

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

TAÍSE FERNANDA DA SILVA FERRARA

**Identificação, expressão recombinante e caracterização de uma cisteíno
peptidase de *Diaphorina citri*, inseto vetor da doença *Huanglongbing***

SÃO CARLOS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

TAÍSE FERNANDA DA SILVA FERRARA

**Identificação, expressão recombinante e caracterização de uma cisteíno
peptidase de *Diaphorina citri*, inseto vetor da doença *Huanglongbing***

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

Co-orientador: Luciano Takeshi Kishi

SÃO CARLOS

2014

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

F374ie Ferrara, Taíse Fernanda da Silva.
Identificação, expressão recombinante e caracterização de uma cisteíno peptidase de *Diaphorina citri*, inseto vetor da doença *Huanglongbing* / Taíse Fernanda da Silva Ferrara. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
109 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Enzimas. 2. Cítricos. 3. Cisteíno peptidase. 4. *Diaphorina citri*. 5. Catepsina B-like. 6. *Huanglongbing* (HLB). I. Título.

CDD: 574.1925 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**“IDENTIFICAÇÃO, EXPRESSÃO RECOMBINANTE E
CARACTERIZAÇÃO DE UMA CISTEÍNO PEPTIDASE DE *Diaphorina
citri*, INSETO VETOR DA DOENÇA *Huanglongbing*”**

Dissertação de Mestrado de

TAÍSE FERNANDA DA SILVA FERRARA

Banca Examinadora

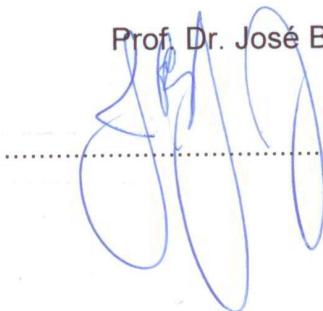
Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes



Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona



Prof. Dr. José Belasque Júnior



Dedico,

À Deus, fonte de graça, amor e sabedoria, ao meu amado esposo Davi Ferrara, por todo amor, confiança e paciência, e aos meus pais, Raimundo e Janete, por serem meu bem mais precioso.

“A história da lebre e da tartaruga é a história da vitória da perseverança contra todas as probabilidades de fracasso. Em outras palavras, assim como aconteceu com a tartaruga, você não pode fracassar, se você não desistir jamais.”

(Catherine Ponder)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pai fiél, amigo e protetor, pela maravilhosa dádiva de viver, por seu imenso e profundo amor e por me presentear com a melhor família, o melhor esposo e os melhores amigos.

À Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes, pela preciosa orientação, apoio, amizade e confiança. Por ser uma orientadora sempre presente, disposta a ajudar e ensinar e por sempre esclarecer minhas dúvidas e principalmente por me acalmar em momentos de desespero. Meu muito obrigado, por toda paciência, aprendizado, por se alegrar e por sofrer comigo, mas, principalmente por ter sido sempre um grande exemplo de caráter, personalidade e conduta.

Ao professor Dr. Flávio Henrique Silva por ter sido um segundo orientador, por ter me recebido em seu laboratório para a realização desse trabalho, por todo apoio, amizade, compreensão, preocupação, críticas construtivas e sábios conhecimentos compartilhados que contribuíram para meu aprendizado e crescimento.

Ao meu co-orientador e amigo, bioinformata Luciano Takeshi Kishi, pela grande co-orientação e amizade, por toda ajuda, inicial e no decorrer de todo o trabalho, por toda paciência, atenção, sábios conselhos e por toda experiência de vida compartilhada, que contribuíram de forma significativa para meu crescimento profissional e para a realização desse trabalho. Muito obrigada.

Ao programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia molecular da UFScar e a secretária Ivanildes por todo suporte para a realização desse trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) de Araraquara – SP, pela colaboração para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Belasque Júnior pela valiosa colaboração nos experimentos, pela disponibilização dos insetos utilizados no trabalho, por todo o auxílio e amizade, também, aos estagiários da Fundecitrus, Lucas Abrantes Silva e Rafael Garcia Brandão pela prontidão, disponibilidade e suporte.

Ao Dr. Wayne Hunter, pela colaboração, boa vontade e disponibilização dos dados do transcriptoma de *Diaphorina citri* desenvolvida pelo United States Department of Agriculture (USDA).

A Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona, por gentilmente me receber em seu laboratório para a realização dos testes de ativação da proteína recombinante e também ao Prof. Dr. Márcio Fernando Madureira Alves, pela disposição, ajuda e por toda experiência compartilhada na parte de ativação de cisteíno peptidases.

Ao Prof. Dr. José Cesar Rosa, pela colaboração nos experimentos de espectrometria de massa, para sequenciamento da proteína recombinante.

Aos meus amados pais, Raimundo Pereira da Silva e Janete Duarte da Silva, por tamanho amor e dedicação, por serem meu bem mais precioso, e, sem dúvida, por serem meu alicerce, referenciais de honra, força, honestidade e determinação, em todo o meu caminhar.

Ao meu grande e eterno amor, meu esposo, Davi Ferrara, por tornar os momentos felizes da minha vida inesquecíveis, e os difíceis, suportáveis. Por estar sempre ao meu lado, por ser parte da minha vida, por todo amor, carinho, compreensão, confiança e por sonhar junto comigo.

Ao meu querido irmão, Sargento Wendel Lucas da Silva, por ser um dos meus maiores exemplos de persistência e por sempre me apoiar e incentivar em todas as minhas escolhas.

Aos meus queridos e amados pastores e sogros Nilson Ferrara e Sandra Ferrara por serem meus pais na fé, me apoiarem em minhas decisões, orem e torcerem por mim, por todo amor, carinho e por todos os ensinamentos de vida que sem dúvida, corroboraram para que eu chegasse até aqui.

A minha tia, Márcia Helena, por sempre se preocupar comigo, querendo sempre estar participando da minha vida, por me dar tanto carinho, amor, compreensão e amizade.

Ao meu sobrinho Lucas Ferrara, que sempre ocupou um grande espaço em meu coração, apesar de tão pequeno, por toda ternura e por ser uma, das minhas maiores alegrias.

A minha amiga e “irmã”, Patrícia Elias, por todo carinho, amor, amizade, companheirismo e preocupação. Por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e críticos da minha vida, tornando-os mais alegres.

A minha querida “sister” Andressa Lima, por toda amizade, carinho, felicidade e principalmente por me aguentar e compartilhar momentos de alegria, gulodisse, tristeza e estresse. Muito obrigada Dressa.

A minha amiga “gaúcha” Vanessa Schneider, que apareceu em minha vida não há muito tempo, mas, que esteve comigo nos momentos mais estressantes e críticos do meu trabalho, mostrando-se uma verdadeira amiga, obrigada pela amizade, alegria, carinho, risadas e principalmente pela disposição em fazer o bem e ajudar sempre! Tenho certeza que essa conduta irá te render muitos bons frutos.

As amigas, Marina Rocha, Karina Lopes por todo apoio, carinho e amizade. Aos colegas de laboratório, Adelita Santiago, Elizabeth Baraldi, Rafael Pedezzi, Darlan Nakayama, Rafaela Côrrea, Fernando Fonseca, Mariana Cardoso, Ana Lígia, Danyelle Toyama, Daniela Néó, Priscila Vasques Castilho, Gabriel Belém, Bruna Arcângelo, Augusto Balula, Mariana, Ehnara, Rafael, Rodrigo, Franciele e Ana Paula, pela amizade, conhecimentos e experiência compartilhados e boa convivência no trabalho. Também aos que fizeram parte e deixaram saudades, aos meus queridos Wesley Generoso, Aliandra Gibertoni, Lucas Catelli, Letícia Andrade e Vanessa Souza.

A Todos, meu muitíssimo obrigado, aos que muito ou pouco colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

RESUMO

O Brasil é um dos maiores exportadores de laranjas do mundo, sendo o estado de São Paulo o maior produtor de citros no país. Nos últimos anos as plantas do gênero *citrus* têm sido fortemente afetadas por diversas patologias e dentre estas, a doença *Huanglongbing* (HLB) têm ocupado papel de destaque e importância devido aos danos devastadores causados a citricultura mundial. Causada pela *Candidatus Liberibacter* spp., uma bactéria que coloniza e obstrui os vasos condutores da seiva elaborada (floema) e transmitida pelo vetor, hemíptero, o psilídeo *Diaphorina citri*. Neste contexto, se faz necessário à busca por estratégias de controle para a doença nos pomares de citros. Com a finalidade de identificar uma cisteíno peptidase de *D. citri*, no presente trabalho, foi realizada a identificação, expressão recombinante e caracterização de uma cisteíno peptidase de *D. citri*, do tipo (catepsina B) denominada *DiaciCATHB*. A identificação de uma ORF para cisteíno peptidase de foi realizada através do banco de dados do transcriptoma de *D. citri*. A expressão recombinante foi realizada em células da levedura *Pichia pastoris*. Para a ativação da enzima recombinante fatores importantes foram observados, como condições ácidas e incubação em temperatura e tempo adequados. A caracterização cinética da enzima foi verificada pela hidrólise do substrato sintético Z-Phe-Arg-MCA, resultando em um (K_m) de 15,7 μ M. Testes de inibição da atividade enzimática foram realizados utilizando a o inibidor de cisteíno peptidases recombinante CaneCPI-4, resultando na constante de inibição (K_i) de 0,05 nM. A análise de expressão do gene *DiaciCATHB* demonstrou que a expressão do gene ocorre em todas as fases de desenvolvimento do inseto, havendo no entanto, uma diferença significativa no nível de expressão. De acordo com as fases de desenvolvimento do inseto *D. citri*, o nível de expressão de *DiaciCATHB* aumenta gradualmente, sendo maior nas fases de ninfa e adulto. Os resultados obtidos nesse trabalho não comprovam qual a localização e função exercida pela enzima *DiaciCATHB*, porém, independente disso, a cisteíno peptidase em estudo apresenta potencial para tornar-se um importante alvo para a utilização em futuros estudos no controle do inseto.

ABSTRACT

Brazil is a major exporter of oranges in the world, with the state of São Paulo, the largest citrus producer in the country. In the last years plants of the genus *citrus* have been strongly affected by various diseases and among them, the disease *Huanglongbing* (HLB) have occupied prominent role and importance due to the devastating damage caused to citrus production worldwide. Caused by *Candidatus Liberibacter* spp., a bacterium that colonizes and blocks the conductive vessels of elaborated sap (phloem) and transmitted by the vector, hemiptera, the psyllid *Diaphorina citri*. In this context, it is necessary to search for strategies to control the disease in citrus orchards. In order to identify a cysteine peptidase *D. citri*, in this work, the identification, recombinant expression and characterization of a cysteine peptidase *D. citri*, the type (cathepsin B) called *DiaciCATHB* was performed. The identification of an ORF for cysteine peptidase was performed using the database of the transcriptome of *D. citri*. Recombinant expression was performed in *Pichia pastoris* yeast cells. For activation of the recombinant enzyme important factors were observed, acidic conditions and incubation in suitable temperature and time. Kinetic characterization of the enzyme was verified by hydrolysis of the synthetic substrate Z-Phe-Arg-MCA, resulting in a (k_m) of 15.7 mM. Inhibition of the enzymatic activity tests were conducted using the recombinant inhibitor of cysteine peptidases CaneCPI-4, resulting in the inhibition constant (K_i) of 0.05 nM. The analysis of gene expression *DiaciCATHB* demonstrated that gene expression occurs in all stages of insect development, there is however a significant difference in expression level. According to the developmental stages of the insect *D. citri*, the expression level gradually increases *DiaciCATHB*, being higher in nymph and adult stages. The present results do not prove that the location and function performed by the enzyme *DiaciCATHB*, but regardless, the cysteine peptidase in this study has the potential to become an important target for use in future studies on insect control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Maturação e coloração irregular em plantas sintomáticas para HLB.....	26
Figura 1.2. Morfologia de ovo de <i>Diaphorina citri</i>	26
Figura 1.3. Ninfas de <i>D. citri</i> mostrando os cinco ínstares de desenvolvimento.....	28
Figura 1.4. Morfologia <i>D. citri</i> adulto.....	29
Figura 1.5. Ciclo Biológico do psilídeo <i>D. citri</i>	31
Figura 1.6. Modelo proposto por Schechter e Berger (1967).....	38
Figura 1.7. Mecanismo catalítico de cisteino peptidases.....	41
Figura 1.8. Estruturas tridimensionais das enzimas: catepsina L, papaína e catepsina B.....	43
Figura 3.1. Plasmídeo PTZ57r, utilizado como vetor de propagação.....	51
Figura 3.2. Representação da hidrólise do substrato fluorogênico.....	62
Figura 4.1. Peptídeo sinal identificado na sequência da cisteino peptidase de <i>D. citri</i>	70
Figura 4.2. Possíveis sítios de N - glicosilação da <i>DiaciCATHB</i>	71
Figura 4.3. Predição do pró-peptídeo, família e sítios ativos da cisteino peptidase.....	72
Figura 4.4. Alinhamento das sequências de aminoácidos das catepsinas B de diferentes organismos.....	73
Figura 4.5. Amplificação da região codante da catepsina B de <i>D. citri</i>	74
Figura 4.6. PCR de colônias do plasmídeo PTZ57r + ORF Catepsina B.....	75
Figura 4.7. Análise de restrição (enzimas <i>Eco RI</i> e <i>Xba I</i>) para confirmação do plasmídeo de expressão.....	76
Figura 4.8. Linearização do plasmídeo de expressão pPICZ α C_ <i>DiaciCATHB</i>	76
Figura 4.9. Esquema representativo do plasmídeo de expressão pPICZ α C_ <i>DiaciCATHB</i> e sequência da ORF da catepsina B.....	77
Figura 4.10. PCR das colônias de KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZ α C_ <i>DiaciCATHB</i>	78

Figura 4.11. Expressão do plasmídeo de expressão pPICZαC_ <i>DiaciCATHB</i> recombinante em <i>P. Pastoris</i> KM71H.....	79
Figura 4.12. Purificação de <i>DiaciCATHB</i> expressa em <i>P. pastoris</i>	81
Figura 4.13. Ensaio de imunodeteção de <i>DiaciCATHB</i>	82
Figura 4.14. Zimografia reversa.....	83
Figura 4.15. Curva de hidrólise do substrato Z-F-R-MCA.....	85
Figura 4.16. Gráfico da atividade inibitória da canacistatina CaneCPI-4 sobre a <i>DiaciCATHB</i>	88
Figura 4.17. Testes preliminares de inibição da <i>DiaciCATHB</i> utilizando os inibidores E64 e CA074.....	89
Figura 4.18. Peptídeos obtidos por espectrometria de massa da proteína recombinante purificada.....	90
Figura 4.19. Análise de expressão por qPCR do cDNA que codifica a proteína <i>DiaciCATHB</i> nas fases de desenvolvimento de ovo, ninfa e adulto de <i>D. citri</i>	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Ciclo biológico de <i>D. citri</i> e fecundidade das fêmeas.....	30
Tabela 3.1. Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de <i>DiaciCATHB</i> no vetor de expressão.....	49
Tabela 3.2. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento de <i>DiaciCATHB</i>	54
Tabela 3.3. Oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ_{em} : comprimento de onda de emissão

λ_{ex} : comprimento de onda de excitação

μg : micrograma

μL : microlitro

μm : micromêtro

μM : micromolar

$^{\circ}\text{C}$: graus Celsius

BMGY: meio complexo contendo glycerol

BMMY: meio complexo contendo metanol

CA074: [L-3-trans-(Propylcarbamoil)oxirane-2-carbonyl]-L-isoleucyl-L-proline

cDNA: DNA complementar

cm: centímetro

CP: cisteíno peptidase

Ct: cycle threshold

D.O: densidade óptica

dNTPS: desoxirribonucleotídeos trifosfato

DTT: ditioneitol

E-64: transepoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano

G: força G

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

K_m : quantidade de substrato necessária para a enzima atingir metade da velocidade máxima

K_i : Constante de inibição

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

mm: milímetro

mRNA: RNA mensageiro

ng: nanograma

nm: nanômetro

nM: nanomolar

nt: nucleotídeo

NCBI: National Center Biotechnology Information

ORF: *Open reading frame* (fase aberta de leitura)

pb: pares de bases

PCR: Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

pH: potencial de hidrogênio

PVDF: polivinilideno difluorido

qPCR: PCR quantitativo

RNA: ácido ribonucléico

RNase: ribonuclease

rpm: rotações por minuto

s: segundo

SDS: sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato

T_m: temperatura de desnaturação

U: unidade enzimática

UAF: unidade arbitrária de fluorescência

UDG: uracil-DNA-glicosilase

UV: ultravioleta

V: volts

Vs: versus

X: vezes

TBS: solução salina tamponada com tris

USDA: United States Department of Agriculture

UV: ultravioleta

V: volts

Z-F-R-MCA: carbobenzoic acid-Phe-Arg-7-amino-4-methylcoumarin

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. GÊNERO <i>CITRUS</i> , E SUA IMPORTÂNCIA DENTRO DA SUBFAMÍLIA AURANTIOIDEAE.....	20
1.2. Citricultura, importância econômica mundial.....	20
1.2.1. Algumas patologias que afetam diretamente a citricultura.....	21
1.2.1.1 <i>Huanglongbing</i> , etiologia, histórico e progressão da doença.....	23
1.3. Descrição da morfologia das fases de desenvolvimento do inseto vetor do HLB – <i>Diaphorina citri</i>	26
1.3.1 Ovos.....	26
1.3.2. Ninfas.....	27
1.3.3. Adultos.....	28
1.4. Etiologia, distribuição, particularidades e hospedeiros do vetor <i>D. citri</i>	31
1.5. Agente causal do HLB.....	32
1.6. Legislação e medidas de controle do HLB.....	34
1.7. Inibidores de proteases, uma alternativa para a medida de controle do vetor <i>D. citri</i>	36
1.8. Enzimas proteolíticas.....	37
1.8.1. Cisteíno peptidases.....	39
1.8.2. Catepsina B.....	41
1.9. Cistatinas: inibidores de cisteíno peptidases.....	44
1.9.1. Fitocistatinas.....	45
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1. ANÁLISE IN SÍLICO DAS SEQUÊNCIAS E OBTENÇÃO DOS CLONES CONTENDO ORF DA CISTEÍNO PEPTIDASE DO TIPO CATEPSINA B DE <i>DIAPHORINA CITRI</i>	48
3.2. Insetos de <i>D. citri</i>	49
3.3. Extração do RNA total de <i>D. citri</i>	49
3.3.1. Síntese de cDNA e amplificação do gene da cisteíno peptidase de <i>D. citri</i>	50

3.3.2. Construção do plasmídeo de propagação <i>PTZ_DiaciCATHB</i>	51
3.4. Transformação do plasmídeo de expressão <i>pPICZαC_DiaciCATHB</i> em células de <i>Pichia pastoris</i>	54
3.4.1. Ensaio de expressão recombinante da catepsina B de <i>D. citri</i> em pequena escala em <i>P. pastoris</i>	57
3.4.2. Expressão recombinante da catepsina B de <i>D.citri</i> em larga escala.....	58
3.4.3. Purificação da proteína recombinante <i>DiaciCATHB</i> por cromatografia de afinidade.....	58
3.5. Produção de anticorpo policlonal contra <i>DiaciCATHB</i> recombinante e ensaio de <i>Western Blot</i>	59
3.6. Zimografia Reversa.....	60
3.7. Ativação da Cisteíno peptidase <i>DiaciCATHB</i>	61
3.7.1. Caracterização cinética da cisteíno peptidase recombinante <i>DiaciCATHB</i>	61
3.7.2. Cálculo da constante de Michaelis-Menten.....	62
3.7.3. Ensaio de inibição da atividade catalítica da <i>DiaciCATHB</i>	62
3.8. Análise por espectrofotometria de massa da cisteíno peptidase recombinante.....	63
3.9. Coleta das fases de desenvolvimento de <i>D. citri</i> e extração do RNA total de ovos de <i>D. citri</i> para análise de expressão gênica.....	64
3.9.1. Tratamento dos RNAs provenientes das fases de desenvolvimento de <i>D. citri</i> com DNase.....	65
3.10. Desenho dos oligonucleotídeos utilizados no qPCR.....	66
3.11. Cálculo de eficiência e especificidade do oligonucleotídeos qPCR.....	66
3.12. Análise de expressão gênica relativa de <i>DiaciCATHB</i> em diferentes fases de desenvolvimento.....	67
3.13. Análise dos dados de expressão gênica por qPCR.....	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQUÊNCIA DA <i>DIACICATHB</i>	69
4.2. Construção do plasmídeo de expressão <i>pPICZαC_DiaciCATHB</i>	74
4.3. Transformação do plasmídeo <i>pPICZαC_DiaciCATHB</i> em células de <i>Pichia pastoris</i>	78
4.4. Expressão da proteína <i>DiaciCATHB</i> recombinante em células de <i>Pichia pastoris</i>	78
4.5. Purificação da proteína <i>DiaciCATHB</i> recombinante.....	80
4.6. Imununodeteção de <i>DiaciCATHB</i>	82

4.7. Detecção da atividade do sobrenadante de <i>P. pastoris</i> expressando a cisteíno protease recombinante em gel de gelatina.....	82
4.8. Ativação da proteína recombinante <i>DiaciCATHB</i> purificada.....	83
4.9. Atividade da cisteíno peptidase recombinante e cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m).....	84
4.10. Ensaio de inibição da atividade de <i>DiaciCATHB</i> por uma cistatina recombinante (CaneCPI-4).....	85
4.11. Sequenciamento da cisteíno peptidase recombinante <i>DiaciCATHB</i> expressa em <i>P. pastoris</i> por espectrometria de massa.....	89
4.12. Análise de expressão gênica de <i>DiaciCATHB</i> em diferentes fases de desenvolvimento do inseto.....	90
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Citrus*, e sua importância dentro da subfamília Aurantioideae

O gênero *Citrus* tem sido amplamente estudado pela sua importância econômica e complexidade taxonômica (SWINGLE; REECE, 1967). Estima-se que *Citrus* e gêneros correlatos surgiram há cerca de 20 a 30 milhões de anos e que seu provável centro de origem e diversidade compreenda as regiões subtropicais e tropicais do continente Asiático e Arquipélagos Malaios, de onde se expandiram por todo o mundo (WEBBER, 1967). Este gênero é representado por plantas de porte médio (arbóreo/arbustivo), flores brancas, com aroma e frutos tipo baga, contendo vesículas preenchidas por um suco de grande interesse comercial (ARAUJO; ROQUE, 2005).

O Citros pertence a família Rutaceae, subfamília Aurantioideae (Citroideae) que é composta de 155 gêneros e 1.600 espécies, é amplamente distribuída nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. No Brasil, a família está representada por cerca de 29 gêneros e 182 espécies (BARROSO et al., 1984).

1.2. Citricultura, importância econômica mundial

A cultura do citros possui grande importância econômica mundial, sendo atualmente produzido em 140 países, resultando em uma produção anual com mais de 122 milhões de toneladas. Atualmente, segundo dados da FAO (2013), os maiores produtores são China, Brasil, Estados Unidos, Índia e México.

O setor citrícola têm um papel importante no agronegócio brasileiro e no aprimoramento dessa atividade e grande relevância no seu desenvolvimento. O Brasil possui certificação para a produção de mudas e viveiros, cultivo de frutas cítricas, produção de suco e canais de distribuição internacional que levam os produtos cítricos ao consumidor europeu, norte-americano e asiático (NEVES et al., 2010). Atualmente a produção de citros ocupa uma posição importante para o agronegócio brasileiro, já que o Brasil é um dos maiores exportadores de laranjas do mundo, sendo o estado de São Paulo o maior produtor de citros no país (LEAL et al., 2010).

A partir da década de 60, com o desenvolvimento da indústria de suco concentrado, o crescimento da demanda pela matéria-prima provocou expansão da área plantada e da produção, até o fim dos anos 90, passando a constituir uma das principais atividades agrícolas do Estado de São Paulo. Atualmente o Brasil detém uma parte significativa da produção e exportação mundial de suco de laranja, sendo o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado congelado (NEVES, et al., 2010). No Estado de São Paulo, as maiores regiões produtoras formam quatro pólos produtores de citros: a região central (São Carlos – Araraquara), a norte (Bebedouro – São José do Rio Preto), a Sudeste (Araras – Mogi-Guaçu) e o pólo centro sul (Bauru – Itapetininga) (BOTEON; NEVES, 2005).

Nas últimas 15 safras, de 1995/96 a 2009/10, a queda na produção mundial de suco foi de 13% (equivalentes a 308 mil toneladas), sendo que as maiores reduções aconteceram na Flórida em 295 mil toneladas e no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro em 31 mil toneladas. De acordo com dados disponibilizados pela Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos – CitrusBR é possível verificar uma queda na produção de laranjas do cinturão citrícola do Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro nos últimos anos, sendo que a safra de 2013/2014 apresentou uma produção de 281 milhões de caixas e a safra de 2011/2012 387 milhões de caixas, ambas com 40,8 kg de peso por caixa (CITRUSBR, 2013).

Na atividade citrícola, a principal fonte de risco é a perda de produtividade que é causada por ataque de pragas e doenças e por condições climáticas drásticas, que é também, fator determinante no desenvolvimento de muitas doenças. O risco da atividade citrícola se deve ao fato de que, ao longo de sua história, a cultura da laranja foi constantemente atacada por pragas e doenças, sendo que, atualmente, considera-se que existam em torno de 300 pragas e doenças afetando a citricultura paulista (FIGUEIREDO, 2008).

1.2.1. Algumas patologias que afetam diretamente a citricultura

O controle da maioria das doenças que atingem o citros é baseado na extensa utilização de agrotóxicos, utilizados para o controle de pragas e patógenos e em medidas preventivas, como obtenção de mudas certificadas, manutenção da

nutrição de plantas, controle de vetores, desinfestação de materiais e veículos e o uso de quebra-ventos na tentativa de diminuir a disseminação de patógenos pelo pomar (FUNDECITRUS, 2006).

As doenças causadas pelos fungos do gênero *Phytophthora* sp. apresentam sérios problemas (desde a sementeira, atividades no viveiro, até a fase de pós-colheita). As ocorrências em pomares comerciais, são as que refletem uma atenção maior devido aos grandes prejuízos causados pela aparência e na qualidade dos frutos (FEICHTENBERGER, 1990; ROSSETTI et. al, 1987).

Os porta-enxertos estão constantemente expostos à infecção por *Phytophthora* sp. Por estarem intimamente expostos ao solo. Além de raízes necrosadas, os sintomas também são evidentes na região do colo das plantas com a presença de goma, fendilhamento da casca e típicas lesões pardacentas no lenho. Quando toda a periferia do tronco do porta-enxerto passa a ser afetada, as plantas morrem, pois toda a região do câmbio já foi comprometida. Estes sintomas também podem ocorrer acima da linha de enxertia, se a variedade de copa for suscetível como, por exemplo, as laranjas doces (FEICHTENBERGER, 1990; ROSSETTI et. al, 1987).

