos artrópodes os oócitos exibem crescimento rápido, acumulam carboidratos, lipídios e proteínas que atenderão às necessidades regulatórias e metabólicas do embrião em desenvolvimento (CHIPPENDALE, 1978). A literatura fornece informações amplas sobre metabólitos durante as fases larval e adulta de vários artrópodes (BRIEGEL *et al.*, 2003; BROWN *et al.*, 2008; GOLDSTROHM *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2004). A regulação das vias do metabolismo da glicose e as dinâmicas da utilização de nutrientes na embriogênese podem diferir de acordo com as espécies, devido as demandas de acordo com a fisiologia de cada organismo. Entretanto, de modo geral o metabolismo energ, tanto em vertebrados como em invertebrados são extremamente muito importantes para o processo de reprodução.

1.7.1 Metabolismo de carboidratos

Os carboidratos possuem um monômero centralizador que é a glicose. Da glicose os carboidratos podem ser estocados na forma de glicogênio nos vertebrados e invertebrados. Quando o organismo necessita de energia é acionada a via glicolítica, onde a glicose é convertida a piruvato (NELSON *et al.*, 2011), substrato para o ciclo de Krebs, outra via importante que compõe o processo de respiração celular para a produção de energia.

A via da glicólise, é composta por 10 etapas (divididos por 3 estágios) e se inicia com a fosforilação da glicose. Nesta etapa a enzima hexoquinase utiliza uma molécula de ATP para converter a glicose em glicose-6-fosfato (NELSON *et al.*, 2011) de forma irreversível, sendo uma etapa limitante desse processo.

A via da glicólise compreende basicamente três estágios. O estágio 1, se inicia quando a glicose entra nas células através de proteínas de transporte específicas e é fosforilada pelo ATP para formar glicose-6-fosfato. Esta etapa é notável por duas razões: (1) a glicose-6-fosfato não pode se difundir através da membrana, devido às suas cargas negativas, e (2) a adição do grupo fosforil começa a desestabilizar a glicose, facilitando assim seu metabolismo adicional. A transferência do grupo fosforil do ATP para o grupo hidroxil no carbono 6 da glicose é então catalisada pela hexoquinase. O próximo passo na glicólise é a isomerização da glicose 6-fosfato em frutose-6-fosfato, seguida de uma segunda reação de fosforilação, onde a frutose-6-fosfato é fosforilada por ATP para frutose-1,6-bifosfato (BERG *et al.*, 2020).

No estágio 2, ocorre a clivagem do 1,6-bifosfato de frutose em dois fragmentos de três carbonos. Essas unidades de três carbonos resultantes são facilmente interconvertíveis. E por fim, no estágio 3, o ATP é colhido quando os fragmentos de três carbonos são oxidados em piruvato. (BERG *et al.*, 2020).

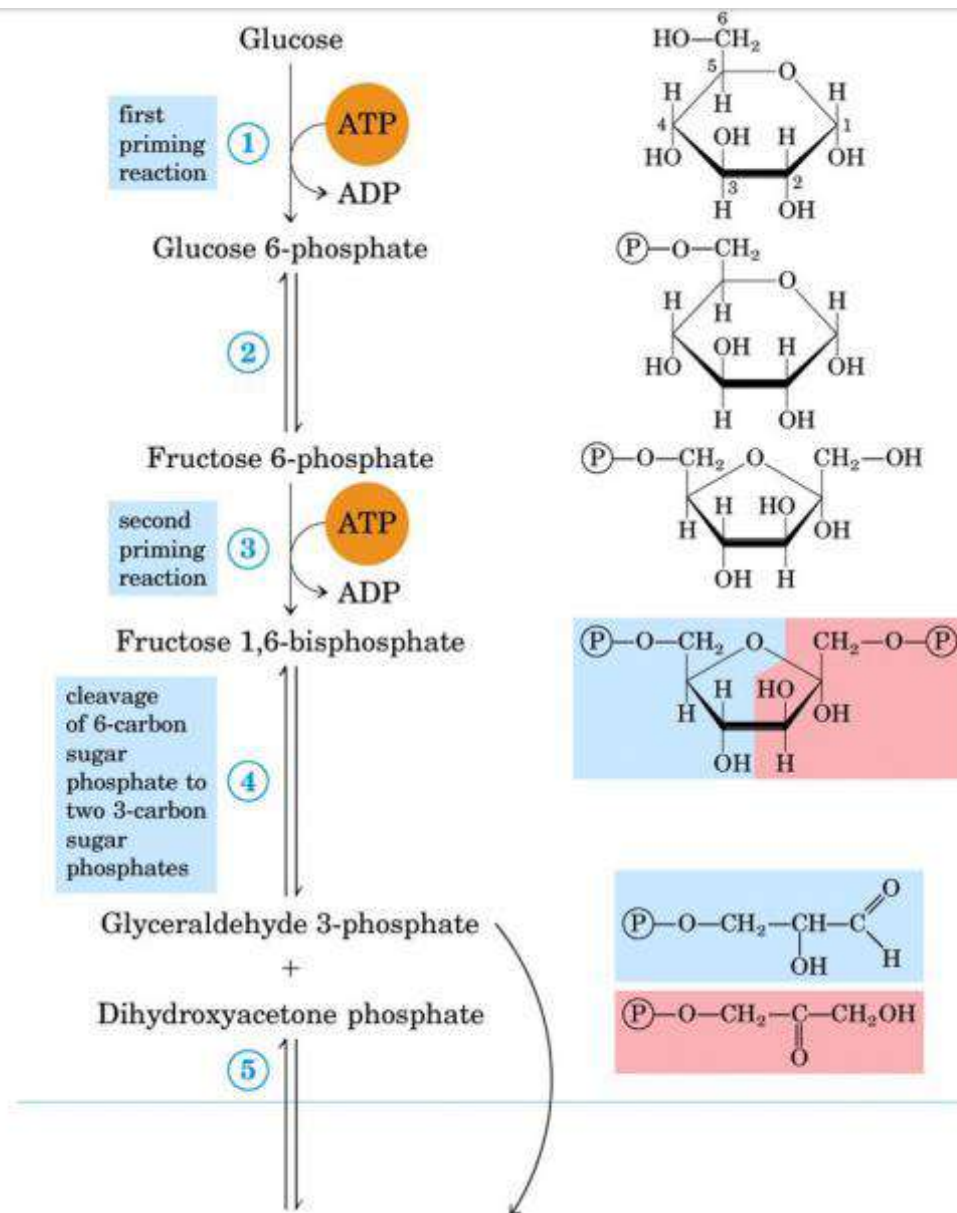


Figura 7: Fase preparatória da glicólise. Fonte: NELSON et al, 2011.

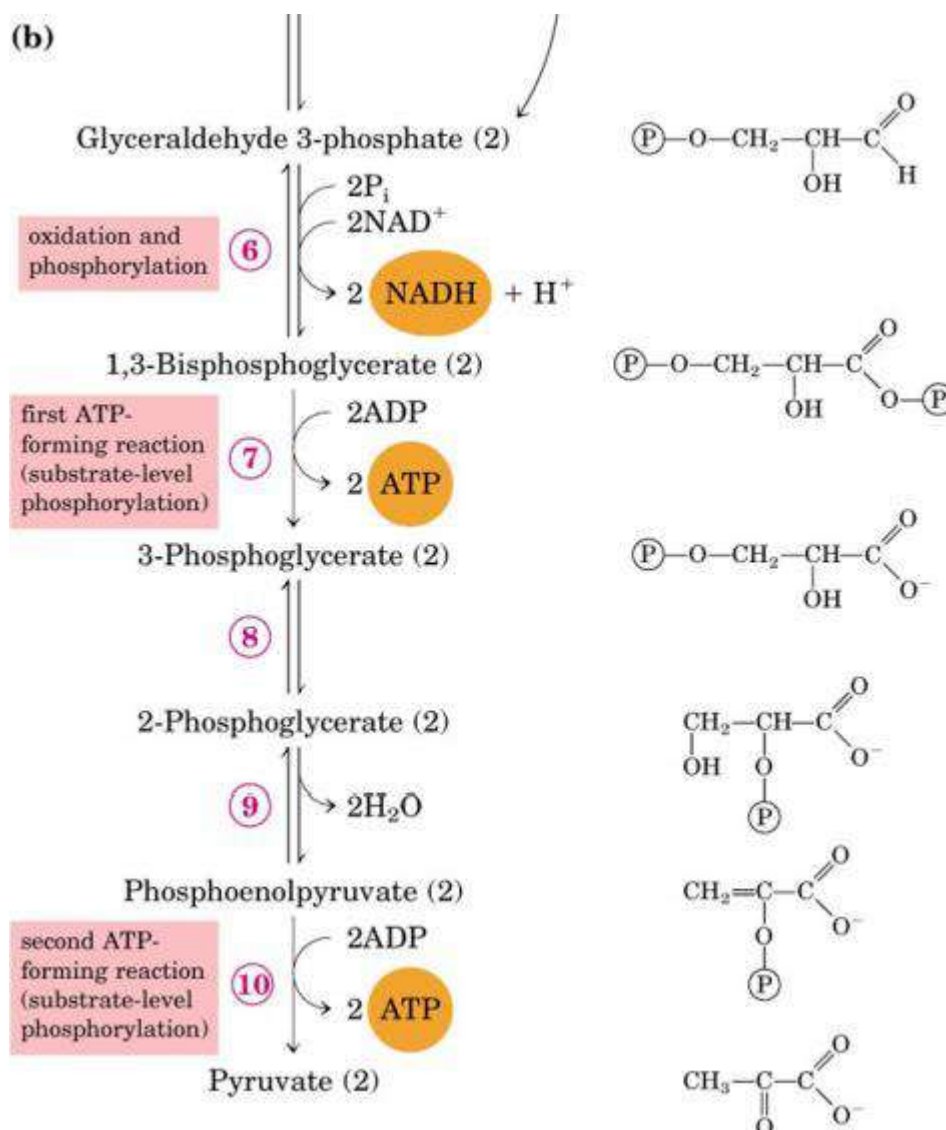


Figura 8: Fase compensação da glicólise. Fonte: NELSON et al, 2011.

Na maioria dos organismos, a glicose é o substrato mais importante da HK, pois promove a formação de glicose-6-fosfato possuindo destinos muito variados dentro da célula (NELSON *et al.*, 2011).

A HK desempenha um papel central na regulação do metabolismo energético através do ciclo de Krebs (XU *et al.*, 2012). Injeção de um inibidor de HK, 2-desoxiglicose (DOG), atrasa o desenvolvimento pupal de *Helicoverpa armígera* (GILBERT *et al.*, 2005). A expressão de HK e os níveis de atividade foram significativamente reduzidos em insetos na diapausa, o que indica que a HK é um fator crítico na redução da atividade metabólica para o início da diapausa. Juntos, a regulação negativa da

expressão de HK e sua baixa atividade poderiam causar aumento da atividade de espécies de oxigênio (ERO), reguladores centrais no alongamento da vida útil, para induzir diapausa (HWANG *et al.*, 2014; SCHMEISSER *et al.*, 2013).

Além da via glicolítica, a glicose-6-fosfato pertence também a primeira etapa da via das pentoses-fosfato, uma importante via presente no metabolismo de carboidratos. Alguns tecidos especializados utilizam a glicose-6-fosfato para a produção de pentoses-fosfato, que serão utilizadas na síntese do DNA, RNA, CoASH, ATP, FADH₂ e NADH. Essa rota metabólica é denominada via das pentoses (NELSON *et al.*, 2011):

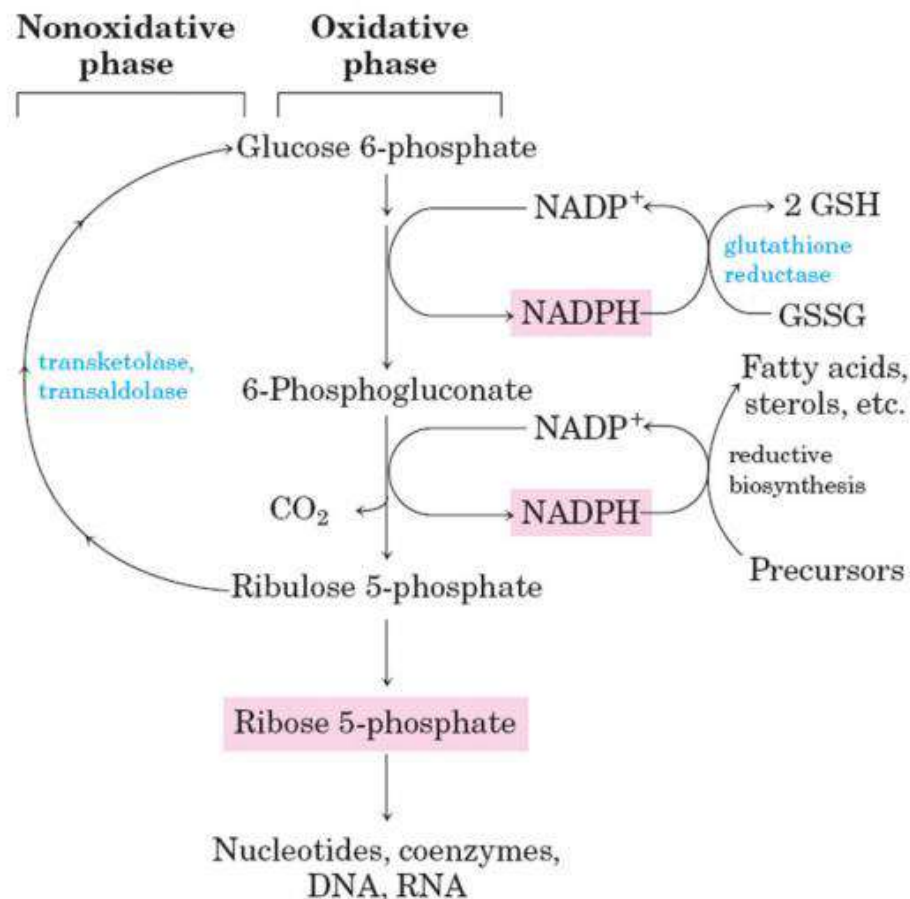


Figura 9: Via das pentoses. Fonte: NELSON et al, 2011.

A via das pentoses pode ser dividida em duas fases. Na fase oxidativa a glicose-6-fosfato é oxidada até ser convertida à ribose-5-fosfato, para ser utilizada na

biossíntese. Na fase não oxidativa a ribose-5-fosfato é reconvertida à glicose-6-fosfato para ser degradada e produzir energia (NELSON *et al.*, 2011).

Na primeira etapa da fase oxidativa a enzima glicose-6-fosfatodesidrogenase utiliza do NADP⁺ para oxidar a hidroxila do hemiacetal da glicose-6-fosfato à carbonila, formando assim uma lactona, a 6-fosfogliconoδ-lactona. A enzima lactonase então catalisa a hidrólise da ligação éster da lactona, formando o 6-fosfogliconato. A enzima 6-fosfogliconato-desidrogenase utiliza outro NADP⁺ para oxidar a hidroxila em C-3 à cetona, o que favorece a descarboxilação do β-ceto-ácido, formando a ribulose-5-fosfato. Para finalizar, a enzima fosfopentose-isomerase catalisa a isomerização da ribulose-5-fosfato em ribose-5-fosfato, num mecanismo análogo ao da isomerização da glicose-6-fosfato à frutose-6-fosfato (NELSON *et al.*, 2011).

1.7.2 Metabolismo de Aminoácidos

Os artrópodes desenvolveram ao longo do tempo, diversas adaptações para se alimentarem, dentre elas está a hematoglia. Os insetos hematógafos possuem uma dieta rica em aminoácidos, proveniente da hemoglobina, uma proteína presente no sangue.

As aminotransferases são enzimas essenciais envolvidas no metabolismo central de todos os organismos. O primeiro passo no catabolismo da maioria dos L-aminoácidos que chegam ao fígado é a remoção dos grupos α – amino através das reações de transaminação, onde o grupo α – amino é transferido para o átomo de carbono α do α – cetoglutarato, produzindo o respectivo α – cetoácido análogo do aminoácido. O objetivo das reações de transaminação é coletar os grupos amino de muitos aminoácidos diferentes na forma de apenas um, o L- glutamato, que funciona como doador de grupos amino para as vias biossintéticas ou para as vias de excreção que levam à eliminação dos produtos nitrogenados (LEHNINGER, 2006).

As enzimas alanina e aspartato aminotransferases catalisam a transferência reversível de amino grupos de aminoácidos a α-cetoglutarato, formando ácido glutâmico e piruvato ou oxaloacetato. Essas reações desempenham um papel central

na síntese e degradação de aminoácidos e atuam como uma ponte entre metabolismo de aminoácidos e carboidratos (MOTTA, 2003)

Em *Aedes aegypti*, mosquito que se alimenta de sangue, a parte do ácido úrico (produto nitrogenado) é retido no corpo e posteriormente metabolizado em alantoína e ácido alantóico, gerando uréia como produto final. A uréia é derivado da degradação do ácido úrico, que é um depósito de excesso de amônia produzida durante a digestão do sangue (SCARAFFIA *et al.*, 2008). O ácido úrico esteve envolvido como eliminador de radicais livres em insetos como como *D. melanogaster* (HILLIKER *et al.*, 1992), *R. prolixus* (GRACA-SOUZA *et al.*, 1997; GRACA-SOUZA *et al.*, 1999) e *Pyrearinus termitiluminanos* (BARROS *et al.*, 2000).

1.8 Modelagem Molecular

O Centro Nacional de Informações em Biotecnologia, *National Center for Biotechnology Information - NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), é um avanço para a ciência e a saúde fornecendo acesso a informações biomédicas e genômicas. O volume impressionante de dados moleculares e seus padrões sutis e críticos levaram a uma demanda para bancos de dados computadorizados e ferramentas de análise. Nesse contexto, o NCBI foi encarregado de criar sistemas automatizados para armazenar e analisar dados de biologia molecular, bioquímica e genética; facilitar o uso de tais bancos de dados e *softwares* pela comunidade científica; coordenar esforços para reunir informações sobre biotecnologia tanto nacional como internacionalmente e realizar pesquisa em métodos avançados de processamento de informação baseada em computador para analisar a estrutura e função de moléculas biologicamente importantes.

A modelagem molecular envolve métodos computacionais teóricos com o objetivo de prever o comportamento de moléculas, fornecendo informações sobre conformação, interações químicas e propriedades moleculares (EWEAS, 2014). Técnicas computacionais de modelagem molecular e triagem virtual têm se mostrado cada vez mais promissoras no processo de descoberta de novas moléculas, sendo utilizadas pela academia e pela indústria farmacêutica (LEELANANDA e LINDERT, 2016).

O crescente número de informações estruturais disponíveis no *Protein Data Bank* – PDB, juntamente com a melhoria no desempenho dos *softwares* de computadores, fez com que as técnicas de modelagem molecular fossem amplamente utilizadas nas últimas duas décadas (SGRIGNANI e MAGISTRATO, 2013). Em geral, o uso da modelagem molecular visa projetar ou descobrir novos fármacos e estudar os alvos moleculares a nível atômico e suas interações para melhorar a afinidade das moléculas mais promissoras (VILLOUTREIX *et al.*, 2009).

