

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Análise do Transcritoma de *Anthonomus grandis* e  
Avaliação de um Gene com Potencial Aplicação para  
Controle do Inseto por Silenciamento Gênico**

**Alexandre Augusto Pereira Firmino**

Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Porto Alegre, RS - Novembro de 2012

Trabalho realizado nos Laboratórios de Interação Molecular Planta-Praga, de Bioinformática e de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF.

Órgãos Financiadores: CAPES, CNPq, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Banca Examinadora

Professora Dr<sup>a</sup> Márcia Maria A. Nachenveng Pinheiro Margis – Membro Titular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Professor Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira – Membro Titular

Universidade Federal do Ceará – UFC

Professora Dr<sup>a</sup> Maria Helena Bodanese Zanettini – Membro Titular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Professor Dr. Rogério Margis – Membro Suplente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Dra Maria Fatima Grossi de Sá – Orientadora

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dedicatória

Aos meus pais, José Carlos Firmino e Maria das Graças Pereira Firmino (*in memoriam*)  
que sempre me apoiaram em tudo.

## Agradecimentos

- Em primeiro lugar agradeço a Deus, sempre, pela vida, por me dar sabedoria e discernimento, por não me abandonar nunca e se fazer presente nas mínimas coisas.
- Agradeço ao meu pai José Carlos, por acreditar em mim, investir nos meus devaneios e me fazer seguir em frente. Pai, te amo!
- Agradeço a minha mãe, Maria das Graças, minha primeira professora e orientadora, que imprimiu em mim algo mais importante que todo o conhecimento do mundo: o amor e o respeito a Deus e ao próximo, e as ferramentas para ter um bom caráter e fazer a diferença na vida das pessoas. A vida ficou bem mais difícil sem sua alegria. Mas sei que onde ela estiver, olha por mim. Mãe, amo-te pra sempre!
- Aos meus irmãos Marco e Fabiano, por dividirem todos os momentos difíceis, por toda a paciência, pela amizade, companheirismo e alegria. Amo vocês!
- Agradeço aos meus familiares, avós (*in memoriam*), tios, primos... distantes fisicamente, mas perto com o amor, apoio e torcida!
- Agradeço ao PPGBCM e ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial à Dr<sup>a</sup> Célia Carlini pelos conselhos e pelo apoio; à Dr<sup>a</sup> Marcia Margis pela amizade e apoio; à Silvia Centeno pela sua alegria, amizade, disponibilidade, educação e eficiência; Ao Luciano Saucedo, pelo rigor no trabalho e amizade.
- Aos amigos da UFRGS, Juliana Bugs, João Debarba, Júlio Lima, Joséli Schwambach, Vitor Falavigna, Moara Mingori, Karoline Flach, Letícia Marconato, Karen Schmid, Rafael Rauber, Francine Melise, Felipe Maraschin e Patrícia Santos por fazerem da minha estada em Porto Alegre uma experiência boa e inesquecível.
- Sou muito grato aos pesquisadores do Laboratório de Bioinformática do Cenargen, Georgios Pappas, Orzenil Silva, Roberto Togawa, Marcos Costa, e Natália Martins

pela orientação e paciência ante a minha ignorância em bioinformática, e principalmente pelo café da tarde!

- Agradeço também ao Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos do Cenargen, nas pessoas de Helio Santos (Helinho), que começou nos fornecendo insetos, e Isabella Grisi, que além de por a mão na massa na colônia de insetos, se tornou uma amiga e parceira essencial nos experimentos com bicudo. Sem Isabella, nós estávamos perdidos!!!
  
- Agradeço ao Diogo Claudino e Lucas Machado pela orientação com a dissecação dos insetos.
  
- Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP) que tornaram o trabalho um pouco menos estressante: André (amigo e irmão), José Dijair (amigo de longas partilhas!), Anne, Thiago (BS), Carol, Isabela (minha companheira de bancada, de gavetas, de cerveja, de festa), Janaína, Raquel (Especialíssima! There's nothing I can say, a total eclipse of the heart...), Vivian, Itamara, Aulus, Gustavo, Magda, Angelina, Thiago (grande amigo!), Ariane, Edilson, Rafael, Dra. Cristina, Dra. Maria Eugênia, Cadu (o amigo louco mais sensato que eu tenho), Flávia e Eduardo (meus afilhados e amigos mais que queridos), Vanessa, Dr. Regina, Bruna, Wagner, Dr. Érico, Dr. Osmundo (o cearense mais culto do DF), Dra. Patrícia, Dra. Érika, Maíra, Diogo, Alessandra, Stefani, Robertinha, Thiago (Zé), Felipe, Philippe, Stephan (Bruder!), Daniela e, em especial Lecir (quanto sal comemos juntos! Pessoa mais que especial) Angélica, Sheiska e Sineide por toda a ajuda e paciência.
  