Em 1999 foi observada uma nova doença que afeta as laranjas doces *Citrus sinensis* enxertadas em limão “cravo” na cidade de Comendador Gomes, no sul do Estado de Minas Gerais (GIMENES-FERNANDES; BESSANEZI, 2001). Devido à velocidade com que as plantas definham e morrem, a denominação de Morte Súbita dos Citros (MSC) foi atribuída a esta doença (CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA, 2001). Evidências demonstram que a MSC seja semelhante à tristeza dos citros na sua forma de declínio rápido, quando a laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] é enxertada sobre a laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L.), e que seja causada por um vírus disseminado por um vetor. Esta hipótese é baseada na associação constante das plantas com sintomas de MSC com o a tristeza dos citros (CTV- Citrus tristeza vírus), pertencente à família Closteroviridae, gênero *Closterovirus*, e nas semelhanças entre a MSC e a tristeza quanto à sintomatologia (GIMENES-FERNANDES; BESSANEZI, 2001).

O cancro cítrico representa uma das principais doenças da cultura dos citros (KOIZUMI, 1985; GOTTWALD et al., 2001, 2002; STALL; SEYMOUR, 1983). Causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, afeta todas as espécies e

variedades de citros de importância comercial. Com origem na Ásia, onde ocorre de forma endêmica em todos os países produtores, foi constatado pela primeira vez no Brasil em 1957, nos Estados de São Paulo e Paraná (<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/7-Cancro>). O sequenciamento completo do genoma da bactéria permitiu evidenciar a considerável versatilidade bioquímica e uma série de mecanismos que esse organismo utiliza para a sua sobrevivência e para a infecção da planta hospedeira (DA SILVA et al., 2002). Os sintomas são encontrados em folhas, e um halo amarelo ao redor do centro corticoso das lesões, que, inicialmente, nas folhas, surgem como pequenas pontuações de coloração castanha com halo amarelo, que evoluem para lesões corticosas e salientes em ambos os lados (CHAGAS et al., 2001; GOTTWALD et al., 1997). Em ramos, as lesões podem ocasionar-lhes a morte quando atingem grandes áreas. Desfolha e queda de frutos podem ocorrer sob condições favoráveis de epidemia, sendo mais comuns em hospedeiros mais suscetíveis (GOTTWALD et al., 1988, 1989).

Entre as principais doenças presentes na cultura de citros, está o *huanglongbing* (HLB), popularmente conhecido como “greening” (TSAI; LIU, 2000; ALEMÁN et al., 2007; BOINA et al., 2009).

1.2.1.1 - *Huanglongbing*, etiologia, histórico e progressão da doença

Antes da adoção do termo chinês *huanglongbing* (doença do ramo amarelo) como nome oficial da doença, a mesma recebeu diversas denominações de acordo com o local de ocorrência dos sintomas como “Greening” (inversão de cores na fase de amadurecimento dos frutos) na África do Sul, “Dieback” (seca de ponteiros) na Índia, “Phloem degeneration” (necrose do floema ou degeneração do floema) na Indonésia, “Likubin” (declínio) em Taiwan e “Leaf mottling” (folha mosqueada) nas Filipinas (BOVÉ, 2006).

Huanglongbing (HLB) é uma doença que afeta severamente a cultura do citros, ameaçando sua viabilidade econômica. O HLB é conhecido na China há mais de cem anos, tendo sido relatado pela primeira vez por Reinking em 1919 com esse nome *huanglongbing* (REINKING, 1919; LIN, 1956). Na África, uma doença com sintomas similares foi descrita em 1937, com o nome de greening (VAN DE MERWE; ANDERSON, 1937). Nos diversos países asiáticos onde ocorre, o HLB

está associado à presença da bactéria *Candidatus* (Ca.) *Liberibacter* (L.) *asiaticus*, enquanto que na África, à presença de *Ca. L. africanus* (GARNIER; BOVÉ, 1996). Essa bactéria *Candidatus* *Liberibacter* spp. é transmitida pelo psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), classificada recentemente como família Liviidae. Uma importante praga da citricultura, já que a doença HLB é considerada a doença mais grave do citros (MCCLEAN; SCHWARTZ, 1970; BOVE, 2006).

No continente americano, onde se situam os dois principais centros produtores de citros do mundo, Brasil (representado pelo estado de São Paulo) e Estados Unidos (representado pelo estado da Flórida), o HLB foi relatado em 2004 e 2005 respectivamente (COLETTA-FILHO et al., 2004; HALBERT, 2005). Em 2007 foi confirmada a ocorrência do HLB em Cuba (LLAUGER et al., 2008; PANTOJA et al., 2008; LUIS et al., 2009), em 2008 na República Dominicana (MATOS et al., 2009).

De acordo com Belasque et. al (2010), um total de 46 municípios registravam ao menos um pomar citrícola afetado com HLB, em setembro de 2004, no Estado de São Paulo. Através de um levantamento amostral realizado no ano de 2004, para estimativa dos talhões infestados por HLB nas regiões centro e sul do Estado de São Paulo, o município com maior incidência da doença foi Araraquara, com 20,3% de pomares com ao menos uma planta sintomática. Em um segundo levantamento amostral, realizado no mês de setembro de 2007, 12,9% de talhões infestados em todo o estado foram verificados. A primeira detecção da doença no Estado de Minas Gerais ocorreu em 2005 e em 2007 no Estado do Paraná.

Um terceiro levantamento amostral foi realizado em Abril de 2008, porém, além da estimativa de talhões infestados, foi estimado o número de plantas com sintomas de HLB e foi constatado que em São Paulo a doença continuou a aumentar de forma acelerada ocorrendo em todas as regiões citrícolas do Estado, estimando que o número de plantas com sintomas de HLB já tenha atingido mais de 4 milhões em todo o Estado de São Paulo (BELASQUE et al., 2009).

Em 2012, mais de sete milhões de plantas foram arrancadas dos pomares de citros paulistas devido à presença da doença HLB, esses dados foram obtidos através de relatórios referentes às inspeções da doença realizadas por citricultores comerciais do Estado de São Paulo e divulgados pela CDA (Coordenadoria de Defesa Agropecuária), órgão da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (Coordenadoria da Defesa Agropecuária, 2013).

Devido à severidade e destruição da doença dos citros HLB ocorrem efeitos prejudiciais no desenvolvimento das plantas e perdas na produção dos frutos. A bactéria, *Candidatus Liberibacter* spp. coloniza os vasos condutores da seiva elaborada da planta, obstruindo o floema e desencadeado todo o processo de desenvolvimento da doença. A presença de folhas mosqueadas é um sintoma típico do HLB, a bactéria provoca amarelecimento, desfolha, seca e morte dos ramos. Os frutos apresentam maturação irregular (Figura 1.1), redução do tamanho, deformação e queda intensa (BOVÉ, 2006).

A queda de frutos sintomáticos é comumente observada em plantas doentes, de acordo com o progresso da doença. A redução na produção e tamanho dos frutos pode ser de até 100%, dependendo da proporção da copa afetada, além da queda precoce dos frutos sintomáticos, ocorre um aumento na acidez, com menores valores de Brix, *ratio*, porcentagem de suco e sólidos solúveis, reduzindo a qualidade do suco (BASSANEZI et al., 2006a).

O HLB não provoca a morte das plantas, porém, com o passar dos anos, ficam debilitadas e improdutivas. Observações de pomares afetados em diferentes regiões citrícolas do mundo, inclusive em São Paulo, revelam que pomares inteiros podem tornar-se inviáveis economicamente entre sete e dez anos após o aparecimento da primeira planta sintomática, caso não sejam adotadas medidas de controle. Esse tempo pode ser menor para pomares jovens, de até quatro anos, os quais se tornam economicamente inviáveis em até cinco anos (GOTTWALD et al., 2007a).

Figura 1.1. Maturação e coloração irregular em plantas sintomáticas para HLB. A: Assimetria do fruto. Proporção assimétrica e diminuição de suco em fruto. B: Sintoma de mosqueado: folhas com manchas amareladas.



Fonte: (<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/10-Greening>, 2013).

1.3. - Descrição da morfologia das fases de desenvolvimento do inseto vetor do HLB – *Diaphorina citri*

1.3.1. Ovos

Os ovos de *D. citri* medem cerca de 0,31 mm de altura e 0,14 mm de largura (TSAI; LIU, 2000). São alongados, engrossados na base, cônicos na parte distal (Figura 1.2) e, assim que ovipositados, apresentam coloração pálida tornando-se amarelo alaranjados com o tempo. A postura é feita verticalmente na superfície das folhas e/ou brotos (MEAD, 2002). O período de pré-oviposição é de aproximadamente 10 dias (NAVA et al., 2007). O período de incubação dos ovos é de aproximadamente 3 dias (CATLING, 1970; NAVA et al., 2007).

Figura 1.2. Morfologia de ovo de *Diaphorina citri*.



Fonte: (Rafael Garcia Brandão, 2013).

A fecundidade do inseto relacionado ao número de ovos depositados pelas fêmeas em média, é bem discutido. De acordo com estudos de Tsai e Liu (2000) a média de números de ovos por fêmea obtidos foram de 858 em *Citrus paradisi* (grapefruit), 626 em *Murraya paniculata* (murta), 613 em *C. aurantium* (laranja-Azeda) e 572 em *C. jambhiri* (limão Rugoso) em sala climatizada a 25°C. Porém, em outro estudo segundo Parra (2010), em experimentos para análise de fecundidade do inseto, sendo um dos hospedeiros a mesma do estudo anterior, a murta-de-cheiro, os números de ovos obtidos em plântulas foram (348,4 ovos) para murta-de-cheiro, (265,1 ovos) para limão cravo e (166,2 ovos) para tangerina Sunki. Estas diferenças podem estar associadas às condições de estudo como cepas do psíldeo ou mesmo de gerações produzidas em laboratório (PARRA, 2010).

A densidade média de ovos de *D. citri* em condições de campo, no estado de São Paulo (8,7 ovos por ramo), (PAIVA, 2009), é metade daquela verificada na Flórida, EUA (16,0 ovos por ramo, em média) (HALL et al., 2008). O controle populacional por meio da atividade predatória no Brasil é relativamente baixo se comparado ao verificado nos EUA (MICHAUD, 2004).

1.3.2. Ninfas

As ninfas são praticamente imóveis, ficando grande parte do tempo agregadas e se alimentando na superfície abaxial das folhas, parte terminal do pecíolo e entre a gema axilar e os brotos novos (TSAI; LIU, 2000). Apresentando cinco instares de desenvolvimento, de coloração amarelo – alaranjada e olhos vermelhos, modificando a coloração para marrom claro com o passar do tempo.

De acordo com Tsai e Liu (2000) o primeiro instar, pode medir 0,3 mm de comprimento por 0,17 mm de largura, o segundo instar 0,45 x 0,25 mm, o terceiro 0,74 x 0,43 mm, quarto instar 1,01 x 0,7 mm. E o quinto e último instar podem medir de 1,6 x 1,02 mm (Figura1.3).

Figura 1.3. Ninfas de *D. citri* mostrando os cinco ínstares de desenvolvimento. Em ordem, da esquerda para direita: 1°, 2°, 3°, 4° e 5° ínstar.



Fonte: (Rafael Garcia Brandão, 2013).

Tsai e Liu (2000) relatam que ninfas secretam constantemente cera nas folhas, resultando posteriormente no crescimento de fungos sobre as mesmas. Também, neste mesmo trabalho, os autores relatam a variação no tempo de desenvolvimento das ninfas de *D.citri* mantidas a uma temperatura de 25°C nos hospedeiros *C. paradisi*, no qual o tempo de desenvolvimento foi de 12,6 dias, enquanto que em *M. paniculata*, *C. aurantium* e *C. jambhiri* foi de 12,8; 13,1 e 13,5; respectivamente. A variação dos ínstares das ninfas está entre 16 e 18 dias em épocas quentes e até 45 dias em épocas mais frias (Tabela 3.1), (AUBERT, 1987). De acordo com Tsai e Liu (2000) a temperatura influencia diretamente na taxa de desenvolvimento, sobrevivência, reprodução e longevidade do psíldeo. Para o desenvolvimento de ninfas, à 28°C foram necessários 10,6 dias, sendo que a 15°C o número de dias aumenta, para até 39,6 dias.

Ninfas e adultos de *D.citri* causam danos diretos por suas picadas sucessivas na planta hospedeira, injetando toxinas ao se alimentarem, causando deformação das folhas jovens, secamento de brotações, retorcimento e engruvinhamento devido a retirada da seiva elaborada de plantas hospedeiras (PARRA et al., 2010; SANCHES et al., 2009).

1.3.3. Adulto

Os adultos são insetos sugadores dos vasos condutores das plantas e possuem pernas metatorácicas modificadas para saltar. Os adultos medem de dois a quatro milímetros e tem o corpo manchado de marrom, cabeça marrom claro, asa

dianteira alargada da metade até o ápice (Figura 1.4) antena com ápice preto e com duas pequenas manchas marrom claras no meio dos segmentos, além de apresentarem secreção cerosa na forma de pó (AUBERT, 1987; GALLO et al., 2002). *D.citri* adultos são caracterizados por serem ovíparos, colocando seus ovos em dobras ou inserção das folhas, com a base inserida no tecido da folha e vertical em relação à superfície (GRAVENA, 2005).

Figura 1.4. Morfologia *D. citri* adulto.



Fonte: (Rafael Garcia Brandão, 2013).

Plantas jovens com brotações novas estimulam a oviposição, com a postura das fêmeas a 2 cm do ápice das folhas, pecíolos ou gemas (TSAI; LIU, 2000). Em adultos os movimentos tornam-se mais rápidos, com saltos enérgicos quando a temperatura atinge entre 24 e 29°C, podendo apresentar em campo aberto um deslocamento de aproximadamente 2.400 metros (KOIZUMI et al., 1997).

Estudos envolvendo adultos de *D. citri* em *M. paniculata* ocuparam 95% dos brotos, ovipositando por dois-quatro dias gerando de 25 a 100 ninfas por broto (SKELLEY; HOY, 2004). O período de pré-oviposição é de cerca de 10 dias e a longevidade da fêmea é maior que a do macho, sendo a postura concentrada nos primeiros 10 dias de vida (PARRA et al, 2010). As fêmeas prestes a ovipositar não voam e ficam refugiadas nas brotações (SKELLEY; HOY, 2004). Apesar da preferência por brotações, quando submetidas às árvores mais velhas, os psíldeos acabam por se alimentar de folhas ou ramos maduros. Os adultos podem viver entre 80 e 90 dias (Tabela 1.2) quando há alimento disponível (AUBERT, 1987). Em estudos Tsai e Liu (2000), observaram diferenças na longevidade de adultos de *D.*

citri, em diferentes espécies de hospedeiros, sendo a maior longevidade, 66 dias para *C. jambhiri*, 54 dias para *paradisi*, 54 dias para *M. paniculata* e 60 dias para *C. aurantium*. Nava et al., (2007) afirma que os machos adultos de *D. citri* vivem uma média de 21-25 dias e as fêmeas vivem uma média de 31-32 dias, à 24 ° C.

Segundo Nava et al., (2007), o desenvolvimento de ovo-adulto de *D. citri* em diferentes hospedeiros, limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), murta-de-cheiro (*M. paniculata*) e tangerina Sunki (*C. sunki* hort. ex Tanaka), não foi afetado com relação à duração, sendo próxima a 18 dias, nas três espécies.

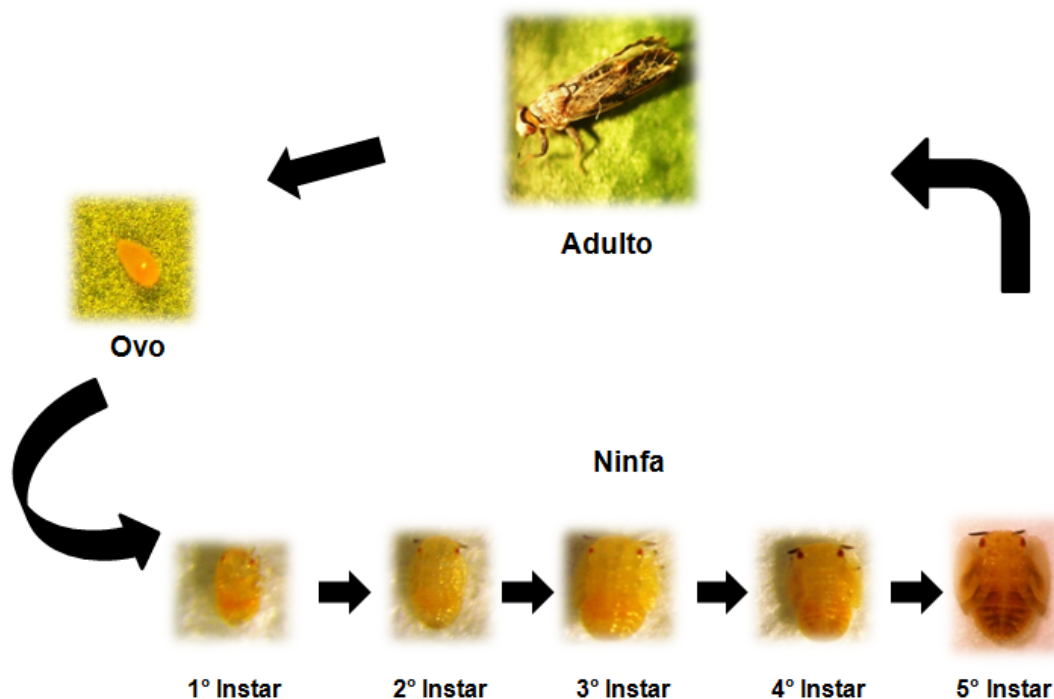
Tsai e Liu (2000) relataram uma longevidade máxima dos adultos, de 117 dias a 15 °C e 51 dias a 30 °C. Porém, em estudos de Richardson & Hall (2012) foi verificado uma longevidade máxima de até 188 dias à 27 ° C em uma planta hospedeira favorável. Embora na natureza, o inseto deva procurar microclimas favoráveis, a exposição a temperaturas elevadas por tempo prolongado deve afetar o seu desenvolvimento, e, portanto, não devem ser recomendadas para criação do inseto em laboratório (PARRA et al., 2010). Em observações realizadas na FUNDECITRUS – Araraquara, durante a criação desses insetos, em sala climatizada com temperatura média de 25 °C (variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$), e em estufa, com médias de 28 °C, com picos máximos de 32 °C e mínimas de 19 °C, foi verificado o melhor desenvolvimento do inseto em estufa, foi onde a temperatura era mais alta (Comunicação Pessoal). Tsai e Liu (2000), avaliando os efeitos da temperatura no ciclo biológico de *D. citri* (Figura 1.5), verificaram que o menor período do ciclo ovo-adulto, 14,1 dias, se deu quando os insetos foram mantidos a temperatura de 28°C e o maior, 49,3 dias quando esta foi de 15°C.

Tabela 1.1. - Ciclo biológico de *D. citri* e fecundidade das fêmeas

Fase de desenvolvimento	Dias/meses
Fase ovo	2,6 - 7,7 dias
Fase ninfa	9,4 - 35,8 dias
Longevidade do adulto	3 - 4 meses
Período de oviposição	30 - 80 dias
Fase ovo - adulto	12, 1 à 43, 5 dias
Fecundidade das fêmeas	200-800 ovos

Fonte: (Adaptada a partir de dados de Nava et al., 2007).

Figura 1.5. Ciclo Biológico do psíldeo *D. citri*.



Fonte: (Elaborada pela autora).

1.4. Etiologia, distribuição, particularidades e hospedeiros do vetor *D. citri*

Diaphorina citri (=Euphalarus citri (Kuwayama 1908)) foi descrita em citros na cidade de Shinchiku, Taiwan em 1907. Existem seis outras espécies de *Diaphorina* relatadas em citros e outras plantas: *D. amoena*, *D. aubert*, *D. communis*, *D. Murrayi*, *D punctulata* e *D. zebrana* (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

O psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) possui uma ampla distribuição geográfica, sendo um inseto cosmopolita. Foi registrado no Brasil pela primeira vez na década de 40 (COSTA LIMA, 1942). Foi atribuída a espécie importância secundária até que a doença *Huanglongbing* (HLB), também chamada de greening dos citros, foi confirmada nos pomares do estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005).

Em condições de temperatura e umidade relativa que favorecem o seu crescimento populacional, este inseto pode causar danos diretos problemáticos, tais como deformações de folhas jovens, secamento de brotações e presença de fumagina (HALBERT; MANJUNATH, 2004; MICHAUD, 2004). Os danos são resultantes da injeção de toxinas pelas ninfas que levam a alterações no crescimento das partes atacadas. As folhas apresentam deformações devido a retirada da seiva elaborada de plantas hospedeiras. A fumagina, resultante do excesso de 'honeydew', pode levar a secamento das estruturas vegetais atacadas. Tudo dependerá do nível populacional e, em altas densidades, pode haver abscisão de folhas e mesmo de todo o ramo infectado (HOY; NGUYEN, 2001; PAIVA, 2009).

De acordo com Parra et al., (2010), *D. citri* ocorre preferencialmente em ramos novos de plantas da família Rutaceae, sendo referidas aproximadamente 21 espécies de hospedeiros, em algumas delas não é verificado o desenvolvimento completo do inseto, em outras, os mesmos colocam apenas ovos, sem desenvolverem-se na planta. Um dos principais hospedeiros deste psíldeo é a espécie *Murraya paniculata* (L.) Jack, conhecida popularmente como murta-de-cheiro, utilizada como cerca viva ou ornamental no Brasil.

A aquisição de *Ca. L. asiaticus* pode ocorrer tanto por ninfas (4º. e 5º. ínstaes) como por adultos de *D. citri* (XU et al., 1988). Indivíduos que adquirem o patógeno na fase de ninfa são capazes de transmitir após a ecdise para a fase adulta (INOUE et al., 2009). Após a aquisição do patógeno em plantas infectadas, é necessário um tempo para que *D. citri* seja capaz de inocular a bactéria em uma planta sadia (PARRA et al., 2010).

1.5. Agente causal do HLB

A doença bacteriana de citros conhecida por *huanglongbing* (HLB), anteriormente denominada *greening*, é caracterizada pela presença de microorganismos procarióticos no floema, estrutura responsável pela circulação dos nutrientes elaborados da planta (GARNIER et al, 1984).

O prefixo *Candidatus* foi escolhido porque ainda não se tinham relatos de seu cultivo em meio de cultura, um dos requisitos necessários para a classificação taxonômica definitiva para um microrganismo. Porém, recentemente, em estudos de Sechler et al., (2009) o cultivo de *Candidatus Liberibacter* spp. foi relatado em um

novo meio denominado líber A, o qual contém fosfatos, NADP, cicloheximida e extrato de homogeneizado de pecíolo e nervura central de folha de laranja doce.

Ca. L. asiaticus é mais facilmente transmitida via enxertia de tecidos infectados para plantas cítricas do que *Ca. L. americanus* (LOPES et al., 2009b), tolerando temperaturas acima de 32°C enquanto a população de *Ca. L. americanus* diminui, podendo até desaparecer, nestas condições (LOPES et al., 2009a). As duas espécies também diferem na capacidade de multiplicação nos tecidos das plantas cítricas. *Ca. L. asiaticus* chega a atingir populações com titulação bacteriana em média 10 vezes maior que *Ca. L. americanus* (LOPES et al., 2009b).

As bactérias causadoras do HLB dos citros são classificadas como α -Proteobacteria, da ordem Rhizobiales e família Rhizobiaceae, dentro da qual estão também incluídas bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Sinorhizobium*, muitas delas envolvidas em processos de interação simbiótica com plantas. Inicialmente proposta como *Liberobacter* (JAGOUÉIX et al., 1994).

Desde os primeiros relatos da associação de organismos procarióticos com plantas com sintomas de HLB nos anos 1970 (LAFLECHE; BOVÉ, 1970), quando se suponha serem organismos semelhantes à *Rickettsia* (bactérias Gram-negativas intracelulares) e micoplasmas (bactérias sem parede celular e intracelulares), ficou comprovado, através da observação da estrutura da parede celular que esses organismos eram de fato bactérias Gram-negativas (GARNIER et al., 1984).

A variante africana e seu vetor *Triosa eritrea* não suportam temperaturas acima de 28°C, enquanto a variante asiática e seu vetor *Diaphorina citri* podem desenvolver-se em temperaturas acima de 28°C (BOVÉ et al., 1974). Na forma asiática de *Ca. Liberibacter*, podem ser constatadas variações entre as bactérias de origem do Pacífico (Japão, Filipinas, Indonésia, Tailândia e Nepal) e as de origem chinesa e indiana (SUBANDIYAH et al., 2000). No Brasil (São Paulo) foi constatada a variante asiática (COLETTA-FILHO et al., 2004) e uma terceira variante até então não descrita em nenhum outro país, a *Ca. Liberibacter americanus* (TEIXEIRA et al., 2004).

Uma das principais alterações anatômicas observadas em tecidos vegetais infectados com a bactéria do HLB é a formação e deposição de alta quantidade de calose aparentemente bloqueando os poros da placa crivada, acompanhado de

acúmulo de sacarose, provavelmente resultado dos distúrbios de transporte nos vasos do floema. Não ocorrendo acúmulo considerável de bactéria dentro do vaso crivado, que implique no bloqueio da placa e, diferentemente de outras bactérias do sistema vascular, as bactérias do HLB não parecem formar agregados de biofilme. As alterações anatômicas e bioquímicas são positivamente correlacionadas com a expressão de genes ligados à síntese de amido e proteínas do sistema estrutural e funcional do floema (KIM et al., 2009).

A incapacidade de cultivo em laboratório de todas as espécies de *Ca. Liberibacter* associadas ao HLB dificulta sobremaneira o melhor conhecimento de sua biologia. Exigências nutricionais, efeito de fatores abióticos sobre a taxa de crescimento, interação com outros microrganismos, hospedeiros e vetor, diversidade, filogenia e genoma são difíceis de serem avaliados sem um adequado sistema de cultivo. No entanto, muitas informações têm sido obtidas em experimentos com transmissão através de tecidos infectados, vetor ou com plantas parasitas do gênero *Cuscuta* (MACHADO et al., 2010).

A bactéria se multiplica em todas as variedades de citros e a sua transmissão de planta a planta é feita pelo inseto vetor *Diaphorina citri* (Kuwayama), popularmente conhecido como psílideo (BOVÉ, 2006; MACHADO et al., 2008).

