

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

BIOLOGIA MOLECULAR  
APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS  
PARA O CONTROLE DO BICUDO DA  
CANA-DE-AÇÚCAR, *Sphenophorus levis*



Tese de Doutorado

FERNANDO FONSECA PEREIRA DE PAULA

São Carlos, fevereiro de 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Fernando Fonseca Pereira de Paula

Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

Co-orientadora: Prof. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

SÃO CARLOS, fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Fernando Fonseca Pereira de Paula

Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas). Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Henrique Silva

Co-orientadora: Prof. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

SÃO CARLOS, fevereiro de 2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P324bm

Paula, Fernando Fonseca Pereira de.

Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* / Fernando Fonseca Pereira de Paula. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
180 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Genética. 2. *Sphenophorus levis*. 3. Inseto - controle. 4. Catepsina L. 5. Cistatina. 6. Digestão. I. Título.

CDD: 575.1 (20<sup>a</sup>)

“Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*”

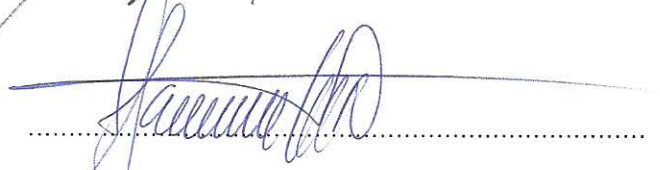
Tese de Doutorado de  
FERNANDO FONSECA PEREIRA DE PAULA

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Flavio Henrique Silva



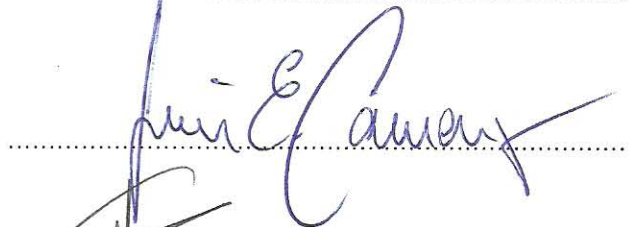
Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes



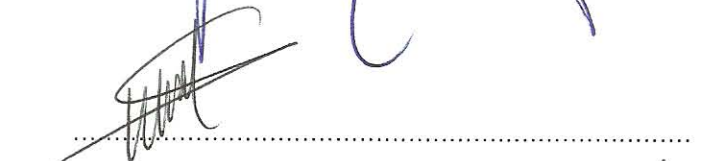
Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra



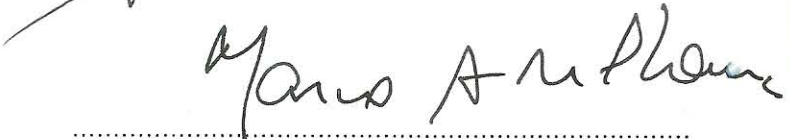
Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo



Prof. Dr. Michel Vincentz



Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama



Dedico este trabalho aos meus pais, Belmira e Antônio, e também à minha companheira, Julia, que deram suporte para sua realização.

## Agradecimentos

Ao amigo e mestre, Professor Dr. Flávio Henrique-Silva, por abrir as portas de seu laboratório. Seus votos de confiança e orientação foram incondicionais para o desenvolvimento deste trabalho. Sempre presente e mostrando a importância da busca do conhecimento e de se fazer ciência com prazer. Pelos ensinamentos depositados nas entrelinhas, que vão muito além da vida acadêmica.

À Profa. Dra. Andrea Soares Costa Fuentes, por todo o suporte como co-orientadora e também me guiando nos momentos difíceis, dos primeiros experimentos à redação da tese.

Ao prof. Dr. John Gatehouse pela oportunidade e também pela orientação nos estudos com RNAi. Ao Prashant pela ajuda com os experimentos e a todos os companheiros de laboratório em Durham, que tornaram agradável minha jornada longe de casa.

Aos colegas Ludier Kesser e Wilson Malagó, por todas as risadas, bons momentos e conhecimentos compartilhados dentro e fora do laboratório. À Kesser, Danilo, Rafael e Kishi pela valiosa ajuda com os experimentos.

A todos os colegas de laboratório, Wesley, Danyelle, Darlan, Adelita, Letícia, Natália, Lucas, Augusto, Gabriel, Daniela, Mariana, Ana Lígia, Francine, Vanessa, Rafaela, Taíse, Priscila, Bianca, pelas contribuições e especialmente pela convivência harmoniosa.

A todos os professores e colaboradores que foram fundamentais para a realização deste estudo: Walter Terra, José Marcos, Alberto Ribeiro, José Rosa, Heloísa Araújo e Ana Paula.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução (PPGGEv) pela infra-estrutura oferecida para a realização deste trabalho. A todos os colegas e professores do departamento de Genética e Evolução, pela boa convivência nesses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e CNPQ pelas bolsas concedidas e fomento do projeto de pesquisa.

Aos amigos da escalada que me aguentaram todos esses anos falando de genes e besouro, pela força e motivação.

À Julia, minha companheira, pelo carinho e apoio irrestrito durante esses anos. Sem a sua ajuda este trabalho não estaria terminado.

Aos meus pais Belmira e Antônio, e ao meu irmão Fábio pelo amor, educação e estímulos, que me motivaram nessa caminhada.

Agradeço a todos que durante esses cinco anos contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Os conhecimentos acumulados dessas amizades vão muito além do âmbito científico e foram muito importantes para a minha formação pessoal.

A todos, meus sinceros agradecimentos.



## RESUMO

O bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, é um inseto que na fase larval se alimenta do rizoma da cana-de-açúcar cavando galerias que causam danos e levam à morte das plantas. Os métodos convencionais de controle disponíveis não tem sido eficientes contra esse inseto. O objetivo desse estudo foi gerar conhecimento sobre a biologia desse inseto em nível molecular utilizando uma abordagem transcriptômica para a identificação de possíveis genes alvo, visando futuros estudos para desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque deste inseto. Após o processamento e montagem das sequências utilizando o programa dCAS, 3804 sequências foram agrupadas em 201 *contigs* e 1363 *singlets*, os quais foram manualmente anotados. Foram identificados diversos genes de degradação de parede celular, incluindo pectinases e celulases. Pela primeira vez um *contig* contendo uma sequência que codifica uma invertase foi identificado em um coleóptero. As prováveis enzimas digestivas totalizam 19,3% e os genes desconhecidos representam 28,8% do total de sequências expressas. Considerando a predominância de catepsinas L dentre as enzimas digestivas identificadas no transcriptoma (54,3%) e a sua importância para a hidrólise de proteínas nos processos digestivos, um clone de cDNA codificando uma catepsina L, denominado *Sl-CathL*, foi escolhido para a expressão recombinante em células de *Pichia pastoris*, caracterização e inibição *in vitro* utilizando a cistatina da cana-de-açúcar CaneCPI-4 ( $K_i = 0,196$  nM). Os ensaios de imunolocalização evidenciaram a produção da *Sl-CathL* no epitélio do intestino médio e a secreção de vesículas, contendo a enzima, no lúmen do intestino. Larvas do inseto *S. levis* também apresentaram sensibilidade para disparar a maquinaria de RNA de interferência induzida por injeções de dsRNA na cavidade corpórea e o silenciamento gênico específico foi confirmado por qRT-PCR. As larvas que receberam injeções com dsRNA da V-ATPase E morreram dentro de três semanas, enquanto as larvas que tiveram a serpina 1 silenciada exibiram atraso no desenvolvimento, aprisionamento na fase pupal, ou morreram como adultos farados. Desse modo, concluímos neste trabalho iniciado a partir da análise do transcriptoma, que a inibição da principal enzima digestiva pela Cane-CPI-4 e o silenciamento gênico via RNAi são alternativas promissoras para o estabelecimento de plantas resistentes ao inseto e podem ser aplicadas no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar transgênicas com o objetivo de aumentar sua resistência ao *Sphenophorus levis*.

Palavras chave: *Sphenophorus levis*, controle de insetos, catepsina L, cistatina, digestão, RNAi.

## ABSTRACT

The sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*, is an insect that feeds on the rhizome of sugarcane in its larval stage, boring channels that cause damage and death to the plant. Conventional methods of insect control have not been efficient. The aim of the present study was to generate knowledge on the biology of this insect on the molecular level using a transcriptomic approach to determine potential target genes for the engineering of insect-resistant plants. After sequence processing and assembly using the dCAS program, 3804 sequences were grouped into 201 *contigs* and 1363 *singlets*, which were manually annotated. Several plant cell wall degrading enzymes were identified, including pectinases and cellulases. An invertase-containing *contig* was identified for the first time in a coleopteran. Total probable digestive enzymes accounted for 19.3% and unknown genes accounted for 28.8% of the total number of expressed sequence tags. Considering the predominance of cathepsin L enzymes among the digestive enzymes found in the transcriptome (54.3%) and their importance to the breakdown of proteins in the insect digestive process, a cDNA clone encoding a cathepsin L enzyme, denominated *Sl-CathL*, was chosen for recombinant expression in *Pichia pastoris* cells, characterization and *in vitro* inhibition by the sugarcane cystatin CaneCPI-4 ( $K_i = 0.196$  nM). Immunolocalization assays demonstrated the production of *Sl-CathL* in the midgut epithelium and secretion into the gut lumen from vesicles containing the enzyme. *S. levis* demonstrated sensitivity in triggering RNA interference machinery induced by dsRNA injections in the body cavity and gene-specific knockdown was confirmed by qRT-PCR. Larvae injected with V-ATPase E dsRNA died within three weeks after injection and serpin 1-silenced larvae either exhibited delayed development, arresting in the pupal stage, or died as pharate adults. In conclusion, transcriptome analyses, together with the inhibition of the main digestive enzyme by Cane-CPI-4 and gene silencing using RNAi, are promising procedures for the development of transgenic sugarcane plants to enhance resistance to *Sphenophorus levis*.

**Keywords:** *Sphenophorus levis*, insect control, cathepsin L, cystatin, digestion, RNAi.

## Lista de figuras

- FIGURA 1: INFESTAÇÃO DE *SPHENOPHORUS LEVIS* NOS CANAVIAIS DA USINA DA PEDRA (RIBEIRÃO PRETO-SP). A E B: SINTOMAS DAS PLANTAS NAS ÁREAS INFETADAS: MORTE DAS PLANTAS E FALHAS NO BROTEAMENTO. C E D: LARVAS DO BESOURO ALIMENTANDO-SE DO RIZOMA. AS GALERIAS CAVADAS CAUSAM A MORTE DAS PLANTAS. FOTOGRAFADO POR FONSECA, F. P. P. EM OUTUBRO DE 2011. .... 2
- FIGURA 2: CICLO DE VIDA DO *SPHENOPHORUS LEVIS*. IMAGENS FOTOGRAFADAS NO LBM/UFSCAR (A/B/C/E) E USINA DA PEDRA (RIBEIRÃO PRETO-SP) (D). A: FÊMEA ADULTA; B: OVOS; C E D: LARVAS SE ALIMENTANDO DA CANA NO LABORATÓRIO E NO CAMPO, RESPECTIVAMENTE; E: PUPA. APÓS A POSTURA DOS OVOS, OS INSETOS LEVAM APROXIMADAMENTE 60 A 75 DIAS PARA ATINGIR FASE ADULTA. .... 4
- FIGURA 1.1: ESPÉCIES MAIS SIMILARES IDENTIFICADAS NO BANCO DE DADOS DE PROTEÍNAS NÃO REDUNDANTES DO GENBANK PARA O TOTAL DE ESTS. A: SEM PARÂMETROS DE EXCLUSÃO E PARA CADA UM DOS CLUSTERS, B: UTILIZANDO APENAS SEQUÊNCIAS COM E-VALUES INFERIORES A  $E^{-15}$ . EM AMBAS AS ANÁLISES FORAM PREDOMINANTES OS TRANSCRITOS COM MAIOR SIMILARIDADE COM OS GENES DO COLEÓPTERO *TRIBOLIUM CASTANEUM*. .... 21
- FIGURA 1.2: PERFIL GERAL DOS TRANSCRITOS ANOTADOS DA BIBLIOTECA DE *S. LEVIS*. A: AGRUPAMENTO DAS SEQUÊNCIAS; B: PORCENTAGENS DE TRANSCRITOS DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO GERAL; C: TABELA INDICANDO AS FREQUÊNCIAS DOS GENES ASSOCIADOS ÀS FUNÇÕES NÃO DIGESTIVAS. .... 21
- FIGURA 1.3: GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO DAS ENZIMAS RELACIONADAS À DIGESTÃO NAS LARVAS DE *S. LEVIS*. A: DENTRE TODAS AS SEQUÊNCIAS DE PEPTIDASES IDENTIFICADAS NO TRANSCRIPTOMA, 10,5% DELAS FORAM ANOTADAS COMO PROVAVELMENTE RELACIONADAS A PROCESSOS NÃO DIGESTIVOS. B: A TRANSCRIÇÃO DAS PROVÁVEIS PEPTIDASES DIGESTIVAS É PREDOMINANTE NO INTESTINO DAS LARVAS DESSE INSETO, SEGUIDA DAS ENZIMAS RELACIONADAS À DIGESTÃO DE CARBOIDRATOS (22,04%) E LIPÍDEOS (5,85%). .... 24
- FIGURA 1.4: TECIDOS DISSECADOS DAS LARVAS COM 30 DIAS DE VIDA PARA AS ANÁLISES DE QRT-PCR. .... 27
- FIGURA 1.5: GRÁFICO INDICANDO A EXPRESSÃO RELATIVA ANALISADA POR QRT-PCR PARA OS GENES SELECIONADOS NOS DIFERENTES TECIDOS. PARA A COMPARAÇÃO, OS ÍNDICES MÁXIMOS DE TRANSCRIÇÃO PARA CADA GENE FORAM UTILIZADOS COMO CALIBRADORES (1x). A CATEPSINA L (*Sl-CATHL*), CELULASE, CATEPSINA B, INVERTASE E ESTERASE SÃO SINTETIZADAS FUNDAMENTALMENTE NO INTESTINO MÉDIO (IM) DAS LARVAS, COMO ESPERADO PARA ENZIMAS DIGESTIVAS. A DETECÇÃO DE ESTS DA SERINO PEPTIDASE NO INTESTINO POSTERIOR (IP) É CONTROVERSA, DESDE QUE ESSA REGIÃO É NORMALMENTE REVESTIDA POR QUITINA. AS OUTRAS PROTEÍNAS COMO A SERPINA, V-ATPASE, CATEPSINA D E DUAS PROTEÍNAS DE FUNÇÃO DESCONHECIDA (FAT 1 E 2) SÃO TRANSCRITAS EM NÍVEIS ELEVADOS NOS TECIDOS ALÉM DO INTESTINO MÉDIO, O QUE INDICA A PARTICIPAÇÃO EM PROCESSOS NÃO DIGESTIVOS. .... 28
- FIGURA 1.6: GRÁFICO DA ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DURANTE AS FASES DO DESENVOLVIMENTO DE *S. LEVIS* ANALISADAS POR QRT-PCR. PARA O EFEITO COMPARATIVO DA ANÁLISE, OS ÍNDICES MÁXIMOS DE TRANSCRIÇÃO DETECTADOS PARA CADA ENZIMA AO LONGO DO CICLO DE VIDA DO INSETO FORAM TOMADOS COMO CALIBRADORES (1x). ASSIM, OS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DAS ENZIMAS NÃO REFLETEM AS DIFERENÇAS REAIS CONSIDERANDO AS ABUNDÂNCIAS ENTRE SI. AS ENZIMAS DIGESTIVAS, FUNDAMENTALMENTE PRODUZIDAS NO INTESTINO MÉDIO, ATINGEM OS MAIORES ÍNDICES DE EXPRESSÃO NAS LARVAS COM 30 DIAS DE VIDA, COM EXCEÇÃO DA CELULASE QUE É MAIS ABUNDANTE NO ESTÁGIO ANTERIOR (20 DIAS). ESSAS ENZIMAS TÊM A TRANSCRIÇÃO REDUZIDA NAS PRÉ-PUPAS E PRATICAMENTE ANULADA NA FASE DE PUPA. A CATEPSINA D FOI

- DETECTADA EM TODOS OS TECIDOS E FASES DO DESENVOLVIMENTO, O QUE SUGERE A ATUAÇÃO NÃO DIGESTIVA DESSA ENZIMA. .... 29
- FIGURA 1.7: GRÁFICO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS DIVERSAS ENZIMAS DE *SPHENOPHORUS LEVIS* DURANTE O CICLO BIOLÓGICO DO INSETO. ESSES RESULTADOS CORRESPONDEM À EXPRESSÃO RELATIVA REAL ENTRE OS GENES ESTUDADOS. AS CISTEÍNO PEPTIDASES SÃO PREDOMINANTES EM FUNÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE TRANSCRITOS DE CATEPSINAS L E MINORITÁRIA DE CATEPSINAS B. .... 30
- FIGURA 1.8A: ALINHAMENTO ENTRE AS CISTEÍNO PEPTIDASES TIPO CATEPSINAS B DE *S. LEVIS* E DA CATEPSINA B DE *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS*. OS ASTERISCOS INDICAM OS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DA TRIÁDE CATALÍTICA CONSERVADA DE CISTEÍNO PEPTIDASES: CISTEÍNA, HISTIDINA E ASPARAGINA. A CAIXA EVIDENCIA O PROVÁVEL LOOP, DE ACORDO COM A SEQUÊNCIA CARACTERIZADA PARA *C. MACULATUS* (KOO ET AL., 2008). .... 31
- FIGURA 1.8B: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS DOS *CONTIGS* DE SERINO PEPTIDASES IDENTIFICADOS NA BIBLIOTECA DE LARVAS DE *S. LEVIS*. O *CONTIG 111* É FORMADO POR 7 SEQUÊNCIAS E CODIFICA UMA PROVÁVEL TRIPSINA. A CAIXA PONTILHADA CORRESPONDE À EXTREMIDADE N-TERMINAL CONSERVADA DAS TRIPSINAS (IVGG). OS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO DAS SERINO PEPTIDASES, HISTIDINA (His<sup>57</sup>) E ÁCIDO ASPÁRTICO (Asp<sup>102</sup>), SÃO INDICADOS POR UM ASTERISCO E A SERINA REATIVA (Ser<sup>195</sup>) É INDICADA POR UMA CABEÇA DE SETA. A SETA E A CAIXA BRANCA INDICAM O RESÍDUO CONSERVADO DE ÁCIDO ASPÁRTICO (Asp<sup>189</sup>) QUE CONFERE ESPECIFICIDADE ÀS TRIPSINAS, QUE É SUBSTITUÍDO POR UMA SERINA, GLICINA OU TIROSINA NAS QUIMIOTRIPSINAS (TERRA E FERREIRA, 2011). OS RESÍDUOS IDÊNTICOS SÃO MARCADOS EM CAIXAS ESCURAS E AQUELES CONSERVADOS SÃO INDICADOS EM CAIXAS CINZA. .... 34
- FIGURA 1.9A: ALINHAMENTO ENTRE A CATEPSINA D DE *S. LEVIS* E OUTRAS ASPARTIL PEPTIDASES DE INSETOS. AS CAIXAS ESCURAS MOSTRAM OS AMINOÁCIDOS IDÊNTICOS E AS CAIXAS CINZA INDICAM OS AMINOÁCIDOS EM SÍTIOS CONSERVADOS, QUE APRESENTAM CARACTERÍSTICAS SIMILARES. A SETA INDICA O PROVÁVEL PEPTÍDEO SINAL DA *SL-CATHD* E A CABEÇA DE SETA O PROVÁVEL SÍTIO DE N-GLICOSILAÇÃO (Asn<sup>122</sup>). OS ASTERISCOS INDICAM OS RESÍDUOS DE ASPARTATO (D) DO SÍTIO ATIVO DESSAS ENZIMAS, ENQUANTO A CAIXA SEM PREENCHIMENTO EVIDENCIA A PRESENÇA DO LOOP DE PROLINAS "DxPxPx(G/A)P", CARACTERÍSTICO DAS CATEPSINAS LISSOSSOMAS DESCRITO POR PADILHA E COLABORADORES (2009). .... 36
- FIGURA 1.9B: ALINHAMENTO ENTRE AS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE ALGUMAS DAS VARIANTES DAS *SL-CATHLS* 1, 2 E 3. TODAS AS VARIANTES TEM O PEPTÍDEO SINAL IDENTIFICADO PARA A *SL-CATHL* E TAMBÉM A PRÓ REGIÃO COM O MOTIVO INIBITÓRIO DE CATEPSINAS L (E<sup>42</sup>R<sup>46</sup>F<sup>50</sup>N<sup>53</sup>I<sup>57</sup>N<sup>61</sup>) CONSERVADOS INDICADOS PELAS CAIXAS SECCIONADAS CINZA E PRETA, RESPECTIVAMENTE. A SETA APONTA O SÍTIO DE CLIVAGEM DA PRÓ-REGIÃO IDENTIFICADO PARA A *rSL-CATHL* E A CABEÇA DE SETA INDICA O RESÍDUO DE CISTEÍNA DO SÍTIO ATIVO (Cys<sup>138</sup>), QUE É SUBSTITUÍDO POR UMA SERINA EM UMA DAS VARIANTES DO *CONTIG 35*. A NOMENCLATURA DAS VARIANTES SEGUE O PADRÃO DA PRIMEIRA SEQUÊNCIA DO ALINHAMENTO CORRESPONDENTE À *rSL-CATHL* (GENBANK: ACK38176) A MAIS ABUNDANTE ENTRE TODAS AS CATEPSINAS L IDENTIFICADAS: PERTENCENTE AO *CONTIG 13* (13), VARIANTE PROTÉICA 1 (\_1) CODIFICADA POR 107 SEQUÊNCIAS (n107), DISTRIBUÍDAS EM 13 CLUSTERS DE CDNA (c13). .... 38
- FIGURA 1.10: ALINHAMENTO ENTRE OS FRAGMENTOS N-TERMINAIS DAS VARIANTES DAS *SL-CATHLS* 1, 2 E 3. O GRUPO CORRESPONDENTE À *SL-CATHL 2* ESTÁ RESSALTADO COM UMA CAIXA SECCIONADA HORIZONTAL PRETA. AS SEQUÊNCIAS ACIMA DESSA CAIXA CORRESPONDEM ÀS VARIANTES DA *SL-CATHL 1*, E AQUELAS ABAIXO DA CAIXA SÃO AS VARIANTES DA *SL-CATHL 3*. TODAS AS VARIANTES POSSUEM O MOTIVO CONSERVADO E<sup>42</sup>R<sup>46</sup>F<sup>50</sup>N<sup>53</sup>I<sup>57</sup>N<sup>61</sup> DA PRÓ-REGIÃO INIBITÓRIA, O QUE ESTÁ DESTACADO NA PRIMEIRA SEÇÃO DO ALINHAMENTO. A CABEÇA DE SETA INDICA O RESÍDUO DE CISTEÍNA (Cys<sup>138</sup>) DO SÍTIO ATIVO

- CONSERVADO, COM EXCEÇÃO DAS TRÊS VARIANTES DA *SL-CATHL 3* PERTENCENTES AO *CONTIG 35*, NAS QUAIS A CAIXA VERMELHA INDICA A MUTAÇÃO PARA O RESÍDUO DE SERINA. O ASTERISCO APONTA O RESÍDUO DE GLUTAMINA (GLN<sup>132</sup>) CONSERVADO, TAMBÉM ENVOLVIDO NO MECANISMO DE CATÁLISE. .... 40
- FIGURA 1.11: AGRUPAMENTO DAS *SL-CATHLS* BASEANDO-SE NA SIMILARIDADE DA REGIÃO N-TERMINAL DAS PROTEÍNAS. AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS EM CONDIÇÃO DE DIETA ARTIFICIAL ESTÃO INDICADAS COMO "LAB" ENQUANTO O TERMO "CAMPO" É UTILIZADO PARA AS SEQUÊNCIAS PROVENIENTES DO TRATAMENTO EM CONDIÇÕES DE DIETA NATURAL. A ANÁLISE DE SIMILARIDADE INDICA A ABUNDÂNCIA DE VARIANTES DA *SL-CATHL 2* PREFERENCIALMENTE TRANSCRITAS EM CONDIÇÕES DE DIETA NATURAL, INDICADAS NO RAMO VERMELHO. OS CLUSTERS DE *SL-CATHL* MAIS ABUNDANTES DO TRANSCRIPTOMA SÃO INDICADOS PELOS RAMOS MAIS ESPessos, EM PRETO. .... 41
- FIGURA 1.12: GRÁFICO INDICANDO A CONTRIBUIÇÃO DAS PRINCIPAIS ENZIMAS NOS PROCESSOS DIGESTIVO DAS LARVAS DE *S. LEVIS*. AS ENZIMAS PROVAVELMENTE ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE PARECE CELULAR SÃO DESTACADAS, ASSIM COMO A INVERTASE. 43
- FIGURA 1.13: ALINHAMENTO DAS DUAS SEQUÊNCIAS DE B-1,4-ENDOGLUCANASES IDENTIFICADAS NO TRANSCRIPTOMA DE *S. LEVIS* COM OUTRAS CELULASES (GH45) PROVENIENTES DE COLEÓPTEROS. .... 45
- FIGURA 1.14: CARACTERIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE CDNA DE UM CLONE QUE CODIFICA A INVERTASE IDENTIFICADA NO TRANSCRIPTOMA DE *S. LEVIS*. A: SEQUÊNCIA COMPLETA DO CDNA DA INVERTASE E DA ENZIMA CODIFICADA. VERIFICA-SE A OCORRÊNCIA DE REGIÕES NÃO TRANSCRITAS (UTRs) 5' E 3', ALÉM DO SINAL DE POLI ADENILAÇÃO (AATAAA) E DA CAUDA POLI-A, INDICADA EM VERMELHO. B: ELETROFEROGRAMA DA REGIÃO UTR 3' DO CDNA QUE EVIDENCIA A OCORRÊNCIA DA CAUDA POLI-A CARACTERÍSTICA DE RNAs MENSAGEIROS EUCARIÓTICOS. .... 47
- FIGURA 1.15: ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA DA INVERTASE DE *S. LEVIS* COM AS INVERTASES HOMÓLOGAS DE LEPIDÓPTEROS E BACTÉRIAS. OS PROVÁVEIS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS CONSERVADOS DO SÍTIO ATIVO SÃO INDICADOS POR CABEÇAS DE SETA. O ASTERISCO INDICA OUTRO RESÍDUO DE AMINOÁCIDO CONSERVADO, TAMBÉM PROVAVELMENTE ENVOLVIDO NA CATÁLISE, DE ACORDO COM O DESCRITO PARA AS INVERTASES CARACTERIZADAS DE MICRO-ORGANISMOS. .... 48
- FIGURA 1.16: ANÁLISE FILOGENÉTICA DA INVERTASE IDENTIFICADA NA BIBLIOTECA DE *S. LEVIS* COM OUTRAS INVERTASES PROVENIENTES DE DIVERSOS ORGANISMOS. A MAIOR SIMILARIDADE DA SEQUÊNCIA DE *S. LEVIS* COM INVERTASES BACTERIANAS REFORÇA A TEORIA DE AQUISIÇÃO DESSE GENE POR TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL, COMO PROPOSTO PARA OS LEPIDÓPTEROS (DAIMON ET AL., 2008; PAUCHET ET AL., 2008). A ANÁLISE FOI CONDUZIDA NO PROGRAMA MEGA 5.05 UTILIZANDO O MÉTODO DE NEIGHBOR JOINING COM 10.000 REPETIÇÕES. OS VALORES DE *BOOTSTRAP* SÃO APRESENTADOS NOS RAMOS DA FIGURA. .... 49
- FIGURA 1.17: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS CODIFICADAS PELOS *CONTIGS 30* E *31*, *FAT 1* E *FAT 2* RESPECTIVAMENTE. A SEQUÊNCIA COMPLETA DA *FAT 2* AINDA NÃO FOI DETERMINADA. A SETA INDICA O PROVÁVEL PEPTÍDEO SINAL E OS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DIFERENTES SÃO INDICADOS POR CAIXAS. .... 50
- FIGURA 1.18: ANÁLISE DO PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DAS PROTEÍNAS *FAT 1* E *FAT 2*. OS ÍNDICES DE TRANSCRIÇÃO REPRESENTAM AS DIFERENÇAS REAIS DE ABUNDÂNCIA ENTRE OS GENES E FORAM CALIBRADOS EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO MÁXIMA DA CATEPSINA L NAS LARVAS COM 30 DIAS DE VIDA (1 x). .... 51
- FIGURA 2.1: ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CATEPSINA L HUMANA (TURK E GUNCAR, 2003). (A) PRÓ-CATEPSINA L HUMANA COM A EXTENSA REGIÃO N-TERMINAL INDICADA EM VERMELHO, CORRESPONDENTE AO PRÓ-DOMÍNIO INIBITÓRIO QUE IMPEDE O ACESSO DO SUBSTRATO AO SÍTIO ATIVO (COULOMBE ET AL., 1996; PDB: 1CJL; IN: TURK E GUNCAR, 2003). (B) CATEPSINA L HUMANA MADURA, APÓS LIBERAÇÃO DO PRÓ-DOMÍNIO INIBITÓRIO. A SETA INDICA A CAVIDADE FORMADA ENTRE OS DOIS

- LÓBULOS DA ENZIMA, ONDE O SUBSTRATO É ACOMODADO. NA CAVIDADE CORRESPONDENTE AO SÍTIO ATIVO DA CATEPSINA SÃO INDICADOS OS RESÍDUOS DE Cys25 E His159, DESTACADOS EM AMARELO E VERDE, RESPECTIVAMENTE (GUNCAR ET AL., 1999; PDB: 1ICF; IN: TURK E GUNCAR, 2003). ..... 57
- FIGURA 2.2: MODELO DE SCHECHTER E BERGER (1967): EXPLICA A INTERAÇÃO PEPTIDASE-SUBSTRATO. CONSIDERANDO A ACOMODAÇÃO DO SUBSTRATO NO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA, NO SENTIDO N-C TERMINAL, O SÍTIO P1 CORRESPONDE AO PRIMEIRO RESÍDUO DE AMINOÁCIDO QUE ANTECEDE O PONTO DE CLIVAGEM DO SUBSTRATO, ENQUANTO P1' É A DENOMINAÇÃO PARA O PRIMEIRO AMINOÁCIDO LOCALIZADO APÓS O PONTO DE CLIVAGEM. PARA OS SÍTIOS DA ENZIMA, É SEGUIDA A MESMA DENOMINAÇÃO: S1 CORRESPONDE AO RESÍDUO DE AMINOÁCIDO DA ENZIMA QUE ACOMODA O RESÍDUO DENOMINADO P1 DO SUBSTRATO. ADAPTADO DE COLIGAN, ET AL. (2004). ..... 58
- FIGURA 2.3: ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA ORIZACISTATINA, ISOLADA DO ARROZ (*ORYZA SATIVA*). ESSA FOI A PRIMEIRA FITOCISTATINA COM A ESTRUTURA RESOLVIDA POR NAGATA E COLABORADORES (2000), FORMADA POR CINCO FOLHAS-B ANTIPARALELAS, SENDO QUATRO PRINCIPAIS LEVEMENTE DOBRADAS SOBRE UMA HÉLICE-A, ALÉM DE UMA CURTA FOLHA-B NA PORÇÃO N-TERMINAL (PDB: 1EQK). NA PARTE INFERIOR, EM CINZA, OS TRÊS DOMÍNIOS CONSERVADOS ENTRE AS FITOCISTATINAS QUE FORMAM UM NÚCLEO HIDROFÓBICO EM FORMA DE CUNHA, O QUAL INTERAGE COM O SÍTIO ATIVO DA PEPTIDASE. .... 62
- FIGURA 2.4: REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO DE UMA CISTATINA E UMA CISTEÍNO PEPTIDASE. O SÍTIO ATIVO DA ENZIMA É MOSTRADO NA PARTE SUPERIOR DA FIGURA. A CADEIA POLIPEPTÍDICA DA CISTATINA É ILUSTRADA ABAIXO, COM OS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS INDICADOS POR LETRAS. AS TRÊS REGIÕES DA CISTATINA ENVOLVIDAS NA LIGAÇÃO DA ENZIMA ESTÃO EVIDENCIADAS EM CORES. OS RESÍDUOS DA REGIÃO N-TERMINAL (AMARELO) INTERAGEM COM A PEPTIDASE, SENDO QUE A GLY11 SE ENCAIXA EM S2, IMPEDINDO A LIGAÇÃO DO PRÓXIMO AMINOÁCIDO DA MOLÉCULA DE CISTATINA COM O SÍTIO S1 DA PEPTIDASE, PREVENINDO A CLIVAGEM DA MOLÉCULA INIBIDORA. OS OUTROS DOIS LOOPS DA MOLÉCULA DE CISTATINA, UM EM VERDE NA REGIÃO CENTRAL E OUTRO SEGMENTO PRÓXIMO À REGIÃO C-TERMINAL (AZUL) CONSTITUEM AS OUTRAS REGIÕES DE CONTATO COM A PROTEASE EM S1' E S2' RESPECTIVAMENTE. MODIFICADO DE ALVAREZ-FERNANDEZ E ABRAHAMSON (2006). ..... 63
- FIGURA 2.5: PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO EM LEVEDURA pPICZAC QUE CONFERE RESISTÊNCIA À ZEOCINA, CONTENDO FATOR A DE SECREÇÃO E CAUDA DE HISTIDINA. .... 65
- FIGURA 2.6: ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PROTÉICA DA *SL-CATHL* (ACK38176) COM CATEPSINAS L HOMÓLOGAS DE COLEÓPTEROS. RESÍDUOS CONSERVADOS, IDÊNTICOS EM TODAS AS PROTEÍNAS SÃO DESTACADOS EM CAIXAS PRETAS, ENQUANTO AS CAIXAS BRANCAS MOSTRAM OS RESÍDUOS COM MAIS DE 50% DE IDENTIDADE ENTRE AS SEQUÊNCIAS. O PEPTÍDEO SINAL DA *SL-CATHL* APARECE SUBLINHADO EM PRETO E O PROVÁVEL PONTO DE CLIVAGEM DA PRÓ-REGIÃO É INDICADO POR UMA SETA. O MOTIVO INIBITÓRIO CONSERVADO DA PRÓ-REGIÃO "E-R-F-N-I-N" ESTÁ DESTACADO EM UMA CAIXA CINZA ACIMA DO ALINHAMENTO. OS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS ENVOLVIDOS NA CATÁLISE SÃO INDICADOS COM ASTERISCO (\*) ACIMA DO ALINHAMENTO, QUE FOI REALIZADO UTILIZANDO O PROGRAMA MULTALIGN UTILIZANDO PARÂMETROS PADRÕES (CORPET, 1988). ..... 77
- FIGURA 2.7: CLADOGRAMA REPRESENTANDO O AGRUPAMENTO ENTRE A *SL-CATHL* E AS CALS (CATEPSINAS L) DE *T. MOLITOR*. NOTE QUE A *SL-CATHL* É AGRUPADA JUNTO À CAL3, E TAMBÉM À CAL2, UMA DAS RARAS CATEPSINAS L COMPROVADAMENTE DIGESTIVAS, ENQUANTO AS ISOFORMAS DE CAL1 ESTÃO AGRUPADAS EM UM RAMO SEPARADO FORMADO APENAS PELAS CATEPSINAS LISSOSSOMAIS. .... 78

- FIGURA 2.8: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA *SL-CATHL* (FJ467290). O PROVÁVEL PEPTÍDEO SINAL DE 16 AMINOÁCIDOS ESTÁ INDICADO EM PRETO NA EXTREMIDADE N-TERMINAL. A REGIÃO MARCADA EM CINZA EVIDENCIA O PRÓ-DOMÍNIO PREDITO, QUE SE ESTENDE ATÉ A POSIÇÃO 113. O MOTIVO INIBITÓRIO CONSERVADO DA PRÓ-REGIÃO E<sup>42</sup>R<sup>46</sup>F<sup>50</sup>N<sup>53,57</sup>I<sup>61</sup> É DESTACADO EM CAIXAS BRANCAS NA PRÓ-REGIÃO. OS RESÍDUOS CONSERVADOS DA TRIÁDE CATALÍTICA: CYS<sup>138</sup>, HIS<sup>272</sup>, ASN<sup>292</sup> ESTÃO DESTACADOS EM CAIXAS ESCURAS, ENQUANTO O RESÍDUO DE GLUTAMINA (GLN<sup>132</sup>), TAMBÉM ENVOLVIDO NA CATÁLISE, É INDICADO POR UM ASTERISCO..... 80
- FIGURA 2.9: SEQUÊNCIA DA *SL-CATHL* (ACK38176), EVIDENCIANDO OS PEPTÍDEOS (A) VPESIDWR, (B) NVVTPIK E (C) DYWLIK, PREVIAMENTE IDENTIFICADOS NAS ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSA A PARTIR DA PROTEÍNA NATIVA PURIFICADA DO INTESTINO DAS LARVAS DO INSETO (DELLAMANO, 2009; FONSECA ET AL., 2012). ESSE RESULTADO INDICA QUE A *SL-CATHL* É DE FATO, UMA ENZIMA DIGESTIVA PRODUZIDA NO INTESTINO. A SETA INDICA O PROVÁVEL SÍTIO DE CLIVAGEM DA PRÓ-REGIÃO. .... 81
- FIGURA 2.10: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA *rSL-CATHL* EM CÉLULAS DE *E. COLI* ROSETTA (DE3) POR *WESTERN BLOTTING*. REVELAÇÃO DO *WESTERN BLOTTING* EM MEMBRANA DE PVDF COM ANTICORPO ANTI-HIS TAG (1:7500) EVIDENCIANDO A PROVÁVEL DEGRADAÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE PRODUZIDA EM BACTÉRIA. M: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; 1: CÉLULAS DE *E. COLI* ROSETTA (DE3) 01 NÃO INDUZIDA; 2: CÉLULAS DE *E. COLI* ROSETTA (DE3) 01 INDUZIDA DURANTE 4H COM A ADIÇÃO DE 0,4 mM DE IPTG; 3: COLÔNIA 02 NÃO INDUZIDA; 4: COLÔNIA 02 INDUZIDA 4H; 5: COLÔNIA 03 NÃO INDUZIDA; 6: COLÔNIA 03 INDUZIDA 4H. A SETA INDICA AS BANDAS RECONHECIDAS NAS FRAÇÕES INDUZIDAS DOS DIFERENTES TRANSFORMANTES, COM MASSA MOLECULAR MENOR DO QUE O ESPERADO, QUE SUGEREM A DEGRADAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE. .... 83
- FIGURA 2.11: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA CISTEÍNO PEPTIDASE RECOMBINANTE DE *S. LEVIS* EM *P. PASTORIS*. SDS-PAGE 15% CORADO COM COMASSIE BLUE INDICANDO A EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E ATIVAÇÃO DA *rSL-CATHL*; M: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; 1: CÉLULAS DE *PICHIA PASTORIS* (KM71H) CONTROLE NEGATIVO DE INDUÇÃO; 2: CLONE RECOMBINANTE DE *P. PASTORIS* (KM71H) TRANSFORMADO COM O PLASMÍDEO PPICZAC-*rSL-CATHL* INDUZIDO 24H COM A ADIÇÃO DE METANOL [0,75%]; 3: ENZIMA PURIFICADA NA FRAÇÃO 50 mM DE IMIDAZOL (PH 8,0); 4: FRAÇÕES PURIFICADAS DIALISADAS EM PH 8,0; 5: *rSL-CATHL* MADURA APÓS DIÁLISE EM PH 5,0. A SETA BRANCA INDICA A PRÓ-ENZIMA COM MASSA MOLECULAR DE 42 KDA, ENQUANTO A SETA PRETA EVIDENCIA A ENZIMA EM SUA FORMA MADURA, COM APROXIMADAMENTE 39 KDA. .... 84
- FIGURA 2.12: ANÁLISE DE SDS-PAGE 12% COM *rSL-CATHL* APÓS OS TRATAMENTOS COM GLICOSIDASES INDICANDO AUSÊNCIA DE GLICOSILAÇÃO. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR. AS CABEÇAS DE SETA PREENCHIDAS EM PRETO INDICAM A *rSL-CATHL*. (A) TRATAMENTO COM N-GLICOSIDASES; 1: *rSL-CATHL* CONTROLE; 2: *rSL-CATHL* APÓS O TRATAMENTO COM PNGASE F; 3: ENZIMA RECOMBINANTE APÓS O TRATAMENTO COM ENDOGLICOSIDASE H. A SETA BRANCA INDICA A BANDA RELATIVA À PNGASE F DE 36 KDA, ENQUANTO A SETA PRETA INDICA A ENDOGLICOSIDASE H COM MASSA ESTIMADA DE 29 KDA. (B) TRATAMENTO DA *rSL-CATHL* COM A O-GLICOSIDASE; 4: *rSL-CATHL* NÃO TRATADA, CONTROLE; 5: ENZIMA RECOMBINANTE ADICIONADA DE O-GLICOSIDASE, COM MASSA MOLECULAR ELEVADA (147 KDA), INDICADA PELA SETA ESCURA E NEURAMINIDASE, COM MASSA MOLECULAR PRÓXIMA A 40 KDA, INDICADA PELA SETA NÃO PREENCHIDA. .... 86
- FIGURA 2.13: ATIVIDADE DA ENZIMA *rSL-CATHL* EM FUNÇÃO DO PH. AS MEDIDAS DE ATIVIDADE FORAM REALIZADAS EM REAÇÕES COM DIFERENTES TAMPÕES VARIANDO OS VALORES DE PH ENTRE 3,0 A 10,0. O PH ÓTIMO IDENTIFICADO PARA A ENZIMA *rSL-CATHL* RECOMBINANTE FOI 6,0. A ATIVIDADE RESIDUAL É PERCEPTÍVEL DO PH 4,8 A 7,6..... 87

- FIGURA 2.14: CURVAS DE ESTABILIDADE TÉRMICA (TRACEJADO) E ATIVIDADE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (LINHA CONTÍNUA) PARA A *rSL-CATHL*. AS CURVAS MOSTRAM O COMPORTAMENTO DA ENZIMA RECOMBINANTE COM ATIVIDADE CATALÍTICA MÁXIMA A 37 °C, E EVIDENCIAM SUA ACENTUADA INSTABILIDADE TÉRMICA. .... 88
- FIGURA 2.15: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA *rSL-CATHL* RECOMBINANTE. OS GRÁFICOS (A) E (B) REPRESENTAM A HIDRÓLISE DOS SUBSTRATOS Z-LEU-ARG-AMC E Z-PHE-ARG-AMC, RESPECTIVAMENTE, EM FUNÇÃO DO TEMPO. A EFICIÊNCIA CATALÍTICA ( $K_{CAT}/K_M$ ) DA *rSL-CATHL* PARA A HIDRÓLISE DO SUBSTRATO Z-PHE-ARG-AMC FOI DE 2.07  $MM S^{-1}$  E PARA Z-LEU-ARG-AMC FOI DE 37.53  $MM S^{-1}$ . ESTE RESULTADO INDICA PREFERÊNCIA DA *rSL-CATHL* PARA O SUBSTRATO Z-LEU-ARG-AMC E ESTÁ DE ACORDO COM O COMPORTAMENTO DE ENZIMAS DO TIPO CATEPSINA L..... 89
- FIGURA 2.16: CURVA DE HIDRÓLISE DO SUBSTRATO Z-LEU-ARG-AMC ADICIONADO EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES VARIANDO ENTRE 0,1 E 10,5  $\mu M$  (CF) PARA A DETERMINAÇÃO DO PARÂMETRO CINÉTICO  $K_M$  DA *rSL-CATHL*. O CÁLCULO DA CONSTANTE ( $K_M$ ) FOI REALIZADO POR REGRESSÃO NÃO LINEAR UTILIZANDO O PROGRAMA GRAFIT (LEATHERBARROW, 1992) E O VALOR DETERMINADO PARA A CONSTANTE FOI 1,79  $\mu M$ . .... 91
- FIGURA 2.17: GRÁFICOS DAS ATIVIDADES INIBITÓRIAS DAS CANACISTATINAS SOBRE A *rSL-CATHL*. A TABELA DA FIGURA INDICA OS VALORES DE  $K_I$  ESTIMADOS PARA OS INIBIDORES. OS GRÁFICOS REPRESENTAM A CURVA DE INIBIÇÃO DE CADA INIBIDOR, OBTIDA PELO CÁLCULO DA ATIVIDADE RESIDUAL DA *rSL-CATHL* À MEDIDA QUE O INIBIDOR FOI ADICIONADO. DENTRE AS CANACISTATINAS, A CANECPI-1 ( $K_I = 3 \mu M$ ) FOI O INIBIDOR MENOS EFICIENTE E A CANECPI-4 ( $K_I = 0,196 \mu M$ ) O MELHOR INIBIDOR CONTRA A *rSL-CATHL*. NOTE, NO CANTO INFERIOR DIREITO DOS GRÁFICOS, A ESCALA E ORDEM DE DILUIÇÃO DOS INIBIDORES UTILIZADOS PARA ANULAR A ATIVIDADE DA *rSL-CATHL*. .... 92
- FIGURA 2.18: IMUNODETECÇÃO DA *rSL-CATHL* E DA ENZIMA NATIVA DO INSETO (A): PROTEÍNAS SEPARADAS EM SDS-PAGE 15% CARREGADAS EM QUANTIDADES SIMILARES UTILIZADAS NA IMUNODETECÇÃO. (B): PROTEÍNAS TRANSFERIDAS PARA MEMBRANA DE PVDF INCUBADAS COM ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*rSL-CATHL* NA DILUIÇÃO DE 1:10.000. M: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR; 1: CONTROLE NEGATIVO DA EXPRESSÃO, 144 H APÓS A ADIÇÃO DE METANOL (*P. PASTORIS* TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO SEM INSERTO); 2: SOBRENADANTE DA INDUÇÃO DA *rSL-CATHL* 144 H APÓS A ADIÇÃO DE METANOL ; 3: FRAÇÃO DE ENZIMA PURIFICADA EM PH 8,0 (50MM DE IMIDAZOL); 4: APROXIMADAMENTE 12  $\mu G$  DA MESMA FRAÇÃO PURIFICADA, APÓS DIÁLISE EM TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO, PH 8,0; 5: FRAÇÃO PROTÉICA EXTRAÍDA DO CONTEÚDO DO TUBO INTESTINAL DE *S. LEVIS*. A SETA PRETA INDICA A *rSL-CATHL* COMO PRÓ-ENZIMA, ENQUANTO A SETA BRANCA MOSTRA A ENZIMA NATIVA COM A MASSA MOLECULAR IDÊNTICA À PROTEÍNA PURIFICADA (SOARES-COSTA ET AL, 2011), COM APROXIMADAMENTE 34 kDa, RECONHECIDA PELO ANTICORPO CRIADO CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE..... 95
- FIGURA 2.19: VISÃO DA MORFOLOGIA DO INTESTINO DE *S. LEVIS*. INTESTINO ANTERIOR (IA), INTESTINO MÉDIO (IM), INTESTINO POSTERIOR (IP) E TÚBULOS DE MALPIGHI (TM). O INTESTINO MÉDIO É MAIS DILATADO NA REGIÃO ANTERIOR E FOI SUBDIVIDIDO EM QUATRO VENTRÍCULOS (V1, V2, V3, V4) DE IGUAL COMPRIMENTO. .... 96
- FIGURA 2.20: IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO INDICANDO A PRODUÇÃO DA *SL-CATHL* NATIVA EM UMA CÉLULA EPITELIAL DO INTESTINO MÉDIO DE UMA LARVA DE *S. LEVIS*. AS PARTÍCULAS DE OURO COMPLEXADAS AO ANTICORPO SECUNDÁRIO (ANTI-MOUSE IgG), POSSIBILITAM A VISUALIZAÇÃO DE PONTUAÇÕES ESCURAS QUE CORRESPONDEM À CATEPSINA L NATIVA. A PRODUÇÃO DA ENZIMA NATIVA OCORRE NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO (RE) COM POLIRIBOSSOMOS ASSOCIADOS. AS ENZIMAS RECÉM SINTETIZADAS SÃO DIRECIONADAS PARA O COMPLEXO DE GOLGI (G), ONDE OCORRE A FORMAÇÃO DE VESÍCULAS DE SECREÇÃO (V) CONTENDO A ENZIMA. ESSAS VESÍCULAS SÃO EXPORTADAS ATÉ A BASE DO EPITÉLIO, ONDE SE FUNDEM, LIBERANDO AS ENZIMAS DIGESTIVAS NA LUZ DO INTESTINO. M: MITOCÔNDRIA. .... 97



- FIGURA 2.21: IMUNOLocalização da *SL-CATHL* no intestino médio da larva de *S. LEVIS*. As imagens da MET dos cortes dos quatro ventrículos indicam que a *SL-CATHL* é produzida em toda extensão do intestino médio, desde V1 até V4. As setas escuras indicam as vesículas de secreção marcadas com o anticorpo produzido em camundongos contra a proteína recombinante *SL-CATHL*. ..... 98
- FIGURA 2.22: ANÁLISES DA EXPRESSÃO RELATIVA DA CATEPSINA L DE *S. LEVIS* POR QRT-PCR. (A) EXPRESSÃO RELATIVA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO, EM CONDIÇÕES DE DIETA ARTIFICIAL, INDICANDO QUE A *SL-CATHL* É PRINCIPALMENTE PRODUZIDA NOS ESTÁGIOS LARVAIS DE DESENVOLVIMENTO QUANDO CONSTITUI A PRINCIPAL ENZIMA DIGESTIVA. AS LARVAS DE 30 DIAS APRESENTARAM O MAIOR VALOR DE EXPRESSÃO RELATIVA DA ENZIMA, 1257 VEZES MAIS EXPRESSA DO QUE NAS PUPAS. NOS OVOS HÁ UMA EXPRESSÃO BASAL (1,29 x). A BAIXA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS NO ADULTO (11,53 x) INDICA QUE O SISTEMA DIGESTIVO DOS ADULTOS É DIFERENTE. (B) EXPRESSÃO TECIDO-ESPECÍFICA DA CATEPSINA L, INDICA A SÍNTESE DA ENZIMA FUNDAMENTALMENTE NO INTESTINO MÉDIO E COMPROVA O SEU PAPEL COMO ENZIMA DIGESTIVA. .... 99
- FIGURA 3.1: MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA MAQUINARIA DE SILENCIAMENTO GÊNICO VIA ADMINISTRAÇÃO DE dsRNA (TRADUZIDO DE BELLÉS, 2010). EXPLICA OS PASSOS ENVOLVIDOS NA DEGRADAÇÃO DO RNAM ALVO NA PRESENÇA DO dsRNA CORRESPONDENTE QUE INDUZ O SILENCIAMENTO GÊNICO. .... 103
- FIGURA 3.2. REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS DE DISPARO DA MAQUINARIA DE SILENCIAMENTO GÊNICO EM INSETOS, VIA INJEÇÃO OU INGESTÃO DE dsRNA. A: AS MOLÉCULAS DE dsRNA ADMINISTRADAS VIA ALIMENTAÇÃO SÃO ABSORVIDAS NO INTESTINO MÉDIO (IM), A ÚNICA REGIÃO DO INTESTINO NÃO REVESTIDA PELA CUTÍCULA DE QUITINA INDICADA EM MARROM NO INTESTINO ANTERIOR (IA) E POSTERIOR (IP) (ADAPTADO DE GATEHOUSE E PRICE, 2011). B: A ABSORÇÃO DO dsRNA NAS CÉLULAS DO EPITÉLIO DO INTESTINO É MEDIADA PELAS PROTEÍNAS TRANSMEMBRANAS SID 1 E 2, ASSIM COMO POR MECANISMOS DE ENDOCITOSE. OS MECANISMOS DE AMPLIFICAÇÃO DO dsRNA INTRACELULAR AINDA NÃO SÃO CONHECIDOS EM INSETOS, DEVIDO À AUSÊNCIA DE UMA PROTEÍNA HOMÓLOGA DA RNA DEPENDENTE RNA POLIMERASE (RdRP), RESPONSÁVEL PELA AMPLIFICAÇÃO DO SINAL DOS dsRNA QUE DISPARA A RESPOSTA SISTÊMICA EM MICRO-ORGANISMOS, PLANTAS E NEMÁTODOS (ADAPTADO DE PRICE E GATEHOUSE, 2008). .... 106
- FIGURA 3.3: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS ENTRE AS SERPINAS 1 E 2 DE *SPHENOPHORUS LEVIS*, COM AS PROTEÍNAS MAIS SIMILARES IDENTIFICADAS PELA ANÁLISE DE BLASTX CONTRA O BANCO DE DADOS DE *TRIBOLIUM CASTANEUM* DISPONÍVEL NO GENBANK. OS RESÍDUOS IDÊNTICOS ESTÃO INDICADOS EM CAIXAS ESCURAS, ENQUANTO OS RESÍDUOS CONSERVADOS SÃO MOSTRADOS NAS CAIXAS CLARAS. A BAIXA SIMILARIDADE DA SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA QUE CODIFICA O GENE DA SERPINA 1 DE *S. LEVIS* REFLETE NA DIFICULDADE DE IDENTIFICAÇÃO DO GENE HOMÓLOGO EM *T. CASTANEUM*. A SERPINA 6 DE *T. CASTANEUM* FOI ESCOLHIDA COMO A PROVÁVEL PROTEÍNA HOMÓLOGA DA SERPINA 1 DE *S. LEVIS* EM FUNÇÃO DE SUA MAIOR SIMILARIDADE E IDENTIDADE DE AMINOÁCIDOS NO REACTIVE CENTER LOOP (RCL), CONTENDO UMA ARGININA (R) NA POSIÇÃO CONHECIDA PARA A CLIVAGEM POR TRIPSINA BOVINA (FONSECA ET AL., 2011). .... 126
- FIGURA 3.4: ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PROTÉICA DA SERPINA DE *S. LEVIS* (SPN1) COM A PROVÁVEL HOMÓLOGA DE *T. CASTANEUM* (SPN6). AS PROTEÍNAS APRESENTAM 44,5% DE IDENTIDADE DE AMINOÁCIDO. DESCONSIDERANDO A DIFERENÇA NO TAMANHO DAS PROTEÍNAS DEVIDO À MAIOR EXTENSÃO DA EXTREMIDADE N-TERMINAL DA SPN1 A IDENTIDADE CHEGA A 49%. AS CAIXAS CINZAS REPRESENTAM REGIÕES DE IDENTIDADE. NOTE OS AMINOÁCIDOS P1 E P1' CONSERVADOS NO LOOP QUE É CLIVADO PELA PEPTIDASE. A ARGININA (R<sup>350</sup>) INDICADA COM O ASTERISCO CORRESPONDENTE AO AMINOÁCIDO P1 DA ANTI TROMBINA HUMANA, O QUAL INTERAGE COM O RESÍDUO DE GLUTAMATO (E<sup>195</sup>) NESSE INIBIDOR (JOHNSON ET AL., 2006), TAMBÉM É CONSERVADO ENTRE A SPN1 E SPN6. .... 128

- FIGURA 3.5. SEQUÊNCIAS DE DNA QUE CODIFICAM AS ORFS DA SPN1 E SPN6. AS CAIXAS CINZAS INDICAM AS REGIÕES DE IDENTIDADE ENTRE OS GENES, QUE COMPARTILHAM 52,45% DE IDENTIDADE. AS SETAS CONTÍNUAS PRETAS E LARANJAS INDICAM OS PRIMERS UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DOS DSRNAs DA SPN1 E SPN6, RESPECTIVAMENTE. NOTE QUE A SEQUÊNCIA CLONADA DA SPN1 PARA A PRODUÇÃO DE DSRNA (400 PB), COM OS QUAIS AS LARVAS DE *T. CASTANEUM* TAMBÉM FORAM INJETADAS NÃO COMPARTILHA MAIS DO QUE OITO NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIAIS IDÊNTICOS À SPN6. AS SETAS SECCIONADAS REPRESENTAM OS PRIMERS UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES DE qRT-PCR, EM PRETO PARA *S. LEVIS* E LARANJA PARA *T. CASTANEUM*. ..... 129
- FIGURA 3.6: ALINHAMENTO ENTRE OS FRAGMENTOS DE CDNA CLONADOS DAS V-ATPASES E DE *S. LEVIS* E *T. CASTANEUM* PARA A PRODUÇÃO DE DSRNA. OS AMPLICONS PARA AS SEQUÊNCIAS DE *T. CASTANEUM* E *S. LEVIS* TEM 341 E 334 PB, RESPECTIVAMENTE, E APRESENTAM 77,84% DE IDENTIDADE DE SEQUÊNCIA DE DNA, COM ATÉ 38 NUCLEOTÍDEOS IDÊNTICOS EM TANDEM (POSIÇÃO 43 A 80 DA ORF). AS ORFS COMPLETAS COMPARTILHAM 71,68% DE IDENTIDADE. AS SETAS CONTÍNUAS PRETAS E LARANJAS INDICAM OS PRIMERS UTILIZADOS PARA A CLONAGEM E PRODUÇÃO DE DSRNAs DAS V-ATPASES E DE *S. LEVIS* E *T. CASTANEUM*, RESPECTIVAMENTE. AS SETAS SECCIONADAS CORRESPONDEM AOS PRIMERS UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES DE RT-PCR, INDICADOS PELO MESMO PADRÃO DE COR, PRETO PARA *S. LEVIS* E LARANJA PARA *T. CASTANEUM*. ..... 131
- FIGURA 3.7: SÍNTESE DE SSRNA. GEL DE AGAROSE 1% (TBE 0,5X) NÃO DESNATURANTE, INDICANDO PRODUÇÃO DE SSRNAs COM O SISTEMA DE TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* MEGASCRIPT T7 TRANSCRIPTION KIT (APPLIED BIOSYSTEMS / AMBION). QUANTIDADES VARIANDO DE 0,9 A 2,6 µG DE SSRNA FORAM CARREGADOS EM CADA CANELETA. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR. 1 E 2: SSRNAs SENSE E ANTISENSE DA V-ATPASE E DE *S. LEVIS*; 3 E 4 : SSRNAs SENSE E ANTISENSE DA SPN1; 5 E 6 SSRNAs SENSE E ANTISENSE DO GENE QUE CODIFICA RESISTÊNCIA À KANAMICINA. NAS CANELETAS 2 E 4 É OBSERVADA A FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PARA AS FITAS ANTISENSE DA V-ATPASE E E SPN1, O QUE É ESPERADO PARA UM GEL NÃO DESNATURANTE. O MATERIAL FOI PRECIPITADO, PURIFICADO E QUANTIFICADO PARA A HIBRIDIZAÇÃO E PRODUÇÃO DOS DSRNAs. .... 132
- FIGURA 3.8: ANÁLISE DE qRT-PCR INDICANDO O PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES DE *T. CASTANEUM* AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO. (A) EXPRESSÃO RELATIVA DA V-ATPASE E INDICANDO QUE O GENE É TRANSCRITO EM TODOS OS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO EM NÍVEIS NÃO MUITO DISTINTOS. (B) A ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA SPN6 EVIDENCIOU A TRANSCRIÇÃO DESSE GENE TAMBÉM DURANTE TODAS AS FASES ANALISADAS, COM NÍVEIS CRESCENTES AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO E EXPRESSÃO MÁXIMA NAS PUPAS. .... 133
- FIGURA 3.9: ANÁLISE DE qRT-PCR INDICANDO O PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A SERPINA DE *SPHENOPHORUS LEVIS* (SPN1). (A) EXPRESSÃO RELATIVA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO, EM CONDIÇÕES DE DIETA ARTIFICIAL, INDICANDO QUE O GENE É TRANSCRITO EM TODOS OS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO, COM EXPRESSÃO MÁXIMA EM PUPAS, ÍNDICES ELEVADOS DE TRANSCRIÇÃO TAMBÉM SÃO DETECTADOS NOS OVOS (0,66 x) E ADULTOS (0,64 x). (B) A ANÁLISE DE EXPRESSÃO TECIDO ESPECÍFICA DA SERPINA APONTA A TRANSCRIÇÃO EM TODOS OS TECIDOS, COM ÍNDICES REDUZIDOS NO INTESTINO. NO CORPO GORDUROSO, A ENZIMA É 100 (x) MAIS TRANSCRITA DO QUE NO INTESTINO MÉDIO (IM) E 20 (x) MAIS DO QUE NO INTESTINO POSTERIOR (IP). TRANSCRITOS DA SERPINA TAMBÉM FORAM DETECTADOS EM NÍVEIS INTERMEDIÁRIOS NA EPIDERME, CABEÇA E HEMOLINFA. .... 135
- FIGURA 3.10: ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA DA V-ATPASE E DE *S. LEVIS* POR qRT-PCR. (A) O PERFIL DE EXPRESSÃO AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO INDICA EXPRESSÃO CONSTITUTIVA, EM TAXAS NÃO MUITO DISTINTAS. (B) A ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO

- TECIDO ESPECÍFICA MOSTRA A TRANSCRIÇÃO PREDOMINANTE DA V-ATPASE E NO INTESTINO DAS LARVAS DO INSETO, MAS TAMBÉM É DETECTADA EM NÍVEIS CONSIDERÁVEIS EM TODOS OS OUTROS TECIDOS. .... 136
- FIGURA 3.11: LARVAS DE *T. CASTANEUM* INJETADAS COM DSRNA DA V-ATPASE E ORTÓLOGA DE *S. LEVIS*, APÓS CINCO SEMANAS DAS INJEÇÕES. O FENÓTIPO OBSERVADO PARA O TRATAMENTO COM DSRNA DO GENE ENDÓGENO É O MESMO. ESSES INSETOS MORRERAM 12 DIAS APÓS AS INJEÇÕES, TRÊS DIAS ANTES DAQUELES INJETADOS COM O DSRNA DO GENE ENDÓGENO DO INSETO..... 138
- FIGURA 3.12: LARVAS DE *T. CASTANEUM* INJETADAS COM DSRNA DA SERPINA 6 DO INSETO. APARENTEMENTE AS LARVAS E PUPAS (A) SE DESENVOLVERAM NORMALMENTE, ENTRETANTO TODOS OS INSETOS MORRERAM NO FIM DA FASE PUPAL OU COMO ADULTOS EMERGENTES (B). O PRIMEIRO ADULTO APRESENTA AS ASAS MALFORMADAS, ENQUANTO OS OUTROS DOIS NÃO PERDERAM A CUTÍCULA DA FASE DE PUPA, MORRENDO COMO ADULTOS FARADOS. AS IMAGENS DOS ADULTOS FORAM TIRADAS 35 DIAS APÓS AS INJEÇÕES. .... 140
- FIGURA 3.13: DESENVOLVIMENTO NORMAL DAS LARVAS DE *T. CASTANEUM* INJETADAS COM DSRNA DA KANAMICINA (R). A: VISÃO DORSO LATERAL E VENTRAL DE LARVAS; B: VISÃO VENTRAL DE PUPAS; C: VISÃO DORSAL E VENTRAL DE ADULTOS. ESSE GRUPO DE INSETOS COMPLETOU NORMALMENTE O CICLO DE VIDA, ASSIM COMO AQUELES INJETADOS COM DSRNA DA SPN1 DE *S. LEVIS*. .... 141
- FIGURA 3.14: ANÁLISE DO SILENCIAMENTO DA V-ATPASE E DE *T. CASTANEUM* POR QRT-PCR. TANTO NAS LARVAS INJETADAS COM DSRNA DA V-ATPASE DO PRÓPRIO INSETO, QUANTO COM DSRNA DO GENE ORTÓLOGO DE *S. LEVIS* FOI DETECTADA A REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DA V-ATPASE PARA 14,22% E 15,99%, RESPECTIVAMENTE, QUANDO COMPARADAS COM OS INSETOS INJETADOS COM DSRNA CONTROLE DA KANAMICINA (R). A BARRA CINZA INDICA O NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO NAS LARVAS NÃO INJETADAS (1 x). .... 142
- FIGURA 3.15: ANÁLISE DE RT-PCR UTILIZANDO PRIMERS ESPECÍFICOS PARA AVALIAR O EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DA SPN6 DE *T. CASTANEUM*. APENAS AS LARVAS INJETADAS COM DSRNA DE 341 PB SEQUÊNCIA ESPECÍFICO PARA A SPN6 APRESENTARAM REDUÇÃO MÉDIA DE 81,05% NOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DA SERPINA 6. OS INSETOS TRATADOS COM DSRNA DA SPN1 DE *S. LEVIS* EXIBIRAM NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DA SPN6 SIMILARES AOS CONTROLES TRATADOS COM DSRNA DA KANAMICINA (R)..... 145
- FIGURA 3.16: LARVA DE *S. LEVIS* INJETADA COM DSRNA DA KANAMICINA (R). APENAS UM INSETO CHEGOU À FASE ADULTA (C), DEVIDO ÀS CONDIÇÕES DE CULTIVO. AS LARVAS (A) E PUPAS (B) SE DESENVOLVERAM NORMALMENTE, MAS QUATRO PUPAS SOFRERAM O ATAQUE DE FUNGOS DEVIDO AO EXCESSO DE UMIDADE NO FRASCO DE CULTIVO..... 147
- FIGURA 3.17: LARVAS DE *S. LEVIS* APÓS 44 DIAS DO TRATAMENTO COM DSRNA DA V-ATPASE E. QUATRO DAS SEIS LARVAS INJETADAS COM DSRNA DA V-ATPASE MORRERAM ATÉ O DIA 20 APÓS AS INJEÇÕES. A TERCEIRA LARVA MOSTRADA NA FIGURA APRESENTA UMA CICATRIZ NA REGIÃO POSTERIOR DEVIDO À PROVÁVEL LISE DO INTESTINO, RESULTANTE DO DESEQUILÍBRIO OSMÓTICO CAUSADO PELA PERDA DE FUNÇÃO DA V-ATPASE..... 148
- FIGURA 3.18: COMPARAÇÃO ENTRE OS INSETOS TRATADOS COM OS DIFERENTES DSRNAS, 23 DIAS APÓS AS INJEÇÕES. NESSA ETAPA, QUATRO INSETOS MOSTRADOS NA ÚLTIMA LINHA, INJETADOS COM O DSRNA DA V-ATPASE E MORRERAM. A MAIORIA DOS INSETOS TRATADOS COM DSRNA DA SERPINA 1 APRESENTAVAM MENOR TAMANHO EM RELAÇÃO AOS CONTROLE..... 149
- FIGURA 3.19: DIFERENÇAS OBSERVADAS NOS TRÊS DIFERENTES GRUPOS TRATADOS COM DSRNA, 44 DIAS APÓS AS INJEÇÕES. DOIS INSETOS DOS GRUPOS INJETADOS COM DSRNA DA V-ATPASE E E SERPINA 1 SE DESENVOLVERAM NORMALMENTE E NÃO SÃO

REPRESENTADOS NA FIGURA. ENTRETANTO, É EVIDENTE O ATRASO NO DESENVOLVIMENTO DO GRUPO TRATADO COM DSRNA DA SERPINA 1. ....	150
FIGURA 3.20: RNA TOTAL EXTRAÍDO DAS LARVAS DE <i>S. LEVIS</i> INJETADAS COM DSRNA. GEL DE AGAROSE 1% (TBE 1X) INDICANDO A QUALIDADE DOS RNAs TOTAIS EXTRAÍDOS DAS LARVAS DE <i>S. LEVIS</i> INJETADAS COM DSRNA, APÓS TRATAMENTO COM DNASE. APROXIMADAMENTE 500 NG DE CADA AMOSTRA, FORMADA POR UM CONJUNTO DE TRÊS INSETOS INJETADOS, FORAM UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DO CDNA QUE SERVIU DE MOLDE PARA AS ANÁLISES DE SILENCIAMENTO VIA RT-PCR. ....	151
FIGURA 3.21: ANÁLISE DO SILENCIAMENTO GÊNICO DA V-ATPASE DE <i>S. LEVIS</i> UTILIZANDO OS GENES GAPDH (A) E B-ACTINA (B) COMO GENES CALIBRADORES. A REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO EM RELAÇÃO AOS INSETOS INJETADOS COM DSRNA DA KANAMICINA (R) FOI DE 33,75% E 46% RESPECTIVAMENTE. AS BARRAS CINZAS MOSTRAM OS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DETECTADOS PARA OS INSETOS NÃO INJETADOS (N.I.), UTILIZADOS COMO PADRÃO (1 X). ....	151
FIGURA 3.22: ANÁLISE DO SILENCIAMENTO GÊNICO DA SERPINA 1 DE <i>S. LEVIS</i> . OS INSETOS INJETADOS COM DSRNA DA SPN1 TIVERAM A REDUÇÃO DOS NÍVEIS DOS TRANSCRITOS PARA 10,13% EM RELAÇÃO AOS INSETOS TRATADOS COM DSRNA DA KANAMICINA (R). ....	153
FIGURA 3.23: DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS DE <i>S. LEVIS</i> INJETADAS COM DSRNA DA SERPINA 1. AS LARVAS (A) TRATADAS COM DSRNA DA SERPINA APRESENTARAM REDUÇÃO DO GANHO DE PESO COMPARADO AOS CONTROLES. AS IMAGENS DAS PUPAS (B) E ADULTOS (C) FORAM CAPTURADAS NO DIA 22/07/2011, 95 DIAS APÓS AS INJEÇÕES. B: DOIS INSETOS MORRERAM NO ESTÁGIO DE PUPA; C: DOIS DOS QUATRO ADULTOS MORTOS APRESENTARAM MAL FORMAÇÃO DAS ASAS. AS SETAS INDICAM MAL FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INCOMPLETO DOS ÉLITROS, RESPECTIVAMENTE. ....	154

## Lista de tabelas

TABELA 1.0: SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE REAL-TIME PCR, INDICANDO O TAMANHO DOS AMPLICONS....	16
TABELA 1.1: ANOTAÇÃO DOS ESTS DAS LARVAS DE <i>S. LEVIS</i> DE ACORDO COM SEU ENVOLVIMENTO. A: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS; B: DIGESTÃO DE CARBOIDRATOS; C: DIGESTÃO DE LÍPÍDEOS; D: PROTEÍNAS ACESSÓRIAS; E: PEPTIDASES CARACTERIZADAS COMO NÃO DIGESTIVAS. OS ASTERISCOS INDICAM OS GENES QUE TIVERAM O PERFIL DE TRANSCRIÇÃO AVALIADO POR RT-PCR.....	26
TABELA 1.2: VARIANTES DA <i>SL-CATHL</i> INDICADAS DE ACORDO COM A ABUNDÂNCIA DE ESTS E VARIANTES DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM CADA <i>CONTIG</i> A PARTIR DA ANÁLISE MANUAL. ....	37
TABELA 2.1: RELAÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES (M.M) E PONTO ISOELÉTRICO (P.I.) ESTIMADOS PARA A ENZIMA NATIVA E RECOMBINANTE ( <i>rSL-CATHL</i> ). NOTE AS DIFERENÇAS NO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR OBSERVADAS PARA AS PROTEÍNAS DESCRITAS ABAIXO. ANÁLISES REALIZADAS EM: <a href="http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool">HTTP://WEB.EXPASY.ORG/CGI-BIN/COMPUTE_PI/PI_TOOL</a> . ....	85
TABELA 2.2: PARÂMETROS CINÉTICOS DESCRITOS PARA CATEPSINAS L SELECIONADAS DE OUTROS INSETOS: <i>TENEBRIO MOLITOR</i> E <i>DIABROTICA VIRGIFERA</i> (COLEOPTERA), <i>BOMBYX MORI</i> (LEPIDOPTERA), <i>SARCOPHAGA PEREGRINA</i> (DIPTERA).....	90
TABELA 2.3: COMPARAÇÃO ENTRE AS CONSTANTES DE INIBIÇÃO OBTIDAS PARA A <i>rSL-CATHL</i> E PARA A FRAÇÃO DE ENZIMA PURIFICADA DO INTESTINO (DELLAMANO, 2009; SOARES-COSTA ET AL., 2011). OS RESULTADOS EVIDENCIAM A POTÊNCIA DO INIBIDOR CANECPI-4 CONTRA AMBAS ENZIMAS.....	93
TABELA 3.1: SEQUÊNCIA 5' - 3' DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DOS cDNAs NO VETOR pLITMUS 28i, UTILIZADO PARA A SÍNTESE DOS dsRNAs. OS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO ESTÃO SUBLINHADOS NAS SEQUÊNCIAS .....	118
TABELA 3.2: SEQUÊNCIA 5' - 3' DOS <i>PRIMERS</i> DESENHADOS PARA AS ANÁLISES DE RT-PCR. A PENÚLTIMA COLUNA INDICA A REGIÃO DE HIBRIDIZAÇÃO DESSES <i>PRIMERS</i> NA SEQUÊNCIA GÊNICA, EM RELAÇÃO À ORF. ....	123
TABELA 3.3: CONTAGEM DAS LARVAS MORTAS DE <i>T. CASTANEUM</i> APÓS INJEÇÃO COM dsRNA E PBS. DIARIAMENTE, DURANTE SETE DIAS, TRÊS EXEMPLARES DE CADA TRATAMENTO FORAM COLETADOS. NESTA ETAPA, AS MORTES PODEM SER ATRIBUÍDAS AO VAZAMENTO DE HEMOLINFA DECORRENTE DAS INJEÇÕES. ....	137
TABELA 3.4: MONITORAMENTO DAS LARVAS DE <i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i> INJETADAS COM dsRNAs E PBS ATÉ A FASE ADULTA. TODOS OS INSETOS INJETADOS COM dsRNA DAS V-ATPASES DOS DOIS INSETOS MORRERAM NA SEGUNDA SEMANA APÓS A INJEÇÃO, E APARECEM DESTACADOS EM VERDE. AS CAIXAS CINZAS INDICAM QUE NÃO HÁ ATRASO NO DESENVOLVIMENTO DOS INSETOS INJETADOS COM dsRNA DAS SERPINAS, EM RELAÇÃO AOS CONTROLES. A ÚLTIMA COLUNA, DESTACADA EM LARANJA, MOSTRA O RESULTADO FINAL COM VÁRIOS INSETOS DE AMBOS CONTROLES ATINGINDO A FASE ADULTA, ALÉM DAQUELES INJETADOS COM dsRNA DA SERPINA 1 DE <i>S. LEVIS</i> . ....	139
TABELA 3.5: CONTAGEM DAS LARVAS DE <i>SPHENOPHORUS LEVIS</i> INJETADAS COM dsRNAs DURANTE OS DIAS DE COLETA PARA AS ANÁLISES DE RT-PCR. O QUADRO CINZA INDICA O GRANDE NÚMERO DE INSETOS MORTOS NO PRIMEIRO DIA APÓS A INJEÇÃO DEVIDO AO VAZAMENTO DA HEMOLINFA. O NÚMERO DE INSETOS RESTANTES PARA AS ANÁLISES FENOTÍPICAS É MOSTRADO NO QUADRO LARANJA. ....	146
TABELA 3.6: MONITORAMENTO DAS LARVAS DE <i>S. LEVIS</i> RESTANTES APÓS AS COLETAS PARA ANÁLISE DO SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RT-PCR, ATÉ 59 DIAS APÓS AS INJEÇÕES. QUATRO DAS SEIS LARVAS INJETADAS COM dsRNA DA V-ATPASE MORRERAM DENTRO DE TRÊS SEMANAS APÓS A INJEÇÃO E SÃO DESTACADAS NO QUADRO VERDE. AS CAIXAS CINZAS RESSALTAM O ATRASO NO DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS INJETADAS COM dsRNA DA SERPINA 1, EVIDENTE NO DIA 52.....	148

TABELA 3.7: RELAÇÃO DO GANHO DE PESO APÓS A INJEÇÃO DAS LARVAS. A MAIORIA DOS INSETOS INJETADOS COM dsRNA DA V-ATPASE E E SERPINA EXIBIRAM UMA EVIDENTE DEFICIÊNCIA NA INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA, QUANDO COMPARADOS COM O CONTROLE. OS QUADROS CINZA NO 24<sup>o</sup> DIA INDICAM A PESAGEM DOS DOIS INSETOS DE CADA TRATAMENTO QUE SE DESENVOLVERAM SIMILARMENTE AOS CONTROLES, PROVAVELMENTE EM FUNÇÃO DO VAZAMENTO DO dsRNA COM A HEMOLINFA. AS ÚLTIMAS COLUNAS, DESTACADAS EM LARANJA MOSTRAM O ATRASO NO DESENVOLVIMENTO DOS INSETOS INJETADOS COM dsRNA DA SERPINA 1. OS PESOS SÃO MOSTRADOS EM MILIGRAMAS E NÃO POSSUEM BARRA DE ERROS POIS OS INSETOS FORAM PESADOS EM CONJUNTO..... 150

ANEXO 1: ANÁLISE DE CÓDON *USAGE* DAS SEQUÊNCIAS DE CDNA QUE CODIFICAM AS INVERTASES DE *S. LEVIS*, DE LEPIDÓPTEROS E DE BACTÉRIAS. OS CÓDONS SÃO INDICADOS PELA ABUNDÂNCIA (ABUND.) NAS SEQUÊNCIAS DE CDNA E PELA FREQUÊNCIA (FREQ.) EM RELAÇÃO ÀS VARIANTES DAS TRINCAS QUE CODIFICAM O MESMO AMINOÁCIDO. AS CÉLULAS DESTACADAS INDICAM AS DIFERENÇAS ENTRE OS CÓDONS PREFERENCIAIS IDENTIFICADOS PARA AS INVERTASES DE EUCARIOTOS E BACTERIANAS. NO CABEÇALHO, "N" REFERE-SE AO NÚMERO DE SEQUÊNCIAS ANALISADAS E O NÚMERO DE PARES DE BASES (PB) TAMBÉM É INDICADO. PARA A VALIDAÇÃO DA COMPARAÇÃO FORAM UTILIZADAS AS SEQUÊNCIAS DAS PEPTIDASES DE *S. LEVIS* MAIS ABUNDANTES NA BIBLIOTECA, INCLUINDO A *rSl-CATHL*..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

## Sumário

I Introdução .....	1
I.1 A cana-de-açúcar e o contexto produtivo .....	1
I.2 A espécie <i>Sphenophorus levis</i> .....	1
I.3 O controle da praga <i>Sphenophorus levis</i> .....	4
II Justificativa e objetivos gerais .....	6
Capítulo 1: Transcriptoma das larvas de <i>Sphenophorus levis</i> : Conhecendo o inseto.	8
1.1 Introdução.....	9
1.2 Materiais e métodos .....	12
1.2.1 Animais.....	12
1.2.2 Extração do RNA para a construção da biblioteca das larvas de <i>S. levis</i> .....	12
1.2.3 Construção da biblioteca de cDNA das larvas de <i>S. levis</i> e sequenciamento.....	13
1.2.4 Análise do transcriptoma de <i>S. levis</i> .....	14
1.2.5 Análise de expressão gênica relativa por qRT-PCR.....	15
1.2.6 Análises das sequências, alinhamentos e análises filogenéticas ...	18
1.2.7 Construção das mini-bibliotecas comparativas: expressão das variantes de catepsinas L em dieta artificial e campo.....	19
1.3 Resultados e discussão.....	20
1.3.1 Qualificação da biblioteca.....	20
1.3.2 Análise do transcriptoma de <i>S. levis</i> : processamento e anotação das sequências.....	20
1.3.3 Panorama geral da digestão em larvas de <i>S. levis</i> .....	23
1.3.4 Análises de qRT-PCR dos genes selecionados .....	27

1.3.5 Peptidases identificadas no transcriptoma das larvas de <i>S. levis</i> ...	31
1.3.6 Digestão de proteínas e a variabilidade de <i>Sl-CathLs</i> .....	37
1.3.7 Digestão de carboidratos .....	42
1.3.8 Transcritos abundantes que codificam proteínas desconhecidas ..	50
Capítulo 2: Expressão recombinante, localização e inibição <i>in vitro</i> da cisteíno peptidase intestinal de <i>Sphenophorus levis</i> ( <i>Sl-CathL</i> ) .....	52
2.1 Introdução.....	53
2.1.1 Cisteíno peptidases .....	55
2.1.2 Fitocistatinas: proteínas inibidoras de peptidases .....	61
2.1.3 O sistema de expressão de proteínas heterólogas em <i>Pichia pastoris</i> .....	64
2.2 Materiais e métodos .....	66
2.2.1 Coleção de insetos .....	66
2.2.2 Dissecção do intestino e preparo do extrato de proteínas digestivas .....	66
2.2.3 Predição de peptídeo sinal e ocorrência de sítios de glicosilação na proteína <i>Sl-CathL</i> .....	67
2.2.4 Expressão recombinante da cisteíno peptidase de <i>S. levis</i> .....	68
2.2.5 Produção de anticorpos anti- <i>rSl-CathL</i> .....	71
2.2.6 Análises de <i>Western blotting</i> .....	72
2.2.7 Sequenciamento da região N-terminal da <i>Sl-CathL</i> .....	72
2.2.8 Caracterização enzimática da <i>rSl-CathL</i> .....	73
2.2.9 Ensaio de inibição de atividade da <i>rSl-CathL</i> .....	75
2.2.10 Imunolocalização da <i>Sl-CathL</i> no intestino do inseto por microscopia eletrônica de transmissão .....	76
2.3 Resultados e discussão.....	76
2.3.1 Caracterização da sequência da <i>Sl-CathL</i> .....	76



2.3.2	Expressão da <i>Sl-CathL</i> em bactéria .....	82
2.3.3	Expressão recombinante da <i>Sl-CathL</i> em <i>Pichia pastoris</i> .....	83
2.3.4	Ativação da enzima recombinante expressa em <i>Pichia pastoris</i> ....	84
2.3.5	Análises de glicosilação da <i>rSl-CathL</i> .....	85
2.3.6	Ensaio de atividade enzimática da <i>rSl-CathL</i> .....	86
2.3.7	Ensaio de inibição de atividade da <i>rSl-CathL</i> utilizando cistatinas recombinantes de cana-de-açúcar.....	91
2.3.8	Imunolocalização da <i>Sl-CathL</i> no intestino das larvas.....	95
2.3.9	Expressão relativa da <i>Sl-CathL</i> ao longo do desenvolvimento de <i>S. levis</i> .....	99
Capítulo 3: RNA de interferência aplicado ao controle de <i>Sphenophorus levis</i> .....		101
3.1	Introdução.....	102
3.1.1	Mecanismo de ação do RNAi .....	102
3.1.2	RNA de interferência em insetos .....	104
3.1.3	RNAi aplicado ao controle de insetos -praga.....	107
3.1.4	Seleção dos genes alvo para avaliar os efeitos do RNAi em <i>S. levis</i> .....	109
3.2	Materiais e métodos .....	116
3.2.1	Cultura de insetos.....	117
3.2.2	Obtenção das sequências e clonagem dos cDNAs .....	117
3.2.3	Transcrição <i>in vitro</i> e síntese de dsRNAs.....	119
3.2.4	Injeção de dsRNA nas larvas dos insetos .....	121
3.2.5	Análises de qRT-PCR quantitativo .....	121
3.3	Resultados e discussão.....	124
3.3.1	Análise das sequências e clonagem para a produção dos dsRNAs. ....	124

3.3.2	Análise da expressão diferencial tecido específica e durante o desenvolvimento por RT-PCR .....	132
3.3.3	Análise do silenciamento gênico via injeção de dsRNA em <i>Tribolium castaneum</i> .....	137
3.3.4	Análise do silenciamento gênico via injeção de dsRNA em <i>Sphenophorus levis</i> .....	146
III	Considerações finais .....	157
IV	Perspectivas .....	159
V	Referências Bibliográficas.....	160
VI	Anexos .....	179

## I INTRODUÇÃO

### I.1 A cana-de-açúcar e o contexto produtivo

O álcool gerado por meio do processamento da cana-de-açúcar coloca o Brasil em destaque no cenário de produção bioenergética mundial. Considerando que o país possui a melhor tecnologia de produção de álcool a partir da cana-de-açúcar, as maiores barreiras para o desenvolvimento estão na logística produtiva e, fundamentalmente, nas perdas causadas pela infestação das lavouras por pragas (Centro de Tecnologia Canavieira - CTC, 2007).