- Agradeço em especial aos meus amigos de luta diária no LIMPP, de risadas, de tentativas, erros e acertos, de discussões e conclusões, Fernando Fonseca, Roberta Coelho e Leonardo Macedo. Juntos quebramos a cabeça e nos aventuramos nessa loucura do silenciamento gênico de insetos. No final, o trabalho foi só uma desculpa pra gente crescer como amigos e profissionais!

- Agradeço ao meu amigo Dr. Rodrigo Fragoso pelos conselhos e indicações, pelas sugestões e correções ao longo do trabalho e na tese.
  
- Agradeço também alguns amigos que já trabalharam no LIMPP e contribuíram muito, direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho: Minha querida amiga e quase mãe Dr<sup>a</sup>. Simoni Dias, que desde antes do doutorado esteve ao meu lado. Nossa amizade é pra sempre, e cada vez maior é meu respeito pelo seu trabalho; Meu amigo Dr. Antônio Américo, obrigado pela sua amizade de décadas (já tem mais de uma!) e pelas conversas; Meu grande amigo nipo-saxão, futuro Nobel de alguma coisa, Erich Nakasu! Uma das pessoas mais inteligentes e perspicazes que eu conheço. Esse faz falta, de verdade!
  
- Não é possível expressar com a devida justiça a minha eterna gratidão à minha orientadora Dr<sup>a</sup> Maria Fatima Grossi de Sá. Agradeço por toda confiança depositada em mim desde o início, pela orientação, parceria, paciência, amizade e acima tudo por todo investimento pessoal, financeiro e profissional.
  
- Por fim agradeço às instituições que possibilitaram a realização deste trabalho: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CAPES, CNPq e UFRGS.

## ÍNDICE

I. Abreviaturas.....	11
II. Índice de Figuras.....	13
III. Índice de Tabelas.....	15
IV. Resumo.....	16
V. Abstract.....	17
VI. Introdução Geral.....	18
a. Agronegócio e Biotecnologia.....	18
b. O Bicudo do Algodoeiro.....	20
c. RNA interferente (RNAi).....	24
VII. Objetivos.....	31
a. Objetivo Geral.....	31
b. Objetivos Específicos.....	31

## Capítulo I

### Análise do Transcritoma do Bicudo do Algodoeiro (*Anthonomus grandis*)

I.1. Introdução.....	33
a. Sequenciamentos de Nova Geração (NGS).....	33
b. Pirosequenciamento.....	35
c. Noções de Bioinformática para Pirosequenciamento 454.....	39
d. Transcritomas de Insetos.....	40
I.2. Material e Métodos.....	42
a. Criação de Bicudo do Algodoeiro em Colônia.....	42
b. Extração de RNA Total.....	42
c. Construção e normalização da Biblioteca de cDNA e pirosequenciamento.....	43
d. Pré-processamento das sequências.....	43
e. Montagem dos <i>contigs</i> , Anotação e Ontologia Gênica.....	44
f. Análise <i>in silico</i> da sequência do domínio PAZ de <i>contigs</i> .....	45



I.3. Resultados e Discussão.....	46
a. Determinação dos ínstaes na fase larval do bicudo.....	46
b. Extração de RNA Total, Pirosequenciamento e Pré-processamento das sequências ( <i>reads</i> ).....	47
c. Montagem e Anotação do transcrito.....	51
d. Proteínas envolvidas nos mecanismos de RNA interferente.....	59
e. Considerações Finais.....	63

## Capítulo II

### Silenciamento do gene que codifica a enzima Lacase2

II.1. Introdução.....	65
a. Validação de genes para silenciamento via RNAi em insetos.....	65
b. RNA interferente para controle e insetos.....	66
c. Cutícula de insetos: Síntese e Esclerotização.....	67
d. Lacases.....	71
II.2. Material e Métodos.....	75
1. Seleção das Sequências dos Genes de Referência Candidatos.....	75
a. Dissecção das partes do bicudo do algodoeiro.....	75
b. Análise de estabilidade de expressão gênica por RT-qPCR .....	78
2. Silenciamento do gene de Lacase2.....	81
a. Síntese de dsRNA de Lacase2.....	81
b. Análise da expressão do gene de Lacase2.....	82
c. Bioensaio com larvas microinjetadas com dsRNA de lacase2.....	83
d. Análise do silenciamento de lacase2 por RT-qPCR.....	84
e. Determinação do número de cópias do gene de lacase2.....	85
II.3. Resultados e discussão.....	85
1. Seleção das Sequências dos Genes de Referência Candidatos.....	85
a. Análise da estabilidade de expressão por Bestkeeper.....	88