1.6. Legislação e medidas de controle do HLB

De acordo com a Instrução Normativa nº 53 publicada pelo Ministério da Agricultura, em outubro de 2008, o produtor deve inspecionar e eliminar as plantas doentes. As inspeções devem ser feitas pelo menos a cada três meses e os resultados encaminhados à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado por meio de relatórios semestrais. Talhões com incidência superior a 28% de plantas com sintomas devem ser totalmente eliminados (FUNDECITRUS, 2013).

A estratégia de controle mais utilizada atualmente consiste no controle do vetor da doença, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (COCCO; HOY, 2008; AVERY et al., 2009; SANCHES et al., 2009).

Devido à baixa eficiência de transmissão dos patógenos por *D. citri*, o controle químico é uma ferramenta para diminuir a disseminação e transmissão dos patógenos, contudo, pouco se conhece sobre a eficiência de inseticidas sistêmicos

ou de contato (YAMAMOTO et al., 2009). Os sistêmicos são mais eficazes no controle de *D. citri*, por ser um inseto sugador, sendo a aplicação no tronco, solo ou via “drench” (TOLLEY, 1990; QURESHI; STANSLY; 2008, YAMAMOTO, 2008; BOINA et al., 2009). Dentre os inseticidas de contato, recomendam-se os neonicotinoides (tiametoxan, imidacloprid, acetamiprid, tiacloprid), organofosforados (acetato, dimetoato, etiona, malationa, clorpirifós, metidationa), piretróides (deltametrina, lambdacialotrina, fenpropatrina, esfenvalerato, gama-cialotrina) e carbamatos (carbosulfano, indoxacarbe) (YAMAMOTO, 2006; YAMAMOTO, 2008; YAMAMOTO et al., 2009).

Foram realizadas tentativas de controle com a injeção de antibióticos (tetraciclina), sem resultados promissores. Além do risco ambiental, uma vez interrompido o tratamento com antibiótico os sintomas reapareceram, ou seja, as plantas continuavam doentes (BOVÉ, 2006).

Na procura de métodos alternativos para solucionar problemas ocasionados pelo uso não criterioso de agrotóxicos, tem-se avaliado métodos biológicos (parasitoides, predadores e patógenos) e comportamentais para o manejo de pragas dos citros, embora os predadores que possam ser importantes em outros países, não têm se mostrado eficientes no Brasil (PAIVA, 2009; PARRA, 2010). Há dois parasitoides conhecidos para o controle de *D. citri*: *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Shafee, Alam & Agarwal) (Hymenoptera: Encyrtidae) e *Tamarixia radiata* Waterston (Hymenoptera: Eulophidae) (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

Segundo Belasque et al., (2009), atualmente, o controle preconizado envolve o plantio de mudas saudáveis, eliminação de plantas doentes e o controle do inseto vetor. Portanto, o controle do HLB é baseado na redução do inóculo, presente em plantas e insetos vetores. Sendo que, medidas adicionais, como a eliminação das plantas de murta, também podem ser realizadas.

O controle químico do vetor é a medida de controle mais facilmente adotada pelo citricultor. Apesar de amplamente adotada, poucas são as informações a respeito do seu efeito na redução das infecções. Deve-se empregá-lo da maneira mais racional possível, ou seja, aliado a um monitoramento da população do vetor por meio de armadilhas adesivas ou avaliações visuais de ramos por “pragueiros”. Por outro lado, a eliminação de plantas doentes é uma medida fundamental e sua

eficácia será maior quanto mais frequente forem às inspeções (BELASQUE et al., 2009).

1.7. Inibidores de proteases, uma alternativa para a medida de controle do vetor *D. citri*

O provável envolvimento dos inibidores de proteases na proteção das plantas contra o ataque de insetos foi observado inicialmente por Lipke et. al., (1954), quando larvas do besouro da flor *Tribolium confusum* não se desenvolveram na presença de inibidores de tripsina de soja. Plantas superexpressando genes de resistência a pragas vêm se tornando uma alternativa interessante para a agricultura, viabilizando a obtenção de plantas menos dependentes de pesticidas químicos (BOUCHARD, et al., 2003).

Muitas pesquisas recentemente vêm explorando esse mecanismo de defesa para proteção da cultura, através da transformação genética de plantas com genes que codificam proteínas inibidoras de proteases, aumentando a resistência destas plantas aos insetos (WALKER, et al., 1999). Uma quantidade considerável de plantas transgênicas expressando os genes para serina e cisteína proteinases foram obtidos em mais de duas décadas de pesquisa (VALUEVA et al., 2004). De acordo com Habib e Fazili (2007), desde a descoberta de insetos pragas economicamente importantes, das classes Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, os esforços têm sido direcionados a genes que codificam IPs, inibidores de proteinases ou peptidases, para o desenvolvimento de plantas transgênicas contra serino e cisteíno peptidases.

Diante da severidade da doença HLB e a importância da citricultura para a economia do agronegócio mundial, o surgimento de ferramentas biotecnológicas têm facilitado e acelerado a identificação de genes envolvidos em mecanismos de resistência das plantas contra o ataque de pragas, possibilitando a manipulação subsequente de alguns genes de interesse através da utilização de técnicas de biologia molecular. Essa estratégia poderá ser uma nova alternativa de controle para a doença HLB e poderá contribuir para a disponibilização de culturas comercialmente importantes resistentes a pragas e doenças, proporcionando a diminuição de problemas fitossanitários que comprometem a produtividade das culturas ou a integridade do meio ambiente pela utilização de agrotóxicos.

1.8. Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas, também conhecidas como peptidases, são proteínas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas (BARRET et al., 2004). Elas são encontradas em todos os sistemas biológicos, de vírus a vertebrados e compreendem aproximadamente 2% dos genes expressos (SAJID; MACKERROW, 2002).

Essas enzimas regulam numerosos processos bioquímicos e fisiológicos tais como digestão de alimentos, coagulação sanguínea e fibrinólise, ativação de proenzimas, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos, ativação do sistema complemento, processos de inflamação, entre outros (LEUNG-TONG et al., 2002).

As peptidases são divididas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases removem um, dois ou três resíduos de aminoácidos na extremidade amino-terminal (aminopeptidases) ou carboxi-terminal (carboxipeptidases) de um peptídeo ou proteína. As endopeptidases por sua vez hidrolisam ligações presentes no interior da cadeia polipeptídica (BARRETT, 1994).

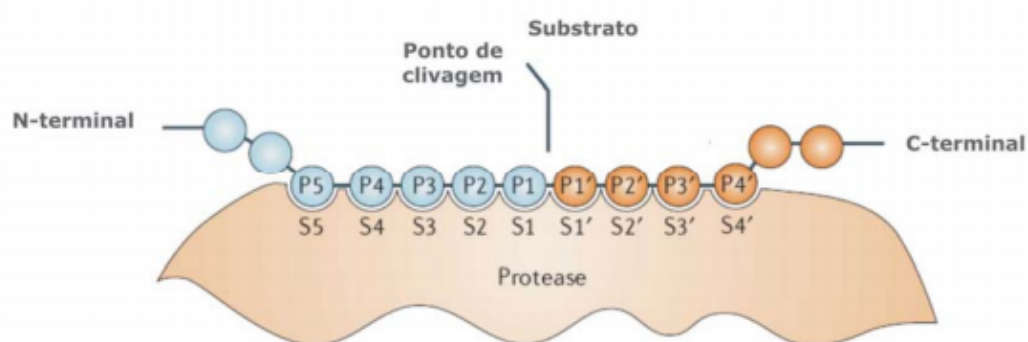
As peptidases são divididas em sete classes principais, baseado nos resíduos de aminoácidos catalíticos presentes no sítio ativo da enzima. As principais classes são: serino-peptidases (EC 3.4.21) que possuem no centro ativo um resíduo de serina envolvido no processo catalítico, as treonino-peptidases (EC 3.4.25) possuem como resíduo catalítico a treonina, as aspartil-peptidases (EC 3.4.23), que possuem um ou dois resíduos de ácido aspártico necessários para sua atividade catalítica. As metalo-peptidases (EC 3.4.24) utilizam um íon metálico, geralmente o Zn^{2+} , em seu mecanismo catalítico. As asparagina-peptidases utilizam resíduos de asparagina em seu mecanismo catalítico. As cisteíno-peptidases (EC 3.4.22) possuem um resíduo de cisteína em seu sítio ativo e as glutamil-peptidases, utilizam como resíduo catalítico primário o ácido glutâmico. As peptidases cujo sítio ativo e mecanismo catalítico ainda não foram determinados são agrupadas na classe de peptidases de tipo catalítico desconhecido (RAWLINGS et al., 2012).

Além das formas de classificação descritas acima, as classes de peptidases ainda são agrupadas de acordo com suas similaridades estruturais. Acredita-se que esta classificação possa refletir as características evolutivas dessas proteínas. Dessa forma, as peptidases podem ser agrupadas em famílias e clãs. As famílias correspondem a grupos de enzimas nos quais cada membro possui relação

evolutiva, seja na sequência completa ou pelo menos na região da sequência responsável pela atividade catalítica, com pelo menos outra proteína da mesma família. Os clãs agrupam famílias que, apesar da ausência de similaridade de sequência significativa, apresentam indícios de relação evolutiva como, por exemplo, a ordem linear dos resíduos catalíticos na estrutura terciária da proteína (RAWLINGS; BARRETT, 1999).

A especificidade entre o substrato e o sítio ativo da enzima é ilustrada na figura 1.7, com base no modelo proposto por Schechter e Berger (1967). De acordo com esse modelo, os subsítios da enzima, identificados pela letra “S”, são locais de ligação da enzima ao substrato. Cada aminoácido dos peptídeos que se acomodam no subsítio é identificado pela letra “P”. Sendo assim, os resíduos de aminoácidos posicionados ao lado da ligação peptídica a ser hidrolisada são numerados P1, P2, P3... Pn em direção ao N-terminal do substrato e P1', P2', P3'... Pn' em direção ao C-terminal. O ponto de clivagem do substrato é identificado pelos resíduos P1 e P1'. De forma semelhante os subsítios da peptidase são designados por Sn... S3, S2, S3, S1', S2', S3'... Sn' (RAWLINGS et al., 2008; DUBEY et al., 2007).

Figura 1.6. Modelo proposto por Schechter e Berger (1967). Interação dos subsítios da protease com os peptídios do substrato.



Fonte: (Adaptado de Turk, 2006).

As serino, cisteíno e treonino proteases possuem aminoácidos fortemente nucleofílicos em seu sítio catalítico os quais geralmente são alinhados com aminoácidos que atuam como basesceptoras de prótons. O mecanismo catalítico destas enzimas envolve a formação de um intermediário covalente entre a enzima e

um fragmento do substrato (catálise covalente). Por outro lado, na catálise das aspartil, metalo e glutamil proteases, não ocorre o ataque nucleofílico por um grupo funcional da enzima, sendo o nucleófilo neste caso, uma molécula de água ativada, e não havendo, portanto, a formação de um intermediário covalente (catálise ácido-base). Neste tipo de catálise um resíduo de ácido aspártico ou ácido glutâmico e o zinco atuam como ácidos e bases (BEYNON; BOND, 1989; BARRET et al., 2004; RAWLINGS et al., 2006).

1.8.1. Cisteíno peptidases

As cisteíno peptidases formam um grupo de enzimas que contém um resíduo de cisteína localizado no sítio ativo, que é composto normalmente pela tríade catalítica Cys-His-Asn. Em geral elas estão localizadas no citossol e em compartimentos lisossomais de diversos tecidos de animais, plantas e microorganismos. Em células de mamíferos, as famílias das caspases e da calpaína localizam-se no citoplasma enquanto as famílias das catepsina e da legumaína encontram-se alojadas em compartimentos lisossomais (CHANG et al., 2007). Em invertebrados, tais como nematoides e ácaros, cisteíno proteases estão entre as enzimas digestivas e em artrópodos, tais como lagostas, elas exercem um papel digestivo, mas também estão relacionadas ao sistema nervoso (RAWLINGS; BARRET, 1994). Em insetos elas são utilizadas em processos digestivos (RAWLINGS; BARRET, 1994), porém, podem ser encontradas em outros tecidos, sugerindo outras funções, além da digestão.

A família C1, pertencente ao clã CA, tem a papaína, extraída do látex de *Carica papaya*, como seu principal representante. A papaína possui uma estrutura de dois domínios, domínio L (left) e domínio R (right), entre os quais está localizado o sítio ativo da enzima (RAWLINGS et al., 2008). Em análise recente no banco de dados MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/clan_index?type=P), foi possível verificar a distribuição das cisteíno peptidases em 78 famílias agrupadas em 9 clãs (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO e CP). Dentre os clãs, o clã CA, família C1, representam as cisteíno peptidases que apresentam semelhanças nas estruturais terciárias e motivos com a papaína.

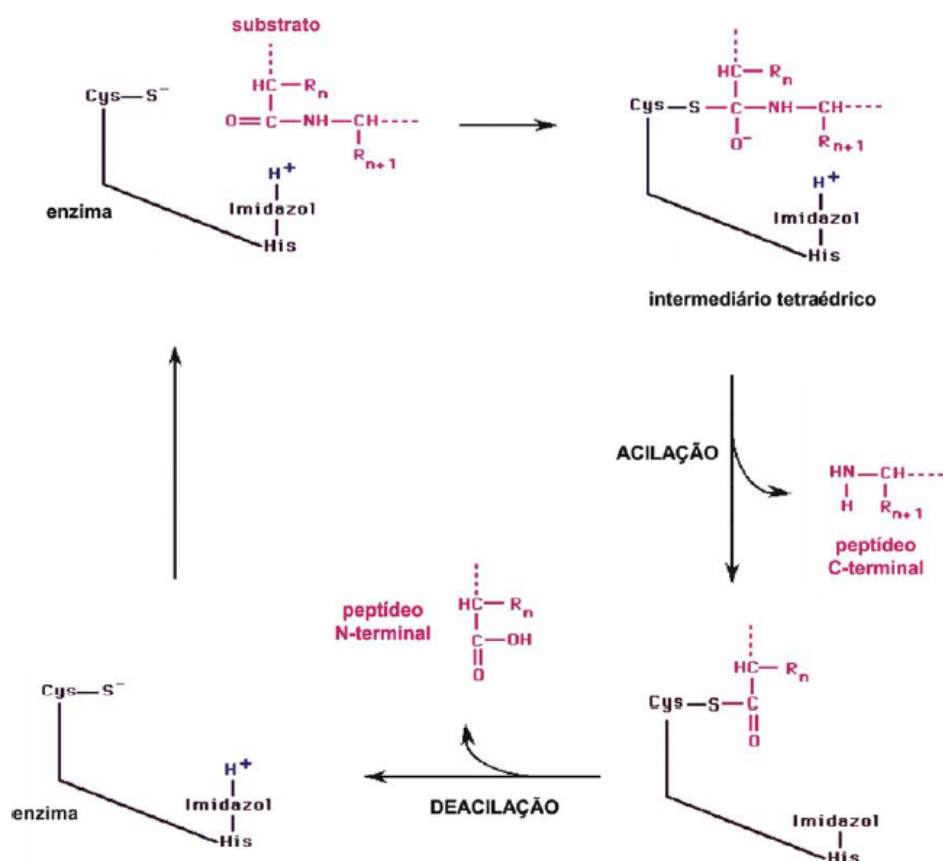
As cisteíno proteases da família C1 podem ser encontradas em plantas e animais assim como em vírus e procariotos. Em eucariotos as enzimas são

sintetizadas como preproenzimas, as quais podem ser divididas em três partes: um peptídeo sinal N-terminal (10 a 20 aminoácidos), um pró-peptídeo (38 a 250 aminoácidos) e a sequência que corresponde a enzima madura (220 a 260 aminoácidos) (WIEDERANDERS, 2003).

O primeiro passo do mecanismo catalítico das enzimas da família C1 envolve a ligação da enzima livre com o substrato, formando o intermediário tetraédrico. Em seguida, ocorre a acilação da enzima com a formação e liberação do primeiro produto enzimático, o grupo amina $R'NH_2$. No passo seguinte, a acil-enzima reage com uma molécula de água levando à formação do segundo produto enzimático ($RCOOH$), fase na qual ocorre a deacilação da enzima. A liberação deste produto leva à regeneração da enzima livre (Figura 1.8), (STORER; MÉNARD, 1994).

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; NAGASE, 2001).

Figura 1.7. Mecanismo catalítico de cisteíno peptidases.



Fonte: (Beynon e Bond, 1989).

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).

1.8.2. Catepsina B

Catepsina B é uma tiol protease que desempenha um papel chave no catabolismo intracelular de proteínas no sistema lisossomal, (BOND; BUTLER, 1987; TAKIO et al., 1983), sendo a única da família das catepsinas que atua como endopeptidase e peptidil dipeptidase (ZENG et al., 2006). As enzimas do tipo catepsina B e L, são as cisteíno peptidases de mamíferos mais bem estudadas e

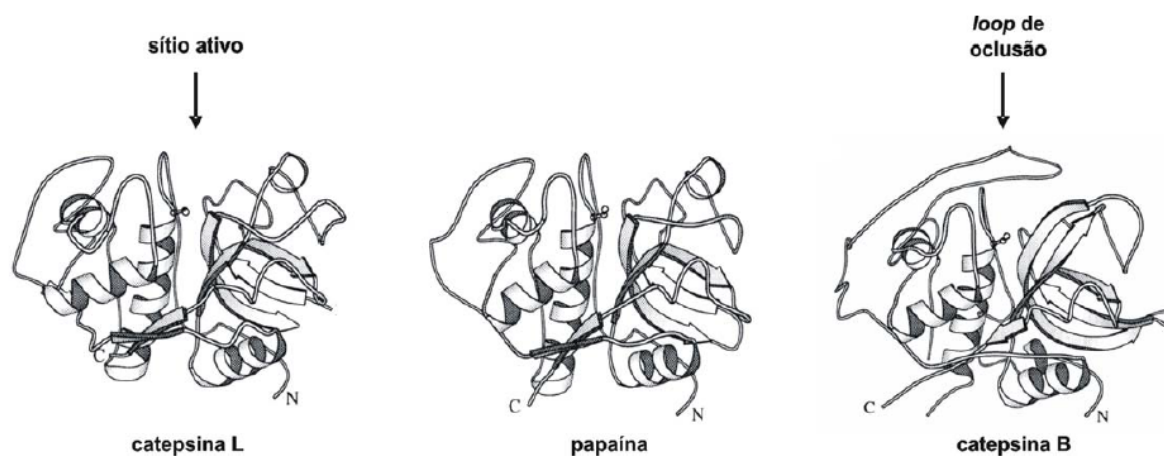
encontram-se presentes na maioria das células e tecidos. Por serem enzimas lisossomais, atuam principalmente na degradação intracelular de proteínas. No entanto, podem agir extracelularmente quando liberadas em determinadas circunstâncias, degradando componentes da matriz extracelular (DICKINSON, 2002). Com base na similaridade de sequências e nas estruturas tridimensionais, as enzimas de mamíferos da família papaína são subdivididas em duas famílias, sendo designadas como enzimas do tipo catepsina L (cathepsin L-like) ou enzimas do tipo catepsina B (Cathepsin B-like). Elas diferem principalmente quanto à presença de um segmento peptídico adicional na estrutura da catepsina B e quanto a especificidade ao substrato, que na família da papaína é determinada principalmente pelo subsítio S2 (COULOMBE et al., 1996; FUJISHIMA et al., 1997).

A catepsina B humana é sintetizada como uma preproenzima de 339 resíduos de aminoácidos, onde a remoção do peptídeo sinal gera a molécula da procatepsina B e sua ativação ocorre nos lisossomos, devido a clivagem e dissociação dos resíduos da pró-região. Muitos resíduos da pró-região estão em contato com a parte madura da enzima bloqueando o sítio ativo (CYGLER et al., 1996; TURK et al., 1996). Esta interação é responsável pela força inibitória da região, devido a orientação contrária da pró-região ao que é requerido para a hidrólise do substrato, sendo todo esse complexo estável em pH neutro (MACH, et al., 1994).

Segundo Musil et al., (2001), como um membro da família da papaína, a catepsina B apresenta similaridade de sequência com a papaína e com outras enzimas da família. No entanto, a estrutura da catepsina B é diferente devido a presença de um segmento peptídico de aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos, denominado loop de oclusão (“occluding loop”) (Figura 1.9), que bloqueia a fenda do sítio ativo da enzima.

Dentro deste segmento, dois resíduos de histidinas, His110 e His111, posicionados sobre a região do subsítio S' estabilizam o carboxilato C-terminal do substrato, posicionando a ligação peptídica a ser clivada dois resíduos a partir do C-terminal e contribuindo assim para a atividade peptidil dipeptidase da enzima (ILLY, et al., 1997).

Figura 1.8. Estruturas tridimensionais das enzimas: catepsina L, papaína e catepsina B. A seta na última estrutura indicando o loop de oclusão da catepsina B, o que a torna diferente das demais cisteíno peptidases da família papaína, como a catepsina L e a própria papaína mostradas na figura, nas quais os sítios ativos estão expostos. O resíduo de cisteína do sítio ativo é mostrado na representação *Ball-and-stick*.



Fonte: (Adaptado de Fujishima et al., 1997).

A catepsina B apresenta preferência por resíduos hidrofóbicos na posição P2 do substrato e é a única enzima desta classe que aceita um resíduo de arginina nesta posição, devido a presença de um resíduo de ácido glutâmico (Glu245) no subsítio S2 (BARRET, et al., 2004).

A presença do *loop* de oclusão na catepsina B madura é incompatível com a inibição por membros da família cistatina, inibidores proteicos reversíveis de cisteíno proteases, uma vez que este se ligam em ambos os subsítios S e S' da enzima (ILLY et al., 1997). A inibição só é possível através de um mecanismo executado em dois passos, o qual requer o deslocamento do *loop* de oclusão. No primeiro passo ocorre uma interação inicial da região N-terminal da cistatina com os subsítios S2 e S3 do sítio ativo da enzima. No passo seguinte ocorre o deslocamento do *loop* de oclusão conforme a cistatina ancorada introduz os seus dois *loops*, o central e o da região C-terminal, nos subsítios S' (NYCANDER et al., 1998; PAVLOVA et al., 2000).

As catepsinas estão envolvidas em várias etapas da progressão tumoral, incluindo etapas precoces de imortalização e transformação, etapas intermediárias da invasão tumoral e angiogênese e etapas tardias de metástase e resistência a droga. Em tumores, estas enzimas podem ser translocadas para a superfície celular

e secretadas para o ambiente extracelular, o que facilitaria o envolvimento em todas as etapas do desenvolvimento tumoral (MAI et al., 2000).

O aumento de expressão das catepsinas B e L, além da secreção e associação destas à superfície celular são comuns em diversos tipos de células tumorais, especialmente nas variantes mais malignas (FROSCH et al., 1999; HEIDTMANN et al., 1993; ISHIDOH; KOMINAMI 1998).

Em células tumorais, a falta de regulação das catepsinas em um ou mais destes níveis pode resultar em um aumento nas quantidades de mRNA e proteína, maior atividade e distribuição intracelular alterada (ROSHY et al., 2003; SLOANE et al., 1994; MOHAMED; SLOANE, 2006). Porém, esse aumento na atividade das catepsinas não é apenas consequência do aumento no nível de expressão de tais enzimas, mas também da redução na regulação por inibidores endógenos, cuja atividade e concentração encontram-se significativamente reduzidas nas células cancerosas (SKRZYDLEWSKA et al, 2005).

1.9. Cistatinas: inibidores de cisteíno peptidases

As cistatinas são inibidores de enzimas do tipo cisteíno peptidases que atuam como pseudosubstratos formando um complexo reversível com as cisteíno proteases alvos, bloqueando assim o acesso do substrato específico ao sítio ativo da enzima (TURK; BODE, 1991; BENCHABANE et al., 2010).

Vários modelos de interação entre as cistatinas e cisteíno proteases alvos sugerem três regiões da cistatina envolvidas no reconhecimento: uma sequência N-terminal contendo um resíduo de glicina, um motivo Gln-X-Val-X-Gly altamente conservado em um loop central e um resíduo de triptofano em um segundo *loop* próximo à extremidade C-terminal (BARRET, 1987).

Ambos os loops, localizados nas regiões central e C-terminal da cistatina, apresentam tamanhos e formas que se encaixam na região correspondente aos subsítios S1' e S2' da fenda do sítio ativo da enzima. O segmento N-terminal contendo o resíduo de glicina conservado nas cistatinas, se encaixa no subsítio S2 do sítio ativo da enzima, porém com uma conformação inapropriada para a proteólise enzimática (BODE et al., 1988; TURK; BODE 1991; ABRAHAMSON, 1993).

Esses inibidores podem ser agrupados em três tipos ou famílias de proteínas, definidos pela análise de semelhança em mamíferos. Além do alinhamento das sequências de aminoácidos, tem-se utilizado outros critérios para agrupar as cistatinas, tais como: similaridade da sequência primária, presença de pontes dissulfeto e a sua massa molecular (RAWLINGS; BARRET, 2000).

A família 1, conhecida como família das estefinas, inclui inibidores com massas moleculares de aproximadamente 11 kDa, não-glicosilados, sem peptídeo sinal e ligações dissulfeto. Esta família também caracteriza-se pela presença do loop Gln-Val-Val-Ala-Gly presente na região central da molécula (TURK; BODE, 1991).

A família 2, ou família cistatina, compreende proteínas de cadeia simples que formam duas pontes dissulfeto intramoleculares próximas à região C-terminal. Estas proteínas são glicosiladas, apresentam massas moleculares entre 13 e 24 kDa e conservam um loop central formado de Gln-X-Val-X-Gly. Estas cistatinas contêm um sequência sinal e são secretadas (TURK; BODE 1991; OLIVEIRA et al., 2003).

A família 3, ou família dos cininogênios, inclui cistatinas de massas moleculares altas (60-120 kDa), que formam ligações dissulfeto, são glicosiladas e secretadas. Estas proteínas contêm três domínios de cistatinas da família 2, dos quais dois possuem atividade inibitória contra CP (TURK; BODE, 1991).

A inclusão de uma quarta família, a das fitocistatinas, a qual contém os inibidores de cisteína proteases de plantas, foi sugerida por Margis e colaboradores (MARGIS et al., 1998).

1.9.1. Fitocistatinas

As fitocistatinas possuem algumas características similares à família das estefinas, como ausência de ligações dissulfeto e resíduos de cisteína, e à família das cistatinas, como o tamanho e a similaridade na sequência primária. No entanto, as fitocistatinas possuem de modo exclusivo a sequência consenso L-A-R-[FY]-A-[VI]-x(3)-N. Além disso, a análise da árvore filogenética de cistatinas animais e de plantas mostrou o agrupamento das fitocistatinas em um único ramo, distinto das cistatinas das famílias 1 e 2 (MARGIS et al., 1998).