De acordo com o último levantamento da safra de cana-de-açúcar realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), a produção nacional de cana-de-açúcar em 2011 foi de 571,471 milhões de toneladas, o que representa uma queda de 8,4% em relação à safra 2010/2011. Os fatores climáticos foram os principais responsáveis por essa diminuição da produção no setor que consiste em um dos alicerces da economia brasileira. Estima-se que as perdas na produção de cana-de-açúcar causadas por ataques de pragas em geral atinjam 20% (D'Agostini et al., 2011). Entre as principais pragas que causam prejuízos para a cana-de-açúcar está a larva do besouro *Sphenophorus levis*, popularmente conhecido como "bicudo da cana". O aumento da disseminação e ocorrência deste inseto reforça sua importância, principalmente devido às dificuldades encontradas para seu controle. As larvas desse inseto alimentam-se do rizoma da cana, gerando grandes prejuízos refletidos na diminuição da produtividade, morte das plantas e redução da longevidade do canavial (Almeida, 2005). Os prejuízos causados pelas larvas de *S. levis* atingem cerca de 20 a 30 toneladas/ha/ano nas áreas infestadas das culturas (Leite et al., 2005), o que equivale a uma perda de até 32% da produção de cana-de-açúcar nos focos de ataque do inseto.

### I.2 A espécie *Sphenophorus levis*

Os besouros pertencentes à família Curculionidae (Coleoptera) possuem a cabeça prolongada em um rostro de comprimento variável, antenas em forma de clave e articuladas, que constituem sinapomorfias da família (Kuschel, 1995). Larvas e adultos de uma mesma espécie podem apresentar hábitos alimentares muito diferentes e, em geral, as larvas possuem hábitos alimentares mais restritos que os

adultos. Geralmente as fêmeas utilizam o rostro para perfurar o substrato, preparando um orifício onde depositam os ovos (Vanin, 1990).

Incluído nessa família, o besouro *Sphenophorus levis* varia em tamanho e mede cerca de 8 a 14 mm, sendo as fêmeas geralmente maiores que os machos. Esse inseto tem hábitos noturnos, apresenta pouca agilidade e simula-se de morto quando atacado (Vaurie, 1978). As fêmeas perfuram o rizoma ou a base de brotos realizando a deposição de ovos dos quais eclodem as larvas responsáveis pelos danos. As larvas são brancas, ápodas, de hábitos subterrâneos e alta sensibilidade ao calor e à desidratação. Elas escavam galerias durante a alimentação e danificam os tecidos no interior das bases, o que provoca a morte das plantas e falhas nas brotações durante os próximos cortes (Almeida, 2005) (Figura 1).

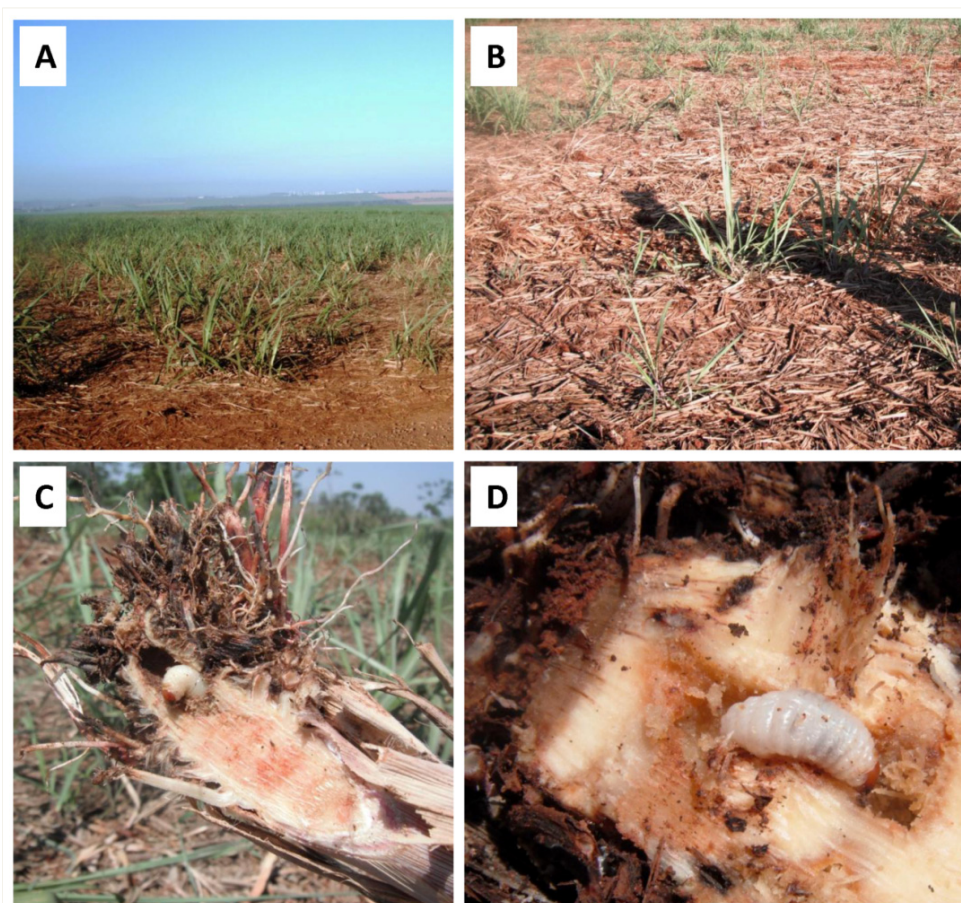


Figura 1: Infestação de *Sphenophorus levis* nos canaviais da Usina da Pedra (Ribeirão Preto-SP). A e B: sintomas das plantas nas áreas infetadas: morte das plantas e falhas no brotamento. C e D: larvas do besouro alimentando-se do rizoma. As galerias cavadas causam a morte das plantas. Fotografado por Fonseca, F. P. P. em outubro de 2011.

No Brasil, o *S. levis* somente foi encontrado em 1977 (Vaurie, 1978) e a expansão das culturas de cana-de-açúcar para outras regiões aumentou sua

ocorrência por todo o centro canavieiro do estado de São Paulo. Atualmente, a ocorrência do inseto tem aumentado significativamente. Em 2009, segundo Almeida, o *S. levis* era encontrado em mais de 30 municípios próximos à região de Piracicaba, além de 23 municípios mais distantes. Na última atualização de focos realizada pelo CTC (2010), a praga foi identificada em 131 municípios, atingindo quatro cidades, além do estado de São Paulo: 3 em Minas Gerais, 1 no Paraná e 1 no Mato Grosso do Sul.

A disseminação da praga por meio do trânsito de mudas infestadas é a hipótese mais provável para explicar a rápida expansão da área infestada, considerando que o inseto possui uma restrita capacidade de vôo, locomoção lenta, e tem uma baixíssima taxa de dispersão (Leite et al., 2005). As mudas de cana podem transportar insetos tanto no interior dos colmos, uma vez que as galerias podem atingir os primeiros internós basais, como entre os colmos depositados no solo após o corte, visto que os insetos adultos frequentemente se alojam entre os colmos, atraídos pela exsudação de açúcares (Dinardo-Miranda, 2005).

As larvas eclodem entre 7 a 12 dias após a postura dos ovos, e se alimentam da parte basal da cana-de-açúcar durante 30 a 60 dias, até cessarem a alimentação para o empupamento. Os adultos emergem das pupas após duas semanas e podem viver até 220 dias (Figura 2) (Almeida 2005; Precetti e Arrigoni, 1990). O número de instares para a fase larval do inseto ainda não foi determinado.

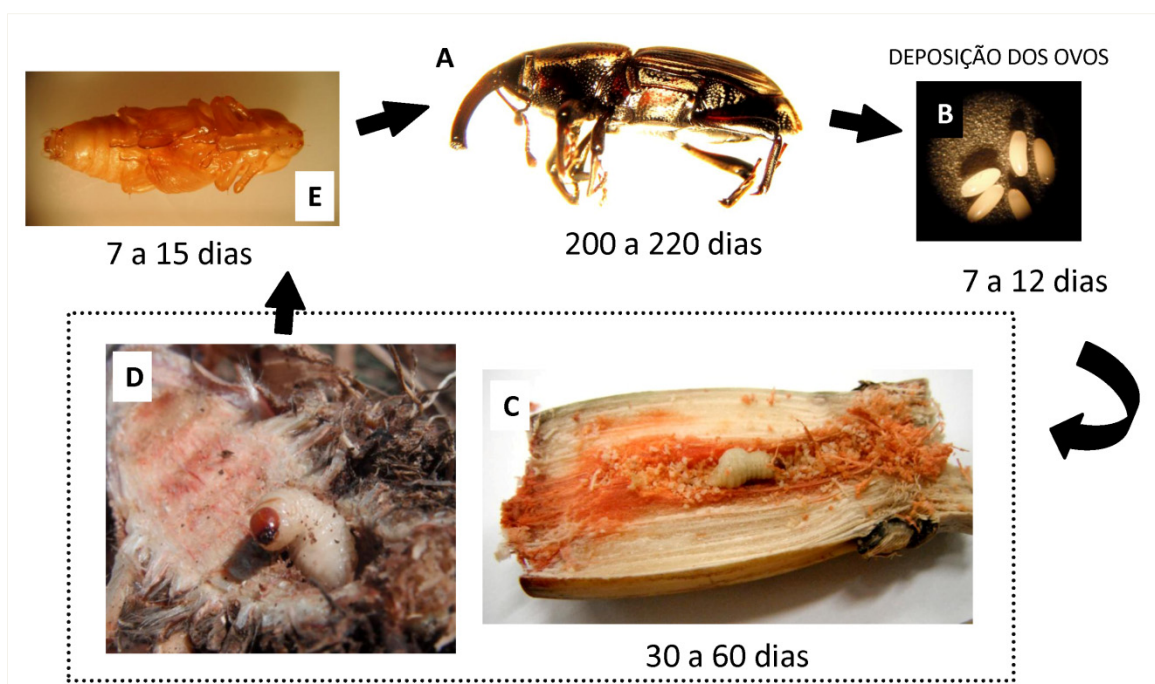


Figura 2: Ciclo de vida do *Sphenophorus levis*. Imagens fotografadas no LBM/UFSCar (A/B/C/E) e Usina da Pedra (Ribeirão Preto-SP) (D). A: fêmea adulta; B: ovos; C e D: larvas se alimentando da cana no laboratório e no campo, respectivamente; E: pupa. Após a postura dos ovos, os insetos levam aproximadamente 60 a 75 dias para atingir fase adulta.

O pico populacional dos adultos ocorre nos meses de fevereiro a março e também em outubro, menos intenso. As larvas são mais frequentes em dezembro e principalmente entre junho e julho (Precetti e Arrigoni, 1990).

### I.3 O controle da praga *Sphenophorus levis*

A utilização de inseticidas sintéticos para o controle de *S. levis* tem eficiência limitada devido ao hábito de vida subterrâneo no estágio larval, onde o alcance e a ação dos inseticidas são reduzidos (Cerdeira et al., 1999). O controle biológico pela utilização de fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* tem apresentado uma eficiência considerável contra *S. levis*. No entanto, o uso de armadilhas patogênicas feitas com toletes de cana (Badilla e Alves, 1989) ou a aplicação dos fungos nas culturas dependem cuidados, o que torna a aplicação extensiva muito cara.

O aumento da importância dessa praga nas culturas de cana levou Zarbin e colaboradores (2003) a investigar a viabilidade de um sistema de controle utilizando um composto sintético muito próximo do feromônio de agregação, mas este método também não mostrou eficiência. Lopes (2002) construiu uma linhagem transgênica de cana-de-açúcar expressando inibidores de cisteína peptidases (chagasina). Contudo, as larvas de *S. levis* alimentadas com as plantas transformadas com o gene da chagasina não morreram ou sofreram atraso no desenvolvimento, provavelmente devido à baixa expressão dos inibidores na planta.

Outros estudos também foram realizados no sentido de identificar alternativas para o controle desse inseto incluindo o isolamento de cepas altamente patogênicas de *Bacillus thuringiensis* (Polanczyk et al., 2004; Cícero et al., 2009) que produzem proteínas (*cry*) tóxicas quando ingeridas pelo inseto. No entanto, nenhum método de entrega efetivo e de baixo custo foi desenvolvido e, até atualmente, o método mais recomendado para o controle da praga é o cultural, que consiste na destruição das soqueiras nas áreas infestadas e o plantio alternado de outras culturas (Almeida, 2005).

Nesse contexto, a utilização de engenharia genética vegetal surge como alternativa para aumentar a resistência das plantas a este inseto. Considerando que a alimentação e o desenvolvimento das larvas de *S. levis* são diretamente dependentes da proteólise digestiva no intestino, a produção de inibidores das enzimas digestivas do inseto em plantas transgênicas pode constituir uma alternativa no combate à praga. Para que a estratégia de inibição seja bem sucedida é preciso que os inibidores sejam eficientes contra as peptidases digestivas das larvas e suficientemente produzidos durante o momento do ataque do inseto.

O conhecimento do perfil de expressão das enzimas digestivas de *S. levis* pela abordagem transcriptômica descrita no primeiro capítulo é fundamental para o delineamento experimental de estratégias de controle robustas utilizando inibidores contra a principal enzima digestiva do inseto. Essa abordagem foi utilizada com inibidores de peptidase da própria cana-de-açúcar e é descrita em detalhes no capítulo 2. Os dados gerados no transcriptoma também foram importantes para a identificação dos genes selecionados para outra estratégia de controle, envolvendo o silenciamento gênico via RNA de interferência (Capítulo 3), assim como para a prospecção de genes que codificam enzimas com potencial aplicação industrial.

## II JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS GERAIS

A falta de um mecanismo eficiente e adequado para o controle desse inseto junto à completa falta de informação genômica reforçam a necessidade de estudos genéticos da espécie *Sphenophorus levis*, a qual vem causando prejuízos significativos para a cana-de-açúcar, uma das principais culturas da economia brasileira.

Dessa maneira, os objetivos gerais deste estudo foram a construção de uma biblioteca de cDNA de larvas de *S. levis* e o sequenciamento de milhares de clones, visando a identificação das enzimas digestivas, principalmente peptidases, como alvos para a inibição de sua atividade via alimentação. A produção recombinante, caracterização e ensaios de inibição *in vitro* da principal enzima digestiva também integram o foco do trabalho. Paralelamente, foi verificada a sensibilidade das larvas de *S. levis* para o disparo do silenciamento gênico induzido pela injeção de dsRNAs específicos, também voltada para o desenvolvimento de estratégias alternativas para o controle do inseto.

Apesar da importância da praga, não existem sequências de DNA deste inseto depositadas em bancos de dados. Este estudo contribuiu não apenas para obtenção de sequências gênicas de enzimas digestivas, mas também de outros transcritos que possam servir para o estudo deste organismo. Nesse sentido, o conhecimento gerado a nível molecular poderá contribuir para estudos futuros voltados para o desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar resistentes às larvas de *S. levis*.

Para tanto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Construir uma biblioteca de cDNA de larvas de *S. levis*;
- Sequenciar milhares de ESTs, estabelecendo o primeiro banco de dados de sequências para este organismo;
- Identificar o perfil metabólico e digestivo das larvas do inseto pela anotação e classificação das sequências obtidas;
- Verificar o padrão de expressão dos genes selecionados durante o desenvolvimento do inseto e nos tecidos das larvas;



- Clonar e produzir de forma recombinante ao menos uma peptidase intestinal de *S. levis*;

- Comprovar a produção dessa enzima no intestino do inseto por RT-PCR quantitativo ou, alternativamente, por imunohibridização no epitélio intestinal.

- Realizar ensaios de inibição de atividade enzimática utilizando inibidores cistatínicos da cana-de-açúcar estudados em nosso laboratório e identificar, dentre esses, o melhor inibidor para a peptidase digestiva recombinante.

- Identificar genes alvo alternativos para o controle do inseto utilizando silenciamento gênico;

- Verificar a resposta das larvas dessa espécie à injeção de dsRNAs;

- Analisar a ocorrência de silenciamento gênico específico via qRT-PCR.

## CAPÍTULO 1: TRANSCRIPTOMA DAS LARVAS DE *Sphenophorus levis*: CONHECENDO O INSETO.

### Resumo

Uma biblioteca de cDNA das larvas de *Sphenophorus levis* foi construída com o objetivo de acessar o perfil de transcrição gênica do inseto. Após o processamento e montagem das sequências utilizando o programa dCAS, 3804 sequências foram agrupadas em 201 *contigs* e 1163 *singlets*. O perfil de expressão das larvas de *S. levis* indicou que as prováveis enzimas digestivas representam 19,32% de todas as sequências analisadas, 51,87% dos ESTs codificam genes *housekeeping* e o restante dos transcritos (28,81%) foram classificados como desconhecidos. Considerando as prováveis enzimas digestivas, 67,35% delas estão relacionadas à digestão de proteínas, que se concentra na atividade das variantes de cisteíno peptidases do tipo catepsinas L (54,29%) e catepsinas B (6,12%), além das serino peptidases (4,49%). As principais enzimas tiveram o perfil de transcrição analisados por qRT-PCR ao longo do desenvolvimento e em diferentes tecidos, comprovando a síntese das mesmas no intestino médio das larvas, com exceção da serino peptidase que foi identificada exclusivamente no intestino posterior. Foram identificadas mais de 32 variantes da *Sl-CathL*, agrupadas em 3 grandes grupos, que refletem a plasticidade do sistema digestivo deste inseto. Um arsenal de enzimas de degradação de parede celular (*PCWDE*) foi identificado, incluindo pectinases e celulasas e, pela primeira vez, foi relatada a identificação de uma sequência gênica que codifica uma invertase de coleóptero. Duas variantes de uma proteína desconhecida, abundantes na biblioteca, Fat 1 (3,89%) e Fat 2 (2,76%) foram identificadas transcritas essencialmente no corpo gorduroso e o padrão de expressão indica a possível atuação como proteína de reserva. Os dados gerados sobre os transcritos de *S. levis* possibilitaram estudos relacionados à inibição da sua principal enzima digestiva e também o silenciamento gênico específico via RNAi, abordados nos próximos capítulos.

**Palavras chave:** Transcriptoma, enzimas digestivas, catepsinas L, *PCWDE*, invertase.

## 1.1 Introdução

Durante a última década, o número de estudos genéticos conduzidos com insetos tem aumentado significativamente e estes são cada vez mais penetrantes em consequência do desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento, rápidas e de custo cada vez mais reduzido. O surgimento ou disseminação de novos insetos praga, bem como a geração de resistência aos inseticidas impulsionaram os estudos genéticos com o objetivo de conhecer a base genética das proteínas e enzimas que sustentam bioquimicamente a fisiologia desses insetos.

Nesse período, as pesquisas na área da transcriptômica evoluíram das análises de poucos genes a partir de bibliotecas de cDNAs para a comparação de dados massivos que permitem o conhecimento do perfil de expressão de milhares de genes. A manipulação genética vegetal possibilitou a evolução dos inseticidas de organoclorados tóxicos e cumulativos para a engenharia genética de plantas resistentes, capazes de produzir toxinas ou inibidores de enzimas digestivas de insetos.

A variedade de insetos existentes reflete a sua diversidade de nichos e capacidade de se adaptar às mudanças ambientais. Na era da genômica e transcriptômica, tal plasticidade é sustentada pela rápida evolução dos seus genomas, inclusive pela transferência horizontal de genes, especialmente de micro-organismos (Pauchet et al., 2010b). O conhecimento genômico e transcriptômico de plantas e insetos fitófagos evidenciou a existência de uma longa e harmoniosa batalha bioquímica ao longo do processo evolutivo (Lawrence e Koundal, 2002). Além disso, em muitos genes de insetos estão informações necessárias para a produção de proteínas de interesse biotecnológico.

A revolução da genômica possibilita o sequenciamento massivo, rápido e de baixo custo para centenas ou milhares de espécies de insetos, fazendo-se carente da bioinformática, uma ciência consolidada e promissora. Os biólogos, bioquímicos e agora os biotecnólogos, fazem a prospecção racional e dirigida das informações contidas nas sequências gênicas, de acordo com as necessidades da ciência aplicada. Mais do que isso, os estudos funcionais das proteínas codificadas pelos genes desses insetos são a chave para o entendimento de seus processos biológicos e permitem a exploração das informações nunca antes observadas,

contidas em novos genes identificados, ou naqueles que codificam proteínas de baixa abundância ou indetectáveis bioquimicamente.

Os coleópteros compreendem a ordem de organismos mais diversa, com mais de 350.000 espécies catalogadas, o que corresponde a uma espécie de besouro para cada três ou quatro espécies de organismos eucariotos conhecidos (Grimaldi e Engel, 2006). A notável diversidade e capacidade de adaptação desses insetos refletem na disseminação de pragas agrícolas devastadoras que pertencem principalmente às superfamílias mais diversas, Curculionoidea e Chrysomeloidea, assim como à superfamília Tenebrionoidea. Devido a sua importância econômica, por se tratarem de pragas agrícolas de difícil controle, diversos coleópteros têm sido profundamente estudados (Gómez-Zurita e Galián, 2005). Desde que a primeira sequência de DNA proveniente de um coleóptero foi publicada por Trewitt e colaboradores (1990) para o gene de protamina do besouro *Anthonomus grandis*, dezoito anos se passaram até a conclusão do primeiro genoma de um coleóptero, o besouro *Tribolium castaneum* (Richards et al., 2008).

Nesse sentido, os transcriptomas de coleópteros têm sido estudados com diferentes profundidades, mas de uma maneira geral, a maioria desses estudos tem como foco o intestino, visando ampliar o conhecimento da interface digestiva desses organismos com as culturas por eles infestadas. O intestino dos insetos consiste na sua interface direta com o meio ambiente e tem sido objeto de estudo porque o entendimento de diversos processos fisiológicos nesse micro ambiente é necessário para o desenvolvimento de estratégias adequadas para o controle de insetos praga (Terra e Ferreira, 2011).

Um dos primeiros transcriptomas do intestino de coleópteros foi realizado com o besouro esculpador de *Pinus*, *Ips pini* (Eigenheer et al., 2003). Posteriormente, diversos outros estudos com caráter semelhante foram conduzidos incluindo transcriptomas do intestino das larvas do besouro das pastagens, *Costelytra zealandica* (Marshall et al., 2008) e também para as larvas do besouro da folha do álamo, *Chrysomela tremulae* (Pauchet et al., 2009), todos visando a compreensão da interface digestiva e a identificação de alvos para o controle.

A maioria dos estudos das enzimas digestivas em diversas espécies de coleópteros tem caráter bioquímico e a análise dessas proteínas, purificadas a partir do conteúdo do intestino, datam de muito antes da ampla utilização do sistema de

produção recombinante dessas enzimas em sistemas de expressão heterólogos utilizando as sequências gênicas específicas. Somadas, essas duas abordagens ganham força para aumentar o entendimento dos processos digestivos e revelam uma heterogeneidade nas abundâncias e também no padrão das classes de enzimas digestivas secretadas por insetos da família Curculionidae, na qual o *Sphenophorus levis* é incluído.

Mesmo com os avanços nas tecnologias de sequenciamento, até recentemente, o único genoma completo publicado de um coleóptero ainda é o de *T. castaneum*, que consiste em uma importante praga, a qual ataca diversos grãos dentre outros alimentos estocados. Vários genes identificados foram considerados candidatos como alvos para o controle deste inseto, incluindo peptidases digestivas e neurohormônios. Dentre as singularidades que chamaram a atenção no genoma de *T. castaneum* está a ausência dos genes homólogos àqueles que integram a maquinaria de amplificação do sinal de RNA de interferência (RNAi) do verme *Caenorhabditis elegans*. Entretanto, este besouro possui uma robusta resposta ao RNAi, o que indica a existência de outra via molecular para o disparo sistêmico do RNAi.

Nesse capítulo, é apresentado um panorama dos transcritos identificados no transcriptoma, com o foco voltado para o sistema digestivo de larvas de *Sphenophorus levis*. As enzimas digestivas, especialmente as peptidases são abordadas mais profundamente, considerando a caracterização dessas enzimas como potenciais alvos para o controle de *S. levis*. A diversidade de variantes das catepsinas L e a identificação de diversas enzimas relacionadas à degradação de parede celular são marcantes no transcriptoma das larvas do inseto. Em conjunto, essas enzimas digestivas podem ser determinantes para a capacidade destrutiva das larvas de *S. levis* sobre a cana-de-açúcar.

Além disso, a caracterização de uma sequência que codifica uma invertase reforça a idéia de que a aquisição de genes provenientes de micro-organismos, via transferência horizontal, podem ser eventos não tão raros ao longo da evolução dos genomas de coleópteros. A idéia de que a cooptação de genes da família das *PCWDE* pode ter sido um fator fundamental durante a irradiação dos coleópteros, garantindo a capacidade adaptativa desses insetos a diversos nichos (Pauchet et al., 2010b), pode ser expandida para a invertase.

As informações geradas a partir da análise do transcriptoma de *S. levis* foram imprescindíveis para a obtenção das sequências gênicas utilizadas nas abordagens de inibição da proteólise digestiva e silenciamento gênico via RNAi, descritas no capítulo 2 e 3 respectivamente, voltadas à identificação de alvos para combate a esse inseto. As análises de qRT-PCR ofereceram suporte para a compreensão do papel fisiológico dos genes selecionados, a partir do perfil de expressão identificado ao longo do desenvolvimento e em tecidos específicos.

Outros estudos estão sendo realizados em nosso laboratório com genes identificados na biblioteca e incluem a produção recombinante de proteínas com potencial aplicação industrial como as pectinases, uma celulase e também uma invertase.

## **1.2 Materiais e métodos**

### **1.2.1 Animais**

As larvas de *Sphenophorus levis* utilizadas para a construção de RNA foram cedidas pelo Laboratório de entomologia do CTC (Centro de Tecnologia Canaveira, Piracicaba, SP) onde foram cultivadas em meio de dieta artificial (Degaspari et al., 1987) e mantidas em câmaras climatizadas com 70% de umidade relativa a 26 °C e fotoperiodismo de 12 horas. Para as análises do efeito da dieta na expressão das catepsinas L, as larvas de insetos coletadas no campo (Fazenda Santo Antônio, Piracicaba, SP) foram mantidas em toletes de cana, na mesma temperatura e fotoperiodismo descritos anteriormente, até a extração do RNA.

### **1.2.2 Extração do RNA para a construção da biblioteca das larvas de *S. levis***

Após a remoção das larvas do meio de cultura, elas foram mantidas em gelo por 10 minutos para a imobilização e dissecadas na própria hemolinfa. Para a construção da biblioteca foram utilizadas 30 larvas com 30 dias de vida, pesando cerca de 200 - 300 mg cada. Elas tiveram o conteúdo interno separado da epiderme e cabeça, desse modo a biblioteca de cDNA foi construída com o tubo intestinal completo, corpo gorduroso e hemolinfa.

Para a obtenção de um RNA total de boa qualidade foi utilizado o método de ultracentrifugação com cloreto de céσιο, baseado em um protocolo modificado de Chirgwin e colaboradores (1979). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas em cadinho de porcelana. Aos tecidos macerados foram adicionados 3 volumes da solução de lise autoclavada (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sódio 25 mM pH 7,0) e a mistura foi homogeneizada até a digestão completa do tecido. O lisado foi centrifugado por 2 minutos a 10.000 rpm para a precipitação do *debris* e o sobrenadante utilizado para a extração do RNA. O homogenato (sobrenadante) foi cuidadosamente dispensado com pipeta Pasteur na parede dos tubos de ultracentrífuga contendo 2 ml da solução de cloreto de céσιο (cloreto de céσιο 5,7 M; acetato de sódio 25 mM pH 5,0) autoclavada. Os tubos foram centrifugados em rotor basculante SW 50.1 em ultracentrífuga L8-80M Beckman-US a 37.000 rpm (222.000 g) durante 21 horas à 15 °C. Utilizando pipetas Pasteur o sobrenadante contendo DNA e proteínas foi cuidadosamente removido e dispensado. Os tubos foram invertidos sobre lenços de papel estéreis e secados à temperatura ambiente. O pellet de RNA foi ressuscitado em 150 µl de água DEPC autoclavada, e estocado a -80 °C.

O RNA extraído foi quantificado em espectrômetro Ultrospec 2100pro e também analisado em gel de agarose 1% para a verificação de sua integridade. Trezentos µg deste RNA foram utilizados para o isolamento do RNA mensageiro utilizando o kit PolyATtract System 1000 (PROMEGA). O RNA mensageiro (RNAm) foi quantificado em espectrômetro NanoDrop ND-1000 e sua integridade foi verificada em gel de agarose 1%.

### **1.2.3 Construção da biblioteca de cDNA das larvas de *S. levis* e sequenciamento**

A biblioteca de cDNA das larvas foi construída utilizando o kit CloneMiner cDNA Library (Invitrogen) baseado no sistema de recombinação sítio específica em substituição a enzimas de clivagem e ligação. O vetor pDONR222 foi recombinado com os cDNAs contendo os adaptadores e transformados em células competentes de *E. coli* DH10B por eletroporação. Os clones transformados foram selecionados em placas contendo kanamicina (25 µg/ml).

O DNA plasmidial foi extraído seguindo o protocolo descrito por Vettore e colaboradores (2001). As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando 250 ng de DNA, 5 pmol do *primer* universal M13-Forward e 4 µl do pré-mix DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare) em um volume total de 10 µl. As amostras foram aplicadas em seqüenciador MegaBACE 1000 Flexyble, de 48 capilares (GE Healthcare) durante 60 segundos a 2 kV e as leituras foram realizadas durante 120 minutos a 9 kV.

#### **1.2.4 Análise do transcriptoma de *S. levis***

##### **1.2.4.1 Processamento das sequências**

Todo o trabalho de processamento, que inclui a excisão de sequências do vetor e regiões de sequências com baixa qualidade (*trimming*), montagem e comparação dos clusters com diversos bancos de dados foi realizado na plataforma dCAS (Guo et al., 2009 ) em um processo automatizado. Os arquivos brutos de sequência (\*ESDs) foram analisados e processados com os parâmetros padrões de entrada no programa e para o primeiro *round* das análises foi utilizado índice Phred > 8. Em seguida, as amostras foram clusterizadas, por Blastx com parâmetro de tamanho de palavra (-W) igual a 48 e após a separação das sequências com sobreposição, os *contigs* foram gerados no programa CAP 3 (Huang e Madan, 1999) com parâmetro padrão de 80% de identidade para a montagem.

Após a anotação, todos os clusters (*singlets* / *contigs*) gerados que foram classificados como desconhecidos e que apresentavam índice médio de qualidade inferior a 15 (Phred < 15) foram excluídos das análises. Posteriormente, as sequências que formaram os clusters de catepsina L (*Sl-CathLs*) foram reanalisadas sem a prévia clusterização com o "blast", e as variantes das enzimas foram separadas manualmente.

##### **1.2.4.2 Análises de similaridade, identificação dos clusters e anotação**

Na plataforma dCAS, após a montagem dos clusters, os *singlets* e *contigs* foram automaticamente comparados com sequências depositadas em diferentes bancos de dados públicos: GenBank (NCBI) - National Center for Biotechnology



Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), Swiss-Prot (<http://expasy.org/sprot/>), GO - Gene Ontology database ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)), CDD - The Conserved Domain Database (NCBI), KOG - Eukaryotic Clusters of Orthologous Groups of proteins (NCBI), SMART - Simple Modular Architecture Research Tool ([smart.embl-heidelberg.de](http://smart.embl-heidelberg.de)) e PFAM - Protein Family ([pfam.sanger.ac.uk](http://pfam.sanger.ac.uk)). As análises finais foram realizadas em novembro de 2011, os resultados compilados e exportados para uma planilha hiperlinkada com os respectivos alinhamentos, *e-values* e porcentagem de similaridade, que facilitaram a análise e interpretação dos resultados.

Os clusters gerados pelo programa foram anotados manualmente com o auxílio da ferramenta *Classifier*, desenvolvida pelo Prof. Dr. José Marcos C. Ribeiro (Laboratory of Malaria and Vector Research-NAID-USA), a qual importa os resultados que apresentam as maiores similaridades dos clusters analisados contra as sequências depositadas nos bancos de dados. Para a classificação foram considerados *e-values* menores que  $e^{-10}$ , índices de similaridades maiores que 30% ou cobertura de, ao menos, 80% de um domínio de proteína conhecido. Quando as análises não satisfizeram nenhuma dessas condições ou em caso de ambiguidade, a sequência foi anotada como desconhecida.

Após a identificação dos clusters, eles foram classificados em diversas categorias que associam os transcritos anotados de acordo com a provável função a nível celular e metabólico, considerando os processos fisiológicos do inseto no estágio de desenvolvimento estudado.

### **1.2.5 Análise de expressão gênica relativa por qRT-PCR**

#### **1.2.5.1 Desenho dos *primers* e cálculo de eficiência da reação**

Os *primers* utilizados para as análises de qRT-PCR foram desenhados utilizando o programa *Primer 3* versão 4.0 ([www.frodo.wi.mit.edu/primer3](http://www.frodo.wi.mit.edu/primer3)), com parâmetros específicos para qRT-PCR: conteúdo de GC de 45 a 55%,  $T_m$  variando de 58 a 61 °C, não complementariedade entre os primers, temperatura de hibridização próxima para o par de *primers* e de modo que amplificassem um fragmento de aproximadamente 100 pb (Giulietti et al., 2001).

Para a padronização de cada par de *primer*, a eficiência foi testada utilizando diluições seriadas do cDNA: 1x, 0,5x, 0,25x e 0,125x variando o tempo e a temperatura de hibridização. Os parâmetros de seleção foram: eficiência maior que 95%; slope  $-3,0 < 3,6$  e  $R^2 > 95\%$ . As sequências dos *primers* utilizados para as análises de RT PCR quantitativo (qRT-PCR) são indicadas na tabela 1.0:

Tabela 1.0: Sequência dos *primers* utilizados nas análises de Real-Time PCR, indicando o tamanho dos amplicons.

Gene alvo	Amplicon (pb)	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')
Catepsina L	143	CCTTCTTAAAGAGGATGGTGTC	TATATTCAGCATTGTGAGCTTCAATT
Endoglucanase	112	AGTTCAGGCATGTGCTGCT	GACAGCCCAAGGTTGTTGA
Catepsina B	103	CGCTATTGTTCTGGTGTTGG	CGATTGTTTGCCGTTGATTT
Catepsina D	98	ACCTGTCCACCGATACTCTTAC	GGCAGCGACGAAAGTTAG
Serino peptidase	99	AGGTCTCGGTTCTTCCAA	ATCGTCCTGGTGGTGATGA
Invertase	167	CAAAAGGTTGGATGAATGACC	TGGAGACAGTGCTATGGGAAG
Esterase	70	GACAGATTGACAGCAGCAGA	CAGGAGGTTTAGCGTATGGAA
V-ATPase E	73	CAAGGCTTGTACCAGATCTTCG	GACTTCAAGAGGTCTCTGTCT
Serpina 1	95	AAGAGTTCACCACCGCCTTA	GTCCGTGTTTGAGCGAAGT
Fat_1	89	CGACGAACACAACGAAGAAG	GGATGAACCCTTGGAGATGA
Fat_2	120	AGTCGTTCCCGTTTTGAT	ACGTGATGCACCCAATGTC
GAPDH	104	CAACTGGCGTTTTTACCACA	AACATACATTGGGGCGTCA

### 1.2.5.2 Extração dos RNAs, síntese dos cDNAs e reações de Real-Time PCR quantitativo

A análise do transcriptoma permitiu a identificação de ORFs completas que codificam diferentes produtos gênicos, muitos desses provavelmente envolvidos no processo de digestão das larvas de *S. levis*. No sentido de confirmar a atuação das prováveis enzimas digestivas no intestino médio, bem como identificar em quais estágios de desenvolvimento elas são sintetizadas, a expressão dos genes

selecionados foi monitorada por PCR quantitativo em tempo real. Também são reportadas, para fins comparativos, as análises da expressão gênica de dois novos transcritos abundantes, Fat 1 e Fat 2, assim como dos dois genes estudados no último capítulo, a V-ATPase-E e a serpina 1.

Os níveis de expressão foram analisados em sete fases do desenvolvimento: ovos, larvas de 10, 20 e 30 dias após a eclosão dos ovos, pré-pupas, pupas e insetos adultos. Todos os insetos adultos analisados eram fêmeas. Os RNAs foram extraídos individualmente para cada inseto e os cDNAs foram sintetizados a partir de um pool com 600 ng de RNA tratado, composto por 200 ng de RNA de 3 diferentes exemplares da mesma fase de desenvolvimento. O pool representativo dos ovos foi preparado utilizando-se 600 ng de RNA provenientes de 10 ovos.

Para a síntese dos cDNAs utilizados nas análises de expressão diferencial dos tecidos, utilizou-se 600 ng de RNAs preparados de um pool de quatro larvas com 30 dias de vida. Para tanto, as larvas de *S. levis* foram lavadas externamente três vezes em tampão PBS (pH 7,0), imobilizadas em gelo e dissecadas no mesmo tampão. As amostras de RNA foram extraídas dos pools de tecidos separados: hemolinfa, corpo gorduroso, cabeça, carcaça, intestino médio e intestino posterior.

Para cada extração de RNA foram utilizados 600 µl do reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Os RNAs foram quantificados em espectrômetro Nanodrop ND-1000 (260 nm) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TBE 0,5X. O material foi dividido em quatro alíquotas, armazenadas em ultrafreezer. Cada amostra de RNA total foi tratada individualmente com DNase I Amplification Grade (Invitrogen), para a remoção de contaminantes de DNA genômico, em reações contendo 2 µg de RNA em um volume final de 20 µl.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit Improm II Reverse Transcription System (Promega), 600 ng de RNA por reação e 0,5 µg de Oligo dT<sub>(x15)</sub> em um volume final de 20 µl. As reações de RT-PCR foram conduzidas utilizando-se 5µL mistura Platinum SYBR Green qPCR UDG Supermix (Invitrogen), 1 µl de cDNA diluído dez vezes e 0,4 µM de cada *primer* em 10 µl de volume final. A enzima Uracil DNA glicosilase (UDG), incluída na mistura, evita a contaminação cruzada e re-amplificação dos produtos de PCR. As reações foram conduzidas no aparelho Pico Real-Time PCR System (Helixis) e o ciclo de reação utilizado: 50 °C

por 2 minutos, 95 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos. Para a curva de *melting* as amostras foram cicladas a 95 °C, 55 °C e 95 °C por 15 segundos em cada temperatura.

### **1.2.5.3 Normalização dos dados e cálculo da expressão relativa**

As análises de RT-PCR quantitativo para avaliar a expressão diferencial foram realizadas pelo método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , como descrito por Livak e Schmittgen (2001). As medidas foram tomadas em triplicatas (replicatas técnicas) e os desvios padrões são indicados com barras de erros nas figuras. Para todas as reações foram adicionados controles negativos. O gene que codifica a enzima GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como calibrador. A atuação constante deste produto gênico no metabolismo intermediário fez do GAPDH um gene utilizado para a normalização de experimentos em abelhas (Scharlaken et al., 2007) e até nas análises de silenciamento gênico, conduzidas com o coleóptero *Sitophilus* spp. (Vallier et al., 2009).

Todas as análises de qRT-PCR foram conduzidas incluindo como controle negativo reações nas quais um RNA não foi adicionado da enzima transcriptase reversa, confirmando a ausência de contaminação com DNA genômico pela não amplificação dos genes alvo.

### **1.2.6 Análises das sequências, alinhamentos e análises filogenéticas**

Para os alinhamentos, as ORFs foram comparadas com sequências homólogas selecionadas a partir do GenBank, utilizando o programa Blastx e Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Após a identificação e seleção das sequências protéicas, essas foram alinhadas utilizando o software ClustalW (Thompson et al., 1994) na interface do programa BioEdit v7.0.5.3. (Hall, 1999). Na maioria dos alinhamentos de proteínas, os resíduos idênticos estão representados em caixas pretas e os resíduos conservados ou com características similares são indicados por caixas cinzas.

Outras análises das sequências de proteínas, como predição de peptídeo sinal e identificação de prováveis sítios de glicosilação, foram realizadas na plataforma <http://www.cbs.dtu.dk/services>. As análises de códon *usage* para as sequências de invertases foram realizadas utilizando o programa Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000), disponível em: [http://www.geneinfinity.org/sms/sms\\_codonusage](http://www.geneinfinity.org/sms/sms_codonusage). Para as análises filogenéticas as sequências das variantes das catepsinas L ou invertases homólogas identificadas foram alinhadas no programa ClustalW e as árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Neighbor Joining (distância P), utilizando o pacote MEGA versão 5.05 (Tamura et al., 2011). Os valores de *bootstrap* para 10.000 repetições são indicados nos ramos da árvore.

### **1.2.7 Construção das mini-bibliotecas comparativas: expressão das variantes de catepsinas L em dieta artificial e campo.**

Dada a diversidade de variantes das catepsinas L identificadas, foram construídas duas bibliotecas de insetos cultivados sob diferentes dietas. Foram utilizadas 10 larvas para cada tratamento, cultivadas em dieta artificial ou coletadas no campo. Os RNAs, extraídos dos pools de larvas, e o cDNAs foram preparados seguindo os mesmos procedimentos descritos na seção 1.2.6.2. As variantes das enzimas foram amplificadas dos cDNAs utilizando os *primers* degenerados SI-CPF TTTAAG(C/G/T)(C/T)GAAACACGGCAAGACCTAC e SI-CPR CA(A/G)/TCCACCAATTGTTGTTTCAG. Os amplicons, de aproximadamente, 422 pb (rSI-CathL GenBank: 217323617) foram clonados no plasmídeo pTZ57R/T (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante e transformados em células de *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen) por eletroporação (Sambrook et al., 1989).

Para as análises das bibliotecas, o DNA plasmidial e as reações de sequenciamento foram preparados como descrito na seção 1.2.3 e após o *trimming*, utilizando a interface do dCAS (Guo et al., 2009), as sequências foram processadas manualmente. Para comparação, foi selecionada a mesma região dos clusters das SI-CathLs identificados no transcriptoma. Todas as sequências de aminoácidos correspondentes, somadas às 58 sequências de cada tratamento (campo x laboratório) foram alinhadas com o software ClustalW e agrupadas para análise filogenética, como descrito na seção 1.2.5.

## 1.3 Resultados e discussão

### 1.3.1 Qualificação da biblioteca

Utilizando o kit PolyATtract System 1000, foram recuperados 3,5 µg de RNAm a partir de 300 µg de RNA total, que foram utilizados para a construção da biblioteca. O título obtido para a biblioteca foi de  $2,13 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias. A qualificação da biblioteca foi feita por meio de digestão aleatória de 20 clones com a enzima *BsrG I*, e o tamanho médio dos fragmentos digeridos, 1200 a 1500 pb, com cDNAs maiores que 2.500 pb, indica a construção de uma biblioteca de boa qualidade.

### 1.3.2 Análise do transcriptoma de *S. levis*: processamento e anotação das sequências

Ao todo foram sequenciadas 51 placas da biblioteca de *S. levis* e os dados gerados na análise inicial foram agrupados em 2499 clusters. Após a anotação realizada com o auxílio do programa *Classifier*, foram excluídos das análises os *singlets* classificados como desconhecidos e que apresentaram índice de qualidade (Phred) menor que 15. Após a exclusão, das 3804 sequências restantes 2642 (69,45%) foram agrupadas em *contigs* (201) e o restante, 1162 sequências (30,55%) formaram *singlets* (Figura 1.2A).

Na figura 1.1 são indicadas as frequências das espécies contra as quais o total de ESTs (1.1A) sem parâmetros de exclusão e também os clusters com *e-values* inferiores a  $e^{-15}$  (1.1B) apresentaram maior similaridade. A predominância de transcritos com similaridades com *Tribolium castaneum* era esperada em vista da maior cobertura gênica, considerando que é a única espécie de coleóptero com o genoma totalmente sequenciado. Vários dos transcritos também apresentaram maior similaridade com genes de espécies pertencentes a outras ordens como, por exemplo, *Acyrtosiphum pisum* (Hemiptera).

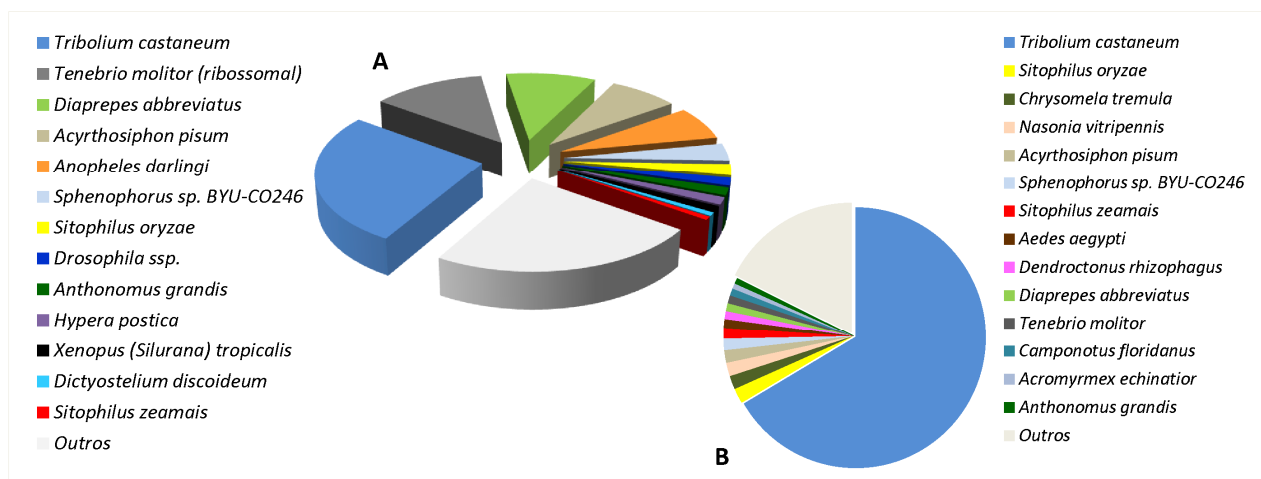


Figura 1.1: Espécies mais similares identificadas no banco de dados de proteínas não redundantes do GenBank para o total de ESTs. A: sem parâmetros de exclusão e para cada um dos clusters, B: utilizando apenas sequências com  $e$ -values inferiores a  $e^{-15}$ . Em ambas as análises foram predominantes os transcritos com maior similaridade com os genes do coleóptero *Tribolium castaneum*.

O aproveitamento dos dados de sequenciamento que foram utilizados na planilha final foi de 77,69% e o perfil geral de expressão gênica identificado pela anotação dos transcritos das larvas de *S. levis* é indicado na tabela da figura 1.2.

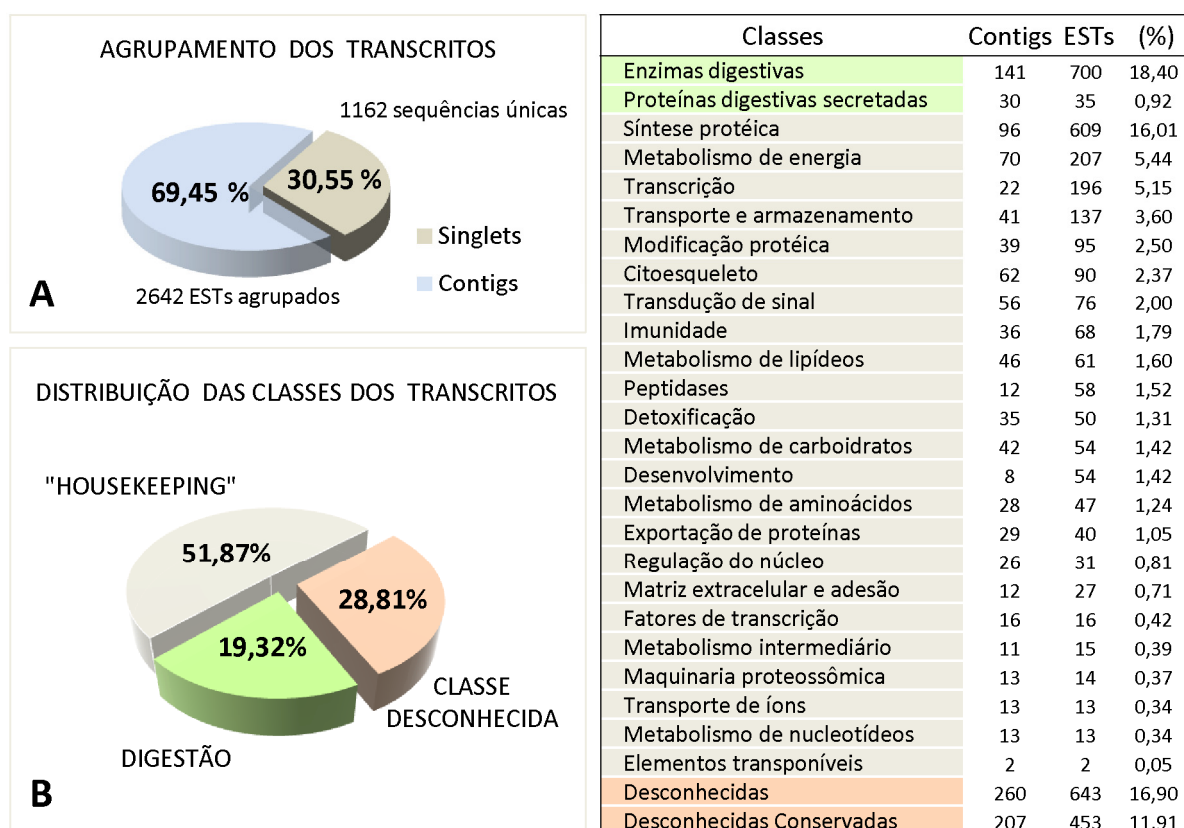


Figura 1.2: Perfil geral dos transcritos anotados da biblioteca de *S. levis*. A: agrupamento das sequências; B: porcentagens de transcritos de acordo com a classificação geral; C: tabela indicando as frequências dos genes associados às funções não digestivas.

As prováveis enzimas digestivas representam 19,32% de todas as sequências analisadas, 51,87% dos ESTs codificam genes *housekeeping* e o restante dos transcritos (28,81%) foram classificados como desconhecidos. Os ESTs classificados como *housekeeping* (51,87%) incluem todas as proteínas e enzimas anotadas, com função conhecida e que não participam da digestão, propriamente dita, no intestino do inseto. Considerando as proteínas identificadas que atuam no metabolismo geral, aquelas relacionadas à síntese de proteínas (16,01%), metabolismo de energia (5,44%) e transcrição (5,15%) são as mais abundantes.

A identificação de diversos ESTs provavelmente relacionados à detoxificação (1,31%) também marcou o perfil do transcriptoma de *S. levis*, uma vez que a relativa abundância desses transcritos pode também estar relacionada com a resistência desse inseto a inseticidas. Dentre as proteínas envolvidas nesse processo, as citocromo P450 e glutathione S-transferases foram as mais abundantes identificadas. As 24 sequências de citocromo P450 (0,63% do total de ESTs) estão distribuídas em dois *contigs* e 14 *singlets*. As variantes das proteínas dessa família foram identificadas no genoma de *T. castaneum* como produtos de expansão de uma família gênica (Richards et al., 2008) e podem estar relacionadas ao metabolismo de detoxificação contra inseticidas e alelo químicos de defesa produzidos por plantas (Ffrench-Constant et al., 2004). As 12 prováveis sequências que codificam glutathione S-transferases (0,32%) estão distribuídas em 4 *contigs* e 8 *singlets*, e também estão envolvidas na detoxificação de inseticidas em mosquitos (Che-Mendoza et al., 2009).

Dentre os ESTs que codificam proteínas desconhecidas ou não conservadas (28,81%), os dois *contigs* mais abundantes foram analisados por RT-PCR e são descritos no item 1.3.8, junto com seus padrões de transcrição. Os *contigs* 30 e 31 da biblioteca de *S. levis* codificam duas novas variantes de proteínas denominadas Fat 1 e Fat 2, respectivamente. As enzimas digestivas são classificadas em detalhes na próxima seção (1.3.3), com foco voltado à diversidade de peptidases digestivas super representadas pelas variantes da catepsina L de *Sphenophorus levis* (*Sl-CathL*), assim como pela presença de diversas *PCWDE* e um *contig* de uma invertase.



### 1.3.3 Panorama geral da digestão em larvas de *S. levis*

Antes de aprofundar a discussão sobre as enzimas digestivas é sensato esclarecer que todos os resultados de classificação funcional apresentados consistem em sugestões sobre a atuação dessas enzimas. As peptidases consistem em importantes enzimas digestivas que, no entanto também podem assumir outras funções, como por exemplo, relacionados à atuação lisossomal ou como ativadoras de pró-enzimas em processos fisiológicos não relacionados à digestão. Nesse sentido, estudos funcionais ou relacionados à localização celular são imprescindíveis para a caracterização de enzimas exclusivamente digestivas, secretadas no intestino médio de insetos.

Bons e raros exemplos para confirmar a função das enzimas consistem na comprovação da expressão exclusivamente intestinal utilizando anticorpos específicos contra as variantes dessas enzimas. No estudo de caracterização das catepsinas L de *T. molitor* (CALs) foi detectado que as variantes da CAL1 são lisossomais, enquanto a CAL3 foi verificada exclusivamente no intestino das larvas do coleóptero (Cristofolletti et al., 2005). Em outro estudo, dentre as três catepsinas D de *Musca domestica*, duas delas foram detectadas no intestino, enquanto uma outra variante constitui uma enzima lisossomal (Padilha et al., 2009). No entanto, na próxima seção é descrito o perfil de expressão das principais enzimas digestivas identificadas no transcriptoma de *S. levis* via qRT-PCR. A imunolocalização da *Sl-CathL* no intestino médio das larvas, descrita no capítulo 2, foi fundamental para o entendimento e validação do padrão de expressão de outras peptidases digestivas. Dessa forma, os resultados de qRT-PCR confirmam o padrão de expressão das enzimas digestivas predominantes no intestino das larvas de *S. levis*, além da abrupta queda da transcrição na fase pupal ao longo do desenvolvimento do inseto.

Dentre todas as sequências de peptidases identificadas no transcriptoma, 10,5% delas foram anotadas como provavelmente relacionadas a processos não digestivos (Figura 1.3A). A figura 1.3B indica que a transcrição das prováveis peptidases digestivas é predominante no intestino das larvas desse inseto, seguida das enzimas relacionadas à digestão de carboidratos (22,04%) e lipídeos (5,85%).

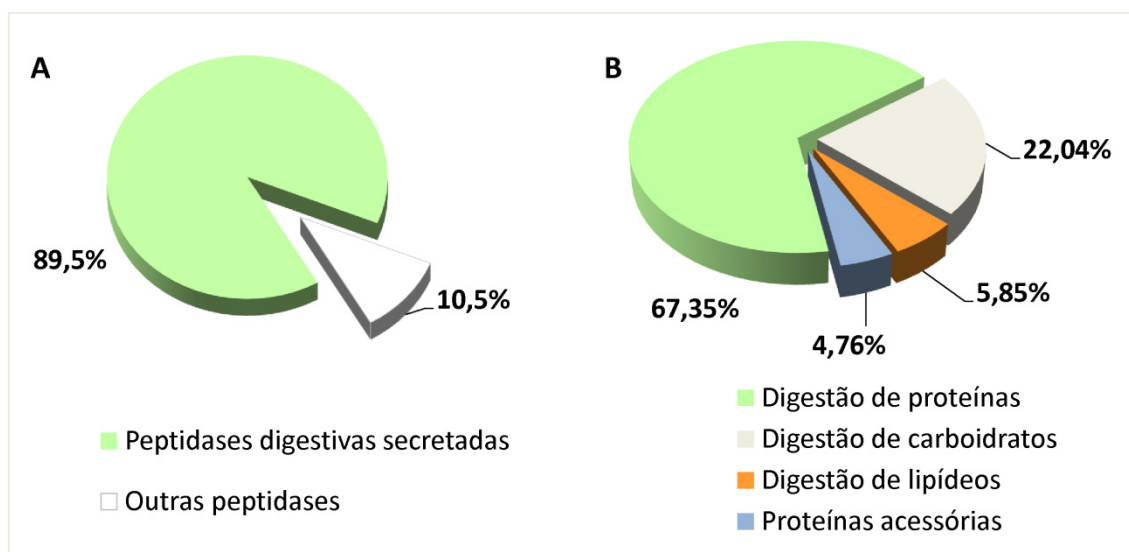


Figura 1.3: Gráfico de distribuição das enzimas relacionadas à digestão nas larvas de *S. levis*. A: dentre todas as sequências de peptidases identificadas no transcriptoma, 10,5% delas foram anotadas como provavelmente relacionadas a processos não digestivos. B: a transcrição das prováveis peptidases digestivas é predominante no intestino das larvas desse inseto, seguida das enzimas relacionadas à digestão de carboidratos (22,04%) e lipídeos (5,85%).

Considerando os ESTs que codificam prováveis proteínas acessórias (Tabela 1.1D), a maioria deles (0,79%) foi caracterizada como similares à mucina. Alguns desses transcritos são provavelmente homólogos às peritrofinas de insetos, que desempenham papéis importantes como constituintes da membrana peritrófica. Essa estrutura da membrana peritrófica é formada principalmente por uma matriz protéica de peritrofinas associadas à quitina e é importante para a divisão do lúmen do intestino médio em dois compartimentos. Essa compartimentalização é essencial para a proteção das células do epitélio e aumento da eficiência do processo digestivo (Terra, 2001; Terra e Ferreira, 2011). Em estudos anteriores foi verificada a ocorrência de um gel peritrófico no intestino médio anterior (V1 e V2) e de membrana peritrófica no intestino médio posterior (V3 e V4) em larvas de *S. levis* (Soares-Costa et al., 2011). No entanto, é necessário um maior esforço de sequenciamento para a obtenção das sequências completas e caracterização detalhada dessas prováveis peritrofinas.

Na tabela 1.1 é indicada a anotação das principais enzimas e proteínas digestivas, de acordo com suas funções. A divisão respeita as cores apresentadas no gráfico da figura 1.3B, de caracterização das enzimas segundo as classes das moléculas hidrolisadas. Considerando as prováveis enzimas digestivas, 67,35% delas estão relacionadas à digestão de proteínas, que se concentra na atividade

majoritária de variantes de cisteíno peptidases do tipo catepsinas L (54,29%) e catepsinas B (6,12%), além das serino peptidases similares à tripsina (4,49%). Esse padrão predominante de atuação de cisteíno peptidases e minoritária de serino peptidases é similar ao observado para as larvas de *Ceutorhynchus assimilis* (Girard et al., 1998a) e *Baris coerulescens* (Bonadé-Bottino et al., 1999), ambos besouros da família Curculionidae.

As catepsinas B, assim como as serino peptidases e também exopeptidases, apesar de não abundantes, também devem contribuir significativamente para a digestão de proteínas nas larvas desse coleóptero. A atividade dessas enzimas já havia sido previamente relatada por meio de estudos bioquímicos realizados por Soares-Costa e colaboradores (2011) utilizando proteínas purificadas e extratos protéicos do conteúdo intestinal de larvas *S. levis*. A partir da análise do transcriptoma também foram identificadas duas classes principais de esterases, que estão envolvidas na digestão de lipídeos, correspondentes a 5,85% do total de enzimas digestivas. Foi identificada uma grande variedade de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos, que correspondem a 22,04% do total de enzimas digestivas. As enzimas relacionadas à degradação de parede celular como as pectinases e celulases, além de uma invertase também são marcantes no transcriptoma, por isso sua ocorrência em insetos são discutidas em detalhes nas seções seguintes.

No item E da tabela 1.1 são indicadas as peptidases que foram caracterizadas como provavelmente não digestivas. Dentre elas estão as catepsinas F, e também cisteíno peptidases que não apresentaram alta similaridade com a *Sl-CathL*, que é uma versão comprovadamente digestiva. A catepsina D foi detectada em índices consideráveis em todos os tecidos analisados por qRT-PCR e sua transcrição não é regulada negativamente durante a fase de pupa, o que sugere sua atuação lisossomal. Por isso essa enzima foi classificada como não digestiva.

Para diferenciar as cisteíno peptidases não digestivas foi utilizado como parâmetro além da baixa similaridade com a *Sl-CathL*, a predição de ocorrência de sítios de N-glicosilação nas sequências protéicas. Nessas enzimas, os sítios de glicosilação são mais abundantes e indicados com maiores probabilidades de ocorrência. Apesar da utilização desse parâmetro nesse caso especial, considerando que a glicosilação pode ser fundamental para o endereçamento

lisossomal (Cuozzo et al., 1998), a predição de sítios de N-glicosilação é um tanto incerta e os sistemas de predição são treinados para poucas proteínas humanas (NetNGlyc; Gupta et al., 2004), o que dificulta a sua utilização como parâmetro de seleção.

Tabela 1.1: Anotação dos ESTs das larvas de *S. levis* de acordo com seu envolvimento. A: digestão de proteínas; B: digestão de carboidratos; C: digestão de lipídeos; D: proteínas acessórias; E: peptidases caracterizadas como não digestivas. Os asteriscos indicam os genes que tiveram o perfil de transcrição avaliado por qRT-PCR.

	Classe	Clusters	ESTs	(%) DIG.	(%) Total
<b>A</b>	<i>Sl-CathL 1</i> *	35	279	37,96	7,33
	<i>Sl-CathL 2</i>	12	68	9,25	1,79
	<i>Sl-CathL 3</i>	8	52	7,07	1,37
	Catepsina B *	6	45	6,12	1,18
	Serino peptidase *	19	33	4,49	0,87
	Serino carboxipeptidase	8	12	1,63	0,32
	Xaa-Pro aminopeptidase	2	2	0,27	0,05
	Carboxipeptidase	2	2	0,27	0,05
	Aminopeptidase	1	1	0,14	0,03
	Acilpeptideo hidrolase	1	1	0,14	0,03
<b>B</b>	Alfa-amilase	4	42	5,71	1,10
	Exoglucanase	5	27	3,67	0,71
	Chitinase	16	22	2,99	0,58
	Beta-glucosidase	13	21	2,86	0,55
	Maltase	6	15	2,04	0,39
	Endoglucanase *	5	12	1,63	0,32
	Pectina metilesterase *	2	5	0,68	0,13
	Glucosidase 2 (beta)	2	4	0,54	0,11
	Beta-fructofuranosidase (invertase) *	1	3	0,41	0,08
	Beta-galactosidase	3	3	0,41	0,08
	Endopoligalacturonase *	2	2	0,27	0,05
	Glucano endo-1,3-beta-glucosidase	2	2	0,27	0,05
	Beta-Glucuronidase	2	2	0,27	0,05
	Alpha-D-galactosidase (melibiase)	1	1	0,14	0,03
	Beta-N-acetilhexosaminidase	1	1	0,14	0,03
<b>C</b>	Carboxilesterase	13	28	3,81	0,74
	Esterase *	5	15	2,04	0,39
<b>D</b>	Similar à mucina	25	30	4,08	0,79
	Outras proteínas secretadas	5	5	0,68	0,13
<b>E</b>	Classe	Clusters	ESTs	% Total	
	Cisteíno peptidase	7	45	1,18	
	Aspartil peptidase (Catepsina D) *	1	11	0,29	
	Cisteíno peptidase (Catepsina F)	2	2	0,05	

O principal cluster da catepsina B (*contig 53*) foi identificado nas análises de qRT-PCR como produzido essencialmente no intestino médio e com perfil de transcrição ao longo do desenvolvimento similar à *Sl-CathL*. Entretanto, a detecção de sítios de N-glicosilação em sua sequência de proteína deixa claro que esse

parâmetro de predição não pode ser tomado como determinante para a atuação lisossomal de cisteíno peptidases. Na tabela 1.1, os asteriscos indicam os genes que foram analisados por Real Time PCR quantitativo ao longo do desenvolvimento do inseto e também nos tecidos dissecados das larvas. Os resultados dessas análises são mostrados e discutidos na próxima seção.