b. Análise da estabilidade de expressão por geNorm.....	89
c. Análise da estabilidade de expressão por NormFinder.....	90
d. Comparação entre as análises de estabilidade de expressão.....	91
2. Silenciamento do gene de Lacase 2.....	102
a. Análise da expressão do gene de Lacase 2.....	102
b. Microinjeção em bicudo do algodoeiro.....	104
c. Bioensaio com dsRNA de lacase2.....	106
d. Avaliação do silenciamento do gene de lacase2 por RT-qPCR.....	109
e. Considerações Finais.....	113
Referências Bibliográficas.....	114
Anexos.....	139

## I. Abreviaturas e definições

ArgK	Arginina Quinase
cDNA	DNA complementar
<i>Contigs</i>	Sequências contíguas montadas por alinhamento de <i>reads</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeo
dsRNA	RNA fita dupla
EC	Códigos de classificação enzimática
EF1A	Fator de Elongação 1-Alpha
EST	“expressed sequence tag”, etiquetas de transcritos
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GM	geneticamente modificado
GO	Ontologia Gênica
kb	Quilobase - $10^3$ pares de bases
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
pb	Pares de base
PCR	Reação de polimerização em cadeia (“polymerase chain reaction”)
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeos iniciadores
qPCR	PCR quantitativo
RT-qPCR	RT-PCR quantitativa (em tempo real)
RDRP	RNA Polimerase dependente de RNA
<i>reads</i>	Sequências geradas na reação de sequenciamento
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA interferente
RPS11	Proteína Ribossomal S11
RPS26	Proteína Ribossomal S26
RPS3	Proteína Ribossomal S3
RT	“reverse transcriptase”, transcriptase reversa
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
<i>scaffolds</i>	Série de contigs em ordem correta, mas não necessariamente conectados

siRNA	RNA interferente pequeno
UBQ	Ubiquitina

## II. Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida do Bicudo do Algodoeiro.....	23
Figura 2. Via de silenciamento gênico por RNAi no nematoide <i>C. elegans</i> .....	29
Figura 3. Etapas da reação de pirosequenciamento.....	36
Figura 4. Placa de pico-titulação ( <i>Picotiter plate</i> ). Foto retirada do <i>website</i> 454 Sequencing da empresa Roche ( <a href="http://www.454.com">www.454.com</a> ).....	38
Figura 5. Gel de agarose com amostras de RNA total das diversas fases de desenvolvimento do bicudo.....	49
Figura 6. Exemplo de dados contidos em um arquivo <i>.qual</i> mostrando o índice de qualidade de cada base sequenciada nos <i>reads</i> .....	50
Figura 7. Distribuição dos <i>contigs</i> por tamanho.....	51
Figura 8. Valores de <i>e-value</i> para os principais hits de BLASTx.....	52
Figura 9. Espécies com principais <i>hits</i> após BLASTx.....	53
Figura 10. Categorias de ontologia gênica (GO) para o transcrito de <i>A. grandis</i> .....	56
Figura 11. Comparação entre as ontologias gênicas do transcrito de <i>A. grandis</i> e <i>T.</i> <i>castaneum</i> .....	58
Figura 12. Diagrama de Venn da homologia entre as famílias de proteínas do transcrito do bicudo as famílias proteicas dos bancos de dados de <i>D.</i> <i>melanogaster</i> (Flybase) e <i>B. mori</i> (Silkbase).....	59
Figura 13. Comparação entre as sequências proteicas do domínio PAZ de dicers e argonautas.....	62
Figura 14. Esquema da estrutura da cutícula de insetos.....	69
Figura 15. Mecanismo de oxirredução catalisado pelas lacases.....	72
Figura 16. Dissecção da larva de <i>A. grandis</i> .....	76
Figura 17. Método de dissecção de <i>A. grandis</i> adultos.....	78
Figura 18. Sequência do <i>contig</i> A_grandis_454_rep_c1717.....	84
Figura 19. Sequências dos produtos de PCR gerados com os <i>primers</i> dos genes candidatos de referência.....	87
Figura 20. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos com geNorm nas partes do inseto adulto.....	95