As abordagens de modelagem molecular são divididas em métodos baseados em estrutura (direto) e baseados em ligantes (indireto). A abordagem baseada na estrutura consiste em utilizar a estrutura tridimensional (3D) do alvo (enzima / receptor) para a geração ou rastreio de ligantes (moduladores), seguido de síntese, testes biológicos e otimização. Já na abordagem baseada em ligantes, as propriedades de um conjunto de ligantes conhecidos por se ligar a um alvo de interesse, são utilizadas para construir um modelo com características comuns que se acredita serem importantes para o efeito biológico. Esta abordagem também pode ser utilizada para encontrar novos ligantes que compartilham características comuns (EVANTHIA *et al.*, 2014; PHILIP *et al.*, 2007).

Em uma pesquisa realizada em maio de 2018 no PDB, foram encontradas 137.358 estruturas experimentais de proteínas depositadas, porém a determinação da estrutura protéica por meio de métodos experimentais, como a cristalografia de raios X ou espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), é demorada e não é sempre bem sucedida com todas as proteínas, especialmente com proteínas de membrana (FLOUDAS *et al.*, 2006; VYAS *et al.*, 2012). Nesse contexto, o método de modelagem comparativa, também denominado modelagem por homologia, é capaz de gerar um modelo 3D confiável de uma proteína a partir da sua sequência de aminoácidos (TRAMONTANO e MOREA, 2003), baseando-se no fato de que proteínas relacionadas evolutivamente compartilham uma estrutura similar (JOHNSON *et al.*, 1994).

A modelagem comparativa se baseia no fato de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada do que a sequência de aminoácidos e que pequenas ou médias mudanças na sequência de aminoácidos normalmente resultam em pequenas variações na estrutura 3D (VYAS *et al.*, 2012). Estes métodos utilizam

um algoritmo de reconhecimento de moldes, baseado na similaridade entre as sequências de aminoácidos, em um banco de dados de estruturas 3D de proteínas. Então, a partir de um ou mais moldes de proteínas semelhantes, é montada a estrutura tridimensional (3D) da proteína modelo, essa estrutura passa por uma etapa de otimização por mecânica e/ou dinâmica molecular e, posteriormente, o modelo construído é validado (CAVASOTTO e PHATAK, 2009; SANT'ANNA, 2009).

O *docking* molecular é uma das estratégias mais estabelecidas dentro da *Structure-Based Drug Design* - SBDD. É capaz de prever a orientação mais provável de uma molécula em relação a outra em complexos, fornecendo informações sobre as poses dos ligantes e interações que estabilizam ou tornam o complexo desfavorável (FERREIRA *et al.*, 2015).

O desenho de ligantes baseado na estrutura é uma abordagem amplamente utilizada e se tornou possível com o desenvolvimento de técnicas que permitiram a resolução de diversas estruturas de receptores e enzimas. Esta é uma técnica na qual se utiliza as informações estruturais de receptores e enzimas disponíveis em banco de dados, geralmente obtidas por cristalografia de raio x ou modelagem comparativa (FERREIRA *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2011).

O *docking* molecular é a técnica mais amplamente utilizada para predição de posições e afinidade de ligação de pequenas moléculas aos seus biorreceptores (TANCHUK *et al.*, 2016) e tenta prever a estrutura e as interações formadas entre dois ou mais constituintes moleculares, geralmente interações proteína-ligante. Portanto, é uma ferramenta valiosa para a identificação de potenciais ligantes de alvos de interesse biológico.

Diversos programas de *docking* molecular estão disponíveis para *triagem* virtual. Cada um possui diferentes algoritmos que buscam a melhor conformação ou “pose” para o ligante e funções de *score* para estimar a afinidade do ligante com a proteína através da energia de ligação teórica (FERREIRA *et al.*, 2015). Programas como Gold, AutoDock e FITTED apresentaram valores de RMSD - *Root Mean Square deviation*, valor médio para o desvio médio dos átomos, inferiores a 2Å entre a pose construída no programa e a pose do modelo experimental em cerca de 70% das 10 poses com melhor *score* (SCARPINO *et al.*, 2018) demonstrando o potencial destas ferramentas para prever resultados empíricos.

O interesse crucial da técnica de docking é a reprodução dos potenciais químicos, que direcionam as conformações preferenciais das ligações e a energia livre de ligação, gerando um grupo de conformações que são ordenadas por um escore com base na sua estabilidade (NUNES, 2015; SILVA, 2008; TROTT e OLSON, 2010).

Os dois principais componentes dos softwares de docking são o algoritmo de busca e uma função que pontua a afinidade (SILVA, 2008). O algoritmo avalia recursivamente a conformação do ligante, explorando os graus de liberdade rotacional e translacional até que a energia mínima seja alcançada, enquanto a função distingue os modos de ligação que teoricamente são mais próximos dos obtidos experimentalmente dentre os demais modos explorados pelo algoritmo de busca, classificando as conformações de acordo com a soma das energias eletrostáticas e de van der Waals (PAGADALA *et.al*, 2017; SILVA, 2008).

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivos gerais a partir de estudos bioquímicos experimentais, verificar se a alimentação em *Rhodnius prolixus* interfere na demanda de determinados metabólitos e atividade de determinadas enzimas em órgãos como ovário, testículo e corpo gorduroso de fêmeas e machos, e se há uma diferença dessa demanda comparando os órgãos reprodutores com o corpo gorduroso. E além disso, diante da importância da enzima hexoquinase para o metabolismo de carboidratos, outro objetivo foi utilizar ferramentas de modelagem molecular para a construção de modelo 3D dessa enzima de *Rhodnius prolixus* para mapear as interações da mesma com um inibidor conhecido, para futuramente ser utilizada como um alvo no controle desse inseto vetor.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a quantidade de proteínas totais, glicose, glicogênio, colesterol e triglicerídeos em corpo gorduroso de fêmeas e machos, ovário e testículos de adultos em *Rhodnius prolixus*;

- Determinar as atividades enzimáticas da aspartato e alanina aminotransferases;
- Utilizar a técnica *in silico* de modelagem comparativa para a construção de um Modelo 3D da proteína de interesse do metabolismo energético de *Rhodnius prolixus*, a Hexoquinase.
- Mapear as interações moleculares que ocorrem entre a hexoquinase de *Rhodnius prolixus* e um inibidor conhecido, o glifosato, com o auxílio da técnica de *Docking molecular*.

3. JUSTIFICATIVA

O *Rhodnius prolixus* é um hemíptero hematófago, que chega a ingerir 10 vezes seu peso em sangue em uma única refeição. A espécie pertence à família *Reduviidae* e possui a muda de um estágio para outro estimulada por repasto sanguíneo, sendo tanto a qualidade como a quantidade do sangue ingerido essencial para o desenvolvimento e maturação dos órgãos. É hospedeiro intermediário de tripanossomatídeos (parasita da Doença de Chagas) sendo apontado como principal vetor da Doença de Chagas em países como Venezuela e Colômbia, que acomete de forma irreversível e crônica diferentes sistemas do organismo.

A hematofagia em fêmeas adultas de *R. prolixus* desencadeia o processo de ovogênese e, cerca de quatro dias após a alimentação, inicia-se a oviposição (Santos *et al.*, 2008). Em machos, foi evidenciado que os insetos não alimentados recentemente emergidos não acasalam, dessa forma, para garantir a cópula, os machos adultos precisam ser alimentados alguns dias antes do acasalamento (CHIANG *et al.*, 2013). Diante das evidências apresentadas sabe-se que a maturidade reprodutiva tanto em fêmeas, quanto em machos depende da demanda de substratos energéticos, como glicose, glicogênio, triglicerídeos que são disponibilizados através da alimentação.

A glicose é um substrato muito importante para a enzima hexoquinase, na qual atua de forma irreversível na primeira etapa da via glicolítica para produção de piruvato, que será usado pelo Ciclo de Krebs no processo de respiração celular. Sabe-

se que a demanda de glicose é importante para o desenvolvimento do embrião e uma possível alteração pode induzir problemas (BRAZ *et al.*, 2019; MORAES *et al.*, 2007), promovendo uma inviabilidade reprodutiva.

Visto que o *Rhodnius prolixus* é o principal vetor da Doença de Chagas e que a sua alimentação é essencial para a demanda de glicose, que é extremamente importante no desenvolvimento, o uso de técnicas da modelagem molecular para estudar a enzima hexoquinase desse inseto é algo inovador, quando se pensa na utilização da mesma como alvo, onde auxiliará em futuros trabalhos para a busca de inibidores seletivos que promovam o controle da propagação desse vetor.

Desse modo, verifica-se a importância dos nutrientes advindos da alimentação para a maturação e desenvolvimento dos órgãos reprodutores. Maiores relatos sobre a característica de alguns metabólitos e proteínas em órgãos reprodutores de machos e fêmeas do *R. prolixus* ainda não estão disponíveis na literatura, apesar de serem uma temática extremamente relevante, visando o controle desses vetores.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimental

4.1.1 Colônia de insetos

A colônia de *R. prolixus* foi mantida em uma estufa incubadora digital modelo FT 1020, Fluxo Tecnologia, no Laboratório Integrado de Bioquímica Hatsaburo Masuda, a uma temperatura de 28°C, e umidade relativa de aproximadamente 80%. A colônia de *R. prolixus* teve sua origem a partir de uma colônia mantida pelo Laboratório de Bioquímica de Insetos, do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ.

4.1.2 Grupos de insetos utilizados

Foram utilizados *R. prolixus* adultos, sob duas condições: 4 dias após a primeira alimentação (A) e 21 dias após a primeira alimentação (B).

4.1.3 Alimentação dos insetos

Os animais foram alimentados com uma periodicidade de 20 dias para adultos e 30 dias para os diferentes estágios, com sangue de coelho, diretamente na orelha dos animais, imobilizados em caixas de contenção. Este estudo foi realizado de acordo com as orientações da Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus UFRJ-Macaé e o protocolo foi aprovado sob o registro MAC032.

4.1.4 Condições para coletas de amostras

Para a quantificação de metabólitos e verificação da atividade enzimática em órgãos de *Rhodnius prolixus* (adultos) foram utilizados um total de trinta fêmeas e trinta machos na condição de 4 dias após a 1ª alimentação, e trinta fêmeas e trinta machos na condição de 21 após a 1ª alimentação.

Para cada condição, as 30 fêmeas e 30 machos foram subdivididos em 3 grupos de 10 insetos para cada sexo, diferenciados pelas mudas em dias diferentes e representados por DIA 1, DIA 2 e DIA 3. As amostras coletadas foram ovário, corpo gorduroso de fêmea, testículo e corpo gorduroso de macho, obtendo-se dez amostras de cada órgão, armazenados em eppendorff e posteriormente dosados por espectrofotometria.

Foram quantificados os seguintes metabólitos: proteínas totais, glicose, glicogênio, triglicerídeos, e a atividade enzimática da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase sob as condições 4 dias e 21 dias após a 1ª alimentação, denominadas respectivamente por condições A e B.

As dosagens das amostras foram realizadas por meio da espectrometria, utilizando-se o espectrofotômetro UV-VIS UV-1280 SHIMADZU, disponível no laboratório.

4.1.5 Obtenção e preparo de homogeneizados de tecidos

Cada amostra (ovário, corpo gorduroso de fêmea, testículo e corpo gorduroso de macho) coletada foi transferida para 480 µL de tampão fosfato-salina 1x e, em seguida, macerada, centrifugada utilizando parâmetros como, velocidade de 6000

RPM por 1 minuto, em 28°C, e enfim, foi retirado o sobrenadante para a realização dos ensaios de determinação de metabólitos.

4.1.6 Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteínas nas amostras foram determinadas pelo método de Bradford (1976) a 595 nm. A curva padrão foi realizada utilizando ovoalbumina (SIGMA – USA). Foram utilizadas BSA 0,1% para a curva padrão e para as amostras, 10 µL de cada, juntamente com 90 µL de H₂O miliq e 1 mL de reagente de Bradford, preparado previamente no laboratório. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.1.7 Determinação da concentração de glicose

Para a dosagem de glicose foi utilizado o Kit Glucos da marca Doles®, conforme o manual. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 500 nm. A concentração de glicose foi calculada com base em uma curva padrão de glicose. Foram utilizadas para a curva padrão uma solução padrão 100 mg/dL (2,4,6,8,10 µL) juntamente com seu reagente colorimétrico (998, 996, 994, 992, 990, 1000 µL). Para as amostras foram utilizados 10 µL de cada mais 990 µL de reagente colorimétrico. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.1.8 Determinação da concentração de glicogênio

O ensaio foi realizado utilizando o Kit do marca glucox®, seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (shimadzu UV-visível-1240) a 505 nm. O conteúdo de glicogênio nos ovos foi calculado com base em uma curva padrão de glicogênio submetida às mesmas condições de ensaio. Foram utilizadas para a primeira etapa, curva e amostras incubados em 40°C por quatro horas, para a curva padrão foi utilizado glicogênio 2mg/mL (0, 1, 2, 4, 8, 12 µL), juntamente com tampão NaAc 0,2 M (190, 189, 188, 186, 182, 178 µL) e amiloglucosidase 1mg/mL (10 µL). Para as amostras, foram utilizados 15 µL de amostra mais 175 µL de tampão NaAc 0,2 M e 10 µL de amiloglucosidade 1mg/mL.

Na segunda etapa, foi feita a leitura no espectrofotômetro. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.1.9 Determinação da concentração de triglicerídeos

Para a dosagem de triglicerídeos foi utilizado o Kit triglicérides enzimático da marca Líquido®, conforme o manual. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 510 nm. A quantidade de triglicerídeos de cada amostra foi calculada com base em uma curva padrão. Foram utilizados 10 µL de amostra com 1000 µL de reagente colorimétrico e, para a curva, foram utilizados 10 µL da solução padrão e 1000 µL do reagente colorimétrico. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.1.10 Determinação da atividade de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase

As atividades das enzimas foram medidas utilizando os respectivos kits, e AST ALT da marca Doles®. As amostras foram lida em espectrofotômetro a 340 nm. Foram utilizados para o preparo do reagente de uso, 1600µL de reagente de trabalho e 400µL de coenzima. Reagente de uso e amostras foram incubadas por 10 minutos a 37°C. Para a leitura foram utilizados 500 µL de reagente de uso e 50 µL de amostra.

4.1.11 Análise estatística

Comparações entre as amostras estudadas em suas respectivas condições, foram feitas pela análise de variância usando two-way ANOVA (GraphPad Prism). Para todos os testes, uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada significativa.

4.2 Modelagem Molecular

4.2.1 Modelagem Comparativa da proteína de *R. prolixus*

As sequências primárias de aminoácidos da hexoquinase de *R. prolixus* foram obtidas com o grupo da Profa. Gloria Braz, do IQ-UFRJ, que, em colaboração com

outros pesquisadores, reuniu o genoma de *R. prolixus* e disponibilizaram no NCBI. A Construção dos modelos tridimensionais das proteínas de interesse de *R. prolixus* por Modelagem Comparativa foi realizada no servidor Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) (GUEX *et al.*, 2009). Para a construção dos modelos, foi feita uma busca por similaridade estrutural, utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), disponível no programa Swiss Model. Um dos critérios de escolha foi a proteína-molde cuja sequência tivesse maior *score* do BLAST entre as estruturas do banco de dados, além do grau de resolução (em Å) e organismo.

Após a construção do modelo, é necessário identificar possíveis erros relacionados à escolha das estruturas de referência, e ao alinhamento entre sequência-alvo e molde. Desse modo, na etapa de validação a análise estrutural do modelo da proteína de *R. prolixus* (etapa de validação) foi realizada através do gráfico de Ramachandran obtido pelo servidor Rampage (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) e Procheck 3.5.4 no Structural Analysis and Verification Server (<http://nihserv-110 er.mbi.ucla.edu/SAVES/>), para avaliar a qualidade para modelos tridimensionais de proteínas construídos (KELLOGG, 2004).

Mediante o gráfico de Ramachandran, que determina os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis, gerado pelo servidor *Rampage* através da avaliação de diversos parâmetros estereoquímicos de importância fundamental, como os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, os ângulos torcionais da cadeia principal, estão relacionados com a qualidade do modelo (KELLOGG, 2004).

No servidor Procheck 3.5.4 (LAKOWSKI, *et al.*, 1993 apud SILVA, 2007), o modelo proteico pode ser avaliado quanto à qualidade dos ambientes químicos, determinando o nível de confiabilidade do enovelamento proteico do modelo virtual (KELLOGG, 2004). O Structural Analysis and Verification Server, consegue determinar os ambientes químicos de cada resíduo do modelo e pontuando com valores de *scores* que fará referência a uma determinada matriz que foi construída com o auxílio da análise estatística envolvendo estruturas de proteínas armazenadas no PDB.

Após a etapa de validação, foi realizada a inspeção visual dos modelos construídos, através do programa PyMOL, versão 0.99 (<http://www.pymol.org/>).

4.2.2 Docking molecular

Para os estudos de *docking* molecular neste trabalho, foi utilizado o programa GOLD v. 5.5 (VERDONK *et al.*, 2003) para realizar a ancoramento molecular entre a estrutura 3D construída da hexoquinase – Rhpr com os ligantes 6-O-fosfono-beta-D-manopiranosose (M6D) e glifosato (herbicida) (Figura 7). As moléculas utilizadas foram construídas no programa *Spartan'8 V1.2.0* (Wavefunction Inc. Irvine, CA) e a predição do estado de ionização em pH fisiológico das moléculas foi realizada no programa MarvinView da ChemAxon, versão 16.2.29.0 (<http://www.chemaxon.com>). Em seguida, as mesmas foram otimizadas no *Spartan'8 V1.2.0* utilizando como parâmetro para o cálculo o método funcional de densidade B3LYP/ 6-31G* (HEHRE, 2003).

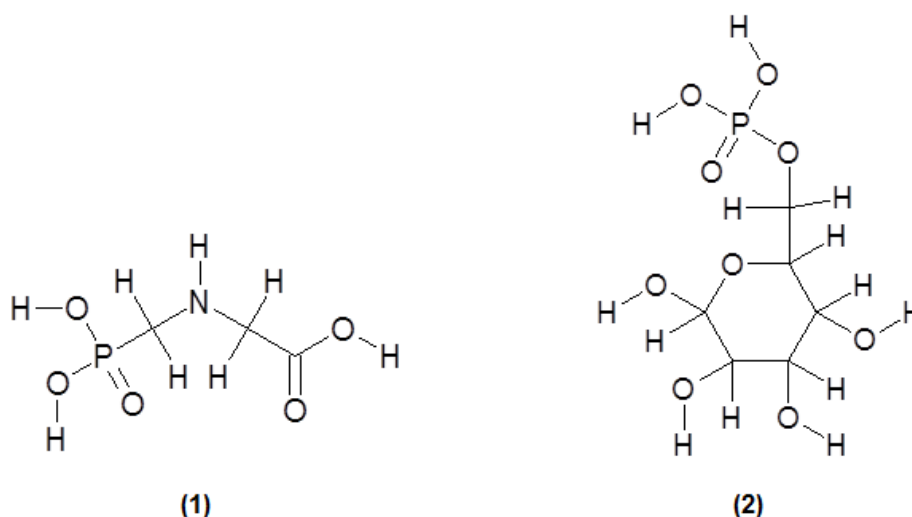


Figura 10: Estrutura 2D do glifosato (1) e 6-O-fosfono-beta-D-manopiranosose (M6D)(2).