### 1.3.4 Análises de qRT-PCR dos genes selecionados

As análises de Real Time PCR quantitativo foram realizadas com o objetivo principal de comprovar a atuação essencialmente no intestino médio de várias enzimas anotadas como digestivas. A comparação do perfil de expressão ao longo do desenvolvimento com a *Sl-CathL*, comprovadamente digestiva, reforça a sugestão da função digestiva também atribuída a essas outras enzimas. A figura 1.4 indica os tecidos dissecados que foram utilizados para as análises. O corte referente à cabeça foi realizado visando a identificação de prováveis sítios de secreção em glândulas salivares.

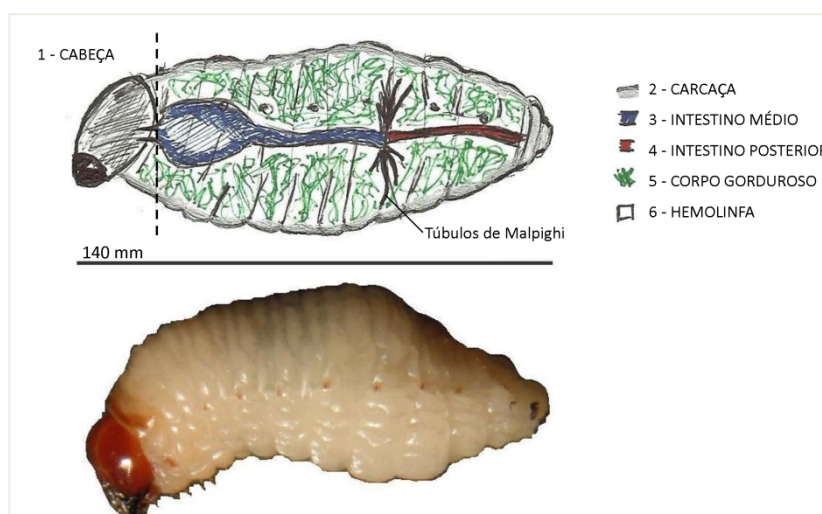


Figura 1.4: Tecidos dissecados das larvas com 30 dias de vida para as análises de qRT-PCR.

No entanto, nenhuma enzima digestiva foi identificada com índices consideráveis de expressão na região correspondente à "cabeça" (Figura 1.5), o que sugere, que ao menos para as enzimas analisadas, o sítio de secreção constitui apenas o intestino das larvas do inseto. O gráfico da figura 1.5 representa o padrão geral observado para os transcritos analisados por qRT-PCR nos diferentes tecidos das larvas de *S. levis*. Para a comparação, foi considerado para cada gene o maior

índice de expressão detectado em todos os tecidos, igual a 1x. Dessa maneira, esse gráfico não representa a diferença de expressão real entre os diferentes genes. Contudo, nessa análise podem ser visualizadas claramente as diferenças entre os níveis de expressão para cada gene nos tecidos das larvas.

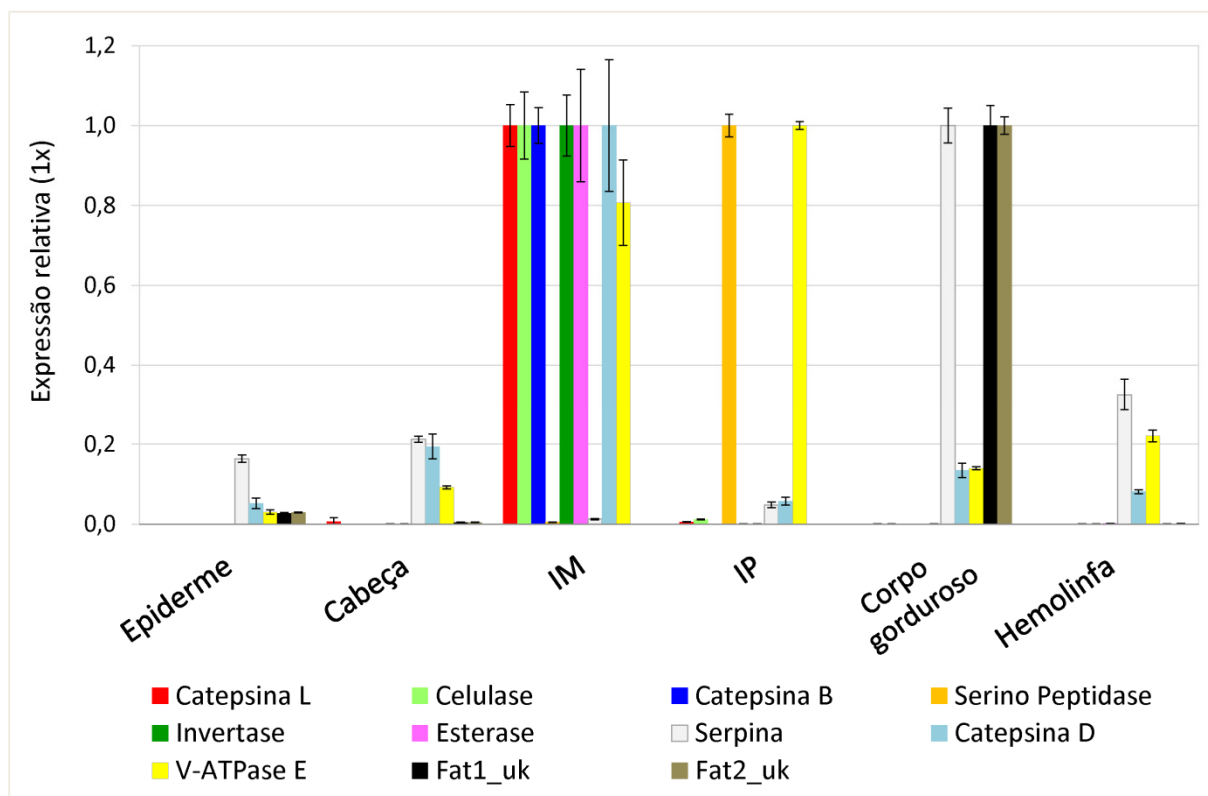


Figura 1.5: Gráfico indicando a expressão relativa analisada por qRT-PCR para os genes selecionados nos diferentes tecidos. Para a comparação, os índices máximos de transcrição para cada gene foram utilizados como calibradores (1x). A catepsina L (*Sl-CathL*), celulase, catepsina B, invertase e esterase são sintetizadas fundamentalmente no intestino médio (IM) das larvas, como esperado para enzimas digestivas. A detecção de ESTs da serino peptidase no intestino posterior (IP) é controversa, desde que essa região é normalmente revestida por quitina. As outras proteínas como a serpina, V-ATPase, catepsina D e duas proteínas de função desconhecida (Fat 1 e 2) são transcritas em níveis elevados nos tecidos além do intestino médio, o que indica a participação em processos não digestivos.

Os resultados de qRT-PCR obtidos para a *Sl-CathL* servem como padrão para a identificação de outras enzimas digestivas, considerando a comprovação da atuação digestiva dessa enzima, descrita no capítulo 2. Os *primers* utilizados para a análise da *Sl-CathL* são específicos para a variantes 1, correspondente a *rSl-CathL*. Na figura 1.5 é observado que o padrão de expressão da celulase ( $\beta$ -1,4-endoglucanase), catepsina B, invertase e esterase é muito similar ao da catepsina L. Verifica-se que a síntese de RNAm para essas enzimas ocorre fundamentalmente no intestino médio das larvas, como esperado para enzimas digestivas.

As outras proteínas como a serpina, V-ATPase, catepsina D e duas proteínas de função desconhecida (Fat 1 e 2) são transcritas em níveis consideráveis em outros tecidos além do intestino médio, o que indica a participação em outros processos não digestivos. Os perfis de expressão da V-ATPase e serpina são discutidos em detalhes no capítulo 3, considerando esses genes como alvos para o silenciamento.

Assim como na análise anterior, a expressão gênica relativa avaliada durante as fases do desenvolvimento de *S. levis* não aponta as verdadeiras diferenças entre as abundâncias dos transcritos, mas facilita a compreensão por meio da comparação dos perfis identificados. As enzimas que tiveram a transcrição previamente identificada no intestino do inseto atingem os maiores índices de expressão nas larvas com 30 dias de vida (Figura 1.6), com exceção da celulase que é mais abundante no estágio anterior (20 dias). Como esperado para enzimas digestivas, a transcrição é reduzida nas pré-pupas quando os insetos cessam a alimentação e é praticamente nula no estágio pupal.

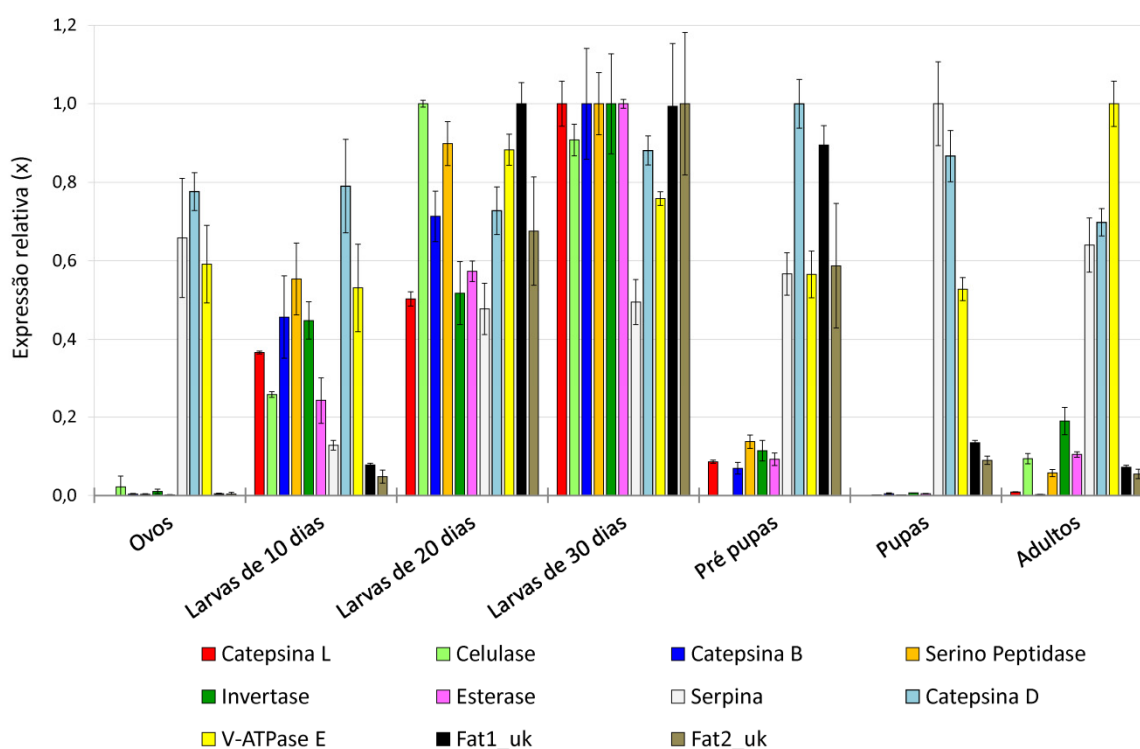


Figura 1.6: Gráfico da análise da expressão gênica relativa durante as fases do desenvolvimento de *S. levis* analisadas por qRT-PCR. Para o efeito comparativo da análise, os índices máximos de transcrição detectados para cada enzima ao longo do ciclo de vida do inseto foram tomados como calibradores (1x). Assim, os níveis de transcrição das enzimas não refletem as diferenças reais considerando as abundâncias entre si. As enzimas digestivas, fundamentalmente produzidas no

intestino médio, atingem os maiores índices de expressão nas larvas com 30 dias de vida, com exceção da celulase que é mais abundante no estágio anterior (20 dias). Essas enzimas têm a transcrição reduzida nas pré-pupas e praticamente anulada na fase de pupa. A catepsina D foi detectada em todos os tecidos e fases do desenvolvimento, o que sugere a atuação não digestiva dessa enzima.

Na figura 1.7 os índices de transcrição dos genes analisados por qRT-PCR são apresentados pelas diferenças reais observadas entre a abundância de seus transcritos. A predominância da catepsina L está de acordo com o observado na biblioteca e também na análise de atividade peptidásica de cisteíno peptidases no intestino médio das larvas de *S. levis* (Soares-Costa et al., 2011). As catepsinas B também contribuem para a atividade de cisteíno peptidases no intestino das larvas do inseto e a detecção minoritária de serino peptidases (tipo tripsina) também foi verificada no intestino, de acordo com as observações prévias do relato da atividade dessa enzima (Soares-Costa et al., 2011).

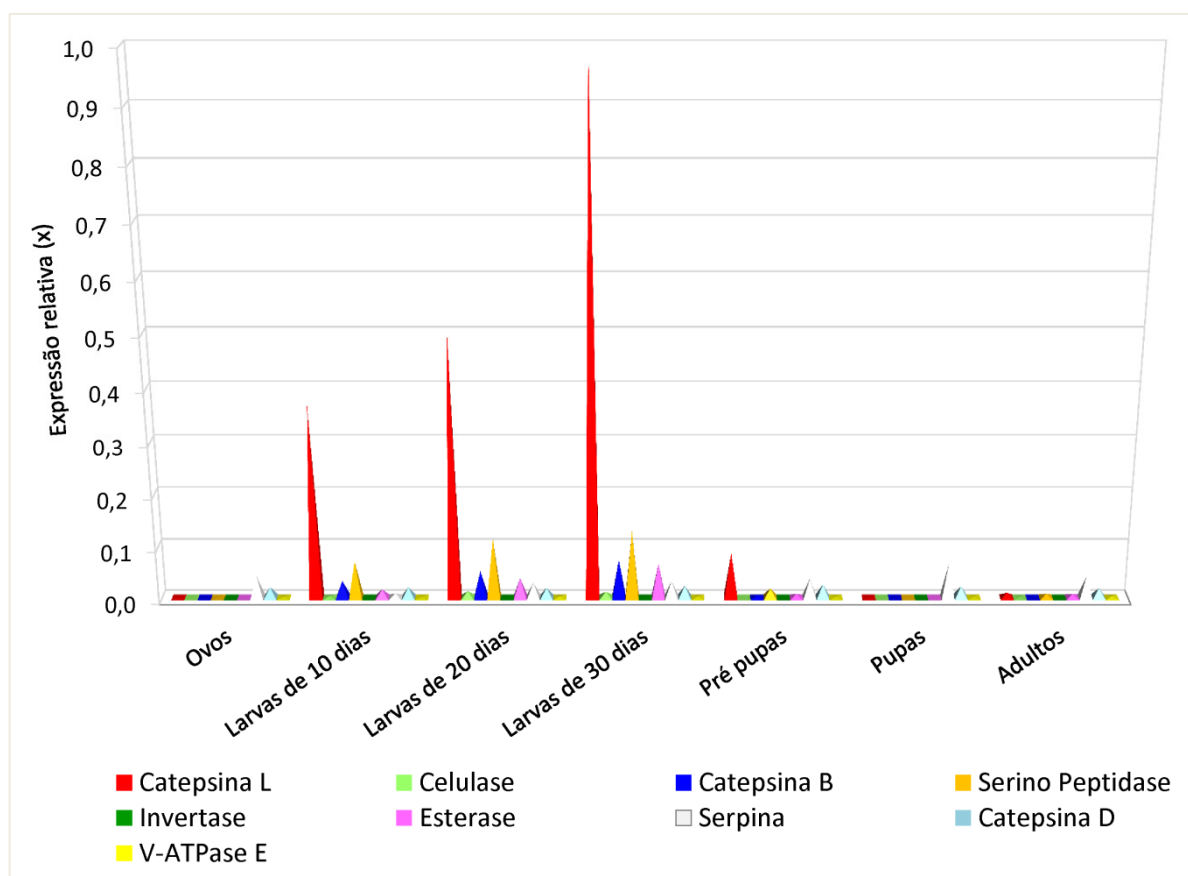


Figura 1.7: Gráfico do perfil de expressão gênica das diversas enzimas de *Sphenophorus levis* durante o ciclo biológico do inseto. Esses resultados correspondem à expressão relativa real entre os genes estudados. As cisteíno peptidases são predominantes em função da abundância de transcritos de catepsinas L e minoritária de catepsinas B.



### 1.3.5 Peptidases identificadas no transcriptoma das larvas de *S. levis*

#### 1.3.5.1 Cisteíno peptidases tipo catepsina B

A catepsina B apresenta atividade de peptidil-dipeptidase (exopeptidase) e também endopeptidásica que é extremamente reduzida quando comparada à catepsina L que atua exclusivamente como endopeptidase. A atividade endopeptidásica da catepsina B está relacionada à presença de um *loop* estendido que protege o sítio ativo da enzima, a tríade catalítica (cisteína, histidina e asparagina) é conservada entre as cisteíno peptidases tipo catepsina B e L (Barret et al., 1998).

No alinhamento das sequências de aminoácidos das catepsinas B de *S. levis* e *Callosobruchus maculatus*, indicado na figura 1.8A, são indicados os resíduos de aminoácidos conservados do sítio ativo, além da provável região que corresponde ao *loop* da catepsina B de *C. maculatus* (Koo et al., 2008), que pode interferir na interação do sítio ativo dessas enzimas com os respectivos substratos e também inibidores. O *contig* 53 formado por 19 sequências foi analisado por qRT-PCR e a expressão predominante no intestino médio indica a participação da catepsina B codificada nos processos de digestão de proteínas nas larvas.

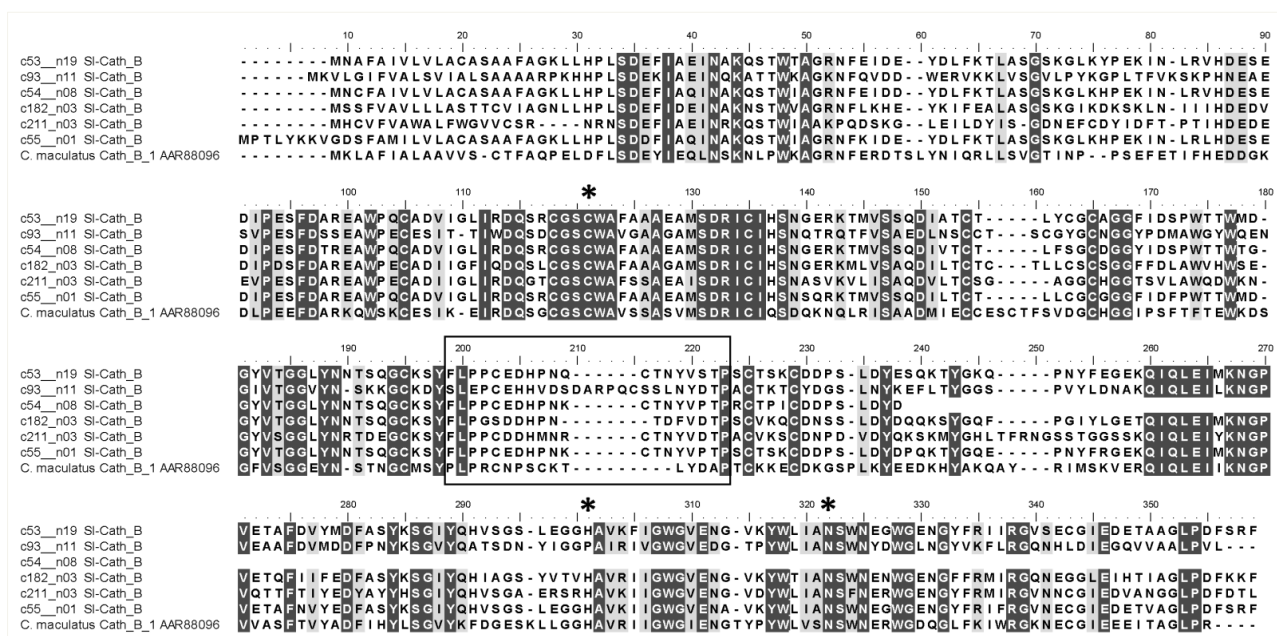


Figura 1.8A: Alinhamento entre as cisteíno peptidases tipo catepsinas B de *S. levis* e da catepsina B de *Callosobruchus maculatus*. Os asteriscos indicam os resíduos de aminoácidos da tríade catalítica conservada de cisteíno peptidases: cisteína, histidina e asparagina. A caixa evidencia o provável *loop*, de acordo com a sequência caracterizada para *C. maculatus* (Koo et al., 2008).

Assim como *S. levis* o besouro *Callosobruchus maculatus* produz fundamentalmente catepsina L como a principal enzima digestiva para a degradação de proteínas no intestino (Kitch e Murdock, 1986; Zhu-Salzman et al., 2003). Quando desafiado com um inibidor de cisteíno peptidases, a cistatina N da soja, as larvas de *C. maculatus* são capazes de reajustar a expressão de suas enzimas digestivas, e passam a produzir a catepsina B1 em taxas muito mais elevadas. Essa catepsina B é insensível ao inibidor, provavelmente devido à presença do *loop* que impede o acesso do inibidor ao sítio ativo, e constitui uma enzima do sistema de contra-defesa do inseto a fatores anti-nutricionais (Koo et al., 2008).

O perfil de transcrição observado para a catepsina B de *S. levis* é similar ao da catepsina B de *C. maculatus*, com padrão de expressão crescente durante as fases de desenvolvimento larvais e praticamente nula nas pupas. O efeito sinérgico da administração simultânea de inibidores para ambas as classes de enzimas digestivas, catepsinas L e B, pode sobrepor-se à plasticidade dos mecanismos de contra-defesa do inseto levando-o à morte logo nos primeiros estágios larvais.

O perfil das peptidases digestivas identificadas a partir do transcriptoma (Tabela 1.1) e também por qRT-PCR (Figura 1.7) apontam a catepsina B de *S. levis* como a segunda classe de peptidase mais abundante no intestino do inseto. Nas estratégias de controle visando a inibição da atividade peptidásica deve ser considerada a utilização sinérgica de inibidores contra as catepsinas B e L como uma alternativa, caso o inseto seja capaz de adaptar-se à presença de um inibidor. No próximo capítulo é relatada a potência do inibidor cistatínico CaneCPI-4 contra a catepsina L recombinante, que em adição também mostrou-se eficiente contra catepsina B humana (Gianotti et al., 2008). Considerando essas especificidades, a CaneCPI-4 pode apresentar atividade sinérgica, *in vivo*, contra as duas classes de peptidases mais abundantes no intestino de *S. levis*.

### 1.3.5.2 Serino peptidases

A detecção de ESTs da serino peptidase no intestino posterior é controversa, desde que essa região é normalmente revestida por quitina. A ação de serino peptidases é relatada no final do intestino médio de *Tenebrio molitor* (Vinokurov et al., 2006, Prabhakar et al., 2007) e *Tribolium castaneum* (Vinokurov et al., 2009),

ambos insetos da família Tenebrionidae. Para *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) a atividade de serino peptidases foi também detectada no intestino posterior, ainda que diminuída 15 vezes em relação à atividade detectada no intestino médio (Gatehouse et al., 2009). Em *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) 16% da atividade total de tripsinas foi detectada no intestino posterior de insetos adultos, mas os autores atribuíram essa atividade ao fluxo de enzimas provenientes do intestino médio (Zhu e Baker, 1999).

Curiosamente, na análise de atividade das tripsinas a partir das frações do intestino de *S. levis*, a atividade máxima dessas enzimas foi verificada em pH acima de 8,0. A detecção da atividade decrescente de tripsinas ao longo do conteúdo do intestino médio é incongruente com os valores de pH observados ao longo do intestino médio das larvas de *S. levis* que variam de 5,5 na região anterior (V1) a 7,6 na região posterior (V4) (Soares-Costa et al., 2011), mas essa distribuição pode ainda ser justificada pelo fluxo das enzimas nos espaços endo e ectoperitróficos, relacionado à reciclagem das mesmas (Terra e Ferreira, 2011).

Nesse sentido, o aparente artefato da detecção da expressão da tripsina analisada no intestino posterior, onde o pH deve ser mais elevado, ganha uma sustentação fisiológica para a ocorrência atípica dessa enzima. Ainda, a não detecção desses transcritos no intestino médio exclui a possibilidade de contaminação entre os tecidos. No entanto, a suposição de que a tripsina mais abundante de *S. levis*, correspondente ao *contig* 111, seja de fato produzida no intestino posterior é indicada exclusivamente pelos resultados de qRT-PCR, o que não exclui a possibilidade de atuação intracelular. Pelo fato do intestino posterior de insetos ser geralmente revestido por quitina, outros estudos como a imunolocalização da enzima são necessários para confirmar a atuação digestiva dessa tripsina.

Além disso, os *primers* utilizados para as análises de expressão gênica da serino peptidase são específicos para o *contig* 111, o mais abundante dentre as serino peptidases identificadas, que é formado por 7 sequências que codificam uma tripsina. O padrão de transcrição não foi analisado para os outros dois *contigs*, formados por 6 e 3 ESTs (*contigs* 128 e 200, respectivamente), que codificam quimotripsinas (Figura 1.8B). Outras 12 sequências únicas e um *contig* contendo

duas sequências de serino peptidases não foram sequenciados por completo e caracterizados.

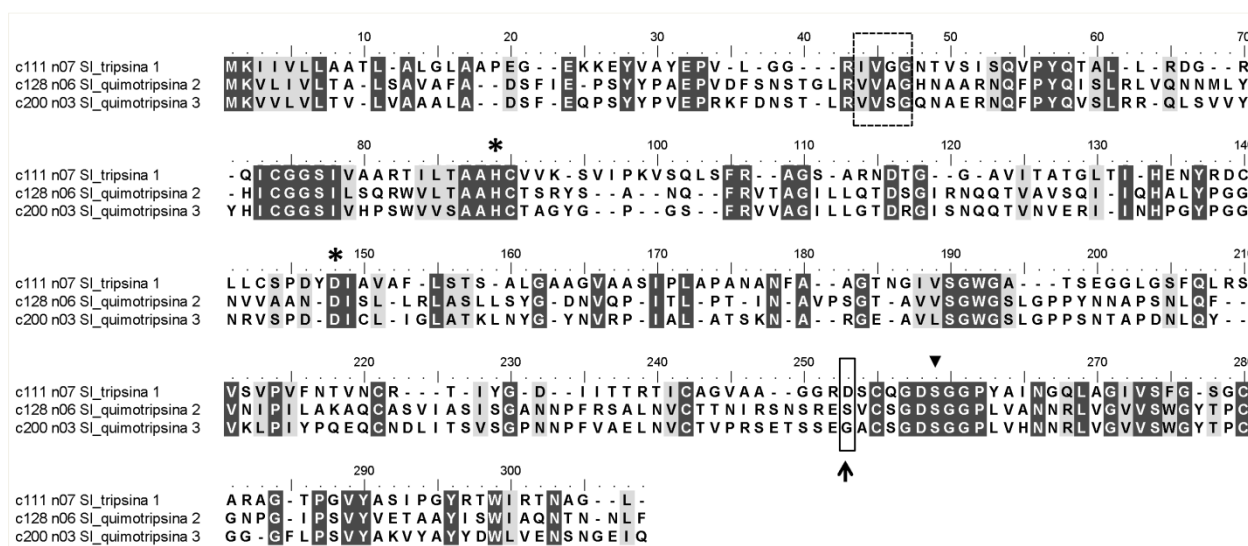


Figura 1.8B: Alinhamento das sequências de proteínas dos contigs de serino peptidases identificados na biblioteca de larvas de *S. levis*. O contig 111 é formado por 7 sequências e codifica uma provável tripsina. A caixa pontilhada corresponde à extremidade N-terminal conservada das tripsinas (IVGG). Os resíduos do sítio ativo das serino peptidases, histidina (His<sup>57</sup>) e ácido aspártico (Asp<sup>102</sup>), são indicados por um asterisco e a serina reativa (Ser<sup>195</sup>) é indicada por uma cabeça de seta. A seta e a caixa branca indicam o resíduo conservado de ácido aspártico (Asp<sup>189</sup>) que confere especificidade às tripsinas, que é substituído por uma serina, glicina ou tirosina nas quimotripsinas (Terra e Ferreira, 2011). Os resíduos idênticos são marcados em caixas escuras e aqueles conservados são indicados em caixas cinza.

Nas análises de atividade de serino peptidases no intestino das larvas de *S. levis*, previamente relatadas por Soares-Costa e colaboradores (2011) foi detectada a atividade de, ao menos, duas tripsinas e nenhuma atividade considerável de quimotripsinas. Os resultados obtidos a partir da análise da biblioteca de *S. levis* indicam que, muito provavelmente, ao menos uma outra tripsina digestiva deve ser codificada por um dos *singlets* de serino peptidases. Ainda, os dois contigs que codificam quimotripsinas podem não codificar enzimas de fato digestivas, uma vez que a atividade dessas enzimas não foi detectada anteriormente no intestino médio das larvas de *S. levis*. Estudos mais detalhados, como imunolocalização ou mesmo qRT-PCR, são necessários para a confirmação da função dessas serino peptidases identificadas no transcriptoma.

### 1.3.5.3 Catepsina D

A catepsina D é a aspartil protease mais estudada em artrópodes e pode participar da proteólise intra ou extracelular (Lenarcic et al., 1991; Terra e Ferreira,

1994). Essas enzimas têm preferência por pH ácido variando entre 3 e 5, e o mecanismo de catálise é baseado em dois resíduos de aspartato no sítio ativo. A atuação da catepsina D nos processos fisiológicos dos insetos é muito ampla: na mosca do mediterrâneo (*Ceratitis capitata*) promove a histólise do corpo gorduroso (Rabossi et al., 2004). No bicho da seda (*Bombyx mori*) está relacionada à apoptose e à muda do estágio de larva para pupa (Gui et al., 2006). Em mosquitos, modula a produção e degradação da vitelogenina (Cho e Raikhel, 1992), e atua na digestão de proteínas presente no sangue ingerido por ácaros e carrapatos (Boldbaatar et al., 2006).

Em coleópteros a catepsina D pode ser secretada no intestino médio de diversas espécies, especialmente daquelas que produzem essencialmente cisteíno proteases como principal enzima digestiva (Silva e Xavier-Filho, 1991; Brunelle et al., 1999). Foi demonstrado que a catepsina D encontrada no intestino do besouro do Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) tem a capacidade de iniciar a hidrólise de um inibidor de cisteíno peptidases adicionado à dieta. A completa digestão do inibidor, cistatina da soja, se dá pela ação de cisteíno e serino peptidases que atuam após a clivagem inicial promovida pela catepsina D (Brunelle et al., 1999).

Em *C. maculatus*, as aspartil peptidases tipo catepsina D são encontradas no extrato do intestino representando aproximadamente 10% do total de atividade proteolítica (Kitch e Murdock, 1986; Ahn e Zhu-Salzman 2009). Nesse inseto, essas peptidases também são relatadas como enzimas relacionadas à resposta adaptativa induzida pela adição de inibidores de cisteíno peptidases (Ahn e Zhu-Salzman, 2009).

A atividade de aspartil peptidases tipo catepsina D também foi detectada no intestino das larvas de *T. castaneum* (Blanco-Labra et al., 1996), porém em um estudo mais recente foi constatado que essa atividade proteolítica detectada em extratos do intestino é decorrente da liberação de aspartil peptidases intracelulares, e não digestivas (Vinokurov et al., 2009). Em *Tenebrio molitor*, a existência de aspartil peptidases digestivas também é improvável (Terra e Christofolletti, 1996; Vinokurov et al., 2006).

O perfil de transcrição gênica identificado para a catepsina D de *S. levis* difere completamente daqueles observados para as outras enzimas analisadas. A detecção de transcritos dessa enzima em todos os tecidos e durante todo o

desenvolvimento do inseto sugere fortemente a atuação dessa aspartil peptidase de *S. levis* em processos não digestivos, assim como identificado para *T. molitor* e *T. castaneum*. Na figura 1.9A é indicado o alinhamento entre a sequência de aminoácidos da catepsina D de *S. levis* com as proteínas homólogas de outros insetos, incluindo as catepsinas D caracterizadas como enzimas digestivas em *Musca domestica* (Diptera) (Padilha et al., 2009).

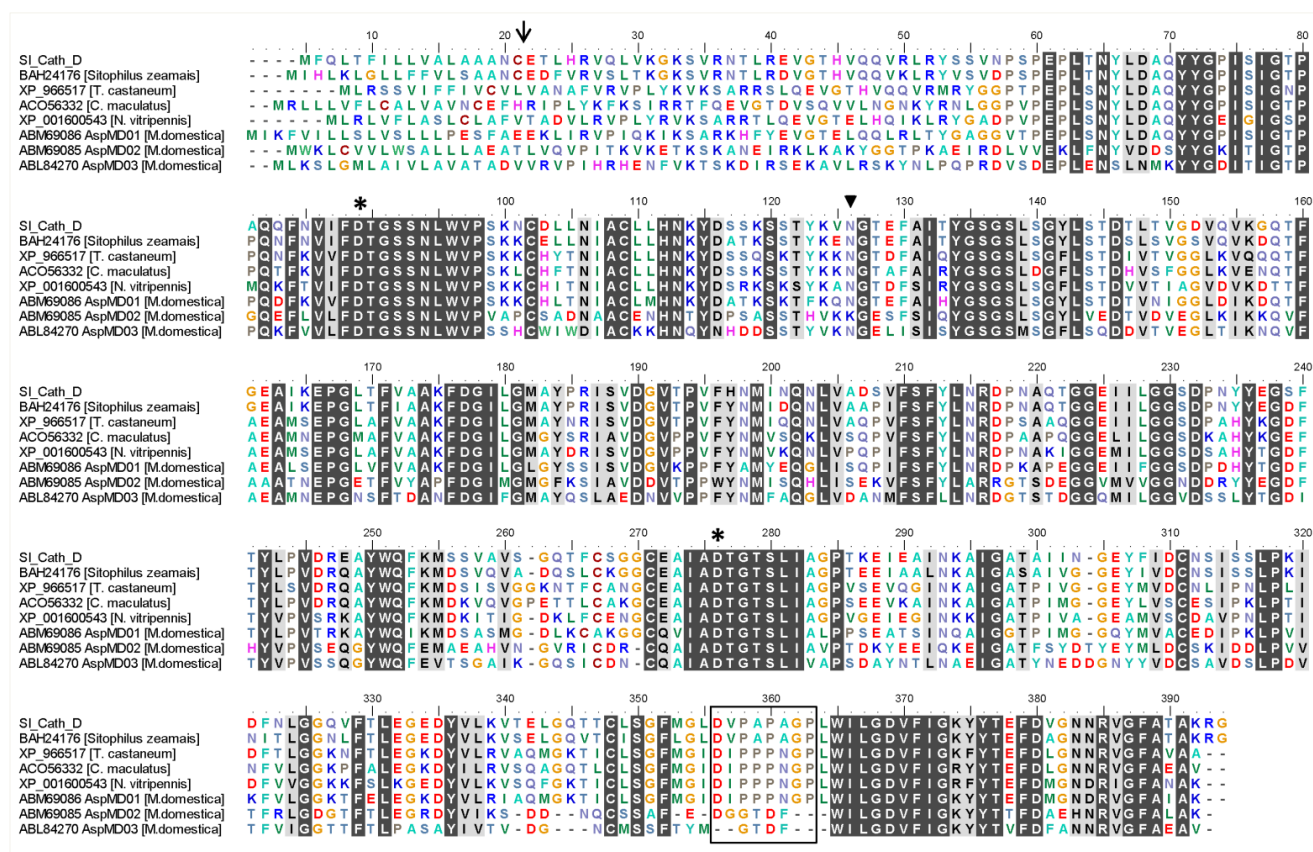


Figura 1.9A: Alinhamento entre a catepsina D de *S. levis* e outras aspartil peptidases de insetos. As caixas escuras mostram os aminoácidos idênticos e as caixas cinza indicam os aminoácidos em sítios conservados, que apresentam características similares. A seta indica o provável peptídeo sinal da *Sl-CathD* e a cabeça de seta o provável sítio de N-glicosilação (Asn<sup>122</sup>). Os asteriscos indicam os resíduos de aspartato (D) do sítio ativo dessas enzimas, enquanto a caixa sem preenchimento evidencia a presença do *loop* de prolínas "DxPxPx(G/A)P", característico das catepsinas lisossomais descrito por Padilha e colaboradores (2009).

As catepsinas D digestivas CAD 2 e CAD 3 de *M. domestica* não possuem um *loop* de prolínas "DxPxPx(G/A)P", característico das catepsinas lisossomais descrito por Padilha e colaboradores (2009), que é evidente em todas as outras catepsinas D de insetos, incluindo a CAD 1 de *M. domestica* e a catepsina D de *S. levis* (Figura 1.9A). Essa assinatura reforça a observação feita a partir das análises de RT-PCR da catepsina D de *S. levis*, e também a ausência da atividade de aspartil peptidases

nos ensaios de caracterização enzimática utilizando as frações de conteúdo do intestino (Soares-Costa et al., 2011).

### 1.3.6 Digestão de proteínas e a variabilidade de *SI-CathLs*

Dentre as prováveis enzimas digestivas identificadas no transcriptoma, 67,35% dos ESTs estão relacionados à digestão de proteínas que é fundamentada pela atividade de diversas variantes de cisteíno peptidases do tipo catepsinas L (54,29%). Em uma análise manual e mais detalhada das catepsinas L que foram agrupadas inicialmente em 7 *contigs*, foi possível a identificação de ao menos 32 variantes protéicas das *SI-CathLs*, baseando-se apenas na comparação das extremidades 5' dos cDNAs, correspondente a aproximadamente 136 aminoácidos da região N-terminal das proteínas codificadas. Essas enzimas foram agrupadas em 3 grandes classes, de acordo com a similaridade com a variante mais abundante da *SI-CathL 1*, correspondente à enzima recombinante caracterizada no capítulo 2, e a distribuição dessas variantes é indicada na tabela 1.2.

Tabela 1.2: Variantes da *SI-CathL* indicadas de acordo com a abundância de ESTs e variantes de proteínas identificadas em cada *contig* a partir da análise manual.

Classe	<i>Contig</i>	ESTs (N)	Clusters de ESTs	Variantes protéicas
<i>SI-CathL 1</i>	13	261	32	12
	14	2	1	1
	16	1	1	1
	17	1	1	1
<i>SI-CathL 2</i>	15	44	8	7
	63	22	4	3
<i>SI-CathL 3</i>	33	26	4	3
	34	5	1	1
	35	21	3	3

Para a divisão das catepsinas elas foram classificadas de acordo com a similaridade da sequência de proteína com a r*SI-CathL*, que codifica a variante mais abundante das catepsinas, formada por 107 sequências que compõem a variante protéica mais abundante do *contig* 13. As catepsinas classificadas como *SI-CathL 1* apresentam similaridade maior que 90% na sequência de aminoácidos com a r*SI-CathL*, enquanto as *SI-CathL 2* e *SI-CathL 3* compartilham mais de 75% e 45% de identidade de sequência protéica, respectivamente, com a enzima mais abundante identificada. A análise inicial das catepsinas no programa dCAS gerou os 7 *contigs*

que são mostrados na tabela 1.3. O alinhamento entre as sequências completas das proteínas obtidas para cada um dos clusters é mostrado na figura 1.9B. A cabeça de seta indica o resíduo de cisteína do sítio ativo da enzima, que em uma das variantes da *SI-CathL 3* é substituído por uma serina.

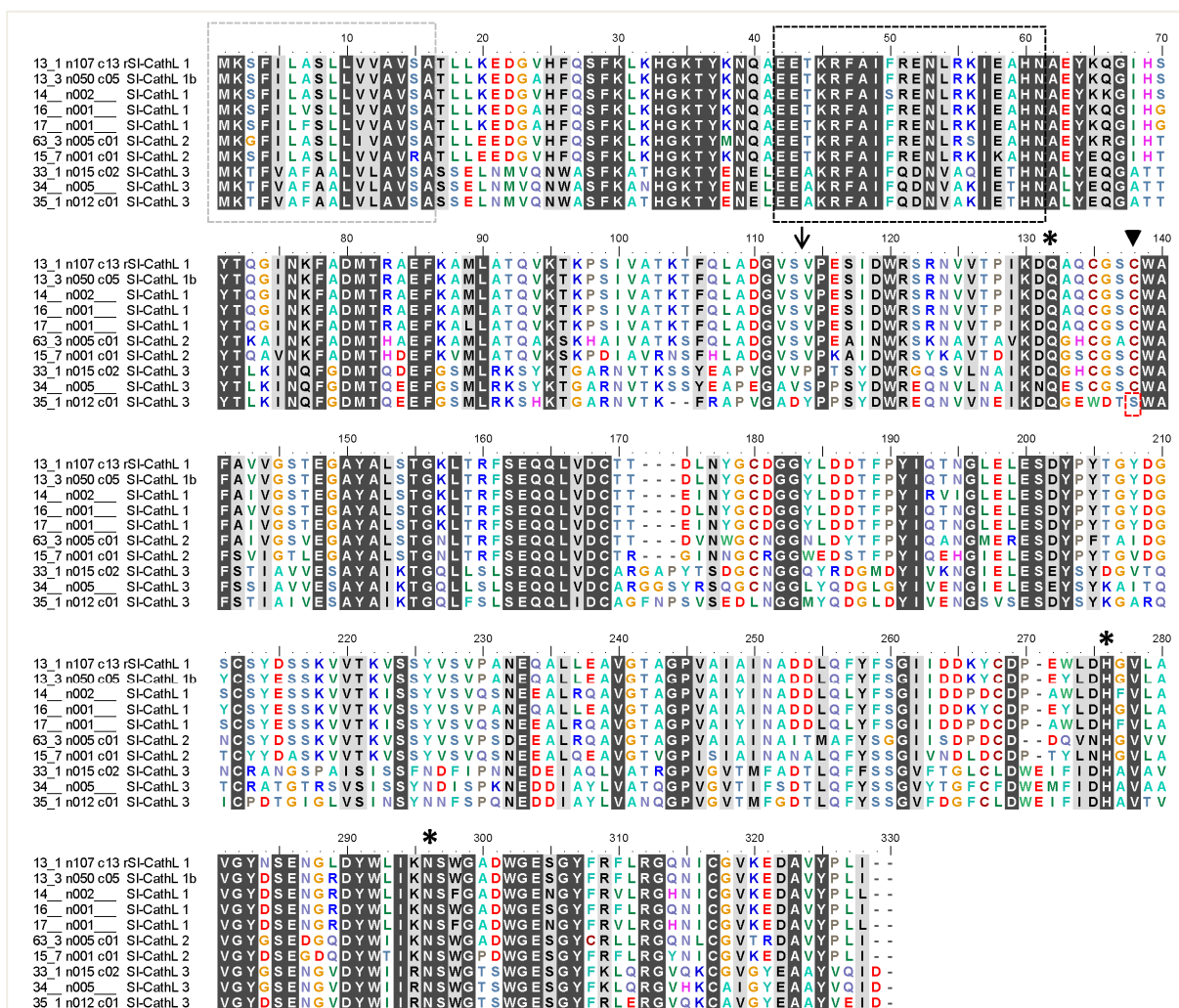


Figura 1.9B: Alinhamento entre as sequências completas de algumas das variantes das *SI-CathL*s 1, 2 e 3. Todas as variantes tem o peptídeo sinal identificado para a *SI-CathL* e também a pró região com o motivo inibitório de catepsinas L ( $E^{42}R^{46}F^{50}N^{53,57}N^{61}$ ) conservados indicados pelas caixas seccionadas cinza e preta, respectivamente. A seta aponta o sítio de clivagem da pró-região identificado para a *rSI-CathL* e a cabeça de seta indica o resíduo de cisteína do sítio ativo ( $Cys^{138}$ ), que é substituído por uma serina em uma das variantes do *contig 35*. A nomenclatura das variantes segue o padrão da primeira sequência do alinhamento correspondente à *rSI-CathL* (GenBank: ACK38176) a mais abundante entre todas as catepsinas L identificadas: pertencente ao *contig 13* (13), variante protéica 1 ( $\_1$ ) codificada por 107 sequências (n107), distribuídas em 13 clusters de cDNA (c13).

A partir da análise do genoma de *T. castaneum* foi verificada a expansão das cisteíno peptidases C1, que incluem catepsinas B e L, em cinco famílias divididas em quatro grandes clusters (Richards et al., 2008). Nas análises iniciais de anotação do genoma de *T. castaneum* foram identificados 165 genes que codificam serino



peptidases, 25 para cisteíno peptidases e outros 12 para carboxipeptidases (Prabhakar et al., 2007). A grande representação quantitativa, assim como a diversidade de peptidases identificadas em transcriptomas do intestino de outros besouros, como identificado para *Tenebrio molitor* (Prabhakar et al., 2007) e *Chrysomela tremulae* (Pauchet et al., 2009) não é diferente da diversidade de catepsinas L observadas no transcriptoma das larvas de *S. levis* e reforça a importância dessas peptidases nos processos digestivos das larvas de coleópteros.

Curiosamente, a maioria dessas catepsinas B identificadas no genoma de *T. castaneum* apresentam mutações em resíduos relacionados à atividade catalítica que é associada com a perda da atividade catalítica (Richards et al., 2008). Contudo, essas variantes também foram identificadas no transcriptoma o que indica que essas peptidases desempenham alguma função, como por exemplo, a atuação em mecanismos de defesa contra inibidores de cisteíno peptidases (Morris et al., 2009). No transcriptoma de *S. levis* também foram identificadas variantes abundantes da *SI-CathL 3*, com a cisteína do sítio ativo substituída por uma serina (Figura 1.10).

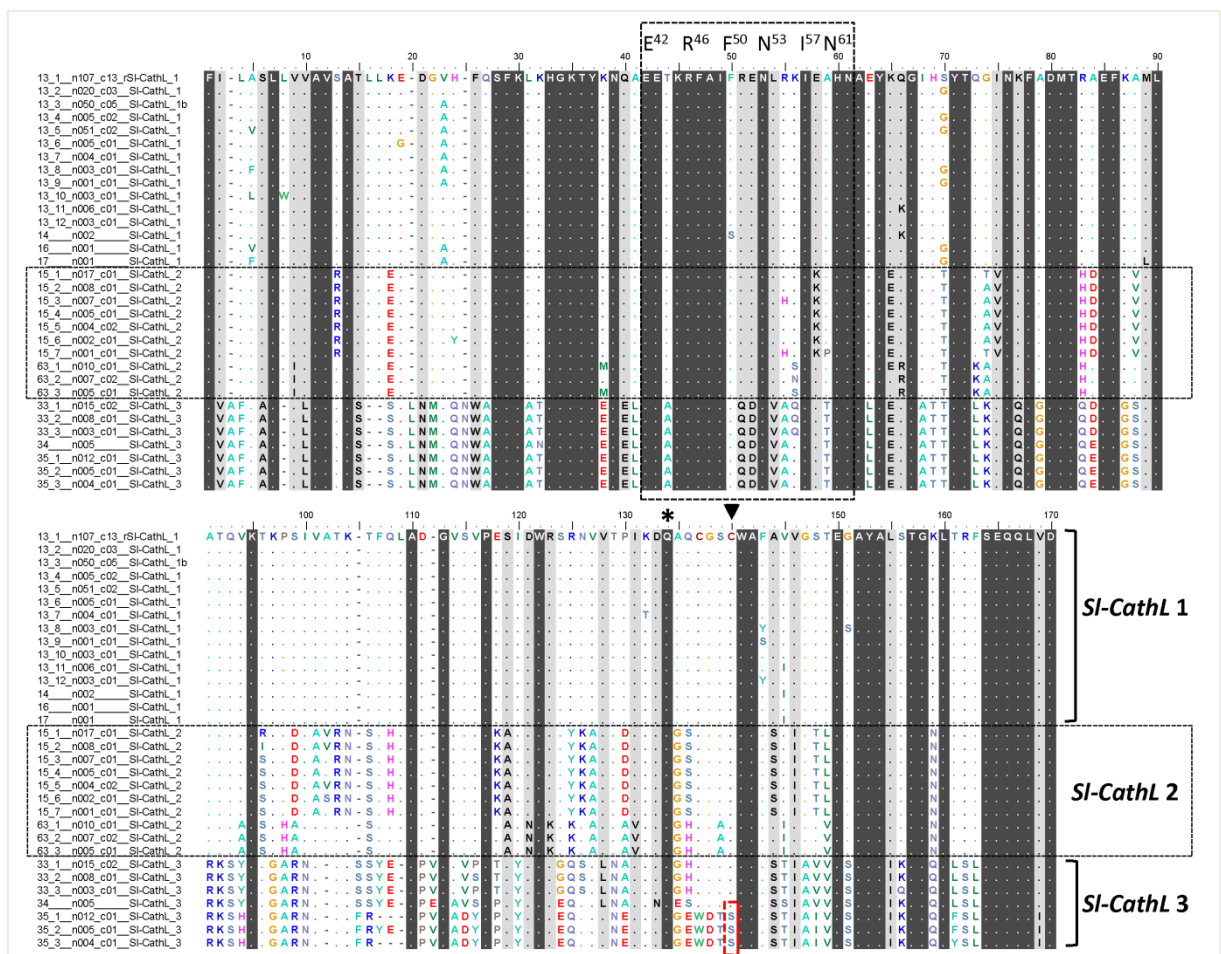


Figura 1.10: Alinhamento entre os fragmentos N-terminais das variantes das *Sl-CathLs* 1, 2 e 3. O grupo correspondente à *Sl-CathL* 2 está ressaltado com uma caixa seccionada horizontal preta. As sequências acima dessa caixa correspondem às variantes da *Sl-CathL* 1, e aquelas abaixo da caixa são as variantes da *Sl-CathL* 3. Todas as variantes possuem o motivo conservado E<sup>42</sup>R<sup>46</sup>F<sup>50</sup>N<sup>53</sup>I<sup>57</sup>N<sup>61</sup> da pró-região inibitória, o que está destacado na primeira seção do alinhamento. A cabeça de seta indica o resíduo de cisteína (Cys<sup>138</sup>) do sítio ativo conservado, com exceção das três variantes da *Sl-CathL* 3 pertencentes ao *contig* 35, nas quais a caixa vermelha indica a mutação para o resíduo de serina. O asterisco aponta o resíduo de glutamina (Gln<sup>132</sup>) conservado, também envolvido no mecanismo de catálise.

No alinhamento entre as sequências completas das variantes da *Sl-CathL*, indicado na figura 1.9, é possível verificar que os resíduos de asparagina e histidina que compõem a tríade catalítica da *Sl-CathL* são conservados entre todas as variantes. Apesar das mutações observadas no resíduo reativo de cisteína das sequências da *Sl-CathL* 3 que formam o *contig* 35 aparentemente implicarem na perda de funcionalidade da enzima, estudos mais detalhados são necessários para confirmar a perda da atividade assim como a função dessas variantes.

O resultado do experimento desenhado para verificar a expressão diferencial das sequências de *Sl-CathLs* provenientes das bibliotecas de insetos cultivados em dieta artificial e no campo é indicado na figura 1.11. Foram utilizadas 58 sequências provenientes de cada tratamento. As sequências provenientes da análise do transcriptoma das larvas também são incluídas nessa análise e as frequências dessas variantes são indicadas na figura (n). O agrupamento das sequências realizado pelo método de Neighbor Joining facilitou a identificação de sequências similares, que aponta a provável expressão diferencial de variantes da *Sl-CathL* 2 nas diferentes dietas. Em função do reduzido número de clones analisados, análises de qRT-PCR são necessárias para confirmar as diferenças nos níveis de expressão encontradas a partir da análise dessas bibliotecas.

O ramo destacado em vermelho corresponde às variantes da *Sl-CathL* 2 abundantemente produzidas em condições de dieta natural do inseto, alimentando-se de cana-de-açúcar. O ramo em azul evidencia outra variante da *Sl-CathL* 2 também identificada na biblioteca, não tão abundante, que é aparentemente transcrita preferencialmente em condições de dieta artificial. Cabe ainda destacar que, a partir do sequenciamento dos clones provenientes dessas bibliotecas de *Sl-CathL*, novas variantes da enzima foram identificadas, as quais não foram encontradas na biblioteca da qual milhares de clones foram sequenciados.

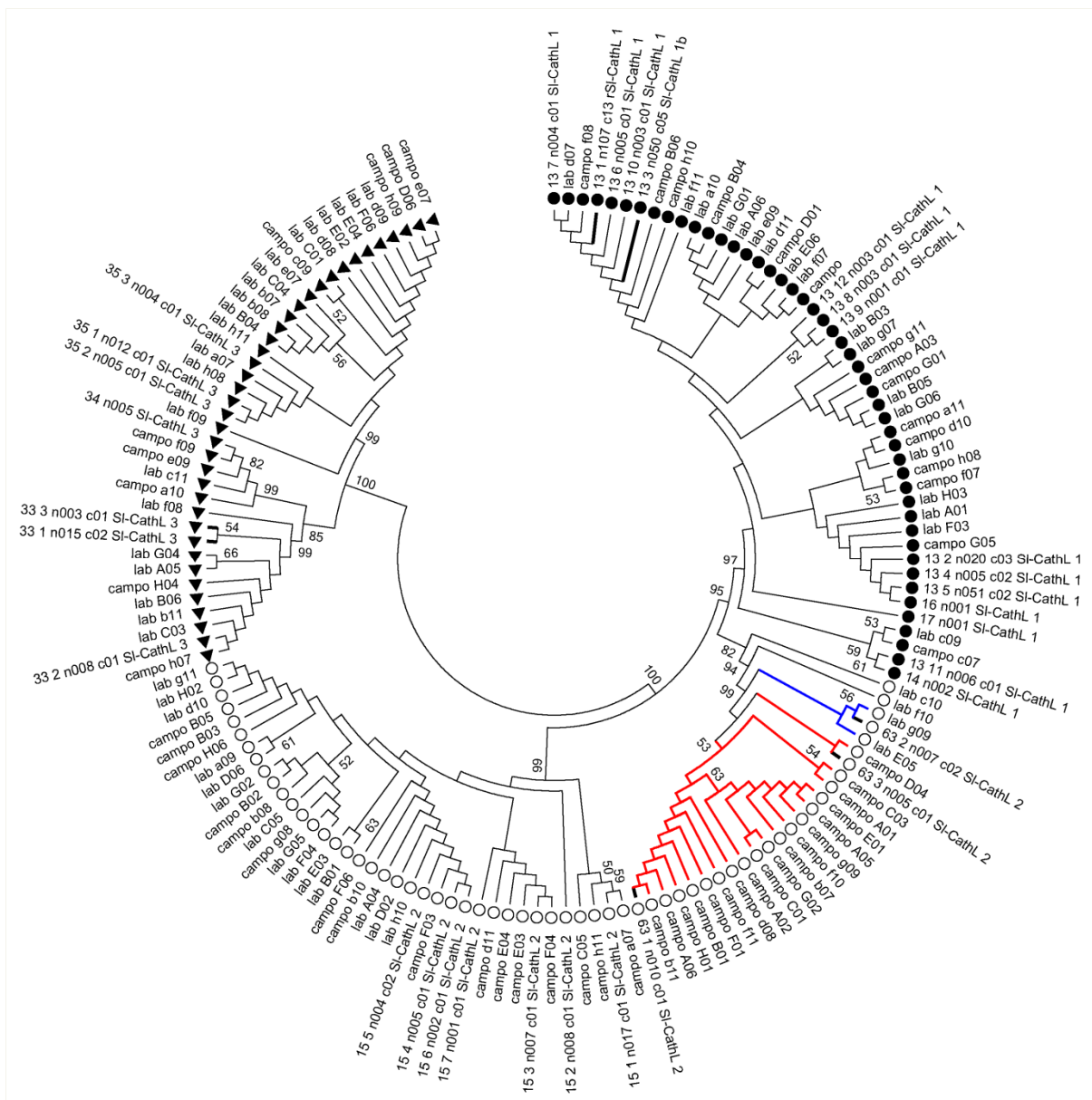


Figura 1.11: Agrupamento das *SI-CathLs* baseado-se na similaridade da região N-terminal das proteínas. As sequências obtidas em condição de dieta artificial estão indicadas como "lab" enquanto o termo "campo" é utilizado para as sequências provenientes do tratamento em condições de dieta natural. A análise de similaridade indica a abundância de variantes da *SI-CathL 2* preferencialmente transcritas em condições de dieta natural, indicadas no ramo vermelho. Os clusters de *SI-CathL* mais abundantes do transcriptoma são indicados pelos ramos mais espessos, em preto.

É conhecido que as plantas produzem diversos inibidores protéicos contra as peptidases digestivas de insetos. Como proteínas de defesa, esses inibidores dificultam a digestão de proteínas por meio da diminuição da disponibilidade das enzimas digestivas, impedindo a síntese de proteínas essenciais para o desenvolvimento e reprodução de parasitas ou predadores (Broadway e Duffey, 1986; Lawrence e Koundal, 2002).

A grande diversidade de variantes de peptidases encontradas nos insetos está certamente relacionada à capacidade de remodelamento do sistema digestivo pela produção de peptidases insensíveis a esses inibidores, como detectado para as serino peptidases dos lepidópteros *Helicoverpa armigera* (Bown et al. 1997) e *Spodoptera frugiperda* (Paulillo et al., 2000). O mesmo foi relatado para as larvas do besouro *Tribolium castaneum* que, quando desafiadas com inibidores de cisteíno peptidases, são capazes de remodelar a produção das enzimas cisteíno peptidases digestivas, produzindo fundamentalmente serino peptidases insensíveis aos inibidores (Oppert et al., 2005).

Apesar dessa plasticidade do sistema digestivo dos insetos dificultar as estratégias de proteção contra insetos que envolvem a expressão de inibidores de peptidases em plantas (Jongsma et al., 1995; Zhu-Salzman et al., 2003; Gruden et al., 2004), essa abordagem ainda sim tem se mostrado uma eficiente abordagem para o desenvolvimento de culturas resistentes a insetos praga (Leplé et al., 1995; Lawrence e Koundal, 2002; Haq et al., 2004). Nesse sentido, a identificação das principais classes de peptidases digestivas pela abordagem transcriptômica é fundamental para o delineamento de estratégias de controle adequadas para o controle de insetos.

### **1.3.7 Digestão de carboidratos**

#### **1.3.7.1 Enzimas de degradação de parede celular (PCWDE)**

Uma ampla variedade de enzimas de degradação de polissacarídeos foi detectada no transcriptoma. Foram identificadas outras enzimas, que vão muito além das de amilases e maltases cujas atividades já eram conhecidas como importantes para a digestão de carboidratos nas larvas do inseto (Soares-Costa et al, 2011). As glicosil hidrolases identificadas tipo celulases e pectinases tomaram nossa atenção, pois a atuação dessas enzimas (PCWDE - Plant Cell Wall Degrading Enzymes) no processo de degradação de parede celular ou vegetal pode ser fundamental para aumentar a eficiência da digestão de *Sphenophorus levis*.

Na figura 1.12 essas enzimas (PCWDE) são destacadas em cinza, junto com uma invertase. As demais enzimas relacionadas à digestão de carboidratos também são indicadas em cinza, aquelas relacionadas à digestão de proteínas e lipídeos são

destacadas em verde e laranja, respectivamente. Apesar da maior contribuição de transcritos que codificam peptidases, as glicosidases são mais diversas no que diz respeito às classes de enzimas.

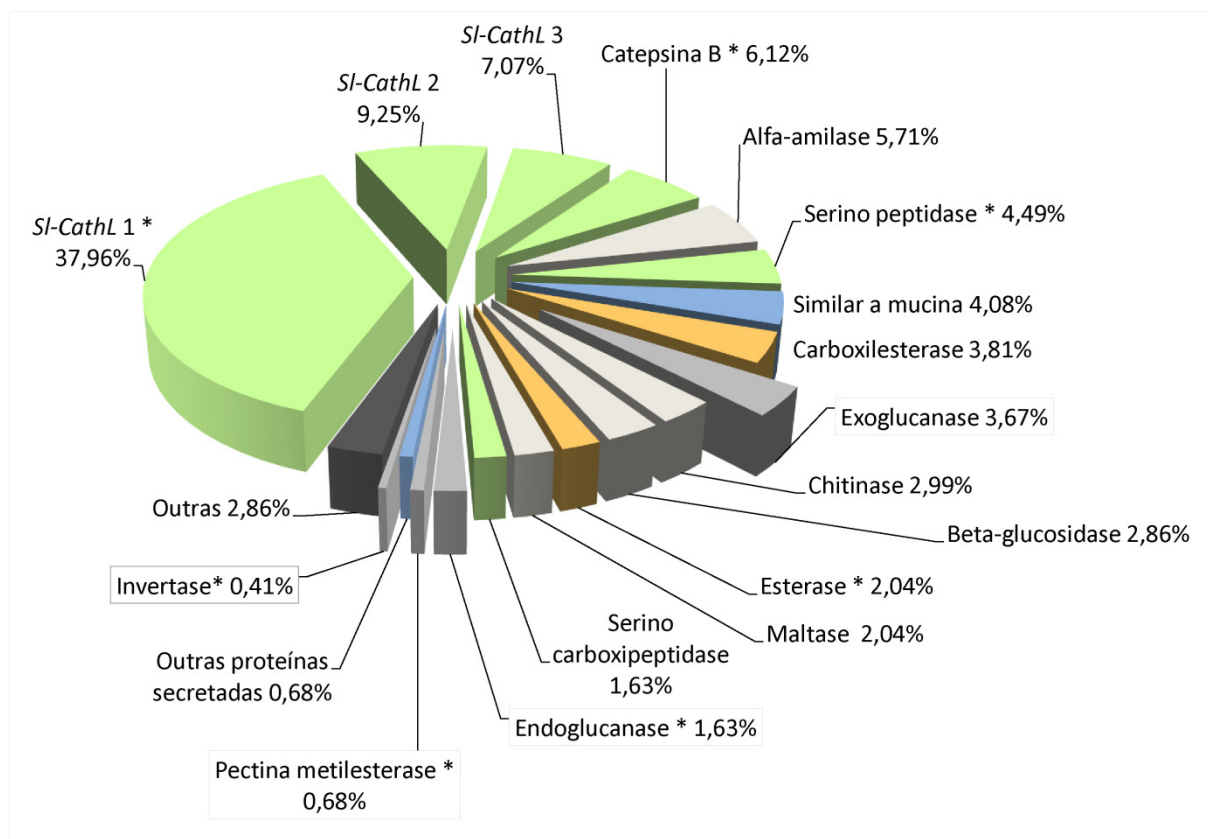


Figura 1.12: Gráfico indicando a contribuição das principais enzimas nos processos digestivos das larvas de *S. levis*. As enzimas provavelmente envolvidas na degradação de parede celular são destacadas, assim como a invertase.

Segundo Girard e Jouanin (1999), a digestão de polissacarídeos por insetos fitófagos pode ser altamente vantajosa pelo aumento da disponibilidade dos nutrientes, especialmente no sentido de degradar as paredes celulares e ajudar outras enzimas digestivas a acessar seus respectivos substratos, como por exemplo, as peptidases descritas neste estudo.

Apesar da existência de diversos relatos da atividade dessas enzimas no intestino de insetos, nenhum estudo havia provado a ocorrência de celulases ou pectinases no genoma de insetos. Além disso, o fato de micro-organismos endossimbiontes de insetos serem capazes de produzir essas PCWDE tornava duvidosa a origem dessas enzimas (Terra e Ferreira, 1994). Watanabe e colaboradores (1998) relataram pela primeira vez a ocorrência de celulases (GHF9) no reino animal, identificadas no genoma do cupim *Reticulitermes speratus*. Em

1999, Girard e Jouanin encontraram clones que codificavam celulases, xilanasas e pectinases em uma biblioteca intestinal do besouro fitófago *Phaedon cochleariae* (Chrysomelidae) e também comprovaram a origem desses genes, por análises de *Southern blot*, abrindo um novo horizonte de perspectivas em relação à importância desses genes nos processos de invasão e digestão inicial dos insetos fitófagos.

Outra celulase também foi identificada, purificada e clonada do besouro *Psacotha hilaris* (Cerambycidae) (Sugimura et al., 2003). No entanto, em ambos trabalhos com coleópteros, não é relatado nenhum cuidado para evitar a contaminação microbiótica, e nos experimentos com *P. cochleariae*, larvas inteiras foram utilizadas para os ensaios de hibridização no genoma. No entanto, esses resultados foram confirmados pela identificação de uma endoglucanase (GHF 45) no genoma do besouro *Apriona germari* (Cerambycidae). O gene foi identificado em análises de *Southern blotting* com DNA extraído de corpo gorduroso do inseto. Os autores ainda clonaram o gene, expressaram e caracterizaram essa nova celulase que foi a primeira comprovadamente identificada em coleópteros (Lee et al., 2004).

Apesar desses estudos, quando as primeiras sequências foram geradas a partir deste estudo (2007), as análises de similaridade das sequências gênicas de pectinases e principalmente celulases contra os depósitos de diferentes bancos de dados indicavam similaridades com sequências de micro-organismos, além das poucas sequências depositadas de insetos. Nas análises contra o genoma de *T. castaneum* e também *Bombyx mori* (2008), para nossa surpresa, nenhum gene homólogo foi identificado.

No período que compreende até a recente data, os maiores esforços deste estudo foram voltados para a caracterização enzimática, localização celular e inibição da principal enzima digestiva identificada no transcriptoma produzida de forma recombinante, a rSl-CathL, descrita no capítulo 2. Recentemente, os primeiros estudos transcriptômicos em larga escala de intestino de besouros, empregando pirosequenciamento (Roche 454), evidenciaram que aquelas enzimas tipo PCWDE são de fato produzidas por outros besouros como *Chrysomela tremulae* (Pauchet et al., 2009) além de outras cinco espécies de besouros fitófagos (Pauchet et al., 2010b) nas quais foram identificadas 167 novas PCWDE.

No transcriptoma das larvas de *S. levis* foram identificadas 4 sequências que codificam uma pectina metilesterase e outras 3 sequências para endo

poligalacturonases. A ausência de uma "exo" poligalacturonase, capaz de gerar monômeros de ácido galacturônico é mais uma evidência de que o papel dessas enzimas está relacionado à desestruturação da parede celular vegetal, e não à obtenção de energia. Também foram identificadas e sequenciadas por completo duas variantes de uma  $\beta$ -1,4-endoglucanase (celulase, GH45) e uma  $\beta$ -1,4-exoglucanase (celulase, GH48). O alinhamento das seqüências de proteína das duas endoglucanases de *S. levis* com as celulases de outros coleópteros é indicado na figura 1.13.

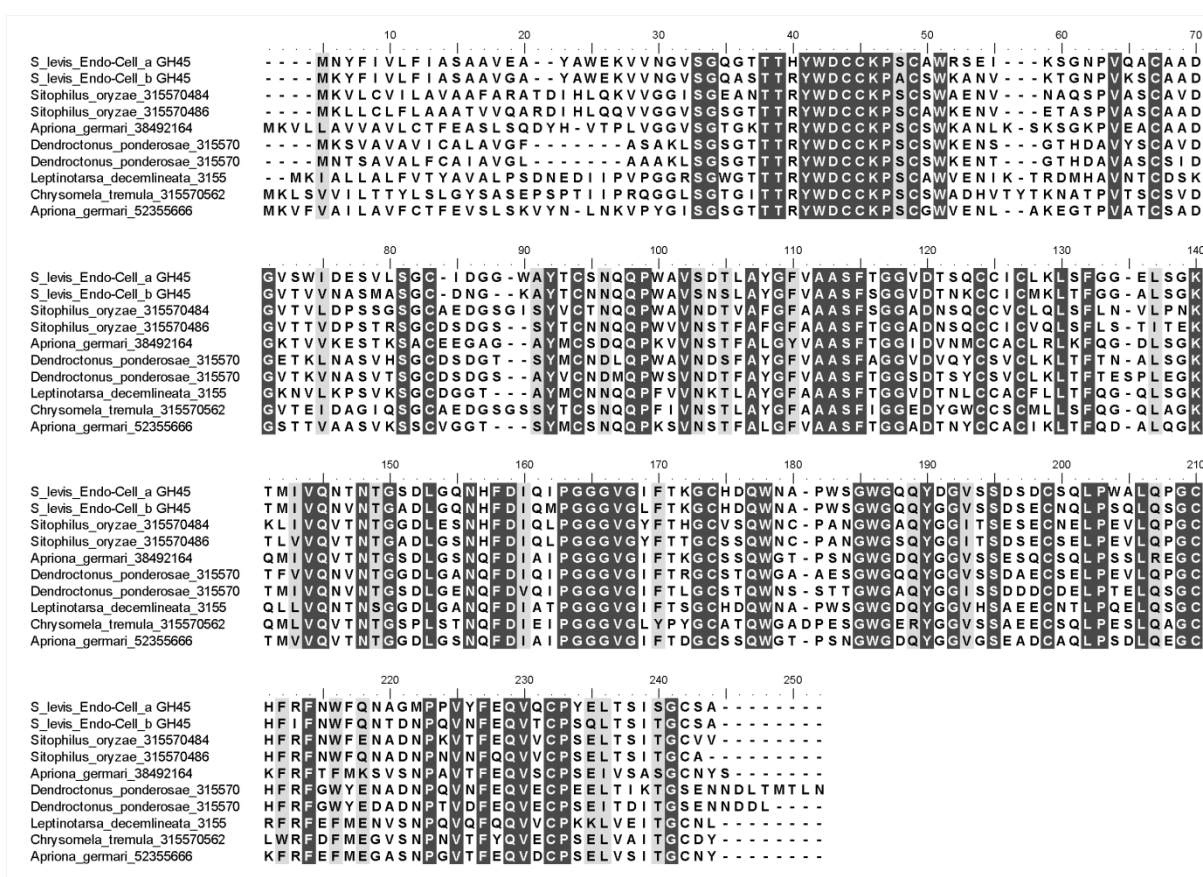


Figura 1.13: Alinhamento das duas seqüências de  $\beta$ -1,4-endoglucanases identificadas no transcriptoma de *S. levis* com outras celulases (GH45) provenientes de coleópteros.

O gráfico apresentado na figura 1.5 indica a expressão da  $\beta$ -1,4-endoglucanase (celulase) exclusivamente no intestino médio das larvas de *S. levis*. O perfil de transcrição durante o ciclo de vida do inseto é similar ao da *SI-CathL* (Figura 1.6), o que reforça a atuação dessa *PCWDE* como uma enzima digestiva acessória.

### 1.3.7.2 Identificação de uma invertase no transcriptoma de *S. levis*

Seguindo a mesma tendência das *PCWDE*, até muito recentemente a existência de  $\beta$ -fructofuranosidases (invertases) não era conhecida no reino animal. Assim como as  $\alpha$ -glucosidases, as invertases atuam na hidrólise de sacarose. No entanto, as últimas atacam a ligação  $\beta$  da frutose, enquanto as  $\alpha$ -glucosidases promovem a hidrólise pela outra extremidade, nas ligações  $\alpha$  da glicose e são amplamente encontradas no trato digestivo de insetos (Terra e Ferreira, 2011). Apesar da aparente ausência nos genomas eucariotos, a atividade de invertases tem sido relatada em lepidópteros (Santos e Terra, 1986; Sumida et al., 1994; Carneiro et al., 2004).

Os primeiros relatos da ocorrência de transcritos de invertases em animais foram em uma biblioteca intestinal de larvas de *Helicoverpa armigera* (Pauchet et al., 2008), assim como em *Bombyx mori*, organismo no qual a enzima foi caracterizada e imulocalizada no intestino e glândulas de seda das larvas (Daimon et al., 2008). Posteriormente, uma nova invertase foi identificada no transcriptoma de larvas de *Manduca sexta* (Pauchet et al., 2010a), todos insetos da ordem Lepidoptera. A ausência desses genes em outros organismos superiores, assim como a similaridade com as invertases bacterianas indicam a provável ocorrência de um evento de transferência horizontal para um ancestral comum desses insetos (Pauchet et al., 2008; Daimon et al., 2008).

Em coleópteros, a atividade de invertases é erroneamente relatada em trabalhos da década de 80, nos quais o termo invertase refere-se a quaisquer enzimas com atividade hidrolítica sobre a sacarose, sem menção alguma à atividade  $\beta$ -fructosidásica específica. Para o nosso conhecimento, nenhum transcrito que codifica uma invertase foi identificado em transcriptomas de coleópteros até o presente. Além disso, foram realizadas análises para verificar a ocorrência de um gene homólogo no genoma de *T. castaneum*, mas nenhum provável transcrito ou motivo conservado foram identificados. Dessa maneira, é relatada pela primeira vez neste estudo a identificação de um EST que codifica uma invertase proveniente de um coleóptero, o *Sphenophorus levis*.

O *contig* 198 é formado por três sequências, que codificam a provável  $\beta$ -fructofuranosidase, ou invertase, proveniente de *Sphenophorus levis*. Os transcritos de cDNA apresentam UTRs 3' e 5', sinal de poliadenilação (AATAAA) e cauda poli-a,



o que indica que é de procedência eucariótica (Figura 1.14). A ORF de 1434 pb, codifica uma proteína de 478 aminoácidos, que apresenta maior similaridade com as invertases bacterianas. No entanto, as análises de códon *usage* (Anexo 1) evidenciam que os códons da invertase de *S. levis* são muito mais similares àqueles preferencialmente identificados para as peptidases digestivas do inseto do que os códons observados para outras invertases bacterianas.