Figura 21. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos com geNorm nas partes da larva.....	96
Figura 22. Valores de V após análise da estabilidade dos genes candidatos com geNorm nas partes do inseto adulto.....	97
Figura 23. Valores de V após análise da estabilidade dos genes candidatos com geNorm nas partes da larva.....	98
Figura 24. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos com NormFinder nas partes do inseto adulto.....	99
Figura 25. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos com NormFinder nas partes da larva.....	100
Figura 26. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos com NormFinder nas partes do inseto adulto, da larva e de ambos.....	101
Figura 27. Gel de agarose com o produto de PCR produzido com <i>primers</i> de Lacase2.....	103
Figura 28. Perfil de expressão do gene de lacase2 nas diversas fases de desenvolvimento do bocado do algodoeiro.....	104
Figura 29. Locais de microinjeção testados no bocado do algodoeiro.....	105
Figura 30. Pupas/Adultos observados 20 dias após microinjeção de dsRNA de lacase2A.....	107
Figura 31. Comparação entre larvas normais de 3° instar e larvas observadas 20 dias após microinjeção de dsRNA de lacase2A.....	108
Figura 32. Esquema do bioensaio de bocado com dsRNA de lacase2 durante o ciclo de vida do inseto.....	109
Figura 33. Avaliação do efeito de dsRNA de lacase2 20 dias após a microinjeção.....	109
Figura 34. Comparação da quantidade de transcritos de lacase2 entre os insetos-controle e as pupas/adultos ou larvas após a microinjeção com dsRNA.....	110
Figura 35. Análise de lacase2A de <i>A. grandis</i> por Southern blot.....	112

### III. Índice de Tabelas

Tabela 1. Tipos de pequenos RNAs.....	30
Tabela 2. Determinação de instares de larvas de bicudo.....	47
Tabela 3. Quantidade de RNA extraído por fase de desenvolvimento do Bicudo.....	49
Tabela 4. Sumário da análise do pirosequenciamento do transcrito do bicudo.....	50
Tabela 5. Principais categorias de proteínas representadas no transcrito do bicudo.....	55
Tabela 6. Genes envolvidos no mecanismo de RNAi encontrados no transcrito do bicudo do algodoeiro.....	61
Tabela 7. <i>Primers</i> utilizados nos experimentos de com genes de referência.....	79
Tabela 8. <i>Primers</i> utilizados nos experimentos de lacase2A .....	83
Tabela 9. Sumário da análise estatística gerada pela ferramenta Bestkeeper para os genes candidatos de referência para as partes de insetos adultos.....	93
Tabela 10. Sumário da análise estatística gerada pela ferramenta Bestkeeper para os genes candidatos de referência para as partes de larvas.....	94
Tabela 11. Análise da combinação de dois genes candidatos com menor valor de M.....	101
Tabela 12. Cinco melhores <i>matches</i> da sequência do <i>contig</i> A_grandis_454_rep_c1717 após BLASTx.....	102

#### IV. Resumo

O algodoeiro sofre o ataque de diversos insetos-praga, sendo o principal o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Visando alternativas mais eficazes para o controle de insetos, tem-se buscado a transgenia de plantas, por meio da introdução de genes que codificam moléculas entomotóxicas. Entre as diferentes estratégias de engenharia genética utilizadas para controle de insetos-praga, a estratégia envolvendo o silenciamento gênico, pelo uso da interferência mediada por RNA (RNAi), é atualmente bastante promissora e de grande relevância. O trabalho aqui apresentado resultou na geração de uma biblioteca completa de genes expressos de *A. grandis*, por meio de sequenciamento completo de ESTs, obtidas a partir de diferentes estágios do desenvolvimento do inseto. O pirosequenciamento do transcrito de *A. grandis* gerou mais de 500.000 *reads* e um banco de dados com 20.841 *contigs* com alta qualidade. Após a montagem e anotação das sequências foram realizadas buscas por genes essenciais do inseto, candidatos ao silenciamento por RNAi. Um desses genes, que codifica a enzima lacase2, foi selecionado e avaliado, mostrando alto potencial para o controle do bicudo do algodoeiro. Esta enzima faz parte do processo de formação e esclerotização da cutícula do inseto. Sua expressão se mostrou quantitativamente maior nas fases mais tardias do ciclo de vida do inseto. Observou-se que a expressão relativa dos transcritos de lacase2 foi altamente reduzida e o desenvolvimento do inseto foi afetado pelo silenciamento gênico. Além da validação do gene de lacase2 para potencial controle do bicudo, este trabalho disponibiliza dados para a escolha de genes de referência para experimentos de quantificação relativa de transcritos por PCR em tempo real em várias partes de larvas e adultos de *A. grandis*. O conjunto de dados aqui obtidos poderá contribuir enormemente para o agronegócio brasileiro e será de grande importância para a obtenção e geração de eventos de algodão transgênicos resistentes ao bicudo do algodoeiro.