É visualmente notável ao comparar as estruturas do glifosato e M6D (Figura 10), que possuem oxigênios receptores de elétrons e também a porção fosfato na extremidade da estrutura, o que confere uma estrutura mais estabilidade.

Uma das características mais importantes dos métodos de *docking* é a sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, funcionando até como uma forma de validação dos mesmos. A fim de se verificar se as ligações observadas em estruturas resolvidas experimentalmente e as obtidas no *docking* são semelhantes, o ligante oriundo da estrutura experimental é extraído e reinserido por um software de *docking* (método também conhecido como *redocking*), tornando possível a comparação dos resultados experimental e teórico (SILVA, 2008).

O *redocking* foi a primeira etapa do processo de *docking* molecular, na qual utilizou-se o inibidor, 6-*O*-fosfono-beta-*D*-manopiranosose (M6D), co-cristalizado na estrutura da hexoquinase humana recombinante tipo I de código 4FOE.1B depositada no PDB (dados não publicados). A M6D foi retirada do complexo proteína-ligante e recolocada no sítio ativo da enzima pela metodologia do *docking*. Foram utilizados as funções de *score*: Chemp1p, Goldscore e Chemscore. Nas três funções foram utilizados raios de busca de 10Å, 15Å e 20Å, utilizando como resíduo de referência o átomo de oxigênio 523 pertencente ao resíduo de aminoácido Asp67, pois faz parte do sítio de ligação com o ligante. Após o *redocking*, foi escolhida a melhor função e o melhor raio pelo menor valor de Desvio Médio Quadrático da Raiz, *Root Mean Square Deviation* (RMSD) entre o inibidor retirado do cristal e aquele obtido pela metodologia do *redocking* (melhor pose).

O resultado do *redocking* está relacionado principalmente ao poder de encaixe e à qualidade do modelo do receptor. Cada encaixe deve utilizar uma função de pontuação durante a pesquisa, a fim de se selecionar poses da molécula e, finalmente, levar ao melhor modo de ligação, comparado ao obtido experimentalmente. Por esta razão, o *redocking* também está relacionado à qualidade das funções de pontuação (CERQUEIRA *et al.*, 2015).

Após o *redocking*, foi realizado o *docking* molecular onde foi realizado o ancoramento molecular da hexoquinase - Rhpr com o glifosato, utilizando a função obtida na validação deste estudo (*redocking*).

A análise das interações entre as moléculas em estudo e as proteínas foi realizada nos programas *Pymol* v. 0.99 (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.) e *Discovery Studio* v. 16.1.0. (BIOVIA, 2017).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimental – Dosagens de metabólitos

5.1.1 Determinação de proteínas totais

Na quantificação de proteínas totais em fêmeas, foi possível observar na Figura 11, que a alimentação afetou o conteúdo de proteínas presentes nas amostras analisadas de forma significativa ($p=0,0002$), onde ovário e corpo gorduroso apresentaram maior conteúdo 4 dias após a alimentação. Comparando-se a quantidade de proteínas totais nos diferentes tecidos, ovário e corpo gorduroso, verifica-se que a diferença entre eles também afetou o conteúdo desses metabólitos ($p<0,0001$). É evidente que no ovário, independentemente da condição de alimentação, foi observada maior concentração de proteínas totais, considerando o grande aporte de nutrientes por esse órgão devido à sua função estrutural, pois os ovários ao longo da sua maturação para o desenvolvimento de ovos necessitam de uma demanda maior de proteínas, desse modo, já era esperado este resultado.

Já em machos foi observado na Figura 12, que a alimentação não afetou o conteúdo de proteínas totais nos diferentes tecidos de forma significativa ($p=0,2285$). Por outro lado, é possível verificar que na comparação entre tecidos observou-se uma diferença significativa ($p<0,0001$), onde o testículo apresentou uma quantidade de proteína maior nas duas condições de alimentação. Da mesma forma que em ovários, o testículo desempenha um importante papel na reprodução, considerando a necessidade de maturação deste órgão e desenvolvimento de espermatozoides, a maior demanda de proteínas neste órgão já era esperada.

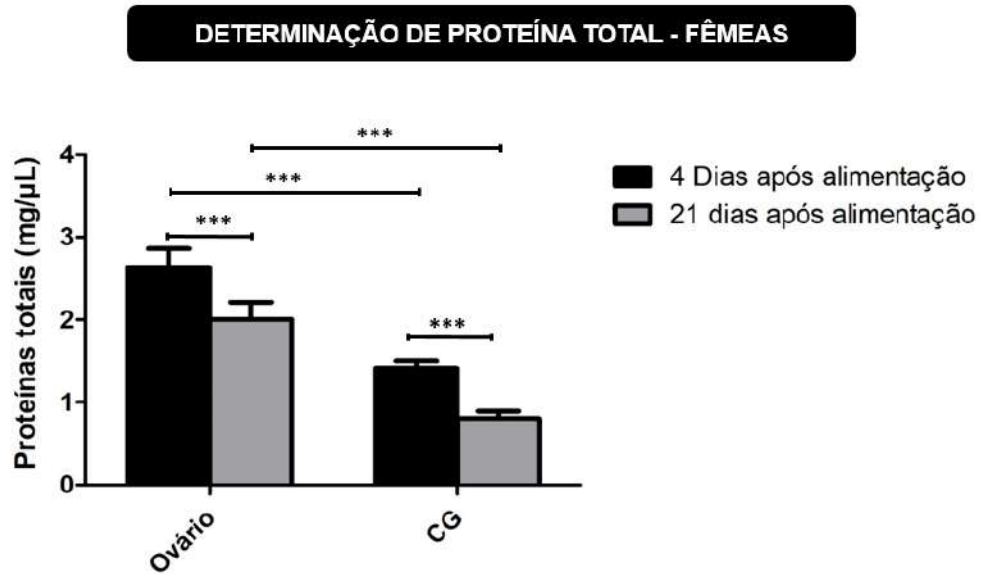


Figura 11: Diferenças na concentração de proteínas totais entre amostras de ovário e corpo gorduroso (CG) de fêmeas sob condições de 4 dias e 21 dias após a 1ª alimentação.

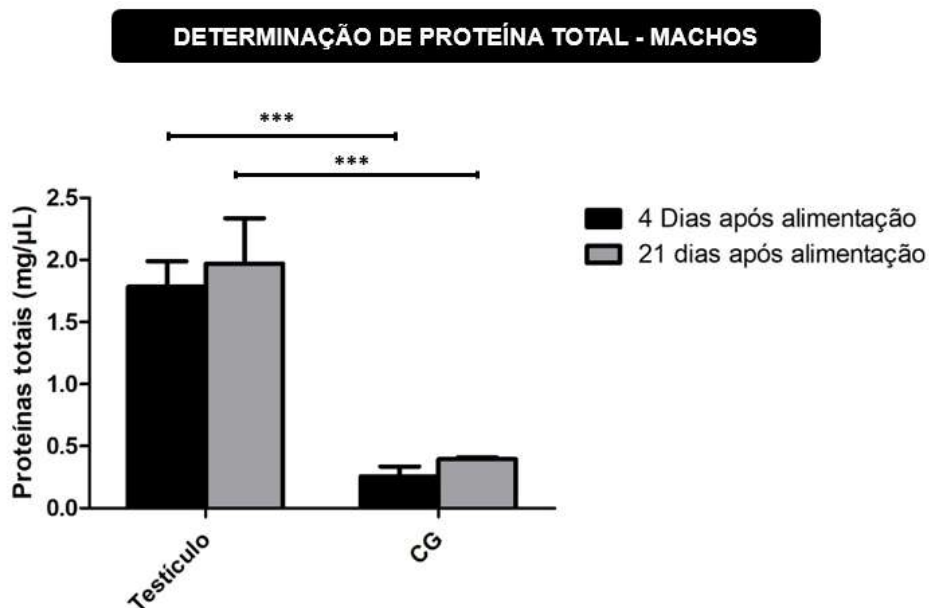


Figura 12: Diferenças na concentração de proteínas totais entre amostras de testículo e corpo gorduroso (CG) de machos sob condições de 4 dias e 21 dias após a 1ª alimentação.

Existe uma família de hormônios muito importante para a fisiologia de insetos, chamados ecdisteróides. Os ecdisteróides são responsáveis, principalmente, pela

muda, desenvolvimento e reprodução em artrópodes (DE LOOF, 2006; KRISHNAKUMARAN e SCHNEIDERMAN, 1970; MARGAM *et al.*, 2006). Vafopoulou, X., & Steel, C. G. H. (2005) também afirmaram que os ecdisteróides em insetos são fundamentais para a regulação de numerosos processos de embriogênese, desenvolvimento, metamorfose e reprodução.

Nas fêmeas de várias espécies, os ovários são a principal fonte de ecdisteróides, onde estão envolvidos na vitelogênese e no desenvolvimento e maturação de ovócitos (RAIKHEL *et al.*, 2005). Santos *et al.* (2008) em estudo de quantificação de proteínas totais em ovos de *R. prolixus*, verificou uma concentração constante de proteínas em grupos de ovos até a eclosão, indicando uma intensa atividade de captação de proteínas durante o desenvolvimento do embrião. Isso evidencia o resultado citado acima (Fig. 11), onde o ovário apresentou a mesma quantidade de proteína totais em 4 dias após alimentação. Diante disso, é possível sugerir que o ovário necessite e receba uma grande demanda de proteínas no processo de ovogênese. Supõem-se que, assim como os ovos, o ovário também necessite desse aporte de proteínas para a maturação, desenvolvimento fisiológico e para a promoção da capacidade reprodutiva viável.

Em vários insetos, os ecdisteróides também são envolvidos na regulação da diferenciação de espermatócitos como divisões mitóticas em células espermatogonais e espermiogênese, por exemplo, em *Rhodnius prolixus* e *Locusta migratoria* (DUMSER, J. BRIAN, 1980; DUMSER, J. B., 1980). Os estudos pioneiros de Loeb e colaboradores concluíram que o testículo, e especificamente a bainha do testículo, é um local de síntese de ecdisteróides em machos de *Lymantria* e *Ostrinia* (GELMAN *et al.*, 1989; LOEB e WOODS, 1989; LOEB *et al.*, 1982). Steel (1982) afirma em um estudo que o desenvolvimento para o próximo estágio do ciclo de vida requer uma alimentação de sangue, que fornecerá um estímulo inicial para a liberação de vários hormônios, onde podemos incluir os ecdisteróides (VAFOPOULOU e STEEL, 1996). Diante dessas evidências, entende-se o motivo pelo qual em machos não foi verificada diferença significativa entre 4 dias e 21 dias após alimentação em testículo (Fig. 12). A presença de maior quantidade de proteínas observada no testículo sugere que este órgão necessita de uma demanda maior deste nutriente para atender às necessidades

para maturação e desenvolvimento deste órgão reprodutor ao longo do período alimentado e jejum.

5.1.2 Determinação de Glicose

Na determinação de glicose nas amostras de fêmeas e machos diante dos resultados apresentados, Figuras 13 e 14, verificou-se que as condições de 4 e 21 dias após alimentação afetaram significativamente no conteúdo de glicose presente nas amostras ovário, testículo e corpo gorduroso de fêmeas e machos ($p < 0,0001$). Em fêmeas foi observado (Figura 13), que as peculiaridades de cada tecido afetaram no conteúdo de glicose presente ($p = 0,0005$), em que a maior concentração de glicose foi observada no ovário em 4 dias após alimentação. Em machos as peculiaridades dos tecidos também afetaram significativamente o conteúdo de glicose nas amostras ($p < 0,0001$), onde o corpo gorduroso apresentou maior concentração em 21 dias após alimentação (Figura 14).

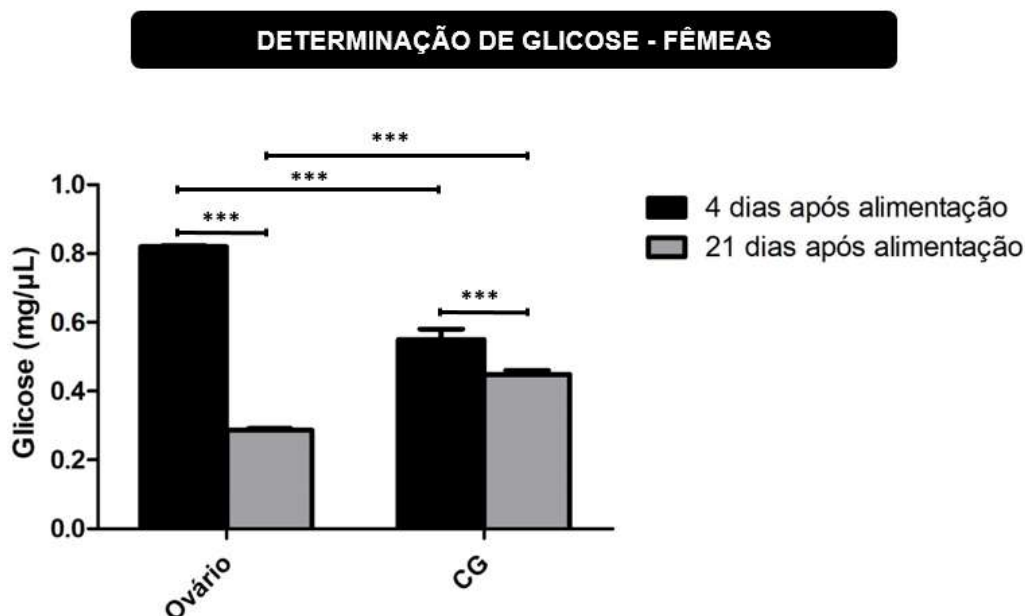


Figura 13: Diferenças na concentração de glicose (mg/μL) entre ovário e corpo gorduroso (CG) em fêmeas sob condições de 4 dias e 21 dias após a 1ª alimentação.

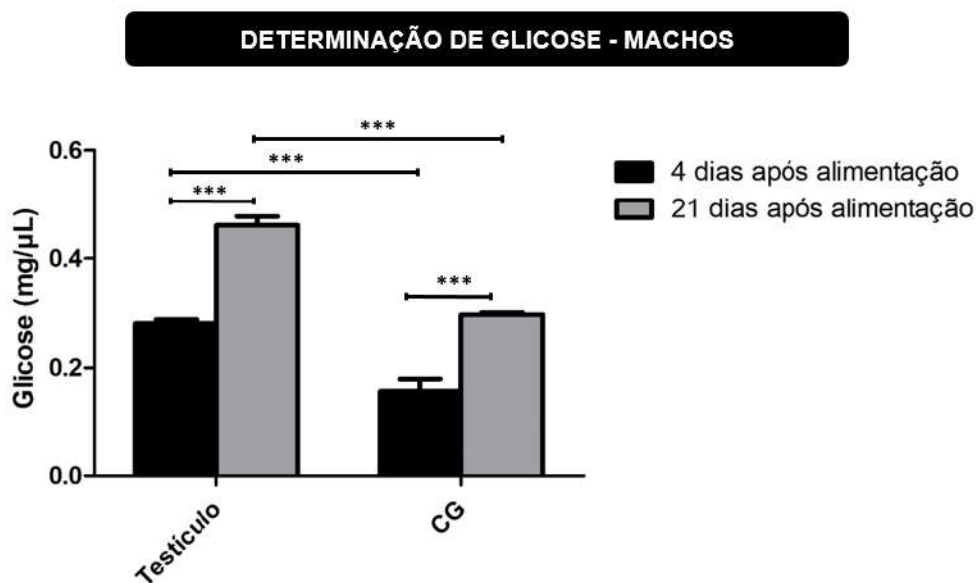


Figura 14: Diferenças na concentração de glicose (mg/μL) entre testículo e corpo gorduroso (CG) em machos sob condições de 4 dias e 21 dias após a 1ª alimentação.

Santos, R. *et al.* (2008), em um estudo realizado sobre acumulação e utilização de carboidratos por ovócitos de *Rhodnius prolixus*, menciona que durante a ovogênese, os ovos de insetos acumulam nutrientes que são usados como substratos para embriogênese e manutenção de ninfas eclodidas. Em seus resultados, Santos, R. *et al.* (2008), verificou que os níveis de glicose permaneceram constantes em ovos e as quantidades totais de glicogênio, glicose e proteína nos ovócitos aumentou com o crescimento. Esta evidência mostra que em ovários este padrão não se manteve, pois ao longo do tempo a quantidade de glicose diminuiu. Desse modo, é importante ressaltar que diante do comportamento do nível de glicose nas diferentes condições, que em fêmeas não ocorre o acúmulo de glicose, podendo ser observado na presença de uma menor concentração desse metabólito em 21 dias após alimentação.

Mariano, A. C *et al.* (2009), em um estudo onde relata o acúmulo e mobilização de glicogênio e trealose durante alimentação e jejum em machos adultos, observou que a quantidade de trealose no corpo gorduroso aumentou até o sexto dia após a alimentação, diminuiu abruptamente, e se estabilizou entre 7 e 15 dias.

Sabe-se que a trealose é dissacarídeo não redutor composto por duas moléculas de D-glicose, presente em insetos. A glicose-UDP pode ser usada para a

síntese de glicogênio ou trealose, o açúcar circulante na hemolinfa. Quando a trealose do corpo gorduroso atinge uma certa concentração, sua síntese é inibida e glicose-UDP é usada para a síntese de glicogênio e mobilização de reservas de carboidratos, onde o glicogênio é mobilizado para uso por outros tecidos, principalmente na forma de trealose (THOMPSON, 2003).

Visto que a glicose é a unidade básica da trealose e que está relacionada com a síntese de glicogênio supõem-se que as características mencionadas nos resultados obtidos em machos, neste presente estudo, segue o raciocínio deste padrão, onde o CG apresenta uma maior quantidade de glicose. Ou seja, sendo contrário ao padrão verificado em fêmeas, pois supõem-se que devido fêmeas e machos apresentarem uma diferença funcional entre seus órgãos reprodutores, haverá também uma diferença na demanda energética requerida por cada órgão, considerando que as fêmeas são responsáveis pelo desenvolvimento e maturação dos ovos necessitando de uma maior demanda de metabólitos energéticos. Entretanto, é necessário mais estudos acerca desse ponto. Um outro ponto importante a ser destacado em machos, verificado neste presente estudo, é em relação ao acúmulo de carboidratos que pode ser observado na condição de 21 dias após alimentação, apresentando um nível maior de glicose, diferente do que ocorre em fêmeas.

5.1.3 Determinação de Glicogênio

Na determinação de glicogênio em fêmeas e machos observou-se que a quantidade deste metabólito foi afetada pela alimentação, diante dos resultados dispostos nas Figuras 15 e 16, onde se observa que as amostras analisadas 4 dias após a alimentação apresentaram maior conteúdo de glicogênio apenas em ovário, comparado com aquelas que foram analisadas 21 dias após a alimentação ($p < 0,0001$). Além disso, é possível verificar também, diferenças significativas do conteúdo de glicogênio entre ovário e corpo gorduroso de fêmeas, e entre testículo e corpo gorduroso de machos 4 dias após a alimentação, sendo possível verificar que o ovário apresentou maior concentração deste metabólito ($p < 0,05$) comparado com o corpo gorduroso de fêmea (Figura 15) e o corpo gorduroso de macho apresentou maior concentração comparado com o testículo ($p < 0,0001$) (Figura 16).