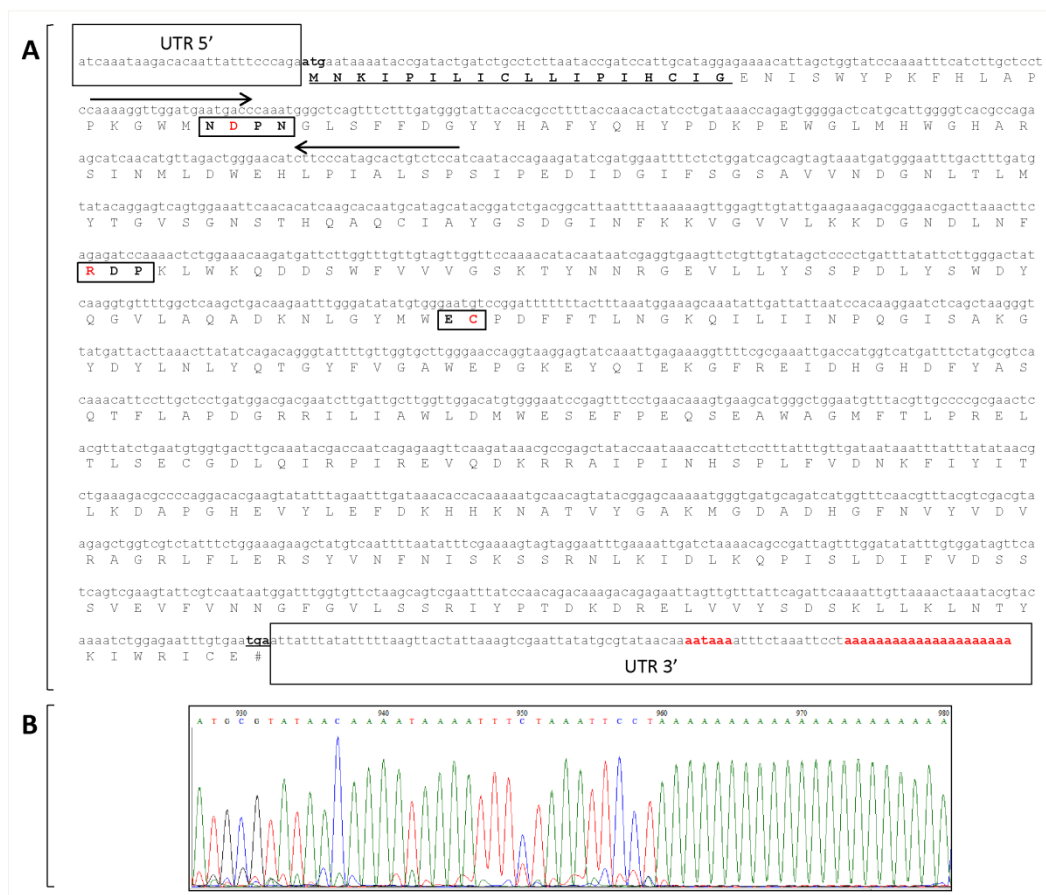


Figura 1.14: Caracterização da sequência de cDNA de um clone que codifica a invertase identificada no transcriptoma de *S. levis*. A: Sequência completa do cDNA da invertase e da enzima codificada. Verifica-se a ocorrência de regiões não transcritas (UTRs) 5' e 3', além do sinal de poli adenilação (aataaa) e da cauda poli-a, indicada em vermelho. B: Eletroferograma da região UTR 3' do cDNA que evidencia a ocorrência da cauda poli-A característica de RNAs mensageiros eucarióticos.

Apesar da baixa frequência dos transcritos da invertase na biblioteca de *S. levis* (0,08%) em condições de dieta artificial, a enzima está sendo estudada em detalhes em nosso laboratório pelo estudante de iniciação científica Rafael Peduzzi. A comprovação da presença da invertase no genoma de *S. levis* deve esclarecer a importância da mesma para os processos digestivos do inseto, desde que a média do conteúdo de sacarose em plantas de cana-de-açúcar selecionadas chega até a 18,1% do total da biomassa vegetal (Papini-Terzi et al., 2009). O perfil de expressão

gênica da invertase de *S. levis*, analisado por qRT-PCR e indicado na figura 1.6, assemelha-se àquele obtido para outras enzimas digestivas. Além disso, na figura 1.5 é indicada a transcrição da invertase exclusivamente no intestino médio das larvas de *S. levis*.

Acredita-se que a ocorrência da invertase no genoma de *B. mori* pode ter relação com a capacidade de adaptação aos açúcares sintetizados pelas amoreiras, que mimetizam os açúcares, atuando como inibidores específicos de  $\alpha$ -glucosidases (Daimon et al., 2008). Nesse sentido, a ocorrência da invertase em *S. levis* também poderia ser vantajosa visto que flavonóides isolados do melão de cana-de-açúcar tem a capacidade de inibir a atividade de  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -amilase *in vitro* (Holt et al., 2003). O alinhamento da sequência completa da invertase identificada no transcriptoma de *S. levis*, com outras invertases provenientes de lepidópteros e bactérias é indicado na figura 1.15.

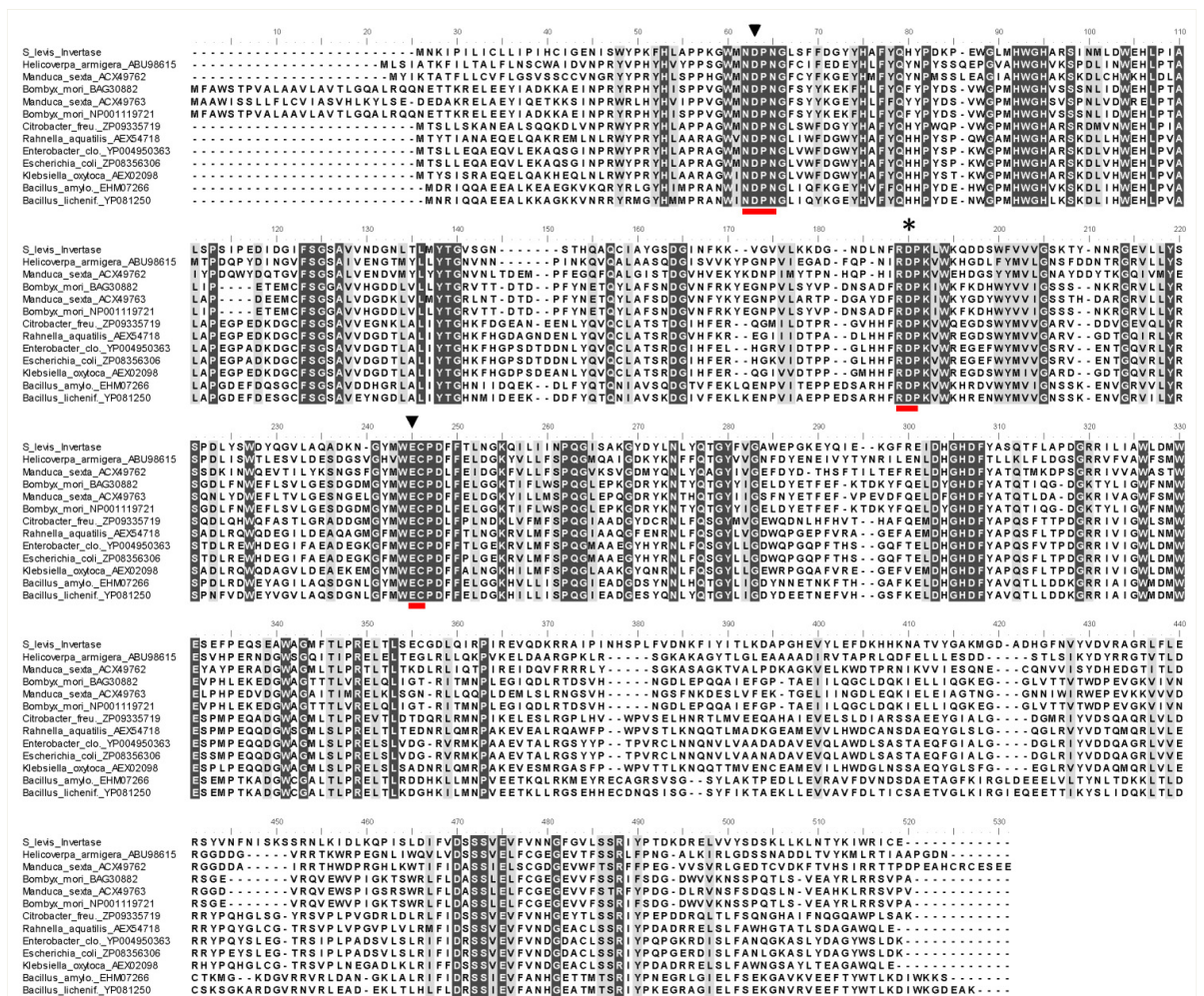


Figura 1.15: Alinhamento da sequência de proteína da invertase de *S. levis* com as invertases homólogas de lepidópteros e bactérias. Os prováveis resíduos de aminoácidos conservados do sítio

ativo são indicados por cabeças de seta. O asterisco indica outro resíduo de aminoácido conservado, também provavelmente envolvido na catálise, de acordo com o descrito para as invertases caracterizadas de micro-organismos.

Os resíduos de aminoácidos conservados provavelmente envolvidos na catálise, de acordo com o descrito para as enzimas de micro-organismos, são também destacados na figura 1.15. A análise filogenética apresentada na figura 1.16 indica a maior semelhança da invertase de *S. levis* com as enzimas de origem bacteriana, o que reforça a teoria de aquisição desse gene por transferência horizontal, como proposto para os lepidópteros (Daimon et al., 2008; Pauchet et al., 2008; Pauchet et al., 2010a).

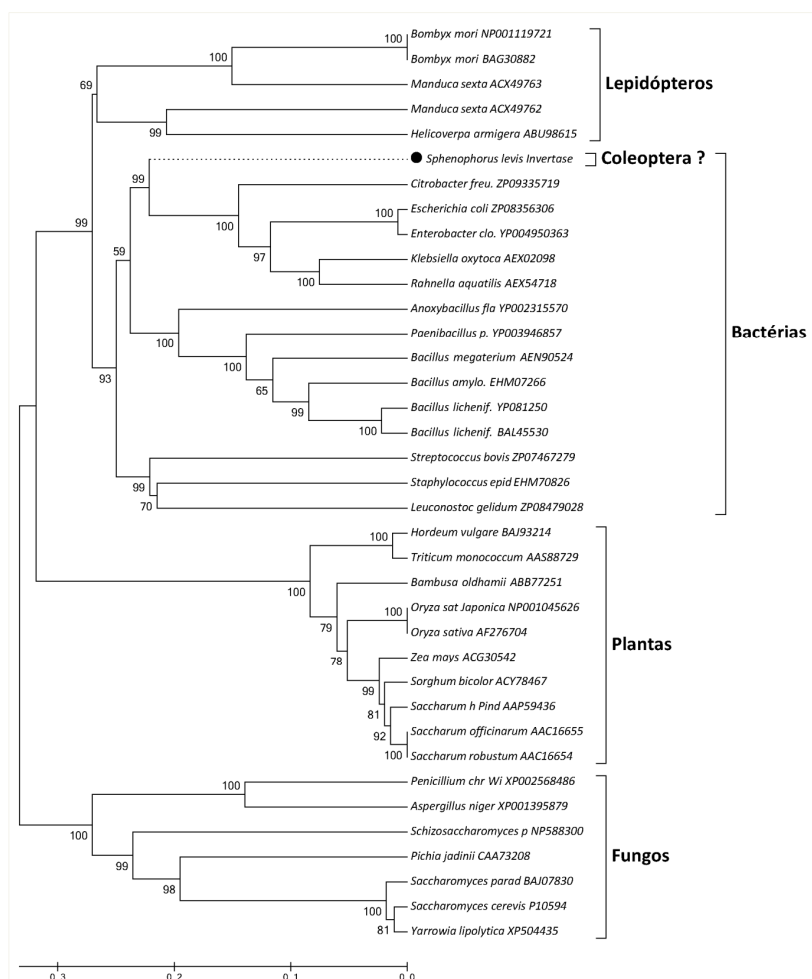


Figura 1.16: Análise filogenética da invertase identificada na biblioteca de *S. levis* com outras invertases provenientes de diversos organismos. A maior similaridade da sequência de *S. levis* com invertases bacterianas reforça a teoria de aquisição desse gene por transferência horizontal, como proposto para os lepidópteros (Daimon et al., 2008; Pauchet et al., 2008). A análise foi conduzida no programa Mega 5.05 utilizando o método de Neighbor Joining com 10.000 repetições. Os valores de *bootstrap* são apresentados nos ramos da figura.

### 1.3.8 Transcritos abundantes que codificam proteínas desconhecidas

Dois novos genes abundantes na biblioteca, Fat 1 (3,89%) e Fat 2 (2,76%) que codificam variantes de uma mesma proteína também foram analisados por qRT-PCR. As análises de similaridade contra os principais bancos de dados de proteínas, GenBank, pFAM e UniProt indicam a ausência de um domínio conservado ou similaridade dessas prováveis novas proteínas codificadas com outras já conhecidas. O alinhamento das sequências de aminoácidos dessas proteínas é indicado na figura 1.17 e a alta similaridade entre elas sugere que essas variantes de proteína podem desempenhar funções similares.

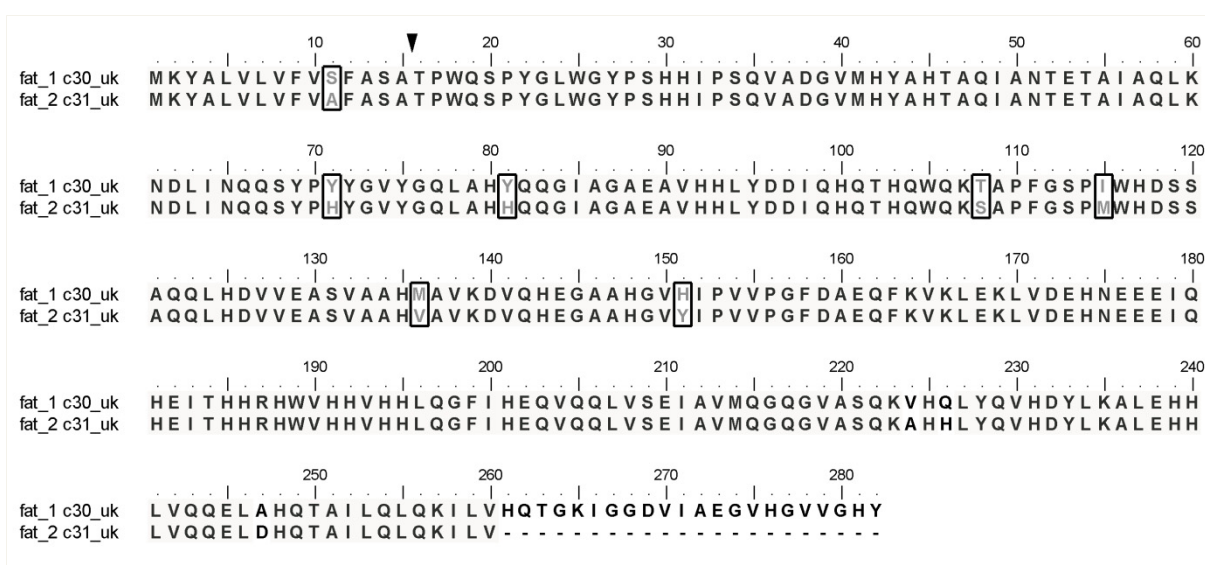


Figura 1.17: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos contigs 30 e 31, Fat 1 e Fat 2 respectivamente. A sequência completa da Fat 2 ainda não foi determinada. A seta indica o provável peptídeo sinal e os resíduos de aminoácidos diferentes são indicados por caixas.

Os padrões de transcrição para Fat 1 e 2 são muito similares e os índices de transcrição são superiores ao da *Sl-CathL* (Figura 1.18), o que reflete a abundância dos transcritos também observada no transcriptoma. Os perfis de transcrição ao longo do desenvolvimento para esses genes são similares, porém levemente atrasados em relação às enzimas digestivas, o que sugere a atuação como prováveis proteínas de reserva. A síntese desses transcritos ocorre essencialmente no corpo gorduroso (Figura 1.6) e é quase esgotada na fase de pupa, não atingindo novamente altos índices nos adultos.

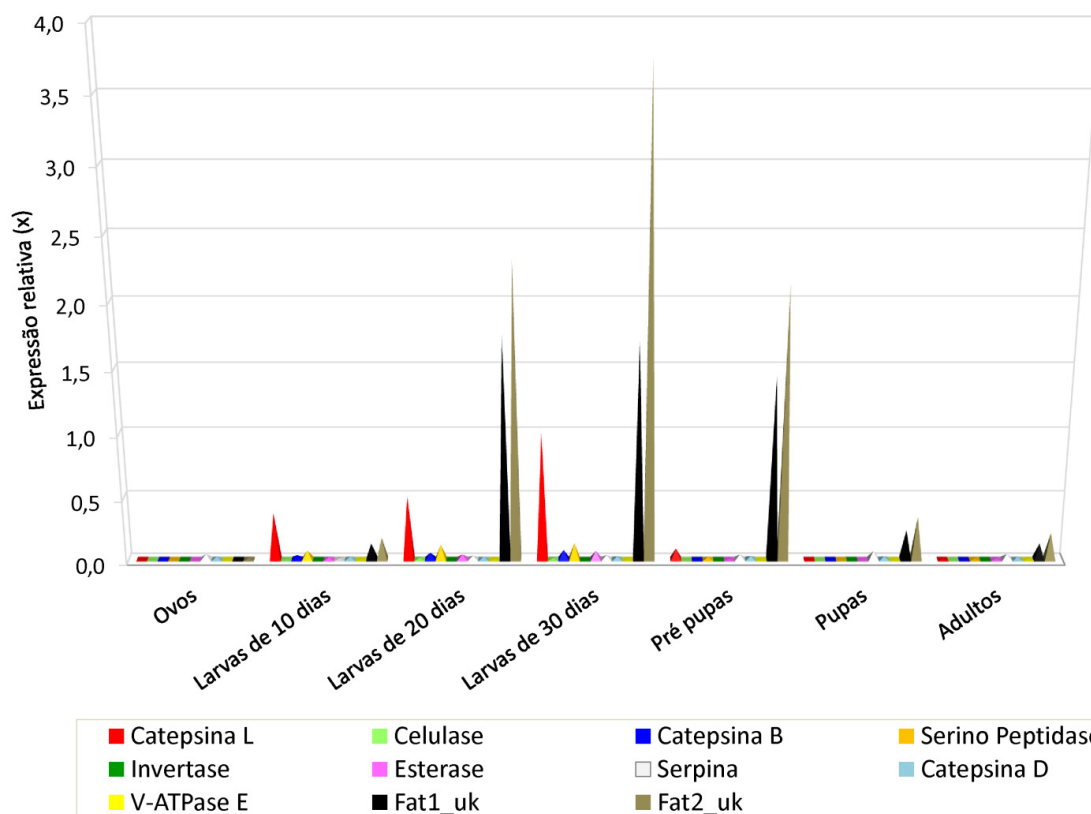


Figura 1.18: Análise do perfil de transcrição das proteínas Fat 1 e Fat 2. Os índices de transcrição representam as diferenças reais de abundância entre os genes e foram calibrados em função da expressão máxima da catepsina L nas larvas com 30 dias de vida (1 x).

## CAPÍTULO 2: EXPRESSÃO RECOMBINANTE, LOCALIZAÇÃO E INIBIÇÃO *IN VITRO* DA CISTEÍNO PEPTIDASE INTESTINAL DE *Sphenophorus levis* (*Sl-CathL*)

### Resumo

Considerando a predominância das catepsinas L como enzimas digestivas encontradas no transcriptoma (10,49% dos ESTs), e sua importância na digestão para a larva do inseto, foi escolhido um clone de cDNA que codifica uma catepsina L para a produção recombinante da enzima, caracterização cinética e ensaios de inibição tendo em vista a enzima como um alvo para o combate ao inseto. A ORF de 972 pb codifica uma pré-pró-enzima, nomeada *Sl-CathL*, homóloga a outras enzimas digestivas do tipo catepsina L identificadas no intestino médio de outros coleópteros. A expressão da proteína recombinante foi conduzida em *Escherichia coli* e também na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. A produção da proteína recombinante em células de *E. coli* não foi bem sucedida, no entanto, a *rSl-CathL* foi expressa em células de *P. pastoris* e purificada na forma de pró-enzima com massa molecular estimada de aproximadamente 42 kDa. A enzima recombinante foi auto ativada em pH (5,0) e a enzima madura com massa molecular de 39 kDa apresentou acentuada instabilidade térmica com atividade máxima em pH 6,0 a 37 °C. Anticorpos policlonais anti-*rSl-CathL* foram produzidos em camundongos e mostraram-se eficientes para a detecção da enzima nativa do inseto. A análise imunohistoquímica em seções do intestino das larvas de *S. levis* revelou que a *Sl-CathL* ocorre em vesículas de secreção em toda a extensão do intestino médio (V1-V4), confirmando que esta enzima desempenha um papel importante na digestão do intestino e que constitui um alvo potencial para a inibição *in vivo*, uma vez que a enzima pode ser inibida diretamente pela adição de inibidores na dieta do inseto. O perfil de expressão identificado por RT-PCR por todo o ciclo biológico do inseto indica que *Sl-CathL* é produzida principalmente na fase larval, com expressão máxima em larvas de 30 dias, quando a enzima é 1250 vezes mais transcrita em relação às pupas, onde o menor nível de expressão foi detectado. A análise de expressão tecido-específica apontou a produção da *Sl-CathL* essencialmente no intestino médio das larvas, confirmando o papel digestivo dessa enzima, assim como detectado nas análises imunohistoquímicas. A eficiência catalítica da enzima recombinante foi calculada utilizando diferentes substratos e a *rSl-CathL* mostrou preferência pela hidrólise do substrato Z-Leu-Arg-AMC ( $k_{cat} / K_m = 37,53 \text{ mM S}^{-1}$ ;  $K_m = 1,79 \text{ }\mu\text{M}$ ). Nos ensaios de inibição contra quatro cistatinas recombinantes de cana-de-açúcar, a *Sl-CathL* foi fortemente inibida pela cistatina CaneCPI-4 ( $K_i = 0,196 \text{ nM}$ ). Além disso, este inibidor já se mostrou muito eficiente para a inibição de catepsina B, que constitui a segunda classe de peptidases mais abundantes identificadas na biblioteca. Esses resultados sugerem que a *Sl-CathL* é um potencial alvo para o controle do besouro *S. levis* e, também que, a construção de uma linhagem de cana-de-açúcar transgênica super produzindo este inibidor endógeno, a CaneCPI-4, poderia reduzir eficientemente os danos causados por este inseto.

**Palavras chave:** Catepsina L, cisteíno peptidase, canacistatinas, inibição, CaneCPI-4, digestão, intestino médio, imunolocalização.

## 2.1 Introdução

A falta de um método eficiente e adequado para o controle do besouro *Sphenophorus levis*, somada à importância desse inseto para a agricultura brasileira, nos motivou ao desenvolvimento de estratégias alternativas para o seu controle.

Devido ao hábito de vida subterrâneo o controle desta praga na agricultura é extremamente difícil, tornando a aplicação de inseticidas ineficiente. Além disso, seria interessante a utilização de estratégias mais adequadas de controle, visto que os inseticidas são substâncias nocivas a outros organismos e ao meio ambiente. Tendo em vista o problema e as dificuldades de controle encontradas nos 30 anos da ocorrência dessa praga, uma abordagem relacionada ao desenvolvimento de plantas modificadas geneticamente se torna interessante, considerando que essa estratégia tem oferecido várias possibilidades para o controle de insetos-praga (Gatehouse et al., 1993; Jouanin et al., 2000).

Considerando que a alimentação e o desenvolvimento das larvas de *S. levis* são diretamente dependentes da proteólise digestiva no intestino, a utilização de inibidores de enzimas relacionadas a esta proteólise surge como alternativa para aumentar a resistência das plantas a este inseto. Inibidores de peptidases constituem um grupo de genes que têm sido utilizados com sucesso para aumentar a resistência de culturas a insetos, gerando efeitos tóxicos quando ingeridos por diferentes espécies (Rahbé et al., 2003). Recentemente, a produção de inibidores de peptidases em plantas transgênicas tem se mostrado uma eficiente abordagem para o desenvolvimento de culturas resistentes a insetos praga (Lawrence e Koundal, 2002; Haq et al., 2004).

As fitocistatinas compreendem inibidores de cisteíno peptidases produzidos por plantas (Margis et al., 1998) que atuam como inibidores reversíveis (Abrahamson, 1993). A ingestão desses inibidores impede a ação das enzimas digestivas, e a decorrente deficiência de aminoácidos na dieta interfere na síntese de proteínas e desenvolvimento dos insetos (Lawrence e Koundal, 2002). Por essa razão, as fitocistatinas têm sido utilizadas com sucesso contra peptidases digestivas

presentes no trato digestivo de insetos (Koiwa et al., 2000; Outchkourov et al., 2004; Alvarez-Alfageme et al., 2007; Martinez e Diaz, 2008). Em 1995, Leplé e colaboradores conduziram o primeiro experimento *in vivo* evidenciando a expressão de cistatinas em plantas transgênicas que se mostraram eficientes na inibição das peptidases de *Chrysomela tremula*, conferindo resistência dos álamos ao coleóptero. Até então, apenas inibidores de serino peptidases haviam sido empregados como inseticidas, em transgenes de tabaco e tomate, aumentando a resistência dessas culturas a insetos da ordem Lepidoptera (Johnson et al., 1989; Augustin et al., 1993; McManus et al., 1994).

Insetos da ordem Coleoptera e Lepidoptera estão incluídos dentre as principais pragas agrícolas em todo o mundo. Entretanto, eles diferem substancialmente no pH do trato digestivo e, conseqüentemente, na classe das principais enzimas que promovem a proteólise digestiva. Serino peptidases constituem a principal classe de enzimas digestivas das ordens Lepidoptera e Diptera, enquanto as cisteíno peptidases e aspartil peptidases são mais abundantes na ordem Coleoptera (Terra e Ferreira, 1994). Nesse sentido, o conhecimento específico do perfil digestivo dos insetos é fundamental para o desenvolvimento de transgenes empregando inibidores de peptidases, que sejam específicos e eficientes contra a classe de enzimas produzidas pelo inseto.

No primeiro capítulo foi identificada a abundância das principais classes de peptidases, majoritariamente cisteíno peptidases (catepsina L e B) e também de serino peptidases. A atividade de cisteíno peptidases já havia sido detectada no intestino das larvas de *S. levis* por Lopes (2002). Posteriormente, nosso grupo foi capaz de purificar enzimas digestivas do conteúdo intestinal das larvas do inseto e caracterizar o perfil digestivo sustentado principalmente pela ação de cisteíno peptidases (Soares-Costa et al., 2011).

Considerando a predominância das cisteíno peptidases do tipo catepsinas L como enzimas digestivas encontradas no transcriptoma (10,49% dos ESTs), e sua importância na digestão para a larva do inseto, foi escolhido um clone de cDNA que codifica uma catepsina L, denominado *Sl-CathL*, para a produção recombinante da enzima. Neste capítulo é apresentada a caracterização cinética da enzima recombinante denominada *rSl-CathL* e comprovada a atuação digestiva da enzima nativa por meio de Real-Time PCR tecido específico além de análises



imunohistoquímicas que evidenciam a produção e secreção dessa enzima no lúmen do intestino médio das larvas de *S. levis*.

Também foram realizados ensaios de inibição da *rSl-CathL* utilizando quatro cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar, as canacistatinas: CaneCPI-1 (Soares-Costa et al., 2002), CaneCPI-2, CaneCPI-3 (Gianotti et al., 2006) e CaneCPI-4 (Gianotti et al., 2008) as quais têm sido estudadas em detalhes em nosso laboratório. Tendo em vista a enzima *Sl-CathL* como um alvo para o combate ao inseto, a eficiência desses inibidores contra a principal enzima digestiva das larvas de *S. levis* é discutida e avaliada visando o desenvolvimento de novas linhagens de cana-de-açúcar super produzindo esses inibidores. Nas seções seguintes, 2.1.1 e 2.1.2 é feita uma breve revisão sobre cisteíno peptidases, sua ocorrência em insetos e de seus inibidores naturais produzidos por plantas, as fitocistatinas.

### 2.1.1 Cisteíno peptidases

As peptidases são enzimas que promovem a clivagem de proteínas ou peptídeos e podem estar envolvidas em processos digestivos, ativação de pró-enzimas e em diversos outros processos fisiológicos, atuando tanto no meio intracelular quanto extracelular (Rawlings e Barrett, 1993; Oliveira et al., 2003).

Podem ser divididas em dois grupos: exopeptidases e endopeptidases, dependendo do seu sítio de ação. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas aos grupamentos amino (N) ou carboxi (C) terminal do substrato, enquanto as endopeptidases atacam as ligações peptídicas distantes dos grupos terminais. As peptidases podem ainda ser subdivididas em cinco grandes classes: serino peptidases, cisteíno peptidases, aspartil peptidases, metalo peptidases e treonino peptidases; de acordo com o resíduo de aminoácido presente no seu sítio ativo, mecanismo de ação, similaridades de sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais das proteínas, categoria de inibidores e pH ótimo de atividade (Barrett et al., 2004).

As cisteíno peptidases são agrupadas em cinco clãs de acordo com a sua origem evolutiva. O clã CA é o maior e mais estudado das cisteíno peptidases e compreende as catepsinas, junto a um grande número de outras cisteíno peptidases pertencentes à família C1 (*papain-like*), que inclui endopeptidases de vírus,

protozoários, plantas e animais e exopeptidases de bactérias, fungos e animais (Rawlings e Barrett, 1999; Barrett e Rawlings, 2001). As cisteíno peptidases de invertebrados, como ácaros e nemátodos, podem atuar em processos digestivos (Pernas et al., 2000). Essas enzimas desempenham a função digestiva em muitos insetos (Terra e Ferreira, 1994), mas também são encontradas em diversos tecidos, o que indica a atuação dessas peptidases também em outros processos (Rawlings e Barrett, 1994).

Diversas catepsinas lisossomais de mamíferos pertencem à classe das cisteíno peptidases, que também inclui peptidases vegetais como a papaína, calpaínas e ainda peptidases de parasitas. A papaína, isolada do látex de *Carica papaya*, é uma das cisteíno peptidases melhor caracterizadas e, por isso, a numeração de resíduos de aminoácidos de outras cisteíno peptidases segue a papaína como modelo. As primeiras sequências de cisteíno peptidases foram descritas para as catepsinas B e H de ratos (Takio et al., 1983). Em mamíferos as catepsinas estão envolvidas fundamentalmente na proteólise lisossomal e incluem aspartil peptidases (catepsina D e E) e cisteíno peptidases (catepsinas B, H, K, L, O e S) (Barrett et al., 2004).

#### **2.1.1.1 Mecanismo de ação das cisteíno peptidases**

As cisteíno peptidases geralmente necessitam da remoção do fragmento N-terminal, a pró-região, para que sejam ativadas. Essa região desempenha importantes funções como a inibição de atividade enzimática e enovelamento de proteínas recém sintetizadas protegendo-as da desnaturação sob mudanças bruscas de pH (Tao et al., 1994; Oliveira et al., 2003). A pró-região das catepsinas L contém um motivo conservado "ERFNIN", envolvido na inibição da atividade da dessas enzimas (Karrer et al., 1993). A figura 2.1A indica a pró-região inibitória da catepsina L humana (Turk e Guncar, 2003) mostrada em vermelho, a qual impede o acesso do substrato ao sítio ativo. Para várias catepsinas L, incluindo aquelas de insetos, esse longo pró-domínio se estende por aproximadamente 110 aminoácidos.

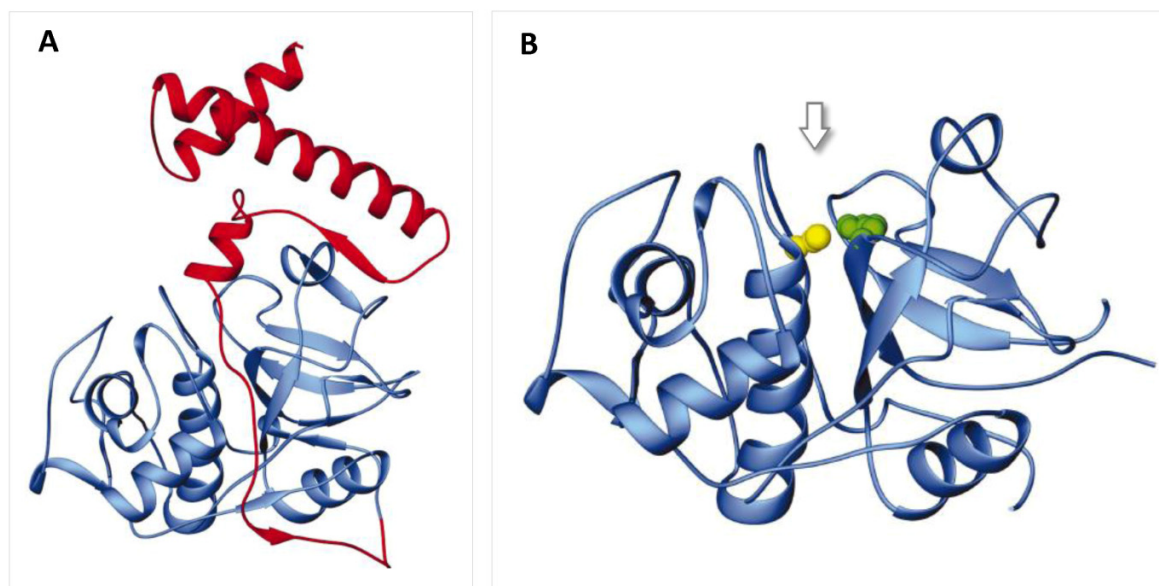


Figura 2.1: Estrutura tridimensional da catepsina L humana (Turk e Guncar, 2003). (A) Pró-catepsina L humana com a extensa região N-terminal indicada em vermelho, correspondente ao pró-domínio inibitório que impede o acesso do substrato ao sítio ativo (Coulombe et al., 1996; PDB: 1CJL; In: Turk e Guncar, 2003). (B) Catepsina L humana madura, após liberação do pró-domínio inibitório. A seta indica a cavidade formada entre os dois lóbulos da enzima, onde o substrato é acomodado. Na cavidade correspondente ao sítio ativo da catepsina são indicados os resíduos de Cys25 e His159, destacados em amarelo e verde, respectivamente (Guncar et al., 1999; PDB: 1ICF; In: Turk e Guncar, 2003).

Como sugerido pelo nome, o resíduo de cisteína é essencial para a atividade catalítica das cisteíno peptidases. Essas enzimas possuem uma estrutura tridimensional comum, composta por dois lóbulos correspondentes ao domínio L e domínio R (do inglês, Left e Right) que formam uma cavidade catalítica no formato de uma fenda. O sítio ativo destas enzimas consiste em um par iônico tiol-imidazol reativo, formado por um resíduo de cisteína (Cys<sup>25</sup>) no domínio L e por um resíduo de histidina (His<sup>159</sup>) no domínio oposto (R), acomodados na borda da cavidade catalítica e representados na figura 2.1B. O domínio L é formado caracteristicamente por três hélices- $\alpha$ , enquanto o domínio oposto apresenta uma hélice- $\alpha$  além de uma estrutura em barril- $\beta$  (McGrath 1999).

O sítio ativo dessas enzimas é composto por um resíduo de cisteína, uma asparagina e uma histidina, que juntos formam a tríade catalítica. Um resíduo de glutamina conservado também é importante para a atividade da enzima, uma vez que esse aminoácido pode estar envolvido na manutenção da estrutura tetraédrica intermediária durante a hidrólise do substrato (Rawlings e Barret, 2000).

O mecanismo de ação das cisteíno peptidases é iniciado pelo ataque nucleofílico do ânion sulfeto do sítio ativo da enzima à ligação peptídica do substrato (McGrath, 1999; Kunakbaeva et al., 2003). O grupo tiol da cisteína que compõe a tríade catalítica promove um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do substrato, resultando em um intermediário tetraédrico covalente, a acil-enzima. O grupo imidazol da cadeia lateral da histidina atua como aceptor de hidrogênio na catálise e o resíduo de asparagina participa orientando o anel imidazólico da histidina (Beyon e Bond, 1989; Barrett et al., 2004). Finalmente, após a clivagem da ligação peptídica, é formada uma ligação covalente acil-enzima que é hidrolisada, resultando na liberação da enzima livre (Rao et al, 1998; Baird et al., 2006).

A interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima é mostrada na figura 2.2, segundo o modelo descrito por Schechter e Berger (1967). A cadeia lateral do aminoácido P2 se encaixa no sítio de ligação do substrato, denominado S2, formando uma cavidade que determina a especificidade da clivagem. Essa especificidade é determinada pela interação e complementaridade entre os resíduos que formam o sítio S2 e a cadeia lateral em P2. Os resíduos do fundo da cavidade têm maior importância para determinar a especificidade da enzima pelo substrato. A formação dessa estrutura favorece a interação com grandes cadeias laterais hidrofóbicas na maioria das catepsinas e desfavorece as cadeias laterais carregadas. A especificidade de substrato para catepsinas B, K, L e S são normalmente determinadas pelo resíduo de aminoácido na posição P2, adjacente na posição N-terminal ao resíduo de aminoácido que sofreu hidrólise da ligação peptídica, chamado de P1 (Barrett et al., 2004).

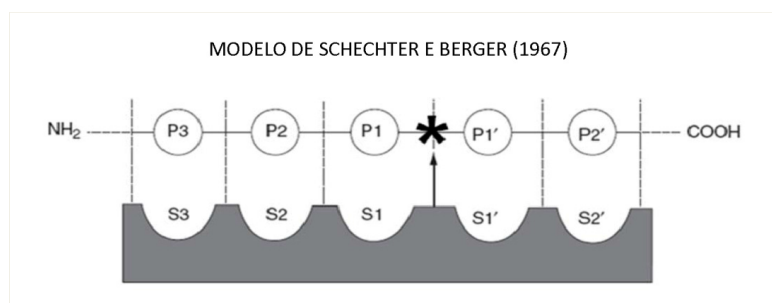


Figura 2.2: Modelo de Schechter e Berger (1967): Explica a interação peptidase-substrato. Considerando a acomodação do substrato no sítio ativo da enzima, no sentido N-C terminal, o sítio P1 corresponde ao primeiro resíduo de aminoácido que antecede o ponto de clivagem do substrato, enquanto P1' é a denominação para o primeiro aminoácido localizado após o ponto de clivagem. Para os sítios da enzima, é seguida a mesma denominação: S1 corresponde ao resíduo de aminoácido da enzima que acomoda o resíduo denominado P1 do substrato. Adaptado de Coligan, et al. (2004).

As enzimas da família da papaína são especificamente inibidas pelo peptídeo epóxido E-64 e, portanto, esse inibidor pode ser utilizado para a caracterização dessa classe de enzimas (Barrett et al., 1982). Para este inibidor, o mecanismo de inibição é irreversível e se dá pela ocupação dos subsítios da enzima e alquilação da cisteína da tríade catalítica pelo grupo trans epóxido (Salvesen e Nagase, 2001).

#### **2.1.1.2 Cisteíno peptidases de coleópteros**

No intestino de insetos, a ação de peptidases é necessária para a quebra das ligações peptídicas das proteínas ingeridas, resultando na liberação dos aminoácidos essenciais para o desenvolvimento. O processo de digestão pode ser complexo, envolvendo a atuação principal no intestino médio de diversas endopeptidases, seguida da ação de exopeptidases, que quebram as proteínas em peptídeos menores e aminoácidos livres que são absorvidos ainda no intestino médio (Terra e Ferreira, 1994). As diferenças nas cadeias peptídicas das proteínas ingeridas, somadas à diversidade de inibidores de peptidases produzidos por plantas (Martinez e Dias, 2008) explicam a grande diversidade de peptidases digestivas produzidas por um único inseto.

A ocorrência de cisteíno peptidases digestivas em larvas do coleóptero *Callosobruchus maculatus* (Bruchidae) foi relatada em 1985 por Gatehouse e colaboradores. Posteriormente, a atividade digestiva de cisteíno peptidases também foi identificada para outros diversos besouros fitófagos com importância econômica (Murdock et al., 1987). Atualmente, é conhecido que insetos pertencentes à infraordem Cucujiformia, que inclui os besouros das famílias Curculionidae, Tenebrionidae, Chrysomelidae e Bruchidae, produzem cisteíno peptidases digestivas (Terra e Ferreira, 2011). Essas enzimas podem ser produzidas junto a serino peptidases ou mesmo sozinhas, o que sugere que a produção de cisteíno peptidases pode ser uma adaptação evolutiva que ocorreu em um ancestral cucujiforme para contornar a ingestão de inibidores de serino peptidases abundantes em sementes (Terra e Ferreira, 1994).

A grande maioria dos estudos que caracterizam a atividade proteolítica no intestino de insetos utiliza homogenatos ou mesmo enzimas purificadas a partir do

intestino. Um grande problema para a comprovação dessa atividade digestiva é que o rompimento das células intestinais pode ocasionar a liberação de catepsinas lisossomais (Terra e Ferreira, 2011). Nesse sentido, estudos que provam a produção e secreção dessas enzimas, tipo catepsina L, no intestino de coleópteros são raros, porém de extrema importância. Um dos poucos estudos foi conduzido por Cristofolletti e colaboradores (2005), provando a produção e secreção de uma catepsina L (CAL2) a partir do epitélio intestinal de larvas de *Tenebrio molitor*. Nesse trabalho, realizado a partir de uma biblioteca de cDNA intestinal, outras catepsinas L (CAL1: a,b,c) foram detectadas como versões lisossomais dessa enzima.

Lopes (2002) detectou atividade de cisteíno peptidases em larvas de *S. levis*, comprovando a tendência da família Curculionidae em apresentar esse tipo de peptidase como proposto por Murdock e colaboradores (1987) e Terra e Ferreira (1994), uma vez que está inserida na infraordem Cucujiformia. As cisteíno peptidases digestivas encontradas em coleópteros têm atividade bioquimicamente similares às catepsinas lisossomais L e B de mamíferos e atuam geralmente em pH próximo de 5,0 (Terra e Ferreira, 1994). A atuação das cisteíno peptidases em coleópteros ocorre fundamentalmente nos primeiros dois terços do intestino médio, visto que o pH intestinal varia de ligeiramente ácido a muito alcalino (Murdock et al., 1987; Terra e Cristofolletti, 1996).

Estudos com diversas espécies de coleópteros têm revelado uma heterogeneidade nas abundâncias e também no padrão das classes de enzimas digestivas secretadas por insetos da família Curculionidae. Em vários casos, as cisteíno peptidases são responsáveis pela maior atividade proteolítica, e atuam junto a serino peptidases, que atuam em pHs mais elevados em torno de 9 a 10. Esse padrão foi observado para as larvas de *Psylliodes chrysocephala* (Girard et al., 1998b), *Ceutorhynchus assimilis* (Girard et al., 1998a) e *Baris coerulescens* (Bonadé-Bottino et al., 1999). A atividade de cisteíno peptidases também pode ocorrer junto com aspartil peptidases, tipo catepsina D, como identificado para diversas famílias de coleópteros (Terra e Ferreira, 2011).

A provável adaptação aos inibidores de serino peptidases por meio da produção de cisteíno peptidases em um ancestral cucujiforme (Terra e Ferreira, 1994), somada a vários indícios de transferência horizontal para enzimas de degradação de parede celular em coleópteros fitófagos (Pauchet et al., 2010b)

indicam uma rápida evolução do sistema digestivo dos insetos dessa ordem, que é refletida nas diferenças das classes de enzimas digestivas encontradas nesses insetos, e podem explicar a diversidade de espécies devido ao sucesso de adaptação a novos nichos.

### **2.1.2 Fitocistatinas: proteínas inibidoras de peptidases**

Os inibidores de peptidases são proteínas que podem atuar na regulação de diversos processos metabólicos dependentes da ação de peptidases. Nas células, têm como função principal proteger células e tecidos contra a atividade proteolítica de peptidases lisossomais que podem ser liberadas durante a morte celular (Barrett e Kirschke, 1981) e podem também atuar regulando processos que são modulados pela atividade de peptidases endógenas em diversos organismos. Os inibidores específicos de cisteíno peptidases são conhecidos como cistatinas, sendo aqueles de origem vegetal denominados fitocistatinas (Turk e Bode, 1991).

As fitocistatinas são proteínas capazes de regular diversos processos metabólicos mediados pela ação das peptidases endógenas nas plantas, como por exemplo, regulando as atividades das peptidases endógenas durante a maturação de suas sementes (Arai et al., 2002). Esses inibidores também podem atuar como proteínas de defesa contra o ataque de insetos ou micro-organismos (Ryan, 1990; Lawrence e Koundal, 2002), dificultando a digestão de proteínas por meio da diminuição da disponibilidade das enzimas digestivas de patógenos ou predadores, impedindo a síntese de proteínas essenciais para o desenvolvimento e reprodução desses organismos (Broadway e Duffey, 1986; Lawrence e Koundal, 2002).

As fitocistatinas constituem uma classe de proteínas amplamente estudada devido à sua capacidade de inibir especificamente peptidases exógenas, como aquelas encontradas nos intestinos dos insetos (Martinez e Diaz, 2008). A primeira fitocistatina caracterizada foi a orizacistatina, proveniente das sementes de arroz (Abe et al., 1987), a qual tem mostrado eficiente atividade inibitória de peptidases de diferentes coleópteros praga como *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* (Liang et al., 1991), e *Leptinotarsa decemlineata* (Benckekroun et al., 1995) entre outros besouros (Chen et al., 1992).

As cistatinas podem ser agrupadas em uma superfamília que compreende três famílias de cistatinas animais além da família das fitocistatinas. A família das estefinas compreende as cistatinas que não formam ligações dissulfeto, têm massa molecular reduzida, em torno de 11 kDa, e geralmente atuam no citosol. A segunda família, chamada de família da cistatina, é formada por proteínas que formam duas ligações dissulfeto e têm massa molecular entre 13 e 24 kDa. A família dos cininogênios compreende proteínas com elevada massa molecular (60 a 120 kDa) as quais são glicosiladas, formam ligações dissulfeto, e estão envolvidas no processo de coagulação do sangue (Barret et al., 1986; Turk e Bode, 1991). A família fitocistatinas, descrita posteriormente, é formada por proteínas produzidas em plantas, com massa molecular entre 5 e 87 kDa, possuem características comuns às famílias das estefinas e cistatinas e não formam ligações dissulfeto (Reis e Margis, 2001).

Os inibidores pertencentes à família das fitocistatinas possuem uma sequência consenso característica "L-A-R-[FY]-A-[VI]-X(3)-N" que forma uma  $\alpha$ -hélice na região N-terminal da proteína (Margis et al, 1998). A estrutura tridimensional comum às fitocistatinas compreende 5 folhas- $\beta$  antiparalelas encurvadas sobre uma hélice- $\alpha$ , primeiramente descrita para a orizacistatina por Nagata e colaboradores (2000). As dobras das folhas- $\beta$  formam as regiões de contato da cistatina com o sítio ativo da peptidase (Figura 2.3).



Figura 2.3: Estrutura tridimensional da orizacistatina, isolada do arroz (*Oryza sativa*). Essa foi a primeira fitocistatina com a estrutura resolvida por Nagata e colaboradores (2000), formada por cinco folhas- $\beta$  antiparalelas, sendo quatro principais levemente dobradas sobre uma hélice- $\alpha$ , além de uma curta folha- $\beta$  na porção N-terminal (PDB: 1EQK). Na parte inferior, em cinza, os três domínios conservados entre as fitocistatinas que formam um núcleo hidrofóbico em forma de cunha, o qual interage com o sítio ativo da peptidase.



As fitocistatinas são capazes de formar um complexo com as cisteíno peptidases, ocupando o sítio ativo dessas enzimas, por isso, atuam como inibidores reversíveis com o mecanismo de ação baseado na inibição competitiva por meio do bloqueio da atividade proteolítica (Abrahamson, 1993).

O mecanismo de inibição é explicado pela interação de uma região hidrofóbica da molécula de cistatina, formada por três domínios em regiões distintas da molécula (Figura 2.3), que é inserida no sítio ativo da peptidase, bloqueando o acesso do substrato (Bode et al., 1988). Esses domínios podem ser identificados pela presença de uma glicina na região N-terminal, um motivo Gln-Val-Val-Ala-Gly no primeiro loop e uma sequência Leu-Pro ou Pro-Trp no segundo loop de ligação das famílias das cistatinas e estefinas. Esses pontos de interação da cistatina com a cisteíno peptidase são ilustrados nas figuras 2.3 e 2.4.

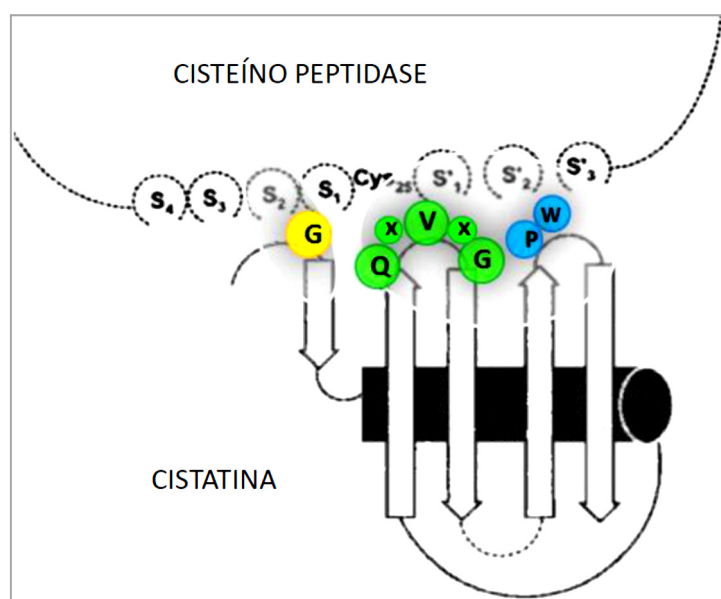


Figura 2.4: Representação da interação de uma cistatina e uma cisteíno peptidase. O sítio ativo da enzima é mostrado na parte superior da figura. A cadeia polipeptídica da cistatina é ilustrada abaixo, com os resíduos de aminoácidos indicados por letras. As três regiões da cistatina envolvidas na ligação da enzima estão evidenciadas em cores. Os resíduos da região N-terminal (amarelo) interagem com a peptidase, sendo que a Gly11 se encaixa em S2, impedindo a ligação do próximo aminoácido da molécula de cistatina com o sítio S1 da peptidase, prevenindo a clivagem da molécula inibidora. Os outros dois loops da molécula de cistatina, um em verde na região central e outro segmento próximo à região C-terminal (azul) constituem as outras regiões de contato com a protease em S1' e S2' respectivamente. Modificado de Alvarez-Fernandez e Abrahamson (2006).

As primeiras cistatinas de cana-de-açúcar foram descritas por Reis e Margis (2001), que identificaram no banco de dados de ESTs da cana-de-açúcar, o SUCEST (Sugarcane Expressed Tags Project) vinte e cinco prováveis fitocistatinas,

denominadas canacistatinas, por meio de análises de similaridade com outros membros da superfamília cistatina. A primeira cistatina de cana-de-açúcar produzida em sistema de expressão heteróloga foi a CaneCPI-1 (Soares-Costa et al., 2002), composta por 126 aminoácidos e com massa molecular aproximada de 13 kDa. Essa proteína apresentou atividade inibitória contra cisteíno peptidases, inclusive catepsinas humanas (Soares-costa et al., 2002).

Outras três cistatinas foram isoladas da cana-de-açúcar, produzidas em *E. coli* e purificadas, sendo denominadas de CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4. Em ensaios de atividade realizados com estes inibidores mostraram atividade inibitória sobre a cisteíno peptidase, papaína, (Gianotti et al., 2006) e a CaneCPI-4 (Gianotti et al., 2008) e uma potente atividade inibitória contra as cisteíno peptidases humanas catepsinas B e L (Gianotti et al., 2008). Com base nesses resultados, e sabendo da eficácia da orizacistatina contra peptidases de coleópteros, esses inibidores foram testados *in vitro* contra a *rSl-CathL*, buscando a identificação do melhor inibidor cistatínico endógeno da cana-de-açúcar contra a principal enzima digestiva de *Sphenophorus levis*, produzida de forma recombinante.

### **2.1.3 O sistema de expressão de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris***

*Pichia pastoris* é uma levedura capaz de metabolizar metanol como fonte única de carbono (metilotrófica) amplamente empregada na produção heteróloga de proteínas (Bromme et al., 2004). Além de ser facilmente manipulada, oferece as vantagens de sistemas eucarióticos de expressão, tais como: processamento de proteína, enovelamento correto e modificações pós transcricionais. Considerando as dificuldades encontradas na expressão da cisteíno peptidase em bactéria, optou-se pela expressão em levedura *P. pastoris*.

A enzima álcool oxidase, codificada pelo gene AOX1, é responsável pelo primeiro passo do metabolismo do metanol, oxidando-o em formaldeído. Sua transcrição é fortemente regulada e induzida pela adição de metanol diretamente no meio de cultura, levando à considerável expressão que pode passar de 30% do total de proteínas solúveis na célula. Geralmente os sistemas de expressão utilizam o promotor AOX1, o qual é fortemente induzido pelo metanol e resulta na rápida

produção da proteína recombinante. Contudo, para esse trabalho utilizamos linhagem KM71H (*his4 arg4 aox1Δ::ARG4*) que possui o gene AOX1 deletado e substituído pelo gene ARG4 de *Saccharomyces cerevisiae*. O resultado é uma cepa fracamente induzida pelo metanol por meio do promotor AOX2, que produz a proteína recombinante em uma taxa mais lenta (fenótipo Mut-S), o que pode propiciar o correto envelhecimento e inibir a morte celular se a proteína apresentar toxicidade para a célula (EasySelect *Pichia* Expression kit, Invitrogen).

Esse sistema também é vantajoso pelo fato da levedura secretar proteínas endógenas em baixíssimos níveis o que facilita a purificação, pois a proteína recombinante apresenta-se predominante e quase pura no meio de cultura. Além disso, *P. pastoris* não secreta endopeptidases endógenas que possam ativar a enzima recombinante, evitando sua autocatálise ou degradação. Todos os passos de produção da proteína recombinante em *P. pastoris* foram realizados seguindo as instruções do fabricante do kit.

Outro diferencial do sistema de expressão em *P. Pastoris* é a possibilidade de secretar a proteína recombinante, ou seja, direcionar sua produção diretamente para o meio de cultura. Isso é possível graças à utilização da sequência do peptídeo sinal também importado de *Saccharomyces cerevisiae*, o pré peptídeo fator  $\alpha$  (Figura 2.5), que está presente no plasmídeo (pPICZ $\alpha$ C, Invitrogen) utilizado nesse trabalho para a expressão da enzima do inseto em *P. pastoris*. Este plasmídeo permite também a produção da proteína recombinante contendo uma cauda de histidina (His<sub>x6</sub>) em sua porção C-terminal, o que facilita a etapa subsequente de purificação.

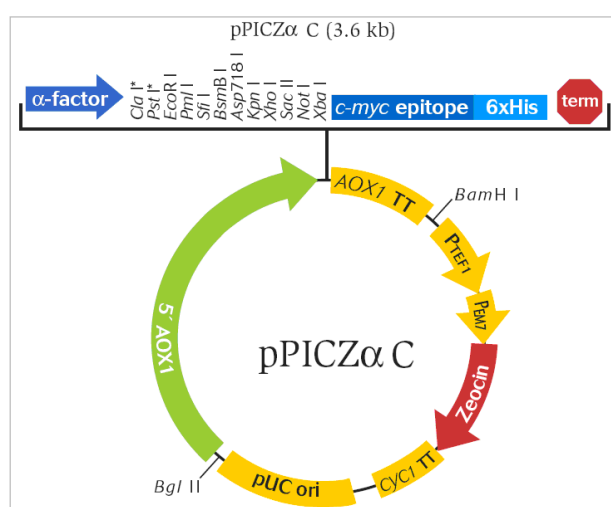


Figura 2.5: Plasmídeo de expressão em levedura pPICZ $\alpha$ C que confere resistência à zeocina, contendo fator  $\alpha$  de secreção e cauda de histidina.

Para a transformação do plasmídeo é necessário que ele seja linearizado por meio da digestão com enzima de restrição. A transformação ocorre por recombinação homóloga entre o DNA plasmidial recombinante contendo a região flanqueadora (AOX1) e a região homóloga do genoma da levedura (Cregg et al., 1985). A integração garante a estabilidade do DNA recombinante no genoma da levedura, mesmo em múltiplas cópias, além de possibilitar a seleção de recombinantes pela resistência ao antibiótico zeocina, que é conferida pelo plasmídeo (Cereghino e Cregg, 2000).

Levando em consideração as dificuldades de obtenção da *rSl-CathL* em *Escherichia coli*, descrita na seção de resultados, provavelmente, decorrentes da toxicidade da enzima produzida dentro da célula bacteriana, optou-se pela produção da proteína recombinante no sistema eucarioto de *Pichia pastoris* utilizando o fator  $\alpha$  de secreção que facilita a etapa de purificação diretamente do meio de cultura.

## **2.2 Materiais e métodos**

A seção de materiais e métodos relativa às análises de RT-PCR discutidas neste capítulo foi previamente detalhada no capítulo anterior.

### **2.2.1 Coleção de insetos**

Os espécimes de *S. levis* foram gentilmente cedidos pelo laboratório de entomologia do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP) sob responsabilidade do pesquisador Dr. Luis Carlos de Almeida. Após a eclosão dos ovos, as larvas do inseto foram cultivadas em meio de dieta artificial (Degaspari et al., 1987) e mantidas em câmaras climatizadas a 26 °C com fotoperíodo de 12 horas. Larvas de 30 dias de vida foram utilizadas para a dissecação do intestino e imunolocalização, pesando cerca de 200 a 300 mg cada.

### **2.2.2 Dissecação do intestino e preparo do extrato de proteínas digestivas**

As larvas de *S. levis* foram mantidas no gelo por 5 minutos para a imobilização, e em seguida dissecadas em tampão PBS pH 7,0 para a separação do tubo intestinal o qual foi homogeneizado em 2 ml de tampão (Tris-HCl 10 mM, NaCl

150 mM e Triton X-100 2%, pH 7,4). O homogenato foi centrifugado a 4 °C, 6000 g por 30 minutos e a fração solúvel, correspondente ao conteúdo do tubo intestinal, foi separada em gel SDS 15% (Laemmli, 1970) para as análises de *Western blotting*.

Para as análises morfológicas do intestino, foram utilizadas cinco larvas de *S. levis* com 30 dias de vida, as quais tiveram seus intestinos cuidadosamente removidos em tampão PBS pH 7,0 e examinados em microscópio com uma lente objetiva graduada.

### 2.2.3 Predição de peptídeo sinal e ocorrência de sítios de glicosilação na proteína *Sl-CathL*

A sequência protéica da *Sl-CathL* foi deduzida a partir da tradução da ORF e analisada utilizando o programa SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). O programa indica a possibilidade de existência de peptídeo sinal, baseado em índices de hidrofobicidade e seu possível sítio de clivagem, comparando-o com diversas sequências sinais que têm os pontos de clivagem conhecidos.

A sequência completa da proteína também foi submetida a análises *in silico* para verificar a existência de prováveis sítios de glicosilação nos programas NetNGlyc 1.0 (Gupta et al., 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e NetOGlyc 3.1 (Julenius et al., 2005; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).

A proteína recombinante foi tratada com diferentes enzimas objetivando verificar a ocorrência de glicosilação. Foram utilizadas as glicosidases: endoglicosidase H, PNGase F e a O-glicosidase (New England Biolabs). A endoglicosidase H é uma glicosidase recombinante capaz de clivar entre o cerne de chitobiose de oligossacarídeos híbridos ou com alto teor de manose em proteínas N-glicosiladas. Assim, é uma enzima que cliva cadeias laterais de açúcares, especificamente manose. Sua massa molecular aproximada é de 29 kDa.

A N-glicosidase F (PNGase F) é uma amidase que cliva internamente resíduos de glicina ou asparagina com alto teor de manose, híbridos e oligossacarídeos complexos de proteínas N-glicosiladas, constituindo uma enzima capaz de clivar qualquer resíduo de açúcar em uma proteína N-glicosilada. Sua massa molecular aparente é de 36 kDa. As reações foram realizadas utilizando 1,5

µg de proteína recombinante, 1 µl do tampão desnaturante para glicoproteínas, em um volume final de 10 µl, e aquecidas a 100 °C durante 10 minutos. Após a desnaturação foram adicionados 2 µl de tampão G5, 2µl de enzima endoglicosidase H e água suficiente para completar 20 µl. As reações com PNGase F foram acrescidas de 2 µl de NP40 e o tampão utilizado foi o G7.

A endo-*a-N*-acetylgalactosaminidase, ou O-glicosidase, é uma enzima de 147 kDa que catalisa a remoção de dissacarídeos ligados a glicoproteínas. Nas reações é utilizada juntamente com a neuraminidase (acetyl-neuraminyl hydrolase), que é capaz de remover resíduos de ácido N-acetyl-neuramínico das proteínas ou oligossacarídeos e tem massa molecular próxima de 40 kDa. As reações para avaliar a presença de O-glicosilação na *rSl-CathL* foram realizadas nas mesmas condições descritas para as N-glicosidases, utilizando 2 µl de NP40 e tampão G7 adicionados de 2 µl de neuraminidase e 2 µl de O-glicosidase. Todas as reações foram incubadas durante 24 horas a 37 °C e analisadas em SDS-PAGE 12% para verificar se a *rSl-CathL* apresentou mudança no padrão de massa molecular devido à liberação das cadeias de açúcar.

## **2.2.4 Expressão recombinante da cisteíno peptidase de *S. levis***

### **2.2.4.1 Expressão da *rSl-CathL* em *Escherichia coli***

#### **2.2.4.1.1 Clonagem em plasmídeo de expressão**

A enzima *rSl-CathL* foi inicialmente produzida em *E. coli* utilizando-se o plasmídeo pET28a (Novagen) em fusão com uma cauda de histidinas, que facilita a posterior purificação por cromatografia de afinidade em coluna contendo níquel. Para a construção do plasmídeo, a fase aberta de leitura excluindo o peptídeo sinal foi amplificada por PCR utilizando *primers* específicos CathL-Forward (5'-ACCCTTCTTAAAGAGGATGG - 3'), *blunt* e CathL-Reverse (5' -ATAAGAATGCGGCCGCGATGAGCGGGTAGACAGCATC - 3') que inclui em sua sequência sítio para a enzima *Not* I, possibilitando a clonagem do inserto em fase no plasmídeo de expressão. Após a construção do plasmídeo pET28a *rSl-CathL*, 10 ng do plasmídeo construído foram utilizados para transformar células *E. coli* Rosetta (DE3) CaCl<sub>2</sub> competentes. Após a transformação as células foram plaqueadas em LB ágar contendo o antibiótico kanamicina (25 µg/ml).

#### 2.2.4.1.2 Expressão da *rSl-CathL* em *E.coli* e teste de solubilidade

Das colônias selecionadas, 10 delas foram empregadas nos testes de expressão e cultivadas por 16 horas a 37 °C em 3 ml de meio de cultura LB Broth contendo 25 µg/ml de kanamicina, sob agitação de 250 rpm. Esse pré-inóculo foi diluído em 100 ml de meio LB com antibiótico e cultivado a 37 °C, 250 rpm, até atingir a D.O.<sub>(600)</sub> de 0,5. A expressão foi induzida pela adição de IPTG na concentração final variando de 0,2 a 1 mM e as culturas foram mantidas sob a mesma agitação e incubadas a 30 e 37 °C para a determinação do melhor perfil de expressão. Foram retiradas alíquotas das culturas em intervalos de 1 hora e a indução foi conduzida até 4 horas, quando as células foram coletadas por centrifugação (Sorvall RC 5C PLUS) a 15.000 g, 4 °C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 25 ml de tampão de lise (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8,0). As células ressuspensionadas foram lisadas por 8 pulsos de sonicação com duração de 1 minuto e intervalos de 30 segundos no sonicador Sonic Dismembrator 500 (Fisher Scientific). O lisado foi centrifugado durante 15 minutos a 15.000 g e 4 °C e o sobrenadante, contendo a fração solúvel, foi separado do precipitado. As análises de expressão e solubilidade foram realizadas em SDS-PAGE gradiente 4 - 12% (Laemmli, 1970), utilizando-se 10 µl do sobrenadante e dos pellets ressuspensionados em tampão de lise, adicionados de 5 µl de tampão desnaturante (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, 2.5% SDS, 0,36 mM β-mercaptoethanol, EDTA 0,5 mM, 10% glicerol e 0,005% bromophenol blue). As amostras foram fervidas durante 10 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida. A corrida foi realizada a 140 V, e o gel corado com Comassie Blue.

#### 2.2.4.2 Expressão recombinante da *Sl-CathL* em *Pichia pastoris*

##### 2.2.4.2.1 Construção do plasmídeo de expressão e transformação em *Pichia pastoris*

Para a construção do plasmídeo, a ORF excluindo o peptídeo sinal, foi amplificada por PCR utilizando *primers* específicos pPICZαC-CathL-F (5' - CCATCGATGACCCTTCTTAAAGAGGAT - 3') e pPICZαC-CathL-R (5' - GATGCTGTCTACCCGCTCATCGCGGCCGCATTCTTAT -3') que incluem em suas

sequências sítio para a enzima *Cla* I e *Not* I, respectivamente, possibilitando a clonagem *in frame* no plasmídeo de expressão pPICZ $\alpha$ -C (Invitrogen).

O plasmídeo construído, pPICZ $\alpha$ C-*Sl-CathL*, foi linearizado pela digestão com a enzima endonuclease *Pme* I e 3  $\mu$ g de DNA foram utilizados para a transformação na linhagem KM71H de *P. pastoris*. A transformação foi realizada por eletroporação utilizando o dispositivo Gene Pulser (Bio-Rad) em cubeta de 0,2 cm, com os parâmetros: 25 uF, 200  $\Omega$ , e seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). Cepas recombinantes de *P. pastoris* foram selecionadas em placas de YPDS ágar contendo 100  $\mu$ g/ml de zeocina, incubadas por 48 h a 30 °C. Também foram utilizadas placas com concentrações elevadas de zeocina, 250 e 500  $\mu$ g/ml para a seleção de clones multicópias.

#### **2.2.4.2.2 Expressão de cisteíno peptidase recombinante em *Pichia pastoris***

Para os testes iniciais de expressão em baixa escala foram utilizados 4 clones selecionados por PCR. Os clones foram inoculados em 50 ml de meio de cultura BMGY e incubados a 30 °C, 250 rpm, durante 24 h para a multiplicação celular até atingir a D.O.<sub>(600)</sub> igual a 6. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 g e ressuspensas em 10 ml de BMMY. A expressão foi realizada durante 144 horas a 26 °C, 250 rpm. A produção da enzima recombinante foi induzida pela adição diária de metanol na concentração final de 0,75%. Para checar a expressão, coletas diárias foram realizadas antes da adição do metanol, 1 ml da cultura foi aliqotado e centrifugado 1500 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram congelados em freezer - 80 °C e posteriormente submetidos à análise em SDS-PAGE 12%.

Após os testes de expressão e identificação de uma colônia hiper produtora da proteína recombinante, essa colônia foi inoculada em 10 ml de BMGY e a cultura foi incubada nas mesmas condições descritas anteriormente. O pré-inóculo foi diluído em 500 ml de BMGY e incubado por 30 h a 26 °C, sob agitação de 250 rpm, para a geração de biomassa (D.O.<sub>(600)</sub> 6). As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 g e ressuspensas em 100 ml de BMMY para a expressão durante 24 h a 26 °C, 250 rpm, induzidas pela adição de metanol 0,75% (CF).



#### **2.2.4.2.3 Purificação da *rSl-CathL* expressa em *Pichia pastoris***

A cultura contendo a proteína recombinante foi centrifugada e o sobrenadante foi filtrado a vácuo em membrana de 0,44 µm. Após a filtração, a purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em uma coluna de resina de sílica (5 ml) contendo níquel (HisLink, Promega). A eluição da proteína foi feita pela lavagem da coluna com 2 volumes do tampão de lise contendo concentrações crescentes de 10 a 250 mM de imidazol. Uma alíquota de 10 µl de cada fração de eluição foi adicionada de 5µl tampão desnaturante, fervida durante 5 minutos e analisada em SDS-PAGE 12%.

As frações contendo a proteína pura foram dialisadas em membranas de 14000 MW (Pierce) durante 12 horas a 4 °C, utilizando-se 2 litros de tampão para diálise (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) para a remoção do imidazol e sais que podem influenciar os testes de atividade. Foi realizada uma troca de tampão, e a diálise foi conduzida por mais uma hora. Para ativação da enzima foi realizada uma diálise posterior em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 nas mesmas condições. Após as diálises, a concentração da proteína foi determinada utilizando-se o kit BCA Protein Assay (Pierce) baseado no método do ácido bicinchonínico descrito por Smith e colaboradores (1985).

#### **2.2.5 Produção de anticorpos anti- *rSl-CathL***

Anticorpos policlonais anti-*rSl-CathL* foram produzidos em camundongos contra a proteína recombinante purificada. Para a obtenção desses anticorpos foram feitas duas inoculações de 50 µg da proteína purificada em camundongos com 20 dias de vida (Biotério-UFSCar). Para a primeira imunização foi utilizada a proteína combinada com o mesmo volume, aproximadamente 60 µl, do adjuvante completo de Freund (Sigma). Após 45 dias da primeira inoculação foi feita a segunda inoculação. Nesta etapa, a proteína foi conjugada com o mesmo volume do adjuvante incompleto de Freund (Sigma) e após 10 dias, os camundongos foram sacrificados pela Profa. Dra. Keico Okino Nonaka do Departamento de Fisiologia (UFSCar). O sangue foi coletado e centrifugado a 4 °C por 5 minutos (15.700 g) para obtenção do soro contendo os anticorpos.

### 2.2.6 Análises de *Western blotting*

Após a separação das amostras em SDS-PAGE 15% foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF (Pierce - Thermo Scientific) em sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), em tampão de transferência (Tris 200 mM, glicina 50 mM e metanol 20%) a 150 V e 150 mA durante duas horas. Para checar a eficiência da transferência, a membrana foi corada em uma solução contendo 250 µl de solução estoque de Ponceau (Merck), adicionados de 50 µl de ácido acético, em volume final de 50 ml. A membrana foi lavada em água e incubada durante 12 horas em solução de bloqueio (2,5 g de leite em pó desnatado em 50 ml de tampão TBS - Tris 5 mM, NaCl 75 mM, pH 8,0). Em seguida foi lavada três vezes durante 5 minutos em tampão TBS pH 8,0 e então incubada com o anticorpo primário específico.

Para avaliar a eficiência e especificidade do anticorpo produzido, as membranas foram incubadas durante 90 minutos nas seguintes diluições do anticorpo: 1:2000, 1:5000, 1:7500, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:40000 e 1:50000 em tampão TBS. Após uma nova lavagem em TBS, as membranas foram incubadas com *anti-mouse* IgG (1:10000 em TBS) (Sigma) por mais 90 min. As membranas foram novamente lavadas com TBS e a revelação foi realizada por adição de 5 ml do substrato AP Color Development reagent (Bio Rad) para a enzima fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo secundário (*anti-mouse*). Também foram realizadas análises de imunoblotting com o anticorpo anti-*His-tag* utilizado na diluição 1:7500 em TBS, específico para a cauda de histidinas (HIS<sub>x6</sub>) da proteína recombinante.

### 2.2.7 Sequenciamento da região N-terminal da *SI-CathL*

Após a ativação da enzima *rSI-CathL*, foi observado em SDS-PAGE o aparecimento de novas bandas correspondentes a proteínas de massa molecular inferior. Com o objetivo de verificar o exato ponto de clivagem da enzima na forma zimogênio (pró-enzima), e assim determinar sua pró-região e sequência da proteína madura, essas bandas foram submetidas ao sequenciamento da extremidade N-terminal. Para tanto, foi realizado o mesmo procedimento de transferência da proteína para membrana de PVDF, detalhado na seção anterior (2.2.6). Após a confirmação da transferência com solução de Ponceau, as bandas foram recortadas

da membrana com o auxílio de um bisturi, e rapidamente descoradas com água milli-Q, secas com papel filtro, e enviadas para o sequenciamento da extremidade N-terminal da proteína madura.

O sequenciamento da região N-terminal da *rSl-CathL* foi realizado em sequenciador automático de proteínas Shimadzu PPSQ-23A, pelo método de degradação de Edman, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Carlos, com a colaboração da Prof. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.

## **2.2.8 Caracterização enzimática da *rSl-CathL***

### **2.2.8.1 Ativação da enzima *rSl-CathL***

A enzima recombinante foi produzida em sua forma zimogênio, contendo a pró-região com o domínio inibitório. Para os ensaios de atividade enzimática o pH foi reduzido, propiciando a auto-ativação da enzima dada pela liberação do pró-domínio. A *rSl-CathL* foi ativada por meio da diálise em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, diversas alíquotas foram congeladas a - 20 °C e também estocadas em geladeira (4 a 8 °C) para os testes de ativação, estabilidade e monitoramento da atividade enzimática. Foram realizados diversos ensaios variando condições de temperatura, pH e tempo de incubação, buscando identificar o melhor padrão de ativação da enzima. A ativação da enzima foi confirmada pelas medidas de atividade enzimática, detalhada na seção seguinte, e também visualmente em SDS-PAGE 15% pela detecção de uma banda de massa molecular inferior, proveniente da clivagem da pró-região N-terminal da enzima na forma inativa.