As fitocistatinas estão envolvidas na regulação da atividade de proteases endógenas durante a maturação de sementes, e na defesa contra cisteína proteases

exógenas de insetos e nematoides, os quais geralmente têm essas proteases em seus intestinos (ARAI et al., 2002). As fitocistatinas têm sido identificadas em diversas plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas. As primeiras cistatinas de origem vegetal a serem clonadas e caracterizadas foram a orizacistatina I (ABE et al., 1987) e orizacistatina II (KONDO et al., 1990).

Em estudos desenvolvidos em nosso laboratório, foi caracterizada e primeira cistatina de cana-de-açúcar, canacistatina. Este inibidor produzido de forma recombinante (SOARES-COSTA et al., 2002), mostrou-se eficiente na inibição de catépsinas humanas, assim como outras cisteíno proteases (OLIVA et al., 2004). Em estudos de Gianotti (2008), três cistatinas recombinantes, denominadas CaneCPI- 2, CaneCPI- 3 e CaneCPI-4, foram efetivas na inibição de catépsina L humana. Porém, para inibição da catépsina B humana, o único inibidor efetivo dentre estes, foi CaneCPI- 4. Além de inibir as duas catépsinas humanas, B e L, CaneCPI-4 foi capaz de inibir a invasão de células tumorais de mama (MDA-MB-231) em matriz de matrigel.

Como citado anteriormente os inibidores de proteases, vêm se tornando uma alternativa interessante para a agricultura no controle de pragas. Porém isso apenas se tornaria possível a partir do entendimento dos mecanismos de funcionamento do sistema digestivo da espécie *Diaphorina citri*. Existem diversos relatos descritos na literatura, que identificaram através de testes bioquímicos e moleculares a presença de enzimas do tipo cisteíno-proteases no intestino de insetos pertencentes às ordens Hemiptera, Díptera e Coleoptera (TERRA; FERREIRA, 1994). O inseto *Diaphorina citri* pertencente à ordem hemíptera, provavelmente possui cisteíno-proteases em seu trato digestivo. Assim, estudos para a caracterização das enzimas digestivas do inseto e sua interação com inibidores de proteases poderiam contribuir para a identificação de uma molécula específica que pudesse ser utilizada em futuros estudos de desenvolvimento de plantas transgênicas superexpressando inibidores de proteases, resistentes ao vetor da doença *Huanglongbing*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos gerais, identificar, expressar de forma recombinante, caracterizar e avaliar a inibição da primeira cisteína peptidase descrita de *Diaphorina citri*, inseto vetor da doença HLB de citros. Também, analisar o perfil de expressão nas diferentes fases de desenvolvimento do inseto. Assim, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Análise *in silico* de uma cisteína peptidase de *D. citri* proveniente do Projeto de transcriptoma do psilídeo (USDA).
- Isolamento da ORF da catepsina B-like para clonagem em vetor de propagação PTZ57r.
- Subclonagem da ORF da catepsina B-like em vetor de expressão pPICZαC para expressão em levedura.
- Expressão heteróloga da catepsina B-like em *Pichia pastoris* e purificação da proteína.
- Análise da expressão gênica nas fases de ovo, ninfa e adulto por PCR quantitativo.
- Produção de anticorpos policlonais contra a catepsina B-like recombinante.
- Caracterização cinética da catepsina B-like recombinante.
- Ensaio de inibição da atividade enzimática da catepsina B-like utilizando a cistatina recombinante de cana-de-açúcar CaneCPI-4.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise *in silico* das sequências e obtenção dos clones contendo ORF da cisteíno peptidase do tipo Catepsina B de *Diaphorina citri*

As análises *in silico* foram realizadas através de análises no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Uma sequência de catepsina B de *D. citri* depositada nesse banco de dados foi selecionada. No entanto, a sequência estava parcial.

Em colaboração com o Dr. Wayne Hunter do departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA - United States Department of Agriculture), foi possível ter acesso aos dados do transcriptoma de ovo, ninfa e adulto de *D. citri*. Com os dados do transcriptoma um banco local no servidor do LBM (DGE - UFSCAR) foi montado. Utilizando a sequência da catepsina B depositada no banco de dados do NCBI, foram realizadas buscas por similaridade no banco de dados local contendo os transcritos, utilizando as ferramentas bioinformáticas BLASTX e tBLASTn.

Uma sequência de catepsina B completa, dos transcritos de adulto foi escolhida, identificada a ORF e traduzida.

Análises *in silico* da sequência de aminoácidos foi realizada utilizando o Programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para predição do possível peptídeo sinal da sequência. Possíveis sítios de N-glicosilações presentes na sequência, foram analisados utilizando o programa NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Por se tratar de uma procatepsina, uma análise funcional foi realizada para verificação da posição da pró-região utilizando o programa InterPro (protein sequence analysis & classification) disposto no banco de dados do EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Para uma análise de similaridade da catepsina B de *D. citri*, com outras catepsinas B de diferentes organismos uma busca foi realizada no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e as sequências alinhadas utilizando o software ClustalW (THOMPSON et al., 1994) na interface do programa BioEdit v7.0.5.3. (HALL, 1999).

Os oligonucleotídeos para amplificação da catepsina B de *D. citri* (Tabela 3.1) foram desenhados através do programa Oligo Perfect™ (<http://tools.invitrogen.com/>),

com sítios para as enzimas de restrição *Eco RI* e *Xba I*, sem a sequência que corresponde ao peptídeo sinal e em fusão com uma cauda de histidina (His-tag) adicional na região C-terminal.

Tabela 3.1 - Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de *DiaciCATHB* no vetor de expressão

Nome	Sequência 5' - 3'
CatBPpicZ-F	ATCG <u>GAATTCT</u> ACGTTCCACAGAGACTGGAC
CatBPpicZ-R	AGCTT <u>CTAGAT</u> TAAACTTGCAAAAAGTGGGT

Fonte: elaborada pela autora.

3.2. Insetos *D. citri*

Os insetos das diferentes fases de desenvolvimento de *D. citri*, foram coletados no Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS, Araraquara, São Paulo) por intermédio do Prof. Dr. José Belasque Júnior.

3.3. Extração do RNA total de *D. citri*

Os 400 insetos adultos de *D. citri* foram coletados e imediatamente colocados em nitrogênio líquido, em seguida, armazenados em freezer -80°C. Para realizar os experimentos, as amostras foram retiradas do freezer (-80), e colocadas em 2 tubos de 1,5 ml, utilizando um total de 400 insetos, ou seja 200 insetos em cada tubo. Para a extração de um RNA total íntegro e de boa qualidade foi utilizado o reagente Trizol® (Invitrogen®) baseado na metodologia descrita por Chomczyn e Sacchi (1987). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com bastão de vidro. A esses tecidos macerados foram adicionados 500µl de reagente Trizol, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos e homogeneizadas. Foram adicionados 100 µl de clorofórmio e em seguida, as amostras foram agitadas por 15 segundos e incubadas por 12 minutos em temperatura ambiente.

O lisado foi centrifugado em 12.000 x g por 15 minutos à uma temperatura de 4°C. Havendo a separação em 3 fases: sobrenadante, intermediária e orgânica, o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 250µl de isopropanol e os mesmos foram sutilmente vertidos. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas em 12.000 x g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet preservado, uma lavagem com etanol 70% e centrifugação por 5 minutos em 12.000 x g à 4°C foi realizada. Com o auxílio de pipetas de Pasteur o sobrenadante foi removido e o tubo contendo o RNA foi invertido em papel estéril para remoção do etanol, permanecendo em temperatura ambiente, embrulhados em papel estéril para que fossem totalmente secos. O pellet foi ressuspendido em 200µl de água nuclease free e estocado no -80°C. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop ND 1000 e em gel de agarose 1% para análise de sua integridade.

3.3.1. Síntese de cDNA e amplificação do gene da cisteína peptidase de *D.citri*

Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit Impron II (Promega), utilizando 2µg de RNA total como molde para a reação, juntamente com 0,5 µg do primer Oligo dT¹⁵, em tubo de 0,2 mL (Eppendorf), num volume final de 5 µL, a reação foi incubada em termociclador a 70°C por 5 minutos, e em seguida no gelo por mais 5 minutos (tubo 1ª reação). Para o tubo da 2ª reação, foram utilizados Impron II 5X reaction buffer, MgCl₂ (concentração final de 1.5 – 8.0 mM), DNTPs (concentração final de 0.5 mM de cada DNTP), 20 unidades de Recombinant RNAsin ribonuclease inhibitor e Impron II reverse transcriptase, num volume de reação final de 15 µL. O conteúdo do tubo da 2ª reação, foi adicionado ao tubo da 1ª reação, e mantido em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf) no ciclo: 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C, 15 minutos.

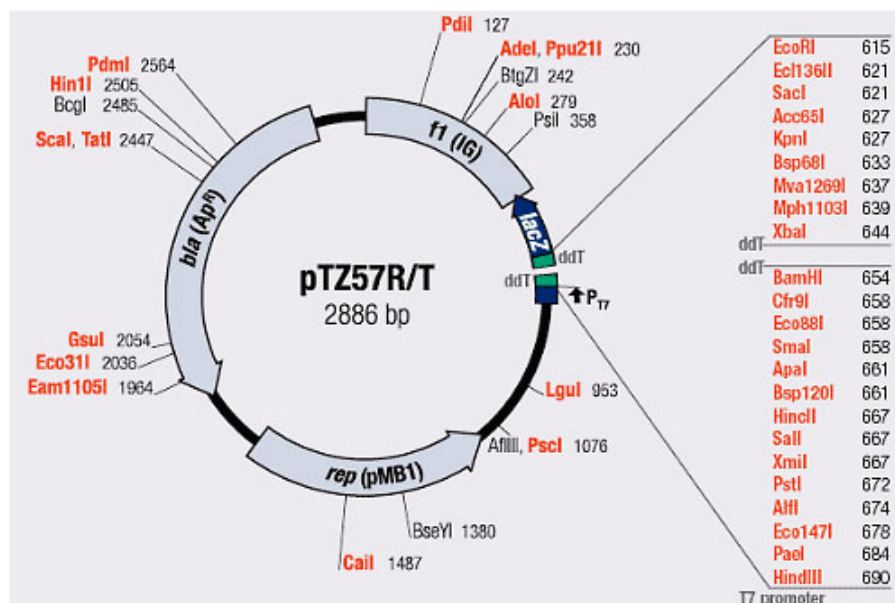
Para amplificação do gene da cisteína peptidase de *D. citri* e posterior clonagem no vetor de expressão pPICZαC (Invitrogen), foram utilizados os oligonucleotídeos descritos anteriormente (Tabela 3.2.). Os oligonucleotídeos foram desenhados para clonagem do cDNA da catepsina B de *D. citri* sem a região contendo o peptídeo sinal, em fusão com a cauda de histidina (His-tag) adicional na região C-terminal.

A PCR foi realizada contendo 1 µl de cDNA, 2,5 µl de tampão de reação com KCl 1X, 1,5 µl de cloreto de magnésio (25 mM), 4 µl de dNTP (1,25 mM), 10 pmoles de cada primer, 0,125 µl de taq DNA polimerase (Fermentas) e H₂O para um volume final de 25 µL. Para amplificação, foi utilizado o programa de PCR em gradiente, em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf) 94°C de desnaturação inicial por 3 minutos, 94°C de desnaturação por 1 minuto, gradiente de 50, 52 e 55°C de anelamento, 72°C de extensão por 1 minuto e 72°C de extensão final por 7 minutos. Repetições de 35 ciclos, com exceção da primeira desnaturação e última de extensão. O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (1 µg/ml) e visualizados em luz UV.

3.3.2. Construção do plasmídeo de propagação *PTZ_DiaciCATHB*

O fragmento correspondente ao gene da catepsina B de *D. citri* após o PCR, foi purificado com o kit Wizard SV Gel and PCR clean Up System (Promega), para clonagem no vetor de propagação pTZ57r (Fermentas) (Figura 3.1).

Figura 3.1. Plasmídeo PTZ57r, utilizado como vetor de propagação.



Fonte: (<http://eshop.biogen.cz/klonovani/instaclone-tm-pcr-cloning-kit>, 2013).

As reações de ligação foram feitas em um volume final de 10 μ L, contendo 55 ng do vetor PTZ57r (Fermentas), 140 ng do fragmento purificado, 1 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e tampão da enzima 1X [Tris-HCL 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT (Dithithreitol) 1 mM, polietilenoglicol (PEG) 8000 5% (w/v)]. As reações de ligação foram mantidas à 4°C por 16 horas e utilizadas para transformação em células de *E.coli* DH5 α pelo método de choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 1989). Os transformantes contendo os vetores recombinantes (pTZ57r + gene) foram selecionados em meio LB Agar (USB) contendo 100 μ g/mL de antibiótico ampicilina, 100 mM de IPTG (isoprpopil- β -tiogalactosídeo) e 40 μ g/mL de x-gal (5Bromo-4Cloro 3Indolyl-BDgalactoside), substrato da enzima β -galactosidase, permitindo a identificação dos clones recombinantes por um screening das colônias brancas.

Os clones recombinantes foram submetidos a técnica de PCR de colônia. Para tanto, 20 colônias foram selecionadas, com auxílio de palitos estéreis, as colônias foram picadas e ressuspendidas em tubos de 0,2 mL contendo a reação de amplificação. O conteúdo da reação: 1x tampão NH₄SO₄ (-MgCl₂), DNTPs (5 mM), MgCl₂ (25 mM), 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (Fermentas), oligonucleotídeos específicos e H₂O, em um volume final de 20 μ L. O programa de amplificação foi realizado em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf), sendo: 94°C de desnaturação inicial por 10 minutos, 94°C de desnaturação por 30 segundos, 52 de anelamento por 30 segundos, 72°C de extensão por 30 segundos e 72°C de extensão final por 7 minutos. Repetições de 29 ciclos, com exceção da primeira desnaturação e última de extensão. As colônias que apresentaram resultado de amplificação positivo foram inoculadas em meio LB líquido, contendo antibiótico ampicilina e mantidas à 37°C, 250 rpm, por 16 horas para extração do DNA plasmidial utilizando o método de lise alcalina descrito por Sambrook et al., (1989).

Para confirmação dos clones recombinantes foi realizada uma análise de restrição, utilizando o DNA plasmidial das colônias que apresentaram resultado positivo, num volume de reação final de 10 μ L, contendo: 500 ng de DNA plasmidial, 1U de cada uma das enzimas de restrição *Eco RI* e *Xba I*, tampão tango 2X [Tris-

acetato 66 nM (pH 7.9 a 37°C), acetato de magnésio 20 mM, acetato de potássio 132 mM, BSA 0,2 mg/mL] (Fermentas) e H₂O.

O plasmídeo PTZ_*DiaciCATHB* foi utilizado em uma reação de clivagem para a recuperação do fragmento correspondente da catepsina B. A reação de clivagem continha 3500 ng de DNA plasmidial, 1U de cada enzima de restrição *Eco RI* e *Xba I* (Fermentas), tampão tango 2X [Tris-acetato 66 nM (pH 7.9 a 37°C), acetato de magnésio 20 mM, acetato de potássio 132 mM, BSA 0,2 mg/mL] (Fermentas) e H₂O para o volume final de 50 µL. As reação de clivagem foi incubada à 37°C por 2 horas. O fragmento correspondente ao cDNA da catepsina B de *D. citri*, foi recuperado do gel de agarose 1% para posterior subclonagem direcional nos vetor de expressão pPICZαC.

Na reação de clivagem para preparação do vetor pPICZαC, foram utilizados 4 µg de DNA plasmidial, 1 U das enzimas *Eco RI* e *Xba I* (Fermentas) tampão tango 2X (Fermentas), em um volume de reação final de 50µL. A reação de clivagem foi incubada à 37°C durante 2 horas e analisadas em gel de agarose 1%. O fragmento correspondente a Catepsina B de *D. citri* e o vetor clivado foi recuperado do gel de agarose e purificado com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega) e utilizados em uma reação de ligação.

A reação de ligação entre o vetor pPICZαC clivado e o fragmento correspondente a catepsina B continha 40 ng do vetor pPICZαC, 120 ng do inserto, 1 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e tampão da enzima 1X [Tris-HCL 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT (Dithithreitol) 1 mM, polietilenoglicol (PEG) 8000 5% (w/v)]. A reação de ligação foi incubada à 4°C por 16 horas, e posteriormente utilizadas para transformação em células de *Ecoli* Dh5α quimiocompetentes por choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 1989).

As bactérias transformantes foram selecionadas em meio LB Low salt Agar (Invitrogen) contendo 25 µg/mL de Zeocina (Invitrogen) para o clone pPICZαC_*DiaciCATHB*. A técnica de "PCR de colônia" foi utilizada para confirmação de que o plasmídeo continha o gene de interesse. Para tanto, foram picadas 10 colônias da presente placa de petri com auxílio de palitos estéreis em 10 tubos de 0,2 mL contendo: 0,5 µL de cada oligonucleotídeo específico (10 pmoles), 1x tampão NH₄SO₄ (-MgCl₂), DNTPs (5 mM), MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (Fermentas) e H₂O, em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação está

descrito no item 3.3.2. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1%.

Para confirmação dos resultados obtidos por PCR de colônia, das colônias que apresentaram resultado de amplificação positivo e posteriormente o plasmídeo foi submetido ao sequenciamento. O plasmídeo de expressão pPICZ α C contendo a ORF que codifica a cisteína peptidase de *D. citri*, *DiaciCATHB*, foi sequenciado em equipamento Megabace Flexyble 1000 (GE Healthcare UK) para obtenção da ORF completa e confirmação da construção, utilizando os oligonucleotídeos internos CatB_Interno-F, CatB_Interno-R e os oligonucleotídeos universais Fator α Forward e AOX reverse, específicos para o vetor pPICZ α C (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. - Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento de *DiaciCATHB*

Nome	Sequência 5'- 3'
CatB_Interno-F	AGCCAACTCTAAACAGGC
CatB_Interno-R	ATGTGAGCTTTCTTGCCC
Fator α - F	TACTATTGCCAGCATTGCTGC
AOX - R	GCAAATGGCATTCTGACATCC

Fonte: (Elaborada pela autora).

3.4. Transformação do plasmídeo de expressão pPICZ α C_ *DiaciCATHB* em células de *Pichia pastoris*

A levedura *Pichia pastoris* têm se mostrado um eficiente sistema de expressão, por apresentar algumas vantagens, quando comparado ao sistema de expressão em *E.coli*. Algumas dessas vantagens são atribuídas a sua capacidade de promover um melhor enovelamento e processamento da proteína heteróloga, além de glicosilações realizadas nas proteínas secretadas. Também, a possibilidade de integração do genoma dos vetores de expressão ao genoma da levedura *Pichia pastoris*, aumentam a estabilidade das linhagens utilizadas.

A levedura *P. pastoris* utiliza o metanol como fonte de carbono. Neste sistema há a presença de um promotor denominado (AOX), responsável pela regulação da expressão, a qual é induzida na presença de metanol. Dois genes codificam a enzima álcool oxidase em *Pichia pastoris*, *AOX1* e *AOX2*, sendo que a maior parte de atividade de álcool oxidase na célula é controlada por *AOX1*.

A linhagem utilizada foi KM71H, essa linhagem apresenta fenótipo Mut^s, tendo uma baixa atividade de enzima álcool oxidase, por apresentar um locus *AOX1* mutado. Mesmo com baixa capacidade de metabolizar metanol, essa linhagem têm a capacidade de induzir uma alta expressão do promotor *AOX1*. O vetor de expressão utilizado pPICZαC, permite a clonagem do gene de interesse em fase com uma sequência nucleotídica que codifica o sinal de secreção (Fator α), o qual fica na região N-terminal da proteína expressa, o que por sua vez permite que a proteína recombinante seja secretada para o meio extracelular. Além de uma região na extremidade C-terminal que codifica seis histidinas, o que permite posterior purificação em coluna de resina de níquel, por cromatografia de afinidade e um epítipo c-myc para detecção da proteína recombinante por Western blot.

Para a transformação da linhagem KM71H, o plasmídeo pPICZαC_*DiaciCATHB*, foi linearizado com a enzima *PmeI* (New England Biolabs), após análise dos sítios de clivagem da sequência da proteína através do programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), para facilitar a recombinação homóloga com o genoma da levedura. Para a linearização foram utilizados 3 µg de plasmídeo, 1 µL de enzima *PmeI* (2U/ µL), 5 µL de tampão NeBuffer-4 (1X) (20 mM Tris-acetato, 50 mM acetato de potássio, 10 mM acetato de magnésio, 1 mM DTT, pH 7.9), 0.5 µL de BSA (100 µg/mL) e H₂O, em um volume de reação final de 50 µL. A reação foi mantida à 37°C overnight. Após, a inativação da enzima foi realizada por uma incubação à 65 °C durante 20 minutos. Em seguida, a reação contendo o plasmídeo linearizado, foi submetida a uma precipitação em solução contendo 1/10 do volume final de acetato de sódio 3M, pH 5.2, 2.5 volumes de etanol 100%, a reação de precipitação foi incubada por 15 minutos no -80°C, em seguida foi feita uma centrifugação à 16.000 x g por 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 1000 µL de etanol 70% gelado e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Após evaporação do etanol, o material foi ressuspendido em 10 µL de água miliQ.

O preparo de células KM71H eletrocompetentes foi realizado segundo protocolo de Cregg (2007). No protocolo uma colônia de KM71H foi inoculada em 5 mL de meio YEPD (1% extrato de levedura, 2% peptona - Invitrogen, 2% dextrose – J.T. Baker), a cultura foi mantida à 30°C, 250 rpm, durante 8 horas. Quarenta e três µL dessa cultura foi inoculada em 50 mL de meio YEPD, e a cultura foi mantida à 30°C, 250 rpm, até atingir uma D.O de 1.4. A análise de absorvância da cultura foi realizada à 600nm, e para isso, a cultura foi diluída 10 vezes em água antes da leitura. Após atingir a D.O. a cultura contendo as células de KM71H foi centrifugada, à 1.500g por 10 minutos, 4°C e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram ressuspensas sutilmente em 10 mL de meio YEPD juntamente com 2 mL de tampão Hepes 1M, pH 7.0. Em seguida foi adicionado 250 µL de DTT 1M (ditiotreitól - ICN Bimedicals Inc., USA), a amostra foi homogeneizada e incubada à 30°C em estufa por 15 minutos. Em seguida, foi adicionada água gelada, em um volume final de 50 mL. As células foram centrifugadas à 1.500g por 10 minutos, 4°C, e o sobrenadante descartado. As células foram então lavadas com 25 mL de água gelada estéril, e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente, em seguida, as mesmas foram novamente lavadas com 2 mL de sorbitol (1M) gelado. E, após centrifugação, as células foram ressuspensas em 100 µL de sorbitol 1M gelado. As células foram distribuídas em alíquotas de 40 µL.

Para a transformação do plasmídeo pPICZαC_*DiaciCATHB* em células de *Pichia pastoris* KM71H foi utilizado 3000 ng do DNA linearizado em 40 µL de células KM71H eletrocompetentes, em seguida a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0.2 cm (Bio-Rad) e incubado em gelo por 5 minutos. A transformação foi realizada por eletroporação no aparelho GenePulser II (BioRad) nas seguintes condições: 1500 V, 25 µF, 200 Ω. Rapidamente, após o choque foi adicionado a cubeta 1 mL de sorbitol 1M, mantido à 30°C, por 2 horas, com agitação de 170 rpm. Para a seleção de transformantes foram plaqueados 50, 100 e 200 µL da transformação em placas contendo meio YEPDs (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose, 1M sorbitol, 2% de ágar), contendo 100 µg/mL e 200 µg/mL de zeocina. Para confirmação da inserção do gene de interesse contendo o gene de *DiaciCATHB* no genoma de *P. pastoris*, foi realizado uma PCR de colônia. Para a realização da PCR de colônias das células de *Pichia pastoris* KM71H transformadas um total de 15 colônias foram repicadas com palito estéril e

colocadas em tubos de 1.5 mL contendo 20 μ L de SDS 0.2%, os quais foram fervidos por 5 minutos à 90°C, e em seguida centrifugados 12.000g por 30 segundos. Sendo que, 1 μ L desse sobrenadante foi utilizado como molde para a PCR em um volume final de 25 μ L. Para a reação foi utilizado tampão NH₄SO₄ (-MgCl) 1x, 1,5 mM de MgCl, 0,4 Mm de dNTPs, 1 % triton x -100, 10 pmoles de cada primer (Fator α e primer 3' específico do gene de interesse), 1,25 U de Taq DNA polimerase e H₂O. Entre os clones analisados por PCR de colônia, alguns foram selecionados por apresentarem o produto de amplificação correspondente ao fragmento de interesse.

3.4.1. Ensaio de expressão recombinante da catepsina B de *D. citri* em pequena escala em *P. pastoris*

Os clones positivos selecionados por PCR de colônia foram utilizados para análise da expressão da catepsina B recombinante em *Pichia pastoris*. Os ensaios de expressão foram realizados em placa de 24 poços, em cada poço foi adicionado 3 mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 100 mM de tampão fosfato pH 6.0, 1.34% de YNB, 4 x 10⁻⁵ de biotina, 1% glicerol). Em cada poço foi inoculada uma colônia transformante. A placa contendo a cultura foi mantida à 30°C durante 48 horas, com agitação de 250 rpm. Após esse período a placa contendo a cultura foi centrifugada por 10 minutos, à 1.700 x g, o meio de crescimento BMGY foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL de meio BMMY (contendo 0,75% de metanol 100% em substituição ao glicerol), as células foram mantidas à 30°C, sob agitação de 250 rpm. A cada 24 horas, foi adicionado metanol na concentração final de 0.75%, para indução expressão da proteína de interesse, como descrito por Aoki et al. (2003). A placa de screening foi mantida durante o intervalo de tempo de 24-144 horas e a análise da expressão da proteína recombinante foi visualizada em SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970). Após as análises das bandas no gel, foi possível constatar que somente um, entre todos os clones testados, expressava uma banda na altura de aproximadamente 50 kDa. O clone positivo foi escolhido para realização de ensaios de expressão em larga escala.

3.4.2. Expressão recombinante da catepsina B de *D.citri* em larga escala

A colônia contendo células de levedura expressando a cisteína peptidase de *D.citri* denominado *DiaciCATHB* foi utilizada para preparação de um pré-inóculo. Assim, uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio BMGY em tubo de 50 mL durante 24 horas sob agitação de 250 rpm, à 30°C. Um volume de 10 mL desse pré-inóculo foi transferido para um frasco Erlenmeyer aletado de 2 L contendo 500 mL de meio BMGY (pH 6.0) e mantido à 30°C por 16 horas sob agitação de 250 rpm. Após esse período a cultura foi centrifugada a 1.500 x g por 5 minutos e ressuspendida em 100 mL de meio BMMY em frasco Erlenmeyer de 1L. O ensaio de indução da expressão da proteína recombinante foi realizado à 30°C, 250 rpm.