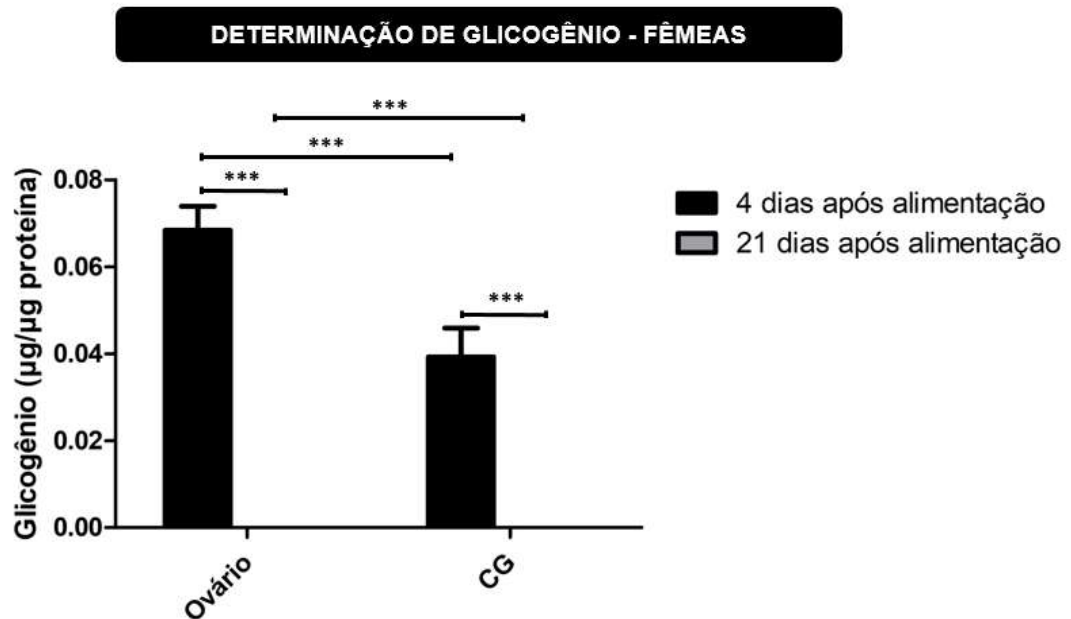


Figura 15: Determinação de glicogênio em ovário e corpo gorduroso de fêmeas.

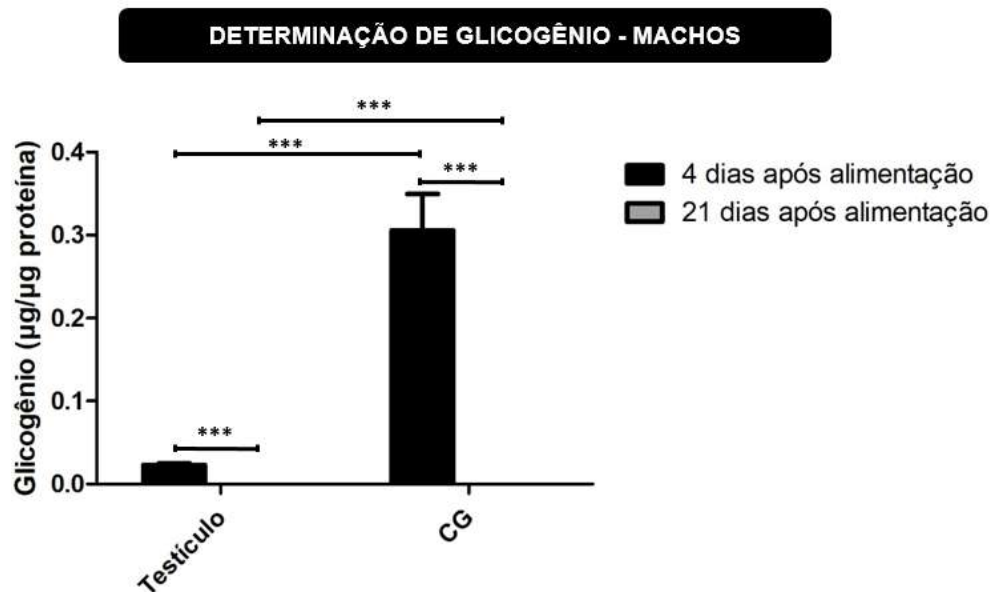


Figura 16: Determinação de glicogênio em testículo e corpo gorduroso de machos.

Durante a ovogênese, os ovos de insetos acumulam vários nutrientes usados como substratos para a embriogênese. Alguns nutrientes presentes na hemolinfa atravessam o folículo da membrana basal, passando pelo espaço extracelular que separa as células epiteliais dos folículos e atingem a superfície oocitária (ZIEGLER e VAN ANTWERPEN, 2006), já o glicogênio é sintetizado no próprio ovário (ENGELS e

DRESCHER, 1964; KATAGIRI *et al.*, 1998; RAMAMURTY, 1968). O glicogênio pode ser quase esgotado após metamorfose e na fase adulta este é recuperado e armazenado após a alimentação (LORENZ e ANAND, 2004; ZIEGLER, 1991).

Santos M. *et al*, em estudo sobre acumulação e utilização de carboidratos por ovócitos de *Rhodnius prolixus*, verificou que os níveis de glicose permaneceram constantes em ovos, mas aumentou nos fertilizados, especialmente principalmente após o dia 7, enquanto a quantidade de glicogênio diminuiu. Desse modo, a presença do maior conteúdo de glicogênio presente no ovário de fêmeas sob a condição de 4 dias após a alimentação já era esperada diante das evidências presentes na literatura. Já em machos ocorre o contrário, devido ao testículo não ter a mesma demanda energética que um ovário, como observado nos resultados, apresentando maior conteúdo de glicogênio no corpo gorduroso.

5.1.4 Determinação de triglicerídeos

Na quantificação de triglicerídeos, foi possível observar mediante os resultados apresentados nas Figuras 17 e 18, que alimentação afetou o conteúdo destes metabólitos tanto em fêmeas, quanto em machos ($p < 0,0001$), pois observa-se que em 4 dias após alimentação as amostras de fêmeas e machos apresentaram uma concentração de triglicerídeos maior do que em 21 dias após alimentação. Em relação aos tecidos, os mesmos também afetaram o resultado tanto em fêmeas ($p < 0,0001$), quanto em machos ($p < 0,05$), ou seja, em fêmeas observou-se em 21 dias após a alimentação que a quantidade de triglicerídeos foi maior em corpo gorduroso (Figura 17). Já em machos, essa diferença significativa foi observada em 4 dias após alimentação, em que o corpo gorduroso se apresentou com maior conteúdo desse metabólito (Figura 18).

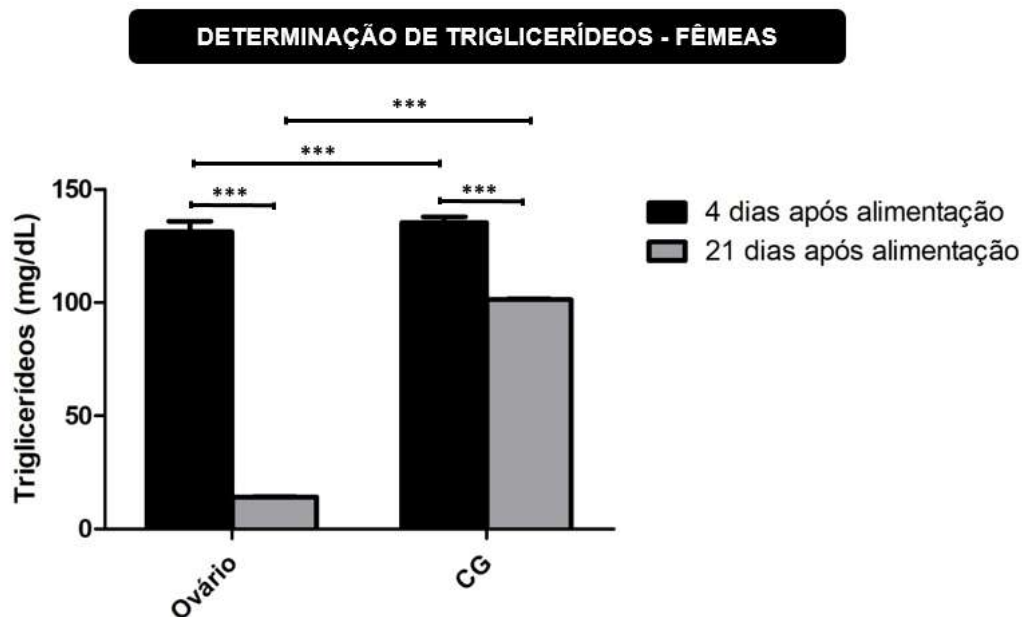


Figura 17: Determinação de triglicerídeos em ovário e corpo gorduroso de fêmeas.

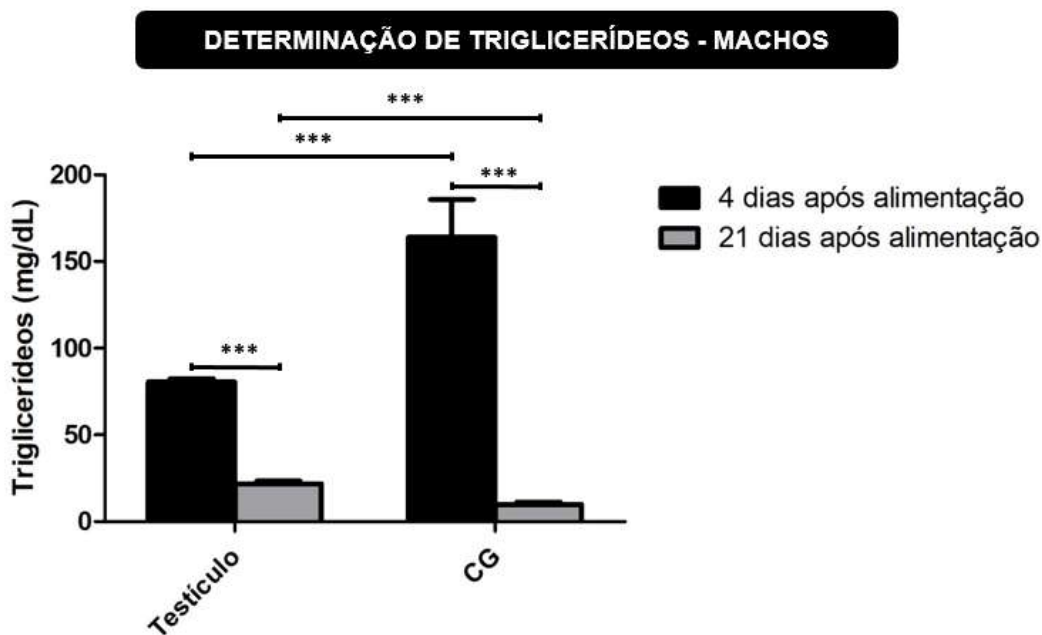


Figura 18: Determinação de triglicerídeos em testículo e corpo gorduroso de machos.

Assim como o glicogênio, os triglicerídeos também são a reserva de energia em células animais e de invertebrados, possuindo implicações diretas no metabolismo energético de insetos (DOWNER e MATTHEWS, 1976) . Ácidos graxos armazenados

como triglicerídeos podem ser usados para produção de energia através de β -oxidação (ATHENSTAEDT e DAUM, 2006). As reservas de gordura são as mais importantes e são usadas pelos insetos para atender sua demanda de energia durante diapausa (HAHN e DENLINGER, 2007), fornecer energia para o embrião em desenvolvimento (ZIEGLER e VAN ANTWERPEN, 2006) e para se manter em períodos prolongados de vôo (BEENAKKERS *et al.*, 1984). O lipídio é o principal componente do tecido adiposo e mais de 90% do lipídeo armazenado é um triglicerídeo (CANAVOSO *et al.*, 2001; GILMOUR, 1978). Diante dessas evidências verifica-se que o maior conteúdo de triglicerídeos observado nos resultados do presente estudo em corpo gorduroso de fêmeas e corpo gorduroso de machos, após 4 dias da alimentação, deve-se ao fato este tecido em insetos desempenhar um papel essencial na armazenamento e utilização de energia. Ele é o depósito central de armazenamento para excesso de nutrientes.

Seguindo o mesmo raciocínio, conseguimos entender o motivo pelo qual, o corpo gorduroso de fêmeas em 21 dias após a alimentação se mostrou com maior conteúdo de triglicerídeo, que seria devido a economia do uso para que pudesse ser utilizado ao longo do período em jejum, para manutenção de sua fisiologia, auxiliando no desenvolvimento e reprodução. É importante ressaltar que a necessidade de determinados nutrientes em ovários é muito maior, por se tratar de um tecido responsável pela oviposição, evento que exige uma alta demanda energética. Por outro lado, observa-se que o corpo gorduroso de machos na condição de 21 dias após alimentação apresentou triglicerídeos em pequena quantidade, supondo-se que seja devido ao uso total dessa reserva presente neste tecido adiposo ao longo deste período, pois, diferente das fêmeas, que ovipõem, os machos não requerem a mesma demanda por não possuírem a mesma funcionalidade.

5.1.5 Determinação das atividades enzimática da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

Na determinação da atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) em fêmeas (Figura 19), observou-se que a diferença entre as condições de alimentação não afetou a atividade da enzima significativamente ($p=0,0135$), pois em

ovários a AST em 4 dias e também em 21 dias após a alimentação apresentou maior atividade no corpo gorduroso. Entretanto, deve-se ressaltar que, mediante o tamanho da barra de erro verificada no gráfico, esses resultados não são fiéis ao experimento realizado. Devido à grande barra de erro verificada na determinação da atividade de AST em fêmeas, as diferenças apresentadas (Figura 19) entre os tecidos não afetaram significativamente a atividade de AST. Supõe-se que o erro resultante possa estar envolvido com a capacidade de alimentação de cada inseto, ou seja, não foi possível controlar no experimento uma quantidade padronizada de sangue ingerido por cada fêmea, só foi possível controlar o tempo de alimentação e, de modo visual, verificar se todas estavam com o abdômen bem distendido.

Em machos (Figura 20), ao contrário dos resultados verificados em fêmeas devido ao erro apresentado, observou-se que a alimentação e o tipo de tecido afetaram significativamente a atividade enzimática de AST ($p < 0,0001$), ou seja, o testículo e o corpo gorduroso apresentaram maior atividade de AST em 4 dias após alimentação.

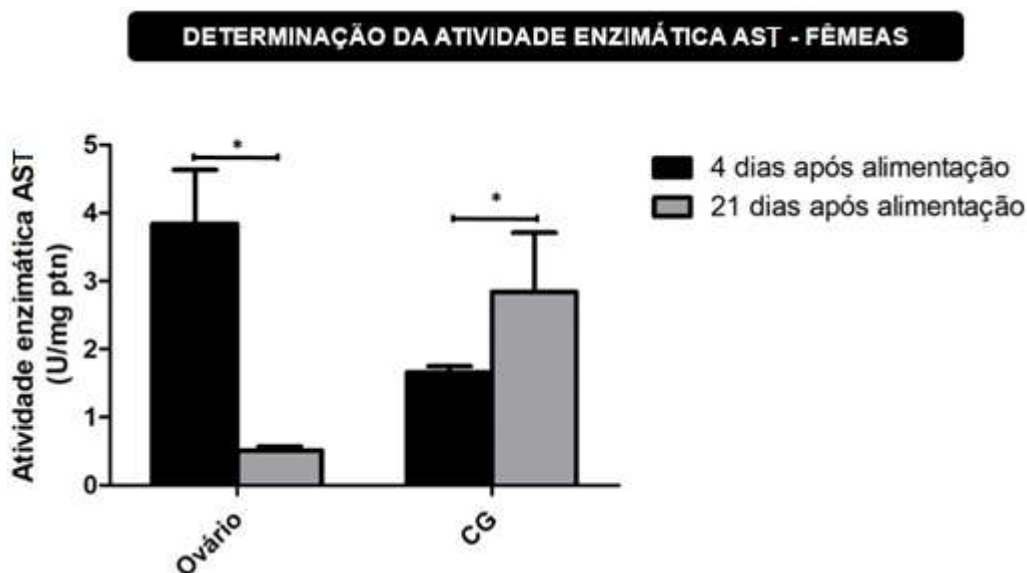


Figura 19: Diferenças na atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST), mediante a sua concentração (U/mg proteína) ao longo de um período de 6 minutos, entre ovário e corpo gorduroso (GC) de fêmeas sob condições de 4 dias e 21 dias após 1ª alimentação.

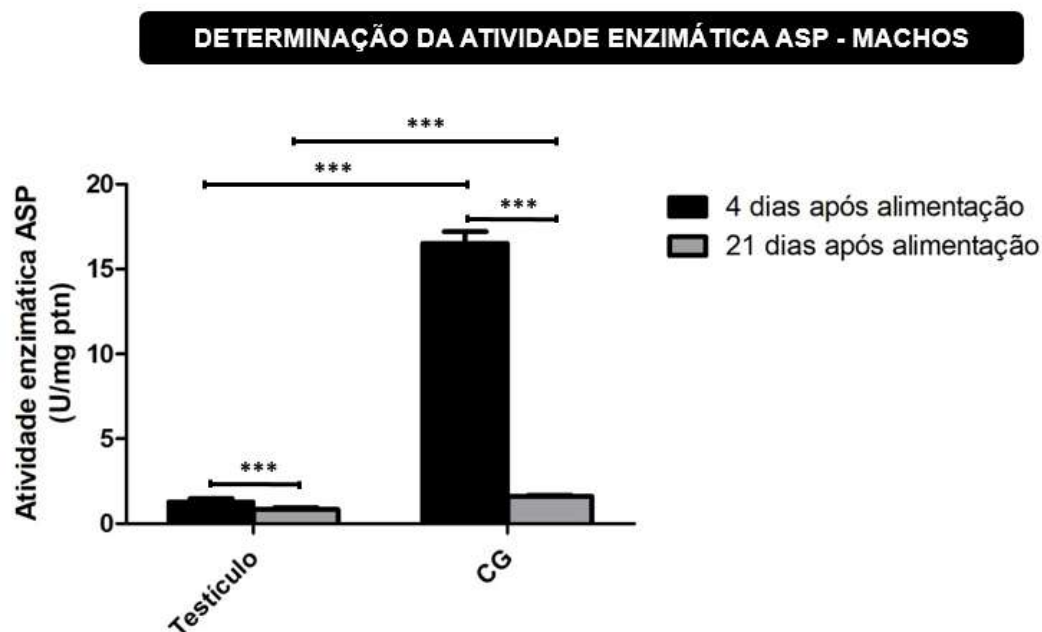


Figura 20: Diferenças na atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST), mediante a sua concentração (U/mg proteína) ao longo de um período de 6 minutos, entre testículo e corpo gorduroso (GC) de machos sob condições de 4 dias e 21 dias após 1ª alimentação.