### **2.2.8.2 Atividade enzimática da *rSl-CathL***

A atividade enzimática e eficiência catalítica da cisteíno peptidase recombinante foi inicialmente determinada utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC usualmente empregado para o monitoramento de atividade de cisteíno peptidases catépsina *L-like* (Barrett e Kirschke, 1981) preparado de acordo com as especificações do fabricante. Posteriormente, outros dois substratos fluorogênicos, Z-Leu-Arg-AMC e Z-Arg-Arg-AMC, foram testados para avaliar a preferência da

enzima recombinante, dada pela constante catalítica ( $k_{cat} / K_m$ ), que determina a eficiência da enzima para os respectivos substratos.

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados a partir da reação contendo 11 nM enzima purificada, 2,5 mM DTT (Dithiothreitol), para a redução do resíduo reativo de cisteína da enzima recombinante, e tampão 100 mM acetato de sódio pH 5,5 em volume final de 495  $\mu$ l, a qual foi pré-incubada a 37 °C durante 5 minutos. Após incubação, o substrato Z-Xaa-Arg-AMC foi adicionado à reação na concentração final de 2  $\mu$ M. Em seguida, utilizando o espectrofluorímetro Hitachi-2500 com comprimento de onda de  $\lambda_{ex}$  380 nm e  $\lambda_{em}$  460 nm foi realizada a leitura da fluorescência emitida pela hidrólise do substrato, utilizada para o cálculo da atividade enzimática. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata, utilizando uma cubeta de quartzo de 1 ml.

A atividade da *rSl-CathL* em função do pH foi analisada utilizando-se os diferentes tampões na reação: acetato de sódio 100 mM (3,0 < pH < 5,5); fosfato de sódio 100 mM (6,0 < pH < 7,0); Tris-HCl 100mM (7,0 < pH < 8,5) e borato de sódio 100 mM (9,0 < pH < 10,0). Para a determinação da atividade da *Sl-CathL* em função da temperatura, a reação contendo a enzima recombinante foi pré-incubada nas temperaturas 10, 20, 30, 37, 40, 50, e 60 °C em compartimento termostático. Após incubação, as medidas de atividade foram realizadas nessas temperaturas. Já a estabilidade térmica da *rSl-CathL* foi avaliada pela incubação da reação contendo a enzima durante 1 hora nessas mesmas temperaturas e a atividade residual foi monitorada a 37 °C.

### 2.2.8.3 Determinação das constantes de eficiência catalítica

A constante de eficiência catalítica  $k_{cat} / K_m$  foi determinada sob condições de pseudo primeira ordem, onde  $[S] < K_m$ , e calculada por regressão não linear utilizando o programa GraFit (Leatherbarrow, 1992). Os substratos fluorogênicos Z-Phe-Arg-AMC, Z-Leu-Arg-AMC e Z-Arg-Arg-AMC foram testados separadamente em diferentes concentrações e a eficiência catalítica foi monitorada.

Para a determinação da constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , foi utilizado o substrato Z-Leu-Arg-AMC, para o qual a enzima apresentou maior especificidade ( $k_{cat} / K_m$ ). As reações foram inicialmente preparadas como no item 2.2.8.2,

adicionando o substrato a cada 150 segundos, quando as medidas de atividades foram tomadas. A concentração final, após adição do substrato, variou de 0,1 e 10,5  $\mu\text{M}$ . A constante  $K_m$  foi calculada por regressão não linear como descrito para a eficiência catalítica.

### 2.2.9 Ensaios de inibição de atividade da *rSl-CathL*

Para os testes de inibição de atividade da enzima *rSl-CathL*, foram utilizadas cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar, que são inibidores específicos de cisteíno peptidases e que têm sido estudados em detalhes em nosso laboratório: CaneCPI-1 (Soares-Costa et al., 2002), CaneCPI-2, CaneCPI-3 (Gianotti et al., 2006) e CaneCPI-4 (Gianotti et al., 2008). Também foram realizados testes de inibição com o peptídeo epóxido E-64 (Calbiochem), um inibidor clássico de cisteíno peptidase (Barrett et al., 1982) que inibe irreversivelmente as enzimas da família da papaína.

A inibição da atividade enzimática da *rSl-CathL* foi determinada utilizando o substrato Z-Leu-Arg-AMC. A reação contendo a enzima e o substrato foi preparada como descrito anteriormente, seguido da adição sucessiva do inibidor variando a concentração final de 0,1 nM a 16 nM e atividade hidrolítica residual foi monitorada. O inibidor E-64 foi utilizado na concentração final variando de 0,2  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ .

A constante de inibição ( $K_i$ ) foi calculada de acordo com a fórmula ( $V_0 / V_i = 1 + [I] / K_{i \text{ app}}$ ), onde  $V_0$  velocidade de reação na ausência de inibidor e  $V_i$  velocidade na presença de inibidor,  $[I]$  concentração de inibidor utilizada. Após análise da velocidade de reação em diferentes concentrações dos inibidores foi gerado um gráfico ( $v_0 / v_i - 1$  versus  $[I]$ ) cuja inclinação da reta corresponde a  $1 / K_{i \text{ app}}$ . Para o cálculo da constante de inibição absoluta ( $K_i$ ), foi utilizada a fórmula  $K_i = K_{i \text{ app}} / (1 + [S] / K_m)$  (Beynon e Bond, 1989), na qual foi considerada a constante de eficiência catalítica da enzima e a concentração de substrato utilizada nos ensaios.

### 2.2.10 Imunolocalização da *Sl-CathL* no intestino do inseto por microscopia eletrônica de transmissão

Larvas de *S. levis*, com 30 dias de vida, foram imobilizadas em gelo durante 5 minutos e dissecadas na própria hemolinfa. O intestino das larvas foi cuidadosamente retirado e cortado em diferentes seções que foram fixadas em 4% paraformaldeído adicionado de 0,3% glutaraldeído, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante duas horas a 4 °C. Após 5 lavagens durante 20 minutos com tampão fosfato 0,1 M a 4 °C, o material foi desidratado em gradiente etílico (70 - 100%) e incluído em resina acrílica L. R. White.

As seções de intestino fixadas na resina foram emblocadas em cápsulas de gelatina, cortadas em ultramicrótomo (60 - 90 nm) Leica Ultracut UCT e incubadas com o anticorpo primário produzido em camundongos *anti-rSl-CathL*, na diluição 1:500 em tampão TBS pH 7,2 contendo BSA (Bovine Serum Albumin) 1% e Azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) 0,05%. O anticorpo secundário *anti-mouse IgG* (Amersham) foi diluído (1:15) em tampão TBS pH 8,2, BSA 1% e Azida sódica 0,05%. Esse anticorpo produzido em cabras é associado a partículas de ouro de 15 nm de diâmetro que permitem a visualização das proteínas marcadas.

Os cortes foram contrastados com corante citrato (acetato de uranila 1% aquoso e citrato de chumbo) e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 operado a 80 kV. Como controle foram utilizados cortes das mesmas regiões do intestino do inseto, incubados com soro não imune de camundongos e tratados nas mesmas condições. Todo o trabalho de fixação, preparação e análise das seções do intestino das larvas foi desenvolvido em colaboração com o Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro do departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com o auxílio do técnico Waldir Caldeira.

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Caracterização da sequência da *Sl-CathL*

Um clone de cDNA que codifica uma cisteína peptidase tipo catepsina L, denominado *Sl-CathL*, foi isolado da biblioteca de larvas de *S. levis* apresentada no capítulo 1. Este clone corresponde a uma das isoformas da enzima mais abundante identificada no transcriptoma, a qual é representada por 10,49% do total de ESTs

analisados ou 50,65% dos clones que codificam prováveis enzimas digestivas. A ORF de 972 pb, depositada no GenBank sob o número de acesso FJ467290, codifica uma pré-pró-enzima (*Sl-CathL*) homóloga a outras enzimas digestivas tipo catepsina L identificadas no intestino médio de outros coleópteros. A sequência protéica desta enzima apresenta 60% de identidade com a catepsina L de *Diaprepes abbreviatus* (ABG73217.1), 58% com *Hypera postica* (AAD41105.1) e 46% com a catepsina L de *Tribolium castaneum* (NP\_001163996.1). O alinhamento representado na figura 2.6 destaca os resíduos e motivos conservados entre essas sequências de catepsinas L de coleópteros.

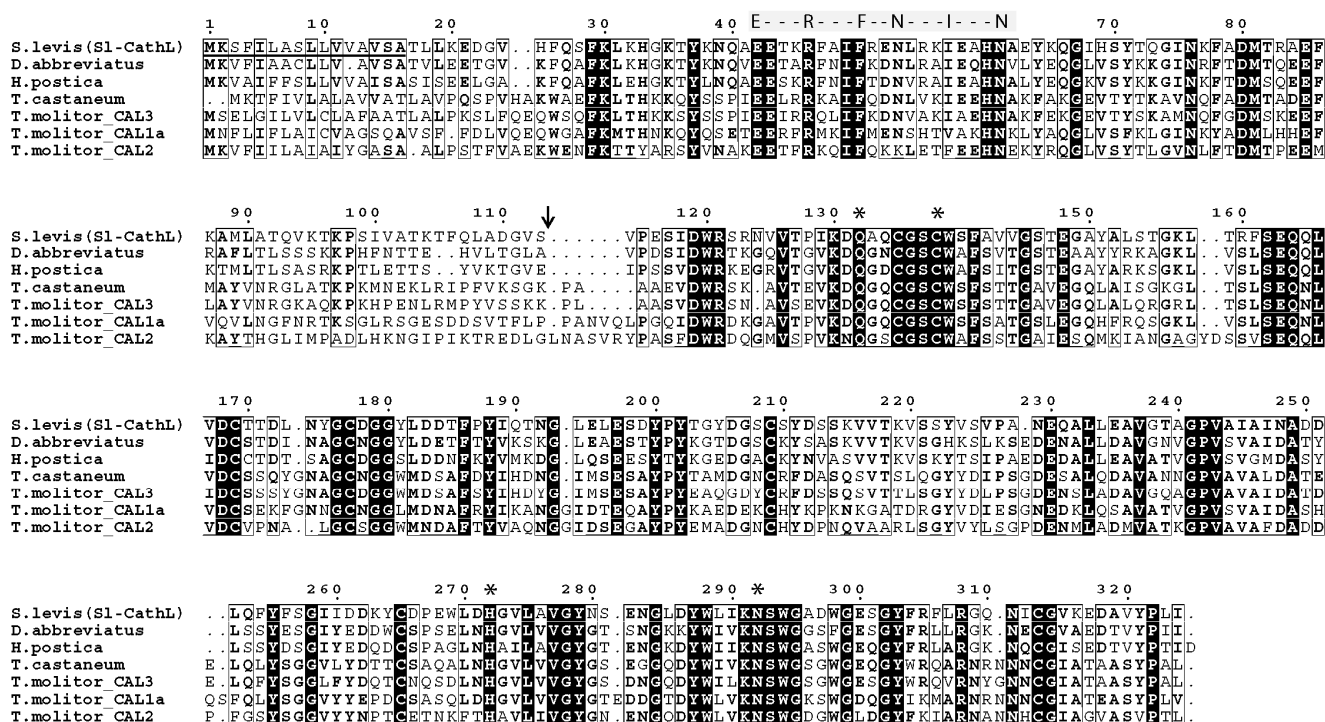


Figura 2.6: Alinhamento da sequência protéica da *Sl-CathL* (ACK38176) com catepsinas L homólogas de coleópteros. Resíduos conservados, idênticos em todas as proteínas são destacados em caixas pretas, enquanto as caixas brancas mostram os resíduos com mais de 50% de identidade entre as sequências. O peptídeo sinal da *Sl-CathL* aparece sublinhado em preto e o provável ponto de clivagem da pró-região é indicado por uma seta. O motivo inibitório conservado da pró-região "E-R-F-N-I-N" está destacado em uma caixa cinza acima do alinhamento. Os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise são indicados com asterisco (\*) acima do alinhamento, que foi realizado utilizando o programa Multalign utilizando parâmetros padrões (Corpet, 1988).

Sabendo que as catepsinas L constituem enzimas originalmente lisossomais, Cristofolletti e colaboradores (2005) conduziram o primeiro estudo gerando fortes evidências de que essa classe de enzimas é secretada no lúmen do intestino das larvas do coleóptero *Tenebrio molitor*, e provaram a atuação dessas enzimas como verdadeiras enzimas digestivas. Utilizando anticorpos específicos e, também

realizando análises de RT-PCR, os autores provaram que a CAL2 (AY337517) e CAL3 (AY332272) são fundamentalmente produzidas no intestino médio das larvas do besouro, enquanto outras três isoformas da CAL1 (a: AY207373; b: AY332270; c: AY332271) foram detectadas em corpo gorduroso e outros tecidos, atuando portanto como enzimas lisossomais. Esses resultados sugerem, segundo os autores, que as catepsinas L digestivas de coleópteros provavelmente originaram-se por um processo de duplicação gênica e evolução independente a partir das catepsinas lisossomais. Em uma análise de similaridade com essas enzimas de *T. molitor*, a *Sl-CathL* apresenta maior similaridade com a CAL3 (63% de similaridade) do que com a CAL2 e isoformas da CAL1, (respectivamente 55% e 56%). O alinhamento evidenciando as identidades destas sequências é também representado na figura 2.6. Um cladograma das mesmas sequências de *T. molitor* e *Sl-CathL* gerado pelo alinhamento utilizando os parâmetros padrões do Blastx, seguido de uma análise pelo método Neighbor Joining (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview>), agrupou a *Sl-CathL* mais próxima à CAL3 e também CAL2, uma das raras catepsinas L comprovadamente digestivas, enquanto as isoformas de CAL1 foram agrupadas em um ramo separado formado apenas pelas catepsinas lisossomais (Figura 2.7).

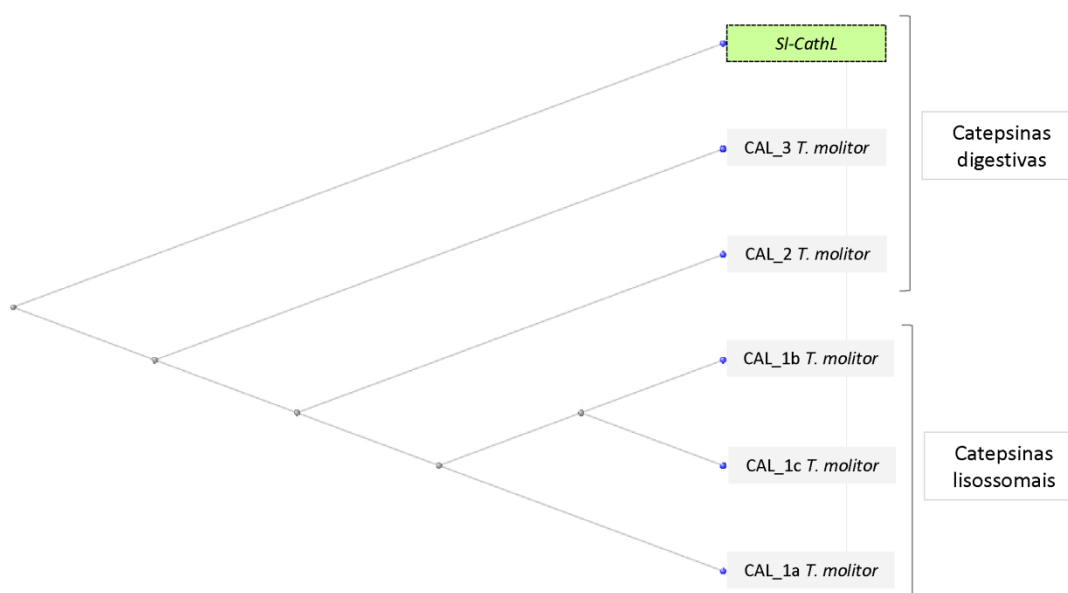


Figura 2.7: Cladograma representando o agrupamento entre a *Sl-CathL* e as CALs (Catepsinas L) de *T. molitor*. Note que a *Sl-CathL* é agrupada junto à CAL3, e também à CAL2, uma das raras catepsinas L comprovadamente digestivas, enquanto as isoformas de CAL1 estão agrupadas em um ramo separado formado apenas pelas catepsinas lisossomais.

Nenhuma alta similaridade foi observada entre a sequência de proteína da *Sl-CathL* contra catepsinas de Lepidópteros, que não possuem a versão digestiva



dessa enzima. Os resultados dessas análises, junto aos poucos estudos de catepsinas L digestivas de insetos, nos motivaram a clonar e caracterizar a *rSl-CathL* além de comprovar a atuação no intestino médio como uma verdadeira enzima digestiva.

O clone de cDNA da *Sl-CathL* codifica uma pré-pró-enzima com um peptídeo sinal predito, composto por 16 aminoácidos (MKSFILASLLVAVSA), indicado pela análise no programa SignalP 3.0 (Bendtsen et al, 2004). A clivagem desse peptídeo resulta em uma pró-enzima composta por 308 aminoácidos de massa molecular estimada em 34.26 kDa. A sequência completa da proteína foi analisada nos programas NetNGlyc 1.0 (Gupta et al., 2004) e NetOGlyc 3.1 (Julenius et al., 2005) para verificar a existência de prováveis sítios de glicosilação, entretanto, nenhum sítio foi identificado. Esses resultados apontam, mais uma vez, para a atuação digestiva da enzima, desde que catepsinas L lisossomais necessitam de resíduos de lisina especialmente dispostos na superfície da proteína, responsáveis pela fosforilação seletiva da manose que são necessárias para o endereçamento lisossomal (Cuozzo et al., 1998).

A *Sl-CathL* é produzida como zimogênio, e o motivo conservado "E<sup>42</sup>R<sup>46</sup>F<sup>50</sup>N<sup>53</sup>I<sup>57</sup>N<sup>61</sup>" do pró-domínio envolvido na inibição da atividade da enzima (Karrer et al., 1993), característico das enzimas *papain-like* é destacado na figura 2.8, junto à outras características da enzima. A tríade catalítica Cys<sup>138</sup>, His<sup>272</sup> e Asn<sup>292</sup> mostra-se conservada entre as sequências de catepsinas L de coleópteros evidenciadas na figura 2.6, assim como o resíduo de glutamina (Gln<sup>132</sup>) que precede a cisteína do sítio ativo (Cys<sup>138</sup>) e provavelmente auxilia na formação da cavidade do oxianion. A asparagina (Asn<sup>292</sup>) participa da catálise orientando o anel imidazólico da histidina catalítica (His<sup>272</sup>) (Rawlings e Barrett, 1994).

A sequência de 924 pb da *Sl-CathL*, excluindo o provável peptídeo sinal, foi subclonada no plasmídeo pPICZαC para expressão recombinante. A pró-região predita da proteína (InterPro domain IPR013201) se estende do resíduo 17 ao resíduo 113, enquanto a proteína madura provavelmente compreende os resíduos 114 a 324 (Figura 2.8). O potencial ponto de clivagem entre o pró-peptídeo e a proteína madura ocorre na sequência "LADGVS\*VPESIDWR", resultando em uma valina (Val<sup>114</sup>) na extremidade N-terminal da enzima madura, e está de acordo com o observado para vários membros da família papaína, onde uma prolina (Pro<sup>115</sup>) é

conservada na posição 2 da enzima madura, provavelmente evitando a degradação da enzima (Rawlings e Barrett, 1994).

```

MKSFILASLLVVAVSAITLLKEDGVHVFQSFKLKHGKTYKNQAEETKRFAIFRENL 54
RKIEAHNAEYKQGIHSYTQGINKFADMTRAEFKAMLATQVKTGPSIVATKTFQL 108
ADGVSVPESIDWRSRNVVTPIKDQAQCGSCWSFAVVGSTEGAYALSTGKLTRFS 162
      ↑                               *
EQQLVDCTTDLNMGCDGGYLDLTFPFIQTNGLELESYPYTYDYGSCSYDSSKV 216
VTKVSSYVSPANEQALLEAVGTAGPVAIAINADDLQFYFSGIIDDKYCDPEWL 270
DHGVLAVGYNSENGLDYWLKNSWGADWGESGYFRFLRGQNICGVKEDAVYPLI 324

```

Figura 2.8: Sequência de aminoácidos da *Sl-CathL* (FJ467290). O provável peptídeo sinal de 16 aminoácidos está indicado em preto na extremidade N-terminal. A região marcada em cinza evidencia o pró-domínio predito, que se estende até a posição 113. O motivo inibitório conservado da pró-região E<sup>42</sup>R<sup>46</sup>F<sup>50</sup>N<sup>53,57</sup>N<sup>61</sup> é está destacado em caixas brancas na pró-região. Os resíduos conservados da tríade catalítica: Cys<sup>138</sup>, His<sup>272</sup>, Asn<sup>292</sup> estão destacados em caixas escuras, enquanto o resíduo de glutamina (Gln<sup>132</sup>), também envolvido na catálise, é indicado por um asterisco.

Soares-Costa e colaboradores (2011) purificaram duas cisteíno peptidases a partir do conteúdo do intestino de larvas de *S. levis*. As duas isoformas, que apresentaram atividade contra o substrato Z-Phe-Arg-AMC, comumente empregado para verificar a atividade de catepsinas L e correspondem à uma única banda de proteína que apresenta massa molecular em torno de 34 kDa. A fração de proteína purificada foi submetida a análises de espectrometria de massa após digestão trípica (Dellamano, 2009; Fonseca et al., 2012) e os dados obtidos revelaram três peptídeos (A) VPESIDWR, (B) NVVTPIK e (C) DYWLK, que foram identificados na sequência da *Sl-CathL*, indicando que ela é produzida no intestino e constitui uma enzima digestiva (Figura 2.9). Os peptídeos deduzidos na análise de espectrometria, correspondentes à proteína purificada, também foram localizados em outras sequências de catepsinas L identificadas a partir da análise do transcriptoma, correspondentes a isoformas dessa enzima. Esses resultados indicam que a proteína purificada do intestino pode corresponder a um conjunto de isoformas da *Sl-CathL*, considerando a abundância dessas variantes na biblioteca.

```

MKSFILASLLVVAVSATLLKEDGVHFQSFKLKHGKTYKNQAEETKRFAIFRENLRKIEAHNAEYKQGIHSYTGINKFADMTR
AEFKAMLATQVKTGPSIVATKTFQLADGVSVPESIDWRSRNVVTPIKDQAQCGSCWSFAVVGSTEGAYALSTGKLRFSEQ
QLVDCTTDLNYGCDGGYLDLDFPYIQTNGLAESDYPTGYDGSYDSSKVVTKVSSYVSPANEQALLEAVGTAGPVAIAI
NADDLQFYFSGIIDDKYCDPEWLDHGVLA VGYNSENGLDYWLIKNSWGADWGESGYFRFLRGQNICGVKEDAVYPLI

```

Figura 2.9: Sequência da *Sl-CathL* (ACK38176), evidenciando os peptídeos (A) VPESIDWR, (B) NVVTPIK e (C) DYWLIK, previamente identificados nas análises de espectrometria de massa a partir da proteína nativa purificada do intestino das larvas do inseto (Dellamano, 2009; Fonseca et al., 2012). Esse resultado indica que a *Sl-CathL* é de fato, uma enzima digestiva produzida no intestino. A seta indica o provável sítio de clivagem da pró-região.

A seta da figura 2.9 indica o provável sítio de clivagem da pró-região da *Sl-CathL*, que é corroborado pelo fato do peptídeo A (VPESIDWR) constituir um peptídeo não tríptico, pois é precedido de um resíduo de serina e não de um resíduo de arginina positivamente carregado, como esperado para uma clivagem tríptica. Isso indica que a clivagem desse peptídeo corresponde ao N-terminal da proteína madura e não da digestão tríptica realizada para a análise de espectrometria de massa, confirmando o sítio de clivagem predito descrito anteriormente para a pró-região da enzima.

Em análises de *Western blotting*, realizadas após a produção e ativação da enzima recombinante, é evidente o aparecimento de uma banda de massa molecular inferior, que pode corresponder à enzima madura, com a sua pró-região liberada. Essa banda foi recortada da membrana de PVDF e submetida ao sequenciamento da região N-terminal da proteína madura. Entretanto, as amostras não geraram sinal no sequenciador de proteína, o que pode indicar que a região N-terminal dessa proteína possa estar bloqueada.

Na seção 2.3.4 é mostrado que a *rSl-CathL* é capaz de se auto-ativar quando incubada em baixa temperatura e em pH inferior a 5,0. Curiosamente, o sítio predito de clivagem da pró-região "LADGVS\*VPESIDWR" não está de acordo com a especificidade esperada para um substrato de catepsinas L. Para as catepsinas L (CALs) de *T. molitor*, foi demonstrado que essas enzimas são processadas após os resíduos "VQ" (CAL1), "VR" (CAL2) ou "SK" (CAL3) (Cristofolletti et al., 2005). Esse processamento também não se encaixa no esperado para a especificidade de catepsinas L, caracterizado pela preferência de um resíduo hidrofóbico em P2 e um aminoácido carregado positivamente em P1 (K ou R). As razões para essa aparente inespecificidade não são certas, mas provavelmente outros resíduos de aminoácidos

próximos ao sítio de clivagem podem estar envolvidos na especificidade da enzima, como previamente detectado para tripsinas de insetos (Lopes et al., 2006).

O peptídeo C (DYWLIK) identificado na sequência da *Sl-CathL* também não constitui um resíduo tríptico, uma vez que é precedido por uma lisina, e não uma arginina. Entretanto, esse peptídeo pode ser considerado um fragmento tríptico de uma variante da *Sl-CathL*, denominado "*Sl-CathL* isoforma b" (GenBank: JN815315) que também foi identificada em abundância na biblioteca e compartilha 98% de identidade de aminoácidos com a *Sl-CathL*, cujo clone foi utilizado para a expressão recombinante (FJ467290). A sequência de proteína da isoforma b é precedida por uma arginina no fragmento peptídico "DYWLIK", podendo constituir uma das abundantes variantes de proteína do intestino da qual esse peptídeo foi originado.

Esses resultados estão de acordo com o perfil previamente identificado por Soares-Costa e colaboradores (2011) que relatam a atividade de cisteíno peptidases do intestino provenientes de, ao menos, duas isoformas, e corroboram a sugestão de que insetos fitófagos possuem uma ampla variedade de enzimas digestivas para contornar as deficiências causadas pela ingestão de inibidores produzidos pelas plantas como estratégia de defesa.

### 2.3.2 Expressão da *Sl-CathL* em bactéria

A catepsina L de *S. levis* foi inicialmente clonada para a produção em *E. coli* utilizando o plasmídeo pET28a, em fusão com uma cauda de histidinas. Após a seleção de transformantes positivos por PCR de colônia e sequenciamento, os clones selecionados foram induzidos pela adição de IPTG. No entanto, as análises em SDS-PAGE 12% revelaram que não houve a expressão da proteína recombinante no tamanho esperado em células de *E.coli*. Uma análise de imunoblotting utilizando o anticorpo anti-His tag (1:7500) evidenciou uma banda inferior a 5 kDa (Figura 2.10), o que pode indicar a degradação da proteína recombinante que continha a cauda de histidina contra a qual o anticorpo foi utilizado. Concluímos que a proteína pode ter sido degradada pela ação de peptidases endógenas da bactéria e por isso a expressão da *rSl-CathL* em bactéria não foi bem sucedida.

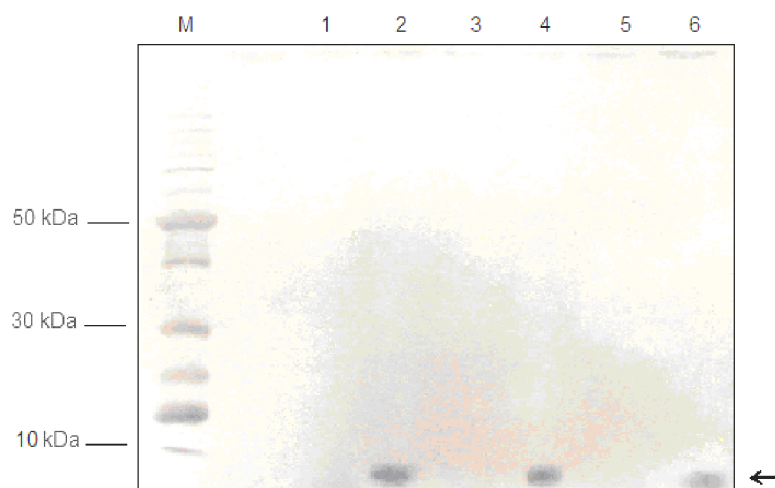


Figura 2.10: Análise da expressão da *rSI-CathL* em células de *E.coli* Rosetta (DE3) por *Western blotting*. Revelação do *Western blotting* em membrana de PVDF com anticorpo anti-His tag (1:7500) evidenciando a provável degradação da enzima recombinante produzida em bactéria. M: marcador de massa molecular; 1: células de *E.coli* Rosetta (DE3) 01 não induzida; 2: células de *E.coli* Rosetta (DE3) 01 induzida durante 4h com a adição de 0,4 mM de IPTG; 3: colônia 02 não induzida; 4: colônia 02 induzida 4h; 5: colônia 03 não induzida; 6: colônia 03 induzida 4h. A seta indica as bandas reconhecidas nas frações induzidas dos diferentes transformantes, com massa molecular menor do que o esperado, que sugerem a degradação da proteína recombinante.

### 2.3.3 Expressão recombinante da *SI-CathL* em *Pichia pastoris*

A *rSI-CathL* foi produzida na levedura *P. pastoris* em fusão com uma sequência His<sub>(x6)</sub>-tag proveniente do vetor (AAASFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH) na extremidade C-terminal, além de uma curta sequência (EAEASM) remanescente do vetor que permanece na extremidade N-terminal da proteína após a clivagem do fator  $\alpha$  de secreção. A clivagem desse peptídeo, o fator  $\alpha$ , é realizada pela enzima *kex2* durante a secreção da proteína para o meio de cultura extracelular, resultando em uma proteína recombinante de massa molecular esperada de 37,93 kDa.

Após a triagem, um clone multicópias foi selecionado para a expressão em maior escala e a *rSI-CathL* foi produzida em altos níveis a 26 °C dentro de 24 h, com rendimento estimado em 260 mg/L cultura. A análise em SDS-PAGE 15% revelou a proteína purificada com massa molecular aproximada de 42 kDa (Figura 2.11) que, após a ativação, foi utilizada para a caracterização cinética.

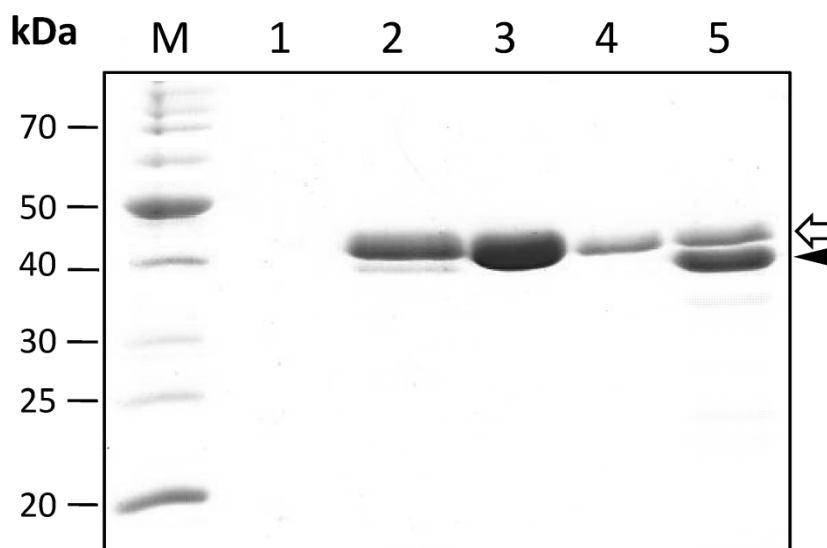


Figura 2.11: Análise da expressão da cisteíno peptidase recombinante de *S. levis* em *P. pastoris*. SDS-PAGE 15% corado com Comassie blue indicando a expressão, purificação e ativação da *rSl-CathL*; M: marcador de massa molecular; 1: células de *Pichia pastoris* (KM71H) controle negativo de indução; 2: clone recombinante de *P. pastoris* (KM71H) transformado com o plasmídeo pPICZaC-*rSl-CathL* induzido 24h com a adição de metanol [0,75%]; 3: enzima purificada na fração 50 mM de imidazol (pH 8,0); 4: frações purificadas dialisadas em pH 8,0; 5: *rSl-CathL* madura após diálise em pH 5,0. A seta branca indica a pró-enzima com massa molecular de 42 kDa, enquanto a seta preta evidencia a enzima em sua forma madura, com aproximadamente 39 kDa.

#### 2.3.4 Ativação da enzima recombinante expressa em *Pichia pastoris*

A enzima *rSl-CathL* produzida pela levedura *P. pastoris* foi diretamente recuperada do meio de cultura BMMY pH 6,0. O baixo valor de pH é indicado para o correto enovelamento da proteína recombinante. A purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel foi conduzida em tampão fosfato de sódio pH 8,0 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM), assim como a diálise para a remoção do imidazol do tampão de eluição. Estas etapas foram realizadas em pH básico com o objetivo de manter a enzima em condição inativa, em sua forma zimogênio, contendo a pró-região N-terminal.

Posteriormente, para a ativação da *rSl-CathL*, a enzima foi novamente dialisada em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) durante 4 horas, em baixa temperatura (4 - 8 °C). A análise em SDS-PAGE revelou que nessas condições a enzima foi capaz de se auto-ativar, promovendo a liberação da pró-região, que é evidenciada pelo aparecimento uma banda de massa molecular inferior. A enzima madura, evidenciada na canaleta 5 da figura 2.11 como a banda de maior intensidade, apresenta massa molecular estimada em torno de 39 kDa. Nessas,

condições, a enzima mantém-se estável quando acondicionada em geladeira por até 10-12 dias, quando sua atividade começa a diminuir em função da proteólise.

### 2.3.5 Análises de glicosilação da *rSl-CathL*

Considerando que a enzima recombinante produzida em células de *Pichia pastoris* apresentou massa molecular de 42 kDa, maior do que o esperado pelas análises *in silico* da sequência de aminoácidos (37,4 kDa), foi considerada a possibilidade da enzima estar glicosilada e devido à adição de cadeias de açúcares, apresentar massa molecular maior, pois esta migra no gel mais lentamente. Essas diferenças são evidenciadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Relação das massas moleculares (M.M) e ponto isoelétrico (P.I.) estimados para a enzima nativa e recombinante (*rSl-CathL*). Note as diferenças no padrão de massa molecular observadas para as proteínas descritas abaixo. Análises realizadas em: [http://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool](http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool).

	Proteína nativa		<i>rSl-CathL</i> (Levedura)	
	P. I. / M. M. estimada(kDa)	M. M. Observada(kDa)	P. I. / M. M. estimada(kDa)	M. M. Observada(kDa)
Pré-pró-enzima	5.06 / 35,89	-	-	-
Fator $\alpha$ / Pró-enzima	-	-	4.79 / 46,85	-
Pró-enzima	4.98 / 34,26	-	5.03 / 37,93	42
<i>Sl-CathL</i> madura	4.09 / 23,17	34 kDa	4.34 / 26,22	39

A sequência completa da proteína *rSl-CathL* foi submetida à análises de glicosilação *in silico*, utilizando os programas NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 3.1. Apesar de vários aminoácidos apresentarem *scores* elevados, próximos da linha de corte para a identificação como possíveis sítios para O-glicosilação, nenhum sítio de glicosilação foi identificado.

Dada a diferença entre a massa molecular esperada e a observada para a enzima, optou-se por também realizar análises de glicosilação da *rSl-CathL* utilizando glicosidases. No entanto, na análise em SDS-PAGE 12% com a proteína recombinante *rSl-CathL* após os tratamentos com N-glicosidases (endoglicosidase H e PNGase F) e O-glicosidase, não foi detectada alguma mudança no padrão de migração da enzima (Figura 2.12), reforçando a provável ausência de glicosilação na proteína recombinante.

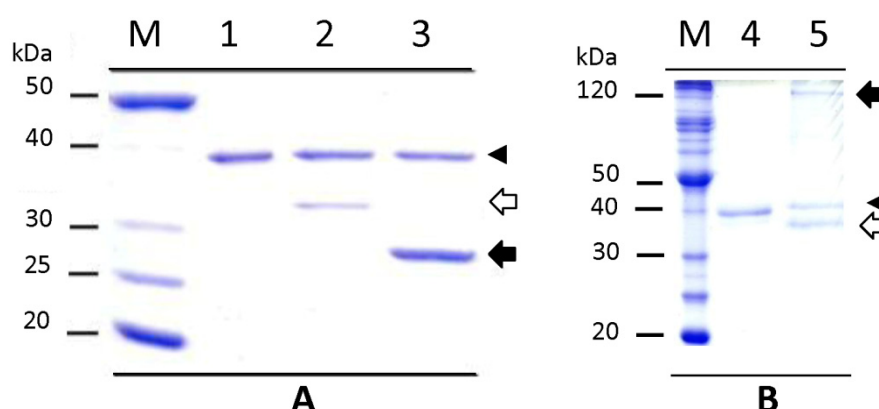


Figura 2.12: Análise de SDS-PAGE 12% com *rSI-CathL* após os tratamentos com glicosidases indicando ausência de glicosilação. M: marcador de peso molecular. As cabeças de seta preenchidas em preto indicam a *rSI-CathL*. (A) Tratamento com N-glicosidases; 1: *rSI-CathL* controle; 2: *rSI-CathL* após o tratamento com PNGase F; 3: Enzima recombinante após o tratamento com endoglicosidase H. A seta branca indica a banda relativa à PNGase F de 36 kDa, enquanto a seta preta indica a endoglicosidase H com massa estimada de 29 kDa. (B) Tratamento da *rSI-CathL* com a O-glicosidase; 4: *rSI-CathL* não tratada, controle; 5: Enzima recombinante adicionada de O-glicosidase, com massa molecular elevada (147 kDa), indicada pela seta escura e neuraminidase, com massa molecular próxima a 40 kDa, indicada pela seta não preenchida.

Essa aparente discrepância na migração eletroforética de proteínas digestivas recombinantes de insetos, também produzidas em *P. pastoris*, já foi relatada para a catepsina L da mosca da carne *Sarcophaga peregrina*, 32 kDa ao invés de 23,9 kDa esperados (Philip et al., 2007). O mesmo foi observado para a catepsina L digestiva da larva do besouro *Diabrotica virgifera*, com 32 kDa quando deveria ter massa equivalente a 26 kDa (Bown et al., 2004), assim como para a CAL de *Delia coarctata*, com 50 kDa, ao invés dos 35,9 kDa esperados (Pyati et al., 2009). Essa discrepância no padrão de migração pode ser um artefato do método, provavelmente devido à composição de aminoácidos, específica para essas proteínas de inseto. Desse modo, a enzima *rSI-CathL* madura, de aproximadamente 39kDa, foi utilizada para a caracterização cinética apresentada adiante.

### 2.3.6 Ensaios de atividade enzimática da *rSI-CathL*

#### 2.3.6.1 Determinação de pH ótimo

A enzima recombinante foi ativada em tampão acetato de sódio (pH 5,5) na presença de 2,5 mM de DTT. Após cinco minutos de incubação a atividade da enzima foi monitorada em função do pH, utilizando os diferentes tampões com pH variando entre 3,0 a 10,0. A enzima apresentou atividade na faixa de pH entre 4,8 a



7,6 e a maior atividade da enzima foi detectada em pH 6,0 (Figura 2.13). A preferência da enzima pelo pH ácido está de acordo com o observado para outras enzimas do tipo catepsinas L, que geralmente tem atividade ótima em valores de pH variando de 4,5 a 6,0 (Turk et al., 2000).

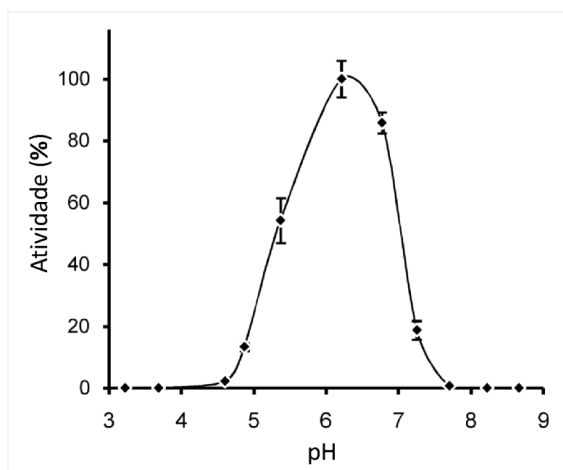


Figura 2.13: Atividade da enzima *rSI-CathL* em função do pH. As medidas de atividade foram realizadas em reações com diferentes tampões variando os valores de pH entre 3,0 a 10,0. O pH ótimo identificado para a enzima *rSI-CathL* recombinante foi 6,0. A atividade residual é perceptível do pH 4,8 a 7,6.

### 2.3.6.2 Determinação da atividade em função da temperatura e estabilidade térmica

A maior atividade enzimática da *rSI-CathL* foi observada a temperatura de 37 °C (Figura 2.14), apresentando 73% da atividade a 30 °C e 84% a 40 °C. Como a maior atividade observada para a enzima foi a 37 °C, essa foi a temperatura escolhida para os ensaios cinéticos da enzima recombinante.

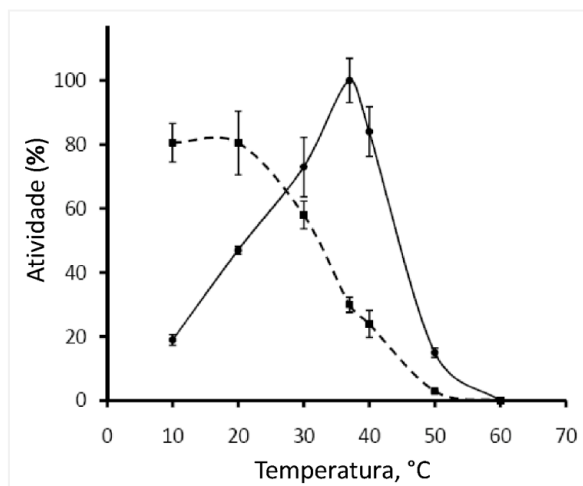


Figura 2.14: Curvas de estabilidade térmica (tracejado) e atividade em função da temperatura (linha contínua) para a *rSl-CathL*. As curvas mostram o comportamento da enzima recombinante com atividade catalítica máxima a 37 °C, e evidenciam sua acentuada instabilidade térmica.

No teste realizado para avaliar a estabilidade térmica da *rSl-CathL*, após o cálculo da atividade residual observou-se uma expressiva perda de atividade à medida que a temperatura de incubação é aumentada. Mesmo incubada em baixas temperaturas, entre 10 - 20 °C, a enzima já apresentou uma perda de atividade residual considerável, na ordem de 19,5%. A 30 °C a atividade residual da *rSl-CathL* foi diminuída para 58% e para 30% a 37 °C.

Esses resultados indicam que a enzima recombinante apresenta uma acentuada instabilidade térmica, similar ao observado para a CAL2 purificada do intestino médio de *T. molitor*, com meia vida de 5 minutos a 40 °C (Cristofolletti et al., 2005). Essa instabilidade da catepsina L digestiva de *S. levis* pode ter sido previamente relatada por Soares-Costa e colaboradores (2011), que purificaram duas frações de enzima nativa do intestino do inseto. A primeira fração de purificação apresentou-se mais instável do que a segunda fração purificada da enzima, o que indica que a primeira fração pode corresponder à versão nativa da *rSl-CathL* e outras variantes identificadas no capítulo 1. Nesse trabalho, apenas a fração mais estável foi caracterizada, o que reforça a importância da caracterização da enzima recombinante, e ainda, pode explicar as diferenças nas características encontradas nessas isoformas da enzima que são discutidas adiante.

### 2.3.6.3 Eficiência catalítica da *Sl-CathL*: ( $k_{cat} / K_m$ )

A enzima *rSl-CathL* apresentou potente ação sobre os substratos Z-Leu-Arg-AMC e Z-Phe-Arg-AMC e não foi capaz de hidrolisar o substrato Z-Arg-Arg-AMC.. O substrato Z-Phe-Arg-AMC é comumente utilizado para ensaiar atividade de enzimas do tipo catepsina L, e a preferência por resíduos não carregados em P2 é característica de catepsinas L (Barret et al., 2004). A eficiência catalítica ( $k_{cat} / K_m$ ) da *rSl-CathL* para a hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-AMC foi de 2,07 mM S<sup>-1</sup> e 37,53 mM S<sup>-1</sup> para Z-Leu-Arg-AMC. As curvas de hidrólise desses substratos são mostradas na figura 2.15.

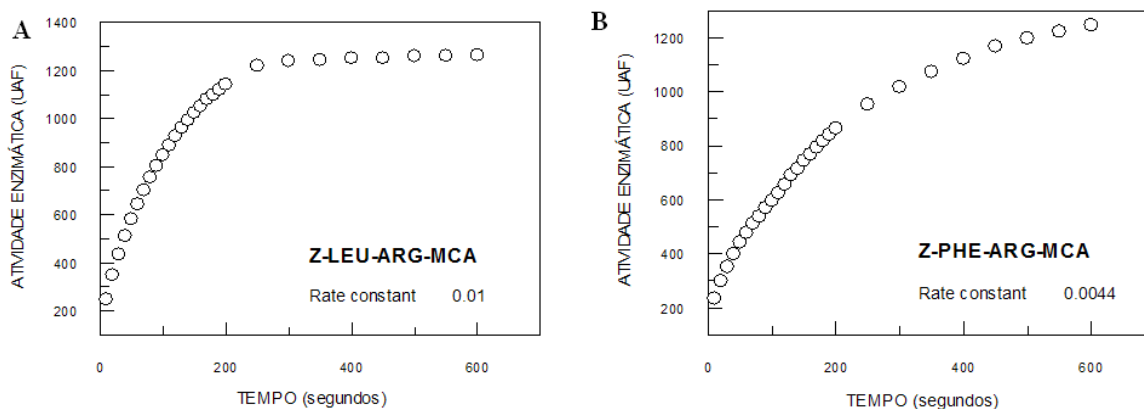


Figura 2.15: Atividade enzimática da enzima *rSI-CathL recombinante*. Os gráficos (A) e (B) representam a hidrólise dos substratos Z-Leu-Arg-AMC e Z-Phe-Arg-AMC, respectivamente, em função do tempo. A eficiência catalítica ( $k_{\text{cat}} / K_m$ ) da *rSI-CathL* para a hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-AMC foi de  $2.07 \text{ mM S}^{-1}$  e para Z-Leu-Arg-AMC foi de  $37.53 \text{ mM S}^{-1}$ . Este resultado indica preferência da *rSI-CathL* para o substrato Z-Leu-Arg-AMC e está de acordo com o comportamento de enzimas do tipo catepsina L.

Este resultado mostra que a enzima *rSI-CathL* apresenta comportamento similar a outras enzimas tipo catepsina L de insetos. Foi realizada uma comparação entre parâmetros cinéticos descritos para catepsinas L de insetos e estes dados são mostrados na tabela 2.2. Esta comparação mostra claramente a preferência das enzimas do tipo catepsina L para o substrato Z-Leu-Arg-AMC, apesar do substrato Z-Phe-Arg-AMC ser um substrato comumente utilizado para enzimas do tipo catepsina L (Barret et al., 2004). Os dados existentes para essas enzimas de insetos confirmam a preferência de certas catepsinas de inseto pelo resíduo de leucina no sítio P2, em detrimento da fenilalanina. Ambos os resíduos de aminoácidos não possuem carga, têm cadeias laterais hidrofóbicas e, portanto, possuem características semelhantes, exceto pelo fato de que a fenilalanina possui um anel aromático na cadeia lateral que confere a esse aminoácido um tamanho ligeiramente maior.

Tabela 2.2: Parâmetros cinéticos descritos para catepsinas L selecionadas de outros insetos: *Tenebrio molitor* e *Diabrotica virgifera* (Coleoptera), *Bombyx mori* (Lepidoptera), *Sarcophaga peregrina* (Diptera).

Organismo	Função	Fonte	Substrato	$k_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}} / k_m$ ( $\text{mM S}^{-1}$ )	Referência
<i>Sphenophorus levis</i>	Digestiva	Recombinante ( <i>rSl-CathL</i> )	Z-Leu-Arg-AMC	1.79	37.5	Este estudo
			Z-Phe-Arg-AMC	-	2	
		Purificada	Z-Leu-Arg-AMC	-	20	Soares-Costa et al., 2011
			Z-Phe-Arg-AMC	-	30	
<i>Tenebrio molitor</i>	Lisossomal	Recombinante ( <i>CAL1a</i> )	Z-Phe-Arg-AMC	50	$2.8 \times 10^{-3}$	Cristofolletti et al., 2005
	Digestiva	Purificada ( <i>CAL2</i> )	Z-Phe-Arg-AMC	8	$6.1 \times 10^{-3}$	
<i>Diabrotica virgifera</i>	Digestiva	Recombinante ( <i>DvRS5</i> )	Z-Phe-Arg-AMC	34	-	Bown et al., 2004
		Recombinante ( <i>DvRS30</i> )	Z-Phe-Arg-AMC	16	-	
		Extrato intestinal	Z-Phe-Arg-AMC	16	-	
<i>Bombyx mori</i>	Fibroinase da glândula de seda	Purificada	Z-Leu-Arg-AMC	40.5	27.7	Watanabe et al., 2004
			Z-Phe-Arg-AMC	231	15.9	
<i>Sarcophaga peregrina</i>	Remodelamento de tecido	Recombinante ( <i>ScathL</i> )	Z-Phe-Arg-AMC	34	-	Philip et al., 2007

Na tabela 2.2 estão indicadas as constantes cinéticas obtidas para a *rSl-CathL*, assim como para a enzima purificada do intestino do inseto (Soares-Costa et al., 2011). Como proposto anteriormente, a existência de variantes da enzima, identificadas no transcriptoma discutidas no capítulo 1, somada ao fato de uma das frações purificadas da enzima nativa, apresentar maior atividade catalítica sobre o substrato Z-Phe-Arg-AMC (Soares-Costa et al., 2011), sugere que uma outra fração da enzima nativa purificada, demonstrada no mesmo trabalho, pode corresponder à *rSl-CathL*, talvez junto a outras isoformas.

Essa hipótese é reforçada pela abundância dessas variantes no inseto, além da redundância de sequências dos peptídeos identificados na análise de espectrometria de massa. As pequenas diferenças entre as constantes cinéticas obtidas para a enzima *rSl-CathL* e a enzima nativa purificada (Soares-Costa et al., 2011) podem ser atribuídas ao fato de que a fração purificada da enzima, aparentemente pode ser composta por um conjunto de isoformas da *Sl-CathL*.

### 2.3.6.4 Determinação da constante cinética $K_m$ para a *rSI-CathL*

A curva de hidrólise do substrato Z-Leu-Arg-AMC pela enzima *rSI-CathL*, a partir da qual o valor de  $K_m$  foi calculado é evidenciada na figura 2.16. O valor obtido para a constante  $K_m$  foi de 1,79  $\mu\text{M}$ , o que indica uma afinidade muito alta da enzima para o substrato utilizado, quando comparada com catepsina L de outros insetos (Tabela 2.2).

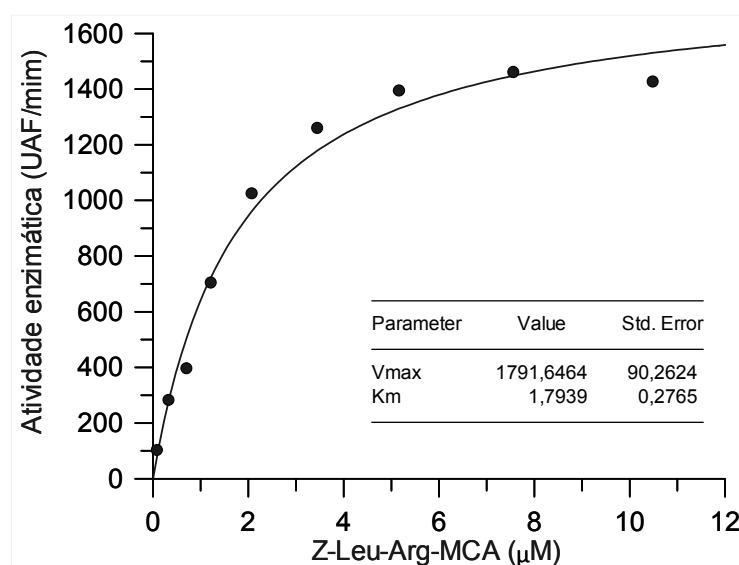


Figura 2.16: Curva de hidrólise do substrato Z-Leu-Arg-AMC adicionado em concentrações crescentes variando entre 0,1 e 10,5  $\mu\text{M}$  (CF) para a determinação do parâmetro cinético  $K_m$  da *rSI-CathL*. O cálculo da constante ( $K_m$ ) foi realizado por regressão não linear utilizando o programa GraFit (Leatherbarrow, 1992) e o valor determinado para a constante foi 1,79  $\mu\text{M}$ .

### 2.3.7 Ensaios de inibição de atividade da *rSI-CathL* utilizando cistatinas recombinantes de cana-de-açúcar

Nos testes de inibição realizados com as cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar, CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 foi observado um perfil de inibição para a *rSI-CathL* semelhante aquele identificado para as catepsinas L humanas (Gianotti et al., 2008). A tabela da figura 2.17 indica os valores de  $K_i$  estimados para os inibidores, sendo a CaneCPI-1 ( $K_i = 2,38 \text{ nM}$ ) o inibidor menos eficiente e a CaneCPI-4 ( $K_i = 0,196 \text{ nM}$ ) o mais potente contra a *rSI-CathL*. Nessa figura são mostrados os gráficos de inibição gradual correspondente a cada um dos inibidores ensaiados, a partir dos quais os valores da constante  $K_i$  foram calculados.

Como esperado, o inibidor sintético E-64, apresentou uma atividade inibitória reduzida com uma constante de inibição de ( $K_{i\text{ app}} = 0,289 \mu\text{M}$ ), quando comparado com os quatro inibidores de cana-de-açúcar. Isso pode ser explicado pelas diferenças no mecanismo de ação e principalmente pelo fato de que, sendo um inibidor generalista de cisteíno peptidases da família da papaína (Barrett et al., 1982), espera-se que sua especificidade para cisteíno peptidases digestivas do inseto seja muito menor quando comparada com proteínas de defesa da cana-de-açúcar, as canacistatinas, que provavelmente evoluíram em função dessa classe de peptidases digestivas (Lawrence e Koundal, 2002; Martinez e Dias, 2008).

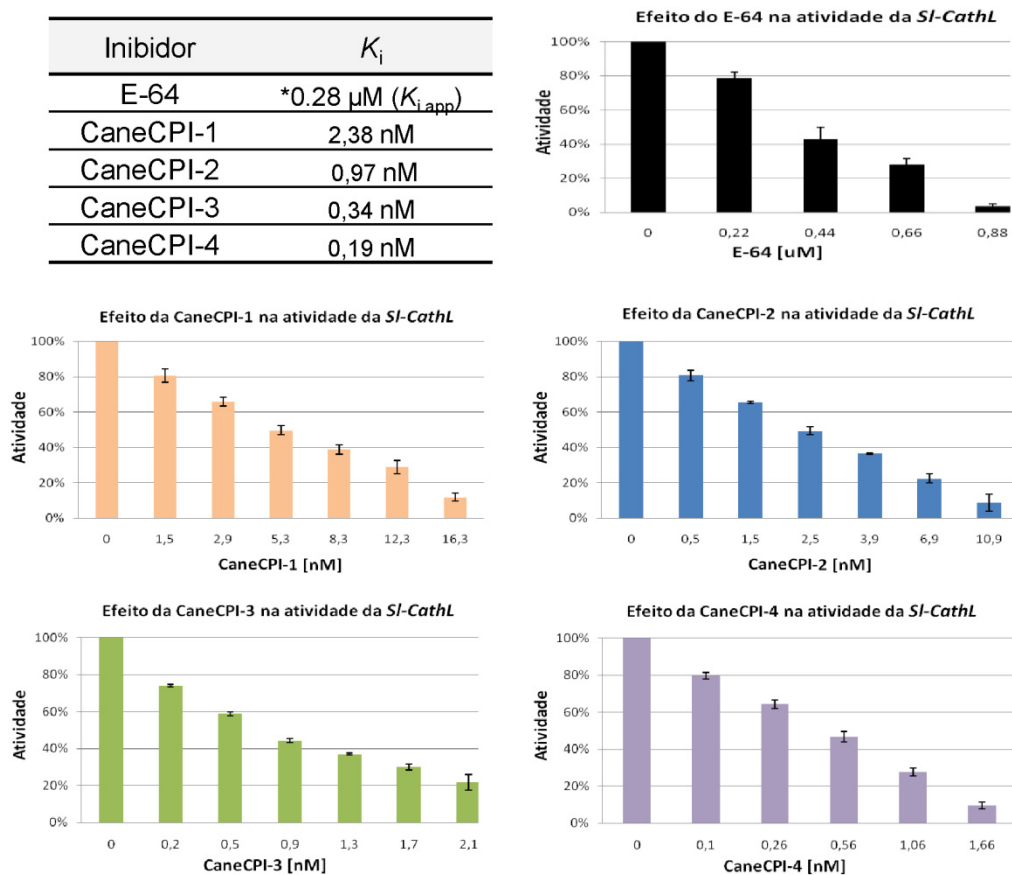


Figura 2.17: Gráficos das atividades inibitórias das canacistatinas sobre a *rSI-CathL*. A tabela da figura indica os valores de  $K_i$  estimados para os inibidores. Os gráficos representam a curva de inibição de cada inibidor, obtida pelo cálculo da atividade residual da *rSI-CathL* à medida que o inibidor foi adicionado. Dentre as canacistatinas, a CaneCPI-1 ( $K_i = 3 \mu\text{M}$ ) foi o inibidor menos eficiente e a CaneCPI-4 ( $K_i = 0,196 \mu\text{M}$ ) o melhor inibidor contra a *rSI-CathL*. Note, no canto inferior direito dos gráficos, a escala e ordem de diluição dos inibidores utilizados para anular a atividade da *rSI-CathL*.

Como relatado anteriormente, uma fração correspondente a uma ou mais isoformas da *SI-CathL* foi previamente purificada do intestino do inseto e

caracterizada (Soares-Costa et al., 2011). As diferenças obtidas para as constantes catalíticas, discutidas na seção 2.3.7.3 e exibidas na tabela 2.2, indicam que a enzima nativa purificada e a recombinante constituem diferentes isoformas. Isso é reforçado pela abundância dessas variantes identificadas no transcriptoma (Capítulo 1). A enzima purificada também foi testada com os mesmos inibidores cistatinicos da cana-de-açúcar (Dellamano, 2009), para os quais foram calculadas a constante  $K_{iapp}$ , as constantes de inibição absolutas foram deduzidas e são comparadas, na tabela 2.3, com aquelas obtidas utilizando os mesmos inibidores contra enzima recombinante, apresentadas neste trabalho.

Tabela 2.3: Comparação entre as constantes de inibição obtidas para a *rSl-CathL* e para a fração de enzima purificada do intestino (Dellamano, 2009; Soares-Costa et al., 2011). Os resultados evidenciam a potência do inibidor CaneCPI-4 contra ambas enzimas.

	Dellamano, 2009 Catepsina L purificada ( $K_i$ )	Este estudo <i>rSl-CathL</i> ( $K_i$ )
E-64 ( $K_{iapp}$ )	34,95 nM ( $K_{iapp}$ )	*0.28 $\mu$ M ( $K_{iapp}$ )
CaneCPI-1	5,72 nM	2,38 nM
CaneCPI-2	3,49 nM	0,97 nM
CaneCPI-3	5,53 nM	0,34 nM
CaneCPI-4	<b>0,23 nM</b>	<b>0,19 nM</b>
Orizacistatina 1	4,56 nM	-

Dentre os inibidores testados, o inibidor CaneCPI-4 foi o mais potente, tanto para a *rSl-CathL* quanto para a enzima purificada (Dellamano, 2009), com valores obtidos para a constante  $K_i = 0,19 \mu$ M e  $0,23 \mu$ M respectivamente. Esse resultado confirma a maior especificidade do inibidor CaneCPI-4 para essas enzimas que, provavelmente, correspondem a distintas variantes da *Sl-CathL* no intestino do inseto. A potência de inibição da CaneCPI-4 ( $K_i = 0,19 \mu$ M) é evidenciada pela comparação com o inibidor cistatinico OC-1 contra a enzima purificada ( $K_i = 4,56 \mu$ M) (Dellamano, 2009), o qual já se mostrou eficiente contra peptidases digestivas de diversos insetos (Leplé et al., 1995; Bouchard et al., 2003; Azzouz et al., 2005; Kiggundu et al., 2010). As diferenças obtidas nas eficácias dos inibidores CaneCPI-2 e CaneCPI-3 para essas variantes da enzima, purificada e recombinante, reforçam que a utilização sinérgica de mais de um inibidor pode ser vantajosa no sentido de bloquear eficientemente outras variantes ou até mesmo diferentes classes de enzimas, dada a diversidade de enzimas digestivas do inseto e a provável resposta adaptativa relacionada à mudança no perfil de expressão de enzimas digestivas.

É conhecido que diversos insetos respondem à adição de inibidores na dieta por meio de uma série de mudanças adaptativas como, por exemplo, a super produção de peptidases insensíveis ao inibidor ou mesmo, por meio de uma simples estimulação da atividade peptidásica, capaz de compensar a ação do inibidor (Broadway e Duffey, 1986; Oppert et al., 2005; Amirhusin et al., 2007). Estes processos podem dificultar as estratégias de proteção contra insetos que envolvem a expressão de inibidores de peptidases em plantas (Jongsma et al., 1995; Zhu-Salzman et al., 2003; Gruden et al., 2004).

No caso do besouro *Tribolium castaneum*, foi relatada uma resposta adaptativa relacionada à mudança do perfil de expressão de peptidases. Quando desafiadas com inibidores de cisteíno peptidases, as larvas do inseto foram capazes de remodelar rapidamente o perfil de expressão de peptidases, iniciando uma super produção de serino peptidases, insensíveis ao inibidor (Oppert et al., 2005). Mudanças similares foram detectadas no perfil de expressão de variantes de serino peptidases digestivas da lagarta de *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera), quando submetida a uma dieta contendo inibidores de proteases oriundos da soja (Paulillo et al., 2000). Esses estudos evidenciam a adaptação do arsenal digestivo dos insetos em resposta à adição de inibidores e reforçam a importância e aplicabilidade da utilização de inibidores sinérgicos, como discutido por Eigenheer e colaboradores (2003) e também por Oppert e colaboradores (2005).

Em nosso laboratório foram desenvolvidas canas-de-açúcar transgênicas super produzindo o inibidor CaneCPI-1 (Ribeiro et al., 2008). Experimentos recentes mostraram que as plantas desenvolvidas são mais resistentes ao ataque desse inseto (Resultados ainda não publicados, artigo em preparação). No presente trabalho, foi mostrado que a CaneCPI-4 é o inibidor mais eficiente contra a enzima recombinante *in vitro*. Além disso, esse inibidor já se mostrou eficiente para a inibição de catepsina B humana (Gianotti et al, 2008). Considerando a maior eficácia da CaneCPI-4 dentre os inibidores testados e, também, que as catepsinas B constituem a segunda classe de peptidases mais abundantes identificadas na biblioteca (capítulo 1), sugere-se que a construção de uma linhagem de cana-de-açúcar transgênica super produzindo este inibidor endógeno poderia reduzir eficientemente os danos causados por este inseto.



### 2.3.8 Imunolocalização da *SI-CathL* no intestino das larvas

#### 2.3.8.1 Titulação e especificidade dos anticorpos

Os anticorpos policlonais produzidos em camundongos para a catepsina L foram eficientes contra a proteína recombinante até a diluição 1:40000. Na figura 2.18B é mostrada uma análise de *Western blotting* realizada com o anticorpo anti-*rSI-CathL* utilizado na diluição 1:10000. O anticorpo mostrou-se altamente específico, reconhecendo apenas a enzima recombinante no meio de cultura e eficiente também para a detecção da enzima nativa no extrato de proteínas do tubo intestinal das larvas *S. levis*, mostrada na canaleta 5. Este resultado indica que a enzima é de fato digestiva e está presente no conteúdo intestinal da larva do inseto. A especificidade do anticorpo detectada para a enzima nativa possibilitou sua utilização em ensaios histológicos, para verificar a expressão desta enzima ao longo do intestino médio.

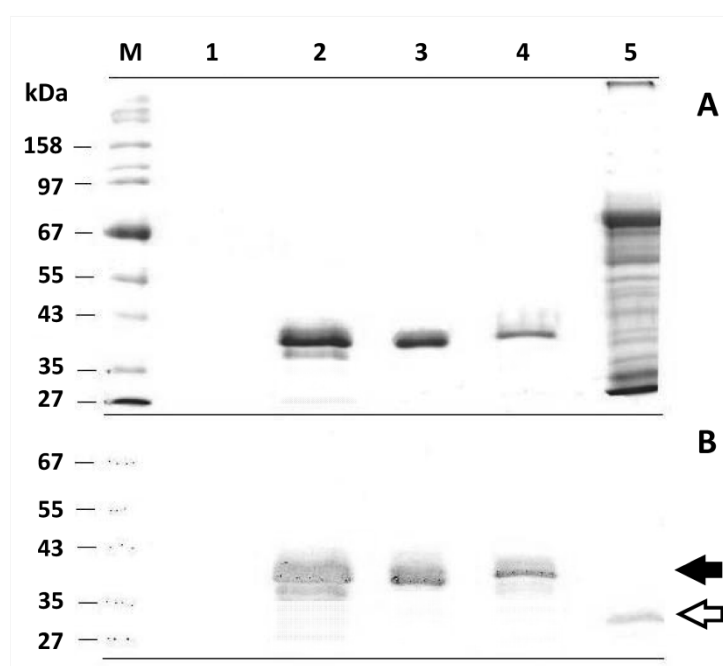


Figura 2.18: Imunodeteccção da *rSI-CathL* e da enzima nativa do inseto (A): Proteínas separadas em SDS-PAGE 15% carregadas em quantidades similares utilizadas na imunodeteccção. (B): Proteínas transferidas para membrana de PVDF incubadas com anticorpos policlonais anti-*rSI-CathL* na diluição de 1:10.000. M: marcador de massa molecular; 1: controle negativo da expressão, 144 h após a adição de metanol (*P. pastoris* transformada com o plasmídeo sem inserto); 2: sobrenadante da indução da *rSI-CathL* 144 h após a adição de metanol ; 3: fração de enzima purificada em pH 8,0 (50mM de imidazol); 4: aproximadamente 12 µg da mesma fração purificada, após diálise em tampão fosfato de sódio, pH 8,0; 5: fração protéica extraída do conteúdo do tubo intestinal de *S. levis*. A seta preta indica a *rSI-CathL* como pró-enzima, enquanto a seta branca mostra a enzima nativa com a massa molecular idêntica à proteína purificada (Soares-Costa et al, 2011), com aproximadamente 34 kDa, reconhecida pelo anticorpo criado contra a proteína recombinante.

### 2.3.8.2 Caracterização morfológica do intestino das larvas de *S. levis*

O intestino das larvas desse inseto foi dissecado para caracterização morfológica. Foi observado que o tubo intestinal é constituído de um intestino anterior (IA) muito curto, um longo intestino médio (IM) dilatado na região anterior, enquanto o intestino posterior (IP) tem tamanho médio e diâmetro pouco reduzido quando comparado com o intestino médio (Figura 2.19).

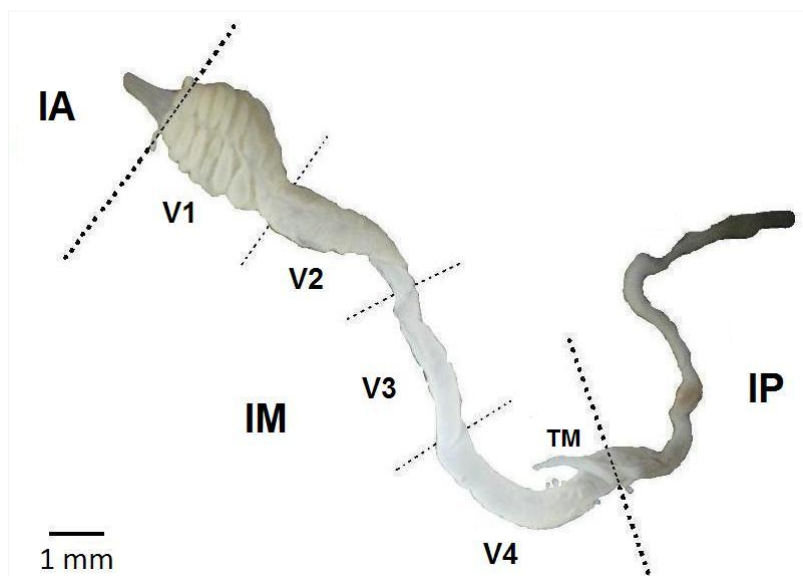


Figura 2.19: Visão da morfologia do intestino de *S. levis*. Intestino anterior (IA), intestino médio (IM), intestino posterior (IP) e túbulos de Malpighi (TM). O intestino médio é mais dilatado na região anterior e foi subdividido em quatro ventrículos (V1, V2, V3, V4) de igual comprimento.

O intestino médio tem extensão média de  $1,58 \pm 0,08$  cm, com diâmetro aproximado de 0,2 cm na região anterior, que é reduzido para 0,06 cm na porção mais posterior. O intestino posterior se estende por aproximadamente  $0,78 \pm 0,09$  cm e seu diâmetro é de  $0,05 \pm 0,005$  cm. A extensão média do intestino anterior é de 0,11 cm. O intestino médio constitui um tubo contínuo, sem compartimentarização, esse ventrículo nesse estudo foi dividido em 4 regiões (V1-V4) para análise mais detalhada do perfil de produção da enzima catepsina L ao longo de sua extensão.

### 2.3.8.3 Imunolocalização da *Sl-CathL* por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Considerando que, de uma maneira geral, o intestino médio dos insetos é a principal região responsável pela produção de enzimas digestivas (Terra et al., 1985; Terra e Ferreira, 1994), para a imunolocalização da *Sl-CathL* foram preparados

cortes dos quarto ventrículos V1, V2, V3 e V4. Essa etapa do trabalho foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro do departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Na figura 2.20 pode ser observado que a proteína nativa foi eficientemente reconhecida pelo anticorpo nos cortes histológicos preparados a partir do epitélio intestinal. Nessa imagem é verificada a síntese da *SI-CathL* nas células do epitélio e a formação de vesículas de secreção (V).

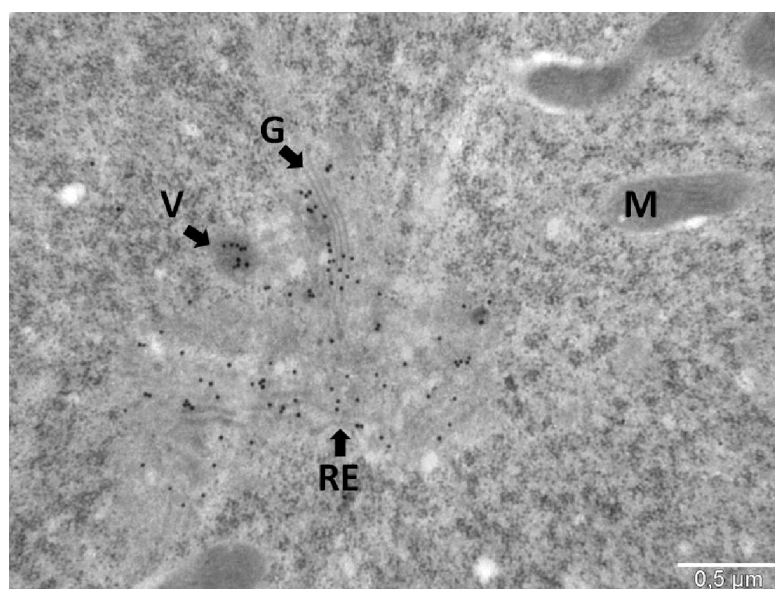


Figura 2.20: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão indicando a produção da *SI-CathL* nativa em uma célula epitelial do intestino médio de uma larva de *S. levis*. As partículas de ouro complexadas ao anticorpo secundário (*anti-mouse IgG*), possibilitam a visualização de pontuações escuras que correspondem à catepsina L nativa. A produção da enzima nativa ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RE) com poliribossomos associados. As enzimas recém sintetizadas são direcionadas para o complexo de golgi (G), onde ocorre a formação de vesículas de secreção (V) contendo a enzima. Essas vesículas são exportadas até a base do epitélio, onde se fundem, liberando as enzimas digestivas na luz do intestino. M: mitocôndria.

Nas análises de imunolocalização ao longo do intestino (Figura 2.21) foi verificada a ocorrência da *SI-CathL* em vesículas de secreção desde o primeiro ventrículo (V1) até o fim do intestino médio (V4). A produção da *SI-CathL* em toda a extensão do intestino médio nas larvas de *S. levis* pode constituir uma sinapomorfia da espécie, considerando que segundo Terra e Cristofolletti (1996), a atuação das cisteíno peptidases em coleópteros ocorre fundamentalmente nos primeiros dois terços do intestino médio, devido à variação de pH ao longo do intestino que pode ser muito alcalino na região posterior.