A cada 24 horas foi adicionado metanol à cultura na concentração final de 0.75%. Após 24 horas de indução, o material foi centrifugado a 6.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana de PVDF 0.45 µm (millipore). A proteína recombinante *DiaciCATHB* em fusão com seis histidinas na região C-terminal, provenientes do vetor de expressão pPICZαC foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de resina de níquel.

3.4.3. Purificação da proteína recombinante *DiaciCATHB* por cromatografia de afinidade

A proteína recombinante *DiaciCATHB* em fusão com seis histidinas na região C-terminal, provenientes do vetor de expressão pPICZαC foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de resina de níquel.

Para tanto, os 100 mL de cultura contendo a proteína recombinante (sobrenadante) foram passados por uma coluna contendo 4 mL de resina de níquel Ni-NTA superflow (Qiagen) previamente equilibrada com 5 volumes (20 mL) de tampão de lise pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM e NaH₂PO₄ 50mM), em seguida a coluna foi lavada com 3 volumes de tampão de lise (12 mL), e a proteína eluída em 2 volumes de tampão de lise contendo concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM). O imidazol têm forte afinidade pelo níquel, competindo, portanto com a cauda de histidinas presente na região C-terminal da proteína recombinante, o que conseqüentemente permite que a proteína de fusão se solte do metal e seja eluída. Toda a etapa de purificação foi realizada na geladeira à 4°C. A proteína recombinante purificada foi analisada em SDS-PAGE

12% corado por *Comassie blue* (LAEMMLI, 1970). As frações contendo a proteína recombinante foram dialisadas em membranas (Spectrum Laboratories) de 3.500 MW contra 2 litros de tampão de lise pH 8,0 e mantidas à 4 °C com trocas do tampão a cada 60 minutos, totalizando 2 horas de diálise e portanto, duas trocas do tampão. Em seguida, a proteína foi concentrada em equipamento SPD1010 SpeedVac® System (ThermoSavant), durante 3 horas e posteriormente por mais 1 hora e 30 minutos em concentrador Vivaspın™ 3.000 MWCO (GE Healthcare). A concentração da proteína *DiaciCATHB* foi determinada pelo método de quantificação Bradford (BioRad) (BRADFORD, 1976), em espectrofotômetro Hitachi U-5100.

3.5. Produção de anticorpo policlonal contra *DiaciCATHB* recombinante e ensaio de *Western Blot*

O anticorpo policlonal anti-*DiaciCATHB* contra a cisteino peptidase recombinante foi produzido em camundongos, de acordo com o protocolo de imunização (SAMBROOK; RUSSEL, 1989). Um total de 50 µg da proteína recombinante foi inetado em 2 camundongos individualmente com o mesmo volume de adjuvante completo de Freund (Sigma), correspondendo a primeira imunização. Após 45 dias foi aplicada a segunda imunização, 50 µg da cisteino peptidase com igual volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Após dez dias da segunda imunização, os animais foram sacrificados e o sangue coletado e mantido à 37°C por uma hora para sua coagulação, em seguida foi centrifugado em centrífuga Eppendorf 5810R à 4.000 rpm por 10 minutos para a separação do soro. Para conservação do soro, foi adicionado 1 µL de azida (2%) para cada 1 µL de soro e estocado à 4°C.

Para as análises em *Western blot*, as amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 12%, transferidas para uma membrana de PVDF [poli (fluoreto de vinilideno)] (Bio Rad) em tampão de transferência (Tris 200 mM, glicina 50 mM, metanol 100% na concentração final de 20%) durante 2 horas, à 150 mA. Após a transferência, a membrana foi corada por aproximadamente 3 minutos em solução Ponceau (Merck) (Ponceau 0.5%, ácido acético 01%) para visualização da localização das bandas e marcação das mesmas com o auxílio de uma agulha.

Para bloqueio das membranas foi utilizado leite em pó desnatado Molico (Nestlé) 5% diluído em TBS 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, pH 8.0) à 4°C

por 16 horas. Após bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS 1X (5 minutos cada lavagem e leve agitação) e incubadas com o anticorpo primário anti-*DiaciCATHB* proveniente do soro dos camundongos diluído em 1: 3.000 em TBS 1X durante 90 minutos sob leve agitação em temperatura ambiente. Depois da incubação, as membranas foram lavadas nas mesmas condições descritas anteriormente, e incubadas com anticorpo secundário Anti - mouse IgG (conjugado a peroxidase) do kit GE Healthcare Amersham ECLTM Western Blotting Analysis System, diluído 1:10.000 em TBS 1X durante 90 segundos sob leve agitação em temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi lavada com TBS 1X, três vezes de 5 minutos e leve agitação, e as bandas correspondendo às proteínas reconhecidas pelos anticorpos foram reveladas.

3.6. Zimografia reversa

A atividade de cisteíno peptidase recombinante foi detectada pelo método de coloração negativa. Neste método a atividade das enzimas é detectada pela não coloração do gel nas regiões onde ocorre a clivagem hidrolítica das ligações peptídicas da gelatina. Para tanto, foram utilizadas duas amostras diferentes no gel, papaína (5 ng), usada como controle positivo e o sobrenadante da levedura *Pichia pastoris* KM71H expressando a cisteíno peptidase recombinante. Estas amostras foram preparadas em condições não redutoras e separadas em gel SDS-PAGE 15% contendo 0,04% de gelatina, de acordo com o protocolo Schlereth et al., (2000), com algumas alterações.

Uma corrida de eletroforese à 4°C foi realizada e o gel incubado por 1 hora a temperatura ambiente sob leve agitação com solução de renaturação de 2,5 % triton X-100 para a remoção do SDS. Após essa incubação, o gel foi lavado por 3x de 5 minutos com H₂O destilada sob leve agitação e incubado com o tampão de ativação por 20 h à 37°C contendo 0,02 M Na₂HPO₄, 0,1 M ácido cítrico nos pHs 5,0 e 6,5 contendo 2mM de DTT (ditiotreitól - ICN Bimedicals Inc., USA) para ativação da peptidase. Após a ativação da cisteíno peptidase as bandas foram visualizadas através da coloração por comassie blue R-250.

3.7. Ativação da Cisteíno peptidase *DiaciCATHB*

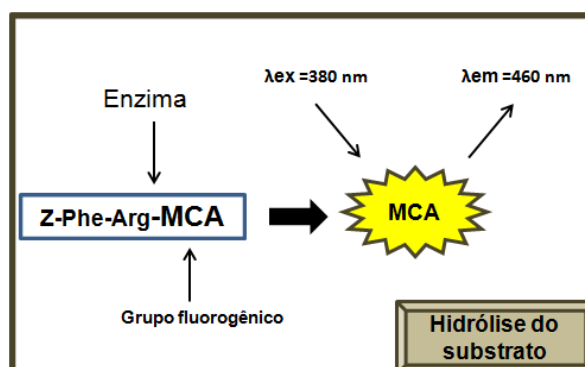
Para os testes de atividade enzimática, foi observado que a proteína *DiaciCATHB* purificada encontrava-se na sua forma inativa, sendo necessário portanto, sua ativação. A ativação foi realizada segundo a metodologia de Brömme et al., (2004), com algumas modificações. A enzima recombinante estava em tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM e NaH₂PO₄ 50mM) pH 8,0. A essa preparação, foi adicionado ácido acético 50%, a enzima teve seu pH alterado para 5,0, seguida de incubação à 37°C, durante 1 hora. Após ativação, a enzima foi mantida em gelo e em seguida foi submetida ao ensaio de atividade.

O ensaio de atividade foi realizado em cubeta de quartzo contendo tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5, 2,5 mM de ditioneitol (DTT, ICN Bimedicals Inc., USA) em compartimento fechado mantido à 30°C. A leitura da atividade da enzima foi realizada pela medida de aumento de fluorescência ocasionada pela hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-MCA, monitorada em espectrofluorímetro Hitachi F-2500.

3.7.1. Caracterização cinética da cisteíno peptidase recombinante *DiaciCATHB*

Para os testes de atividade da enzima *DiaciCATHB* foi utilizada cubeta de quartzo de 500 µL, na qual foi adicionado 400 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, e em seguida, 2,5 mM (concentração final) do agente redutor DTT (ditioneitol - ICN Bimedicals Inc., USA). O DTT é utilizado como agente redutor do resíduo de cisteína presente no sítio ativo das cisteíno peptidases. Juntamente ao tampão acetato e DTT, foi adicionado 2,14 µM da enzima recombinante e a reação foi incubada por 3 minutos à 30 °C. Após incubação, foram adicionadas as concentrações crescentes de 7,5, 15, 30, 45 e 60 µM de substrato Z-F-R-MCA (Calbiochem). As medidas de fluorescências foram detectadas em espectrofluorímetro Hitachi F-2500. A fluorescência é medida através da hidrólise do substrato Z-F-R-MCA, em comprimento de onda (λ_{ex}) de excitação de 380 nm e emitindo fluorescência que pode ser detectada em (λ_{em}) 460 nm (Figura 3.2). A velocidade da reação é então medida considerando a quantidade de MCA livre, como resultado da hidrólise do substrato pela enzima. O programa FL Solutions 2.0 analisa os resultados a partir dos dados de UAF (Unidade Arbitrária de Fluorescência) vs tempo, gerando uma reta que corresponde a velocidade da reação. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 3.2. Representação da hidrólise do substrato fluorogênico. Liberação da molécula fluorescente pela clivagem do substrato pela enzima, o MCA livre é excitado em λ 380 nm, emitindo fluorescência à λ 460 nm.



Fonte: (Elaborada pela autora).

3.7.2. Cálculo da constante de Michaelis-Menten

A constante de Michaelis-Menten (K_m) permite analisar a afinidade da enzima pelo substrato utilizado. O valor de K_m foi determinado utilizando diferentes concentrações do substrato Z-F-R-MCA variando de 1 a 75 μ M, em 500 μ L de solução da reação, contendo tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5 e 2,5 mM de DTT. O valor do K_m foi determinado a partir de um gráfico da velocidade da reação vs substrato, utilizando o programa Grafit (LEATHERBARROW, 2001).

3.7.3. Ensaios de inibição da atividade catalítica da *DiaciCATHB*

Nos estudos de inibição da atividade catalítica da cisteíno peptidase de *D. citri*, *DiaciCATHB*, foi utilizado o inibidor de cisteíno peptidases CaneCPI-4, uma cistatina de cana-de-açúcar caracterizada por Gianotti et al., (2008). Outros dois inibidores E64 (inibidor de cisteíno peptidases em geral) e CA074 (inibidor de catepsina B) (Calbiochem), também foram utilizados em testes de inibição de atividade enzimática preliminares. Os ensaios de inibição enzimática foram realizados em cubeta de quartzo de 500 μ L, a 30 °C. A enzima *DiaciCATHB* (2,14 μ M) pré-ativada a 37°C, foi adicionada em cubeta de quartzo contendo tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5 e DTT (2,5 mM) (dithiothreitol) e incubada por 3 minutos em um volume final de 500 μ L. Após a incubação, o substrato Z-Phe-Arg-MCA (7,5 μ L à 5 mM/ μ L) foi adicionado e a leitura da atividade catalítica residual

realizada em espectrofluorímetro F-2500 (Hitachi). A atividade catalítica, gerada pela hidrólise do substrato pela enzima na ausência de inibidores, representada como 100% de atividade, foi utilizada como controle. Nas mesmas condições foram adicionadas concentrações crescentes de inibidor na cubeta. Em seguida foi calculada a constante de inibição (K_i), o inibidor CaneCPI-4 foi adicionado a reação em diferentes concentrações (0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,20, 0,24, 0,28 nM). A constante de inibição (K_i) é determinada pela fórmula $V_0 / V_i - 1$, sendo V_0 a velocidade de hidrólise em ausência de inibidor e V_i a velocidade de hidrólise na presença de inibidor (BEYNON; BOND, 1989). Os dados foram utilizados para a construção de um gráfico de inibição utilizando o programa GraFit versão 5.0.11. (LEATHERBARROW, 2001). Nos testes preliminares as concentrações de inibidores foram de 0,104 nM CA074 e 0,016 μ M de E64.

3.8. Análise por espectrofotometria de massa da cisteíno peptidase recombinante

Esses experimentos foram realizados pelo Prof. Dr. José Cesar Rosa, do Centro de Química de proteínas – Departamento de biologia molecular e celular da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

A proteína purificada em coluna de resina de níquel Ni-NTA superflow (Quiagen), foi digerida por tripsina por 24 horas à 37°C em 0.1 M de bicarbonato de amônio. A hidrólise de tripsina foi interrompida pela adição de 5 μ L de ácido fórmico e os peptídios triptícos foram desalinifexados em microponteiras contendo resina POROS R2 (Perseptive Biosystem). A resina foi carregada e previamente ativada em metanol e lavada para a remoção do sal com 150 μ L de ácido fórmico 0.2% por 3 vezes e eluídos em 30 μ L de solução contendo ácido fórmico 5 % e metanol 60%.

As análises de espectrometria de massa de peptídeos triptícos MS foram realizadas em espectrômetro de massa por “eletrospray” triplo quádruplo Quattro II (Micromass Manchester, UK) por infusão direta (300nL/min) sob as seguintes condições: voltagem de capilaridade mantida à 2.8 kV, cone de voltagem de 40 V e cone de temperatura à 100 °C. Os parâmetros para varredura de íons MS1 foram otimizados com fragmentos de peptídeos sintéticos ACTH 18-39 (Sigma – Aldrich, St Louis, MO, USA) e angiotensina II fornecidos pelo laboratório de síntese de peptídeos da UNIFESP, São Paulo, ambos na concentração de 1 pmol/ μ L. A

fragmentação dos peptídeos foi obtida por CID-MS/MS e a energia de colisão utilizada foi entre 25 e 40 eV e o argônio utilizado como gás de colisão a uma pressão parcial de 3.0×10^{-3} mTorr.

Cada espectro foi coletado de 20-50 scans (2 a 5 scan/seg) e foi processado utilizando o programa Masslynx v.3.3 (Micromass, Manchester, UK) e os íons foram desconvoluídos para massa molecular utilizando o algoritmo MaxEnt1 ou MaxEnt 3. A Sequência de aminoácidos dos peptídeos trípticos foi deduzida a partir das séries de fragmentos de íons b e y produzidas pela colisão induzida pela espectrometria (CID-MS/MS). As razões de massa por carga foram determinadas com o peptídeo sintético precursor de íon angiotensina II, a $150 \text{ ppm} \pm 20$ por ESI-MS.

Para fragmentos de íons do tipo y e b as medidas foram a $300 \text{ ppm} \pm 100$ após múltiplas análises por ESI-CID-MS/MS. As sequências de aminoácidos dos peptídeos trípticos foram comparadas com a sequência de aminoácidos da cisteíno peptidase de *D. citri*. Disposta no banco de dados do transcriptoma de *D. citri* de USDA – (United States Department of Agriculture) e na sequência de aminoácidos obtida pelo sequenciamento realizado em nosso laboratório (LBM- UFSCar).

3.9. Coleta das fases de desenvolvimento de *D. citri* e extração do RNA total de ovos de *D. citri* para análise de expressão gênica

Após a coleta das diferentes fases de desenvolvimento, ovo, aproximadamente 400 ninfas e 400 adultos de *D. citri*. As amostras correspondentes a fase de ninfa e adulto foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas em (-80°C) para posterior extração do RNA total baseado na metodologia descrita por Chomczyn e Sacchi (1987), como já descrito anteriormente no item 3.2.

Para a fase de desenvolvimento de ovo, foi utilizada a metodologia de Chomczyn e Sacchi (1987), com algumas modificações. Devido ao tamanho diminuto dos ovos de *D. citri*, em torno de 0,31 mm de altura e 0,14 mm de largura, a coleta torna-se laboriosa. Sendo assim, os ovos foram coletados com o auxílio de uma agulha e lupa e adicionados imediatamente em 500 μL de reagente Trizol (Invitrogen) em um tubo (Eppendorf) de 1,5 mL e mantido em gelo, devido ao longo período de exposição, para que a amostra mantivesse sua integridade até o fim da coleta. Após a coleta, a solução de trizol contendo os ovos, foi centrifugada à 13.000

rpm, à 4°C por 2 minutos, para que se formasse um “pellet”, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 500 µL de reagente Trizol (Invitrogen) e macerado com o auxílio de um pistilo de vidro, pressionado a amostra contra a parede do tubo (Eppendorf) de 1,5 mL. Em seguida, foi realizada uma centrifugação à 12.000 x g, 10 minutos à 4°C, o sobrenadante coletado e adicionado a um novo tubo (Eppendorf) de 1,5 mL. A amostra foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e logo após vortexada. Foi adicionado 100 µl de clorofórmio e em seguida, as amostras foram agitadas por 15 segundos e incubadas por 12 minutos em temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado em 12.000 x g por 15 minutos à uma temperatura de 4°C. Três fases foram separadas: sobrenadante, intermediária e orgânica, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (Eppendorf) de 1,5 mL contendo 250 µl de isopropanol e vertido sutilmente. Após, a amostra foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Foi realizada uma centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet preservado, uma lavagem com etanol 70% seguida de centrifugação por 5 minutos em 7.500 x g à 4°C foi realizada. Com o auxílio de pipetas de Pasteur o sobrenadante foi removido e o tubo contendo o RNA foi vertido em papel estéril para remoção do etanol, após alguns minutos os tubos embrulhados em papel estéril e em temperatura ambiente, o pellet foi ressuscitado em 30 µl de água nuclease free (Promega) e estocado à -80°C. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) e também em gel de agarose 1% para análise de sua integridade.

3.9.1. Tratamento dos RNAs provenientes das fases de desenvolvimento de *D. citri* com DNase

O RNA das amostras das diferentes fases de desenvolvimento de *D. citri* foram tratadas, sendo 3 µg de RNA total das amostras de ninfa e adulto e 93,6 ng da amostra de ovo foram tratados com a enzima DNase I *Amplification grade* (Invitrogen), em um volume de reação de 30 µL, em cada tubo foram adicionados 1,5 µL de DNase I (1U/µL), e para amostra de ovo, 0,5 µL (1U/ µL) e tampão da reação 10X (concentração final 1X). Os tubos foram incubados por 15 minutos em temperatura ambiente, para que ocorresse a ativação da enzima, em seguida para inativação da DNase I foi adicionado 1,5 µL de EDTA 25 mM e 0,5 µL para o tubo da amostra de ovo, e aquecidas por 10 minutos à 65°C. As amostras foram analisadas

em gel de agarose 1% para análise de integridade e quantificados em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda de 260 nm e a pureza confirmada através das razões de leituras a 260 e 280 nm.

3.10. Desenho dos oligonucleotídeos utilizados no qPCR

Os oligonucleotídeos para análise de qPCR (Tabela 3.3), foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Os parâmetros utilizados foram: ausência de complementaridade interna, % de GC, tamanho entre 18-20 bases, temperatura de desnaturação de 55-61°C, tamanho do amplicon de 75-150 pb (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foram desenhados oligonucleotídeos para o gene actina, utilizado como controle endógeno.

Tabela 3.3. - Oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR

Nomes	Sequências 5' 3'
CathBD.citriRT_F	CAGCACAACTTCGGTGATT
CathBD.citriRT_R	CAATGGTCGTTCCAAGAGT
ActinaRT_F	ACCATCGGAAACGAAAGAT
ActinaRT_R	CGTGGATACCGCAAGATT

Fonte: (Elaborada pela autora).

3.11. Cálculo de eficiência e especificidade do oligonucleotídeos qPCR

Para cálculo de eficiência da reação e análise de especificidade dos oligonucleotídeos (Tabela 3.2) utilizados foi realizada uma análise de curva padrão (Ct x quantidade de cDNA), a curva padrão é uma ferramenta muito útil para determinar as características de um ensaio, como sua eficiência, sensibilidade e variáveis associadas com a preparação de amostras. Assim, foi realizada uma diluição seriada de cDNA, partindo de uma quantidade inicial de 100 ng de cDNA, foram realizadas 5 diluições seriadas, Para cálculo de eficiência da reação utiliza-se a fórmula $E = [10^{(-1/R)}] - 1$. Para uma reação com 100% eficiência, é necessário um slope de -3.32 com uma tolerância de $\pm 0,3$, para que esses valores sejam aceitáveis e $R^2 = 1.0$, ou seja, valores de $R^2 > 0,99$ são sugeridos (PFAFFL, 2006).

3.12. Análise de expressão gênica relativa de *DiaciCATHB* em diferentes fases de desenvolvimento

Para a qPCR foi utilizado o kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) que contém todos os reagentes necessários para a reação, exceto os oligonucleotídeos. Este kit contém o fluoróforo SYBR Green I, (um corante fluorescente que emite fluorescência ao se ligar ao sulco menor dupla fita do DNA, ou seja, ocorrendo um aumento das duplas fitas de DNA, ocorrerá um aumento proporcional de fluorescência na reação), a enzima uracil-n-glicosidase (UDG) e dUTP em substituição ao dTTP. A enzima UDG remove resíduos de uracila presentes em moléculas de DNA fita simples ou dupla, evitando que o DNA contendo uracila, resultante de amplificações prévias, sirva como molde na reação. Após passos de descontaminação, a UDG é inativada por altas temperaturas durante os passos de qPCR.

A reação de PCR foi realizada em volume de 10 μ L contendo 1 μ L de cDNA, *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 1X*, 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo e H₂O. A reação de amplificação foi realizada no equipamento Eco Real-time System (Illumina) e o ciclo de reação utilizado: Incubação da UDG à 50 °C por 2 minutos, ativação da polimerase à 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. Análise da curva de dissociação (Melting) foi utilizada para análise de especificidade das amplificações, utilizando ciclos na ordem de 95 °C, 55°C e 95 °C por 15 segundos em cada temperatura. A curva de dissociação dependerá do tamanho do fragmento, quantidade de GC e ordem da sequência, para análise dos produtos específicos ou inespecíficos, como, dímeros de *primers*, possíveis erros e contaminações. Os produtos de PCR podem ser analisados pela curva de dissociação, pois, cada molécula de DNA dupla fita possui uma temperatura de dissociação característica (T_m), na qual 50% das moléculas estão com dupla fita e as outras 50% estão dissociadas, fita simples. Com aquecimento da reação a 95°C, ocorre a desnaturação dos produtos amplificados, e o SYBR Green que intercala o sulco menor do DNA é liberado do DNA dupla fita, resultando em uma diminuição de fluorescência quando a temperatura alcança a T_m do produto de PCR presente na reação.

Para as análises de expressão gênica é utilizada a fase exponencial da reação na qual a especificidade e precisão das reações são mais altas. No qPCR o equipamento detecta o ciclo de amplificação no qual o produto de PCR é suficiente para produzir um sinal acima de um limite arbitrário, denominado (threshold), que torna possível diferenciar a fluorescência resultante da amplificação daquela gerada pela fluorescência basal, quando ultrapassa o threshold é determinado o Ct (cycle threshold). Em uma reação com 100% de eficiência, a quantidade de produto dobra de maneira uniforme a cada ciclo. O valor de Ct é maior quanto menor for a quantidade de cDNA molde presente no início da reação.

3.13. Análise dos dados de expressão gênica por qPCR

A análise da expressão relativa é determinada comparando a expressão do gene de interesse *DiaciCATHB* com um gene de referência, actina (controle endógeno). Desta maneira, à partir dos valores de Cts obtidos tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno, foi calculado a média dos Cts de ambos. E, a média dos Cts do gene alvo (*DiaciCATHB*) normalizado com a média de Cts do gene de referência (actina), correspondendo ao $\Delta Ct_{\text{médio}}$ ($Ct_{\text{médio alvo}} - Ct_{\text{médio gene referência}}$). O gene da actina foi escolhido como controle endógeno por apresentar expressão homogênea em diferentes tecidos analisados, de acordo com Tiwari et al., (2011). Os valores de expressão relativa do gene *DiaciCATHB* nas diferentes fases de desenvolvimento foram expressos como potência de dois ($2^{-\Delta Ct}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Para análise da expressão gênica, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O $\Delta\Delta Ct$, faz a normalização dos valores de Ct do gene alvo em relação ao controle endógeno, permite a normalização com relação ao controle endógeno. O $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indica quantas vezes os genes alvo foram mais ou menos expressos quando comparados ao controle. Para análise da significância dos valores obtidos na análise de expressão gênica, foi utilizado o programa *Relative Expression Software Tool* (REST) 2005 versão 1.9.12 da Qiagen (PFAFFL et al., 2002). Este software calcula a expressão relativa de genes pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ levando em conta um valor de eficiência e R^2 citados no item 3.10.1. Também, permite analisar se existem diferenças significativas entre animais tratados, que seriam as fases de ninfa e adulto, com relação aos animais controle, ovos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

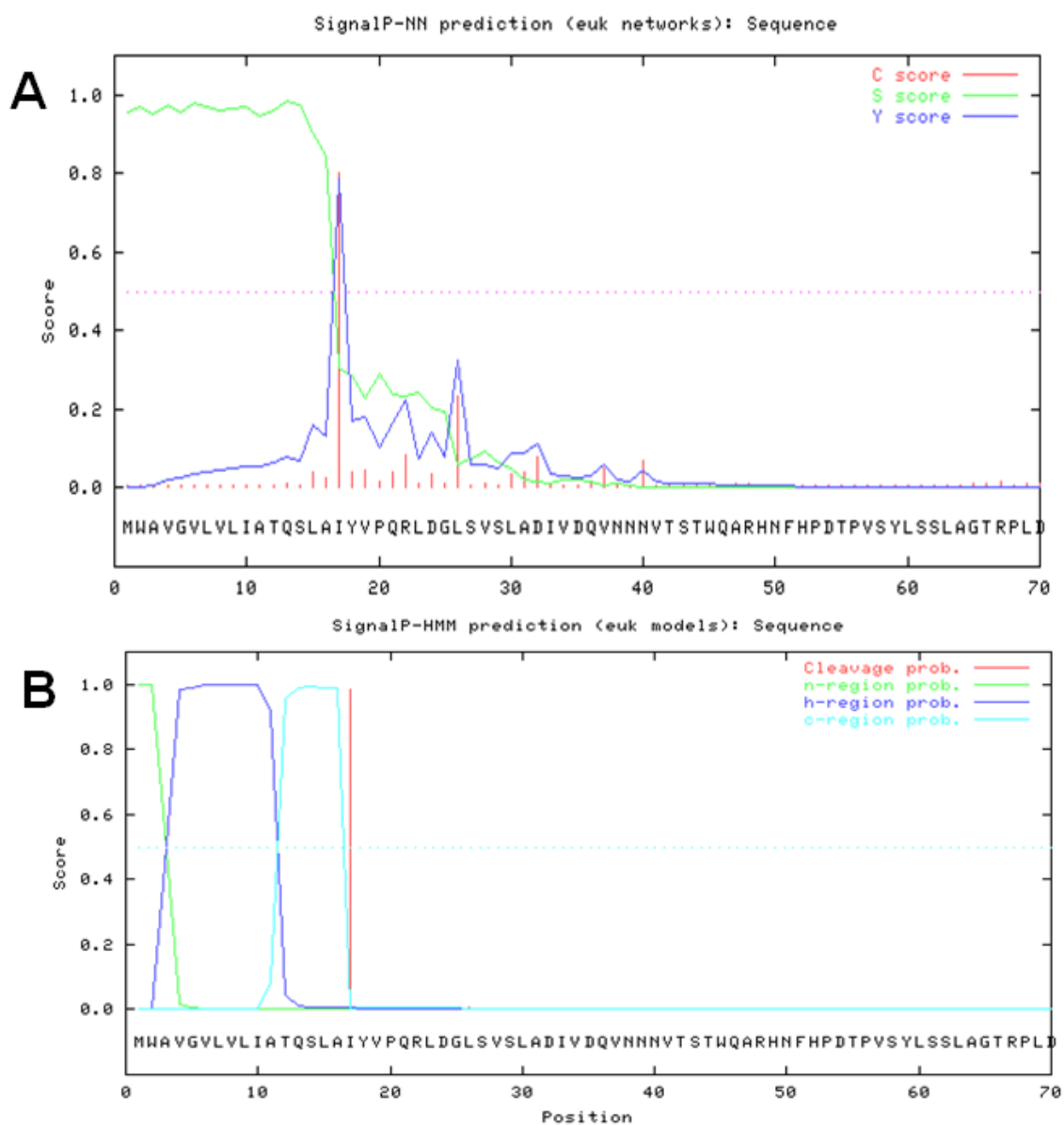
4.1. Análise *in silico* da sequência da *DiaciCATHB*

Na busca por gene que codificasse umacisteíno peptidase de *D. citri*, foi possível ter acesso aos dados do projeto do transcriptoma do psilídeo *Diaphorina citri*, disponível em <http://www.psyllid.org/node/1>, desenvolvido pelo United States Department of Agriculture (USDA). Por intermédio do Prof. Dr. José Belasque Júnior foi possível ter acesso aos dados brutos do transcriptoma de *D. citri*, que foram cedidas pelo Dr. Wayne Hunter. O sequenciamento do RNA de ovo, ninfas de 1°, 3°, 4° e 5° instar e adulto foi realizado por tecnologia Illumina, Inc. Esses dados foram depositados no banco de dados local no servidor do LBM (DGE - UFSCAR).