## V. Abstract

Cotton plants are subjected to the attack of several insect pests. In Brazil, the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* is the most important cotton pest. The use of transgenic plants by introducing genes coding for entomotoxic molecules is one of the recent efficient approaches used in plant pest control. Among those, the use of gene silencing by interference RNA (RNAi) as a technique for insect control is very promising. The work presented in the next pages shows the use of pirosequencing technique for the construction of a cDNA library formed by *A. grandis* expressed genes in all developmental stages of the insect. The pirosequencing of *A. grandis* transcriptome resulted in more than 500,000 reads and a data set of high quality 20,841 *contigs*. After sequence assembly and annotation, the library was screened for insect essential candidate genes for RNAi-mediated gene silencing. One gene, coding for the enzyme laccase2 was selected and has demonstrated high potential for insect control. This enzyme is involved in insect cuticle formation and sclerotization, and the gene was found to be more expressed in the insect pupa and adult developmental stages. Insect development was affected by gene silencing and the relative expression of laccase2 transcripts was highly decreased. Moreover, this work provides data for choosing reference genes to be used in qPCR experiments for several parts of boll weevil larvae and adult organism. The results provided in this work may contribute to Brazilian agribusiness by the potential important generation of genetically modified cotton plants with significant resistance to cotton boll weevil.

## VI. Introdução Geral

### a. Agronegócio e Biotecnologia

A produção agrícola mundial tem recebido especial atenção no início do século XXI. A crescente demanda por alimentos e produtos agrícolas e as previsões do aumento da população mundial nas próximas décadas exige o desenvolvimento de metodologias e processos sustentáveis que venham ajudar a suprir essa demanda ao elevar a produção agrícola, principalmente nos países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina.

No Brasil, o agronegócio é o mais importante setor da economia nacional, sendo responsável por mais de um terço do PIB, por 37% dos empregos gerados no país e 41% das nossas exportações (MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2012). A área plantada na safra de 2011/2012, estimada em 50,83 milhões de hectares, é 1,9% (960,7 mil hectares) maior que a cultivada em 2010/11, que totalizou 49,87 milhões de hectares (CONAB, 2012).

Apesar da aplicação de mais de 2,5 milhões de toneladas de pesticidas em todo mundo, estima-se que mais de 25% de todo o potencial produtivo ainda é perdido devido ao ataque de pragas, incluindo insetos, ervas-daninhas e fitopatógenos antes da colheita. Para algumas *commodities* como arroz, batata e milho, essa perda varia entre 30 e 40%. Além das perdas, o uso de pesticidas representa um custo de mais de 10 bilhões de dólares por ano (GATEHOUSE, 2008; DEVILLIERS; HOISINGTON, 2011). O controle de pragas com agentes químicos diminuiu bastante os danos causados por insetos e patógenos nas últimas cinco décadas. Porém, o uso indiscriminado, extensivo e contínuo de pesticidas químicos pode resultar na degradação do meio ambiente, em efeitos danosos à saúde humana e de outros organismos, além de prejudicar organismos não alvo e levar à seleção de populações de pragas resistentes (WAHAB, 2009).

Neste contexto, a biotecnologia é uma área que tem se destacado na promissora tarefa de prover novos produtos, processos e metodologias para aumentar a produção agrícola, não só com o desenvolvimento de insumos, mas também de variedades resistentes a estresses abióticos como temperatura, seca, salinidade, e estresses bióticos, como ataque de pragas e incidência de doenças.

Por muitos anos o maior desafio para pesquisadores nessa área tem sido o desenvolvimento de variedades de plantas mais resistentes às pragas. Métodos convencionais de melhoramento assistido por marcadores, estudos de mutagênese e o uso de plantas geneticamente modificadas têm sido bastante eficazes. Características importantes têm sido transferidas de plantas não cultivadas para cultivares comerciais desde a década de 1970 por melhoristas. O sucesso no melhoramento de uma variedade resistente a um inseto, por exemplo, depende dos esforços de pesquisadores de áreas como entomologia, fisiologia celular e molecular de plantas, biologia molecular, genética e melhoramento de plantas. No entanto, o melhoramento é um processo dispendioso e demorado, que depende de bancos de germoplasmas com as características de interesse disponíveis.

Ferramentas de engenharia genética trouxeram à humanidade um poder de manipular e desenvolver novos genótipos de plantas sem precedentes, além de trazer uma promissora via para uma agricultura mais segura e sustentável. Genes de plantas e outros organismos, envolvidos em vias de sinalização reguladoras de processos fisiológicos importantes têm sido clonados e transferidos para plantas de interesse agrônomo, conferindo novas características economicamente importantes para o aumento de sua produção.