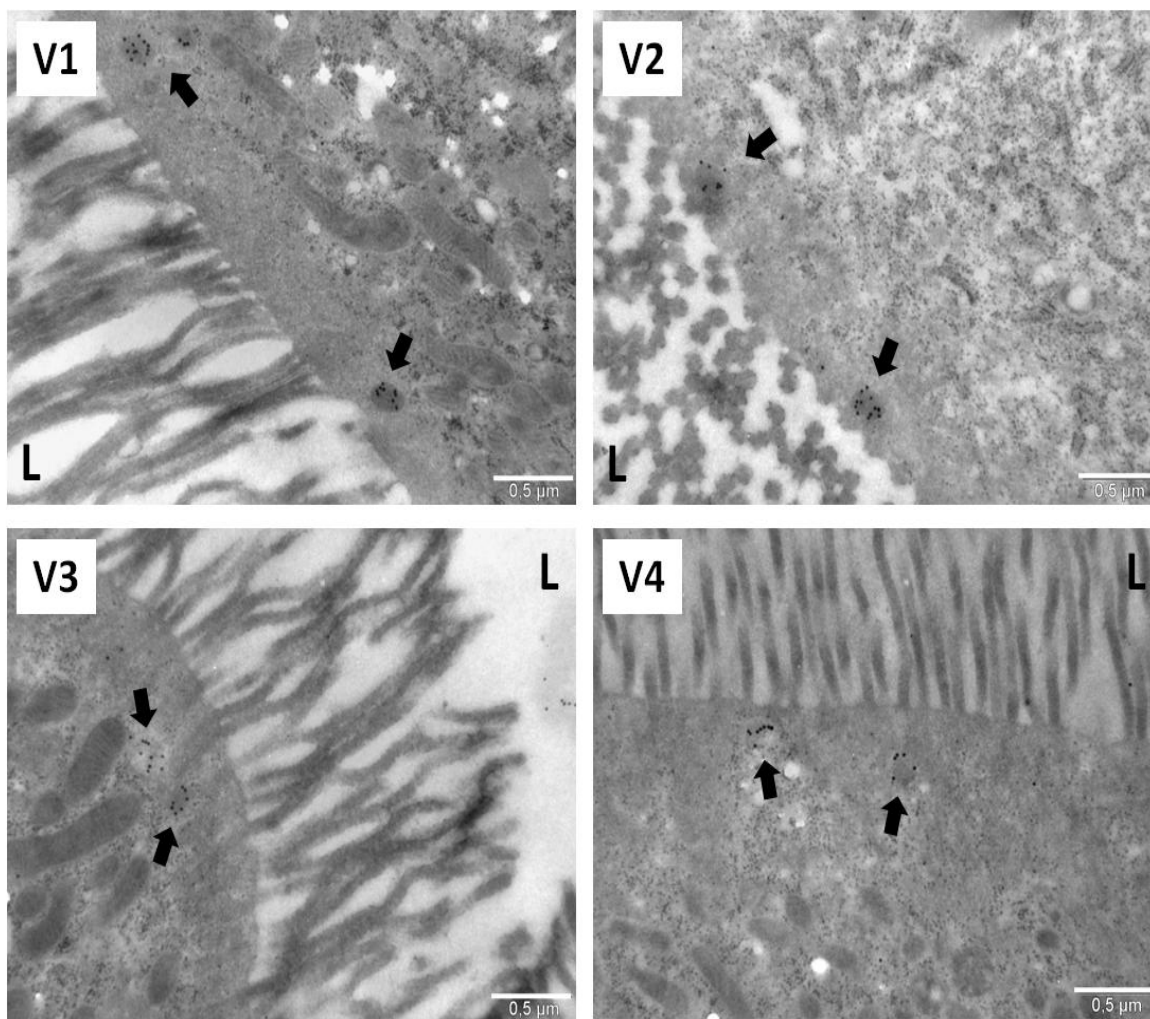


Figura 2.21: Imunolocalização da *SI-CathL* no intestino médio da larva de *S. levis*. As imagens da MET dos cortes dos quatro ventrículos indicam que a *SI-CathL* é produzida em toda extensão do intestino médio, desde V1 até V4. As setas escuras indicam as vesículas de secreção marcadas com o anticorpo produzido em camundongos contra a proteína recombinante *SI-CathL*.

Apesar destes resultados apontarem a produção da enzima ao longo de todo o intestino médio (V1-V4), esse não é um método quantitativo, e dados anteriores da atividade de cisteíno peptidases no intestino médio (Soares-Costa et al., 2011) sugerem que a secreção deve ocorrer principalmente nas porções iniciais do intestino (V1-V2). Esses resultados confirmam o importante papel dessa enzima na digestão nas larvas de *S. levis*, e evidenciam a possibilidade de utilizá-la como alvo para a inibição *in vivo* uma vez que ela pode ter sua atividade bloqueada diretamente pela ingestão de inibidores presentes na dieta do inseto.

### 2.3.9 Expressão relativa da *Sl-CathL* ao longo do desenvolvimento de *S. levis*

Os experimentos de PCR quantitativo em tempo real foram realizados para aumentar o conhecimento da função dessa enzima na fisiologia do inseto pela análise do perfil de expressão durante seu ciclo de vida. O gráfico da figura 2.22A evidencia o padrão de expressão gênica da *Sl-CathL* ao longo do desenvolvimento do inseto. O menor índice de expressão para a *Sl-CathL* foi detectado no estágio de pupa, que foi utilizado como fase calibradora, com expressão relativa igual a uma vez (1 x). Nos ovos também foi detectada uma expressão baixa da enzima (1,29 x).

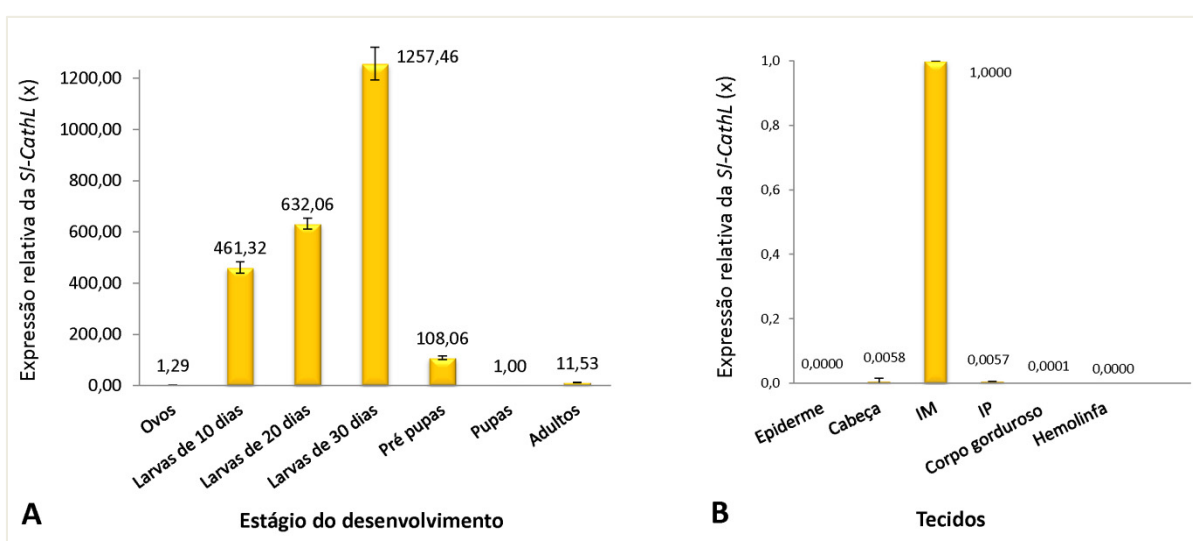


Figura 2.22: Análises da expressão relativa da catepsina L de *S. levis* por qRT-PCR. (A) Expressão relativa ao longo do desenvolvimento, em condições de dieta artificial, indicando que a *Sl-CathL* é principalmente produzida nos estágios larvais de desenvolvimento quando constitui a principal enzima digestiva. As larvas de 30 dias apresentaram o maior valor de expressão relativa da enzima, 1257 vezes mais expressa do que nas pupas. Nos ovos há uma expressão basal (1,29 x). A baixa expressão das enzimas no adulto (11,53 x) indica que o sistema digestivo dos adultos é diferente. (B) Expressão tecido-específica da catepsina L, indica a síntese da enzima fundamentalmente no intestino médio e comprova o seu papel como enzima digestiva.

Dentre as fases do ciclo biológico de *S. levis* estudadas, as larvas com 30 dias de vida apresentam a maior taxa de produção de RNAm que codificam para *Sl-CathL*, o que está de acordo com a necessidade de incorporação de biomassa em uma dieta pobre em aminoácidos, no período que antecede ao empupamento. Nas pré-pupas já são notadas mudanças morfológicas e o cessar da movimentação reflete a impossibilidade de alimentação que é confirmada pela diminuição drástica em mais de 10 vezes da produção da principal enzima digestiva, que atinge o menor nível de expressão no estágio posterior, pupa.

Esta enzima também é produzida por insetos adultos, porém, em taxas muito menos abundantes (11,53 x), o que indica uma diferença no perfil digestivo dos adultos, provavelmente em decorrência do hábito alimentar distinto nessa fase de desenvolvimento de *S. levis*. Enquanto as larvas usam a mandíbula para cavar galerias na base da cana-de-açúcar, os adultos utilizam o rostro para sugar a seiva exsudada dos colmos. A expressão reduzida da enzima nessa fase aponta que a inibição desta enzima nos adultos pode não ser tão severa quanto nas larvas, quando as necessidades relacionadas à digestão de proteínas e absorção de aminoácidos são maiores.

Nos experimentos para avaliar a expressão tecido-específica da *Sl-CathL*, a enzima foi detectada fundamentalmente no intestino médio (1x), correspondendo a aproximadamente 98,9 % de todos os transcritos identificados nessa análise (Figura 2.22B). Esses dados reforçam o resultado obtido na imunolocalização, demonstrando a transcrição desta enzima no intestino do inseto, como uma verdadeira enzima digestiva. Baixos índices de transcrição da enzima foram detectados no intestino posterior (0,0057 x) e cabeça (0,0058 x), como esperado, uma vez que esses tecidos são conectados fisicamente ao intestino médio. Transcritos para a enzima não foram detectados em quantidades significativas no corpo gorduroso hemolinfa ou epiderme, o que nos leva a descartar a possibilidade de atuação lisossomal da enzima.

### CAPÍTULO 3: RNA DE INTERFERÊNCIA APLICADO AO CONTROLE DE *Sphenophorus levis*

#### Resumo

Neste estudo, foram analisados os efeitos da injeção de dsRNAs dos genes V-ATPase E e serpina em larvas dos insetos *Sphenophorus levis* e *Tribolium castaneum*. Vinte e quatro horas após a aplicação, a redução dos níveis dos transcritos para estes dois genes foi detectada por RT-PCR, revelando a ocorrência do silenciamento gênico induzido pelas injeções. Tanto para *T. castaneum* quanto para *S. levis*, o silenciamento dos genes ortólogos revelou fenótipos muito similares. As larvas de *T. castaneum* e *S. levis* injetadas com dsRNA para V-ATPase E morreram dentro de duas e três semanas, respectivamente, revelando a severidade do silenciamento. Larvas de *T. castaneum* injetadas com dsRNA da V-ATPase E ortóloga de *S. levis*, que apresenta 77,84% de similaridade de sequência, também tiveram o silenciamento detectado e exibiram o mesmo fenótipo letal, o que reforça a necessidade de genes específicos para evitar o efeito cruzado em espécies não alvo. O silenciamento da serpina 6 causou a morte de todos os adultos de *T. castaneum* após a fase pupal, alguns deles farados e malformados. Para *S. levis*, o silenciamento da serpina1 causou atraso no desenvolvimento dos insetos, diminuição do ganho de peso das larvas e morte causada pelo aprisionamento na fase pupal ou como adultos farados. Esses resultados, também inéditos para a serpina 6 de *T. castaneum*, indicam a atuação destas serpinas em processos além do sistema imune, provavelmente relacionados ao desenvolvimento e abre novas perspectivas para o entendimento da função biológica desses inibidores de serino peptidases em coleópteros. Neste trabalho, foi relatada pela primeira vez o silenciamento gênico em *S. levis* via RNAi, por meio da injeção de dsRNA na hemolinfa indicando a existência de um mecanismo natural de internalização de dsRNA, clivagem em siRNAs e ativação da maquinaria de silenciamento gênico. Além disso, são descritos dois genes que apresentam fenótipos letais para o inseto via RNAi, portanto constituindo dois novos alvos no combate a essa praga. Ensaios de alimentação devem ser realizados para checar a sensibilidade de *S. levis* ao RNAi via oral e ocorrência da resposta sistêmica, o que abre o último horizonte biotecnológico no combate a este inseto: plantas transgênicas de cana-de-açúcar produzindo grampos de RNA.

**Palavras chave:** RNAi, silenciamento gênico, serpina, V-ATPase E.

### 3.1 Introdução

O RNA de interferência, ou RNAi, é um processo celular conservado em muitos eucariotos pelo qual um RNAm específico é degradado por um complexo, contendo uma fita de RNA complementar àquele do RNAm alvo, que resulta na inibição específica da expressão gênica. Em muitos insetos, a resposta ao RNAi pode ser sistêmica, mediada por um mecanismo relativamente conservado de internalização celular e amplificação de sinal do RNAi por todo o organismo, permitindo o silenciamento gênico via alimentação com dsRNA

Esse mecanismo de amplificação do sinal mediado pelo RNAi, relacionado à resposta sistêmica, apresenta uma relativa conservação entre muitos insetos e já se mostrou eficiente para o controle de coleópteros em plantas transgênicas produzindo grampos de RNA. A partir dessa nova abordagem, o intestino dos insetos, que sempre foi compreendido como uma interface direta com o ambiente, atua como um canal de acesso a todo o metabolismo e funciona como um gatilho de regulação gênica mediada pela degradação de transcritos específicos induzida por meio da alimentação. Sequências de genes únicos, específicos para cada espécie, podem garantir a especificidade única do método, que ainda permite a exploração de novos alvos para combate a insetos-praga.

#### 3.1.1 Mecanismo de ação do RNAi

A exposição de células eucarióticas a moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) pode disparar a regulação negativa da expressão gênica especificamente, via degradação do RNA mensageiro (RNAm) complementar a uma das fitas do dsRNA administrado (Fire et al., 1998). Esse processo de silenciamento gênico, conhecido como RNA de interferência (RNAi) é mediado pela endonuclease RNase III ou Dicer, responsável pela clivagem citoplasmática dos dsRNA em fragmentos de 21 a 23 pb. Esses pequenos fragmentos de RNA dupla fita, os siRNAs (small interfering RNAs) são incorporados em complexos de proteínas chamados RISCs (RNA-induced silencing complex), que são responsáveis pela separação das fitas e identificação de sequências complementares de RNAs endógenos que são degradados ou impedidos fisicamente da transcrição (Figura 3.1) (Mello e Conte, 2004). O complexo RISC é formado pela união de uma proteína multi domínios chamada de argonauta,



que possui um domínio tipo RNase H, responsável pela degradação do RNAm alvo (Martinez et al., 2002).

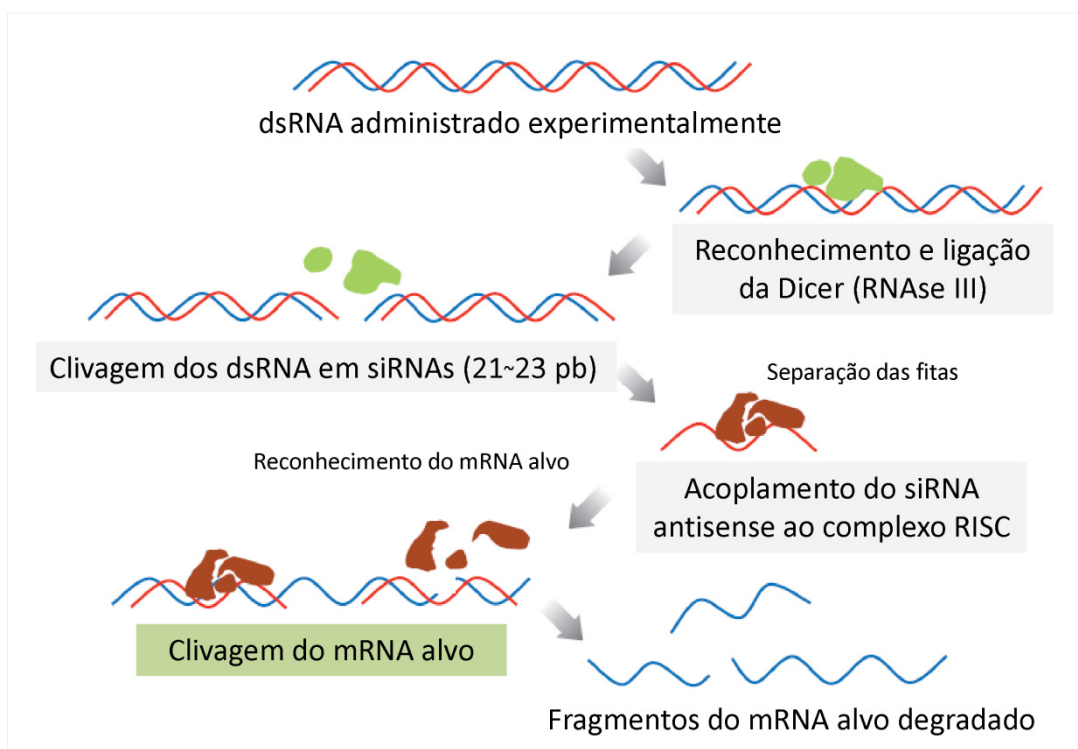


Figura 3.1: Mecanismo de ativação da maquinaria de silenciamento gênico via administração de dsRNA (Traduzido de Bellés, 2010). Explica os passos envolvidos na degradação do RNAm alvo na presença do dsRNA correspondente que induz o silenciamento gênico.

Esse mecanismo é responsável pela proteção do genoma contra elementos genéticos móveis provenientes de vírus e provavelmente evoluiu passando também a desempenhar a função de regulação gênica nos próprios organismos (Mello e Conte, 2004). Grampos formados por pequenas moléculas de RNA também processados pela Dicer, os miRNAs (Micro RNAs) são naturalmente produzidos pela maioria dos organismos, inclusive humanos, atuando como reguladores da expressão gênica. Em animais, os miRNAs possuem complementaridade preferencialmente com as regiões não transcritas dos genes (UTR 3'), o que garante que um único miRNA possa atuar na regulação de um grupo gênico com essa região conservada. Na maioria das vezes, algumas bases não pareadas entre o miRNA e o RNAm alvo implica no recrutamento do complexo RISC que impede a tradução fisicamente, mas o RNAm alvo não é degradado (Ambros, 2004).

### 3.1.2 RNA de interferência em insetos

O termo RNA de interferência foi proposto em 1998 por Fire e colaboradores, e desde a descoberta desse sistema, o RNAi vem sendo amplamente empregado como uma ferramenta genética. A produção de dsRNA correspondente à sequência do gene endógeno e a aplicação artificial no organismo por meio de injeções na cavidade corpórea, ou mesmo administração na alimentação, possibilita o silenciamento gênico específico. A análise dos fenótipos associados à perda de função do gene possibilita a dedução da função gênica, uma vez confirmada a queda da produção do RNAm específico. Essa tecnologia é perfeitamente aplicável a organismos não modelos, para os quais não foram desenvolvidos métodos específicos de transformação genética para o estudo de genômica funcional (Bellés, 2010).

Inicialmente descrito no nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998), é agora evidente que a maquinaria de RNAi é evolucionariamente conservada entre a grande maioria das classes eucarióticas. Entretanto, a potência e eficácia do silenciamento gênico é extremamente variável, mesmo entre espécies próximas, o que reflete a variação nos mecanismos de tomada e propagação do sinal de RNAi. A concentração mínima de dsRNA necessária para causar o silenciamento gênico difere entre os organismos (Huvenne e Smagghe, 2010), possivelmente devido à variação na sensibilidade dos componentes do sistema de interferência ou na eficiência dos sistemas de degradação extracelular para dsRNA (Bellés, 2010). O nível de transcrição do gene alvo, o *turnover* e a estabilidade do RNAm também são fatores que determinam a severidade do fenótipo gerado pelo silenciamento induzido (Rosso et al., 2009).

O fator que torna o RNAi uma ferramenta muito poderosa, inclusive aplicável ao controle de insetos, é que em plantas e em várias espécies animais o silenciamento gênico é transmitido sistemicamente, ou seja, o sinal é amplificado desde as células tratadas com dsRNA por todo o organismo. Contudo, em alguns organismos, a resposta é localizada apenas nas células expostas ao dsRNA devido à ausência de transportadores de dsRNA. Em *C. elegans*, o efeito do RNA de interferência pode ser gerado pela simples imersão dos vermes em solução contendo dsRNA, ou mesmo, pela alimentação administrando bactérias que expressam dsRNA (Fire et al., 1998).

No entanto, para os insetos de uma maneira geral, o método mais eficiente para o disparo do sistema de RNA de interferência se dá pela micro-injeção de dsRNA na cavidade corpórea (Bucher et al., 2002; Tomoyasu et al., 2008). No coleóptero *Tribolium castaneum*, tanto os ovos, larvas e adultos são sensíveis ao RNAi, permitindo estudos de expressão gênica durante todas as fases de desenvolvimento do inseto. Danos aos embriões podem ser evitados pela utilização de um método alternativo, o RNAi parental, que consiste na injeção de dsRNA na hemolinfa de fêmeas no estágio pupal, disparando o sistema de RNAi que é transmitido ativo para a próxima geração (Bucher et al., 2002).

Em *Drosophila melanogaster*, um dos organismos modelo mais bem estudados, grampos de RNAi são empregados para a super-expressão de dsRNA em tecidos e estágios específicos (Bellés, 2010). Isso porque esse inseto não apresenta uma resposta robusta de RNA de interferência mediado pela injeção de dsRNA. A disseminação dos efeitos de RNAi em *Drosophila* é diminuída nos estágios larvais e o RNA parental não foi efetivo para vários dos genes testados (Tomoyasu et al., 2008). Um método eficaz para absorção de RNAi na dieta desse inseto foi desenvolvido por Whyard e colaboradores (2009), no qual foram detectados os efeitos do silenciamento gênico via alimentação utilizando dsRNA de 29 a 40 pb encapsulados em lipossomos .

Em contraste, a praga dos grãos de cereais, *Tribolium castaneum*, além de ser o primeiro coleóptero que teve o genoma completo sequenciado (Richards et al., 2008), bem como o segundo inseto mais bem estudado, desenvolve uma forte resposta sistêmica à injeção de dsRNA. A discrepância entre a eficiência do silenciamento entre *Tribolium* e *Drosophila* é atribuída às diferenças na maquinaria protéica do sistema de silenciamento. As proteínas argonauta e proteína ligadora de dsRNA (dsRBM) são muito mais abundantes no genoma de *Tribolium*, e também acredita-se nas diferenças entre os domínios das isoformas da enzima Dicer entre esses dois insetos (Tomoyasu et al., 2008).

A administração de dsRNAs da V-ATPase E via alimentação se mostrou eficiente para o silenciamento gênico específico em insetos de diferentes ordens: *T. castaneum* (Coleoptera), *Manduca sexta* (Lepidoptera), *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera) e *D. melanogaster* (Diptera) (Whyard et al., 2009). Nos insetos, as moléculas de dsRNA administradas via alimentação são absorvidas no intestino

médio (IM), onde não ocorre o revestimento de quitina existente no intestino anterior (IA) e posterior (IP) (Figura 3.2A). No intestino médio, a absorção do dsRNA pelas células do epitélio é provavelmente mediada pelas proteínas transmembranas SID 1 e 2, assim como por mecanismos de endocitose (Huvenne e Smaghe, 2010) (Figura 3.2B).

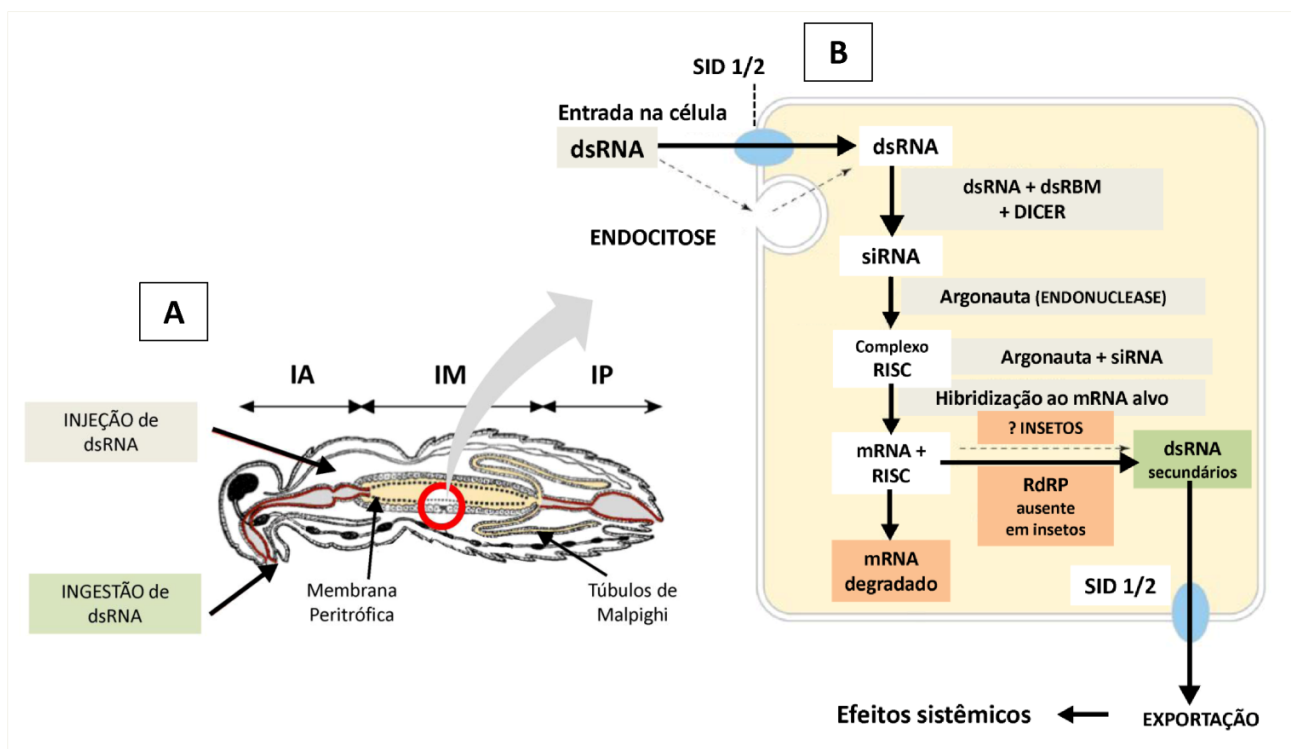


Figura 3.2. Representação dos mecanismos de disparo da maquinaria de silenciamento gênico em insetos, via injeção ou ingestão de dsRNA. A: as moléculas de dsRNA administradas via alimentação são absorvidas no intestino médio (IM), a única região do intestino não revestida pela cutícula de quitina indicada em marrom no intestino anterior (IA) e posterior (IP) (adaptado de Gatehouse e Price, 2011). B: a absorção do dsRNA nas células do epitélio do intestino é mediada pelas proteínas transmembranas SID 1 e 2, assim como por mecanismos de endocitose. Os mecanismos de amplificação do dsRNA intracelular ainda não são conhecidos em insetos, devido à ausência de uma proteína homóloga da RNA dependente RNA polimerase (RdRP), responsável pela amplificação do sinal dos dsRNA que dispara a resposta sistêmica em micro-organismos, plantas e nemátodos (adaptado de Price e Gatehouse, 2008).

Em plantas, micro-organismos e no nemátodo *C. elegans*, poucos nanogramas de dsRNA são suficientes para o disparo de uma resposta sistêmica e persistente do RNA de interferência. Esse efeito é mediado pela ação da enzima RNA dependente RNA polimerase (RdRP), a qual é capaz de interagir com o complexo RISC e sintetizar novas moléculas de dsRNA a partir do RNAm degradado utilizando os siRNAs hibridizados como *primers* (Lipardi et al., 2001; Mello e Conte, 2004). No entanto, em insetos, os mecanismos de amplificação do dsRNA intracelular ainda não são conhecidos devido à ausência de uma proteína homóloga

da RdRP responsável pela amplificação do sinal. No besouro *T. castaneum* ocorre uma forte resposta sistêmica de silenciamento gênico até mesmo via alimentação (Whyard et al., 2009), porém as proteínas relacionadas à amplificação do sinal de RNAi ainda não foram identificadas mesmo com o genoma completo sequenciado (Gatehouse e Price, 2011) (Figura 3.2B).

Mesmo que os mecanismos de transmissão do sinal do RNA de interferência ainda não tenham sido completamente elucidados, a eficácia do RNAi sistêmico em *T. castaneum* tornou esse organismo uma espécie modelo para estudos de silenciamento gênico. Vários processos já foram investigados empregando RNAi incluindo o padrão de formação e segmentação durante o desenvolvimento embrionário, muda, via metabólica da síntese de quitina, percepção odorífera e ação molecular do hormônio juvenil (Tomoyasu et al., 2008; Bellés, 2010).

### **3.1.3 RNAi aplicado ao controle de insetos -praga**

Com a descoberta do mecanismo do RNA de interferência (Fire et al., 1998), esse método mostrou-se promissor para a utilização em plantas geneticamente modificadas, com o objetivo de aumentar a resistência a insetos praga. A primeira geração dessas plantas compreende transgenes produtores de toxinas provenientes de *Bacillus thuringiensis*, a segunda geração utiliza de inibidores de enzimas digestivas, geralmente peptidases e, finalmente o RNAi surge como uma ferramenta de terceira geração (Gatehouse e Price, 2011) constituindo um novo método muito eficiente para o controle de insetos (Baum et al., 2007; Whyard et al, 2009; Mao et al., 2011).

O grande diferencial dessa abordagem é que a utilização de RNAi possibilita a avaliação do fenótipo resultante do silenciamento sem a necessidade de transformação genética. Além disso, utilizando a técnica de silenciamento a importância e a severidade da ausência de qualquer enzima digestiva pode ser avaliada, independente da atuação de inibidores que podem ter seus efeitos reduzidos por diversos fatores como a própria especificidade, concentração insuficiente ou degradação no sistema digestivo. Essas características possibilitam a escolha dos alvos mais eficientes em um menor intervalo de tempo antes da transformação genética vegetal para a obtenção de transgenes resistentes a insetos.

Além de constituir uma importante ferramenta experimental para a determinação de função gênica, o RNAi também tem um enorme potencial para o controle de pragas agrícolas (Price e Gatehouse, 2008). O primeiro relato da produção de plantas transgênicas produzindo dsRNA visando a utilização de RNAi para a proteção da cultura contra insetos foi descrito para plantas de milho transgênico expressando dsRNA de 246 pb para o gene V-ATPase A, as quais exibiram uma drástica redução nos danos causados pelo coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera* que ataca a raiz do milho (Baum et al., 2007).

As larvas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) produzem naturalmente no intestino a enzima citocromo P450, a qual confere resistência desses insetos ao gossipol, um composto polifenólico produzido pelo algodoeiro como substância de defesa, com poder inseticida. Plantas de tabaco e também do gênero *Arabidopsis* foram transformadas com construções para a produção de dsRNA contra o gene da citocromo P450. Após a alimentação das larvas de *H. armigera* com essas plantas, a repressão específica do gene foi observada e os insetos apresentaram sensibilidade aumentada ao gossipol em dietas artificiais (Mao et al., 2007). Em 2011, Mao e colaboradores produziram plantas de algodão transgênicas expressando dsRNAs contra o gene da citocromo. As larvas cultivadas nesses transgenes apresentaram retardo no crescimento e as plantas foram menos danificadas em relação aos controles.

Outros estudos envolvendo plantas transgênicas contendo construções para a produção de dsRNA visando o silenciamento de genes alvo essenciais para o metabolismo de pragas herbívoras ou parasitas relatam redução nos danos causados. Esse paradigma já se mostrou eficiente para criar um novo sistema de resistência de culturas contra nemátodos parasitas e vírus (Fuller et al., 2008), o que evidencia o surgimento de uma nova geração de tecnologia de combate a pragas.

Muito antes de ser explorado como uma alternativa biotecnológica para controle de insetos, o RNAi se consolidou como a ferramenta molecular mais poderosa atualmente para explorar função de genes. Além de constituir uma ferramenta de última geração para desenvolvimento de plantas resistentes ao *S. levis*, a técnica de RNA de interferência ainda oferece um grande potencial para a exploração da função de novos transcritos identificados na biblioteca descrita no capítulo 1.

### 3.1.4 Seleção dos genes alvo para avaliar os efeitos do RNAi em *S. levis*

A utilização de RNA de interferência no presente trabalho tem como principais objetivos a avaliação da sensibilidade de *S. levis* ao RNAi e seleção de genes-alvo adequados para a posterior aplicação do método no desenvolvimento de plantas transgênicas. Estudos recentes na área da transcriptômica relatam a utilização de sequenciamento de última geração, em larga escala, com o objetivo de identificar alvos letais e precoces no desenvolvimento de insetos praga (Wang et al., 2011). Entretanto, a seleção de alvos adequados consiste em uma etapa importante e laboriosa, que ainda é pouco estudada, especialmente no sentido da identificação de genes específicos.

Para que a técnica possa ser empregada de forma eficiente para o controle do inseto no campo é necessário que o disparo do silenciamento do gene escolhido seja possível via ingestão de pequenas quantidades de dsRNA produzidas pela planta, e ainda, que o fenótipo associado implique na inviabilidade do animal. Ainda no que diz respeito aos alvos para RNAi com função inseticida, a utilização de genes que constituem famílias gênicas, como aqueles que codificam as enzimas digestivas em geral, é indesejável porque o silenciamento de apenas um dos genes ou isoforma é facilmente revertido pelo animal.

Zha e colaboradores (2011) produziram o primeiro transgene utilizando dsRNA visando criar resistência contra insetos da ordem Hemiptera. Três transgenes de arroz produzindo grampos de RNA, específicos para transcritos do intestino médio do hemíptero *Nilaparvata lugens*, correspondentes a uma carboxipeptidase, uma tripsina e um transportador de açúcares se mostraram eficientes para disparar o silenciamento gênico em ninfas que foram alimentadas com as plantas. Entretanto, apesar do silenciamento gênico detectado para as três enzimas altamente transcritas do intestino médio do inseto, evidenciado pela redução tanto nos níveis de RNAm, quanto protéico, esses transgenes não foram eficientes para criar resistência das plantas de arroz a esse inseto.

Esses resultados reforçam que a diversidade das enzimas digestivas de insetos, relacionada a um longo processo de evolução entre as plantas e predadores, confere uma grande plasticidade ou capacidade de adaptação dos

insetos quando submetidos à perda de função de uma de suas muitas variantes de enzimas digestivas. Esse processo que ocorre naturalmente, quando os insetos são submetidos a dietas contendo inibidores ou agentes anti metabólicos produzidos por plantas, indica que o silenciamento gênico dessas enzimas, via RNAi , pode não ser efetivo para impedir o desenvolvimento de insetos.

Além disso, o efeito do silenciamento não é o único ponto crucial para a escolha dos genes alvo no nosso contexto de proteção de culturas contra insetos utilizando RNAi. É importante verificar a similaridade da sequência gênica com outros insetos que ocupam o mesmo habitat e possam ser afetados pela utilização de um transgene produzindo dsRNA (Gatehouse e Price, 2011). Do contrário, a utilização de genes altamente conservados como alvos pode ocasionar a diminuição da especificidade no efeito do RNAi, gerando efeito deletérios para espécies nativas ou não daninhas, além de animais superiores.

Ensaio de alimentação em larvas de *D. virgifera* testando diversos genes candidatos que codificam proteínas com funções essenciais foram realizados, com a adição de dsRNAs na dieta desse inseto (Baum et al., 2007). Os melhores resultados foram obtidos para os genes que codificam as subunidades A, D e E da enzima V-ATPase e o gene da  $\alpha$ -tubulina, com altas taxas de mortalidade quando aplicados em concentrações inferiores a 52 ng/cm<sup>2</sup>. Por outro lado, a conservação das sequências gênicas utilizadas para silenciar esses transcritos implica na falta de especificidade. Os dsRNAs produzidos para V-ATPases de *Diabrotica virgifera virgifera* tiveram seu efeito avaliado em outras espécies e causaram uma mortalidade significativa de *Diabrotica undecimpunctata howardii*, assim como nas larvas do besouro do colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, quando submetidas à dieta contendo esses dsRNA. RNA dupla fita também foi preparado a partir do gene V-ATPase A de *Leptinotarsa decemlineata*, e como esperado, nos ensaios de alimentação deste inseto, foi obtida a mesma mortalidade com taxas dez vezes menores de dsRNA (5,2 ng/cm<sup>2</sup>) preparado a partir do endógeno, quando comparado com o dsRNA do ortólogo de *D. virgifera* (52 ng/cm<sup>2</sup>). A similaridade entre esses genes ortólogos de *D. virgifera* e *L. decemlineata* é de 83% e evidencia que um dos aspectos mais importantes para o silenciamento gênico aplicado ao controle de pragas é a especificidade, baseada na identidade de sequência (Baum et al., 2007).



As quitinases de insetos podem estar envolvidas no processo de muda, atuando na digestão da quitina presente no exoesqueleto, ou ainda relacionadas à digestão no intestino do inseto, mediando a hidrólise de quitina da membrana peritrófica (Kramer e Muthukrishnan, 1997). Experimentos realizados em *Tribolium castaneum* envolvendo RNAi no silenciamento de genes que codificam quitinases relacionadas à muda revelaram que a ausência de algumas dessas enzimas pode ser letal. A quitinase 5 (Tc\_CHT5) e o IDGF4 são enzimas necessárias para a formação dos adultos, enquanto o silenciamento da Tc\_CHT10 gera um fenótipo letal em qualquer fase do desenvolvimento. Diversas outras quitinases foram testadas, contudo não foi detectada mudança fenotípica decorrente do silenciamento dessas enzimas, indicando a função digestiva para essas variantes (Zhu et al., 2008). Desse modo, o silenciamento das quitinases também pode ser letal; no entanto, é necessária uma prévia caracterização dessas enzimas em *S. levis* para a identificação daquelas que são essenciais para o desenvolvimento.

A baixa similaridade de sequência protéica, 50 a 60% entre as quitinases de *S. levis* com aquelas descritas em *T. castaneum*, bem como, o grande tamanho dessas proteínas, e a redundância de domínios entre as quitinases em *T. castaneum* dificultam a identificação e seleção da quitinase homóloga à Tc\_CHT10 em *S. levis* para os testes de silenciamento.

Após a análise de genes candidatos identificados na biblioteca de cDNA de *S. levis*, foram escolhidos os genes que codificam uma V-ATPase E e uma serpina para a realização dos experimentos de RNAi em larvas de *S. levis* e também em *T. castaneum*. Enquanto a V-ATPase E já constitui um alvo extremamente eficaz e bem caracterizado para o controle de outros insetos via RNAi, o gene que codifica a serpina foi escolhido em função da sua dissimilaridade de sequência, garantindo especificidade para a espécie praga. A escolha desse gene também foi motivada pelos fenótipos letais observados em mutantes de *Drosophila* sp., assim como pelos poucos estudos funcionais de serpinas em insetos, especialmente coleópteros, no sentido de obter indícios da função biológica desse inibidor de serino peptidases.

O coleóptero *Tribolium castaneum*, conhecido como besouro vermelho da farinha, tem características favoráveis que o tornou um organismo modelo para estudos genéticos, como a facilidade dos métodos de cultura, tempo curto de geração, progênie grande e tem se mostrado um excelente modelo para

manipulação genética envolvendo mutações (Brown et al., 2000; Lorenzen et al., 2003). Além das informações genômicas que facilitam estudos funcionais envolvendo interações gênicas, diversos estudos envolvendo RNAi nesse inseto (Brown et al., 1999; Bucher et al., 2002; Tomoyasu e Denell, 2004; Tomoyasu et al., 2008) evidenciam a potência de sua resposta sistêmica.

Por essas razões, este inseto foi utilizado como modelo para desenhar as análises piloto envolvendo RNA de interferência em *Sphenophorus levis*, inicialmente via injeção de dsRNA. O silenciamento gênico da serpina deste inseto também é um estudo de caráter original, que pode gerar conhecimento sobre a participação desse inibidor na fisiologia do inseto. Os dsRNAs dos genes da serpina e V-ATPase de *S. levis* também foram injetados em *T. castaneum*, com o objetivo de avaliar o efeito cruzado das sequências gênicas específicas nessa espécie não alvo.

#### **3.1.4.1 A subunidade E da enzima V-ATPase como alvo**

A V-ATPase é uma enzima altamente conservada que atua bombeando prótons que levam à acidificação de organelas como os lisossomos e endossomos em todas as células eucarióticas. As V-ATPases também são encontradas em tecidos animais especializados, e em insetos desempenham um importante papel na manutenção do gradiente de pH no lúmen do intestino e também regulam a secreção dos fluídos nos túbulos de Malpighi (Wieczorek et al., 2009). Apesar de ser um gene que apresenta a sequência muito conservada, a severidade do fenótipo observada para o silenciamento gênico em *D. virgífera* servirá como um controle positivo para os testes em *S. levis*. A subunidade E da enzima V-ATPase foi escolhida para clonagem e testes de silenciamento, pois esta apresenta menor similaridade de DNA com o gene homólogo em outros insetos.

A V-ATPase é formada por um complexo protéico multimérico, altamente conservado desde bactérias a humanos, descoberta na membrana do vacúolo celular, mas também presente nas membranas plasmáticas. A estrutura dessa proteína em insetos, caracterizada no lepidóptero *Manduca sexta*, é organizada em dois complexos, sendo um deles citosólico (V1) e outro aderido à membrana (V0). A subunidade E, escolhida para o silenciamento nesse estudo, é integrante do

complexo V1 que é formado por oito diferentes subunidades (Wieczorek et al., 1999).

Em função dos diferentes mecanismos de catálise, o pH do conteúdo intestinal afeta diretamente a atividade das enzimas digestivas (Terra e Ferreira, 2011). Por essa razão, na maioria dos insetos, existe um gradiente de pH ao longo do intestino que garante a atividade das diversas enzimas envolvidas no processo digestivo. Na maioria dos coleópteros, o conteúdo intestinal é tamponado acidamente na região anterior do intestino médio, atingindo pHs neutros ou alcalinos no final do intestino médio. As enzimas são secretadas e compartimentalizadas ao longo do intestino, de modo que atuam nas suas faixas ótimas de pH (Terra e Ferreira, 1994). O pH do intestino médio das larvas de *S. levis* varia de 5,5 na região anterior (V1) a 7,6 na região posterior (V4) (Soares-Costa et al., 2011).

Os mecanismos pelos quais esse gradiente de pH é gerado ainda não são claramente elucidados, especialmente para coleópteros. No entanto, diversos modelos são utilizados para explicar as diferenças de pHs encontradas ao longo do intestino de outros insetos. O intestino de larvas de lepidópteros pode ser extremamente alcalino, atingindo pHs próximos de 11. A anidrase carbônica intracelular presente nas células caliciformes do intestino médio produz ácido carbônico que é dissociado em bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e próton  $\text{H}^+$ . O próton é lançado dentro da cavidade celular ou vacúolo das células caliciformes pela ação da V-ATPase, enquanto o bicarbonato é secretado para o lúmen. Na saída da célula, o bicarbonato é trocado por um ânion cloreto e perde um próton na passagem pela membrana celular, resultando na liberação de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) no lúmen, responsável pela elevação do pH (Dow 1992; Terra e Ferreira, 2011).

O próton liberado na cavidade intracelular das células caliciformes pela ação da V-ATPase é reabsorvido no citoplasma pela troca por um íon metálico potássio ( $\text{K}^+$ ) que se difunde passivamente para o lúmen quando o gradiente eletroquímico é favorável (Dow 1992). O pH elevado, próximo de 11, mantido no intestino médio das larvas de *Manduca sexta*, também é proporcionado pela ação de uma bomba antiporte de potássio ( $\text{K}^+/\text{2H}^+$ ), que reabsorve ativamente para o espaço intracelular o próton da cavidade da célula caliciforme além de outro proveniente do lúmen do intestino, levando ao aumento do pH no lúmen (Wieczorek et al., 1999)

A atuação de duas classes de ATPases nos cecos gástricos de larvas de *Aedes aegypti* explica como o pH ao longo do lúmen do intestino pode ser mantido, mesmo contra um gradiente eletrostático. A reabsorção citoplasmática dos íons  $H^+$  é realizada ativamente pela ação de uma P-ATPase ( $Na^+/K^+$ ) na região basal das células, enquanto a V-ATPase ( $H^+$ ) atua apicalmente. Essas duas ATPases têm a localização na membrana celular invertida ao longo do intestino médio das larvas, o que possibilita a manutenção de um gradiente de pH ao longo do intestino. O gradiente eletroquímico gerado pela ação conjunta das duas ATPases também é um facilitador da osmoregulação, e contribui tanto para o transporte de íons quanto solutos orgânicos através das membranas (Patrick et al., 2006).

Apesar da maioria desses mecanismos não ser bem conhecida para coleópteros, a participação das ATPases, especialmente as V-ATPase ( $H^+$ ) nos processos de osmoregulação, manutenção do gradiente de pH e diferença de potencial de membrana como facilitador da absorção de solutos e aminoácidos é evidente, devido à conservação dessas proteínas entre os insetos. Por essa razão, o silenciamento de uma subunidade da V-ATPase deve gerar os fenótipos severos e letais já conhecidos em insetos, como descrito por Baum e colaboradores (2007) e Whyard e colaboradores (2009), servindo como controle para avaliar a sensibilidade de *S. levis* ao RNA de interferência.

#### **3.1.4.2 A serpina como gene alvo para o silenciamento via RNAi**

As serpinas são proteínas inibidoras de serino peptidases e, em insetos, a maioria delas é descrita atuando no sistema imune pela regulação negativa da atividade de peptidases que desencadeiam a melanização dos tecidos, assim como a síntese de peptídeos anti-microbianos. A melanização é um processo desencadeado por ferimentos na cutícula ou pela infecção por micro-organismos, e pode levar à recuperação do tecido danificado, encapsulamento de micro-organismos invasores e produção de intermediários tóxicos (Ashida e Brey, 1998). Nesse processo imune, uma série de peptidases é recrutada sequencialmente, sendo que a fenoloxidase é a última enzima da cascata e encontra-se constitutivamente na hemolinfa na forma de zimogênio, como a profenoloxidase (Nappi e Ottaviani, 2000).

A ativação da profenoloxidase se dá pela ação de serino peptidases específicas, que são sintetizadas na forma de zimogênio. Essas serino peptidases, uma vez ativadas, também são inibidas por inibidores específicos que modulam a melanização e o processo imune. Sem esses inibidores, a toxicidade dos compostos de oxigênio reativos e quinonas geradas pela ação sistêmica e descontrolada da fenoloxidase pode ocasionar a morte do inseto (Soderhall e Cerenius, 1998). As serpinas são as proteínas chave que atuam na regulação dessas serino peptidases ativadoras da profenoloxidase em insetos (De Gregório et al., 2002; Ligoxygakis et al., 2002) e também participam das cascatas envolvidas na coagulação e resposta inflamatória em mamíferos (Gettins, 2002).

Outros estudos, fundamentalmente em lepidópteros, indicam também a participação de outras serpinas, muitas vezes chamadas de serpinas 1, em processos relacionados ao desenvolvimento ou ciclo de muda desses insetos. Esses inibidores são regulados negativamente pela presença da ecdisona, o hormônio da muda dos insetos, a qual é liberada no período que antecede à mudança de ínstar. Ao contrário da Spn27a de *Drosophila*, essas serpinas não têm a expressão gênica reprimida pelo inóculo de bactérias, o que aparentemente implica em não envolvimento nos processos imunes (Kanost et al., 1995; Chamankhah et al., 2003; Zheng et al., 2009). Entretanto, para esses insetos os estudos têm caráter mais descritivo e, em nenhum deles, foi avaliado o efeito funcional em insetos mutantes ou silenciados para essas serpinas.

A serpina 1 de *S. levis* (Spn1), ou *Leviserpina*, é um dos genes mais dissimilares identificados no transcriptoma, descrito no capítulo 1. Inicialmente foi detectado por meio de RT-PCR a expressão constitutiva desse inibidor em todas as fases do desenvolvimento analisadas, ovos, três fases larvais, pré-pupas, pupas e adultos. Os níveis de expressão são crescentes durante o desenvolvimento larval, atingindo a expressão máxima nas pupas (Fonseca et al., 2011). Considerando o baixo nível de conservação da sequência gênica, mesmo entre coleópteros, esse gene pode constituir um alvo altamente específico pelo silenciamento via RNAi.

A serpina 27a de *Drosophila melanogaster* (Spn27A) atua na inibição da melanização e desaparece da hemolinfa quando o inseto é infectado por microorganismos. Em mutantes de *Drosophila*, a ausência dessa serpina na hemolinfa, tanto em larvas quanto adultos, causa melanização espontânea em taxas muito

elevadas decorrente da atividade constitutiva da fenoloxidase. Em homozigotos deficientes para Spn27a, obtidos a partir de cruzamentos dos mutantes, foi detectado que a maioria dos insetos morre antes de completar o estágio pupal (De Gregório et al., 2002; Ligoxygakis et al., 2002).

A expressão da Spn27a foi detectada por RT-PCR em todos os estágios do desenvolvimento de *Drosophila*, assim como a nível traducional, com anticorpos específicos, exibindo uma maior expressão nas pupas (De Gregório et al., 2002). A expressão constitutiva confirma que essa serpina é o gatilho da resposta imune. Na presença de bactérias ou fungos, os níveis de expressão da serpina caem drasticamente e o inibidor é exaurido da hemolinfa, disparando a resposta imune que leva à melanização em decorrência da atividade da fenoloxidase (De Gregório et al., 2002; Ligoxygakis et al., 2002).

A baixa conservação da sequência de aminoácidos da Spn1 de *S. levis* torna difícil e arriscada a identificação dos ortólogos ou homólogos funcionais entre outros insetos, até mesmo entre coleópteros. Entretanto, baseando-se no perfil de transcrição constitutivo, observado para a Spn1, similar àquele da Spn27a de *Drosophila*, inicialmente foi considerada a possibilidade de que a Spn1 poderia constituir o gene ortólogo da Spn27a em *S. levis*, constituindo um alvo potencialmente letal e específico para o silenciamento gênico. A observação de fenótipos letais para mutações em outras serpinas Spn28Dc, Spn42Da, Spn43Ac, Spn77Ba de *D. melanogaster* indica que a função desses inibidores não é redundante (Garret et al., 2009) e reforça a possibilidade da serpina 1 de *S. levis* constituir um alvo eficiente, independente da homologia funcional com a Spn27a.

### 3.2 Materiais e métodos

Todo o trabalho desenvolvido e apresentado nesse capítulo foi desenvolvido em duas etapas. A primeira fase foi conduzida sob a supervisão do Prof. Dr. John A. Gatehouse e desenvolvida na Universidade de Durham, Reino Unido (School of Biological and Biomedical Sciences, Laboratory of Crop Protection) no período de outubro de 2010 a fevereiro de 2011. Nessa etapa, foi realizada a seleção dos genes, para o silenciamento de *S. levis* e avaliação da resposta ao RNAi. Os genes escolhidos para verificar a sensibilidade do inseto ao RNAi, V-ATPase E e serpina,

também constituem potenciais alvos para o controle do inseto. Estes genes, provenientes de *S. levis*, e os prováveis ortólogos identificados para *Tribolium castaneum*, foram clonados para a produção dos dsRNAs, que foram injetados em larvas de *T. castaneum*, com o objetivo de avaliar a especificidade do RNAi, baseada na similaridade de sequência entre essas espécies de coleópteros. Na segunda fase, conduzida no Laboratório de Biologia Molecular, (UFSCar - São Carlos, Brasil) larvas de *Sphenophorus levis* foram injetadas com dsRNAs da V-ATPase E e serpina, produzidos apenas a partir das sequências gênicas provenientes desse inseto.

### 3.2.1 Cultura de insetos

Os espécimes de *Tribolium castaneum* foram obtidos da coleção de insetos provenientes da sala de cultivo de insetos da Escola de Ciências Biomédicas e Biológicas (Universidade de Durham), onde esses insetos são mantidos a 25 °C e umidade relativa de 65% e sob fotoperiodismo 16:8 luz:escuridão. Esses insetos foram mantidos em dieta artificial preparada com uma mistura de extrato de levedura e farinha de trigo orgânica (1:20), aquecida durante 5 horas a 90 °C para secagem e esterilização. As larvas de *Sphenophorus levis* foram obtidas no laboratório de entomologia do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP) onde foram cultivadas em meio de dieta artificial (Degaspari et al., 1987) e mantidas em câmaras climatizadas com 70% de umidade relativa a 26 °C e fotoperiodismo de 12 horas.

### 3.2.2 Obtenção das sequências e clonagem dos cDNAs

Os genes selecionados da biblioteca de *Sphenophorus levis*, V-ATPase E e serpina (*leviserpina* ou SI\_Spn1) e também os ortólogos em *T. castaneum*, V-ATPase E e serpina 6 (Tc\_Spn6) foram clonados em vetor pLITMUS 28i (New England BioLabs) para a produção de dsRNAs. As sequências utilizadas para o desenho dos *primers* dos genes de *S. levis* foram obtidas dos clones identificados na biblioteca, descrita no capítulo 1. As sequências dos genes ortólogos de *T. castaneum* foram obtidas a partir de análises de similaridade das sequências de *S. levis* contra o banco de dados de proteínas (nr) deste inseto disponível no GenBank,

utilizando os programas Blastx e Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com parâmetros padrões de configuração.

Os alinhamentos de DNA e proteína foram realizados na interface do programa BioEdit v7.0.5.3. (Hall, 1999), utilizando o software ClustalW (Thompson et al., 1994), com parâmetros padrões, selecionados automaticamente de acordo com a similaridade das sequências. Para a clonagem, os genes foram amplificados a partir de cDNAs, utilizando os *primers* específicos desenhados para suas sequências, contendo sítios de restrição para as enzimas *BamH* I e *Pst* I nos *primers sense* e *antisense*, respectivamente. Os cDNAs utilizados para a amplificação dos genes de *T. castaneum* foram os mesmos utilizados para as análises da expressão diferencial desses genes, cuja preparação é descrita a seguir no item 3.2.3. Os genes de *S. levis* foram amplificados a partir de uma fração de cDNAs não transformada, produzida durante a construção da biblioteca.

Como controle para os experimentos, foi utilizado dsRNA sintetizado a partir do gene que codifica a proteína neomicina fosfotransferase, que confere resistência ao antibiótico kanamicina, amplificada a partir do vetor pSMARTGC Blue (Lucigen), com os *primers sense* e *antisense* contendo sítios de restrição para as enzimas *Xba* I e *Xho* I, respectivamente. Todos os *primers* utilizados para a clonagem desses genes são descritos na tabela 3.1, onde também estão indicados os tamanhos dos amplicons para a produção dos dsRNAs.

Tabela 3.1: Sequência 5' - 3' dos *primers* utilizados para a clonagem dos cDNAs no vetor pLITMUS 28i, utilizado para a síntese dos dsRNAs. Os sítios de restrição estão sublinhados nas sequências

<i>Primer</i>	Sequência	T <sub>m</sub> °C	Enzima de restrição	Amplicon (pb)	Start - Stop (ORF)
SI Spn1 (RNAi) F	AAT <u>GGATCC</u> TTTCTATTTCAGTCCGCTCTC	52,4	<i>BamH</i> I	400	138 - 158
SI Spn1 (RNAi) R	AAT <u>CTGCAGG</u> ACCAAACGTGTGAGCGCAC	55,9	<i>Pst</i> I		517 - 537
Tc Spn6 (RNAi) F	ATT <u>GGATCC</u> ACCCCACTGCTGCTGAAATACG	56,7	<i>BamH</i> I	323	104 - 125
Tc Spn6 (RNAi) R	AAT <u>CTGCAGG</u> TCAGCGTCAAGGGTGTTAGGG	58,6	<i>Pst</i> I		405 - 426
SI VatpE (RNAi) F	AAT <u>GGATCC</u> TCAGCGACGCAGATGTTTCAG	53,8	<i>BamH</i> I	334	8 - 27
SI VatpE (RNAi) R	AAT <u>CTGCAG</u> ACAGCATAACGACCTTGATCTC	53	<i>Pst</i> I		320 - 341
Tc VatpE (RNAi) F	ATT <u>GGATCC</u> CATGGCACTAAGCGATGTCGAC	54,4	<i>BamH</i> I	341	1 - 21
Tc VatpE (RNAi) R	AAT <u>CTGCAG</u> TGTGAATATCTCGCCTGGTC	51,8	<i>Pst</i> I		322 - 341
kan Res (RNAi) F	AAT <u>CTCGAGG</u> AATTCGTGGAGAGGCTATTC	52,4	<i>Xho</i> I	811	43 - 64
kan Res (RNAi) R	AAT <u>TCTAGA</u> ACCCGGTGACGTCACCATG	55,4	<i>Xba</i> I		834 - 853



Após a amplificação dos genes, seus amplicons e também o plasmídeo pLITMUS 28i, foram digeridos com as respectivas enzimas indicadas na tabela 3.1. Para as reações de ligação, foram utilizados 30 ng de inserto e 100 ng de plasmídeo clivado com as mesmas enzimas, adicionados de 2 µl de tampão (10X) e 0,5 µl de T4 DNA Ligase (Invitrogen) em volume final de 20 µl. As reações foram incubadas a 22 °C durante 3 horas, adicionadas do mesmo volume de clorofórmio, vortexadas e centrifugadas a 16.000 g durante 10 minutos. As transformações foram realizadas em cubetas de 1 mm a 1,8 kV, utilizando 50 µl de células de *E. coli* DH5α eletrocompetentes adicionadas de 1 µl do sobrenadante purificado com clorofórmio. As células transformadas foram recuperadas pela adição de 500 µl de meio LB seguida da incubação a 37 °C por 45 minutos a 250 rpm. Após a expressão do marcador de resistência, 100 µl foram plaqueados em meio LB ágar adicionado de 100 µg/ml do antibiótico carbenicilina. Colônias transformadas com pLITMUS 28i foram selecionadas por PCR utilizando os *primers* específicos dos genes clonados no vetor. Os clones positivos identificados foram confirmados por sequenciamento utilizando os *primers* universais M13F e M13R.

### 3.2.3 Transcrição *in vitro* e síntese de dsRNAs

Após a clonagem, os transformantes contendo os plasmídeos construídos foram inoculados em 30 ml de meio LB contendo carbenicilina (100 µg/ml) e multiplicados pela incubação overnight a 37 °C e 250 rpm. As extrações de DNA plasmidial foram realizadas utilizando o kit Miniprep DNA Purification System (Promega), e os DNAs foram quantificados em espectrômetro NanoDrop ND-1000 (260 nm) e gel de agarose 1,0 % em tampão TAE 1X.

Os DNAs plasmidiais correspondentes a cada construção foram clivados em separado com as duas enzimas de restrição utilizadas para a clonagem dos mesmos. Para tanto, aproximadamente 10 µg de cada plasmídeo foram digeridos em duas reações contendo 3 µl da enzima *BamH* I ou *Pst* I (Fermentas) e 10 µl do tampão adequado, em volume final de 100 µl. Para o plasmídeo contendo a construção pLITMUS\_28i\_Kanamycin\_R, as clivagens foram realizadas nas mesmas condições, no entanto, utilizando as enzimas *Xba* I e *Xho* I. As reações foram incubadas a 37 °C durante 12 horas e os plasmídeos linearizados foram purificados

do gel de agarose 0,8% (TAE 1X), utilizando o kit Wizard Gel and PCR Clean-up System (Promega).

Cerca de 1 µg dos plasmídeos linearizados foi utilizado para a síntese de ssRNA utilizando o sistema de transcrição *in vitro* MEGAScript® T7 High Yield Transcription Kit (Applied Biosystems / Ambion). As reações foram incubadas durante 12 horas a 37 °C, seguidas de um tratamento de 15 minutos a 37 °C com 1 µl de DNase Turbo. Para a purificação dos transcritos, os ssRNAs foram adicionados de 30 µl de água *nuclease-free*, 30 µl de solução de cloreto de lítio 2,5 M e incubados a -20 °C *overnight*. Os RNAs foram precipitados por centrifugação a 20.000 g a 4 °C durante 20 minutos. Após o descarte do sobrenadante, a lavagem do precipitado foi realizada pela adição de etanol 75% e o material foi centrifugado por 10 minutos nas mesmas condições. O pellet foi secado por 10 minutos a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µl de água *nuclease-free*.

Os ssRNAs purificados foram diluídos 1:10 em água *nuclease-free*, quantificados em espectrômetro NanoDrop ND-1000 (260 nm) e tiveram a qualidade avaliada em gel de agarose 1,0 % em tampão TBE (0,5 X). Para as análises dos ssRNA em gel de agarose não desnaturante foi utilizado 3 µl das amostras diluídas, adicionadas do mesmo volume tampão *Gel Loading Buffer II (2X)* do kit MEGAScript, contendo 95% de formamida, 0.025% de xileno cianol, 0.025% de bromophenol blue, 18 mM EDTA e 0.025% de SDS. As amostras adicionadas de tampão foram incubadas a 85 °C durante 5 minutos e carregadas no gel.

Quantidades iguais (70 µg) de ssRNA *sense* e *antisense* correspondentes a cada gene foram adicionadas a um *ependorf* e o volume foi completado com água *nuclease-free* para 100 µl. Os tubos contendo as fitas complementares de ssRNAs foram incubados em um becker contendo 2 litros de água aquecida a 80 °C, e acondicionado dentro de um isopor semi aberto para a redução gradual da temperatura de incubação ao longo da noite até atingir a temperatura ambiente. O material foi diluído 1:10, quantificado em espectrômetro e a qualidade do dsRNA foi avaliada em gel de agarose 1% em tampão TBE (0,5 X). Para as injeções em *T. castaneum*, o material foi novamente precipitado com cloreto de lítio nas condições descritas anteriormente e ressuspendido em 10 µl de água *nuclease-free*.

### 3.2.4 Injeção de dsRNA nas larvas dos insetos

Devido ao reduzido tamanho das larvas de *T. castaneum*, insetos no último estágio larval foram utilizados para as injeções, correspondentes ao sexto ou sétimo ínstar, medindo aproximadamente de 4 a 6 mm de comprimento. As larvas de *T. castaneum* foram injetadas na Universidade de Durham (U.K.), utilizando um microscópio Vision-SX45 acoplado a um sistema de injeção hidráulico Nanoject Nanolitre (Drummond) e também a um micromanipulador Marzhauser MM33 (Drummond). As injeções foram realizadas na região dorso-lateral da metade posterior das larvas e aproximadamente 350 ng de dsRNA foi injetado em 69 nl. Após a injeção os insetos foram mantidos no meio de cultura sob as mesmas condições de cultivo.

As injeções de dsRNA em *Sphenophorus levis*, foram realizadas no laboratório da Profa. Dra. Nadia Monesi na Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Larvas com 10 dias de vida foram injetadas sob estereomicroscópio MZ6 (Leica) utilizando o injetor FemtoJet (Eppendorf). Os capilares foram conectados à baioneta do injetor que foi manipulada manualmente, sem fixação em suporte. Para facilitar a visualização das injeções, 49 µl de dsRNA foi misturado a 1 µl de corante de alimentos MC Cornich. Os volumes de injeção variaram de 0,25 µl a 0,5 µl, e aproximadamente 0,5 µg a 1 µg de dsRNA foi injetado na região dorso-lateral da metade posterior de larvas de *S. levis*. Após as injeções as larvas foram mantidas nos mesmos frascos, contendo dieta artificial, em temperatura ambiente (24 - 28 °C), sob fotoperiodismo natural.

### 3.2.5 Análises de qRT-PCR quantitativo

Experimentos de Real Time PCR foram realizados com *primers* específicos para transcritos gênicos de V-ATPase E e serpinas visando avaliar a expressão desses genes sob duas condições. Primeiramente, para determinar os níveis dos transcritos tanto nos tecidos específicos de *S. levis*, quanto ao longo do desenvolvimento deste inseto e também em *T. castaneum*. Posteriormente, análises de qRT-PCR foram realizadas para avaliar a redução dos níveis de transcrição após injeções de dsRNA e verificar o silenciamento gênico nos dois insetos. Como controle para os experimentos de silenciamento, os dados foram comparados

àqueles obtidos para o grupo controle injetado com dsRNA para a sequência do gene que codifica uma proteína de resistência ao antibiótico kanamicina, sem identidade contra os ESTs de *T. castaneum* ou *S. levis*. As análises de qRT-PCR para verificar o silenciamento gênico específico foram acompanhadas da análise fenotípica dos insetos injetados com dsRNAs.

### 3.2.5.1 Análises de expressão diferencial em *Tribolium castaneum*

As análises de RT-PCR das larvas de *T. castaneum* injetadas com dsRNA, realizadas em Durham, foram conduzidas utilizando RNAs preparados a partir de *pools* de 3 larvas, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80 °C após as coletas. Para as análises de expressão ao longo do desenvolvimento deste inseto foram utilizados RNAs extraídos de dez insetos. Os RNAs totais foram extraídos utilizando 500 µl de TRI reagent (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. Aproximadamente 8 µg de RNA total foram tratados com 1 µl de DNase TURBO (Ambion) durante 20 minutos a 37 °C em volume final de 30 µl. As amostras tratadas com DNase foram submetidas a uma nova purificação utilizando fenol clorofórmio para a remoção da DNase. Para a síntese do cDNA, 1 µg de RNA tratado foi utilizado de acordo com as instruções do kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis (Roche).

As análises de qRT-PCR foram conduzidas no aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em reações utilizando o marcador fluorescente SYBR\_Green contido na mistura JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich). As reações foram realizadas em volume final de 20 µl, utilizando 10 µl do mix contendo a enzima e o marcador, 0,2 µl do marcador interno de referência (ROX), 1 µM de cada *primer* específico e 500 ng de cDNA. A ciclagem utilizada para a reação foi de 10 minutos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos com desnaturação de 15 segundos a 95 °C e temperatura de hibridização e extensão de 60 °C durante um minuto. A curva de dissociação foi iniciada com desnaturação a 95 °C por 15 segundos, hibridização a 60 °C durante um minuto e aquecimento até 95 °C.

As reações foram realizadas em triplicatas e controles negativos foram adicionados em todos os experimentos. Os *primers* utilizados para as análises foram projetados utilizando o software *Primer Express* v3.0 (Applied Biosystems), com

temperaturas de melting próximas de 59 °C, com tamanho ótimo de amplicon próximo de 50 pb e de modo que não se sobrepusessem à região clonada para a produção de dsRNAs. Estes *primers* estão indicados na tabela 3.2, junto àqueles utilizados para as mesmas análises em *S. levis*. As análises de RT-PCR quantitativo para avaliar a expressão diferencial ao longo do desenvolvimento, e também nos insetos silenciados, foram realizadas pelo método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak e Schmittgen, 2001) para ambos os insetos.

Tabela 3.2: Sequência 5' - 3' dos *primers* desenhados para as análises de qRT-PCR. A penúltima coluna indica a região de hibridização desses *primers* na sequência gênica, em relação à ORF.

<i>Primer</i>	Sequência	T <sub>m</sub> °C	Start - Stop / ORF	Amplicon (pb)
RT_Tc_Spn6_F	TGCAAAACACCGACTTGTACAAC	59	551 - 573	77
RT_Tc_Spn6_R	GCCTAAGTAAGGCATTTCCAAAAA	59	604 - 627	
RT_SI_Spn1_F	AAGAGTTCACCACCGCCTTA	57	212 - 231	95
RT_SI_Spn1_R	GTCCGTGTTTGAGCGAAGT	57	288 - 306	
RT_Tc_VATP-E_F	CACTTGCCATCCGAAACCA	59	514 - 532	59
RT_Tc_VATP-E_R	TTGATTTTACCCTTTTGCGCATA	59	550 - 572	
RT_SI_VATP-E_4_F	CAAGGCTTGTACCAGATCTTCG	57	364 - 385	73
RT_SI_VATP-E_4_R	GACTTCAAGAGGTCTCTGTCT	57	417 - 437	
RT_Tc_GAPDH_F	CCGGGATGGCGTTTCAG	58	677 - 692	45
RT_Tc_GAPDH_R	CCAAACGCACCGTCAAATC	59	739 - 721	
RT_SI_GAPDH_F	CAACTGGCGTTTTTACCACA	57	289 - 308	104
RT_SI_GAPDH_R	AACATACATTGGGGCGTCA	57	374 - 392	
RT_SI_β-actina_F	TCAACACCCCGCTATGT	57	383 - 400	101
RT_SI_β-actina_R	GAGAAACGCCATCACCAGA	57	466 - 484	

### 3.2.5.2 Análises de qRT-PCR em *Sphenophorus levis*

Inicialmente diversos genes de *S. levis* tiveram a expressão diferencial analisada tanto ao longo do desenvolvimento, quanto nos tecidos das larvas de 30 dias de vida. A seção correspondente às preparações e análise desses materiais já foi previamente relatada no capítulo 1. Os resultados são discutidos neste capítulo, em função de sua importância para o entendimento não só do perfil de expressão, mas também dos efeitos do silenciamento via RNAi para a serpina e V-ATPase E de *Sphenophorus levis*.

As análises de qRT-PCR para verificar o silenciamento gênico das larvas de *S. levis* injetadas com dsRNA foram realizadas em condições experimentais similares àquelas utilizadas para verificar a expressão diferencial detalhadas no primeiro capítulo. Foram utilizados pools de 3 larvas para a extração dos RNAs,

coletados 1, 2, 4 e 7 dias após a injeção dos dsRNAs. Os *primers* utilizados para as análises de RT-PCR de *S. levis* foram desenhados utilizando o programa *Primer 3* v4.0 ([www.frodo.wi.mit.edu/primer3](http://www.frodo.wi.mit.edu/primer3)) com parâmetros específicos para qRT-PCR, e são mostrados na tabela 3.2. O gene GAPDH foi utilizado como normalizador para todos os experimentos. O gene da  $\beta$ -actina também foi utilizado como calibrador para confirmar o silenciamento nas larvas de *S. levis* injetadas com dsRNA para a V-ATPase E.

### 3.3 Resultados e discussão

Para o silenciamento em *S. levis* e também no coleóptero *T. castaneum*, o qual é um organismo modelo para estudos envolvendo RNA de interferência foram escolhidos dois genes alvos, V-ATPase E e serpina. As V-ATPases já são conhecidas como alvos extremamente robustos, cujo silenciamento via RNAi resulta em fenótipo letal para vários insetos de diferentes ordens. Por outro lado, o gene que codifica a serpina foi escolhido em função da sua dissimilaridade de sequência e também considerando que mutantes de *Drosophila* para, ao menos, 5 serpinas desenvolvem fenótipos letais (Ligoxygakis et al., 2002; Garret et al., 2009).

#### 3.3.1 Análise das sequências e clonagem para a produção dos dsRNAs.

##### 3.3.1.1 Identificação do gene homólogo da serpina 1 de *Sphenophorus levis* em *Tribolium castaneum*

Em função da sua baixa similaridade de sequência de DNA da serpina de *S. levis* com outros insetos, que não passa de 45% com outras serpinas de coleópteros, o silenciamento do gene que codifica a serpina via RNAi pode garantir especificidade para a espécie praga. Além disso, as serpinas de coleópteros são muito pouco estudadas, sendo que a maioria dos estudos funcionais é realizada com larvas de insetos lepidópteros, assim como mutantes de *Drosophila*. A redução dos níveis de RNAm e conseqüentemente dessa proteína pode gerar indícios sobre sua função biológica, que ainda é desconhecida. De uma maneira geral, as serpinas de insetos com função conhecida estão relacionadas ao sistema imune, sendo que muitas delas modulam direta ou indiretamente a ativação da enzima

profenoxidase, a síntese de peptídeos antimicrobianos ou o processo de coagulação da hemolinfa (Kanost et al., 2004).

O baixo grau de conservação entre as serpinas de insetos é muito provavelmente devido ao grande número de variantes desses inibidores, originados por eventos de duplicação gênica. No genoma de *Drosophila melanogaster* foram identificadas 28 serpinas, 14 em *Anopheles gambiae* e somente 4 em *Apis mellifera* (Zou et al., 2007). No genoma do bicho da seda, *Bombyx mori*, foram identificadas 34 serpinas e estudos evolutivos baseados nas sequências dessas proteínas indicam a ocorrência de um processo de duplicação gênica para essa família gênica (Zou et al., 2009). Esses eventos de duplicações não são restritos a insetos da ordem Lepidoptera e também ocorreram no coleóptero *Tribolium castaneum*, que ao todo possui 31 serpinas identificadas (Zou et al., 2007).

Nas análises de similaridade da serpinas 1 de *S. levis* contra as serpinas de *T. castaneum*, várias serpinas desse inseto apresentaram baixa identidade com a serpinas de *S. levis*, o que dificulta a identificação do provável gene homólogo. Os resultados do Blastx retornaram 8 serpinas com identidade variando de 42 a 49%, porém com diferentes coberturas da sequência de *S. levis*, que variam de 90 a 98%. O alinhamento de 6 serpinas selecionadas de *T. castaneum* com a serpinas 1 e 2 de *S. levis* é mostrado na figura 3.3, indicando a baixa identidade.