Uma sequência parcial de uma cisteíno peptidase do tipo catepsina B (110456454) de *D. citri*, disposta no banco de dados do NCBI foi utilizada para fazer uma busca por similaridade na montagem dos transcritos de ovo, ninfa e adulto, utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Como resultado foram encontrados 6 transcritos de ovo, 10 transcritos de ninfa e 11 transcritos de adulto apresentando similaridade para a catepsina B de *Diaphorina citri*.

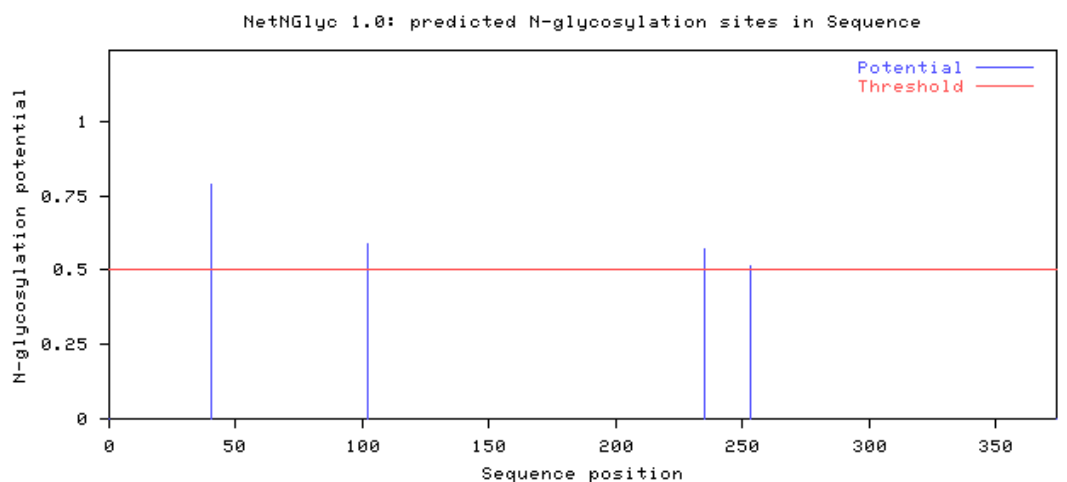
Uma sequência de catepsina B dos transcritos de adulto foi escolhida por conter a ORF (*Open Reading Frame*) completa. A sequência da ORF que codifica a cisteíno peptidase de *D. citri* apresenta 1125 pb e 374 resíduos de aminoácidos. Na análise da sequência de aminoácidos através do programa Signal P (BENDTSEN, et al., 2004), (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Um possível peptídeo sinal de 17 resíduos de aminoácidos foi predito (Figura 4.1). A presença de peptídeos sinais em sequências podem ser típicos de proteínas secretoras ou lisossomais (ALBERTS et al., 2002). A predição para sítios de glicosilação também foi realizada, na qual 4 possíveis sítios de N-glicosilação foram preditos através do programa NetNGlyc 1.0 Server (Figura 4.2).

Figura 4.1. Peptídeo sinal identificado na sequência da cisteíno peptidase de *D. citri*. A: Os gráficos gerados através do programa Signal P são formados devido a presença de sequências que são reconhecidas, como de peptídeos sinais. B: O Provável sítio do peptídeo sinal representado em vermelho, as regiões N e C-terminal representadas em verde e azul claro, e a região hidrofóbica representada em azul escuro.



Fonte: (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Figura 4.2. Possíveis sítios de N - glicosilação da *DiaciCATHB*. O programa NetNGlyc 1.0 gerou um gráfico que mostra quais as posições das glicosilações, sendo para a sequência de *DiaciCATHB*, as asparaginas 40, 102, 235 e 253.



Fonte: (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

A presença e posição do pró-peptídeo na sequência da cisteína peptidase foi predita do resíduo de aminoácido 32 – 69, ou seja, um pró-peptídeo de 37 resíduos de aminoácidos. Estudos realizados por Brömme, Nallaseth e Turk (2004), relatam que as cisteína peptidases da família papaína, apresentam uma pró-região para desempenhar diferentes funções como o transporte para o compartimento endosomal ou lisossômico, para o correto enovelamento da proteína madura ativa, e inibição de atividade da proenzima. E, ainda, que o tamanho dessa pró-região varia significativamente entre os diferentes tipos de cisteína peptidases, sendo descrito um pró-peptídeo de 38 resíduos de aminoácidos para uma catepsina X, enquanto para uma catepsina F, 251 resíduos de aminoácidos.

Através das análises realizadas a proteína *DiaciCATHB* foi classificada como pertencente a família C1 das cisteína peptidases, do tipo catepsina B, possuindo sítios ativos importantes como cisteína e histidina (Figura 4.3).

Figura 4.3. Predição do pró-peptídeo, família e sítios ativos da cisteíno peptidase.



Fonte: (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

No alinhamento da proteína *DiaciCATHB* com outras catepsinas B de diferentes organismos de várias ordens, os resíduos idênticos estão representados em caixas pretas e os resíduos conservados ou com características similares são indicados por caixas cinzas (Figura 4.4).

Figura 4.4. Alinhamento das sequências de aminoácidos de catepsinas B de diferentes organismos. *Diaphorina citri*_NCBI (110456454), *DiaciCATHB*, *Nilaparvata lugens* (22535408), *Tribolium castaneum* (282400164), *Triatoma infestans* (38147393), *Acyrtosiphon pisum* (193716207), *Myzus persicae* (51947600), *Helicoverpa armigera* (7537454), *Danio rerio* (27882093), *Pan paniscus* (397467300) e *Homo sapiens* (30583753). O sublinhado vermelho no início da sequência corresponde a região do peptídeo sinal da sequência de *DiaciCATHB*. As caixas coloridas indicam os resíduos catalíticos, do sítio ativo (tríade), em verde: asparagina, em amarelo: histidina, em pink: cisteína. Triângulos indicam as regiões dos sítios de N-glicosilação. A caixa preta alta evidencia a possível região do loop de oclusão. As caixas pretas correspondem a 100% de identidade de aminoácidos. As caixas vazias e cinzas correspondem aos resíduos similares.



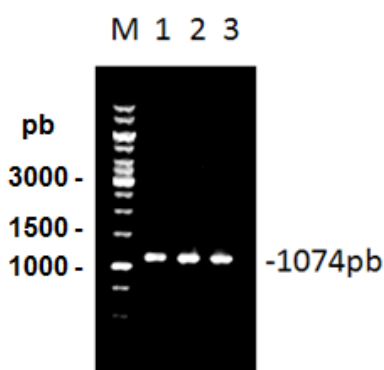


Fonte: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, alinhamento realizado no programa BioEdit v. 7.0.5.3).

4.2. Construção do plasmídeo de expressão pPICZαC_*DiaciCATHB*

A ORF que codifica a proteína *DiaciCATHB*, com exclusão da região inicial pertencente a sequência do peptídeo sinal foi amplificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos contendo os sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *XbaI*. Em análise em gel de agarose 1% um fragmento correspondente ao tamanho esperado para a catepsina B, foi visualizado (Figura 4.5).

Figura 4.5. Amplificação da região codante da catepsina B de *D. citri*. M: marcador de massa molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). 1, 2 e 3: produto amplificado de *DiaciCATHB*.

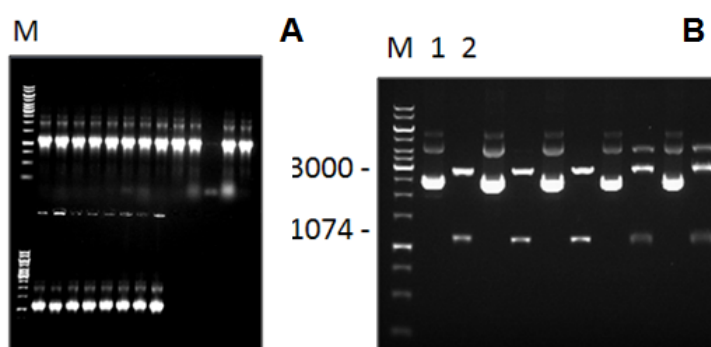


Fonte: (Elaborada pela autora).

A partir do produto amplificado, foi realizada a digestão e purificação do fragmento, e o mesmo utilizado para clonagem em vetor de propagação PTZ57r. Após PCR de colônias e clivagem com as enzimas de restrição, um fragmento de 1074 pb correspondente a catepsina B de *D. citri* e um fragmento de aproximadamente 3000 pb correspondente ao vetor PTZ57r foi visualizado em gel

de agarose 1% (Figura 4.6). O produto de amplificação foi digerido e utilizado para a ligação no vetor de expressão pPICZ α C.

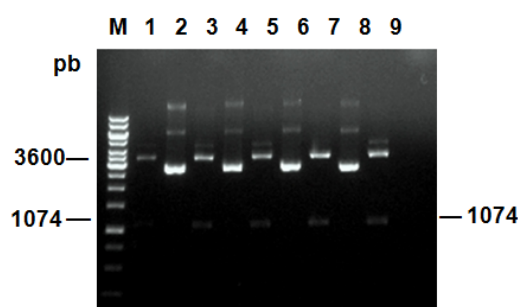
Figura 4.6. A: PCR de colônias do plasmídeo PTZ57r + ORF Catepsina B. M: marcador de massa molecular 1 Kb (Invitrogen). B: Análise de restrição (enzimas *EcoRI* e *Xba I*) para confirmação do plasmídeo de propagação. M: marcador de massa molecular 1 Kb (Invitrogen). 1: Plasmídeo não-restringido. 2: Plasmídeo restringido e verificação dos fragmentos de 3000 pb correspondente ao vetor PTZ57r e 1074 pb correspondente a ORF de *DiaciCATHB*.



Fonte: (Elaborada pela autora).

Como resultado da PCR de colônia, 10 colônias recombinantes apresentaram resultado de amplificação positivo. Para a confirmação dos clones positivos realizou-se uma reação de clivagem de 5 colônias recombinantes, utilizando as enzimas de restrição utilizadas na clonagem. Podemos observar na figura 4.7 o plasmídeo pPICZ α C_*DiaciCATHB* restringido. Após a clivagem com as enzimas *EcoRI* e *Xba I* verificamos a presença dos fragmentos de 3600 pb correspondendo ao vetor pPICZ α C e 1074 pb correspondendo a ORF de *DiaciCATHB*.

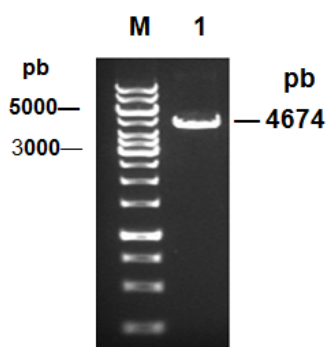
Figura 4.7. A: Análise de restrição (enzimas *EcoRI* e *Xba I*) para confirmação do plasmídeo de expressão. M: marcador de massa molecular 1 Kb (Invitrogen). 1, 3, 5, 7 e 9: Plasmídeo restringido, e verificação dos fragmentos de 3.600 pb correspondendo ao vetor pPICZ α C e 1074 pb correspondendo a ORF de *DiaciCATHB*. 2, 4, 6 e 8: Plasmídeo não – restringido (controle).



Fonte: (Elaborada pela autora).

Foi realizada a linearização do plasmídeo de expressão para posterior transformação em *P. pastoris* (Figura 4.8). A linearização é necessária para que ocorra a integração no genoma da levedura *P. pastoris*, aumentando a estabilidade das linhagens utilizadas na expressão recombinante.

Figura 4.8. Linearização do plasmídeo de expressão pPICZαC_*DiaciCATHB*. M: marcador de massa molecular 1 Kb (Invitrogen). 1: Plasmídeo linearizado, fragmento de 4.674 pb correspondendo ao vetor pPICZαC + ORF *DiaciCATHB*. Com confirmação clones positivos, o clone 4 foi escolhido para dar continuidade dos experimentos.

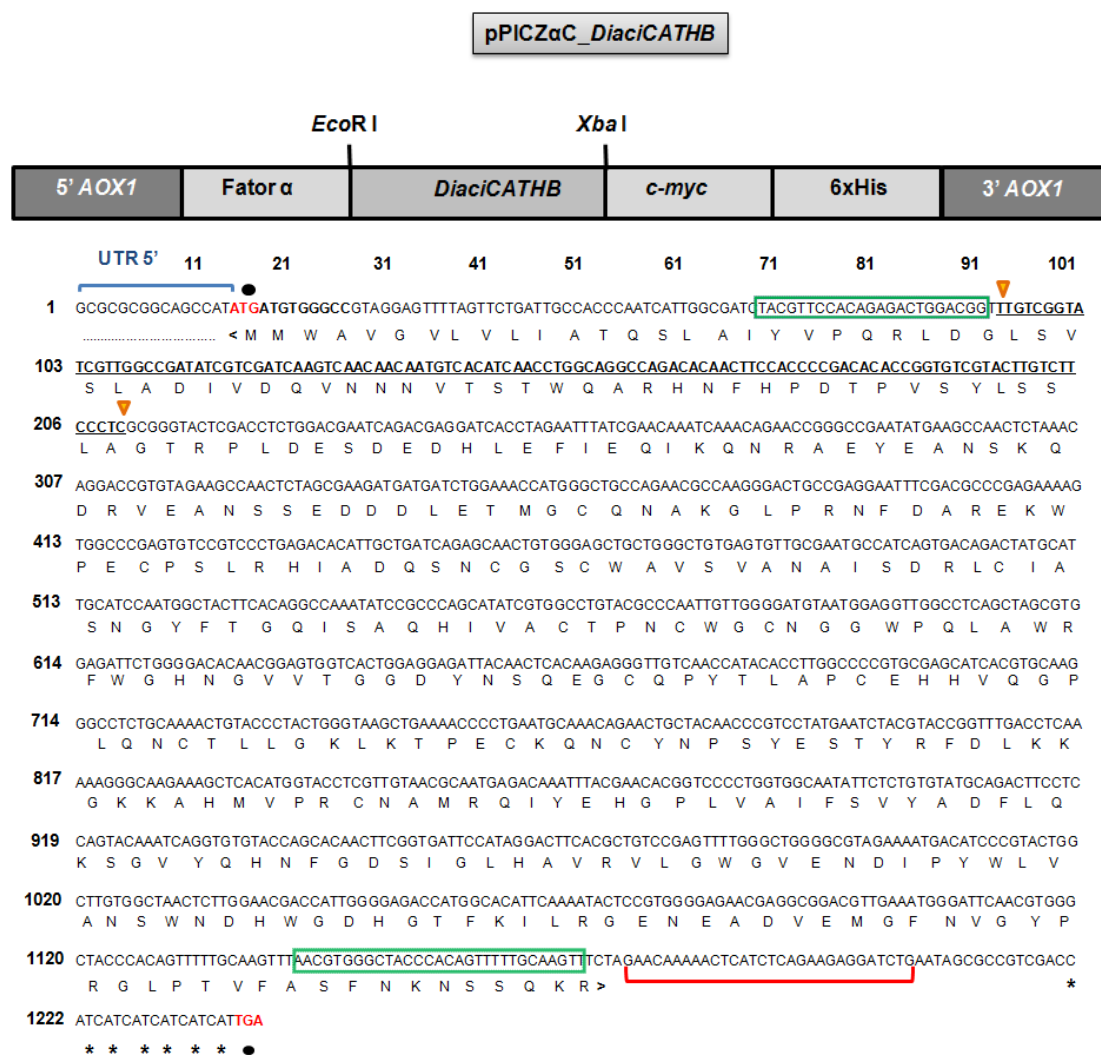


Fonte: (Elaborada pela autora).

A construção contendo a ORF de *DiaciCATHB* foi feita com o pró-peptídeo na região N-terminal da proteína, ou seja, em sua forma inativa, excluindo o peptídeo sinal da sequência e em fusão com o peptídeo sinal do vetor de expressão pPICZαC, que apresenta uma região que corresponde ao peptídeo sinal fator α, um fator de secreção, o qual permite que a proteína seja secretada para o meio de cultivo e em fusão com uma região C-terminal com seis histidinas, importante para a etapa de purificação da proteína recombinante. A figura 4.9 representa o modelo

esquemático do plasmídeo de expressão pPICZαC_*DiaciCATHB* juntamente com a sequência da ORF de *DiaciCATHB*.

Figura 4.9. Esquema representativo do plasmídeo de expressão pPICZαC_*DiaciCATHB* e sequência da ORF da catepsina B. 5' AOX – extremidade 5' do gene AOX, região de recombinação; Fator α – fator de secreção; c-myc – para detecção da proteína de fusão por anticorpo anti-myc; 6xHis - cauda de 6 histidinas; 3' AOX – extremidade 3' do gene AOX. Na sequência do gene de *DiaciCATHB* os nucleotídeos em vermelho com uma bolinha preta, indicando o start e stop códon, as caixas em verde indicando as regiões de anelamento dos primers; as setas laranjas com nucleotídeos em negrito e sublinhado, a possível região do pró-peptídeo, os nucleotídeos grifados em vermelho indicando a sequência do epítopo c-myc e os 7 asteriscos, as seis histidinas presentes no plasmídeo de expressão.

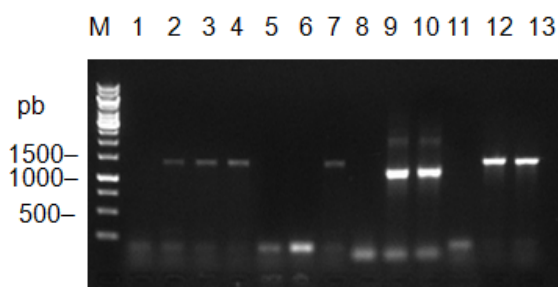


Fonte: (Elaborada pela autora).

4.3. Transformação do plasmídeo pPICZ α C_*DiaciCATHB* em células de *Pichia pastoris*

Após a linearização do plasmídeo, esse foi utilizado para transformar células de *Pichia pastoris*, linhagem KM71H. Após a transformação, foi realizada uma busca pela colônia recombinante em *Pichia pastoris* e a confirmação da integração correta do inserto de interesse no genoma da levedura por PCR das colônias. Para tanto, os treze clones foram selecionados em meio de cultivo seletivo e seis apresentaram produto de amplificação no tamanho esperado para o fragmento de interesse, sendo de 1500 pb (figura 4.10).

Figura 4.10. PCR das colônias de KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZ α C_*DiaciCATHB*. M: marcador de massa molecular 1 Kb (Invitrogen). 1, 5, 6, 9, 10 e 11: Controles negativos. 2, 3, 4, 7, 12 e 13: clones positivos.

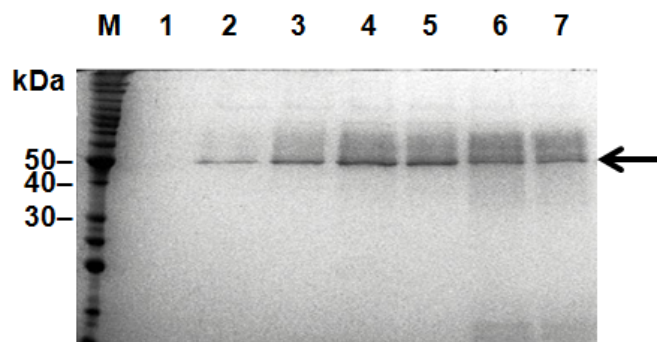


Fonte: (Elaborada pela autora).

4.4. Expressão da proteína *DiaciCATHB* recombinante em células de *Pichia pastoris*

De acordo com os resultados obtidos no PCR das colônias, uma parte considerável dos clones apresentava o gene de interesse, sendo que os 13 clones foram escolhidos para análise de expressão da proteína recombinante em pequena escala. O teste para análise de expressão foi realizado por um período de 144 h. Entre os clones testados, somente um apresentou expressão da proteína recombinante, o qual foi escolhido para análise de todos os tempos de indução da expressão (Figura 4.11).

Figura 4.11. Expressão do plasmídeo de expressão pPICZ α C_*DiaciCATHB* recombinante em *P. Pastoris* KM71H. SDS-page 15% corado com Comassie blue, mostrando a indução de pPICZ α C_*DiaciCATHB* suplementada com metanol 0,75%. M: marcador de massa molecular (Invitrogen). 1- sobrenadante 0 hora de indução; 2- sobrenadante 24 horas de indução; 3- sobrenadante 48 horas de indução; 4-sobrenadante 72 horas de indução; 5-sobrenadante 96 horas de indução; 6-sobrenadante 120 horas de indução; 7-sobrenadante 144 horas de indução.



Fonte: (Elaborada pela autora).

Analisando os resultados dos ensaios da expressão da proteína recombinante em células de *P. pastoris* após 24 horas de indução já foi possível verificar uma banda de expressão, sendo que com o aumento do tempo de indução, um rastro abaixo da banda é verificado, sugerindo que com o aumento do tempo de indução, a enzima começa a ser degradada. O tamanho esperado para a proteína recombinante era de aproximadamente 46 kDa, pois a massa molecular da enzima predita é de 41,9 kDa, porém, com a exclusão do peptídeo sinal da sequência e adição do fator de secreção, epítipo c-myc e cauda de histidina C-terminal a massa estimada é 45,3 kDa, totalizando um aumento de 3,4 kDa. No entanto, observou-se a presença de uma banda na altura de aproximadamente 50 kDa, o que também era esperado, devido aos sítios de N-glicosilações preditos na sequência e a capacidade do sistema de expressão *P. pastoris* promover processamento e modificações pós-traducionais de proteínas. De acordo com Heimo et al., (1997), uma glicoamilase de *Aspergillus awamori* expressa em *P. pastoris* apresentou um aumento em sua massa molecular de 30 kDa, 10 kDa como resultado de N-glicosilação e 20 kDa resultante de O-glicosilação.

Baseado nos tempos de indução utilizados para a expressão da proteína recombinante, o tempo de indução de 72 horas foi escolhido para a realização dos

ensaios de expressão da proteína em larga escala. Após 72 h de indução da cultura celular do clone de *P. pastoris* contendo o gene *DiaciCATHB*, foi coletada e centrifugada para a obtenção da proteína recombinante secretada no meio de cultura.

4.5. Purificação da proteína *DiaciCATHB* recombinante

O sobrenadante proveniente dos ensaios de expressão foi coletado e utilizado para a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em coluna contendo resina de níquel. Em SDS-PAGE 12%, foi possível constatar a proteína em diferentes frações da cromatografia, entre elas as frações do eluato, tampão de lavagem e no primeiro gradiente com 10 mM de imidazol. O rendimento da purificação foi baixo. Podemos observar que houve provavelmente uma baixa interação da proteína com a resina de níquel, o que indicava uma provável perda da cauda de histidinas na região C-terminal devido ao processamento sofrido pela proteína recombinante.

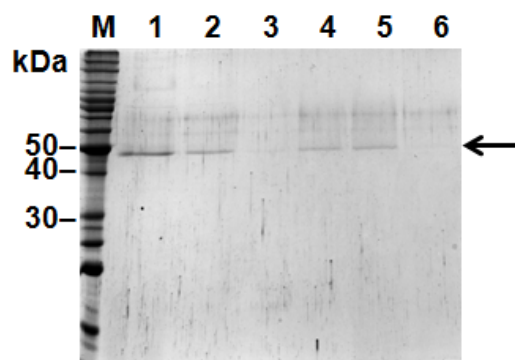
Para evitar o processamento de *DiaciCATHB*, analisando as amostras em SDS-PAGE 12%, dos diferentes tempos de indução da proteína recombinante, era possível detectar que no tempo de 48 h um rastro pequeno de degradação era iniciado, e que este era ausente no tempo de 24 h de indução, mas que por outro lado já havia a expressão da proteína recombinante. Segundo dados da literatura a instabilidade é uma característica comum de cisteíno peptidases do tipo catepsina B.