Na determinação da atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) em fêmeas, observou-se que a diferença entre as condições de alimentação afetaram significativamente a atividade da enzima ($p < 0,0001$), ou seja, tanto em ovário quanto em corpo gorduroso foi apresentada maior atividade de ALT em 4 dias após alimentação (Figura 21). É possível observar que o mesmo ocorre em relação aos tecidos, onde há uma diferença significativa na atividade de AST entre ovário e corpo gorduroso, sob mesma condição de alimentação.

Em machos (Figura 22), foram observados resultados semelhantes em relação à diferença entre as condições de alimentação que afetaram significativamente a atividade da enzima ALT ($p < 0,0001$), onde tanto em testículo quanto em corpo gorduroso foi verificada maior atividade em 4 dias após alimentação. Porém, em relação aos tecidos, viu-se que testículo e corpo gorduroso apresentaram atividade da enzima ALT significativamente diferenciada.

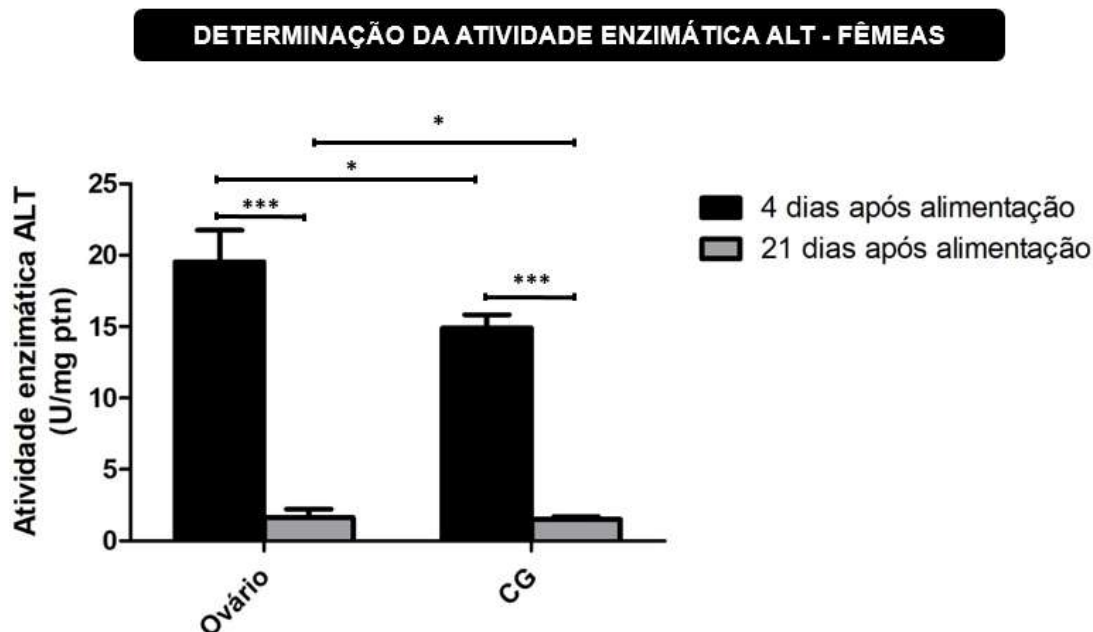


Figura 21: Diferenças na atividade enzimática de alanina aminotransferase (ALT), mediante a sua concentração (U/mg proteína) ao longo de um período de 6 minutos, entre ovário e corpo gorduroso (CG) de fêmeas sob condições de 4 dias e 21 dias após 1ª alimentação.

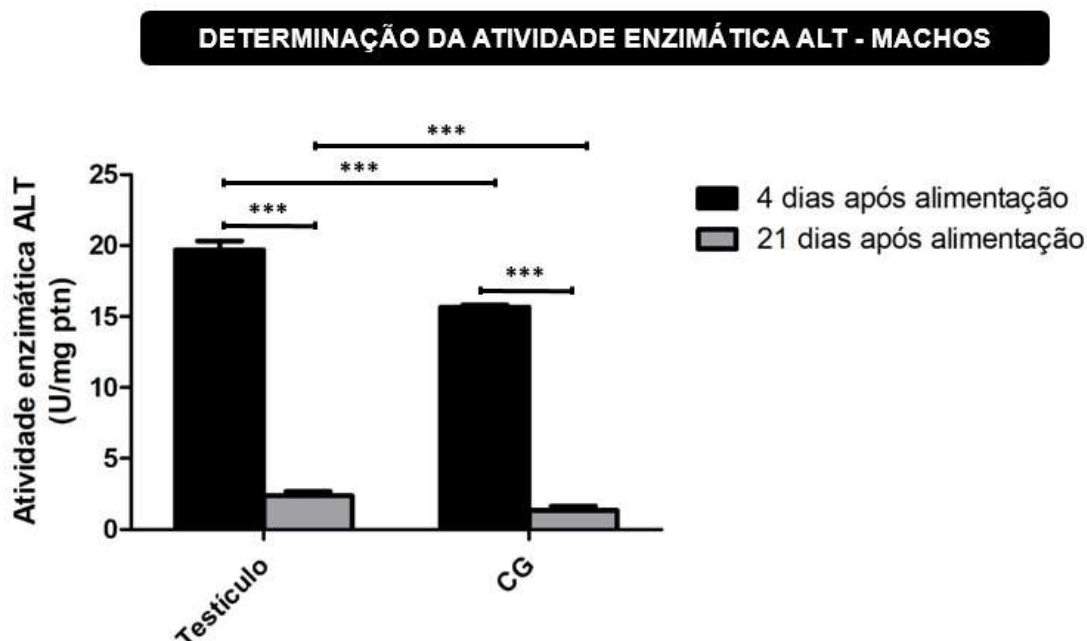


Figura 22: Diferenças na atividade enzimática de alanina aminotransferase (ALT), mediante a sua concentração (U/mg proteína) ao longo de um período de 6 minutos, entre testículo e corpo gorduroso (CG) de machos sob condições de 4 dias e 21 dias após 1ª alimentação.

As enzimas AST e ALT catalisam a transferência reversível de aminogrupos de aminoácidos a α -cetoglutarato, formando ácido glutâmico e piruvato ou oxaloacetato. Essas reações desempenham um papel central na síntese e degradação de aminoácidos e atuam como uma ponte entre metabolismo de aminoácidos e carboidratos (MOTTA, 2003).

Os resultados da AST em fêmeas como dito anteriormente, devido à presença de um grande erro observado nos gráficos, estes resultados não são fiéis ao experimento. Porém em machos pôde-se verificar um resultado satisfatório considerando estudos presente na literatura, que mostram a importância da AST no metabolismo de aminoácidos, onde é maior em dias mais próximos após o repasto sanguíneo. De modo geral, esta evidência também foi observada em relação aos resultados da ALT, tanto em machos quanto em fêmeas o mesmo padrão foi identificado. É importante ressaltar que foi verificado que o CG apresentou maior atividade dessas enzimas, mostrando dessa forma, o quão importante este órgão é no metabolismo deste inseto.

Foi demonstrado que a ALT está envolvida no metabolismo de amônia em *Aedes aegypti* alimentados com sangue (SCARAFFIA *et al.*, 2005). Estudos recentes indicam que a administração de altas doses de L -cycloserine, um inibidor bem caracterizado de ALT (CORNELL *et.al*, 1984 e WALE *et.al*, 2013 apud MAZZALUPO *et.al*, 2016), afeta a sobrevivência dos mosquitos alimentados com sangue e atividade, sugerindo uma interferência com amônia e metabolismo de carboidratos de maneira dependente do tempo (BELLONI e SCARAFFIA, 2014). ALT transfere o grupo N-amino de N-Glu em piruvato e produz N-Ala e α -cetoglutarato no corpo do mosquito. O N-Glu pode seguir diferentes rotas metabólicas, como a síntese de N-Pro, N-Gln, N-ácido úrico e outros compostos de nitrogênio para lidar com o excesso de amônia (SCARAFFIA *et al.*, 2008).

Ambos, ALT e AST são enzimas importantes que têm sido usadas para avaliar efeitos da exposição a toxinas em peixes (BRUNELLI *et al.*, 2010; DAVID *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2016). Entretanto, não se tem estudos que demonstrem o uso dessas enzimas em *R. prolixus*, visto que este inseto é hematófago, e que devido a sua dieta ser rica em proteína (hemoglobina), enzimas como AST e ALT que atuam no metabolismo de aminoácidos são alvos extremamente importantes em estudos com

insetos vetores que se alimentam de sangue. Anteriormente foi evidenciado em estudo, que o excesso de proteína ingerida é clivada, onde a porção amônia é direcionada para a formação de ureia, e a porção da cadeia de carbonos é depositada em tecidos, na forma de lipídios ou carboidratos (WEATHERLEY e GILL, 1989 apud PANETTO *et.al*, 2019). Com isso, conseguimos entender a demanda de carboidratos e outros metabólitos advindos através do metabolismo de aminoácidos em insetos hematófagos, devido a sua alimentação ser rica em proteína.

5.2 Modelagem Molecular

5.2.1 Predição de estrutura tridimensional (3D) da hexoquinase por modelagem comparativa

5.2.1.1 Busca pela sequência de aminoácidos da hexoquinase

Em virtude da abrangência do banco de dados do NCBI, foi realizada a busca da sequência de aminoácidos da hexoquinase de *R. prolixus*, obtendo-se a seguinte sequência FASTA (Figura 23):

```
putative hexokinase, partial [Rhodnius prolixus]
GenBank: JAA77341.1
GenPept Identical Proteins Graphics
>JAA77341.1 putative hexokinase, partial [Rhodnius prolixus]
IKPEIREGCKQFMIENVTLKEIMNKLLEQINLGLNHKTRAKSSVKCFNTYVQDLPTGRERGFALDLGG
TNFRILLIKLDGRHYEMQSKIYAVPASIMTGPVDFDHIASCLDNFTKEHKVSNETLPLGFTFSFPVKQ
EGLKKGVLSWTKGFSCGEGVGGQDVVEMLKVACERKMKSRISIVALLNDTTGTLMSCAWKNHNCKIGLIL
GTGTNACYMEKIDNIEEFDGDHTKPYVLIINTEWGAFGDHGELEFITTSYDKEIDQKSVNPGKQRHEKMIS
GMYLGELVRLVLKFAQDRLLFDGKTSELLKTRDNFRTEYVSNIESDKRGSFKNCKNVLEKLGIVGSDQ
DCANVRYICECVTRRAAHLASAGVATLINKMNVESVTGVGDGTLYRKHPYFHDLIDKILDLISPNVKGV
YMMLSTDGSGRGAALIAAAAAGKESTRR
```

Figura 23: Sequência FASTA da hexoquinase parcial de *R. Prolixus*, disponível no NCBI.

5.2.1.2 Busca por um molde para a construção do modelo

Encontrada a sequência de aminoácidos da hexoquinase em questão, foi iniciada a busca por uma sequência similar com a estrutura experimental obtida por difração de raios X de cristais já resolvida, para ser utilizada como molde para a construção do modelo da hexoquinase de *R. Prolixus* (*Rhpr*).

No servidor *Swiss Model* foi realizada uma busca mediante a sequência FASTA de aminoácidos obtida da hexoquinase – *Rhpr* de proteínas listadas conforme a similaridade. Este servidor identificou 50 possíveis moldes para a construção da hexoquinase - *Rhpr*. O objetivo desta busca foi encontrar proteínas que apresentassem maior porcentagem de identidade e maior resolução de cristalização.

A cobertura, identidade e resolução de cristalização foram utilizadas como critérios para a escolha da proteína molde mais viável que seria utilizada para a construção do modelo tridimensional da hexoquinase – *Rhpr*. A cobertura se refere à porção da proteína que será utilizada para a construção do modelo e a identidade refere-se à semelhança entre a sequência do molde com a sequência do futuro modelo e a resolução se refere à qualidade da estrutura obtida pelo método de difração de raios X.

A literatura acerca da modelagem comparativa sugere que um molde adequado deve ter pelo menos 30% de identidade com a proteína modelo a ser construída (KHAN *et al.*, 2016), e a resolução de cristalização deve ser abaixo de 3,0 Å. Desse modo, dentre os possíveis moldes fornecidos pelo Servidor *Swiss Model*, foi selecionada a proteína Hexoquinase I humana ligada a Manose 6-Fosfato (M6D), código no PDB: 4foe.1B, que apresentou melhores parâmetros de cobertura (0.98), identidade (45,79%) e resolução de cristalização (2,7 Å), para a construção do modelo.

5.2.1.3 Construção do Modelo

Ainda no servidor online *Swiss Model*, foi realizada a construção do modelo através do molde escolhido no alinhamento, conforme descrito no tópico anterior. Mediante o resultado da construção do modelo por meio do molde 4foe.1B, foi obtido o modelo de hexoquinase – *Rhpr*, apresentando GMQE de 0,77 e QMEAN de -1,41.

O GMQE (*Global Model Quality Estimation*) é uma estimativa de qualidade que combina propriedades do alinhamento de modelo de destino e o método de pesquisa de modelo. A pontuação resultante do GMQE é expressa como um número entre 0 e 1, refletindo a precisão esperada de um modelo construído com esse alinhamento e modelo e a cobertura do alvo. Números mais altos indicam maior confiabilidade. Uma vez que um modelo é construído, o GMQE é atualizado para este caso específico, considerando também a pontuação QMEAN do modelo obtido, a fim de aumentar a confiabilidade da estimativa de qualidade (WATERHOUSE *et al.*, 2018).

O QMEAN é um estimador composto baseado em diferentes propriedades geométricas e fornece estimativas de qualidade absoluta globais (para toda estrutura) e locais (por resíduo) com base em um único modelo. O score Z do QMEAN fornece uma estimativa do "grau de natalidade" das características estruturais observadas no modelo em escala global. Indica se a pontuação QMEAN do modelo é comparável ao que se esperaria de estruturas experimentais de tamanho similar. Os score-z do QMEAN em torno de zero indica boa concordância entre a estrutura do modelo e estruturas experimentais de tamanho similar (BENKERT *et al.*, 2011; BENKERT *et al.*, 2009; BENKERT *et al.*, 2008). Pontuações de -4.0 ou abaixo são uma indicação de modelos com baixa qualidade.

Diante dos valores de GMQE e QMEAN, respectivamente 0,77 e -1,41, apresentado no modelo construído neste trabalho, o mesmo apresenta uma boa qualidade.

5.2.1.4 Visualização das estruturas do molde e modelo

O PyMOL é um programa de visualização molecular de código aberto, disponível para uso em biologia estrutural. Neste programa, as estruturas do 4foe.1B (molde) e hexoquinase – *Rhpr* (modelo) foram abertas, de modo a verificar se elas apresentavam uma boa similaridade em 3D. Para isso, as estruturas foram sobrepostas utilizando o comando *align* e o Desvio Médio da Raiz Quadrada foi calculado (RMSD), obtendo-se o valor de RMSD= 0,076 Å, demonstrando assim que as duas estruturas são muito semelhantes (Figura 24).

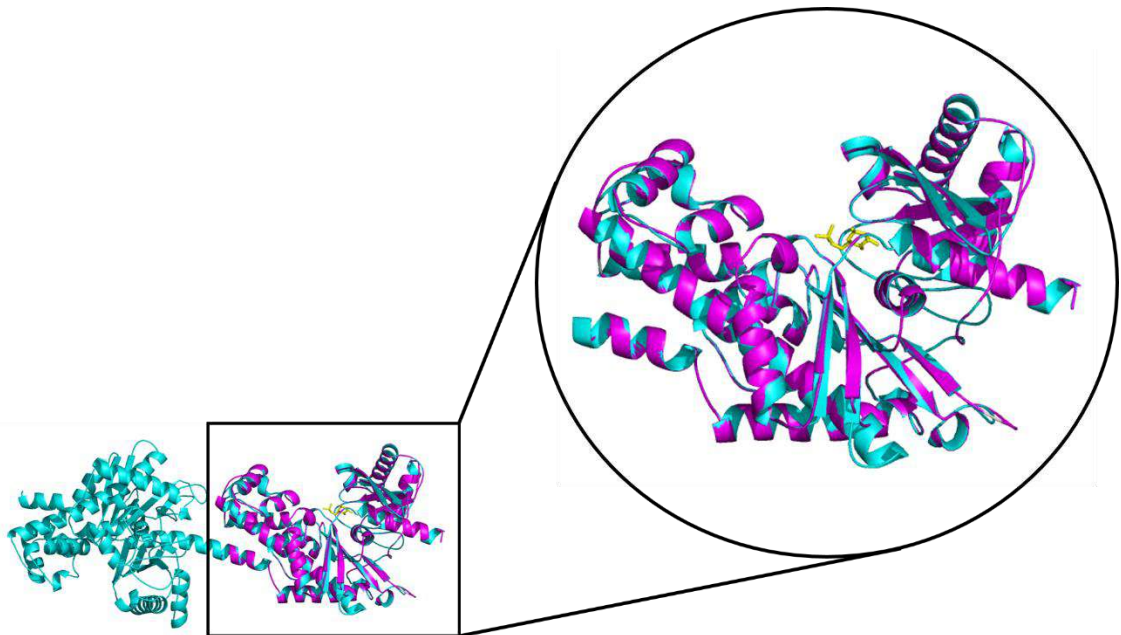


Figura 24: Sobreposição da Hexoquinase – *Rhpr* (modelo - magenta) com 4foe.1B (molde-ciano) ligados ao M6D - ligante (amarelo).

5.2.1.5 Validação do modelo e comparação com o molde

Para validar o modelo construído foi utilizado o método que avalia a qualidade global do modelo (Figura 25) e da qualidade local (Figura 26) por meio do servidor *ProSA-web*. A energia global das proteínas está relacionada ao *score-Z*, apresentando um valor de -13,7 para o modelo e -10,28 para o molde. Pode-se verificar que os valores do molde e o modelo estão dentre os valores de *score-Z* das proteínas de tamanhos similares depositadas no PDB. Em relação à análise da qualidade local das estruturas, o molde e o modelo não apresentaram nenhum resíduo de aminoácido com valor acima de 0. Desse modo, a partir desses resultados o modelo possui qualidade e confiabilidade para que possa ser dado prosseguimento aos estudos.