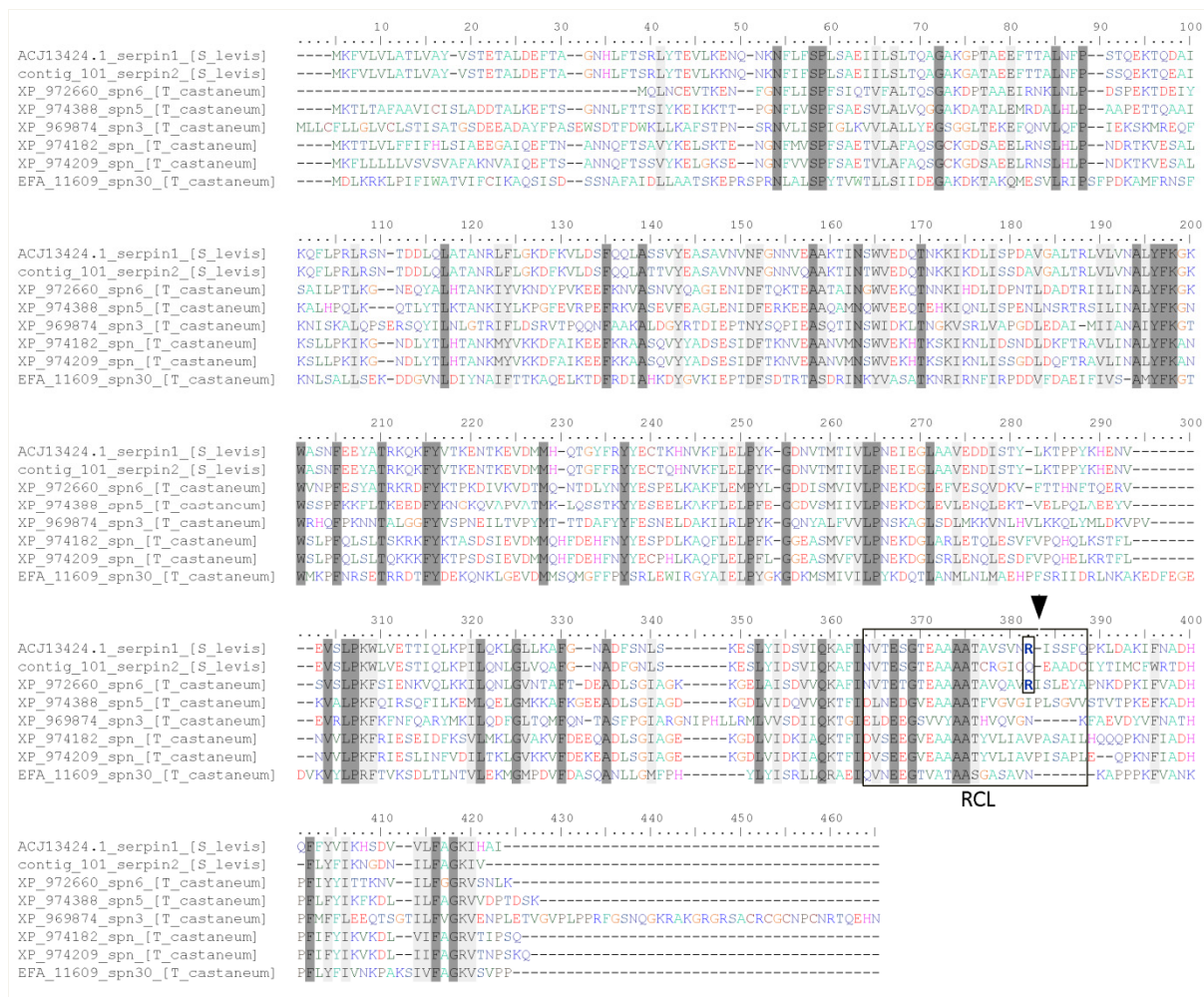


Figura 3.3: Alinhamento das sequências de aminoácidos entre as serpinas 1 e 2 de *Sphenophorus levis*, com as proteínas mais similares identificadas pela análise de Blastx contra o banco de dados de *Tribolium castaneum* disponível no GenBank. Os resíduos idênticos estão indicados em caixas escuras, enquanto os resíduos conservados são mostrados nas caixas claras. A baixa similaridade da sequência da proteína que codifica o gene da serpina 1 de *S. levis* reflete na dificuldade de identificação do gene homólogo em *T. castaneum*. A serpina 6 de *T. castaneum* foi escolhida como a provável proteína homóloga da serpina 1 de *S. levis* em função de sua maior similaridade e identidade de aminoácidos no reactive center loop (RCL), contendo uma arginina (R) na posição conhecida para a clivagem por tripsina bovina (Fonseca et al., 2011).

Em função dessa aparente redundância e baixa similaridade, a identificação do gene homólogo da serpina 1 de *S. levis* (Spn1) em *T. castaneum* seria duvidosa. Foram realizados diversos alinhamentos individuais da Spn1 com essas serpinas, e em função da sua maior similaridade, foi escolhida a serpina 6 de *T. castaneum* (Spn6) como o gene candidato ao homólogo da Spn1. Considerando o alinhamento completo entre as proteínas, indicado na figura 3.4, mesmo possuindo uma região N-terminal de 31 aminoácidos mais curta que a Spn1, a Spn6 apresenta o maior índice de similaridade (44,5%) dentre todas as serpinas de *T. castaneum*.



A serpina 1, ou leviserpina, tem sido estudada em nosso laboratório e o seu sítio de clivagem já havia sido mapeado para tripsina bovina e ocorre no resíduo de arginina (R<sup>350</sup>) (Fonseca et al., 2011). O *reactive center loop* (RCL) da serpina atua como uma isca para a peptidase alvo, sendo que os aminoácidos próximos ao ponto de clivagem, especialmente P1, são determinantes para a especificidade da serpina contra sua peptidase alvo (Johnson et al., 2006). Após a clivagem do RCL, é formada uma ligação covalente entre o complexo serpina-peptidase e a molécula da serpina sofre um dobramento na região do loop em direção ao seu polo oposto. Esse dobramento causa o deslocamento da serina reativa e danos estruturais na molécula da peptidase capturada (Huntington et al., 2000).

No alinhamento da figura 3.3, a única serpina que apresenta identidade para o resíduo de arginina (R<sup>350</sup>) é a Spn6, o que reforça a escolha desta serpina de *Tribolium castaneum* como a homóloga da Spn1. A anti trombina humana, assim como a Spn1, possui na posição P1 uma arginina que interage com o resíduo de glutamato (E<sup>195</sup>), o qual também influencia na sua atividade que é modulada pela heparina (Johnson et al, 2006). Esses resíduos também são conservados apenas entre a Spn1 e Spn6 e indicados por um asterisco na figura 3.4 que mostra a identidade entre essas proteínas. A análise de predição de peptídeo sinal aponta a clivagem da Spn1 entre os resíduos de aminoácidos 16 e 17: (VST-ET), enquanto a Spn6 não possui peptídeo sinal. Essa diferença não impede a existência de homologia entre as mesmas, uma vez que a Spn1 é transcrita em níveis próximos tanto na hemolinfa (0,3 x) quanto no corpo gorduroso (1 x) (Figura 3.9B). Além disso, em *Bombyx mori* foi detectado que o corpo gorduroso reabsorve serpinas durante o período em que o inseto inicia a fiação, levando ao desaparecimento desses inibidores (Shirai et al., 2000). Considerando que a maioria das serpinas de insetos são produzidas tanto no corpo gorduroso quanto na hemolinfa (Kanost et al., 1995; Chamankhah et al., 2003), a observação em *B. mori* ainda indica que pode ocorrer uma migração coordenada entre os tecidos durante diferentes fases de vida.

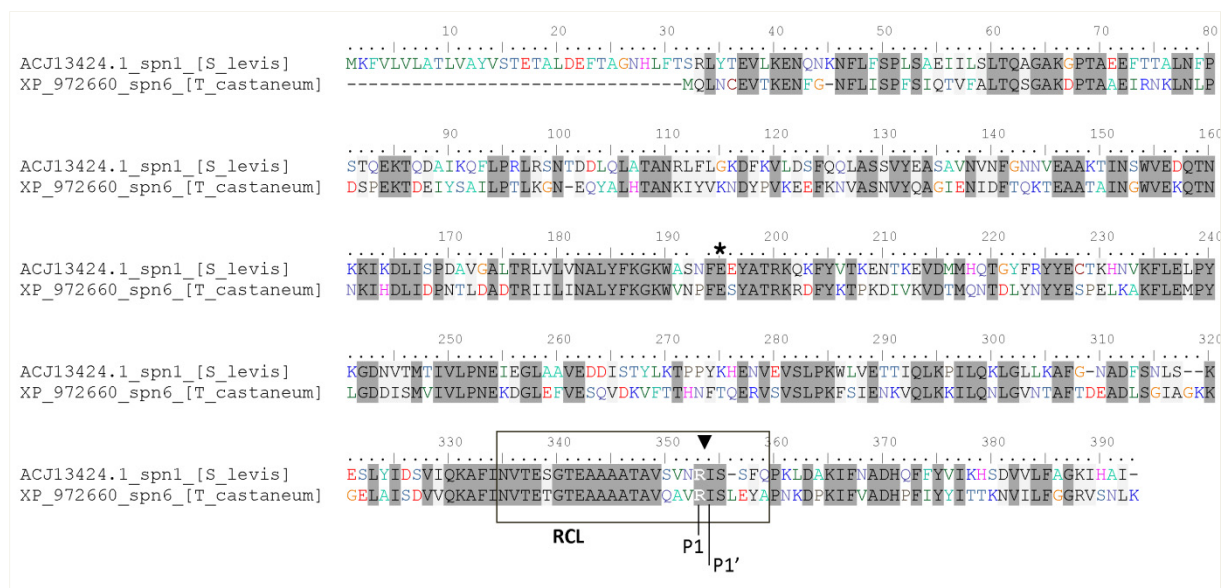


Figura 3.4: Alinhamento da sequência protéica da serpina de *S. levis* (Spn1) com a provável homóloga de *T. castaneum* (Spn6). As proteínas apresentam 44,5% de identidade de aminoácido. Desconsiderando a diferença no tamanho das proteínas devido à maior extensão da extremidade N-terminal da Spn1 a identidade chega a 49%. As caixas cinzas representam regiões de identidade. Note os aminoácidos P1 e P1' conservados no loop que é clivado pela peptidase. A arginina (R<sup>350</sup>) indicada com o asterisco correspondente ao aminoácido P1 da anti trombina humana, o qual interage com o resíduo de glutamato (E<sup>195</sup>) nesse inibidor (Johnson et al., 2006), também é conservado entre a Spn1 e Spn6.

Após a identificação da serpina 6 de *T. castaneum* como candidata homóloga à Spn1, foi analisada a identidade de sequência de cDNA entre os genes que codificam essas proteínas, cujo alinhamento é mostrado na figura 3.5. Os genes compartilham 52,45% de identidade e a sequência clonada da Spn1 para a produção de dsRNA (400 pb) não compartilha mais do que oito nucleotídeos sequenciais idênticos à Spn6. As análises de Blastn contra os ESTs de *T. castaneum* utilizando o Megablast descontínuo e também parâmetros otimizados para sequências com baixa similaridade indicaram a ausência de ESTs com mais de 11 nucleotídeos idênticos em tandem. Sabendo que após a injeção na hemolinfa, os longos dsRNAs 400 pb devem ser digeridos pela enzima dicer (Bernstein et al., 2001) endógena do inseto em siRNAs de 21 a 23 pb (Zamore et al 2000), e que a diferença entre 1 ou 2 nucleotídeos interna nesses pequenos siRNAs causa a perda efetiva da capacidade de degradação do RNAm (Elbashir et al., 2001), é esperado que o fragmento do gene Spn1 de *S. levis* utilizado para a produção de dsRNA não apresente efeitos no silenciamento da Spn6 de *T. castaneum*. Os efeitos da injeção cruzada de dsRNA da Spn1 no silenciamento da Spn6 são discutidos adiante.

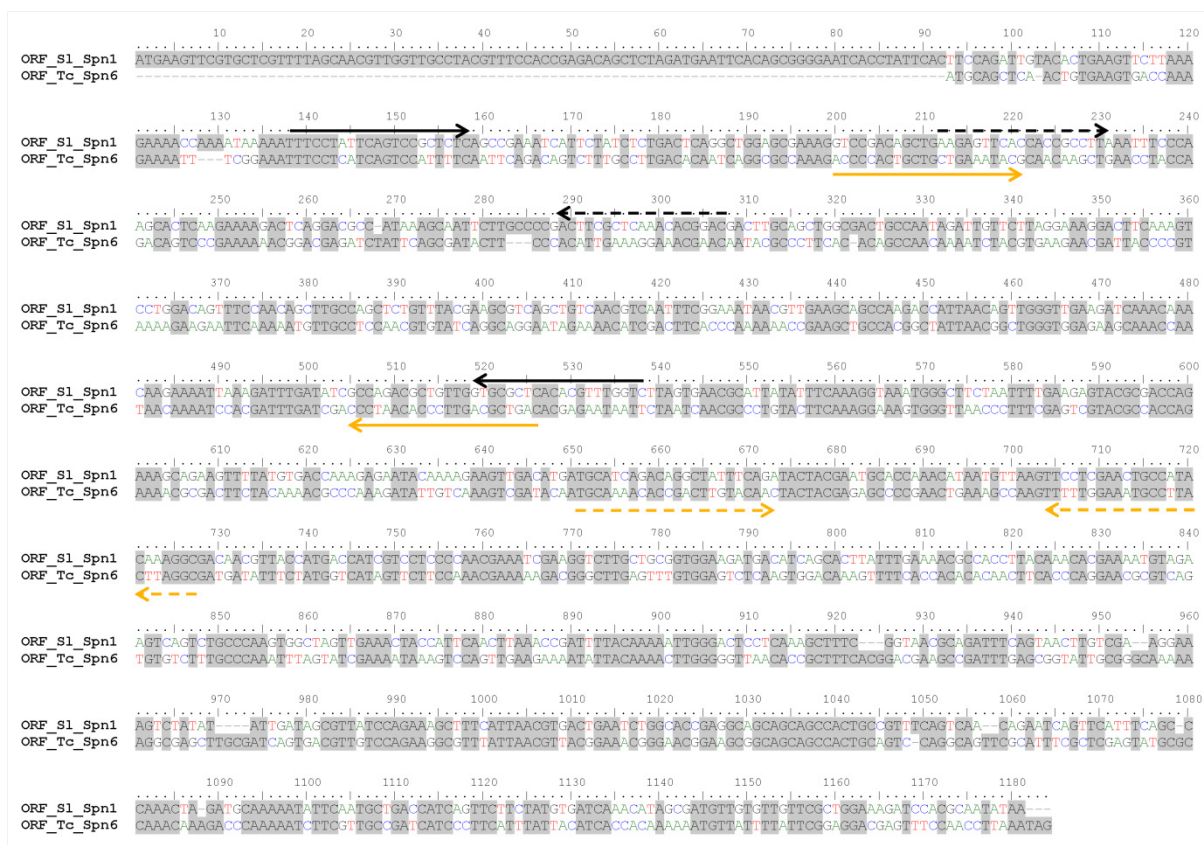


Figura 3.5. Sequências de DNA que codificam as ORFs da Spn1 e Spn6. As caixas cinzas indicam as regiões de identidade entre os genes, que compartilham 52,45% de identidade. As setas contínuas pretas e laranjas indicam os *primers* utilizados para a clonagem dos dsRNAs da Spn1 e Spn6, respectivamente. Note que a sequência clonada da Spn1 para a produção de dsRNA (400 pb), com os quais as larvas de *T. castaneum* também foram injetados não compartilha mais do que oito nucleotídeos sequenciais idênticos à Spn6. As setas secionadas representam os *primers* utilizados para as análises de qRT-PCR, em preto para *S. levis* e laranja para *T. castaneum*.

### 3.3.1.2 Clonagem das V-ATPases E de *S. levis* e *T. castaneum* e produção de dsRNAs.

Na biblioteca de *S. levis* foi identificado apenas um *singlet* para cada uma das subunidades A e E da enzima V-ATPase, o que indica a baixa expressão desses transcritos em relação às enzimas digestivas. Ensaios de alimentação com o coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera* mostraram resultados similares para o silenciamento das subunidade A e E da enzima (Baum et al., 2007). Nas análises iniciais de similaridade a subunidade E da V-ATPase de *S. levis* mostrou menor identidade contra a enzima homóloga de *T. castaneum* (GenBank: XM\_96528.1) e por isso foi escolhida para avaliar o efeito cruzado da administração de dsRNA de *S. levis* em *T. castaneum*.

A V-ATPase de *S. levis* é uma proteína constituída por 226 aminoácidos, com tamanho idêntico à proteína de *T. castaneum* (XP\_970621.1) e conservado entre todos os organismos analisados. No alinhamento completo das ORFs correspondentes dos dois insetos, as sequências de DNA que codificam essas proteínas compartilham 71,68% de identidade (Figura 3.6). Ao contrário das serpinas, as V-ATPases apresentam alto grau de conservação nas sequências de DNA mesmo entre organismos de classes distintas. Alinhamentos da sequência completa de DNA que codifica o gene da V-ATPase E de *S. levis* com as sequências homólogas mais similares identificadas utilizando o programa Blastn retornou V-ATPases de organismos de filos distintos, com identidade de sequência variando de 78% (*Xenopus laevis*) a 84% (*Tribolium castaneum*) e cobertura de 31% (*Gallus gallus*) a 46% (*Apis mellifera*).

No alinhamento da figura 3.6 também estão indicadas as regiões das sequências gênicas que foram clonadas de *S. levis* e *T. castaneum* para a produção de dsRNA. A região de sobreposição entre essas sequências compartilha 77,84% de identidade, com até 38 nucleotídeos idênticos em tandem (posição 43 a 80 na ORF). A similaridade dessas sequências, em teoria, possibilita o silenciamento da V-ATPase E de *Tribolium* mesmo com a injeção de dsRNA do gene homólogo de *S. levis*. Após a clivagem do dsRNA pela endonuclease do inseto, siRNAs de 21-23 pb idênticos aos RNAs que codificam essa enzima no besouro devem disparar o silenciamento gênico. Os *primers* utilizados para as análises de RT-PCR foram desenhados externamente à região de clonagem para a produção de dsRNAs das V-ATPases (Figura 3.6).

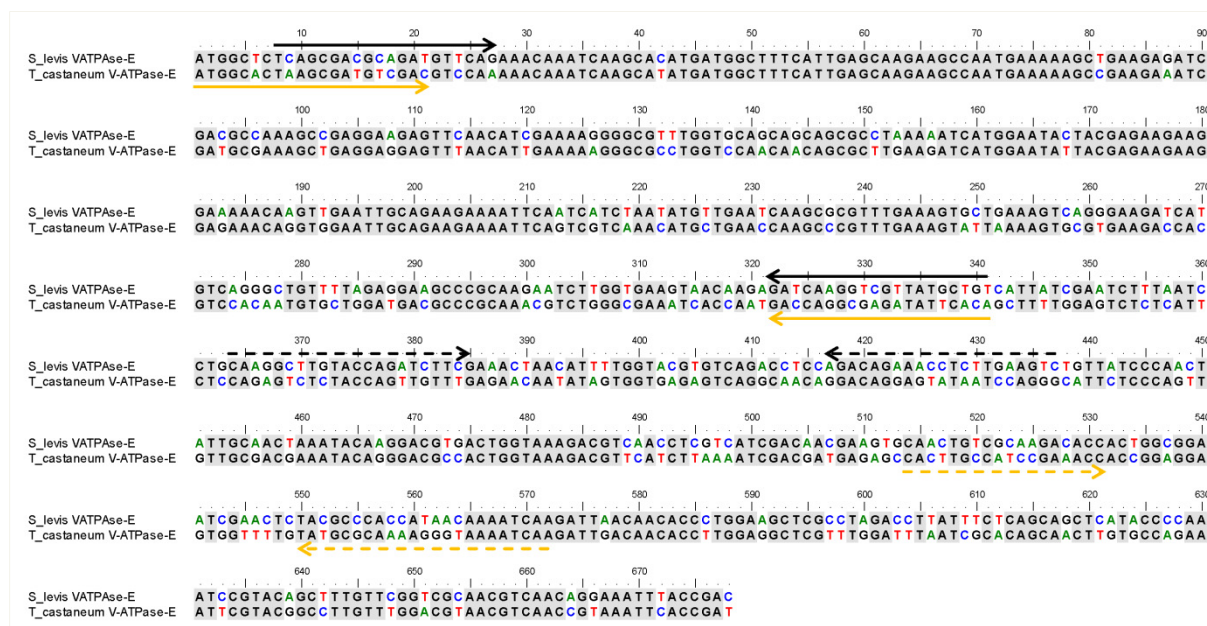


Figura 3.6: Alinhamento entre os fragmentos de cDNA clonados das V-ATPases E de *S. levis* e *T. castaneum* para a produção de dsRNA. Os amplicons para as sequências de *T. castaneum* e *S. levis* tem 341 e 334 pb, respectivamente, e apresentam 77,84% de identidade de sequência de DNA, com até 38 nucleotídeos idênticos em tandem (posição 43 a 80 da ORF). As ORFs completas compartilham 71,68% de identidade. As setas contínuas pretas e laranjas indicam os *primers* utilizados para a clonagem e produção de dsRNAs das V-ATPases E de *S. levis* e *T. castaneum*, respectivamente. As setas seccionadas correspondem aos *primers* utilizados para as análises de RT-PCR, indicados pelo mesmo padrão de cor, preto para *S. levis* e laranja para *T. castaneum*.

Após a clonagem dos fragmentos selecionados para as enzimas homólogas de *S. levis* e *T. castaneum*, cada plasmídeo construído foi clivado em separado com as duas enzimas de restrição utilizadas para a clonagem. Desse modo, os plasmídeos clivados com a enzima *downstream* ao amplicon foram utilizados para a produção de ssRNA sense. A clivagem do plasmídeo *upstream* ao amplicon resulta na produção do RNA simples fita antisense (Figura 3.7). Após a síntese dos ssRNAs eles foram purificados por precipitação e quantificados. Concentrações idênticas das fitas complementares foram utilizadas para a hibridização *overnight* e os dsRNAs resultantes foram utilizados para a injeção nos insetos após a quantificação.

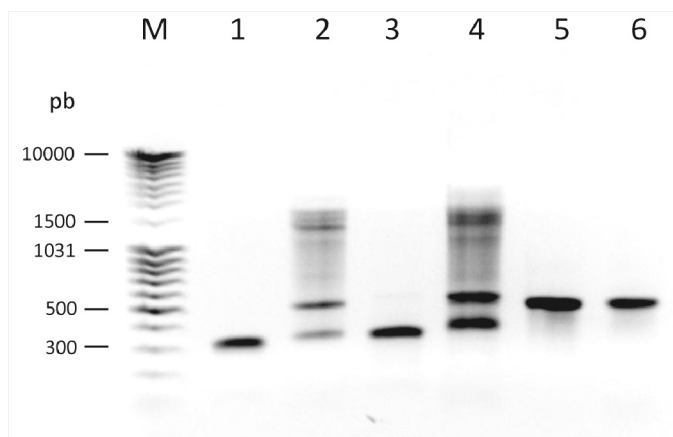


Figura 3.7: Síntese de ssRNA. Gel de agarose 1% (TBE 0,5X) não desnaturante, indicando produção de ssRNAs com o sistema de transcrição *in vitro* MEGAscript T7 Transcription Kit (Applied Biosystems / Ambion). Quantidades variando de 0,9 a 2,6  $\mu$ g de ssRNA foram carregados em cada caneleta. M: marcador de peso molecular. 1 e 2: ssRNAs sense e antisense da V-ATPase E de *S. levis*; 3 e 4 : ssRNAs sense e antisense da Spn1; 5 e 6 ssRNAs sense e antisense do gene que codifica resistência à kanamicina. Nas caneletas 2 e 4 é observada a formação de estruturas secundárias para as fitas antisense da V-ATPase E e Spn1, o que é esperado para um gel não desnaturante. O material foi precipitado, purificado e quantificado para a hibridização e produção dos dsRNAs.

### 3.3.2 Análise da expressão diferencial tecido específica e durante o desenvolvimento por qRT-PCR

Para melhor compreender a dinâmica transcricional dos dois genes selecionados para silenciamento, eles tiveram seus níveis de transcrição monitorados por qRT-PCR ao longo do desenvolvimento em ambos insetos. Para *S. levis*, os níveis de transcrição da V-ATPase E e Spn1 foram analisados durante o desenvolvimento e também em diferentes tecidos, dissecados de larvas com 30 dias de vida.

#### 3.3.2.1 Expressão da V-ATPase E e serpina 6 de *T. castaneum* durante o desenvolvimento

Os gráficos apresentados na figura 3.8 indicam a expressão da V-ATPase E e também Spn6 de *T. castaneum* durante seu ciclo de vida. A V-ATPase E tem um perfil de expressão quase uniforme e é transcrita em todos os estágios do desenvolvimento (Figura 3.8A). A serpina 6 deste inseto também é transcrita em todos os estágios analisados em níveis crescentes até a fase de pupa, onde atinge a expressão máxima, 8,3 vezes mais transcrita do que no primeiro estágio larval, 1,9 vezes mais do que o estágio de pré-pupa e 3 vezes em relação aos adultos (Figura

3.8B). A expressão detectada em todas as fases do desenvolvimento demonstra a importância fisiológica das proteínas produzidas por ambos os genes do inseto. A análise prévia do perfil de expressão da Spn1 de *S. levis*, (Fonseca et al., 2011) foi um fator determinante para a escolha deste gene como alvo para silenciamento.

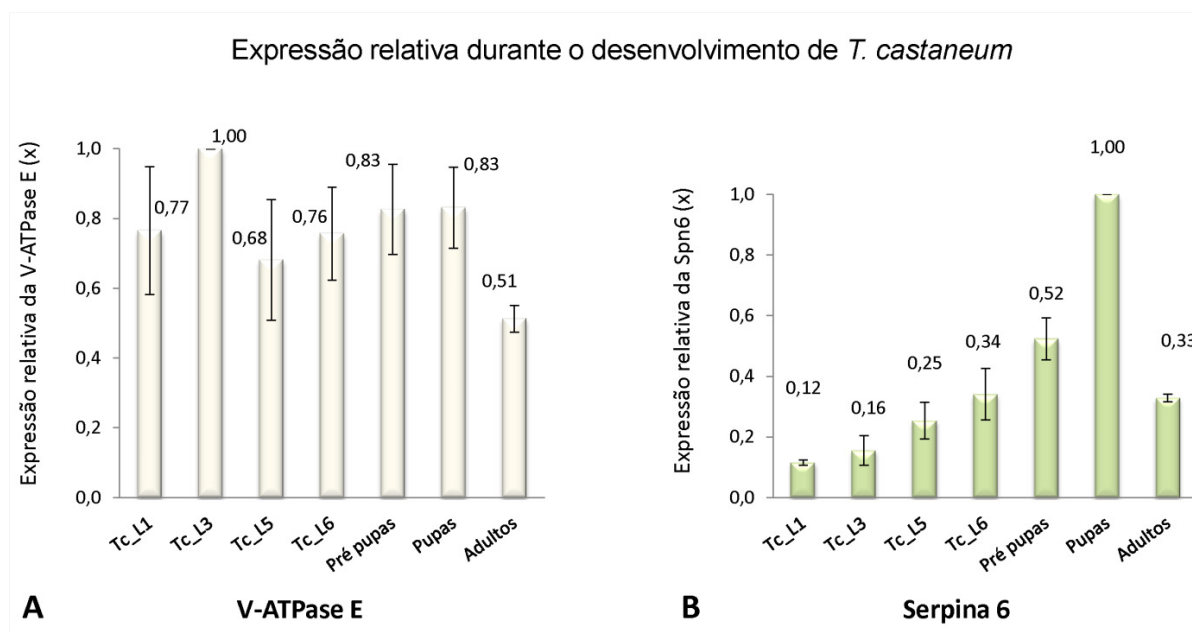


Figura 3.8: Análise de qRT-PCR indicando o perfil de transcrição dos genes de *T. castaneum* ao longo do desenvolvimento. (A) Expressão relativa da V-ATPase E indicando que o gene é transcrito em todos os estágios de desenvolvimento em níveis não muito distintos. (B) A análise de expressão da Spn6 evidenciou a transcrição desse gene também durante todas as fases analisadas, com níveis crescentes ao longo do desenvolvimento e expressão máxima nas pupas.

### 3.3.2.2 Análise da expressão da serpina 1 de *S. levis*

O perfil de transcrição detectado para a Spn1 durante o desenvolvimento do inseto, mostrado na figura 3.9A é muito similar àquele da Spn6 de *T. castaneum* (Figura 3.8B). Esse resultado, considerando o padrão de expressão no desenvolvimento, é um indicativo de que a Spn1 e Spn6 podem ser genes ortólogos. A Spn27a de *Drosophila*, também tem expressão constitutiva e expressão máxima nas pupas (De Gregório et al., 2002). A presença constante dessa serpina confirma a participação dessa serpina modulando negativamente a resposta imune, a qual é induzida pela presença de micro-organismos (De Gregório et al., 2002; Ligoxygakis et al., 2002).

Três serpinas (1a, 1b, 1c) do lepidóptero *Mamestra configurata* também são produzidas constitutivamente em ovos, larvas e adultos. Nas larvas, essas serpinas são fundamentalmente produzidas no corpo gorduroso e hemócitos presentes na

hemolinfa, cuja principal função é defesa. Entretanto, os níveis dessas serpinas não são alterados após o desafio por ferimento ou inoculação de bactéria, o que indica a participação desses inibidores em processos não imunes, relacionados ao desenvolvimento e morfogênese (Chamankhah et al., 2003).

Por outro lado, nem todas as serpinas de insetos são produzidas constitutivamente. Em *Manduca sexta* (Lepidoptera), a serpin 1 foi detectada abundantemente por Northern blot no quarto e quinto estágios larvais, mas não é transcrita no corpo gorduroso de pupas e adultos (Kanost et al., 1995). Contudo, nesse estudo, a expressão não foi avaliada em outros tecidos. Levando em conta a redução do corpo gorduroso nesses estágios do desenvolvimento, ainda é possível que a transcrição ocorra na hemolinfa. Curiosamente, a expressão dessa serpin é regulada negativamente pela ecdisona, e picos desse hormônio no período de muda causam um drástico declínio nos RNAs da serpin 1. A inoculação de bactéria ou ferimento também não induz a produção desta serpin (Kanost et al., 1995).

O perfil de expressão tecido específico da Spn1 de *S. levis* indicado na figura 3.9B indica a produção de RNAs predominante no corpo gorduroso, assim como em níveis menores (0,3 x) na hemolinfa, como esperado, devido à existência de hemócitos nesse tecido. A Spn1 também é transcrita na epiderme (0,16 x) e cabeça (0,21 x), porém é muito menos abundante no intestino. Em *Manduca sexta*, a maior produção de RNA da serpin 1 foi detectada também na gordura, e a variação dos níveis de transcritos é correlata com a quantidade de proteína na hemolinfa (Kanost et al., 1995), o que indica a ausência de processos de regulação pós transcricionais.

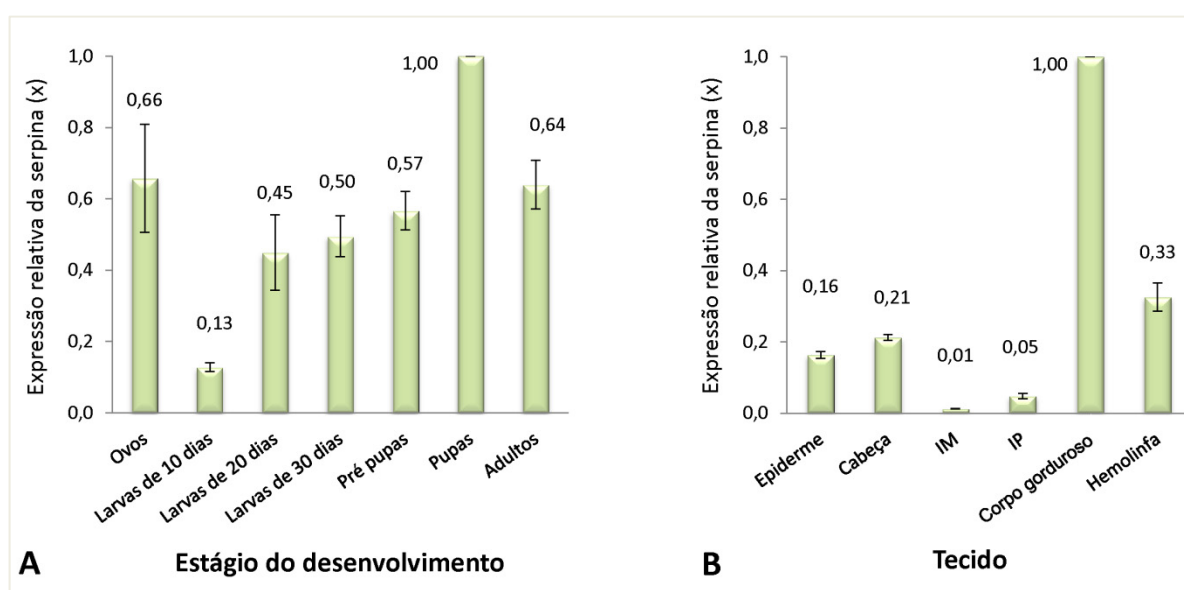




Figura 3.9: Análise de qRT-PCR indicando o perfil de transcrição do gene que codifica a serpina de *Sphenophorus levis* (Spn1). (A) Expressão relativa ao longo do desenvolvimento, em condições de dieta artificial, indicando que o gene é transcrito em todos os estágios de desenvolvimento, com expressão máxima em pupas, índices elevados de transcrição também são detectados nos ovos (0,66 x) e adultos (0,64 x). (B) A análise de expressão tecido específica da serpina aponta a transcrição em todos os tecidos, com índices reduzidos no intestino. No corpo gorduroso, a enzima é 100 (x) mais transcrita do que no intestino médio (IM) e 20 (x) mais do que no intestino posterior (IP). Transcritos da serpina também foram detectados em níveis intermediários na epiderme, cabeça e hemolinfa.

A serpina 1 de *M. configurata* também é produzida principalmente no corpo gorduroso, mas a maior parte das proteínas são liberadas na hemolinfa. Neste inseto, durante o período de muda, ocorre um drástico aumento da atividade de serino peptidases, concomitante com a queda da expressão da serpina (Chamankhah et al., 2003), o que indica a participação desse inibidor em processos relacionados ao desenvolvimento.

Zheng e colaboradores (2009) identificaram quatro serpinas de *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera) que são produzidas ao longo do desenvolvimento deste inseto e verificaram a redução dos níveis de transcrição, especialmente da serpina 1a, durante o período de muda. Os transcritos para a serpina 1a foram encontrados mais abundantemente na epiderme e corpo gorduroso do que no intestino, mas a detecção desse inibidor em todos os tecidos pode indicar efeitos pleiotrópicos. Dentre as quatro serpinas, a serpina 1a foi a proteína mais abundante identificada utilizando anticorpos específicos. Os níveis de expressão dessa proteína aumentam após a muda para o último ínstar larval, atingindo o máximo nas pré-pupas e pupas. Interessantemente, os perfis de transcrição identificados para a Sl\_Spn1 (Figura 3.9A) e Tc\_Spn6 (Figura 3.8B) refletem perfeitamente a abundância da serpina 1 de *C. fumiferana*.

Ensaio *in vitro* mostraram que a serpina 1 *C. fumiferana* é capaz de formar um complexo com elastase, uma serino protease relacionada à degradação da cutícula de insetos. Esses resultados apontam a participação dessa serpina na regulação da degradação da cutícula durante o ciclo de muda (Zheng et al., 2009). Nesse trabalho, os autores selecionaram diversos prováveis genes ortólogos de insetos de diferentes ordens para uma análise filogenética. Apenas quatro serpinas de coleópteros foram escolhidas, o que reforça a existência de poucos estudos com as serpinas de insetos desta ordem. Dentre elas, a serpina 1 de *S. levis* mostrou-se

a mais distinta, e foi agrupada junto à serpina 5 de *T. castaneum*, a qual apresenta muita similaridade com a Tc\_Spn6.

### 3.3.2.3 Expressão das V-ATPase E de *S. levis*

A análise de RT-PCR indicou a produção da V-ATPase E de *S. levis* durante todos os estágios de desenvolvimento analisados em níveis não muito distintos (Figura 3.10A), com um padrão similar ao do gene ortólogo de *T. castaneum* (Figura 3.8A). Este ensaio também revelou que os transcritos para V-ATPase E são predominantes no intestino médio e posterior, mas também sintetizados em todos os outros tecidos analisados (Figura 3.10B).

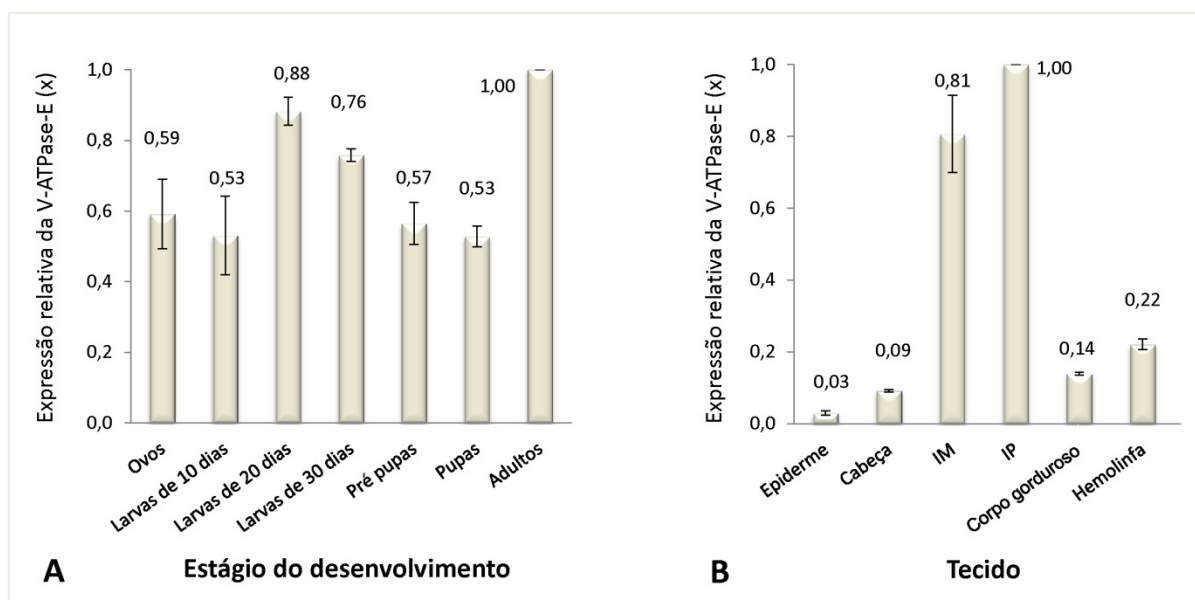


Figura 3.10: Análise de expressão relativa da V-ATPase E de *S. levis* por qRT-PCR. (A) O perfil de expressão ao longo do desenvolvimento indica expressão constitutiva, em taxas não muito distintas. (B) A análise da transcrição tecido específica mostra a transcrição predominante da V-ATPase E no intestino das larvas do inseto, mas também é detectada em níveis consideráveis em todos os outros tecidos.

Esses resultados estão de acordo com a função da V-ATPase, pois essa enzima atua em diversos tipos celulares promovendo o transporte de íons necessário para a acidificação de organelas intracelulares, além de ter um importante papel em todo o transporte secundário no intestino de insetos. No intestino, o gradiente eletroquímico gerado pelo fluxo ativo dos íons  $H^+$  através das membranas celulares constitui uma das principais forças motrizes responsável pela manutenção do pH do lúmen além da facilitação do transporte de solutos, que inclui a absorção de aminoácidos (Wieczorek et al., 1999).

### 3.3.3 Análise do silenciamento gênico via injeção de dsRNA em *Tribolium castaneum*

As larvas de *T. castaneum* injetadas com dsRNA foram monitoradas para a análise fenotípica e durante sete dias três exemplares de cada tratamento foram coletados diariamente e congelados em nitrogênio líquido. Os insetos coletados foram utilizados nas análises de RT-PCR para verificar o silenciamento gênico específico. A tabela 3.3 mostra o número de insetos injetados com cada tratamento além da contagem diária dos insetos mortos e número de insetos restantes após as coletas (10 a 17 espécimes). Essas larvas também foram injetadas com tampão PBS pH 7,0 para avaliar a inocuidade do controle utilizando dsRNA do gene que codifica a proteína de resistência a kanamicina.

Tabela 3.3: Contagem das larvas mortas de *T. castaneum* após injeção com dsRNA e PBS. Diariamente, durante sete dias, três exemplares de cada tratamento foram coletados. Nesta etapa, as mortes podem ser atribuídas ao vazamento de hemolinfa decorrente das injeções.

Tratamento	27/01/11	28/01/11	29/01/11	30/01/11	31/01/11	01/02/11	02/02/11	03/02/11	Restantes	Mortos
	N (#)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7		
PBS	41	4	0	0	0	1	0	2	13	7
Kana (R) dsRNA	41	0	1	0	0	0	2	0	17	3
Sl V-ATPase E dsRNA	39	5	1	0	0	1	0	1	10	8
Sl Spn1 dsRNA	40	0	0	0	2	1	0	0	16	3
Tc V-ATPase E dsRNA	41	1	0	0	3	1	1	1	13	7
Tc Spn6 dsRNA	38	2	2	0	2	0	1	0	11	7

O número de insetos mortos em cada tratamento durante a primeira semana após as injeções é indicado na última coluna da tabela 3.3. Na maioria dos tratamentos sete larvas morreram nesse período, com exceção daquelas injetadas com dsRNA da serpina 1 de *S. levis* e dsRNA da kanamicina (R), com apenas três mortes cada. Os dados apresentados a seguir, relativos às próximas semanas, explicam a ausência de análises estatísticas para comparar os resultados da primeira semana. Além disso, a morte de insetos injetados com ambos tratamentos controle indica que a maioria dessas mortes é decorrente da injeção, principalmente devido ao vazamento de hemolinfa.

Na tabela 3.4 segue a contagem dos insetos monitorada até 55 dias após a injeção, quando ambos controles (PBS e dsRNA da Kanamicina) completam o ciclo

de desenvolvimento atingindo a fase adulta. Na segunda semana após a injeção todos os insetos injetados com dsRNAs das V-ATPases ortólogas morreram (Figura 3.11). Curiosamente, as larvas de *T. castaneum* injetadas com dsRNA da V-ATPase de *S. levis* morreram três dias antes daquelas injetadas com o dsRNA do gene do próprio inseto. A região de 334 pb da sequência gênica da V-ATPase E de *S. levis* foi reanalisada contra o banco de ESTs de *T. castaneum* em busca de fragmentos de 21 nucleotídeos idênticos que pudessem atuar no silenciamento de outros genes além da V-ATPase E. Entretanto, nenhuma região com identidade foi encontrada.



Figura 3.11: Larvas de *T. castaneum* injetadas com dsRNA da V-ATPase E ortóloga de *S. levis*, após cinco semanas das injeções. O fenótipo observado para o tratamento com dsRNA do gene endógeno é o mesmo. Esses insetos morreram 12 dias após as injeções, três dias antes daqueles injetados com o dsRNA do gene endógeno do inseto.

Tabela 3.4: Monitoramento das larvas de *Tribolium castaneum* injetadas com dsRNAs e PBS até a fase adulta. Todos os insetos injetados com dsRNA das V-ATPases dos dois insetos morreram na segunda semana após a injeção, e aparecem destacados em verde. As caixas cinzas indicam que não há atraso no desenvolvimento dos insetos injetados com dsRNA das serpinas, em relação aos controles. A última coluna, destacada em laranja, mostra o resultado final com vários insetos de ambos controles atingindo a fase adulta, além daqueles injetados com dsRNA da serpinina 1 de *S. levis*.

Tratamento	08/02/2011 Dia 12					11/02/2011 Dia 15					17/02/2011 Dia 21				
	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.
PBS	1	5	7	-	12	0	3	9	-	12	0	1	11	0	12
dsKana Res	2	13	2	-	15	0	6	9	-	15	0	2	13	0	15
SI V-ATPase E dsRNA	10	0	0	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
SI Spn1 dsRNA	2	9	5	-	14	0	5	9	-	14	1	1	12	0	13
Tc V-ATPase E dsRNA	1	12	0	-	12	12	0	0	-	0	-	-	-	-	0
Tc Spn6 dsRNA	0	7	4	-	11	2	2	7	-	9	0	1	7	1	9
Tratamento	24/02/2011 Dia 28					28/02/2011 Dia 32					23/03/2011 Dia 55				
	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.
PBS	0	0	3	9	12	0	-	1	11	12*	2	-	0	9	9
dsKana Res	0	0	6	9	15*	0	-	4	10	14*	3	-	0	10	10
SI V-ATPase E dsRNA	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
SI Spn1 dsRNA	0	0	5	8	13	1	-	4	8	12	2	-	0	10	10
Tc V-ATPase E dsRNA	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
Tc Spn6 dsRNA	0	0	2	7	9	0	-	2	7	9	9	-	0	0	0

Nos testes piloto realizados para verificar os efeitos da injeção, foi utilizado apenas PBS como controle e o dsRNA da serpinina foi injetado em concentrações maiores, próximas de 850 ng, contra 350 ng utilizados neste experimento. Na primeira situação do teste piloto, sete insetos injetados com dsRNA para a serpinina 6 de *T. castaneum* morreram na fase pupal, sem completar o desenvolvimento, outros dois morreram como adultos farados, um deles se desenvolveu normalmente e sete larvas injetadas com PBS chegaram à fase adulta (dados não mostrados). Os resultados apresentados para a Spn6 na tabela 3.4 diferem do teste inicial, pois na segunda injeção sete insetos morreram como adultos farados (Figura 3.12), enquanto apenas dois ficaram aprisionados na fase pupal. De qualquer forma, nenhum dos insetos tratados com dsRNA da Spn6 completou o desenvolvimento,

indicando que a serpina 6 é um alvo tardio e de variação no fenótipo, porém letal. A maioria dos insetos não foi capaz de se liberar a cutícula da fase pupal, morrendo como adultos farados indicados na figura 3.12B. Nessa figura, é verificada a mal formação das asas no primeiro adulto mostrado.

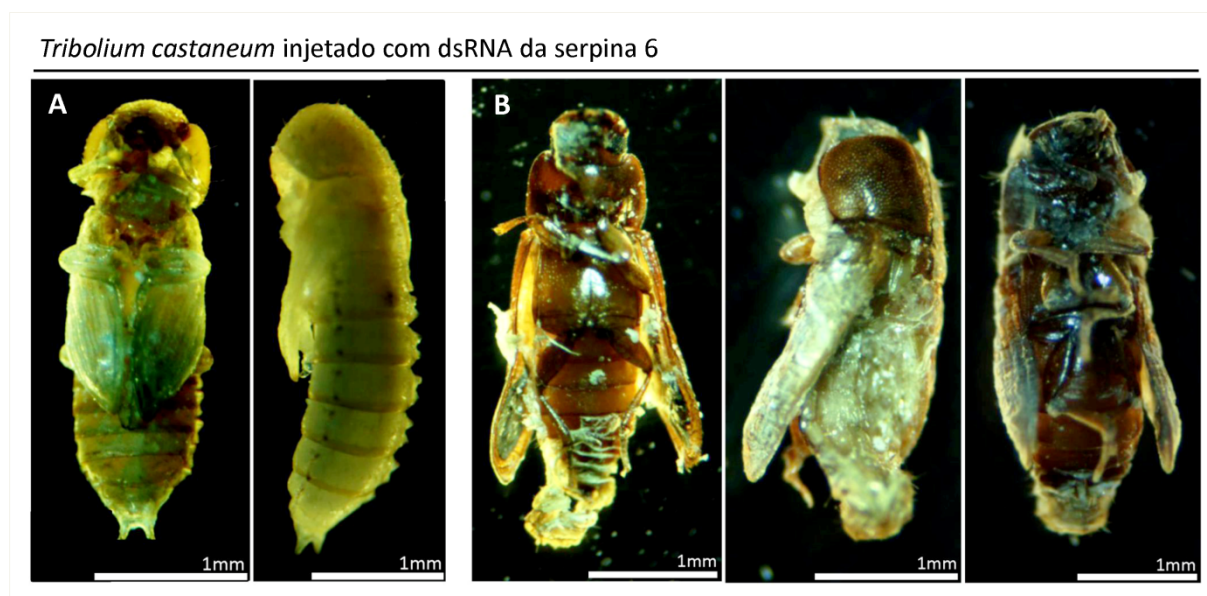


Figura 3.12: Larvas de *T. castaneum* injetadas com dsRNA da serpina 6 do inseto. Aparentemente as larvas e pupas (A) se desenvolveram normalmente, entretanto todos os insetos morreram no fim da fase pupal ou como adultos emergentes (B). O primeiro adulto apresenta as asas malformadas, enquanto os outros dois não perderam a cutícula da fase de pupa, morrendo como adultos farados. As imagens dos adultos foram tiradas 35 dias após as injeções.

As caixas cinzas da tabela 3.4 mostram que não houve atraso no desenvolvimento das larvas de *T. castaneum* tratadas com dsRNA das duas serpinas, quando comparados com os controles. Em conjunto, esses dados sugerem que maiores quantidades de dsRNA injetadas levam a um efeito mais precoce do silenciamento da serpina 6 de *T. castaneum* no desenvolvimento do inseto. A última coluna da tabela, destacada em laranja, mostra que os insetos tratados como controle, injetados tanto com PBS quanto com dsRNA da kanamicina (R), se desenvolveram normalmente chegando à fase adulta (Figura 3.13). A injeção de dsRNA da serpina de *S. levis* nas larvas de *T. castaneum* também não causou algum efeito, como esperado. Os insetos completaram o ciclo de vida até a fase adulta, indicando que as preparações de dsRNA da serpina 1 de *S. levis* não apresentaram efeito cruzado no desenvolvimento de *T. castaneum*, portanto constituindo um gene específico, dentre as duas espécies estudadas.

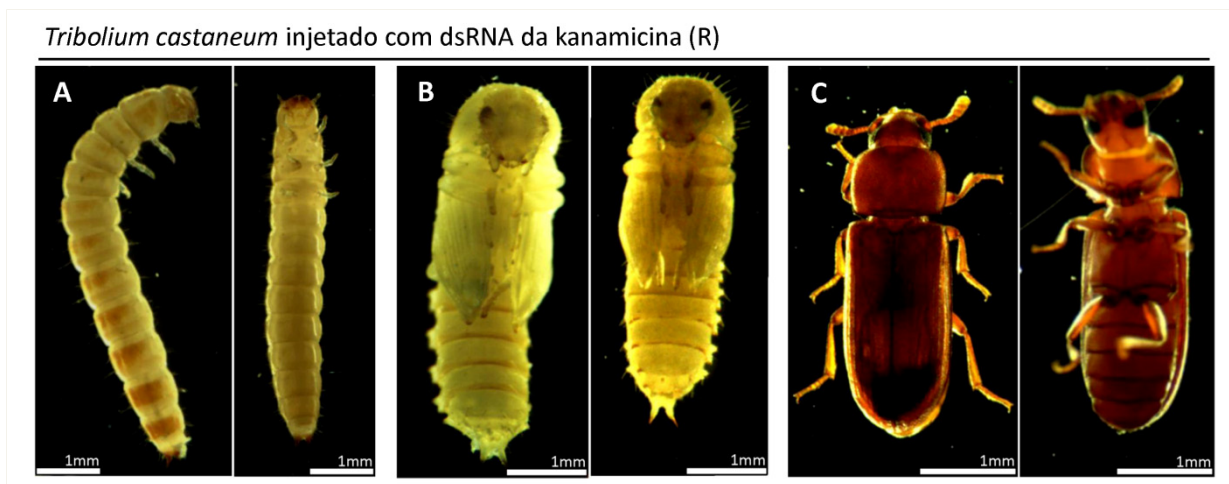


Figura 3.13: Desenvolvimento normal das larvas de *T. castaneum* injetadas com dsRNA da kanamicina (R). A: visão dorso lateral e ventral de larvas; B: visão ventral de pupas; C: visão dorsal e ventral de adultos. Esse grupo de insetos completou normalmente o ciclo de vida, assim como aqueles injetados com dsRNA da *Spn1* de *S. levis*.

Três larvas injetadas com dsRNA de cada preparação, coletadas diariamente durante a primeira semana, foram utilizadas para a análise de silenciamento gênico via RT-PCR. Os níveis de transcrição da V-ATPase E de *T. castaneum* foram estimados para os insetos coletados que foram injetados com dsRNA da V-ATPase E do próprio inseto, assim como para aqueles injetados com dsRNA do gene ortólogo de *S. levis*, e comparados com aqueles obtidos para os insetos injetados com dsRNA da kanamicina (R), o qual não deveria apresentar efeito no silenciamento V-ATPase E. Os resultados são mostrados no gráfico da figura 3.14, e os valores tomados dos níveis de transcrição são comparados àqueles dos insetos não injetados (N.I. = 1 x).

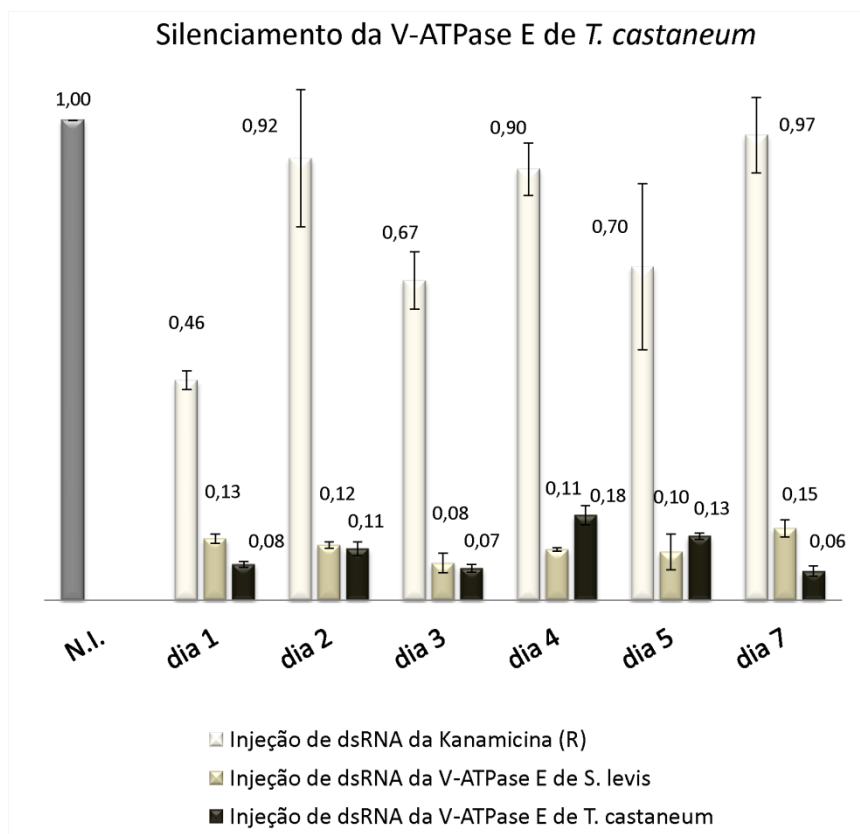


Figura 3.14: Análise do silenciamento da V-ATPase E de *T. castaneum* por qRT-PCR. Tanto nas larvas injetadas com dsRNA da V-ATPase do próprio inseto, quanto com dsRNA do gene ortólogo de *S. levis* foi detectada a redução dos níveis de transcrição da V-ATPase para 14,22% e 15,99%, respectivamente, quando comparadas com os insetos injetados com dsRNA controle da kanamicina (R). A barra cinza indica o nível de transcrição nas larvas não injetadas (1 x).

O silenciamento gênico foi detectado nas larvas de *T. castaneum* injetadas com dsRNA do inseto, assim como para o ortólogo de *S. levis*, que apresenta 77,84% de identidade da região de 334 pb utilizada para a produção dos dsRNAs. A redução detectada nos níveis de transcritos foi de 85,78% e 84,01% para o gene endógeno e ortólogo, respectivamente, comparados com os insetos injetados com dsRNA controle da kanamicina (R) (Figura 3.14). Esse resultado chama a atenção em relação à utilização de sequências gênicas conservadas entre famílias distintas de insetos como alvo para controle utilizando RNAi. O dsRNA de 334 pb preparado a partir da sequência gênica da V-ATPase do besouro *S. levis* (Curculionidae) tem a mesma ação inseticida em comparação com o material preparado da sequência específica da espécie *T. castaneum* (Tenebrionidae).

Resultados similares já foram previamente relatados em testes de alimentação com dsRNA produzidos para V-ATPases A e E e  $\alpha$ -tubulina de *Diabrotica virgifera virgifera*, os quais causaram mortalidade significativa em



bioensaios na espécie próxima *Diabrotica undecimpunctata howardii* (Baum et al., 2007). Nesse mesmo estudo, larvas do besouro do colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, submetidas à dieta contendo dsRNA para a subunidade A da V-ATPase de *D. virgifera*, que apresenta 83% de identidade de sequência, também tiveram índices de mortalidade elevados. As concentrações utilizadas de dsRNA (L.C. 50) para a obtenção das mesmas taxas de mortalidade das larvas de *L. decemlineata* foram dez vezes menores (5.2 ng/cm<sup>2</sup>) com dsRNA preparado a partir do endógeno, quando comparado com o dsRNA do ortólogo de *D. virgifera* (52 ng/cm<sup>2</sup>).

Essas diferenças foram atribuídas à similaridade entre esses genes ortólogos e evidenciam que um dos aspectos mais importantes para o silenciamento gênico aplicado ao controle de pragas é a especificidade, baseada na identidade de sequência. Apesar de nem todos os insetos praga apresentarem sensibilidade à ingestão de dsRNA, é conhecido que importantes espécies polinizadoras, como por exemplo *Apis mellifera* também desenvolvem resposta sistêmica quando dsRNA é administrado na alimentação (Aronstein et al., 2006; Patel et al., 2007). Por essa razão, é fundamental o conhecimento do perfil transcriptômico, assim como da sensibilidade à ingestão de dsRNA em espécies de insetos não alvo, junto à identificação de genes alvos espécie específicos. A produção de grampos de dsRNA em plantas é promissora para o desenvolvimento de inseticidas de última geração, sem custos embutidos na produção, que dispensam aplicação, não geram resíduos tóxicos para o meio ambiente e não prejudicam espécies não alvo.

Em um estudo mais recente, dsRNAs de 158 pb de uma região menos conservada da V-ATPase E foram projetados para atuar especificamente, via alimentação, em quatro diferentes espécies: *T. castaneum* (Coleoptera), *Manduca sexta* (Lepidoptera), *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera) e *D. melanogaster* (Diptera). Os resultados mostraram seletividade dos dsRNA, que causou apenas a morte dos insetos a partir dos quais foram preparados, indicando que regiões gênicas específicas podem garantir especificidade do RNAi como inseticida. Para outro gene conservado, a gamma-tubulina, dsRNAs de 40 pb preparados a partir da região UTR 3' também foram eficientemente seletivos, dessa vez, para quatro espécies de *Drosophila* (Whyard et al., 2009). Esses resultados confirmam a aplicabilidade do RNAi como um inseticida estritamente seletivo e também reforçam a necessidade do

conhecimento genômico e transcriptômico de espécies não alvo para evitar o efeito cruzado, indesejável contra muitas espécies de insetos.

O mesmo delineamento experimental utilizado para avaliar o efeito do dsRNA das V-ATPases foi empregado para checar o efeito da injeção de dsRNAs da serpina 6 de *T. castaneum*, além do efeito cruzado da serpina 1 de *S. levis* nas larvas de *T. castaneum*. Os resultados das análises de RT-PCR são mostrados no gráfico da figura 3.15 e evidenciam o silenciamento gênico da Spn6 apenas no tratamento com dsRNA específicos para a serpina do próprio inseto, com a redução média nos níveis de transcrição de 81,05%. Assim como o grupo controle injetado com dsRNA da Kanamicina (R), os insetos injetados com dsRNA da Spn1 de *S. levis* não exibiram redução nos níveis de transcrição, como esperado de acordo com os resultados apresentados na tabela 3.4, pois estes se desenvolveram normalmente.

As variações representadas pelos altos níveis de expressão da Spn6 detectados para os insetos tratados com dsRNA da Spn1, especialmente no terceiro e sétimo dias podem ser resultado das variações intrínsecas do ciclo de muda dos insetos, como detectado para as serpinas 1 de lepidópteros. Além destas serpinas não aparentarem envolvimento ou resposta a processos imunes, os níveis de transcritos e também das proteínas parecem ser diretamente regulados negativamente pela presença da ecdisona, o hormônio da muda dos insetos, a qual é liberada no período que antecede à mudança de ínstar (Kanost et al., 1995; Chamankhah et al., 2003; Zheng et al., 2009).

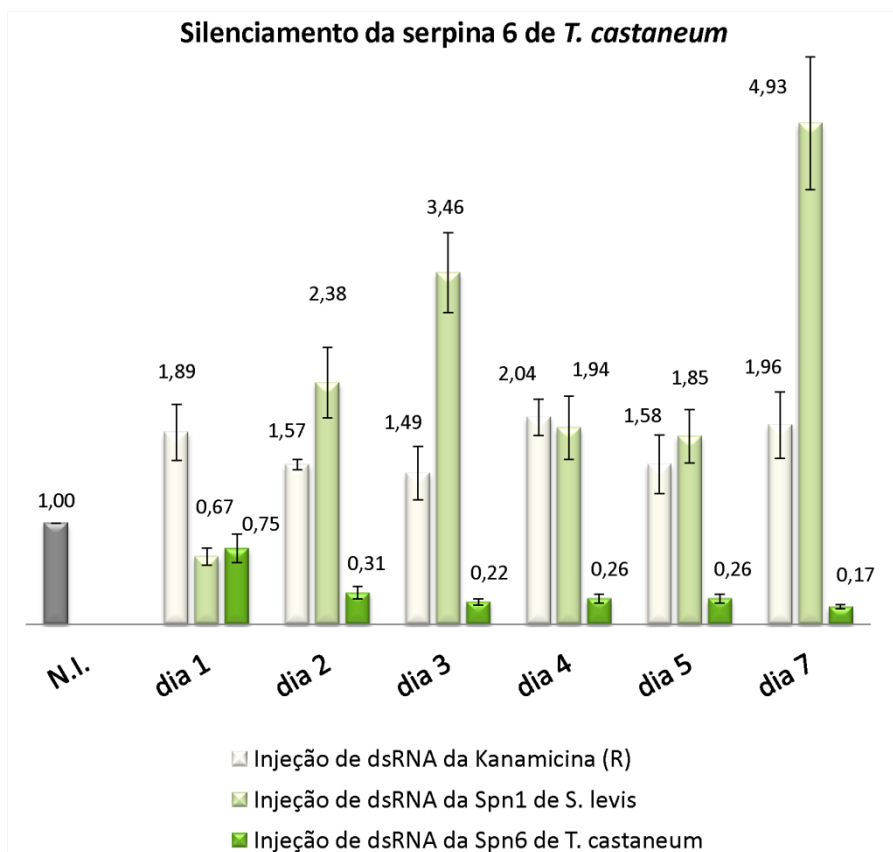


Figura 3.15: Análise de RT-PCR utilizando *primers* específicos para avaliar o efeito do silenciamento gênico da Spn6 de *T. castaneum*. Apenas as larvas injetadas com dsRNA de 341 pb sequência específico para a Spn6 apresentaram redução média de 81,05% nos níveis de transcrição da serpina 6. Os insetos tratados com dsRNA da Spn1 de *S. levis* exibiram níveis de transcrição da Spn6 similares aos controles tratados com dsRNA da kanamicina (R).

Em larvas de *Mamestra configurata* foi detectado que, no período de inanição que antecede a metamorfose, a expressão das variantes de serpina 1 é fortemente induzida no corpo gorduroso e em menores níveis em outros tecidos. Esse aumento da expressão detectado quando as larvas cessam a alimentação é contrário à queda subsequente que ocorre durante a muda e é, provavelmente, um mecanismo de prevenção da destruição dos tecidos durante os períodos em que os insetos não se alimentam. Apesar de o corpo gorduroso constituir o principal local de expressão da serpina 1, a localização da proteína indicou que essa proteína se associa a camadas subcuticulares e na membrana basal da maioria dos tecidos como músculos, intestino médio, túbulos de Malpighi e traquéias. A localização nesses tecidos, bem como a flutuação da expressão da serpina 1 em função da inanição e metamorfose reforçam a possibilidade de atuação desse inibidor no ciclo de muda do inseto (Chamankhah et al., 2003). Os efeitos do silenciamento da Spn6 de *T. castaneum* e Spn1 de *S. levis* são discutidos adiante.

### 3.3.4 Análise do silenciamento gênico via injeção de dsRNA em *Sphenophorus levis*

As larvas de *S. levis* injetadas com dsRNA da V-ATPase E endógena, Spn1 e kanamicina (R) foram coletadas em quatro dias no período da primeira semana para as análises de RT-PCR e o número de insetos restantes é indicado em laranja na tabela 3.5. Na terceira coluna, destacada em cinza, é mostrado que quase metade das larvas morreram devido ao vazamento de hemolinfa decorrente das injeções, logo no primeiro dia.

Tabela 3.5: Contagem das larvas de *Sphenophorus levis* injetadas com dsRNAs durante os dias de coleta para as análises de RT-PCR. O quadro cinza indica o grande número de insetos mortos no primeiro dia após a injeção devido ao vazamento da hemolinfa. O número de insetos restantes para as análises fenotípicas é mostrado no quadro laranja.

	19/04/11 Injeção	20/04/11 Dia 1			26/04/11 Dia 7		28/04/11 Dia 9	
Tratamento	N(#)	mortes	restantes	após coleta	Mortes	restantes	mortes	restantes
Kanam. (R)	36	15	21	18	1	8	1	7
V-ATPase E	37	18	19	16	0	7	1	6
Serpina 1	37	17	20	17	0	8	0	8

Após a eclosão dos ovos, o desenvolvimento das larvas de *S. levis* dura aproximadamente 45 dias até a fase pupal. Apesar das larvas de *S. levis* utilizadas para as injeções, com 10 dias de vida, serem mais jovens em relação às larvas de *T. castaneum* (injetadas no último ínstar, com aproximadamente 4 a 6 mm de comprimento e menos de 1 mm de diâmetro), as larvas de *S. levis* já são maiores nessa fase de desenvolvimento, medindo cerca de 5 a 8 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro. Mesmo com o maior tamanho das larvas de *S. levis* utilizadas para as injeções, as dificuldades encontradas para as injeções foram maiores, principalmente em função da resistência do tegumento à penetração da agulha e flacidez das larvas.

Esses fatores certamente influenciaram no vazamento da hemolinfa que resultou na morte de diversas larvas antes da detecção de algum efeito relativo ao silenciamento gênico. A coloração verde do corante MC Cornich foi observada nos meio de cultura de vários tubos nos quais as larvas foram mantidas após as injeções. Dificuldades similares foram observadas em injeções de dsRNA em larvas

de *Apis mellifera*, com taxas de sobrevivência de 67% a 88% (controle, PBS) após 36 horas das injeções (Aronstein e Saldivar, 2005). O vazamento de hemolinfa também foi detectado em adultos da mesma espécie após a retirada das agulhas (Amdam et al, 2003). A solução para o problema foi o desenvolvimento de um método que emprega dsRNA via alimentação (Nunes e Simões, 2009).

Após as coletas de larvas para os ensaios de silenciamento (RT-PCR), o número amostral restante (6 a 8 insetos) foi monitorado para as análises fenotípicas discutidas adiante. Na tabela 3.6, segue a contagem e monitoramento dos insetos até 59 dias após as injeções, quando o experimento foi encerrado em função das dificuldades de cultivo. Apesar dos insetos do grupo controle, injetados com dsRNA da kanamicina (R) aparentemente se desenvolverem normalmente, chegando à fase de pupa e adulta antes daqueles injetados com dsRNA da serpina 1, quatro desses insetos morreram na fase de pupa, certamente por problemas de cultivo. O inseto do grupo controle, que chegou à fase adulta é mostrado na figura 3.16.

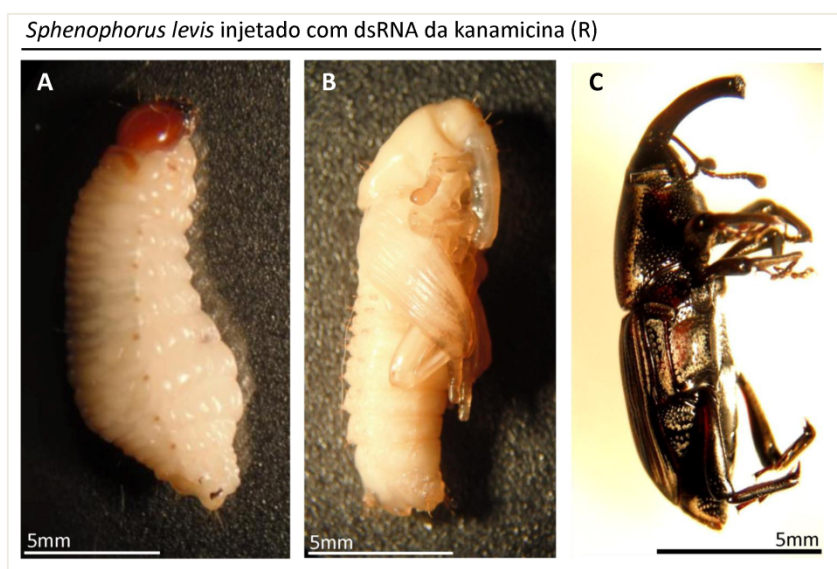


Figura 3.16: Larva de *S. levis* injetada com dsRNA da kanamicina (R). Apenas um inseto chegou à fase adulta (C), devido às condições de cultivo. As larvas (A) e pupas (B) se desenvolveram normalmente, mas quatro pupas sofreram o ataque de fungos devido ao excesso de umidade no frasco de cultivo.

Tabela 3.6: Monitoramento das larvas de *S. levis* restantes após as coletas para análise do silenciamento gênico via qRT-PCR, até 59 dias após as injeções. Quatro das seis larvas injetadas com dsRNA da V-ATPase morreram dentro de três semanas após a injeção e são destacadas no quadro verde. As caixas cinzas ressaltam o atraso no desenvolvimento das larvas injetadas com dsRNA da serpina 1, evidente no dia 52.

Tratamento	05/05/11 Dia 16				09/05/11 Dia 20				12/05/11 Dia 23				16/05/11 Dia 27				
	Morto	Peq.	Normal	Rest.	Morto	Peq.	Normal	Rest.	Morto	Peq.	Normal	Rest.	Morto	Peq.	Normal	Pupa	Rest.
Kanam. (R)	0	-	7	7	0	-	7	7	0	-	7	7	0	-	6	1	7
V-ATPase E	1	2	3	5	3	0	2	2	0	0	2	2	0	0	2	-	2
Serpina 1	0		8	8	1	5	2	7	0	5	2	7	0	5	2	-	7

Tratamento	26/05/11 Dia 37					02/06/11 Dia 44					10/06/11 Dia 52					17/06/11 Dia 59				
	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.	Morto	Larva	Pupa	Adulto	Rest.
Kanam. (R)	0	4	3	-	7	0	2	4	1	7	0	1	5	1	7	0	1	5	1	7
V-ATPase E	0	1	1	-	2	0	0	2	-	2	0	0	1	1	2	0	0	1	1	2
Serpina 1	0	7	0	-	7	0	6	1	-	7	1	5	1	-	6	0	3	2	1	6

Nas caixas verdes da tabela 3.6 é indicada a morte de quatro dos seis insetos restantes tratados com dsRNA da V-ATPase E dentro de três semanas após a injeção (Figura 3.17). Os outros dois insetos deste tratamento se desenvolveram normalmente, provavelmente em função do vazamento do material injetado. As caixas cinzas mostram o efeito da injeção de dsRNA da serpina 1 no desenvolvimento das larvas, que apresentaram um evidente atraso no período de empupamento em relação ao grupo controle (Figura 3.19).

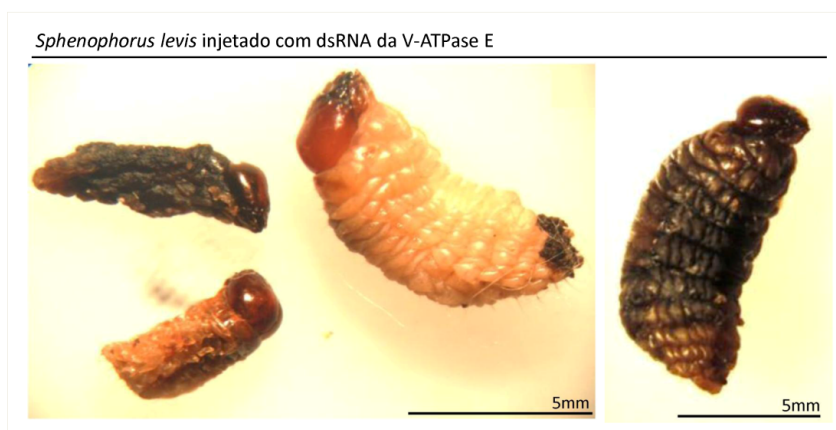


Figura 3.17: Larvas de *S. levis* após 44 dias do tratamento com dsRNA da V-ATPase E. Quatro das seis larvas injetadas com dsRNA da V-ATPase morreram até o dia 20 após as injeções. A terceira larva mostrada na figura apresenta uma cicatriz na região posterior devido à provável lise do intestino, resultante do desequilíbrio osmótico causado pela perda de função da V-ATPase.