Em análise de SDS-PAGE 12%, após 24 h de indução foi possível verificar a expressão da proteína recombinante e também sua purificação por cromatografia de afinidade à 4°C. Foi verificado a presença da banda correspondente a proteína *DiaciCATHB* purificada nas frações de 10 e 25 mM de imidazol (Figura 4.12). Podendo-se comprovar que a purificação realizada a uma temperatura mais baixa foi mais efetiva devido a um melhor rendimento e estabilidade da proteína recombinante. A purificação por cromatografia de afinidade foi realizada de forma eficiente, permitindo a eluição de uma banda íntegra e única.

O rendimento da proteína *DiaciCATHB* purificada foi de 2 mg por litro de cultura. Quando comparado a outros sistemas de expressão, o rendimento de proteínas expressas em *P. pastoris* é maior, no entanto, esse rendimento foi suficiente para a realização dos estudos de caracterização cinética da enzima.

Alguns estudos relatam um rendimento de proteínas produzidas em *Pichia pastoris* com cerca de 60 mg por litro de cultura, enquanto outros relatam 12 mg por litro (AOKI et al., 2003; PHILIP et al., 2007). O rendimento de *DiaciCATHB* foi baixo, quando comparado a outras proteínas recombinantes expressas no mesmo sistema de expressão e devido a quantidade de proteína necessária para a realização dos experimentos posteriores. Porém, foi possível a realização de todos os experimentos, devido a produção suficiente de *DiaciCATHB* resultante de várias induções.

Figura 4.12. Purificação de *DiaciCATHB* expressa em *P. pastoris*. SDS-PAGE 12% corado com comassie blue. M: Marcador de massa molecular (Invitrogen). 1: Eluato. 2: Tampão de lavagem sem imidazol. 3: Proteína eluída em 10 mM de imidazol. 4: Proteína eluída em 10 mM de imidazol. 5: Proteína eluída em 25 mM de imidazol. 6: Proteína eluída em 25 mM de imidazol.



Fonte: (Elaborada pela autora).

A proteína recombinante *DiaciCATHB* purificada, foi dialisada em tampão de lise pH 8,0, tampão acetato de sódio 100 mM pH 6,0 e tampão acetato de sódio 100mM pH 4,5, todas as diálises realizadas overnight. A proteína recombinante apresentou sinais de degradação na diálise em pH 4,5. Nos outros dois valores de pHs, 6,0 e 8,0, a proteína manteve sua integridade.

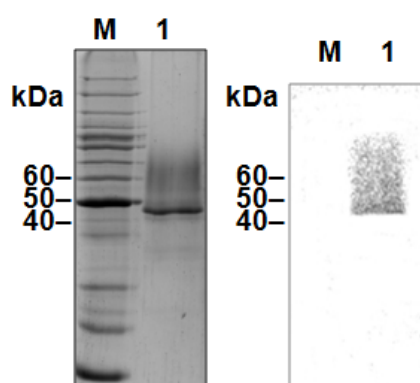
Também, foi constatado que a fração da enzima purificada e dialisada em tampão de lise pH 8,0 apresentava uma integridade melhor, quando comparada a diálise em pH 6,0 tampão acetato de sódio 100 mM, sugerindo que a diálise da proteína em pH mais alto seja um fator importante para sua integridade mantida posteriormente. Sendo que a diálise em pH 8,0 em tampão de lise foi mantida para

os ensaios, e um tempo menor de diálise, de 2 horas. Todas as modificações foram realizadas priorizando a integridade da proteína e excluindo oportunidade para que a mesma sofresse processamento.

4.6. Imunodetecção de *DiaciCATHB*

Para confirmação de que a proteína tratava-se realmente de *DiaciCATHB* procedeu-se com o ensaio de imunodetecção utilizando o anticorpo anti-*DiaciCATHB* produzido em camundongos a partir da proteína recombinante purificada produzida em *P. pastoris*. Através das análises de imunodetecção foi observado que o anticorpo policlonal contra a proteína recombinante *DiaciCATHB* foi capaz de reconhecer a proteína recombinante produzida em *P. pastoris* purificada na titulação de 1:3000 demonstrando assim sua especificidade (Figura 4.13).

Figura 4.13. Ensaio de imunodetecção de *DiaciCATHB*. A: SDS-PAGE 12 % corado com comassie blue, mostrando a proteína recombinante purificada. M: Marcador de massa molecular (Invitrogen). 1: *DiaciCATHB* purificada e concentrada. B: Ensaio de imunodetecção quimiluminescente realizado com a mesma amostra da figura A.



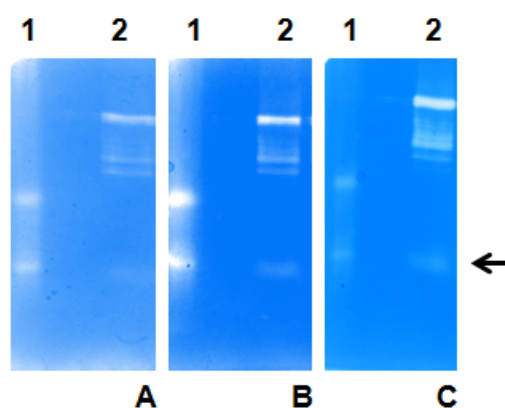
Fonte: (Elaborada pela autora).

4.7. Detecção da atividade do sobrenadante de *P. pastoris* expressando a cisteína protease recombinante em gel de gelatina

Através de eletroforese em SDS-PAGE contendo 0,04% de gelatina realizada a 4°C, e tratamento com tampões de renaturação, ativação e coloração por comassie blue R-250, foi realizado um teste preliminar para detectar a atividade da

cisteíno peptidase. Foi verificada também a presença de bandas não marcadas correspondendo as amostras da papaína (controle) e do sobrenadante de *P. pastoris* expressando a cisteíno peptidase recombinante. As regiões mais claras do SDS-PAGE evidenciam que houve a hidrólise do substrato gelatina, nos três valores de pHs testados, sendo que no pH 6,4 a hidrólise do substrato foi mais evidente, permitindo dizer que a proteína estava ativa no sobrenadante de cultura celular após a indução da expressão da proteína (Figura 4.14).

Figura 4.14. Zimografia reversa. 1: 50 ng Papaína (Controle positivo); 2: Sobrenadante *P. pastoris* expressando *pPICZαC_DiaciCATHB*. A: pH 5.4; B: pH 6.4; C: pH 7.3.



Fonte: (Elaborada pela autora).

4.8. Ativação da proteína recombinante *DiaciCATHB* purificada

Testes iniciais de atividade realizados com a proteína recombinante demonstraram que esta encontrava-se em sua forma inativa. Desta maneira, estratégias foram adotadas para remoção da provável pró-região da enzima e consequente ativação da mesma.

O pH da solução contendo a enzima foi mantido 8,0 durante a diálise para que a proteína recombinante estivesse em sua forma de zimogênio e não sofresse processamento. Sendo que uma vez ativada a clivagem autocatalítica ocorre e a proteína madura pode processar outras moléculas precursoras, ocorrendo uma reação em cadeia que permite a remoção da proregião da proteína não madura (VERNET et al., 1991).

Assim, a proteína *DiaciCATHB* foi ativada durante uma hora à 37°C e em seguida adicionada a uma reação em cubeta de quartzo em espectrofluorímetro, contendo tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e 2,5 mM de DTT (agente redutor) à uma temperatura de 30°C. Uma incubação de 3 minutos da reação, e em seguida foi adicionado o substrato Z-F-R-MCA.

A temperatura de 30°C foi utilizada baseando-se em observações realizadas na criação dos insetos em sala climatizada e estufa no fundo de defesa da citricultura (Fundecitrus- Araraquara/SP), foi observado que a criação dos insetos varia de 28 – 32°C.

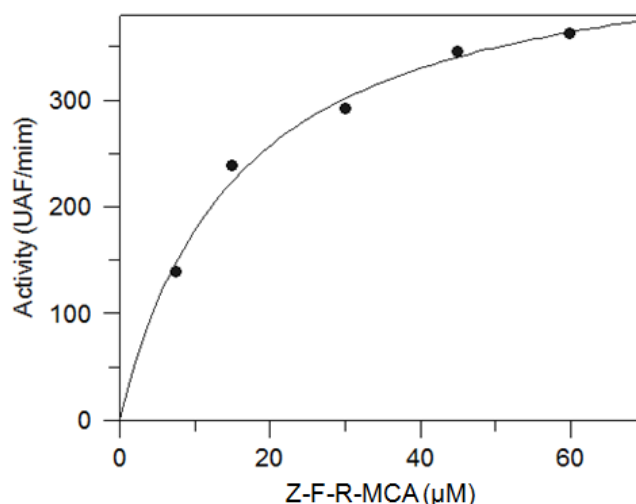
Foi observado que diálises realizadas em valores de pHs mais baixos, seguidos de incubação à 37°C, não são capazes de promover a ativação da enzima. Tempos diferentes de ativação à 37°C, como 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min, 1h e 15 minutos, 1 h e 30 minutos foram testados, sendo que uma hora mostrou-se o melhor tempo para a ativação dessa enzima. Diferentes valores de pH foram testados, como 4,5, 5,5 e 6,5, sendo também o pH 5,0 estabelecido como o melhor para a atividade da enzima. Em condições ácidas, seguidas de incubação em tempo e temperatura adequados, a enzima *DiaciCATHB* é ativada, mostrando-se capaz de hidrolisar o substrato Z-F-R-MCA.

4.9. Atividade da cisteíno peptidase recombinante e cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m)

A atividade enzimática da cisteíno peptidase recombinante foi avaliada utilizando diferentes concentrações do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA. Sendo o valor de (K_m) de 15,7 μ M. Além de avaliar a capacidade de hidrólise da enzima *DiaciCATHB* para resíduos de fenilalamina na posição de P2, testes preliminares avaliaram sua capacidade de hidrolisar resíduos de arginina na mesma posição. Os resultados obtidos coincidem com o que já é bem descrito na literatura em relação à preferência de cisteíno peptidases da família papaína por resíduos hidrofóbicos nesta posição. De acordo com Turk et al., (1998), cisteíno peptidases exibem uma preferência comum por um resíduo hidrofóbico na posição P2 do substrato, sendo o subsítio S2 da cisteíno peptidase essencial para tal especificidade. Baseado nos valores para o cálculo do K_m é possível reproduzir uma

curva de hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-MCA pela enzima *DiaciCATHB* (Figura 4.15).

Figura 4.15. Curva de hidrólise do substrato Z-F-R-MCA. Substrato adicionado em concentrações crescentes, variando de 7.5 a 60 μM , para a determinação do parâmetro cinético K_m de *DiaciCATHB*. O cálculo da constante (K_m) foi realizado por regressão não linear.



Fonte: (Programa GraFit versão 5.0.11).

4.10. Ensaio de inibição da atividade enzimática de *DiaciCATHB* por uma cistatina recombinante (CaneCPI-4)

Para caracterizar a proteína *DiaciCATHB* como uma cisteíno peptidase, a atividade inibitória foi avaliada utilizando o inibidor de cisteíno peptidase CaneCPI-4, uma cistatina recombinante de cana-de-açúcar descrita por Gianotti et al. (2006). A importância em se encontrar um inibidor seletivo e que possa inativar a atividade de uma cisteíno peptidase de *Diaphorina citri* de forma eficiente seria uma alternativa futura de controle dessa praga através da produção de plantas de citros superexpressando essa cistatina, tornando-se resistentes a *D. citri*. O ensaio de inibição de atividade da cisteíno peptidase recombinante *DiaciCATHB* pelo inibidor CaneCPI-4 mostrou-se bastante eficiente. Apresentando um valor de K_i para o inibidor CaneCPI-4 de 0,05 nM, o que mostra que houve uma boa especificidade entre a Catepsina B de *Diaphorina citri* e a CaneCPI-4 (Figura 4.16).

Estudos de Michelin-Duarte (2008) corroboram com os resultados de inibição obtidos nesse trabalho, em que a eficiência de inibição de atividade de uma catepsina B de cana-de-açúcar por CaneCPI-4 foi de 0,010 nM. Um valor muito próximo e coerente com o que foi encontrado para a inibição da catepsina B de *D. citri*.

Gianotti et al., (2008), analisando a invasão de células tumorais de mama (MDA-MB-231) observaram em matriz matrigel, que células superexpressando a cistatina (CaneCPI-4), diminuem em até 20% a invasão tumoral e que a atividade e expressão da catepsina B é associada a capacidade invasiva de células de câncer de mama. Também, avaliaram o potencial inibitório da CaneCPI-4 na atividade da catepsinas B, obtendo-se o valor de K_i de 0,83 nM.

As cistatinas são inibidores que agem através da ligação competitiva ao sítio ativo das cisteíno proteases. A catepsina B, entretanto, apresenta uma sequência adicional, se comparada a outras catepsinas. Essa região adicional, denominada loop de oclusão “occluding loop”, bloqueia a fenda do sítio ativo da enzima (MUSIL et al., 1991). O loop de oclusão torna inacessível o acesso das cistatinas ao sítio ativo da enzima, refletindo em valores de K_i altos para a maioria das cistatinas contra a catepsina B, quando comparados aos valores de K_i de outras cisteíno peptidases que não possuem esse loop (BARRET et al., 1996; ABRAHAMSON, 1994; OHTSUBO et al., 2005; MARTINEZ et al., 2005). Alguns autores sugerem que a eficiência de inibição exercida por cistatinas contra a catepsina B está relacionada a região N-terminal. Foi observado uma diminuição na afinidade da cistatina C e cistatina de ovo de galinha com a catepsina B, devido a remoção da região N-terminal localizada antes do resíduo de glicina conservado (ABRAHAMSON et al., 1991; BJÖRK et al., 1994).

Porém, apenas a região N-terminal não é suficiente para inibição da catepsina B. De acordo com Hall et al., (1998), uma cistatina D, com a região N-terminal substituída por um segmento da cistatina C, continuou a apresentar baixa afinidade e consequente inabilidade para inibição de atividade da catepsina B. Apesar de apresentar a região N-terminal da cistatina C, mais efetiva para a ancoragem inicial, provavelmente a cistatina D tenha falhado em deslocar o loop de oclusão e se ligar a protease por intermédio de seus dois loops. Resultados similares relatados por Gianotti (2008), demonstraram que a cistatina CaneCPI-4 com a região N-terminal

deletada, (mutante CaneCPI-4 delN) apresentou uma perda de atividade inibitória contra a catepsina B. Outra variante, em que o inibidor CaneCPI-4 teve um resíduo de aminoácido serina, substituído pelo aminoácido alanina dentro do motivo conservado Q-X-V-X-G, mostrou uma redução de atividade na inibição de 30%. Esse resultado indica que provavelmente o resíduo de aminoácido serina presente no loop da região C-terminal seja importante para o segundo passo de inibição.

A inibição das cisteíno peptidases da família da papaína, se dá por meio da interação entre três regiões conservadas das cistatinas e a cisteíno peptidase alvo. Na região N-terminal, está localizado um resíduo de glicina altamente conservado, que interage com o subsítio S2 da enzima em uma conformação que impede que a cistatina seja clivada pelo sítio ativo da enzima. O motivo Q-X-V-X-G, altamente conservado entre as cistatinas localizado no loop 1 e a região contendo um resíduo de triptofano localizado no loop 2, apresentam tamanhos e formas que se encaixam nos subsítios S1' e S2' do sítio ativo da enzima (TURK; BODE 1991; BENCHABANE et al., 2010).

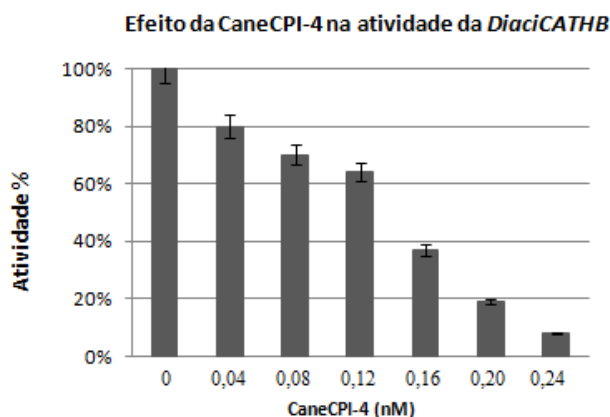
Como descrito por Gianotti et al., (2008), algumas diferenças estruturais na cistatina de cana de açúcar, CaneCPI-4, a tornam diferente de outras cistatinas e talvez essas diferenças sejam a chave para o perfil inibitório contra a catepsina B. Dentre essas diferenças, CaneCPI-4, incluída no grupo III das cistatinas, não apresenta a sequência consenso N-terminal exclusiva das fitocistatinas, o motivo L-A-R-[FY]-A-[VI]-x(3)-N. Também, na superfamília cistatina o motivo conservado é representado pelos resíduos de aminoácidos Q-V-V-A-G, enquanto em CaneCPI-4 é Q-V-V-S-G, assim como em outras cistatinas do grupo III (REIS; MARGIS, 2001).

Valadares et al., (2010) realizaram estudos de modelagem por homologia para determinar as determinantes moleculares das fitocistatinas responsáveis para a inibição da atividade da catepsina B por cistatinas. Uma das cistatinas testadas foi a Cane CPI-4. Em testes de inibição de atividade utilizando o inibidor, este foi capaz de inibir a atividade da catepsina B humana, apresentando um K_i de 0,5 nM. Ao analisarem a cistatina CaneCPI-4 foram verificadas variações para alguns dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos entre a hélice e folha β , incluindo um resíduo de glutamina na posição 30 e glicinas nas posições 47 e 56, responsáveis por uma diminuição nas interações presentes no núcleo hidrofóbico. Alguns resíduos de

aminoácidos presentes do motivo conservado LARFAV, fornecem a complementaridade ideal para os resíduos hidrofóbicos da folha β , necessário para a estabilidade da CaneCPI-4. Alterações estas, que contribuem para a flexibilidade na estrutura da CaneCPI-4 e conseqüentemente atividade inibitória contra catepsina B humana.

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição com CaneCPI-4 demonstram claramente uma seletividade entre esse inibidor e a enzima *DiaciCATHB*. Os dados obtidos corroboram para a caracterização da enzima *DiaciCATHB* como uma cisteíno peptidase do tipo catepsina B.

Figura 4.16. Gráfico de inibição da *DiaciCATHB* utilizando o inibidor de cisteíno peptidase CaneCPI-4. O gráfico representa a curva de inibição obtida pelo cálculo da atividade residual da *DiaciCATHB* à medida que o inibidor foi adicionado.



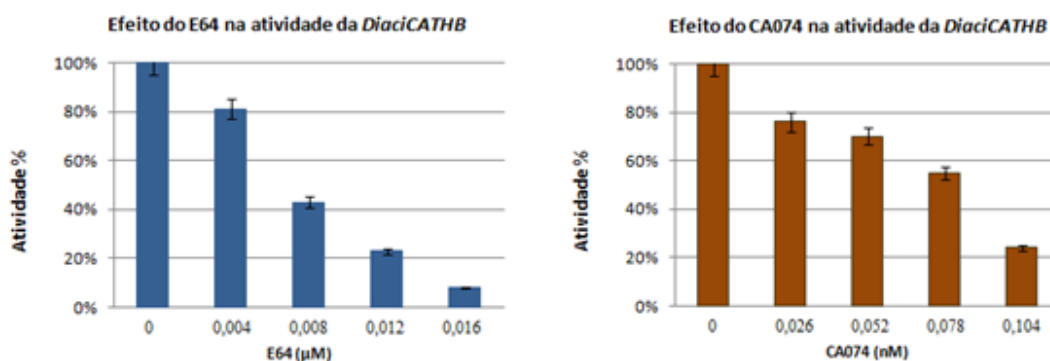
Fonte: (Elaborada pela autora).

Ensaio preliminares de inibição de atividade utilizando os inibidores CA074 e E64 foram realizados e demonstram uma forte interação da enzima com o inibidor CA074 (um inibidor sintético específico para enzimas do tipo catepsina B), sendo mais um indicativo de que essa enzima se comporta como uma catepsina B (Figura 4.17). O inibidor CA074 foi projetado a partir de estudos desenvolvidos com o inibidor E64, para que este fosse específico para catepsinas B. Tal especificidade é possível devido aos resíduos de isoleucina e prolina do motivo dipeptidil presente em sua sequência, além de uma dupla ponte de hidrogênio entre o grupo carboxil da porção terminal e os grupos imidazólicos da catepsina B humana. A especificidade

do inibidor CA074 é evidente, ao analisar os valores de inibição obtidos para catepsina B igual a 2,24 nM, enquanto que 172,00 nM para a catepsina L (MURATA et al., 1991).

O inibidor de cisteíno peptidases E64 demonstrou capacidade de inibição contra *DiaciCATHB*, porém não com a mesma especificidade, o que já era esperado, visto que esse não é um inibidor específico para enzimas do tipo catepsina B. Em estudos de Michelan-Duarte (2008), o inibidor CA074 inibiu fortemente a atividade de uma catepsina B de cana-de-açúcar, com um K_i de 0,13 nM. E, ao utilizar o inibidor E64, verificaram uma interação muito menor, sendo que CA074 foi capaz de apresentar um K_i 36 vezes menor, comprovando uma maior especificidade pela catepsina B. Esses resultados corroboram com o que foi verificado nos testes preliminares, onde a interação de *DiaciCATHB* foi muito maior pelo inibidor CA074.

Figura 4.17. Testes preliminares de inibição da *DiaciCATHB* utilizando os inibidores E64 e CA074. Apesar de preliminares, os dados demonstram uma grande especificidade da enzima pelos inibidores, classificando *DiaciCATHB* como uma cisteíno peptidase do tipo catepsina B.



Fonte: (Elaborada pela autora).

4.11. Sequenciamento da cisteíno peptidase recombinante *DiaciCATHB* expressa em *P. pastoris* por espectrometria de massa

Para confirmação da sequência de aminoácidos presentes na proteína *DiaciCATHB*, a proteína purificada foi submetida ao sequenciamento por espectrometria de massas. Os dados da espectrometria de massas obtidos pelo CID-MS/MS forneceram as sequências de aminoácidos de dois peptídeos QNCYNPSYESTYR e SGVYQHNFGDSIGLHAVR (Figura 4.18). Os dois peptídeos

estão presentes na sequência de aminoácidos da proteína predita obtida no banco de dados do projeto do transcriptoma de *D. citri* (USDA), assim como na sequência predita pelo sequenciamento do plasmídeo pPICZαC_*DiaciCATHB*. Os resultados obtidos com a espectrometria de massa confirmam a identidade da proteína purificada como sendo uma cisteíno peptidase do tipo catepsina B.

Figura 4.18. Peptídeos obtidos por espectrometria de massa da proteína recombinante purificada. Sequência de *DiaciCATHB* evidenciando os resíduos de aminoácidos dos dois peptídeos representados na cor preta, QNCYNPSYESTYR e SGVYQHNFGDSIGLHAVR.

```

MWAVGVVLVIATQSLAIYVPQRDGLSVSLADIVDQVNNNVSTWQARHNFHPDTPVSYLSSLAGTRPLDESDE
DHLEFIEQIKQNRAEYEANSKQDRVEANSSDDLETMGCCNAKGLPRNFDAREKWPECPSLRHIADQSNCG
SCWAVSVANAISDRLCIASNGYFTGQISAQHIVACTPNCWGCNGGWPQLAWRFGHNGVVTGGDYNSEQGC
QPYTLAPCEHHVQGQLNCTLLGKLTPECKQNCYNPSYESTYRFDLKKGKKAHMVPRCNAMRQIYEHGPLV
AIFSVYADFLQYKSGVYQHNFGDSIGLHAVRVRLGWGVENDIPYWLANSWNDHWGDHGTFKILRGNEADVE
MGFNVGYQPQLQV

```

Fonte: (Elaborada pela autora).

4.12. Análise de expressão gênica de *DiaciCATHB* em diferentes fases de desenvolvimento do inseto

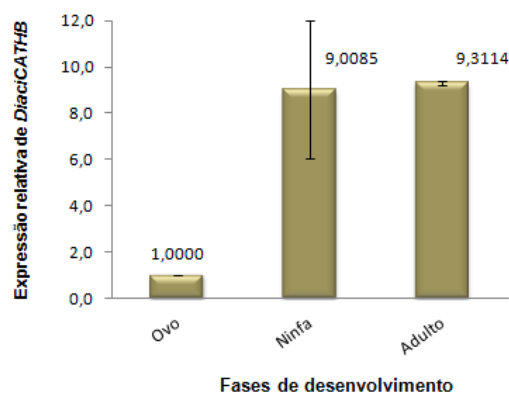
Para a análise da expressão do cDNA que codifica a *DiaciCATHB* foram analisadas as fases de ovo, ninfa (5° instar) e adulto de *D. citri* por técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os valores de expressão obtidos foram expressos em nível do RNAm para o gene da *DiaciCATHB*, e a normalização realizada como os valores de expressão obtidos para o gene actina de *D. citri*, utilizado como controle endógeno. O gene da actina de *D. citri* foi escolhido como controle endógeno baseado em um estudo realizado por Tiwari et al., (2011), onde foi realizada a análise de expressão gênica de genes presentes no citocromo P450 (CYP4), de *D. citri* infectados e não-infectados, e nesse estudo 4 genes foram utilizados como controle endógeno, sendo que o gene actina foi mais estável quando comparado com outros genes testados.

Analisando as diferenças nos níveis de expressão, foi possível verificar a expressão de *DiaciCATHB* na fase de desenvolvimento de ovo, levantando a

hipótese de que talvez a proteína esteja relacionada com os processos de desenvolvimento embrionário no inseto. De acordo com Terra e Ferreira (1994), cisteíno peptidases em insetos podem estar envolvidas na degradação vitelínica embrionária (CHO et al., 1999). Em outro estudo Takahashi et al (1993) relatam que cisteíno peptidases podem ter um papel importante no processo de metamorfose dos insetos, e podem estar envolvidas na decomposição do corpo gorduroso em larvas. Tendo atuação também no processo de ecdise (LIU et al, 2006).

Nas fases de desenvolvimento de ninfa de 5° ínstar e adulto foi verificada uma expressão bem maior de *DiaciCATHB*, quando comparada a fase de ovo (Figura 4.19). Esse resultado é muito interessante, pois as fases em que a expressão de *DiaciCATHB* é maior, são as fases que o inseto se alimenta e adquire a bactéria *Candidatus liberibacter* e também as fases em que transmite o agente causal da doença HLB. Na fase de ninfa a aquisição e transmissão da bactéria ocorre de forma mais eficiente do que na fase de adulto. Adultos de *D. citri* que adquirem a bactéria quando adultos, são vetores ineficientes do agente causal comparados com adultos que adquirirem a bactéria na fase ninfal (PELZ-STELINSKI et al., 2010). A aquisição de *Candidatus Liberibacter* por ninfas de 4° e 5° instar, apresenta um crescimento da população bacteriana com o passar do tempo, no entanto, o mesmo não é observado para insetos que adquirem a bactéria quando adultos. A aquisição no período ninfal torna o adulto mais infectivo e uma medida de controle que possa agir diretamente nessa fase de desenvolvimento de *D. citri* pode tornar-se uma ferramenta útil para o controle da doença HLB.