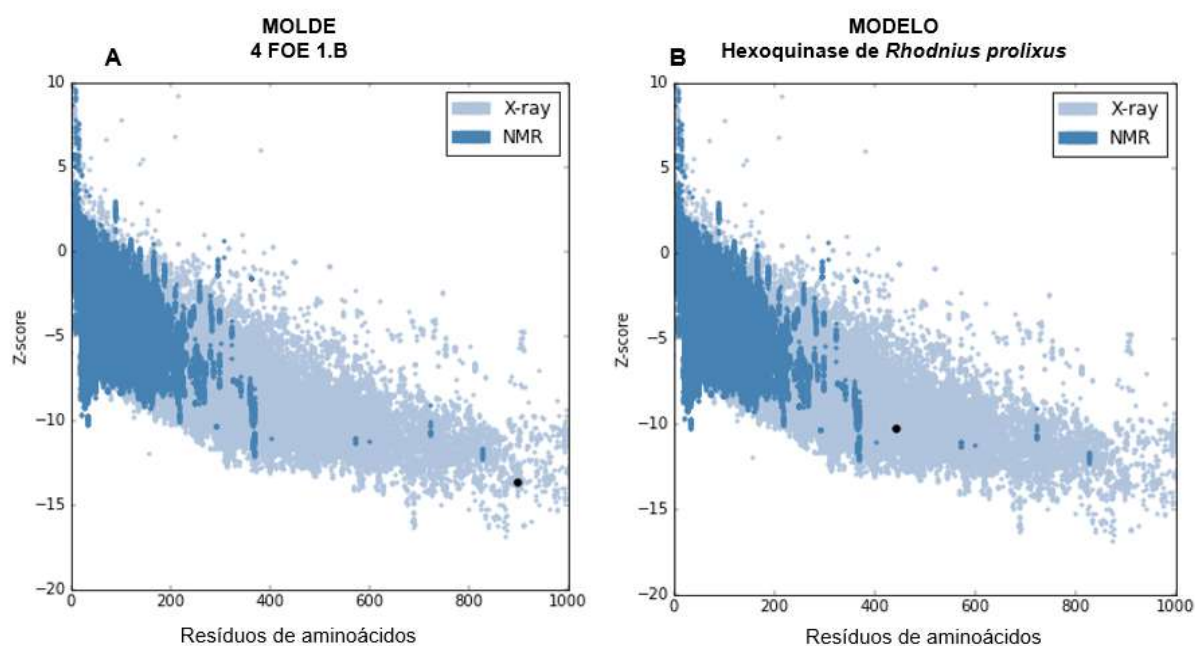


Figura 25: Gráfico representando valor de *score-Z* calculado no ProSA-Web para o modelo (Hexoquinase – *Rhpr*) (A) e o molde (4foe.1B) (B).

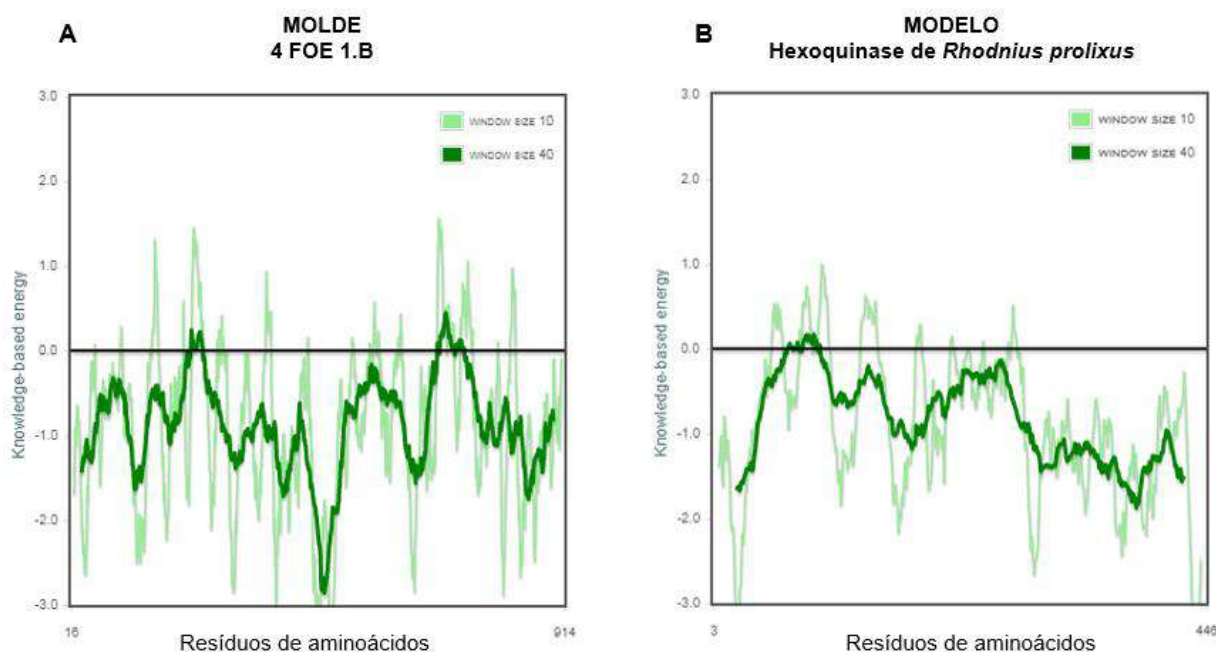


Figura 26: Gráfico da energia local dos resíduos calculado no ProSA-Web para o modelo (Hexoquinase – *Rhpr*) (A) e para o molde (4foe.1B)(B). Regiões verde-claro representando

energia local de cada resíduo único e regiões verde-escuro representado a energia local suavizada atribuída a um átomo central com base em cada fragmento de 40 resíduos de aminoácidos.

Outro método de validação utilizado foi o gráfico de Ramachandran, no qual são definidos os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis, orientando a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas. O servidor *Rampage* (LOVELL *et al.*, 2003) utilizado nesta segunda etapa de validação avalia os comprimentos de ligação, os ângulos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torsionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do gráfico de Ramachandran (RAMAKRISHNAN and RAMACHANDRAN, 1965 apud SARKAR e SEN, 2019).

Utilizando o servidor *Rampage* (Figura 27), observou-se através dos gráficos que o modelo apresentou 94,6% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis e apenas 1,1% dos resíduos em regiões desfavoráveis. Comparando-se com o molde, este apresentou 96,1% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis e nenhum resíduo em regiões desfavoráveis (Tabela 1).

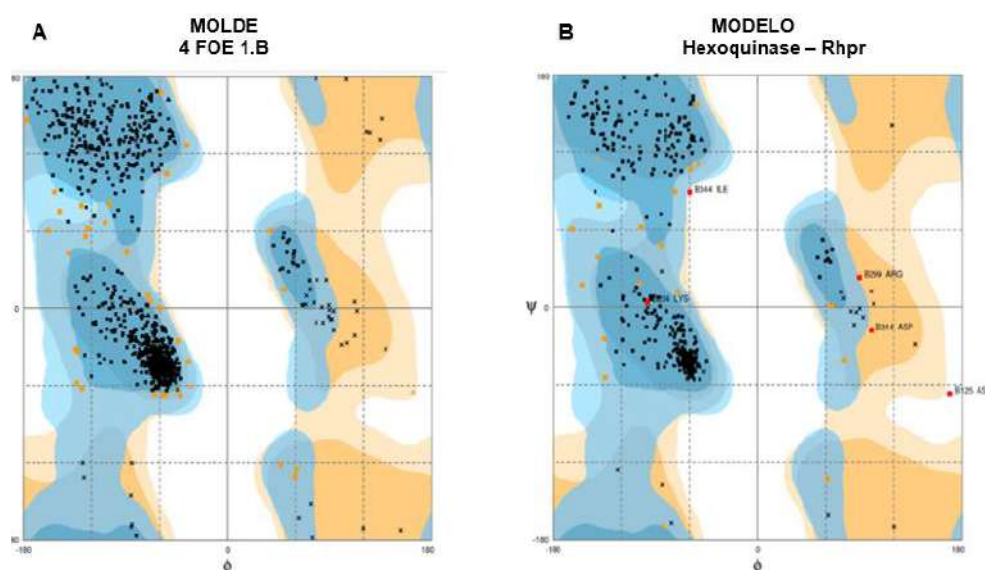


Figura 27: Gráfico de Ramachandran do molde (A) e do modelo (B) obtidos pelo servidor *Rampage*.

Tabela 1: Dados do percentual de resíduos de aminoácidos em cada região do gráfico de Ramachandran.

ESTRUTURA	REGIÕES FAVORÁVEIS	REGIÕES PERMITIDAS	REGIÕES DESFAVORÁVEIS
Molde	96,1 %	3,9 %	0,0 %
Modelo	94,6 %	4,3 %	1,1 %

O modelo apresentou 5 resíduos de aminoácidos presentes em regiões desfavoráveis (Figura 28), sendo eles: Lys234B, Ile344 B, Arg299 B, Asp314 B, Asn125 B. Entretanto, para os cálculos de *docking* os resíduos presentes nessas regiões não irá interferir no resultado, mas esse modelo é inicial, podendo futuramente ser refinado.

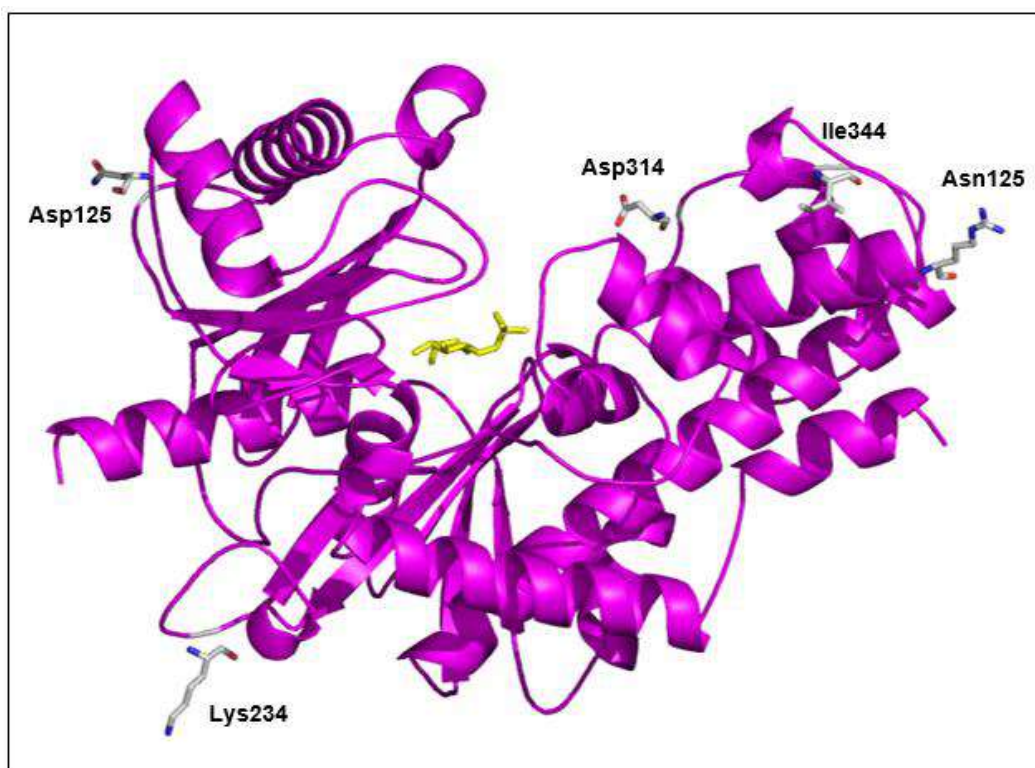


Figura 28: Modelo (magenta) ligado ao M6D (amarelo) e os respectivos aminoácidos presentes nas regiões desfavoráveis de acordo com o gráfico de Ramachandran.

De acordo com os parâmetros acima apresentados, através dos resultados das validações, o modelo da hexoquinase – *Rhpr* apresentou uma boa qualidade estereoquímica.

5.2.2 Estudo de *docking* molecular

5.2.2.1 Validação do estudo de *docking*: redocking

O processo de *redocking* realizado no programa Gold 5.6 é a etapa de validação da metodologia de *docking*, onde se verifica a qualidade das poses obtidas de uma determinada molécula. Esta validação consiste na verificação dos valores de RMSD entre as poses do ligante co-cristalizado com a enzima obtidas por diferentes funções (ChemPLP, ChemScore e GoldScore) e raios de busca (10, 15 e 20Å), partindo a busca do átomo de oxigênio 523, do resíduo de aminoácido Asp67 da estrutura de hexoquinase - *Rhpr*. São considerados satisfatórios os valores de RMSD inferiores a 1,5Å (HEVENER *et al.*, 2009). Na tabela 2, é possível verificar os valores de RMSD em suas respectivas funções e raios.

Tabela 2: Resultado do *redocking* molecular utilizando as funções de *score* do programa Gold e o valor do RMSD para cada sobreposição da pose do ligante obtida.

Hexoquinase – <i>Rhpr</i> Asp67 (O 523)		
FUNÇÃO	RAIO (Å)	RMSD (Å)
ChemPLP	10	3,8
	15	5,5
	20	4,6
ChemScore	10	2,9
	15	2,7
	20	2,6
GoldScore	10	4,2
	15	0,4
	20	0,3

Diante das poses previstas no *redocking* a função GoldScore no raio de 20Å (destacada na Tabela 2) apresentou menor valor de RMSD. Portanto, esta pose da M6D co-cristalizada com a hexoquinase – Rhpr apresentou maior similaridade com a pose da M6D da cristalização original (Figura 29). Os parâmetros determinados no *redocking* foram utilizados para a realização da próxima etapa do estudo de *docking* molecular.

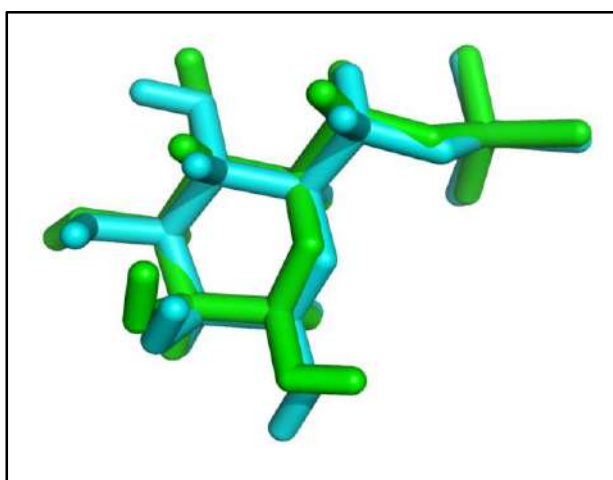


Figura 29: Sobreposição entre a pose de ligação experimental do M6D (ciano) e melhor pose obtida por *redocking* (verde).

Na inspeção visual, observa-se na tabela 3, os tipos de interações presentes entre os aminoácidos do sítio alvo da proteína com seu ligante M6D co-cristalizado com a proteína original e, na tabela 4, os átomos envolvidos.

Partindo para a análise criteriosa do resultado de estudo do *redocking*, foi possível observar (Figura 30) que a proteína construída interage com o ligante M6D co-cristalizado com o molde utilizado para construção deste modelo, mediante as interações detalhadas abaixo, na qual as ligações de hidrogênio estão caracterizadas por um átomo doador e um átomo receptor de ligação de hidrogênio:

Tabela 3: Tipos de interações verificadas após o *redocking* entre os aminoácidos do sítio alvo da hexoquinase – *Rhpr* com o ligante M6D.

INTERAÇÕES INTERMOLECULARES GERAIS ENTRE HEXOQUINASE – <i>Rhpr</i> e	
HEXOQUINASE - <i>Rhpr</i>	Ligante M6D
Asp67	Ligação de hidrogênio
Thr71	Ligação de hidrogênio
Asn72	Van der Waals
Thr133	Van der Waals
Asp189	Ligação de hidrogênio
Thr193	Van der Waals
Ile209	Van der Waals
Thr212	Ligação de hidrogênio
Asp391	Ligação de hidrogênio
Thr393	Ligação de hidrogênio
Leu 394	Van der Waals
Ser429	Ligação de hidrogênio

Tabela 4: Interações entre a hexoquinase de *Rhpr* e o M6D.

INTERAÇÕES ENTRE A HEXOQUINASE DE <i>Rhpr</i> E M6D	
Resíduo da hexoquinase de <i>rhpr</i>	M6D
Nitrogênio (doador) da cadeia principal do resíduo Thr71	Oxigênio 1 (receptor) da porção fosfato
Oxigênio gama 1 (doador) da cadeia lateral do resíduo Thr71	Oxigênio 1 (receptor) da porção fosfato
Nitrogênio (doador) da cadeia principal do resíduo Thr212	Oxigênio 3 (receptor) da porção fosfato

Oxigênio gama 1 (doador) da cadeia lateral do resíduo Thr212	Oxigênio 3 (receptor) da porção fosfato
Nitrogênio (doador) da cadeia principal do resíduo Thr393	Oxigênio 2 (receptor) da porção fosfato
Oxigênio gama 1 (doador) da cadeia lateral do resíduo Thr393	Oxigênio 2 (receptor) da porção fosfato
Nitrogênio (doador) da cadeia principal do resíduo Ser429	Oxigênio 2 (receptor)
Oxigênio gama (doador) da cadeia lateral do resíduo Ser429	Oxigênio 3 (receptor)
Oxigênio delta 1 do resíduo Asp391	Hidrogênio 3518 (doador)
Oxigênio delta 1 do resíduo Asp67	Hidrogênio 3520 (doador)
Oxigênio delta 2 do resíduo Asp189	Hidrogênio 3521 (doador)

Obs.: Os resíduos Asn72, Thr133, Thr193, Ile209 e Leu 394 fazem interação de Van der Waals com o ligante M6D.

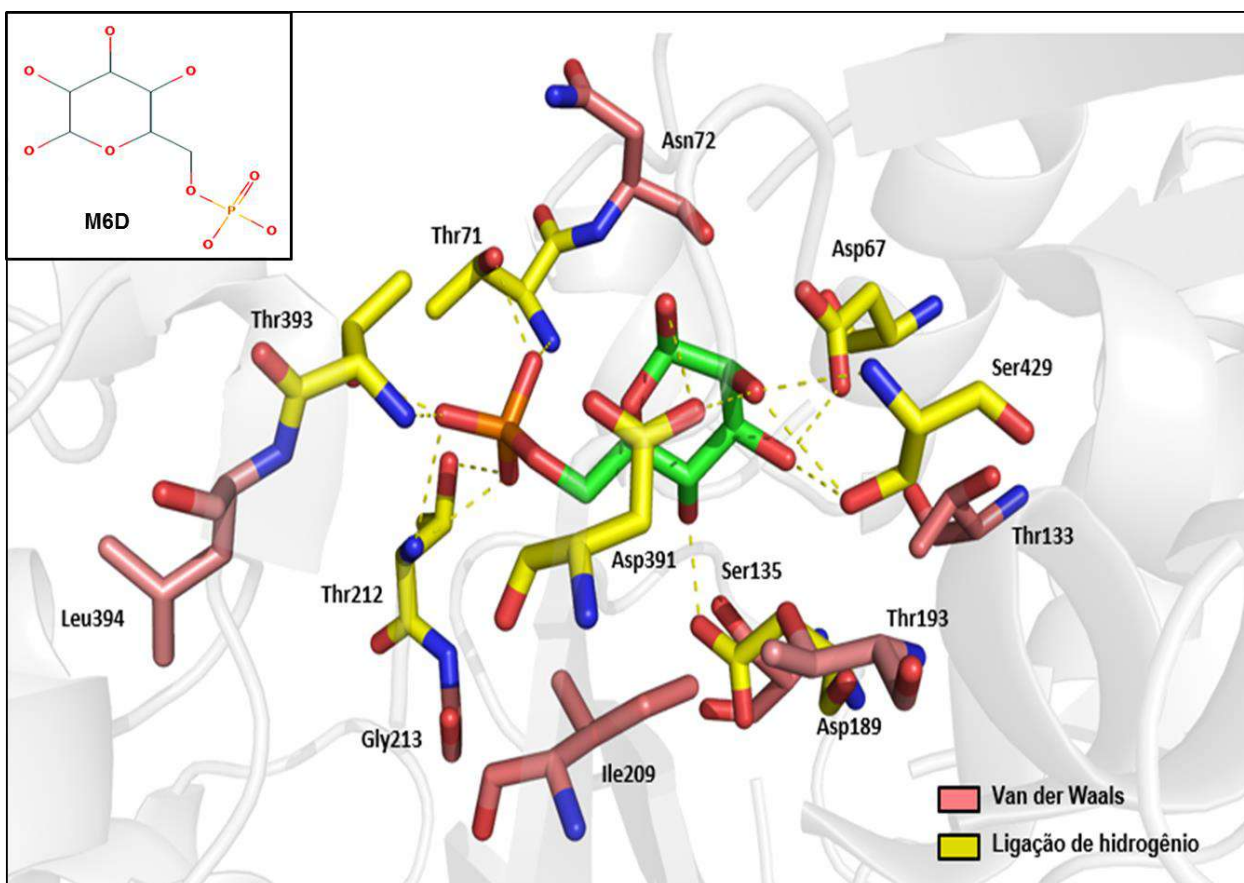


Figura 30: Interações entre hexoquinase – *Rhpr* e o ligante M6D de melhor posição obtida no *redocking*, ilustrando as tabelas 3 e 4.