Neste sentido, o uso de plantas geneticamente modificadas (GM) para controle de insetos tem sido um dos métodos mais eficientes nos últimos anos. Desde o início da adoção desta tecnologia em 1996, foi observado um aumento de 1,7 milhões para 160 milhões em 2011, fazendo desta tecnologia a mais rapidamente adotada na história da agricultura moderna (JAMES, 2011). De acordo com o *Center for Environmental Risk Assessment* (CERA - Washington, DC) que monitora a liberação mundial de variedades GM, 59 cultivares – milho, soja, algodão, tomate e batata – desenvolvidas para resistência a insetos são plantadas atualmente nos mais diversos países (CERA, 2012). Cultivares de algodão resistentes a larvas de lepidópteros e cultivares de milho resistentes a lepidópteros e coleópteros têm sido utilizados na agricultura mundial, reduzindo o uso de pesticidas e diminuindo os custos de produção (JAMES, 2011). O uso da engenharia genética trouxe algumas vantagens em relação aos métodos de genética clássica. Além de aumentar a busca de potenciais genes envolvidos em características de interesse, proporciona a introdução de um número de genes diferentes numa mesma planta, reduzindo o tempo de introgressão de características desejadas em um evento genético elite.

Sendo assim, a introdução de genes envolvidos na resposta de plantas ao inseto, ou genes que codificam proteínas inseticidas, ou ainda cujo produto interfira no desenvolvimento do inseto-praga pode ser um caminho mais eficiente e rápido para melhorar variedades comerciais.

#### b. O Bicudo do Algodoeiro

A cultura do algodão é a mais importante das culturas de fibras têxteis, sendo o algodoeiro uma das espécies vegetais mais cultivadas no mundo. Além dos produtos primários do algodão (pluma, caroço e fibrila), a cadeia produtiva produz linter, fios, tecidos, malhas, torta, farelo, óleo bruto e biodiesel à base de algodão e movimentam bilhões de dólares no comércio mundial (NEVES; PINTO, 2012).

No Brasil, a cultura do algodão está classificada entre as dez principais culturas agrícolas. No cenário mundial, o país se destaca: é o quarto maior produtor do mundo – mais de 2 milhões de toneladas na safra recorde de 2010/2011; é o terceiro país exportador e o quinto maior consumidor, com quase 1 milhão toneladas/ano. O faturamento total da cultura em 2010/2011 foi de US\$ 37 bilhões (NEVES; PINTO, 2012).

Na safra de 2011/2012, cerca de 1,396 milhões de hectares foram plantados. A região Centro-Oeste que continua liderando a produção nacional e participa com 62,8 % na área plantada do país. Estima-se que o índice de produtividade média do algodão em caroço em 2012 deverá alcançar 3.612 kg/ha, contra 3.705 kg/ha obtidos na safra passada, representando um decréscimo médio de 2,5%. Quanto à produção do algodão em pluma, a pesquisa atual aponta para uma redução de 2,8% em relação à safra anterior, passando de 1.959,8 para 1.900,1 mil toneladas (CONAB, 2012).

Apesar dessa sutil diminuição na produção ser devida a problemas climáticos, a produção de algodão no Brasil é bastante afetada pela ação de pragas e doenças que fazem com a qualidade dos produtos agrícolas derivados da cotonicultura seja prejudicada, afetando não só o setor primário (produção), mas também o secundário (industrialização, comercialização e exportação) e terciário (serviços).

Pragas, doenças e ervas daninhas de difícil controle, além de causarem danos às plantas de algodão, aumentam o custo da produção devido ao grande uso de defensivos agrícolas. De acordo com Neves e Pinto (2012), a indústria de defensivos no Brasil lucrou

o total de US\$ 7,24 bilhões em 2010. Só a cultura do algodão teve participação de 10,6% desse lucro, resultando em um faturamento de US\$ 767,44 milhões. A redução dos custos com defensivos agrícolas depende do desenvolvimento, transferência e utilização de tecnologias mais eficientes no combate a pragas, doenças e ervas daninhas. Para a safra 2012/2013 espera-se, com o uso das cultivares transgênicas de segunda geração, que o número de aplicações de inseticidas seja reduzido para sete por ha.

Existem no Brasil 20 pragas de importância econômica para o cotonicultor e 5 pragas ocasionais, além de 15 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (FREIRE, 2011). Os principais insetos-praga que infestam a cultura do algodão são a lagarta da maçã – *Heliothis virescens* Fabr., 1781 (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta rosada – *Pectinophora gossypiella* Saund, 1844 (Lepidoptera - Gelechiidae), o curuquerê – *Alabama argillacea* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), o bicudo do algodoeiro – *Anthonomus grandis* Boh., 1843 (Coleoptera: Curculionidae) e a lagarta do cartucho do milho – *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae). No intuito de combatê-las, os produtores chegam a efetuar 30 aplicações de defensivos, em sua maioria direcionadas ao combate de pulgões, lagartas e do bicudo, sendo este último um dos grandes responsáveis pela queda da área produzida entre as décadas de 1980 e 1990, quando chegou a dizimar plantações inteiras em regiões do nordeste, do sudeste e do sul do Brasil.

O bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) é um dos insetos-praga mais importantes da cultura do algodão, sendo responsável por danos consideráveis na lavoura de vários países das Américas. É um inseto da ordem Coleoptera, família Curculionidae, que mede normalmente de quatro a nove milímetros de comprimento, de coloração castanho-ferruginosa quando adulto jovem e cinza quando se torna mais velho (Figura 1). Uma característica marcante, responsável pelo nome pelo qual o inseto é conhecido, é sua cabeça alongada para frente, que se prolonga em um rostro que tem metade do seu comprimento fino e recurvado (GALLO *et al.*, 2002). A variação do tamanho do bicudo é influenciada por uma série de fatores, como temperatura, umidade e quantidade de alimento no estágio larval (GREENBERG *et al.*, 2003).

No campo, o bicudo se alimenta de pólen. Sem alimento suficiente, as fêmeas não conseguem desenvolver seus ovos. Por isso, é essencial que as plantas de algodão atacadas pelo inseto estejam no estágio reprodutivo. O inseto possui uma extraordinária capacidade

de reprodução sexuada. Após os adultos se alimentarem por 3 a 7 dias e copularem, as fêmeas põem ovos em botões florais do algodão que atingiram pelo menos um terço do tamanho (cerca de 5 milímetros de diâmetro). Pode ocorrer oviposição em botões menores. No entanto, as larvas podem não se desenvolver devido à escassez de alimento. Oviposição também ocorre nas maçãs (frutos) do algodão e uma fêmea coloca cerca de 200 ovos no intervalo de 10-12 dias (NAKANO *et al.*, 1992; GALLO *et al.*, 2002; PRAÇA, 2007). As larvas demoram de 3 a 5 dias para eclodirem e começam a se alimentar por 7 a 18 dias antes de se tornarem pupas. Se os ovos foram postos no botão floral, este vai ficando amarelado e as flores têm a abertura das pétalas prejudicada. No caso das maçãs, estas não se desenvolvem, apresentando perfurações externas, devido ao hábito de alimentação e oviposição do inseto. Fibras e sementes são destruídas pelo desenvolvimento das larvas, o que impede sua abertura normal e leva a uma coloração escura (GALLO *et al.*, 2002). Durante 4 a 7 dias, as pupas vão se tornando adultos. O adulto recém-formado sai do botão floral ou maçã e se alimenta por 5 dias, quando amadurecem os órgãos reprodutores. Durante este tempo ocorre a cópula e a fêmea põe ovos, reiniciando o ciclo. O ciclo de vida completo do bicudo, representado na figura 1, é de 24 a 36 dias. Em condições ótimas, esse tempo pode diminuir.

Algumas características do ciclo de vida do bicudo dificultam o controle de sua população. Bicudos adultos podem hibernar durante o inverno (diapausa) em restos de cultura, lixo orgânico de fazendas e celeiros. Esta diapausa pode durar meses, por períodos variáveis de 150 a 180 dias até um novo ciclo da cultura. De cada 50 bicudos que entram em diapausa, estima-se que uma população de 500.000 adultos surgirá ao fim da próxima safra (WAGNER *et al.*, 1999). Além disso, o inseto tem alta mobilidade, podendo voar alguns quilômetros, e alta tolerância aos seus inimigos naturais (BUSOLI, 1991; PRAÇA, 2007). A alimentação do bicudo é preferencial por plantas do gênero *Gossypium*. No entanto 104 espécies da família Malvaceae são atacadas pelo bicudo. Espécies como *Hibiscus* sp. são consideradas importantes para a manutenção da população do bicudo no período de entressafra do algodão (BUSOLI, 1991; GONDIM *et al.*, 2001).