Figura 4.19. Análise de expressão por qPCR do cDNA que codifica a proteína *DiaciCATHB* nas fases de desenvolvimento de ovo, ninfa e adulto de *D. citri*. Os valores de expressão são relativos ao gene da actina (controle endógeno). As barras de erros foram calculadas de acordo com Livak e Schmittgen, (2001).



Fonte: (Elaborada pela autora).

Para elucidar o papel da enzima *DiaciCATHB*, estudos de localização poderiam contribuir para inferir a função desempenhada pela enzima *DiaciCATHB*, classificando-a como digestiva ou lisossomal. Portanto, estudos específicos como dissecação do inseto para análise de PCR quantitativo de tecidos isolados e imunocitoquímica utilizando anticorpos específicos, necessitam ser realizados.

Digestiva ou lisossomal, a enzima *DiaciCATH* poderá ser utilizada futuramente como alvo na estratégia de controle do inseto utilizando plantas transgênicas que superexpressem o inibidor contra essa enzima ou por silenciamento gênico através da técnica de RNAi (FIRE et al., 1998).

A técnica da interferência por RNA consiste na introdução de dsRNA (double-stranded RNA- RNA de fita dupla) em células eucarióticas, diminuindo especificamente a atividade de genes que contém seqüências homólogas através do reconhecimento e degradação dos mRNAs. O silenciamento pode ser alcançado pela simples injeção do dsRNA específico na cavidade corpórea do indivíduo, ou pela alimentação, através da ingestão de bactérias competentes expressando a seqüência do dsRNA como em muitos helmintos (HANNON, 2002). Em insetos, existem muitos exemplos da utilização do RNA de interferência, alguns bem-sucedidos e outros nem tanto. Sendo que esse sucesso está relacionado a escolha dos genes para o silenciamento e até com o método de disparar esse RNA de

interferência no organismo. O RNAi poderá ser uma ferramenta útil para identificar funções gênicas e elucidar mecanismos biológicos do inseto em estudo.

Os dados da análise da expressão gênica de *DiaciCATHB* em diferentes fases de desenvolvimento do inseto demonstraram baixa expressão na fase de ovo e alta expressão nas fases de ninfa e adulto. Podemos observar que os resultados obtidos nesse trabalho tanto de caracterização da enzima quanto de análise da expressão gênica demonstram que a enzima *DiaciCATHB*, independente da sua função lisossomal ou digestiva, poderá ser validada futuramente como um possível alvo para o controle do inseto.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão recombinante da proteína *DiaciCATHB* foi realizada com sucesso em células de *Pichia pastoris*.

A purificação da proteína *DiaciCATHB* por cromatografia de afinidade, assim como seu rendimento 2 mg/L de cultura foram satisfatórios, uma vez que permitiram as realizações dos estudos de cinética enzimática.

O sequenciamento da proteína *DiaciCATHB* por espectrometria de massa foi bem sucedido, sendo possível a identificação de pelo menos dois peptídeos presentes na sequência de *DiaciCATHB* obtida no banco de dados do Transcriptoma de *D. citri*, também na sequência parcial depositada no banco de dados NCBI. O que comprova que a enzima em estudo é realmente uma cisteíno peptidase do tipo catepsina B de *D. citri*.

A ativação da proteína purificada permitiu a remoção do pró-peptídeo N-terminal de *DiaciCATHB* ocorreu em condições ácidas, incubação em tempo (uma hora) e temperatura (37°C) adequados.

A proteína recombinante mostrou-se ativa e capaz de hidrolisar o substrato fluorogênico Z-F-R-MCA à 30°C.

A partir de testes preliminares de atividade enzimática, para a atividade da enzima o intervalo de pH favorável encontrado foi de 5,0 – 6,5.

Os ensaios de cinética enzimática permitiram caracterizar a enzima recombinante como uma cisteíno peptidase, devido a sua intrínseca preferência por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na posição P2 do substrato Z-F-R-MCA.

Os ensaios de inibição de atividade enzimática realizados com o inibidor de cisteíno peptidase recombinante de cana-de-açúcar CaneCPI-4 demonstram que o mesmo foi capaz de inibir com eficiência a atividade de *DiaciCATHB*. Assim, como

os testes preliminares de inibição demonstraram uma forte interação da enzima recombinante com os inibidores E64 e CA074.

A partir dos resultados obtidos na análise de expressão gênica, pode-se afirmar que *DiaciCATHB* apresenta uma diferença significativa nos níveis de expressão das diferentes fases desenvolvimento do inseto.

Estudos que envolvam a dissecação e imunocitoquímica do inseto deverão ser realizados para definição da cisteíno peptidase como uma enzima digestiva ou lisossomal.

Quando comprovada a localização e função de *DiaciCATHB*, a mesma apresenta potencial para ser utilizada futuramente como alvo para estudos de inibição na transformação genética de plantas, disponibilizando culturas de citros comercialmente importantes resistentes a praga *D. citri*, ou como alvo de silenciamento gênico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K. et al. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **The Journal Biological Chemistry**, v. 262, n. 35, p. 16793-16797, 1987.

ABDULLAH, T. L. et al. Control of *Huanglongbing* (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 17, p. 4007-4015, 2009.

ABRAHAMSON, M. Cystatins – protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. **Journal of the Brazilian Association of the Advancement of Science**, v. 45, n. 5, p. 299-304, 1993.

ABRAHAMSON, M. Cystatins. **Methods Enzymology**, v. 244, p. 685-700, 1994.

ABRAHAMSON, M. et al. Human cystatin C, role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and in its inactivation by leucocyte elastase. **Biochemical Journal**, v. 273, p. 621-626, 1991.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.

ALEMÁN, J.; BAÑOS, H.; RAVELO, J. *Diaphorina citri* y la enfermedad *huanglongbing*: una combinación destructiva para la producción citrícola. **Revista de Protección Vegetal**, v. 22, p. 154-165, 2007.

AOKI, H; NAZMUL AHSAN, M.; WATABE, S. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp. **Protein Expression and Purification**, v. 31, n. 2, p. 213-221, 2003.

ARAI, S. et al. 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.

ARAUJO, E. F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D. et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. Cap. 6, p. 127-143.

AUBERT, B. *Triozae rytrae* and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Montpellier, n. 42, p. 149-62, 1987.

AVERY, P. B. et al. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. **Florida Entomologist**, v.92, p.608 - 618, 2009.

BARRETT, A. J. The cystatins, a new class of protease inhibitors. **Trends in biochemical sciences**, v. 12, p. 193-196, 1987.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 1-15, 1994.

BARRETT, A. J. et al. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. **Biochemical Journal**, v. 236, p. 312, 1986a.

BARRETT, A. J. et al. 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, 189-198, 1982.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. 2. ed. London: Elsevier Academic Press, 2004.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1984. v. 2.

BASSANEZI, R. B. et al. Damages caused by *huanglongbing* on sweet orange yield and quality in São Paulo. In: PROCEEDINGS OF THE HUANGLONGBING-GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Resumos...** Araraquara: FUNDECITRUS, 2006. p. 39.

BELASQUE, J. et al. Scientific basis for the eradication of symptomatic and asymptomatic plants in *Huanglongbing* (HLB, Greening) aimed at effective disease control. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BELASQUE, J. et al. Probable consequences of the mitigation of citrus canker eradication methodology in Sao Paulo state. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 314-317, 2010.

BENCHABANE, M. et al. Plant cystatins. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1657-1666, 2010.

BENDTSEN, J. D. et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, p. 783 – 795, 2004.

BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes: A practical approach**. England: Oxford University Press, 1989.

BJÖRK, I. et al. Differential changes in the association and dissociation rate constants for binding of cystatins to target proteinases occurring on the N-terminal truncation of the inhibitors indicate that the interaction mechanism varies with different enzymes. **Biochemical Journal**, v. 299, p. 219-225, 1994.

BODE, W. et al. 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, n.8, p. 2593-2599, 1988.

BOINA, D. R. et al. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Pest Management Science**, v.65, p.870-877, 2009.

BOND, J.S.; BUTLER, P.E. Intracellular proteases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 333-364, 1987.

BOTEON, M.; NEVES, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JÚNIOR, D. et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. Cap. 2, p. 19-36.

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.

BOVÉ, J. M. et al. Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South Africa greening, India citrus decline, and Philippines leaf mottling diseases. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 6., 1974. Berkeley. **Proceedings...** Berkeley: IOCV, 1974. p.12-15.

BOVÉ, J. M. *Huanglongbing*: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Milan, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRÖMME D.; NALLASETH F.S.; TURK, B. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. **Methods**, v.32, p. 199-206, 2004.

CATLING, H. D. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. **FAO Plant Protection Bulletin**, v.18, p. 8-15, 1970.

CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA. Nova doença já causa prejuízos a pomares de São Paulo e Minas Gerais. **Informativo Centro de Citricultura**, n.76, p.1-4, 2001.

CHAGAS, M. C. M. et al. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 1, p. 55-59, 2001.

CHANG, W. S. H. et al. Lysosomal Cysteine Proteinase Cathepsin S as a Potencial Target for Anti Cancer Therapy. **Journal of Cancer Molecules**, v. 3, n. 1, p. 5-14, 2007.

CHO, W. L. et al. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, p. 13311–13321, 1999.

CHOMCZYN~SKI P.; SACHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p.156-160, 1987.

CITRUSBR. Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. 2013. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com>>. Acesso em: 05/12/2013.

COCCO, A.; HOY, M. A. Toxicity of organosilicone adjuvants and selected pesticides to the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Florida Entomologist**, v. 91, p. 610-620, 2008.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. First report of the causal agent of *huanglongbing* (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p. 1382, 2004.

COSTA-LIMA, A. M. **Insetos do Brasil: Homópteros**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942.

COULOMBE, R. et al. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 20, p. 5492-5503, 1996

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.

CYGLER, M. et al. Structure of rat procathepsin B: Model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. **Structure**, v. 4, n. 4, p. 405-416, 1996.

DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v.417, n.6887, p.459-463, 2002.

DICKINSON, D. P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in healthy and disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, n. 3, p. 238-254, 2002.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D. et al. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, 2005. p. 1-18.

DUBEY, V. K. et al. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1077-1086, 2007.

FAO. **Statistical Yearbook**. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en/>>. Acesso em: 05 Dez. 2013.

FEICHTENBERGER, E. Resistência de combinações varietais cítricas a fungos do gênero *Phytophthora*. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITRUS - PORTAENXERTOS, 1990, Bebedouro. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1990. p. 233-242.

FIGUEIREDO, M. G. **Retorno econômico dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P & D) na citricultura paulista**. 2008. Tese (Doutorado em economia aplicada) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade

de São Paulo, Piracicaba, 2008. Disponível em: <[HTTP://www.teses.usp.br/teses/disponiveis](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis)>. Acesso em: 10 Abr. 2013.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FROSCH, B. et al. Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B. **APMIS**, v. 107, p. 28-37, 1999.

FUJISHIMA, A. et al. The crystal structure of human cathepsin L complexed with E64. **FEBS Letters**, v. 407, n. 1, p. 47-50, 1997.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. 2006. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>> Acesso em: 22 Nov. 2006.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. 2013. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 21 Out. 2013.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. The greening organism is a gram negative bacterium. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9, 1984. **Proceedings...** Riverside: University of California. 1984. p.115-124.

GIANOTTI, A. **Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de-açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular**. 2008. 119 p. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

GIANOTTI, A. et al. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 483-489, 2006.

GIANOTTI, A. et al. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L human breast cancer cell invasion. **Biological Chemistry**, v. 389, n. 4, p. 447-453, 2008.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, p.93, 2001.

GOTTWALD, T. R.; MCGUIRE, R. G.; GARRAN, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v. 78, p. 739-745, 1988.

GOTTWALD, T. R.; TIMMER, L. W.; MCGUIRE, R. G. Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, v. 79, p. 1276-1283, 1989.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with Asian citrus leafminer. **Fruits**, v. 52, p. 383-390, 1997.

GOTTWALD, T. R. et al. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, v. 91, p. 30-34, 2001.

GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2007. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2007/huanglongbing/>>. Acesso em: 21 Dez. 2013.

GRAVENA, S. **Manual prático de manejo ecológico de pragas dos citros**. Jaboticabal: Gravena, 2005.

HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology**, Review, v.2, p. 068-085, 2007.

HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 3, p. 330-353, 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.

HALL, A. et al. Structural basis for different inhibitory specificities of human cystatins C and D. **Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 4071-4079, 1998.

HALL, D. G.; HENTZ, M. G.; ADAIR, J. R. R. C. Population ecology and phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in two Florida citrus groves. **Environmental Entomology**, v. 37, p. 914-924, 2008.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244-251, 2002.

HEIDTMANN, H. H. et al. Secretion of a latent, acid activatable cathepsin L precursor by human non – small cell lung cancer cell lines. **Oncology Research**, v. 5, p. 441-451, 1993.

HEIMO, H.; PALMU, K.; SUOMINEN, I. Expression in *Pichia pastoris* and purification of *Aspergillus awamori* glucoamylase catalytic domain. **Protein Expression and Purification**, v. 10, n. 1, p. 70-79, 1997.

HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, v. 81, p. 48-50, 2001.

ILLY, C. et al. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1197-1202, 1997.

INOUE, H. et al. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, v. 155, p. 29-36, 2009.

ISHIDOH, K.; KOMINAMI, E. Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 379, p. 131-135, 1998.

JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 379-386, 1994.

KIM, J.S. et al. Responses of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, v. 99, n.1, p. 50-57, 2009.

KOIZUMI, M. Citrus canker: the world situation. In: TIMMER, L. W. (Ed.). **Citrus canker: an international perspective**. Gainesville: University of Florida/Institute of Food and Agricultural Science, 1985. p. 2-7.

KOIZUMI, M. et al. Epidemiological aspects of citrus huanglongbing (greening) disease in Thailand. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Ibaraki, n. 31, p. 205-211, 1997.

KONDO, H. et al. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 15832 – 15837, 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LAFLECHE, D.; BOVÉ, J. M. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. **Académie des Sciences**, Paris, v. 270, p. 1915-1917, 1970.

LEATHERBARROW, R. J. **GraFit Version 5**. Horley, UK: Erithacus Software Ltd. 2001.

LEAL, R. M. et al. Distribuição espacial de *Huanglongbing* (Greening) em citros utilizando geoestatística. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 808-818, 2010.

LEUNG – TOUNG, R. et al. Thiol – dependent enzymes and the inhibitors: a Review. **Current Medicinal Chemistry**, Toronto, v. 9, n. 9, p. 979-1002, 2002.

LIN, K.H. Observation on yellow shoot of citrus. Etiological study of yellow shoot of citrus. **Acta Phytopathologica Sinica**, v. 2, p. 1-42, 1956.

LIPKE, H.; FRAENKEL, G. S.; LIENER, J. E. Effects of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 2, p. 410-415, 1954.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LLAUGER, R. et al. PCR detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* associated with Citrus Huanglongbing in Cuba. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. S93, 2008.

LOPES, S. A. et al. Graft transmission efficiencies and multiplication of “*Candidatus Liberibacter americanus*” and “*Ca. Liberibacter asiaticus*” in citrus plants. **Phytopathology**, v. 99, p. 301-306, 2009a.

LOPES, S. A. et al. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” is heat tolerant, “*Ca. L. americanus*” is heat sensitive. **Plant Disease**, v. 93, p. 257-262, 2009b.

LUIS, M. et al. Occurrence of citrus huanglongbing in Cuba and association of the disease with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 3, p. 709-712, 2009.

MACH, L.; MORT, J. S.; GLÖSSL, J. Non-covalent complexes between the lysosomal proteinase cathepsin B and its propeptide account for stable, extracellular, high molecular mass forms of the enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13036-13040, 1994.

MACHADO, M. A.; CARLOS, E. F.; COLETTA-FILHO, H. D. Desafios no estudo de *Candidatus Liberibacter* e no controle do *huanglongbing*. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 70. 2008.

MACHADO, M. A.; LOCALI-FABRIS, E. C.; COLETTA-FILHO, H. D. *Candidatus Liberibacter* spp., agentes do *huanglongbing* dos citros. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2010.

MAI, J. et al. Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 12806-12812, 2000.

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.

MARTINEZ, M. et al. The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. **Journal of experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1821-1829, 2005.

MATOS, L.; HILF, M. E.; CAMEJO, J. First Report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Associated with Citrus Huanglongbing in the Dominican Republic. **Plant Disease** v. 93, n. 6, p. 668, 2009.

MCCLEAN, A. P. D.; SCHWARTZ, R. E. Greening of blotchy-mottle disease in citrus. **Phytophylactica**, v. 2, p. 177–194, 1970.

MEAD, F. W. **Feature names**. 2002. Disponível em: <<http://creatures.ifas.ufl.edu/citrus>>. Acesso em: 17 Jan. 2007.

MICHAUD, J. P. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, v. 29, p. 260-269, 2004.

MICHELAN-DUARTE, S. **Produção recombinante e caracterização de uma cisteína protease (tipo catepsina B) de cana-de-açúcar**. 2008. 69 p. Dissertação (Mestrado em ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

MOHAMED, M. M.; SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 764-774, 2006.

MORT, J. S.; RECKLIES, A. D.; POOLE, A. R. Release of cathepsin B precursors from human and murine tumors. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 180, p. 243-245, 1985.

MURATA, M. et al. Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. **FEBS Letters**, v. 280, n. 2, p. 307-310, 1991.

MUSIL, D. et al. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 9, p. 2321-2330, 1991.

NAVA, D. E. et al. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, n. 9-10, p. 709-715, 2007.

NEVES, M. F. (Coord.). **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: FEA; USP, 2010.

NYCANDER, M. et al. Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. **FEBS Letters**, v. 422, n. 1, p. 61-64, 1998.

OHTSUBO, S. et al. Molecular cloning and characterization of Orizacystatin-III, a novel member of phytocystatins in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5218-5224, 2005.

OLIVA, M. L. V. et al. Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine protease inhibitor from sugarcane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n.4, p. 1082-1086, 2004.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteinases and Cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91-104, 2003.

PAIVA, P. E. B. **Distribuição espacial e temporal, inimigos naturais e tabela de vida ecológica de *Diaphorina citri* Kuwayama 1908, (Hemiptera: Psyllidae) em citros em São Paulo**. 2009. 65 p. Tese (Doutorado em entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PANTOJA, M. L. et al. Huanglongbing in Cuban Citriculture. Book of Program and Abstracts. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 11th, 2008, Wuhan, China. **Resumos...** Gainesville: University of Florida Press, 2008. p.50-51.

PARRA, J. R. P. et al. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.

PAVLOVA, A. et al. Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration by release of loop anchoring through mutation of His110. **FEBS letters**, v. 487, n. 2, p. 156-160, 2000.

PFAFFL, M. W. Relative quantification. In: DORAK, M. T. (Ed.). **Real-time PCR**. New York : Taylor & Francis, 2006. p. 63-82.

PHILIP, J. M. D. et al. Characterization 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.

PELZ-STELINSKI, K. S. et al. Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 5, p. 1531-1541, 2010.

QURESHI, J. A.; STANSLY, P. A. Rate, placement and timing of aldicarb applications to control Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in oranges. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1159-1169, 2008.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of cysteine proteases. **Methods in enzymology**, v. 244, p. 461-486, 1994.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 325-331, 1999.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. The peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 323-325, 2000.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. D343-D350, 2012.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D270-D272, 2006.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 320-325, 2008.

REINKING, O. A. Diseases of economic plants in South China. **Philippine Agriculturist**, v. 8, p. 109-135, 1919.

REIS, E. M.; MARGIS, R. Sugarcane phycocystatins: Identification, classification and expression pattern analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 291-296, 2001.

RICHARDSON, M. L.; HALL, D. G. Resistance of Poncirus and Citrus 9 Poncirus germplasm to the Asian citrus psyllid. **Crop Science**, v. 53, p. 183-188, 2012.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p. 365-386.

ROSHY, S.; SLOANE, B. F.; MOIN, K. Pericellular cathepsin B and malignant progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 22, n. 2-3, p. 271-286, 2003.

ROSSETTI, V.; BERETTA, M. J. G. Declínio of citrus trees in Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CANCRO CÍTRICO, DECLÍNIO E DOENÇAS SIMILARES DAS PLANTAS CÍTRICAS, 1th, 1987, São Paulo. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 262-273.

SAJID, M.; MCMERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SALVESEN, G. S.; NAGASE, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R.; BOND, J.S (Org.). **Proteolytic Enzymes**. Oxford: Oxford University Press, 2001. p. 105-130.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHES, A. L. et al. Eficiência de inseticidas sistêmicos, aplicados em mudas cítricas, em pré-plantio, no controle de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae). **BioAssay**, v. 4, p. 1-7, 2009.

SANTOS-SILVA, L. K. **Produção recombinante e caracterização funcional de uma legumaina de cana-de-açúcar**. 2012. 148 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SÃO PAULO (Estado). Coordenadoria da Defesa Agropecuária. 2013. **Greening: defesa agropecuária divulga índice de inspeções do segundo semestre de 2012**. Disponível em: <<http://www.agricultura.sp.gov.br/noticias/2909-greening-defesa-agropecuaria-divulga-indice-de-inspecoes-do-2o-semester-de-2012>>. Acesso em: 14 Mar. 2014.

SOARES-COSTA, A. et al. sugarcane cystatin: recombinant expression, purification and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, n. 5, p. 1194-1199, 2002.

SOUZA, A. C. Frutas cítricas: singularidades do mercado. **Preços Agrícolas**, Piracicaba, n. 173, p. 8-10, maio/jul., 2001.

SUBANDIYAH, S.; IWANAMI, T.; TSUYUMU, S. Comparison of 16SrDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. **Plant Disease**, v. 84, n. 1, p. 15-18, 2000.

SCHELER, A. et al. Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with *huanglongbing*. **Phytopathology**, v. 99, n. 5, p. 480-486, 2009.

SCHLERETH, A. et al. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axex and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p. 1423-1433, 2000.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

STALL, R.E.; SEYMOUR, C.P. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease**, v. 67, p. 581-585, 1983.

STORER, A. C.; MÉNARD, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 486-500, 1994.

SKELEY, L. H.; HOY, M. A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 14-23, 2004.

SKRZYDLEWSKA, E. et al. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 9, p. 1251-1266, 2005.

SLOANE, B. F. et al. Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. **Journal of cell Science**, v. 107, p. 373-384, 1994.

SWINGLE, W.T., REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W., WEBBER, H.J., BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley and Los Angeles: University of California, 1967. p. 190-430.

TAKAHASHI, N.; KURATA, S.; NATORI, S. Molecular cloning of cDNA for the 29 kDa proteinase participating in decomposition of the larval fat body, during metamorphosis of *Sarcophaga peregrine* (flesh fly). **FEBS Letters**, v. 334, p. 153-157, 1993.

TAKIO, K. et al. Amino acid sequence of rat liver thiol proteinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 115, p. 902-908, 1983.

TAO, K. et al. 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.

TEIXEIRA D. C. et al. A new *Liberibacter* species, *Candidatus Liberibacter americanus*, is associated with *Huanglongbing* in Sao Paulo. In: CONFERENCE OF

THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16th, 2004, Monterrey. **Resumos...** Monterrey: IOCV, 2004. p. 81.

TEIXEIRA, D. C. et al. *Candidatus* Liberibacter americanus, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1857-1862, 2005.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109, p. 1-62, 1994.

TIWARI, S. et al. Characterization of five CYP4 genes from Asian citrus psyllid and their expression levels in *Candidatus* Liberibacter asiaticus- infected and uninfected psyllids. **Insect Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 733-744, 2011.

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.

TOLLEY, I. S. The relation of nursery production with orchard planning and management. In: AUBERT, B.; TONTYAPOM, S.; BUANGSUWON, D. (Ed.). INTERNACIONAL ASIA PACIFIC CONFERENCE ON CITRUS REHABILITATION, 4th, 1990, Chiang Mai. **Proceedings...** Chiang Mai, 1990, p.77-82.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera:Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 1721-1725, 2000.

TURK, V.; BODE, W. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 285, n. 2, p. 213-219, 1991.

TURK, D. et al. Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. **FEBS Letters**, v. 384, n. 3, p. 211-214, 1996.

TURK, D. et al. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. **Biological Chemistry**, v. 379, p. 137-47, 1998.

VALADARES, N. F. et al. Molecular determinants of improved cathepsin B inhibition by new cystatins obtained by DNA shuffling. **BMC Structural Biology**, v. 10, n. 30, p. 1-9, 2010.

VALUEVA, T. A. et al. Role of protease inhibitors in potato protection. **Russian Journal of Biorganic Chemistry (Bioorganicheskaya Khimiya)**, v. 29, p. 499-504, 2004.

VAN DE MERWE, A. J.; ANDERSON, F. G. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? **Farming South Africa**, v. 12, p. 439-440, 1937.

VERNET, T. et al. Processing of the papain precursor. Purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 32, p. 21451 – 21457, 1991.

ZENG, G. Z. et al. Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 1247-1252, 2006.

XU, C. F. et al. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: TIMMER, L. W. et al. (Ed.). CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10th, 1986, Valência, Espanha. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1988, p. 243-248.

YAMAMOTO, P.T. Estratégias de controle químico de *Diaphorina citri*. In: SIMPÓSIO HUANGLONGBING (HLB, EX- GREENING) NO ESTADO DE SÃO PAULO, 28., 2006, Cordeirópolis. **Anais...** Cordeirópolis: Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' do IAC, 2006.

YAMAMOTO, P. T. Controle de insetos vetores de bactérias causadoras de doenças em citros. In: _____. **Manejo Integrado de Pragas dos Citros**. Piracicaba: Ed. Piracicabana, 2008. cap. 9, p. 237-260.

YAMAMOTO, P. T. et al. Eficácia de Inseticidas para o Manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Citros. **BioAssay**, v. 4, n. 4, p. 1-9, 2009.

WALKER, A. J. et al. Transgenic *Arabidopsis* leaf tissue expressing a modified oryzacystatin shows resistance to the field slug *Deroceras reticulatum* (Müller). **Transgenic Research**, v. 8. p. 95 – 103, 1999.

WEBBER, J. H. History and development of the Citrus industry. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L D.; WEEBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: Ed. University of California Press, 1967. p. 1-39.

WIEDERANDERS, B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 3, p. 691-713, 2003.