5.2.2.2. *Docking*: Proteína e glifosato

Herbicidas à base de glifosato (*N*-[fosfonometil] glicina) são caracteristicamente complexas misturas com glifosato como ingrediente ativo e são amplamente utilizados para o controle de plantas. Suas formulações são utilizadas na agricultura como herbicidas para plantas daninhas pós-emergentes em diversas culturas (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

Em trabalho descrito na literatura foram investigados os efeitos do Roundup® (composto organofosforado glifosato) no metabolismo energético durante a embriogênese do zebrafish (*Danio rerio*). O teste de toxicidade embrionária foi realizado por 96 horas após a fertilização e a concentração subletal do Roundup® foi definida como 58,3 mg / L, o que resultou na falha em inflar a bexiga natatória. A atividade da hexoquinase foi significativamente alterada após a exposição a 11,7 mg/L de Roundup® (PANETTO *et al.*, 2019). Diante desta evidência o glifosato foi escolhido para ser utilizado nos estudos de *docking* com a hexoquinase de *R. prolixus*, uma vez que esta substância, interfere na atividade desta enzima.

Na análise do *docking*, seguindo o mesmo raciocínio do *redocking*, mediante a inspeção visual, observa-se na tabela 5, os tipos de interações presentes entre os aminoácidos do sítio alvo da proteína com o ligante glifosato e, na tabela 6, os átomos envolvidos. A Figura 28, mostra de forma ilustrativa as interações realizadas entre os aminoácidos e o ligante.

Tabela 5: Tipos de interações verificadas após o *docking* entre aminoácidos do sítio alvo da hexoquinase – *Rhpr* com o ligante glifosato.

INTERAÇÕES INTRAMOLECULARES GERAIS ENTRE HEXOQUINASE – <i>Rhpr</i> e Glifosato	
HEXOQUINASE – <i>Rhpr</i>	Ligante glifosato
Asp67	Ligação de hidrogênio

Gly70	Van der Waals
Thr71	Ligação de hidrogênio
Asn72	Ligação de hidrogênio
Phe73	Van der Waals
Arg74	Ligação de hidrogênio
Gly128	Van der Waals
Thr133	Van der Waals
Ser135	Ligação de hidrogênio
Asp189	Van der Waals
Ser429	Ligação de hidrogênio

Assim como no *redocking*, partindo para a análise criteriosa do resultado de *docking*, foi possível observar (Figura 31) que o a proteína construída interage com o ligante glifosato, mediante as interações seguintes abaixo, na qual as ligações de hidrogênio estão caracterizadas por um átomo doador e um átomo receptor de ligação de hidrogênio:

Tabela 6: Interações entre a hexoquinase de Rhpr e o glifosato.

INTERAÇÕES ENTRE A HEXOQUINASE DE Rhpr E O GLIFOSATO	
Resíduo da hexoquinase de rhpr	Glifosato
Nitrogênio (doador) da cadeia principal do resíduo Thr71	Oxigênio da porção fosfato
Nitrogênio (doador) da cadeia principal do resíduo Asn72	Oxigênio da (acceptor) da porção fosfato
N epsilon (doador) da cadeia lateral do resíduo Arg74	Oxigênio (receptor) da porção fosfato
Amina (doador) da cadeia lateral do resíduo Arg74	Oxigênio (receptor) da porção fosfato

Oxigênio gama (doador) da cadeia lateral do resíduo Ser135	Oxigênio (receptor) da porção ácida
Oxigênio gama (doador) da cadeia lateral do resíduo Ser429	Oxigênio da porção ácida
Oxigênio delta da cadeia lateral da Asp67 (receptor)	Hidrogênio da amina central
Oxigênio (receptor) da cadeia principal do resíduo Asn72	Hidrogênio da porção fosfato

Obs.: Os resíduos, Gly70, Phe73, Gly128, Thr133 e Asp189 fazem interação de Van der Waals com o ligante glifosato.

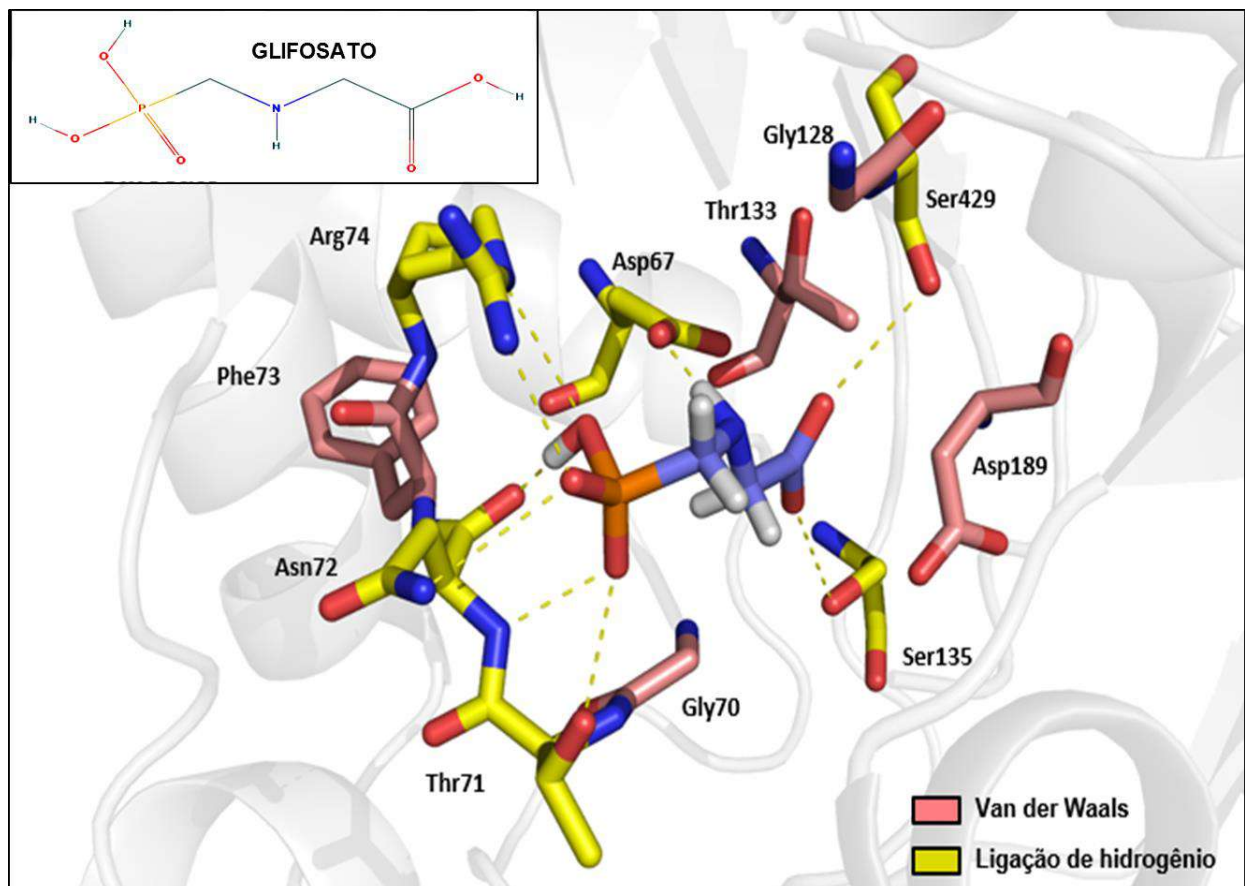


Figura 31: Interações entre hexoquinase – *Rhpr* e o ligante glifosato de melhor posição obtida no estudo de *docking*, ilustrando as tabelas 5 e 6.

Foi verificado no resultado de *docking* da proteína construída e o glifosato, a presença de uma interação não favorável (Figura 32), circulado em amarelo. Pode-se verificar que existe uma interação entre o oxigênio (vermelho) da cadeia lateral do resíduo Asp67 com o oxigênio (vermelho) da porção fosfato (laranja) do ligante glifosato. Entretanto, como o *docking* realizado não levou em consideração a flexibilidade conformacional da proteína, é possível que, na dinâmica real da interação, essa interação não ocorra ou, até, seja intermediada por moléculas de solvente. Além disso, caso um dos átomos de oxigênio do Asp67 esteja protonado, haveria então a realização de uma interação favorável, por ligação de hidrogênio.

Desse modo, neste primeiro momento de estudo da estrutura da hexoquinase – Rhpr, a presença dessa interação desfavorável não limita os resultados que se desejou alcançar, porém, em estudos futuros é importante que seja considerada a flexibilidade conformacional da proteína também, para se obtenha rearranjos conformacionais mais estáveis, com presença de ligações favoráveis.

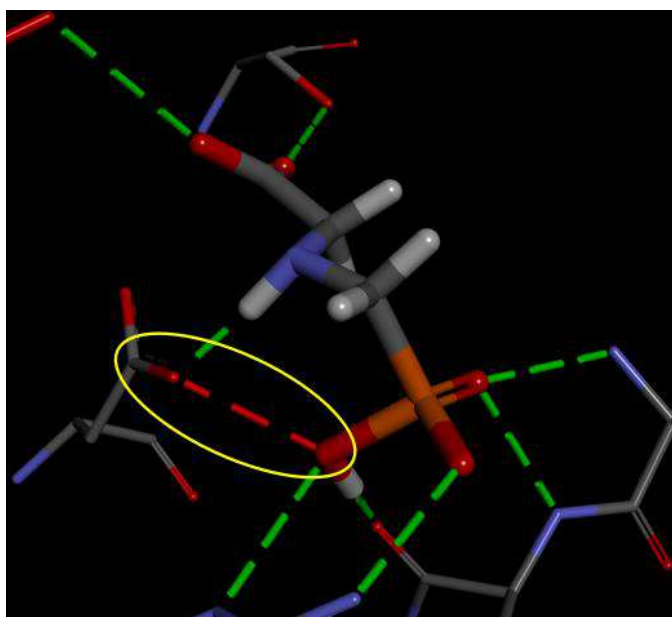


Figura 32: Interação desfavorável entre oxigênio (acceptor) do resíduo de aminoácido Asp 67 da proteína e amina (acceptor) do ligante glifosato.

5.2.2.3 Avaliação das interações entre dos ligantes M6D e Glifosato com hexoquinase – *Rhpr*:

A maioria das interações observadas entre a enzima e o glifosato foram bem conservadas comparada ao ligante M6D. As interações por ligação de hidrogênio envolvendo os resíduos de aminoácidos Thr71, Asp67, Ser429 e Ser135 aparentam ser importantes, assim como as interações por ligação de hidrogênio do grupo fosfato do M6D com os resíduos de aminoácidos Thr71, Thr393, Thr212 da proteína; e do grupo fosfato do ligante glifosato com os resíduos de aminoácidos Arg74, Asn72, Thr71 da proteína. Finalmente, as interações de Van der Waals com o resíduo Thr133 também se mantiveram.

É importante mencionar que houve outros resíduos de aminoácidos que também mantiveram as interações, porém trocadas, ou seja, a Asp189 com o ligante M6D apresentou interação por ligação de hidrogênio, já com o ligante glifosato apresentou interação de Van der Waals. Este fato também ocorreu para o resíduo de aminoácido Asn72, apresentando interação por ligação de hidrogênio com o ligante glifosato, e interação de Van der Waals com o ligante M6D.

Mediante os resultados observados na modelagem molecular, pôde-se prever computacionalmente que o glifosato é capaz de se ligar a resíduos do sítio ativo da hexoquinase-*Rhpr*, por apresentar vários grupos polares, promovendo as interações entre a enzima e o ligante.

6. CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado, propõe-se um avanço no conhecimento acerca do metabolismo energético de *R. prolixus*, mediante os resultados encontrados, onde foi possível responder a perguntas que correlacionam a alimentação com a demanda de proteínas totais, glicose, glicogênio, triglicerídeos, atividade enzimáticas da aspartato e alanina aminotransferases; através do comportamento de alguns metabólitos em órgãos como ovário, testículo e corpo gorduroso de fêmeas e machos.

De acordo com os resultados foi verificado que comparando duas condições de alimentação, os insetos analisados em 4 dias após a alimentação apresentaram maior quantidade de metabólitos, que foi visualmente superior em ovários do que em corpo

gorduroso de fêmeas, mostrando que este órgão acondiciona uma maior quantidade de metabólitos, onde supostamente estarão envolvidos na maturação e desenvolvimento dos ovos. Em machos, os metabólitos alguns metabólitos estiverem mais presentes em testículo, como proteínas totais e glicose, sendo este órgão também muito importante para a perpetuação da espécie. Um fato interessante observado, foi em relação ao acúmulo de glicose em machos, onde não foi verificado o mesmo em fêmeas.

Com a modelagem molecular foi possível realizar a construção de um modelo tridimensional da hexoquinase de *Rhodnius prolixus*, que ainda não foi descrito na literatura. O mesmo apresentou boa qualidade estereoquímica, podendo auxiliar futuramente na busca por inibidores específicos, a partir do conhecimento adquirido neste trabalho sobre a predição das interações que ocorrem entre os resíduos de aminoácidos da hexoquinase – *Rhpr* e o inibidor glifosato. Diante disso, foi possível cumprir com o objetivo deste trabalho, onde foi realizado o mapeamento das interações que ocorrem entre a hexoquinase – *Rhpr* e um ligante conhecido, identificando o sítio alvo da enzima e os átomos presentes nessa interação, para que se possa conhecer melhor esta proteína tão importante nesse inseto.

Ademais, estudos das características estruturais de enzimas envolvidas no metabolismo de nutrientes deste inseto abrirão novas perspectivas para o planejamento racional e descoberta de novas moléculas que possam ser utilizadas futuramente no controle de *R. prolixus* e conseqüentemente da Doença de Chagas.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH, F.; PAVAN, M. G.; JARAMILLO, O. N.; PALOMEQUE, F. S.; DALE, C.; CHAVERRA, D.; MONTEIRO, F. A. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 108 Suppl 1, p. 92-99, 2013.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, 215, n. 3, p. 403-410, Oct 5 1990.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. d.; SANTOS, T. C. R. d.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, 25, p. 589-593, 2002.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu Rev Entomol**, 55, p. 207-225, 2010.
- ATELLA, G. C.; GONDIM, K. C.; MACHADO, E. A.; MEDEIROS, M. N.; SILVA-NETO, M. A.; MASUDA, H. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. **An Acad Bras Cienc**, 77, n. 3, p. 405-430, Sep 2005.
- ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. **Cell Mol Life Sci**, 63, n. 12, p. 1355-1369, Jun 2006.
- BARROS MP, BECHARA EJH. **Photochem Photobiol** 71: 648 - 654, 2000.
- BEENAKKERS, A. M. T.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. A. Insect flight muscle metabolism. **Insect Biochemistry**, 14, n. 3, p. 243-260, 1984/01/01/ 1984.
- BELLONI, V.; SCARAFFIA, P. Y. Exposure to L-cycloserine incurs survival costs and behavioral alterations in *Aedes aegypti* females. **Parasit Vectors**, 7, p. 373, Aug 16 2014.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, 27, n. 3, p. 343-350, Feb 1 2011.
- BENKERT, P.; KUNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Res**, 37, n. Web Server issue, p. W510-514, Jul 2009.
- BENKERT, P.; TOSATTO, S. C.; SCHOMBURG, D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins**, 71, n. 1, p. 261-277, Apr 2008.
- BERG, JEREMY M., JOHN L. TYMOCZSKO; LUBERT STRYER. "Glycolysis Is an Energy Conversion Pathway in Many Organisms." **In Biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2002.
- BIOVIA, D. S. Discovery Studio Modeling Environment. **San Diego: Dassault Systèmes**, 2017.
- BASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. COORDENAÇÃO-GERAL DE DESENVOLVIMENTO DA EPIDEMIOLOGIA EM, S. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3. v.3, p. 477-751, 2017/00 2017.
- BRAZ, V.; GOMES, H.; GALINA, A.; SARAMAGO, L.; BRAZ, G.; DA SILVA VAZ, I., Jr.; LOGULLO, C.; DA FONSECA, R. N.; CAMPOS, E.; MORAES, J. Inhibition of energy metabolism by 3-bromopyruvate in the hard tick *Rhipicephalus microplus*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 218, p. 55-61, Apr 2019.



BRIEGEL, H.; GUT, T.; LEA, A. O. Sequential deposition of yolk components during oogenesis in an insect, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J Insect Physiol**, 49, n. 3, p. 249-260, Mar 2003.

BRINGEL, B. A.; JACOB, J.; ZIMMERMAN, M.; ALVARENGA, M.; DOUGLAS, R. H. Biorelease progesterone LA 150 and its application to overcome effects of premature luteolysis on progesterone levels in mares. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, 27, p. 498-500, 01/01 2003.

BROOKS, G. T. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology: Edited by G. A. Kerkut and L. I. Gilbert. Pergamon Press, Oxford. 1985. 13 Volumes. 8200 pp approx. £1700.00/\$2750.00. ISBN 0 08 026850 1. **Insect Biochemistry**, 15, n. 5, p. i-xiv, 1985/01/01/ 1985.

BROWN, M. R.; CLARK, K. D.; GULIA, M.; ZHAO, Z.; GARCZYNSKI, S. F.; CRIM, J. W.; SUDERMAN, R. J.; STRAND, M. R. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 15, p. 5716-5721, Apr 15 2008.

BRUNELLI, E.; BERNABO, I.; SPERONE, E.; TRIPEPI, S. Gill alterations as biomarkers of chronic exposure to endosulfan in *Bufo bufo* tadpoles. **Histol Histopathol**, 25, n. 12, p. 1519-1529, Dec 2010.

BUXTON, P. A. THE BIOLOGY OF A BLOOD-SUCKING BUG, *RHODNIUS PROLIXUS*. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, 78, n. 2, p. 227-256, 1930/12/01 1930.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. FAT METABOLISM IN INSECTS. **Annual Review of Nutrition**, 21, n. 1, p. 23-46, 2001/07/01 2001.

CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discov Today**, 14, n. 13-14, p. 676-683, Jul 2009.

CDC. **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)**. February 11, 2019 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html>. Acesso em: 10 de Março.

CERQUEIRA, N. M.; GESTO, D.; OLIVEIRA, E. F.; SANTOS-MARTINS, D.; BRAS, N. F.; SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery. **Arch Biochem Biophys**, 582, p. 56-67, Sep 15 2015.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1, p. 159-218, 1909.

CHIANG, R. G.; CHIANG, J. A.; HOOGENDOORN, H.; LIMA, M. M. Exploring the Role of Rhodtestolin, A Cardio-Inhibitor from the Testes of *Rhodnius prolixus*, in Relation to the Structure and Function of Reproductive Organs in Insect Vectors of Chagas Disease. **Insects**, 4, n. 4, p. 593-608, Oct 30 2013.

CHIPPENDALE, G. M. 1 - The Functions of Carbohydrates in Insect Life Processes. *In*: ROCKSTEIN, M. (Ed.). **Biochemistry of Insects**: Academic Press, 1978. p. 1-55.

CORNELL, N. W.; ZUURENDONK, P. F.; KERICH, M. J.; STRAIGHT, C. B. Selective inhibition of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in rat hepatocytes. **Biochem J**, 220, n. 3, p. 707-716, Jun 15 1984.

DAVEY, K. Spermatophore production in. 1959.



DAVID, M.; MUSHIGERI, S. B.; SHIVAKUMAR, R.; PHILIP, G. H. Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. **Chemosphere**, 56, n. 4, p. 347-352, Jul 2004.

DE LOOF, A. Ecdysteroids: the overlooked sex steroids of insects? Males: the black box. **Insect Science**, 13, n. 5, p. 325-338, 2006/10/01 2006.

DOWNER, R.; MATTHEWS, J. Patterns of lipid distribution and utilisation in insects. **American Zoologist**, 16, n. 4, p. 733-745, 1976.

DUMSER, J. B. In vitro effects of ecdysterone on the spermatogonial cell cycle in *Locusta*. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, 2, n. 3, p. 165-174, 1980/01/01 1980.

DUMSER, J. B. The Regulation of Spermatogenesis in Insects. **Annual Review of Entomology**, 25, n. 1, p. 341-369, 1980/01/01 1980.

ENGELS, W.; DRESCHER, W. [Incorporation of H3d-glucose during oogenesis in *Apis mellifica* L]. **Experientia**, 20, n. 8, p. 445-447, Aug 15 1964.

EVANTHIA, L.; GEORGE, S.; DEMETRIOS, K. V.; ZOE, C. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 14, n. 16, p. 1923-1938, 2014.

EWEAS, A. Advances in molecular modeling and docking as a tool for modern drug discovery. **Der Pharma Chemica**, 6, p. 211-228, 12/30 2014.

FAGOTTO, F. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. **Arch Insect Biochem Physiol**, 14, n. 4, p. 217-235, 1990.

FARNER, D. S.; LEDERIS, K. **Neurosecretion: molecules, cells, systems**. Plenum Publishing Corporation, 1981. 0306407604.

FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, 20, n. 7, p. 13384-13421, Jul 22 2015.

FIOCRUZ. Doença de Chagas. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>.

FLOUDAS, C. A.; FUNG, H. K.; MCALLISTER, S. R.; MÖNNIGMANN, M.; RAJGARIA, R. Advances in protein structure prediction and de novo protein design: A review. **Chemical Engineering Science**, 61, n. 3, p. 966-988, 2006/02/01/ 2006.

FRIEND, W. G. The Gorging Response in *Rhodnius Prolixus* Stahl. **Can J Zool**, 43, p. 125-132, Jan 1965.

GELMAN, D. B.; WOODS, C. W.; LOEB, M. J.; BORKOVEC, A. B. Ecdysteroid synthesis by testes of 5th instars and pupae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner). **Invertebrate Reproduction & Development**, 15, n. 3, p. 177-184, 1989/08/01 1989.

GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2005. 044451516X 9780444515162 0444515216 9780444515216 0444515224 9780444515223 0444515232 9780444515230 0444515240 9780444515247 0444515259 9780444515254 0444515267 9780444515261 0444516468 9780444516466.



GILMOUR, D. *Insect Biochemistry and Function*: D. J. Candy and B. A. Kilby (Eds). Chapman and Hall, London. 1975. **Australian Journal of Entomology**, 17, n. 4, p. 372-372, 1978/12/01 1978.

GOLDSTROHM, D. A.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the mosquito *Aedes aegypti*. **J Insect Physiol**, 49, n. 2, p. 115-121, Feb 2003.

GRACA-SOUZA AV, PETRETSKI JH, DEMASI M, BECHARA EJH, OLIVEIRA PL. **Radical Livre Biol Med** 22: 209-214, 1997.

GRACA-SOUZA AV, SILVA-NETO MAC, OLIVERIA PL. **J Biol Chem** 274: 9673-9676, 1999.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. **Electrophoresis**, 30 Suppl 1, p. S162-173, Jun 2009.

HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. **J Insect Physiol**, 53, n. 8, p. 760-773, Aug 2007.

HAUNERLAND, N. H.; SHIRK, P. D. Regional and Functional Differentiation in the Insect Fact Body. **Annual Review of Entomology**, 40, n. 1, p. 121-145, 1995/01/01 1995.

HEHRE, W. J. **A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations**. Wavefunction, 2003. 9781890661182.

HILLIKER AJ, DUYF B, EVANS D, PHILLIPS JP. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 4343-4747, 1992.

HUEBNER, E.; ANDERSON, E. A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. Cytoarchitecture and development of the trophic chamber. **J Morphol**, 138, n. 1, p. 1-40, Sep 1972.

HWANG, A. B.; RYU, E. A.; ARTAN, M.; CHANG, H. W.; KABIR, M. H.; NAM, H. J.; LEE, D.; YANG, J. S.; KIM, S.; MAIR, W. B.; LEE, C.; LEE, S. S.; LEE, S. J. Feedback regulation via AMPK and HIF-1 mediates ROS-dependent longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 42, p. E4458-4467, Oct 21 2014.

JOHNSON, M. S.; SRINIVASAN, N.; SOWDHAMINI, R.; BLUNDELL, T. L. Knowledge-based protein modeling. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, 29, n. 1, p. 1-68, 1994.

KATAGIRI, N.; ANDO, O.; YAMASHITA, O. Reduction of glycogen in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, by use of a trehalase inhibitor, trehalozin, and diapause induction in glycogen-reduced eggs. **J Insect Physiol**, 44, n. 12, p. 1205-1212, Dec 1998.

KELLOGG, G. E. *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. 2nd Edition By Hans-Dieter Höltje, Wolfgang Sippl, Didier Rognan, and Gerd Folkers. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2003. xii + 228 pp. 17 × 24 cm. ISBN 3527305890 (Paperback). \$50.00. **Journal of Medicinal Chemistry**, 47, n. 18, p. 4631-4631, 2004/08/01 2004.

KHAN, F. I.; WEI, D. Q.; GU, K. R.; HASSAN, M. I.; TABREZ, S. Current updates on computer aided protein modeling and designing. **Int J Biol Macromol**, 85, p. 48-62, Apr 2016.

KRISHNAKUMARAN, A.; SCHNEIDERMAN, H. A. Control of molting in mandibulate and chelicerate arthropods by ecdysones. **Biol Bull**, 139, n. 3, p. 520-538, Dec 1970.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, 26, n. 2, p. 283-291, 1993/04/01 1993.



LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein J Org Chem**, 12, p. 2694-2718, 2016.

LEHANE, M. J. **The Biology of Blood-Sucking in Insects**. 2005.

LEHNINGER, A.L. - **Princípios de bioquímica**, 4 ed. São Paulo, Sarvier, 2006.

LIU, T.; TANG, G. W.; CAPRIOTTI, E. Comparative modeling: the state of the art and protein drug target structure prediction. **Comb Chem High Throughput Screen**, 14, n. 6, p. 532-547, Jul 2011.

LOEB, M. J.; WOODS, C. W. Metabolism of ecdysteroid by testes of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 10, n. 1, p. 83-92, 1989/01/01 1989.

LOEB, M. J.; WOODS, C. W.; BRANDT, E. P.; BOAKOVEC, A. B. Larval testes of the tobacco budworm: a new source of insect ecdysteroids. **Science**, 218, n. 4575, p. 896-898, Nov 26 1982.

LOGULLO, C.; VAZ IDA, S.; SORGINE, M. H.; PAIVA-SILVA, G. O.; FARIA, F. S.; ZINGALI, R. B.; DE LIMA, M. F.; ABREU, L.; OLIVEIRA, E. F.; ALVES, E. W.; MASUDA, H.; GONZALES, J. C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P. L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, 116 (Pt 6), p. 525-532, Jun 1998.

LORENZ, M. W.; ANAND, A. N. Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Gryllus bimaculatus*. **Arch Insect Biochem Physiol**, 56, n. 3, p. 110-119, Jul 2004.

LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDALL, W. B., 3rd; DE BAKKER, P. I.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins**, 50, n. 3, p. 437-450, Feb 15 2003.

MARGAM, V. M.; GELMAN, D. B.; PALLI, S. R. Ecdysteroid titers and developmental expression of ecdysteroid-regulated genes during metamorphosis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J Insect Physiol**, 52, n. 6, p. 558-568, Jun 2006.

MAZZALUPO, S.; ISOE, J.; BELLONI, V.; SCARAFFIA, P. Y. Effective disposal of nitrogen waste in blood-fed *Aedes aegypti* mosquitoes requires alanine aminotransferase. **FASEB J**, 30, n. 1, p. 111-120, Jan 2016.

MORAES, J.; GALINA, A.; ALVARENGA, P. H.; REZENDE, G. L.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I., Jr.; LOGULLO, C. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 146, n. 4, p. 528-533, Apr 2007.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. Porto Alegre: Médica Missau, 2003.

MURY, F. B. **ALFA-GLUCOSIDASE E SEU PAPEL NA FORMAÇÃO DE HEMOZOÍNA EM *Rhodnius prolixus***. 2010. Tese Doutorado - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª. Ed. Artmed, Porto Alegre – RS, 2011. Pg. 558

NUNES, V. S. P. **Análise comparativa das Ecto-NTPDase 1 de *Homo sapiens* e *Schistosoma mansoni* por meio de modelagem tridimensional, dinâmica molecular e docking receptor-ligante**. 2015. Tese de Doutorado - ICE/Engenharia Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional, Universidade Federal de Juiz de Fora.



ONU. Organização Pan-Americana da Saúde lança guia da doença de Chagas. n. 18 de novembro, Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2019/01/1654552>.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophys Rev**, 9, n. 2, p. 91-102, Apr 2017.

PANETTO, O. S.; GOMES, H. F.; FRAGA GOMES, D. S.; CAMPOS, E.; ROMEIRO, N. C.; COSTA, E. P.; DO CARMO, P. R. L.; FEITOSA, N. M.; MORAES, J. The effects of Roundup(R) in embryo development and energy metabolism of the zebrafish (*Danio rerio*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 222, p. 74-81, Aug 2019.

PHILIP, P.; ANSHUMAN, D.; ANIL, K. S. Computer-Aided Drug Design: Integration of Structure-Based and Ligand-Based Approaches in Drug Design. **Current Computer-Aided Drug Design**, 3, n. 2, p. 133-148, 2007.

PINAZO, M.-J.; THOMAS, M.-C.; BUSTAMANTE, J.; ALMEIDA, I. C. d.; LOPEZ, M.-C.; GASCON, J. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110, p. 422-432, 2015.

RAHN, H.; REEVES, R. B.; HOWELL, B. J. Hydrogen ion regulation, temperature, and evolution. **Am Rev Respir Dis**, 112, n. 2, p. 165-172, Aug 1975.

RAIKHEL, A. S.; BROWN, M. R.; BELLES, X. 3.9 - Hormonal Control of Reproductive Processes. *In*: GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 433-491.

RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annu Rev Entomol**, 37, p. 217-251, 1992.

RAMAKRISHNAN, C.; RAMACHANDRAN, G. N. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. **Biophys J**, 5, n. 6, p. 909-933, Nov 1965.

RAMAMURTY, P. S. Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly, *Panorpa communis*. **Journal of Insect Physiology**, 14, n. 9, p. 1325-1330, 1968/09/01/ 1968.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. **Rev.Virtual Quim.**, 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

SANTOS, R.; MARIANO, A. C.; ROSAS-OLIVEIRA, R.; PASCARELLI, B.; MACHADO, E. A.; MEYER-FERNANDES, J. R.; GONDIM, K. C. Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of *Rhodnius prolixus*. **Arch Insect Biochem Physiol**, 67, n. 2, p. 55-62, Feb 2008.

SAPPINGTON, T. W.; RAIKHEL, A. S. Ligand-binding domains in vitellogenin receptors and other LDL-receptor family members share a common ancestral ordering of cysteine-rich repeats. **J Mol Evol**, 46, n. 4, p. 476-487, Apr 1998.

SARKAR, A.; SEN, S. 3D structure prediction of VPAC1 and identification of dual natural inhibitors for VPAC1 and EGFR. **J Bioenerg Biomembr**, 51, n. 2, p. 89-102, Apr 2019.

SCARAFFIA, P. Y.; ISOE, J.; MURILLO, A.; WELLS, M. A. Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol**, 35, n. 5, p. 491-503, May 2005.

SCARAFFIA, P. Y.; ZHANG, Q.; THORSON, K.; WYSOCKI, V. H.; ANDMIESFELD, R. L. Differential ammonia metabolism in *Aedes aegypti* fat body and midgut tissues. **J. Insect Physiol**. 56, 1040–1049, 2010.



SCARPINO, A.; FERENCZY, G. G.; KESERU, G. M. Comparative Evaluation of Covalent Docking Tools. **J Chem Inf Model**, 58, n. 7, p. 1441-1458, Jul 23 2018.

SCHMEISSER, S.; PRIEBE, S.; GROTH, M.; MONAJEMBASHI, S.; HEMMERICH, P.; GUTHKE, R.; PLATZER, M.; RISTOW, M. Neuronal ROS signaling rather than AMPK/sirtuin-mediated energy sensing links dietary restriction to lifespan extension. **Mol Metab**, 2, n. 2, p. 92-102, 2013.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, 115, n. 1, p. 14-21, 2010/07/01/ 2010.

SGRIGNANI, J.; MAGISTRATO, A. First-principles modeling of biological systems and structure-based drug-design. **Curr Comput Aided Drug Des**, 9, n. 1, p. 15-34, Mar 2013.

SILVA, J. R.; MURY, F. B.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L.; SILVA, C. P.; DANSA-PETRETSKI, M. Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. **Insect Biochem Mol Biol**, 37, n. 6, p. 523-531, Jun 2007.

SILVA, V. B. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes**. 2008. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

SILVA, V. B. d. MODELAGEM MOLECULAR DE PROTEÍNAS-ALVO POR HOMOLOGIA ESTRUTURAL. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 4, n. 1, 10/25 2007.

SOUZA, G. P. d. Influência da alimentação sanguínea e da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* na modulação da atividade enzimática e expressão gênica de glicosídeo hidrolases de *Rhodnius prolixus*. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) -Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, 2016.

STEEL, C. G. Parameters and timing of synthesis transport and release of neurosecretion in the insect brain. . *In*: FARNER, D. S., Lederis, K (Ed.). **Neurosecretion**. New York : Plenum Press, 1982. p. pp 223–233.

STEWART, J. R.; THOMPSON, M. B. A NOVEL PATTERN OF EMBRYONIC NUTRITION IN A VIVIPAROUS REPTILE. **The Journal of Experimental Biology**, 174, n. 1, p. 97, 1993.

TANCHUK, V. Y.; TANIN, V. O.; VOVK, A. I.; PODA, G. A New, Improved Hybrid Scoring Function for Molecular Docking and Scoring Based on AutoDock and AutoDock Vina. **Chem Biol Drug Des**, 87, n. 4, p. 618-625, Apr 2016.

TRAMONTANO, A.; MOREA, V. Assessment of homology-based predictions in CASP5. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 53, n. S6, p. 352-368, 2003/01/01 2003.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**, 31, n. 2, p. 455-461, Jan 30 2010.

VAFOPOULOU, X.; STEEL, C. G. The insect neuropeptide prothoracicotropic hormone is released with a daily rhythm: re-evaluation of its role in development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 8, p. 3368-3372, Apr 16 1996.

VAFOPOULOU, X.; STEEL, C. G. Testis ecdysiotropic peptides in *Rhodnius prolixus*: biological activity and distribution in the nervous system and testis. **J Insect Physiol**, 51, n. 11, p. 1227-1239, Nov 2005.

VALLE, D.; LIMA GOMES, J. E. P.; GOLDENBERG, S.; GARCIA, E. S. *Rhodnius prolixus* vitellogenesis: Dependence upon the blood source. **Journal of Insect Physiology**, 33, n. 4, p. 249-254, 1987/01/01/ 1987.



VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, 52, n. 4, p. 609-623, Sep 1 2003.

VILLOUTREIX, B. O.; EUDES, R.; MITEVA, M. A. Structure-based virtual ligand screening: recent success stories. **Comb Chem High Throughput Screen**, 12, n. 10, p. 1000-1016, Dec 2009.

VYAS, V. K.; UKAWALA, R. D.; GHATE, M.; CHINTHA, C. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. **Indian J Pharm Sci**, 74, n. 1, p. 1-17, Jan 2012.

WALE, P. L.; GARDNER, D. K. Oxygen affects the ability of mouse blastocysts to regulate ammonium. **Biol Reprod**, 89, n. 3, p. 75, Sep 2013.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; DE BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Res**, 46, n. W1, p. W296-W303, Jul 2 2018.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S.; CASSELMAN, J. M. **The Biology of Fish Growth**. Academic Press, 1987. 9780127390550.

WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insect physiology**. 7th ed. London,: Chapman and Hall, 1972. vii, 827 p. p. 0412114909.

XU, W.-H.; LU, Y.-X.; DENLINGER, D. L. Cross-talk between the fat body and brain regulates insect developmental arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109, n. 36, p. 14687, 2012.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, S. Y. Cysteine proteinase from Bombyx eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. **Comp Biochem Physiol B**, 106, n. 1, p. 35-45, Sep 1993.

ZHANG, Y.; LIU, H.; YAO, J.; HUANG, Y.; QIN, S.; SUN, Z.; XU, Y.; WAN, S.; CHENG, H.; LI, C.; ZHANG, X.; KE, Y. Manipulating the air-filled zebrafish swim bladder as a neutrophilic inflammation model for acute lung injury. **Cell Death Dis**, 7, n. 11, p. e2470, Nov 10 2016.

ZHOU, G.; FLOWERS, M.; FRIEDRICH, K.; HORTON, J.; PENNINGTON, J.; WELLS, M. A. Metabolic fate of [14C]-labeled meal protein amino acids in Aedes aegypti mosquitoes. **J Insect Physiol**, 50, n. 4, p. 337-349, Apr 2004.

ZIEGLER, R. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult Manduca sexta. **J Comp Physiol B**, 161, n. 2, p. 125-131, 1991.

ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochem Mol Biol**, 36, n. 4, p. 264-272, Apr 2006.