A tabela 3.7, relativa à pesagem dos insetos, reforça os resultados apresentados anteriormente. A coluna do dia 24 destacada em cinza mostra os dois insetos tratados com dsRNA da V-ATPase e Spn1 que se desenvolveram normalmente com média de peso comparável ao grupo controle, indicando a ocorrência de vazamento do material injetado. Essa hipótese é sustentada, não só pela diferença entre os insetos tratados, mas também pela coloração verde nos meios de cultura de insetos que não morreram após as injeções. A coluna destacada em laranja mostra o atraso no desenvolvimento observado para as larvas de *S. levis* tratadas com dsRNA da serpina 1 endógena. Além do atraso no desenvolvimento, indicado na figura 3.19, esses insetos também apresentaram uma acentuada redução no ganho de peso comparado ao grupo tratado com dsRNA da kanamicina (R), evidente na pesagem do dia 44 após as injeções.

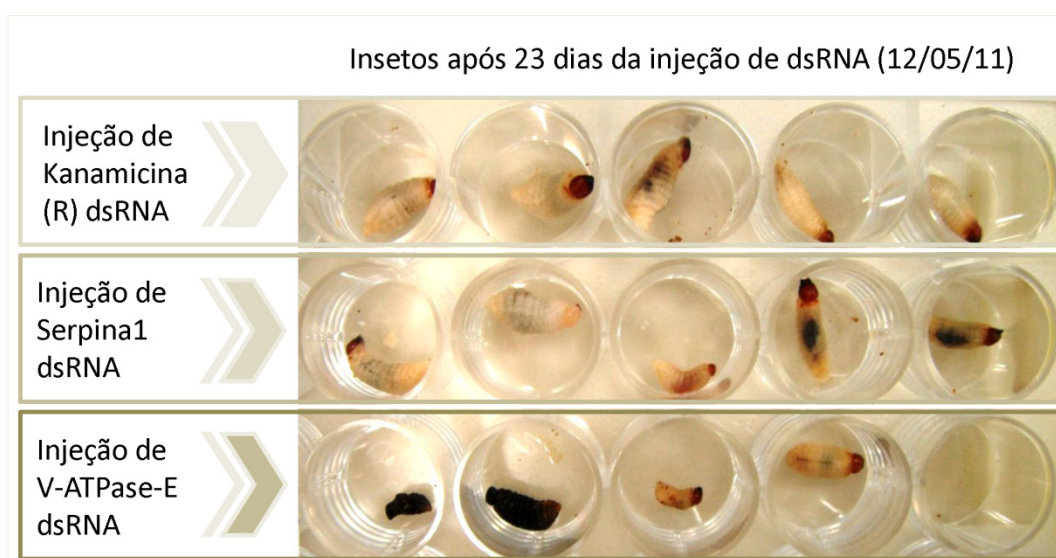


Figura 3.18: Comparação entre os insetos tratados com os diferentes dsRNAs, 23 dias após as injeções. Nessa etapa, quatro insetos mostrados na última linha, injetados com o dsRNA da V-ATPase E morreram. A maioria dos insetos tratados com dsRNA da serpina 1 apresentavam menor tamanho em relação aos controle.

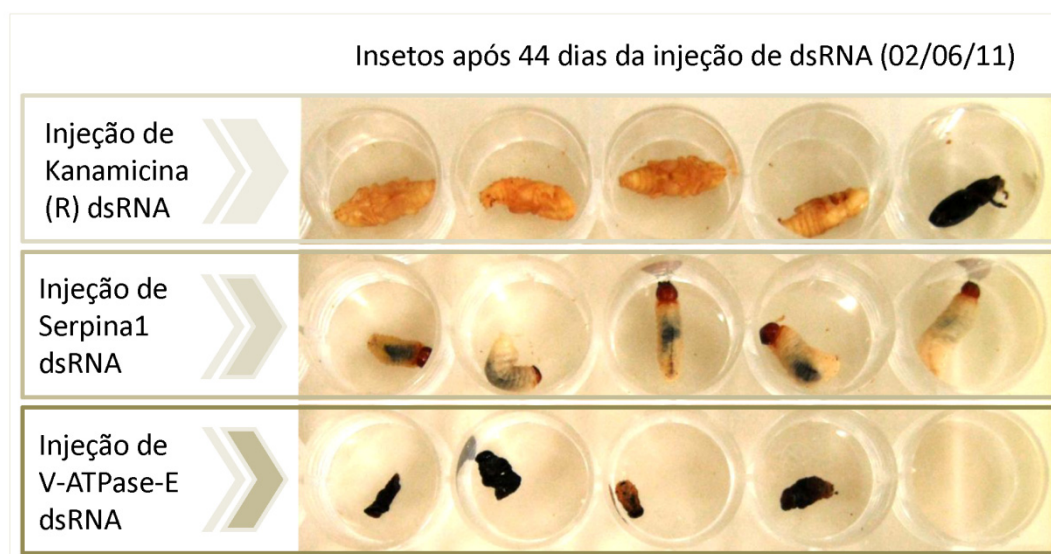


Figura 3.19: Diferenças observadas nos três diferentes grupos tratados com dsRNA, 44 dias após as injeções. Dois insetos dos grupos injetados com dsRNA da V-ATPase E e serpina 1 se desenvolveram normalmente e não são representados na figura. Entretanto, é evidente o atraso no desenvolvimento do grupo tratado com dsRNA da serpina 1.

Tabela 3.7: Relação do ganho de peso após a injeção das larvas. A maioria dos insetos injetados com dsRNA da V-ATPase E e serpina exibiram uma evidente deficiência na incorporação de biomassa, quando comparados com o controle. Os quadros cinza no 24<sup>o</sup> dia indicam a pesagem dos dois insetos de cada tratamento que se desenvolveram similarmente aos controles, provavelmente em função do vazamento do dsRNA com a hemolinfa. As últimas colunas, destacadas em laranja mostram o atraso no desenvolvimento dos insetos injetados com dsRNA da serpina 1. Os pesos são mostrados em miligramas e não possuem barra de erros pois os insetos foram pesados em conjunto.

Tratamento	05/05/11 - Dia 16		13/05/11 - Dia 24				02/06/11 - Dia 44	
	Peso médio (mg)	Núm. larvas	Com fenótipo		Sem fenótipo		Peso médio (mg)	Núm. larvas
			Peso médio (mg)	Núm. larvas	Peso médio (mg)	Núm. larvas		
Kanam. (R)	186,3	3	194,8	5	-	-	138,5	4 pupas
V-ATPase E	83	3	59,5	4 mortas	213	2	-	-
Serpina 1	103,3	3	110,6	5	225	2	96	4 larvas

Devido ao grande número de insetos que não resistiu às injeções, as coletas foram realizadas com três larvas recolhidas apenas no primeiro (D1), segundo (D2), quarto (D4) e sétimo (D7) dia após os tratamentos com dsRNA. A figura 3.20 evidencia a qualidade dos RNAs extraídos de conjuntos de três insetos para as análises de silenciamento, após o tratamento com DNase. Esse material foi utilizado como molde para a síntese de cDNA utilizado para as análises de RT-PCR.



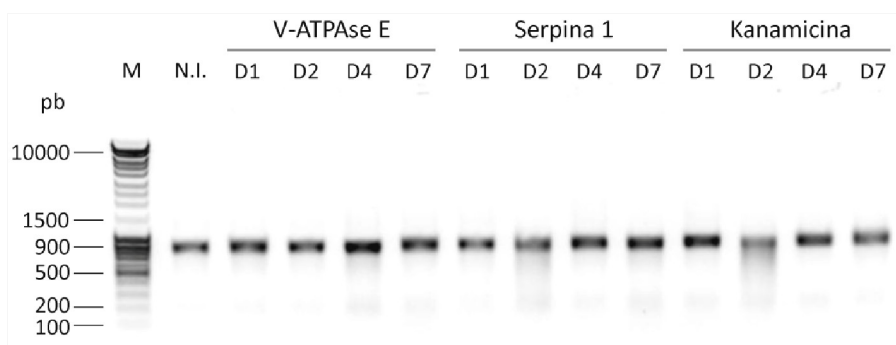


Figura 3.20: RNA total extraído das larvas de *S. levis* injetadas com dsRNA. Gel de agarose 1% (TBE 1X) indicando a qualidade dos RNAs totais extraídos das larvas de *S. levis* injetadas com dsRNA, após tratamento com DNase. Aproximadamente 500 ng de cada amostra, formada por um conjunto de três insetos injetados, foram utilizados para a produção do cDNA que serviu de molde para as análises de silenciamento via RT-PCR.

As análises de RT-PCR para avaliar os efeitos da injeção de dsRNA em *S. levis* foram conduzidas com o mesmo delineamento experimental utilizado para *T. castaneum*. Os gráficos da figura 3.21 mostram os resultados do silenciamento obtidos para as larvas de *S. levis* tratadas com dsRNA da V-ATPase E do próprio inseto, utilizando os genes GAPDH (3.14A) e  $\beta$ -actina (3.14B) como genes calibradores. Diferentemente do silenciamento detectado para as injeções dos ortólogos em *T. castaneum* (85,78%), a redução dos níveis de transcrição em relação aos insetos injetados com dsRNA da kanamicina (R) foi de 33,75% e 46% utilizando os genes GAPDH e  $\beta$ -actina como calibradores, respectivamente.

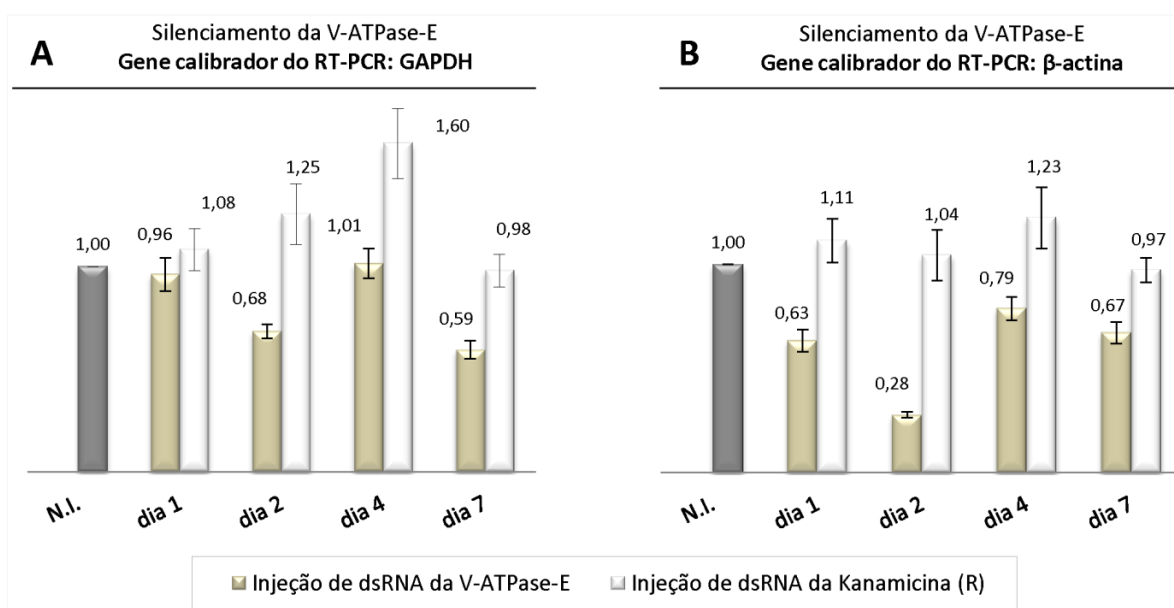


Figura 3.21: Análise do silenciamento gênico da V-ATPase de *S. levis* utilizando os genes GAPDH (A) e  $\beta$ -actina (B) como genes calibradores. A redução dos níveis de transcrição em relação aos insetos injetados com dsRNA da kanamicina (R) foi de 33,75% e 46% respectivamente. As barras cinzas mostram os níveis de transcrição detectados para os insetos não injetados (N.I.), utilizados como padrão (1 x).

As razões para a reduzida supressão do silenciamento da V-ATPase de *S. levis* em relação à *T. castaneum* não são certas, especialmente pelo fato do silenciamento detectado para a serpina 1, mostrado na figura 3.22, aparentar a mesma potência observada em *T. castaneum*. Apesar do silenciamento da V-ATPase em *S. levis* não parecer tão robusto, a importância do produto de transcrição desse gene para a manutenção das condições fisiológicas no intestino deste inseto pode ser um fator determinante para a compensação da expressão induzida pela perda da função gênica.

Em ensaios de alimentação utilizando dsRNA de 158 pb contra a V-ATPase E de *T. castaneum*, as doses de LC50 detectadas foram próximas a 2,5 ng/g de dieta após uma semana de alimentação contínua na dieta contendo dsRNAs. Esses insetos apresentaram redução de 41,2% nos transcritos para o gene da V-ATPase, utilizando o gene da proteína ribossomal RpL32 como referência para as análises de RT-PCR (Whyard et al., 2009). Essa redução de 41,2% nos níveis de transcrição, capaz de causar a morte de 50% das larvas de *T. castaneum*, não difere consideravelmente daquela observada no silenciamento da V-ATPase E de *S. levis* que variou de 33,75% a 46%, utilizando os dois genes calibradores.

Diferentemente da V-ATPase, o perfil de silenciamento gênico da serpina 1, mostrado na figura 3.22, indica uma drástica redução de 89,87% nos níveis de transcritos das larvas de *S. levis* injetadas com dsRNA específico para esse gene. Os elevados níveis de transcrição detectados para o grupo controle tratado com dsRNA da kanamicina (R) no dia 7 após a injeção podem ser explicados pela inanição no período que antecede a muda, como detectado para as larvas de *M. configurata* (Chamankhah et al., 2003).

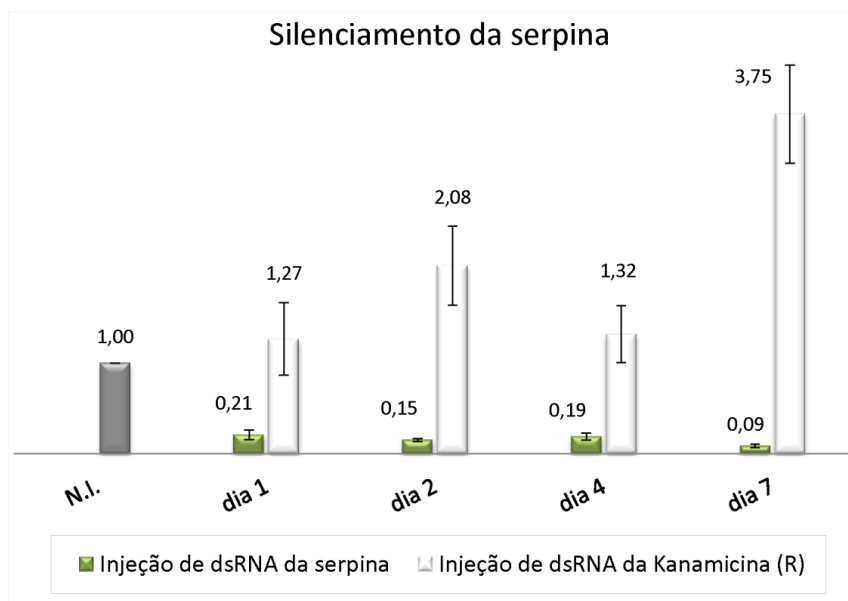


Figura 3.22: Análise do silenciamento gênico da serpina 1 de *S. levis*. Os insetos injetados com dsRNA da Spn1 tiveram a redução dos níveis dos transcritos para 10,13% em relação aos insetos tratados com dsRNA da kanamicina (R).

Poucas serpinas de coleópteros são estudadas, principalmente em função do reduzido tamanho das larvas, mas o envolvimento desses inibidores em processos relacionados ao sistema imune e desenvolvimento é claro. Estudos com serpinas purificadas da hemolinfa das larvas do coleóptero *T. molitor*, Spn40, Spn55 e Spn48 esclareceram a participação desses três inibidores em pares com três serino proteases da cascata de sinalização *Toll*. Essas serpinas regulam inibindo a ação das respectivas peptidases em série, prevenindo a ativação da profenoloxidase e síntese de quinonas e melanina pela via *Toll*. No entanto, a injeção desses três inibidores nas larvas não inibe a produção de peptídeos antimicrobianos, que também é sinalizada pela via *Toll*, indicando que outras serpinas e vias de sinalização podem estar envolvidas nesse processo (Jiang et al., 2009).

A serpina 93 de *T. molitor* é uma proteína constituída de dois domínios inibitórios que também participa da regulação dos processos imunes nesse inseto. O silenciamento do gene que codifica essa proteína, via injeção de dsRNA, resultou na melanização e morte das larvas após a injeção de  $\beta$ -1,3-glucano, um componente da parede celular de fungos e bactérias, capaz de disparar a resposta imune nesse inseto (Jiang et al., 2011). A utilização da serpina 1 de *S. levis* como alvo para silenciamento nesse trabalho, foi motivada pela baixa conservação da sequência gênica que codifica esse inibidor, que poderia constituir um alvo específico para o controle do inseto. Por essa razão, as análises de similaridade de sequência visando

a identificação dos homólogos letais em *Drosophila* não geraram resultados conclusivos. O perfil de transcrição durante todas as fases do desenvolvimento também reforça sua importância para os processos fisiológicos do inseto.

A serpina 1 de *S. levis* apresenta maior similaridade com a Spn1 de *T. molitor*, a qual aparentemente, não atua nos processos imunes deste inseto. Os efeitos do silenciamento da Spn1 de *S. levis* aparentemente indicam a participação desse inibidor em processos relacionados à muda e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do inseto (Figura 3.23), assim como para as serpinas 1 descritas em lepidópteros. Esse é o primeiro relato do silenciamento de serpinas de coleópteros, Tc\_Spn6 e SI\_Spn1, que apresentam efeitos no desenvolvimento dos insetos. A identificação de outras serpinas que possam causar a melanização sistêmica induzida pelo silenciamento via RNAi, relacionadas a processos imunes, sem dúvida é promissora para a prospecção de alvos mais precoces no desenvolvimento.

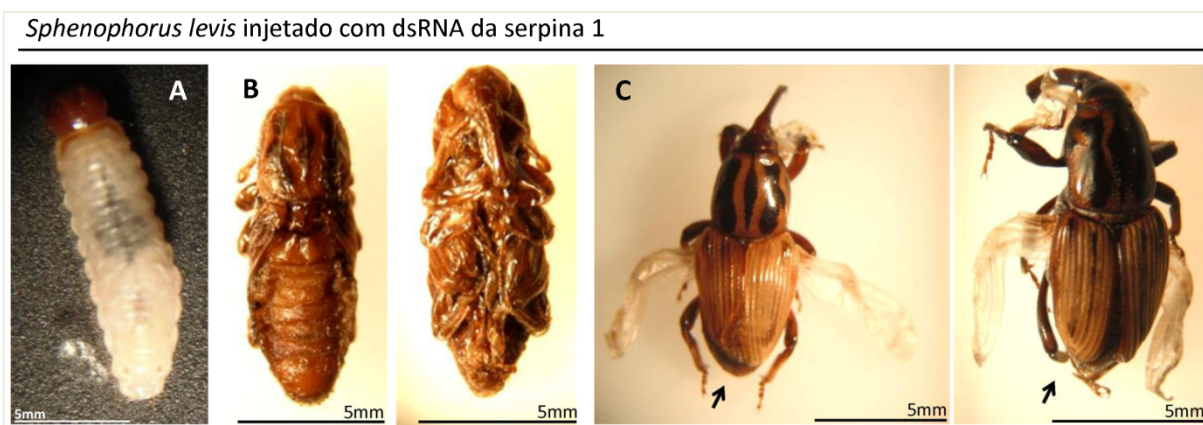


Figura 3.23: Desenvolvimento das larvas de *S. levis* injetadas com dsRNA da serpina 1. As larvas (A) tratadas com dsRNA da serpina apresentaram redução do ganho de peso comparado aos controles. As imagens das pupas (B) e adultos (C) foram capturadas no dia 22/07/2011, 95 dias após as injeções. B: dois insetos morreram no estágio de pupa; C: dois dos quatro adultos mortos apresentaram mal formação das asas. As setas indicam mal formação e desenvolvimento incompleto dos élitros, respectivamente.

O pequeno número amostral de insetos restante após as coletas para as análises de qRT-PCR, assim como as complicações no cultivo do grupo controle, injetado com dsRNA do gene que codifica resistência à kanamicina, certamente dificultam a tomada de conclusões, especialmente a respeito das características fenotípicas causadas pelo silenciamento gênico da serpina 1 de *S. levis*. Contudo, os fenótipos observados para as pupas e adultos mortos, 95 dias após as injeções (Figura 3.23), são similares aqueles observados no silenciamento do provável gene

ortólogo em *T. castaneum*, enquanto o adulto normal de *S. levis*, tratado com dsRNA controle emergiu 49 dias após a injeção. Em ambos os experimentos nenhum inseto adulto emergiu viável e alguns deles permaneceram na fase pupal. Apesar de constituírem alvos tardios, o silenciamento dessas serpinas mostra que são alvos letais, pois inviabilizam o desenvolvimento desses insetos.

A serpina 1 de *Mamestra configurata* não tem a expressão regulada por injúria ou inoculação de bactérias e assim como a serpina 1 de *S. levis*, também é produzida principalmente no corpo gorduroso. Esse inibidor possui um provável envolvimento no ciclo de muda do inseto, além disso, foi identificado nas membranas basais e camadas subcuticulares de diversos outros tecidos. Considerando que a destruição e reconstrução da membrana basal é um processo necessário para o remodelamento de tecidos, os autores sugerem a atuação no remodelamento de tecido durante os processos de muda (Chamankhah et al., 2003).

Em *Drosophila*, é conhecido que a serpina 27a é o inibidor chave no sistema imune, atuando na regulação negativa da atividade da peptidase terminal da cascata de ativação da profenoloxidase que induz a melanização e síntese de peptídeos antimicrobianos pela via de sinalização *Toll* (De Gregório et al., 2002; Ligoxygakis et al., 2002). Após um ferimento, a ausência desse inibidor resulta na morte causada pela melanização espontânea em diversos tecidos. Insetos mutantes para esse gene em homozigose se desenvolvem como larvas normais, porém apenas 30% deles emerge da fase de pupa, o que sugere a participação desse inibidor na metamorfose, além dos processos imunes. Os adultos, mesmo viáveis muitas vezes apresentaram problemas na expansão das asas (De Gregório et al., 2002). Em outro estudo, também utilizando mutantes do mesmo gene em *Drosophila*, a ausência da serpina 27a causou altas taxas de melanização espontânea em larvas e adultos, assim como a atividade constitutiva da enzima fenoloxidase. A maioria dos homozigotos ou 40% dos heterozigotos para a mutação desenvolveram melanização constitutiva e morreram no estágio pupal (Ligoxygakis et al., 2002).

No presente estudo, não foi avaliada a resposta dos insetos ao desafio com bactéria ou injúria e, de uma forma geral, também não foi observada melanização tanto em *T. castaneum* ou *S. levis* que tiveram as serpinas silenciadas. Os insetos que morreram no estágio de pupa apresentaram mudança de coloração, decorrente da morte dos tecidos mas não da melanização espontânea, como detectado para os

mutantes de *Drosophila* para a serpina 27a. Interessantemente, todos os insetos que tiveram a serpina silenciada e chegaram à fase adulta emergindo como insetos inviáveis, além disso, alguns deles apresentaram problemas de malformação nas asas, assim como relatado para a serpina 27a de *Drosophila*. Entretanto, é sugerida a participação da serpina 1 de *S. levis* e serpina 6 de *T. castaneum* no desenvolvimento pela atuação no ciclo de muda, devido à morte dos insetos na fase pupal assim como de adultos farados ou malformados, além do atraso no desenvolvimento das larvas de *S. levis*. Essa hipótese é reforçada também pelas variações e picos de expressão desses inibidores nos grupos controles, que para outros insetos é modulada pela inanição e sinalização do período de muda controlada pela ecdisona.

As análises de qRT-PCR mostram que as larvas de *S. levis* são capazes de disparar a maquinaria de silenciamento gênico via injeção de dsRNA, apresentando sensibilidade ao RNA de interferência. O conhecimento detalhado dos fenótipos associados ao silenciamento da serpina 1 de *S. levis* deve ser estudado em breve, após a padronização dos métodos de cultivo em nosso laboratório e especialmente do desenvolvimento de um método de entrega de dsRNA via alimentação. Esses experimentos também objetivarão o conhecimento da sensibilidade do inseto à administração de dsRNA na alimentação, bem como as concentrações necessárias para disparar a maquinaria de silenciamento gênico, o que é um fator determinante para a aplicação de RNAi em plantas transgênicas, como objetivo de aumentar a resistência a esse inseto.

### III CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Todas as etapas propostas inicialmente foram superadas com sucesso. A realização deste estudo gerou dados massivos sobre a genética e fisiologia do inseto;
- O transcriptoma permitiu o conhecimento do perfil de expressão gênica das larvas de *S. levis*, enquanto as análises de qRT-PCR revelaram a dinâmica transcricional dos genes selecionados, confirmando os perfis de produção principalmente das enzimas digestivas. Outros genes identificados na biblioteca do inseto vêm sendo estudados em nosso laboratório, especialmente aqueles que codificam proteínas que desempenham papéis fundamentais na fisiologia de *S. levis* e constituem alvos potenciais para o controle da praga;
- Enzimas encontradas da biblioteca com potencial aplicação biotecnológica como uma celulase, uma esterase e duas pectinases foram selecionadas para o estudo em outros projetos. A identificação das celulases e das pectinases geraram fortes indícios de que são enzimas importantes nos processos de digestão do inseto;
- Pela primeira vez, foi descrita uma sequência que pode codificar uma invertase digestiva em coleópteros;
- A análise detalhada de transcritos das peptidases evidenciou a ocorrência de, ao menos, 32 variantes da *Sl-CathL*, que foram agrupadas em três grandes grupos, de acordo com a similaridade;
- As variantes da *Sl-CathL 2* encontradas são diferencialmente transcritas em condições de dieta natural e artificial, o que indica o envolvimento dessas variantes nos processos de adaptação do inseto às dietas. A variante mais abundante da *Sl-CathL 1* foi produzida de forma recombinante, caracterizada e localizada no intestino do inseto;
- Nos ensaios de inibição de atividade enzimática realizados com a *Sl-CathL 1*, utilizando as canacistatinas recombinantes, foi verificada a forte inibição da *rSl-CathL* pela CaneCPI-4;
- As larvas de *S. levis* mostraram-se capazes de ativar a maquinaria de silenciamento gênico por meio da injeção de dsRNA;

- A serpina estudada, muito provavelmente, deve estar envolvida nos processos de muda do inseto e, mesmo constituindo um alvo tardio, o silenciamento desse gene mostrou-se eficiente para impedir o desenvolvimento de *S. levis*;
- Os resultados gerados sugerem que tanto a inibição da principal enzima digestiva do inseto, quanto o silenciamento gênico podem constituir abordagens eficientes para a produção de plantas modificadas geneticamente para aumentar a resistência ao inseto.



#### IV PERSPECTIVAS

O desenvolvimento desse estudo gerou dados de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de controle do inseto *S. levis* empregando a biotecnologia. Em um próximo passo, a avaliação da resposta das larvas *in vivo* aos inibidores (canacistatinas) testados pode evidenciar a eficácia desses inibidores para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao inseto.

A utilização de RNA de interferência tem se mostrado uma promissora ferramenta biotecnológica aplicada ao combate de pragas. A avaliação da sensibilidade do *Sphenophorus levis* ao RNAi pela alimentação pode abrir um novo horizonte de perspectivas relacionadas ao combate do inseto, além de constituir uma importante ferramenta experimental para a determinação de função gênica de novos transcritos identificados no transcriptoma de *S. levis*.

## V REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 16793-16797, 1987.
- ABRAHAMSON, M. Cystatins-Proteins Inhibitors of papain-like cysteine proteinases. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 45, 299203, 1993.
- AHN, J. E.; ZHU-SALZMA, K. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 678 – 685, 2009.
- ALMEIDA, L. C. **Bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis***. Informativo. Centro de Tecnologia Canaveieira. Coordenadoria de Programas de Variedades. Gestão de Fitossanidade, 2005.
- ALMEIDA, L. C.; STINGEL, E.; ARRIGONI, E. B. **Monitoramento e controle de pragas da cana-de-açúcar: Bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis***. Informativo do Centro de Tecnologia Canaveieira, 2009.
- ALVAREZ-ALFAGEME, F.; MARTINEZ, M.; PASCUAL-RUIZ, S.; CASTAÑERA, P.; DIAZ, I.; ORTEGO, F. Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. **Transgenic Research**, v. 16, p. 1-13, 2007.
- ALVAREZ-FERNANDEZ; ABRAHAMSON, M. Structural and protease inhibitory features of cystatins. In: ZEROVNIK, E.; JERALA, N. K. (eds) **Human Stefins and Cystatins**. Nova York: Nova Science Publishers, Inc., 2006. p. 23-42.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, p. 350-355, 2004.
- AMDAM, G. V.; SIMÕES, Z. L. P.; GUIDUGLI, K. R.; NORBERG, K.; OMHOLT, S. W. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. **BMC Biotechnology**, v. 3, p. 1, 2003.
- AMIRHUSIN, B.; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; MURDOCK, L. L.; ZHU-SALZMAN, K. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 734-740, 2007.
- ARAI, S.; MATSUMOTO, I.; EMORI, Y.; ABE, K. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6612 – 6617, 2002.
- ARONSTEIN, K.; PANKIW, T.; SALDIVAR, E. SID-I is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. **Journal of Apicultural Research**, v. 45, p. 20–24, 2006.

- ARONSTEIN, K.; SALDIVAR, E. Characterization of a honey bee Toll related receptor gene Am18w and its potential involvement in antimicrobial immune defense. **Apidologie**, v. 36, p. 3–14, 2005.
- ASHIDA, M.; BREY, P. T. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: BREY, P.T.; HULTMARK, D. (Eds.). **Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects**. London: Chapman & Hall, 1998. p. 135 - 172.
- AUGUSTIN, S.; COURTIN, C.; DELPLANQUE, A. Poplar clones effect on development, mortality, fecundity and longevity of *C. populi* and *C. tremulae* (Coleoptera; Chrysomelidae). **Journal Applied Entomology**, v. 115, p. 370-378, 1993.
- AZZOUZ, A.; CHERQUI, A.; CAMPAN, E. D. M.; RAHBÉ, Y.; DUPORT, G.; JOUANIN, L.; KISER, L.; GIORDANENGO, P. Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean BowmanBirk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphididae). **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 75–86, 2005.
- BADILLA, F. F.; ALVES, S. B. **Controle microbiano do gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (Col.: Curculionidae) com *beauveria* spp. e *Metarhizium anisopliae* (METSCH) SOROKIN, 1883**. Agosto de 1989. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de concentração: entomologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.
- BAIRD, I. R.; MOSI, R.; OLSEN, M.; CAMERON, B. R.; FRICKER, S. P.; SKERLJ, R. T. '3 + 1' mixed-ligand oxorhenium(V) complexes and their inhibition of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin K. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, p. 2736 – 2750, 2006.
- BARRETT, A. J.; KEMBHAVI, A .A.; BROWN, M. A. E-64 [L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. **Biochemical Journal**, v. 201, p. 189-198, 1982.
- BARRETT, A. J.; KEMBHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.; TAMAI, M.; HANADA, K. L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido (4 guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. **Biochemical Journal**, v. 201, p. 189 – 198, 1982.
- BARRETT, A. J.; KIRSCHKE, H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. **Methods in Enzymology**, v. 80, p. 535 – 561, 1981.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 382, p. 727 – 733, 2001.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; CAVIES, M. E.; MACHLEIDT, W.; SALVESEN, G.; TURK, V. Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin super family. In: BARRETT, A. J.; SALVESEN, G. (Eds.) **Proteinase inhibitors**. Amsterdam: Elsevier, 1986. p. 515-569.

- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Second edition. London: Academic Press, 2004. 2368 p.
- BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1322 – 132, 2007.
- BELLÉS, X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. **The Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 111 – 128, 2010.
- BENCHEKROUN, A.; MICHAUD, D.; NGUYEN-QUOC, B.; OVERNEY, S.; DESJARDINS, Y.; YELLE, S. Synthesis of active oryzacystatin I in transgenic potato plants. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 585–58, 1995.
- BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; VON-HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, p. 783 – 795, 2004.
- BEWLEY, G. C.; RAWLS, J. M.; JR.; LUCCHESI, J. C.  $\alpha$ -Glycerophosphate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*: Kinetic differences and developmental differentiation of the larval and adult isozymes. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, p. 153 1974.
- BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolitic enzymes: a pratical approach**. New York: Oxford University Press, 1989. 259 p.
- BLANCO-LABRA, A.; MARTINEZ-GALLARDO ,N.A.; SANDOVAL-CARDOSO, L.; DELANO-FRIER, J. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, p. 95 – 100, 1996.
- BODE, W.; ENGH, R.; MUSIL, D.; THIELE, U.; HUBER, R.; KARSHIKOV, A.; BRZIN, J.; KOS, J.; TURK, V. The 2.0 Å X ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. **The EMBO Journal**, v. 7, p. 2593 – 2599, 1988.
- BOLDBAATAR, D.; SIKASUNGE, C. S.; BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 25–36, 2006.
- BONADE-BOTTINO, M.; LERIN, J.; ZACCOMER, B.; JOUANIN, L. Physiological adaptation explains the insensitivity of *Baris coerulescens* to transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin I. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 131–138, 1999.
- BOUCHARD, E.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Oryzacystatin I expressed in transgenic potato induces digestive compensation in an insect natural predator via its herbivorous prey feeding on the plant. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2439-2446, 2003.

- BOWN , D. P.; WILKINSON , H. S.; GATEHOUSE , J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera* , are members of complex multigene families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, p. 625-638, 1997.
- BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; JONGSMA; M. A.; GATEHOUSE, J. A. Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 305 – 320, 2004.
- BRODWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, p. 827-833, 1986.
- BROMME, D.; NALLASETH, F. S.; TURK, B. Production and activation of recombinant papain-like cysteine peptidases. **Methods**, v. 32, p. 199 – 206, 2004.
- BROWN, S. J.; DECAMILLIS, M.; GONZALEZ-CHARNECO, K.; DENELL, M.; BEEMAN, R.; NIE, W.; DENELL, R. Implications of the *Tribolium* Deformed mutant phenotype for the evolution of Hox gene function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 4510–4514, 2000.
- BROWN, S. J.; MAHAFFEY, J. P.; LORENZEN, M. L.; DENELL, R. E.; MAHAFFEY, J. W. Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. **Evolution & Development**, v. 1, p. 11–15, 1999.
- BRUNELLE, F.; NGUYEN-QUOC, B.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Protein hydrolysis by Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: the catalytic role of cathepsin D. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 42, p. 88-98, 1999.
- BUCHER, G.; SCHOLTEN, J.; KLINGLER, M. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). **Current Biology**, v. 12, R85 - R86, 2002.
- CARNEIRO , C. N.; ISEJIMA , E. M.; SAMUELS , R. I. SILVA , C. P. Sucrose hydrolases from the midgut of the sugarcane stalk borer *Diatraea saccharalis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 50 , p. 1093 -1101, 2004.
- CERDA, H.; FERNANDEZ, G.; LOPEZ, A.; VARGA, J. Olfactory attraction of the sugar cane weevil (Coleoptera: Curculionidae) to host plant odors, and its aggregation pheromone. **Florida Entomologist**, v. 82, p. 103 – 112, 1999.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45 – 66, 2000.
- CHAMANKHAH, M.; BRAUN, L.; VISAL-SHAH, S.; O'GRADY, M. BALDWIN, D.; SHI, X. HEMMINGSEN, S. M.; ALTING-MEES, M.; HEGEDUS, D. D. *Mamestra configurata* serpin-1 homologues: implications for a regulatory role for serpins in molting. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 355–369, 2003.

- CHE-MENDOZA, A.; PENILLA, R. P.; RODRÍGUEZ, D.A. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 8, p. 1386-1397, 2009
- CHEN, M. S.; JOHNSON, B.; WEN, L.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J.; MORGAN, T. D.; REECK, G. R. Rice cystatin: bacterial expression, purification, cysteine proteinase inhibitory activity, and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. **Protein Expression and Purification**, v. 3, p. 41-49, 1992.
- CHIRGWIN, J. M.; PRZYBYLA, A. E.; MACDONALD, R. J.; RUTTER, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemical Journal**, v. 18, p. 5294-5299, 1979.
- CHO, W. L.; RAIKHEL, A. S. Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease—sequence-analysis of an insect lysosomal-enzyme similar to cathepsin D and E. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 21823–21829, 1992.
- CÍCERO, E. A. S.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, M. V. F. Identification of cry genes from *bacillus thuringiensis* effective against *Sphenophorus levis*, the sugar-cane borer. **Bragantia**, v. 68, n. 4, p. 817-823, 2009.
- COLIGAN, J. E.; DUNN, B.M.; SPEICHER, D. W.; WINGFIELD, P. T. Peptidases. In: **Current Protocols in Protein Science**. John Wiley ; Sons, Hoboken, N. J.. 2004
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011 - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab 2011. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_12\\_08\\_11\\_00\\_54\\_08.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf)>. Acesso em janeiro de 2012.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 10881 – 10890, 1988.
- COULOMBE, R.; GROCHULSKI, P; SIVARAMAN, J.; MENARD, R.; MORT, J. S.; CYGLER, M. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. **Journal EMBO**, v. 15, p. 5492–5503, 1996.
- CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HELLSER, A. Y. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 3376 – 3385, 1985.
- CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W. R. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: Sequence, properties, immunocytochemical localization and function. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 883 – 901, 2005.
- CUOZZO, J. W.; TAO, K.; CYGLER, M.; MORT, J. S.; SAHAGIAN, G.G. Lysine-based structure responsible for selective mannose phosphorylation of cathepsin D and cathepsin L defines a common structural motif for lysosomal enzyme targeting. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 21067-21076, 1998.

- D'AGOSTINI, S.; REBOUÇAS, M. M.; BATISTA FILHO, A.; VITIELLO, N. **FÓRUM: A CANA-DE-AÇÚCAR PERMEANDO PELO CENTRO DE MEMÓRIA DO INSTITUTO BIOLÓGICO.** Disponível em <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/pag/v5\\_1/dagostini.html](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/pag/v5_1/dagostini.html)>. Acesso em dezembro de 2011.
- DAIMON, T.; TAGUCHI, T.; MENG, Y.; KATSUMA, S.; MITA, K.; SHIMADA, T. Beta-fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: insights into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 15271–15279, 2008.
- De GREGORIO, E.; HAN, S. J.; LEE, W. J.; BAEK, M. J.; OSAKI, T.; KAWABATA S.; LEE, B. L.; IWANAGA, S.; LEMAITRE, B.; BREY, P. T. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. **Developmental Cell**, v. 3, p. 581 – 592, 2002.
- DEGASPARI, N.; BOTELHO, P. S. M.; DEALMEIDA, L. C.; CASTILHO, H. J. Biology of *Sphenophorus levis*, Vaurie, 1978 (Col, Curculionidae), with artificial dieth and in the field. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 22, p. 553 – 558, 1987.
- DELLAMANO, M. Estudos funcionais de inibidores de cisteíno peptidases da cana-de-açúcar e caracterização de uma cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis*, uma importante praga da cultura canavieira. 2009. 129 p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Encarte do Informações Agrônomicas**, v. 110, p. 25 – 32, julh./2005.
- DOW, J. A. T. pH gradients in lepidopteran midgut. **The Journal of Experimental Biology**, v. 172, p. 355–376, 1992.
- EIGENHEER, A. L.; KEELING, C. I.; YOUNG, S.; TITTIGER, C. Comparison of gene representation in midguts from two phytophagous insects, *Bombyx mori* and *Ips pini*, using expressed sequence tags. **Gene**, v. 316, p. 127 – 36, 2003.
- ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. **Genes & Development**, v. 15, n. 2, p. 188-200, 2001.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DABORN, P. J.; LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in Genetics**, v. 20, p. 163–170, 2004.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806 – 811, 1998.
- FONSECA, F. P. P.; IKE, P. T. L.; ASSIS, D. M.; ICIMOTO, M. Y.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; PUZER, L.; HENRIQUE-SILVA, F. Leviserpin: a serine peptidase inhibitor (Serpin) from the Sugarcane Weevil *Sphenophorus levis*. **The Protein Journal**, v. 30, n. 6, p. 404-412, 2011.

- FONSECA, F. P. P.; SOARES-COSTA, A.; RIBEIRO, A. F.; ROSA, J. C.; TERRA, W. R.; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (*Sl-CathL*) from sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 58-69, 2012.
- FULLER, V. L.; LILLEY, C. J.; URWIN, P. E. Nematode resistance. **New Phytologist**, v. 180, p. 27-44, 2008.
- GARRETT, M.; FULLAONDO, A.; TROXLER, L.; MICKLEM, G.; GUBB, D. *Identification and analysis of serpin-family genes by homology and synteny across the 12 sequenced Drosophilid genomes*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 489, 2009.
- GATEHOUSE, A. M. R.; BUTLER, K. J.; FENTON, K. A.; GATEHOUSE, J. A. Presence and partial characterisation of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 39, p. 279–286, 1985.
- GATEHOUSE, H.S.; TAN, B; CHRISTELLER, J. T.; HURST, M. R. H.; MARSHALL, S. D. G.; JACKSON, T.A. Phenotypic changes and the fate of digestive enzymes during induction of amber disease in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 3, p. 215-221, 2009.
- GATEHOUSE, J.; PRICE, D. Protection of Crops against Insect Pests using RNA Interference.. In: VILCINSKAS, A. (Ed.) **Insect Biotechnology**. London: Springer, 2011. p. 145-168. (Series: Biologically-Inspired Systems)
- GETTINS, P. G. W. Serpin structure, mechanism and function. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4751 – 803, 2002.
- GIANOTTI, A.; RIOS, W. M.; SOARES-COSTA, A.; NOGAROTO, V.; CARMONA, A. K.; OLIVA, M. L. V.; ANDRADE, S. S.; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein expression and purification**, v. 47, n. 2, p. 483 – 489, 2006.
- GIANOTTI, A.; SOMMER, C. A.; CARMONA, A. K.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biological Chemistry**, v. 389, p. 447 – 453, 2008.
- GIRARD, C.; BONADE-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M. H.; JOUANIN, L. Two strains of cabbage seed weevil (Coleoptera: Curculionidae) exhibit differential susceptibility to a transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin I. **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 569-77, 1998a.
- GIRARD, C.; JOUANIN, L. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from the phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 1129 – 1142, 1999.
- GIRARD, C.; LE MÉTAYER, M.; ZACCOMER, B.; BARTLET, E.; WILLIAMS, I.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELEÈGUE, M. H.; JOUANIN, L. Growth stimulation of beetle



larvae reared on a transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor. **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 263–270, 1998b.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GÓMEZ-ZURITA, J.; GALIÁN J. Current knowledge on genes and genomes of phytophagous beetles (Coleoptera: Chrysomeloidea, Curculionoidea): a review. **European Journal of Entomology**, v. 102, p. 577 – 597, 2005.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the Insects**. New York: Cambridge University Press, 2006. p. 772.

GRUDEN, K.; KUIPERS, A. G. J.; GUNCAR, G.; SLAPAR, N.; STRUKELJ, B.; JONGSMA, M.A. Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 365-375, 2004.

GUI, Z. Z.; LEE, K. S.; KIM, B. Y.; CHOI, Y. S.; WEI, Y. D.; CHOO, Y. M.; KANG, P. D.; YOON, H. J.; KIM, I.; JE, Y. J.; SEO, S. J.; LEE, S. M.; GUO, X. J.; SOHN, H. D.; JIN, B. R. Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis. **BMC Developmental Biology**, v. 6, p. 49, 2006.

GUNCAR, G.; PUNGERCIC, G.; KLEMENCIC, I.; TURK, V.; TURK, D. Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. **The EMBO Journal**, v. 18, p. 793–803, 1999.

GUO, Y.; RIBEIRO J. M.; ANDERSON, J. M.; BOUR, S. dCAS: a desktop application for cDNA sequence annotation. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1195 – 1196, 2009.

GUPTA, R.; JUNG E.; BRUNAK, S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins <<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>>, 2004

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, p. 145 – 159, 2004.

HOLT, S.; JONG, V. D.; FARAMUS, E.; LANG, T.; BRAND MILLER, J. A bioflavonoid in sugar cane can reduce the postprandial glycaemic response to a high-GI starchy food. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 12, Suppl:S66, 2003.

HUANG, X.; MADAN. A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p. 868 – 877, 1999.

- HUNTINGTON, J. A.; READ, R. J.; CARRELL, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. **Nature**, v. 407, p. 923–926, 2000.
- HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 227 – 235, 2010.
- JIANG, R.; KIM, E. H.; GONG, J. H.; KWON, H. M.; KIM, C. H.; RYU, K. H.; PARK, J. W.; KUROKAWA, K.; ZHANG, J.; GUBB, D.; LEE, B. L. Three Pairs of Protease-Serpin Complexes Cooperatively Regulate the Insect Innate Immune Responses **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 35652–35658, 2009.
- JIANG, R.; ZHANG, B.; KUROKAWA, K.; SO, Y. I.; KIM, E. H.; HWANG, H. O.; LEE, J. H.; SHIRATSUCHI, A.; ZHANG, J.; NAKANISHI, Y.; LEE, H. S.; LEE, B. L. 93-kDa Twin-domain Serine Protease Inhibitor (Serpin) Has a Regulatory Function on the Beetle Toll Proteolytic Signaling Cascade. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 40, p. 35087-35095, 2011
- JOHNSON, D. J.; LANGDOWN, J.; LI, W.; LUIS, S. A.; BAGLIN, T. P.; HUNTINGTON, J. A. Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 35478-35486, 2006.
- JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 16793-16797, 1989.
- JONGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 1041 – 1045, 1995.
- JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; LERIN, J.; PHAM-DELEGUE, M.H. Expression of protease inhibitors in rapeseed. In: Michaud, D. (Ed.), **Recombinant Protease Inhibitors in Plants**, 2000. p. 179-190.
- JULENIUS, K.; MOLGAARD, A.; GUPTA, R.; BRUNAK S. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. **Glycobiology**, v. 15, p. 153 – 164, 2005.
- KANOST, M. R.; JIANG, H.; YU, X. Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. **Immunological Reviews**, v.198, p. 97-105, 2004.
- KANOST, M. R.; PRASAD, S. V.; HUANG, Y. L.; WILLOTT, E. Regulation of serpin gene-1 in *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, p. 285–2911, 1995.

- KITCH, L. W.; MURDOCK, L. L. Partial characterization of a major gut thiol proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus*. F. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 3, p. 561 – 575, 1986.
- KOIWA, H.; SHADE, R. E.; ZHU-SALZMAN, K.; D'URZO, M. P.; MURDOCK, L. L. A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DuCALs) in the larval midgut of the western corn rootworm ( *Diabrotica virgifera virgifera* ). **FEBS Letters**, v. 471, p. 67 – 70, 2000.
- KOO, Y. D.; AHN, J. E.; SALZMAN, R. A.; MOON, J.; CHI, Y. H.; YUN, D. J.; LEE, S. Y.; KOIWA, H.; ZHU-SALZMAN, K. Functional expression of an insect cathepsin B-like counter-defence protein. **Insect and Molecular Biology**, v. 17, p. 235–245, 2008.
- KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, p. 887 – 900, 1997.
- KUNAKBAEVA, Z.; CARRASCO, R.; ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulfur addition to Michael acceptors type compounds. **Journal of Molecular Structure**, v. 626, p. 209 – 216, 2003.
- KUSCHEL, G. A phylogenetic classification of Curculionoidea to families and subfamilies. **Memoirs of the Entomological Society of Washington**, v. 14, p. 5-33, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.
- LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electron. Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 93 – 109, 2002.
- LEATHERBARROW, R. J. GraFit version 3.0. Erithacus Software Ltd. Staines, UK, 1992.
- LEE, S. J.; KIM, S. R.; YOON, H. J.; KIM, I.; LEE, K. S.; JE, Y. H.; LEE, S. M.; SEO, S. J.; SOHN, H. D.; JIN, B.R. cDNA cloning, expression, and enzyme activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 139, p. 107 – 116, 2004.
- LEITE, L. G.; FILHO, A. B.; TAVARES, F. M.; GINARTE, C. M. A.; ALMEIDA, L. C.; BOTELHO, P. S. M. Alternativa de controle: Bicudo da cana-de-açúcar. *Cultivar Grandes Culturas*, 83, 2005. Disponível em <[www.cultivar.inf.br](http://www.cultivar.inf.br)>.
- LENARCIC, B.; KRASOVEC, M.; RITONJA, A.; OLAFSSON, I.; TURK, V. Inactivation of human cystatin C and kininogen by human cathepsin D. **FEBS Letters**, v. 280, p. 211–215, 1991.
- LEPLÉ, J. C.; BONADÉ-BOTTINO, M.; AUGUSTIN, S. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Col: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. **Molecular Breeding**, v. 1, p. 319 – 328, 1995.

- LIANG, C.; BROOKHART, G.; FENG, G. H.; REECK, G. R.; KRAMER, K. J. Inhibition of digestive proteinases of stored grain Coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. **FEBS Letters**, v. 278, n. 2, p. 139-42, 1991.
- LIGOXYGAKIS, P.; PELTE, N.; JI, C.; LECLERC, V.; DUVIC, B.; BELVIN, M.; JIANG, H.; HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 6330 – 6337, 2002.
- LIPARDI, C.; WEI, Q.; PATERSON, B.M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. **Cell**, v. 107, p. 297–307, 2001.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402 – 408, 2001.
- LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W.R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 130-140, 2006.
- LOPES, F. C. C. **Caracterização da atividade proteínásica digestiva de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) e sua sensibilidade à Chagasina**. Junho de 2002. 58 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia, área de concentração genética e melhoramento de plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- LORENZEN, M. D.; BERGHAMMER, A. J.; BROWN, S. J.; DENELL, R. E.; KLINGLER, M.; BEEMAN, R. W. *piggyBac*-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 5, p. 433–440, 2003.
- MAO, Y. B.; CAI, W. J.; WANG, J. W.; HONG, G. J.; TAO, X. Y.; WANG, L. J.; HUANG, Y. P.; CHEN, X. Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1307–1313, 2007.
- MAO, Y. B.; TAO, X. Y.; XUE, X. Y.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. **Transgenic Research**, v. 20, n. 3, p. 665-673, 2011.
- MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and Phylogenetic Relationships among Plant and Animal Cystatins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 359, n. 1, p. 24-30, 1998.
- MARSHALL, S. D.; GATEHOUSE, L. N.; BECHER, S. A.; CHRISTELLER, J. T.; GATEHOUSE, H. S.; HURST, M. R.; BOUCIAS, D. G.; JACKSON, T. A. Serine proteases identified from a *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeidae) midgut EST library and their expression through insect development. **Insect Molecular Biology**, v. 17, p. 247 – 259, 2008.

- MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LÜHRMANN, R.; TUSCHL, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell**, v. 110, p. 563–574, 2002.
- MARTINEZ, M.; DIAZ, I. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, p. 198, 2008.
- McGRATH, M. E. The lysosomal cysteine peptidases. **Annual Review Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 28, p. 181-204, 1999.
- MCMANUS, M. T.; WHITE, D. W. R.; MCGREGOR, P. G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgenic Research**, v. 3, p. 50-58, 1994.
- MELLO, C. C.; CONTE, D. Jr. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, v. 431, p. 338 -342, 2004.
- MORRIS, K.; LORENZEN, M. D.; HIROMASA, Y.; TOMICH, J. M.; OPPERT, C.; ELPIDINA, E. N.; VINOKUROV, K.; JURAT-FUENTES, J. L.; FABRICK, J.; OPPERT, B. *Tribolium castaneum* larval gut transcriptome and proteome: a resource for the study of the coleopteran gut. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 3889–3898, 2009.
- MURDOCK, L. L.; BROOKHART, G.; DUNN, P. E.; FOARD, D. E.; KELLEY, S.; KITCH, L.; SHADE, R. E.; SHUKLE, R. H.; WOLFSON, J. L. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 87, p. 783 – 787, 1987.
- NAGATA, K.; KUDO, N.; ABE, K.; ARAI, S.; TANOKURA, M. Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine protease inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica. **Biochemistry**, v. 39, p. 14753–1476, 2000.
- NAPPI, A. J. e OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **BioEssays**, v. 22, p. 469 – 480, 2000.
- NUNES, F. M. F.; SIMÕES, Z. L. P. A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p 157–160, 2009.
- OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteases and Cystatins. A Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 91 – 104, 2003.
- OPPERT, B.; MORGAN, T. T. D.; HARTZER K.; KRAMER, K. J. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, p. 53 – 58, 2005.
- OUTCHKOUROV, N. S.; DE KOGEL, W. J.; WIEGERS, G. L.; ABRAHAMSON, M.; JONGSMA, M. A. Engineered multidomain cysteine protease inhibitors yield

- resistance against western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) in greenhouse trials. **Journal Plant Biotechnology**, v. 2, p.449-458, 2004.
- PADILHA, M. H. P.; PIMENTEL, A. C.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 782–79, 2009.
- PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VENCIO, R. Z.; FELIX, J. M.; BRANCO, D. S.; WACLAWOVSKY, A. J.; DEL BEM, L. E.; LEMBKE, C. G.; COSTA, M. D.; NISHIYAMA JR, M. Y.; VICENTINI, R.; VINCENTZ, M. G.; ULIAN, E. C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics**, v. 10, p. 120, 2009.
- PATEL, A.; FONDRK, M. K.; KAFTANOGLU, O.; EMORE, C.; HUNT, G.; FREDERICK, K.; AMDAM, G. V. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. **PLoS ONE**, v. 62, n. 6, p. e509, 2007.
- PATRICK, M. L.; AIMANOVA, K.; SANDERS, H. R.; GILL, S. S. P-type Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and V-type H<sup>+</sup>-ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti* **The Journal of Experimental Biology**, 209, 4638-4651
- PAUCHET, Y.; MUCK, A.; SVATOS, A.; HECKEL, D. G.; PREISS, S. Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect. **Journal Proteome Research**, v. 7, p. 1629 – 1639, 2008.
- PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; VAN MUNSTER, M.; AUGUSTIN, S.; PAURON, D.; FFRENCHCONSTANT, R. H. Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 403 – 413, 2009.
- PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; VOGEL, H.; NELSON, D. R.; REYNOLDS, S. E. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defense. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 19, 61 – 75, 2010a.
- PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; CHAUHAN, R.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. **PLoS ONE**, v. 5, n.12, e15635, 2010b.
- PAULILLO, L. C.; LOPES, A. R.; CRISTOFOLETTI, P. T.; PARRA, J. R.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 892 – 896, 2000.
- PERNAS, M.; SANCHEZ-RAMOS, I.; SANCHEZ-MONGE, R.; LOMBARDERO, M.; ARTEAGA, C.; CASTAÑERA, P.; SALCEDO, G. Der p 1 and Der f 1, the highly related and major allergens from house dust mites, are differentially affected by a plant cystatin. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 30, p. 972–978, 2000.

- PHILIP, J. M.; FITCHES, E.; HARRISON, R. L.; BONNING, B.; GATEHOUSE, J. A. Characterisation of functional and insecticidal properties of a recombinant cathepsin L-like proteinase from flesh fly (*Sarcophaga peregrina*), which plays a role in differentiation of imaginal discs. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 589-600, 2007.
- POLANCZYK, R. A.; ALMEIDA, L. C.; PADULLA, L.; ALVES, S. B. Pragas da cana-de-açúcar X métodos alternativos de controle. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 14-17, julh./dez. 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/cana.pdf>>. Acesso em: dezembro de 2011.
- PRABHAKAR, S.; CHEN, M. S.; ELPIDINA, E. N.; VINOKUROV, K. S.; SMITH, C. M.; MARSHALL, J.; OPPERT, B. Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. **Insect Molecular Biology**, v. 16, p. 455 – 468, 2007.
- PRECETTI, A. A. C.; ARRIGONI, E. DE B. Aspectos bioecológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar. **Boletim Técnico COPERSUCAR**, Piracicaba: Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 3-15, 1990.
- PRICE, D. R.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 393 – 400, 2008.
- RABOSSI, A.; STOKA, V.; PUIZDAR, V.; TURK, V.; QUESADA-ALLUE, L.A. Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitis capitata* early metamorphosis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 57, p. 51–67, 2004.
- RAHBÉ, Y.; DERAISON, C.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; NARDON, C.; JOUANIN, L. Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. **Plant Science**, v. 164, p. 441-450, 2003.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial peptidases. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 62, p. 597-635, 1998.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, v. 290, p. 205 – 218, 1993.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, 244, 461 – 486, 1994.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 325 – 331, 1999.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. The peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 323-325, 2000.

- REIS, E. M.; MARGIS, R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification, and expression pattern analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 291 – 296, 2001.
- RIBEIRO, C. W.; SOARES-COSTA, A; FALCO, M. C.; CHABREGAS, S.; ULIAN, E. C.; COTRIN, S. S.; CARMONA, A. K.; SANTANA, L.; OLIVA, M. L. V.; HENRIQUE-SILVA, F. Production of a His-tagged Canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1060 – 1066, 2008.
- RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; WEINSTOCK, G. M.; BEEMAN, R. W.; LORENZEN, M. D.; LORD, J. C.; OPPERT, B. S. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, p. 949 – 955, 2008.
- ROSSO, M. N.; JONES, J. T.; ABAD, P. RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 207 – 232, 2009.
- RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, 1990.
- SALVESEN, G. S.; NAGASE, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R.; BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes**. Oxford: Oxford University Press, 2001. p. 105 – 130.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning** - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1 – 25, 1989.
- SANTOS, C. D.; TERRA, W. R. Midgut alpha-glucosidase and beta-fructosidase from *Erinnyis ello* larvae and imagoes: physical and kinetic-properties. **Insect Biochemistry**, v. 16, p. 819 -824, 1986.
- SCHARLAKEN, B.; de GRAAF, D. C.; MEMMI, S.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; JACOBS, F. J. Differential protein expression in the honeybee head after a bacterial challenge. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 65, p. 223 – 237, 2007.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in peptidases. I Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, p. 157-162, 1967.
- SHIRAI, K.; FUJII, H.; DOIRA, H.; IWAMOTO, H. Synthesis and resorption of a humoral chymotrypsin inhibitor, CI-8, by fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 363–368, 2000.
- SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinase of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology** - Part B: Biochemistry & Molecular Biology, v. 99, p. 529 – 533, 1991.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D.



- C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- SOARES-COSTA, A.; BELTRAMINI, L. M.; THIEMANN, O. H.; HENRIQUE-SILVA, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, p. 1194 – 1199, 2002.
- SOARES-COSTA, A.; DIAS, A. B.; DELLAMANO, M.; DE PAULA F. F.; CARMONA, A. K.; TERRA, W. R.; HENRIQUE-SILVA, F. Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 4, p. 462-468, 2011.
- SODERHALL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidaseactivating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 23 – 28, 1998.
- STOTHARD P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **Biotechniques**, v. 28, p.1102-1104, 2000.
- SUGIMURA, M.; WATANABE, H.; LO, N.; SAITO, H. Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacothaea hilaris*. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 3455 – 3460, 2003.
- SUMIDA , M.; YUAN , X. L.; MATSUBARA , F. Purification and some properties of soluble of soluble beta-fructofuranosidase from larval midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 107, p. 273 -284, 1994.
- TAKIO, K.; KOMINAMI, E.; WAKAMATSU, N.; KATUNUMA, N.; TITANI, K. Amino acid sequence of rat liver thiol proteinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 115, p. 902–908, 1983.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- TAO, K.; STEARNS, N. A.; DONG, J.; WU, Q. L.; SAHAGIAN, G. G. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 311, n. 1, p 19-27, 1994.
- TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, p. 47 – 61, 2001.
- TERRA, W. R.; CRISTOFOLETTI, P. T. Midgut Proteinases in Three Divergent Species of Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 113, n. 4, p. 725 - 730, 1996.

- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert, L. I. (Ed.) **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 365-418.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology** - Part B: Biochemistry & Molecular Biology, v. 109, p. 1 – 62, 1994.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BASTOS, F. Phylogenetic considerations of insect digestion: disaccharidases and the spatial organization of digestion in *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry**, v. 15, p. 443-449, 1985.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIA, K. F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TOMOYASU, Y.; DENELL, R. E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution*, v. 214, p. 575–578, 2004.
- TOMOYASU, Y.; MILLER, S. C.; TOMITA S.; SCHOPPEMEIER, M.; GROSSMANN, D.; BUCHER, G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. **Genome Biology**, v. 9, n. 1, p. R10, 2008.
- TREWITT, P. M.; HEILMANN, L. J.; KUMARAN, A. K. Boll weevil testis-specific cDNA. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 3646, 1990.
- TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 98-111, 2000.
- TURK, D.; GUNCAR, G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. **Acta Crystallographica** - Section D: Biological Crystallography, v. 59, p. 203–213, 2003.
- TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 285, p. 213 – 219, 1991.
- URWIN, P. E.; LILLEY, C. J.; ATKINSON, H. J. Ingestion of double-stranded RNA by pre parasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p 747 – 752, 2002.
- VALLIER, A.; VINCENT-MONEGAT, C.; LAURENCON, A.; HEDDI, A. RNAi in the cereal weevil *Sitophilus spp*: systemic gene knockdown in the bacteriome tissue. **BMC Biotechnology**, v. 9, p. 44, 2009.

- VANIN, S. A. A new species of *Sphenophorus* schoenherr from Brazil (Coleoptera, Curculionidae, Rhynchophorinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 34, n. 4, p. 697-701, 1990.
- VAURIE, P. Revision of the genus *Sphenophorus* in South America. **American Museum Novitates**, n. 2656, p. 1 -30, 1978.
- VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 1 – 7, 2001.
- VINOKUROV, K. S.; ELPIDINA, E. N.; OPPERT, B.; PRABHAKAR, S.; ZHUZHNIKOV, D. P.; DUNAEVSKY, Y. E.; BELOZERSKY, M. A. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 145, p. 126 – 137, 2006.
- VINOKUROV, K. S.; ELPIDINA, E. N.; ZHUZHNIKOV, D. P.; OPPERT, B.; KODRIK, D.; SEHNAL, F. Digestive proteolysis organization in two closely related tenebrionid beetles: red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and confused flour beetle (*Tribolium confusum*). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 70, p. 254 – 279, 2009.
- WANG, Y.; ZHANG, H.; LI, H.; MIAO, X. Second-Generation Sequencing Supply an Effective Way to Screen RNAi Targets in Large Scale for Potential Application in Pest Insect Control. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18644, 2011.
- WATANABE, H.; NODA, H.; TOKUDA, G. A cellulase gene from termite origin. **Nature**, v. 394, p. 330 – 331, 1998.
- WATANABE, M.; YURA, A.; YAMANAKA, M.; KAMEI, K.; HARA, S.; SUMIDA, M. Purification and characterization of fibroinase, a cathepsin L-like cysteine proteinase, from the silk gland in the fourth instar *Bombyx mori* larva at the fourth molt period, stage D2. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v. 73, p. 61 – 70, 2004.
- WHYARD, S.; SINGH, A. D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 824 – 832, 2009.
- WIECZOREK, H.; BEYENBACH, K. W.; HUSS, M.; VITAVSKA, O. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 1611-1619, 2009
- WIECZOREK, H.; BROWN, D.; GRINSTEIN, S.; EHRENFELD, J.; HARVEY, W. R. Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. **Bioessays**, v. 21, p. 637-648, 1999.
- ZAMORE, P. D.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A.; BARTEL, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Cell**, v. 101, p. 25-33, 2000.

- ZARBIN, P. H. G.; ARRIGONI, E. B.; RECKZIEGEL, A.; MOREIRA, J. A.; BARALDI, P. T.; VIEIRA, P. C. Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 2, p. 377-386, 2003.
- ZHA, W.; PENG, X.; CHEN, R.; DU, B.; ZHU, L. Knockdown of Midgut Genes by dsRNA-Transgenic Plant-Mediated RNA Interference in the Hemipteran Insect *Nilaparvata lugens*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, e20504, 2011.
- ZHENG, Y. P.; HE, W. Y.; BÉLIVEAU, C.; NISOLE, A.; STEWART, D.; ZHENG, S. C.; DOUCET, D.; CUSSON, M.; FENG, Q. L. Cloning, expression and characterization of four serpin-1 cDNA variants from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 154, p. 165–173, 2009
- ZHU , Y. C.; BAKER , J. E. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29 , p. 1053 – 1063, 1999.
- ZHU, Q.; ARAKANE, Y.; BEEMAN, R. W.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 6650-6655, 2008.
- ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; SHADE, R. E.; AHN, J. E. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 12, p. 135 – 145, 2003.
- ZOU, Z.; EVANS, J. D; LU, Z.; ZHAO, P.; WILLIAMS, M. Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. **Genome Biology**, v. 8, p. R17, 2007.
- ZOU, Z.; PICHEG, Z.; WENG, H.; MITA, K.; JIANG, H. A comparative analysis of serpin genes in the silkworm genome. **Genomics**, v. 93, n. 4, p. 367–375, 2009.

## VI ANEXOS

AA	Códon	<i>S. levis</i> Invertase n01 1437 pb		<i>S. levis</i> peptidases n13 12372 pb		Invertases de lepidópteros n09 14283 pb		Invertases de bactérias n11 15852 pb	
		abund.	freq.	abund.	freq.	abund.	freq.	abund.	freq.
Ala	GCG	1.00	0.05	18.00	0.05	47.00	0.23	114.00	0.30
Ala	GCA	8.00	0.36	36.00	0.10	53.00	0.26	61.00	0.16
Ala	GCT	10.00	0.45	198.00	0.55	64.00	0.32	58.00	0.15
Ala	GCC	3.00	0.14	109.00	0.30	38.00	0.19	142.00	0.38
Cys	TGT	3.00	0.50	43.00	0.37	27.00	0.59	29.00	0.39
Cys	TGC	3.00	0.50	72.00	0.63	19.00	0.41	46.00	0.61
Asp	GAT	22.00	0.61	114.00	0.50	185.00	0.58	238.00	0.64
Asp	GAC	14.00	0.39	112.00	0.50	132.00	0.42	132.00	0.36
Glu	GAG	4.00	0.17	41.00	0.18	97.00	0.32	139.00	0.43
Glu	GAA	19.00	0.83	183.00	0.82	209.00	0.68	183.00	0.57
Phe	TTT	18.00	0.72	50.00	0.30	133.00	0.54	121.00	0.54
Phe	TTC	7.00	0.28	117.00	0.70	114.00	0.46	105.00	0.46
Gly	GGG	5.00	0.14	24.00	0.06	31.00	0.08	103.00	0.22
Gly	GGA	16.00	<b>0.43</b>	130.00	<b>0.34</b>	165.00	<b>0.42</b>	59.00	<b>0.13</b>
Gly	GGT	15.00	0.41	171.00	0.45	102.00	0.26	97.00	0.21
Gly	GGC	1.00	0.03	52.00	0.14	97.00	0.25	199.00	0.43
His	CAT	9.00	0.60	26.00	0.35	59.00	0.48	91.00	0.44
His	CAC	6.00	0.40	48.00	0.65	65.00	0.52	116.00	0.56
Ile	ATA	13.00	0.37	22.00	0.09	85.00	0.34	25.00	0.15
Ile	ATT	14.00	0.40	113.00	0.46	90.00	0.36	66.00	0.40
Ile	ATC	8.00	0.23	113.00	0.46	78.00	0.31	74.00	0.45
Lys	AAG	5.00	0.17	66.00	0.38	77.00	0.35	37.00	0.34
Lys	AAA	24.00	0.83	109.00	0.62	141.00	0.65	72.00	0.66
Leu	TTG	14.00	<b>0.33</b>	81.00	<b>0.32</b>	90.00	<b>0.21</b>	34.00	<b>0.07</b>
Leu	TTA	12.00	0.28	28.00	0.11	85.00	0.20	74.00	0.15
Leu	CTG	5.00	<b>0.12</b>	33.00	<b>0.13</b>	68.00	<b>0.16</b>	245.00	<b>0.50</b>
Leu	CTA	4.00	0.09	13.00	0.05	47.00	0.11	26.00	0.05
Leu	CTT	3.00	0.07	52.00	0.20	60.00	0.14	51.00	0.10
Leu	CTC	5.00	0.12	50.00	0.19	70.00	0.17	63.00	0.13
Met	ATG	9.00	1.00	52.00	1.00	97.00	1.00	166.00	1.00
Asn	AAT	20.00	0.74	88.00	0.39	134.00	0.61	85.00	0.51
Asn	AAC	7.00	0.26	135.00	0.61	87.00	0.39	82.00	0.49

Anexo 1: Análise de códon *usage* das sequências de cDNA que codificam as invertases de *S. levis*, de lepidópteros e de bactérias. Os códons são indicados pela abundância (abund.) nas sequências de cDNA e pela frequência (freq.) em relação às variantes das trinças que codificam o mesmo aminoácido. As células destacadas indicam as diferenças entre os códons preferenciais identificados para as invertases de eucariotos e bacterianas. No cabeçalho, "n" refere-se ao número de sequências analisadas e o número de pares de bases (pb) também é indicado. Para a validação da comparação foram utilizadas as sequências das peptidases de *S. levis* mais abundantes na biblioteca, incluindo a *rSI-CathL*.

Aminoác.	Códon	<i>S. levis</i> Invertase n01 1437 pb		<i>S. levis</i> peptidasas n13 12372 pb		Invertases de lepidópteros n09 14283 pb		Invertases de bacterias n11 15852 pb	
		abund.	freq.	abund.	freq.	abund.	freq.	abund.	freq.
Pro	CCG	4.00	<b>0.16</b>	13.00	<b>0.09</b>	48.00	<b>0.22</b>	154.00	<b>0.52</b>
Pro	CCA	13.00	<b>0.52</b>	51.00	<b>0.36</b>	59.00	<b>0.27</b>	55.00	<b>0.19</b>
Pro	CCT	6.00	0.24	39.00	0.28	79.00	0.36	44.00	0.15
Pro	CCC	2.00	0.08	38.00	0.27	34.00	0.15	41.00	0.14
Gln	CAG	2.00	<b>0.13</b>	44.00	<b>0.26</b>	60.00	<b>0.36</b>	237.00	<b>0.77</b>
Gln	CAA	13.00	<b>0.87</b>	123.00	<b>0.74</b>	108.00	<b>0.64</b>	71.00	<b>0.23</b>
Arg	AGG	1.00	0.06	14.00	0.10	33.00	0.15	13.00	0.04
Arg	AGA	7.00	<b>0.39</b>	69.00	<b>0.50</b>	82.00	<b>0.37</b>	13.00	<b>0.04</b>
Arg	CGG	0.00	0.00	6.00	0.04	20.00	0.09	44.00	0.13
Arg	CGA	6.00	0.33	11.00	0.08	35.00	0.16	20.00	0.06
Arg	CGT	1.00	0.06	18.00	0.13	25.00	0.11	75.00	0.22
Arg	CGC	3.00	<b>0.17</b>	19.00	<b>0.14</b>	28.00	<b>0.13</b>	170.00	<b>0.51</b>
Ser	AGT	8.00	0.24	50.00	0.14	78.00	0.24	49.00	0.16
Ser	AGC	5.00	<b>0.15</b>	69.00	<b>0.20</b>	57.00	<b>0.18</b>	122.00	<b>0.39</b>
Ser	TCG	1.00	0.03	32.00	0.09	29.00	0.09	42.00	0.13
Ser	TCA	9.00	<b>0.27</b>	58.00	<b>0.17</b>	72.00	<b>0.23</b>	36.00	<b>0.12</b>
Ser	TCT	7.00	<b>0.21</b>	70.00	<b>0.20</b>	54.00	<b>0.17</b>	24.00	<b>0.08</b>
Ser	TCC	3.00	0.09	70.00	0.20	30.00	0.09	40.00	0.13
Thr	ACG	4.00	0.31	13.00	0.06	55.00	0.22	41.00	0.23
Thr	ACA	7.00	0.54	34.00	0.15	61.00	0.25	28.00	0.16
Thr	ACT	2.00	0.15	76.00	0.34	86.00	0.35	15.00	0.08
Thr	ACC	0.00	0.00	100.00	0.45	44.00	0.18	96.00	0.53
Val	GTG	1.00	0.04	40.00	0.13	74.00	0.22	117.00	0.39
Val	GTA	8.00	0.30	58.00	0.19	88.00	0.27	33.00	0.11
Val	GTT	13.00	0.48	115.00	0.38	91.00	0.28	60.00	0.20
Val	GTC	5.00	0.19	90.00	0.30	76.00	0.23	92.00	0.30
Trp	TGG	14.00	1.00	88.00	1.00	138.00	1.00	202.00	1.00
Tyr	TAT	18.00	0.69	57.00	0.28	125.00	0.48	140.00	0.68
Tyr	TAC	8.00	0.31	146.00	0.72	137.00	0.52	66.00	0.32
End	TGA	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.11	1.00	0.09
End	TAG	0.00	0.00	1.00	0.08	3.00	0.33	0.00	0.00
End	TAA	0.00	0.00	12.00	0.92	5.00	0.56	10.00	0.91