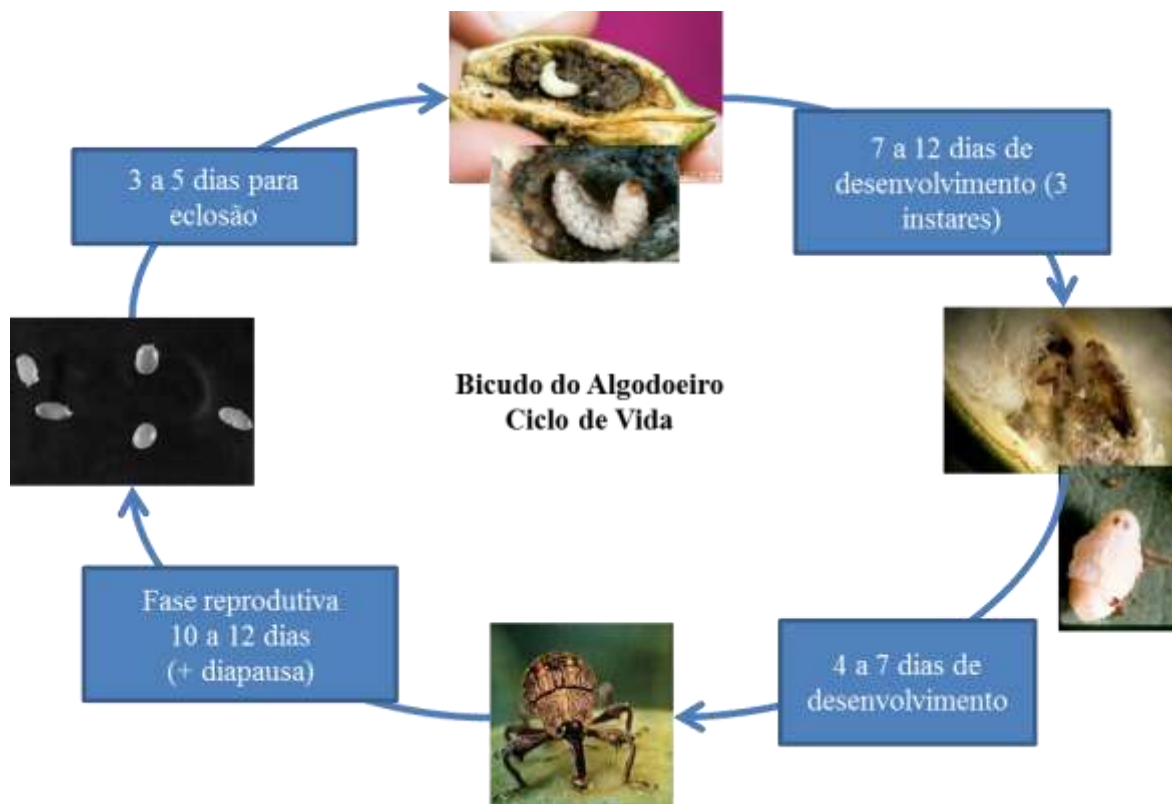


Figura 1. Ciclo de vida do Bicudo do Algodoeiro.

Até a década de 90, o bicudo era o mais importante inseto-praga do algodão na América do Norte. Devido a um severo programa de erradicação promovido pelo USDA (United States Department of Agriculture), uma estratégia integrada de manejo de pragas, baseada no inverno rigoroso e no uso de pesticidas na entressafra obteve sucesso em controlar o bicudo em mais de 95% das áreas plantadas (NATIONAL\_COTTON\_COUNCIL\_OF\_AMERICA, 2009).

No Brasil, a detecção do bicudo do algodoeiro ocorreu pela primeira vez em 1983, na região de Campinas, SP. A partir daí, a praga disseminou-se para outras regiões, e em 1985 havia se dispersado por cerca de 350 mil hectares de algodão, nos Estados de São Paulo, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. A rápida disseminação do bicudo, a abrangência, e os danos consideráveis nas áreas cotonicultoras do Brasil indicaram sua grande capacidade de adaptação a novos ambientes, reforçando suas características biológicas e comportamentais favoráveis, tornando-se uma praga-chave do algodão no país (ALMEIDA; SILVA, 1999). Os níveis de infestação crescem rapidamente, causando

prejuízos de até 100% da produção, caso as medidas de controle não sejam adequadas. O inseto representa um grande potencial de dano, sendo considerado praga-chave no planejamento e controle dos insetos nocivos à cultura, principalmente devido à dificuldade de controle pelos inseticidas químicos. Essa dificuldade é devida principalmente à sua fase larval, que ocorre dentro dos botões florais e maçãs. A principal forma de controle do bicudo está baseada na utilização de agroquímicos (SANTOS, 1999).

Atualmente, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de gerar tecnologias econômica e ecologicamente viáveis para o controle desta praga. Estes incluem: (i) melhoramento clássico visando o desenvolvimento de cultivares com o ciclo curto e de rápida maturação, (ii) armadilhas de feromônios, e (iii) alternativas biológicas que incluem a utilização de agentes biológicos como bactérias, fungos e vírus que poderão ser utilizados por aspersão direta ou para manipulação e transformação de plantas de algodão.

Programas de melhoramento vegetal por meio de transgenia consistem numa via alternativa aos métodos convencionais para o controle de insetos-praga (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002; MORTON *et al.*, 2000). Mais de 10 cultivares de algodão GM resistentes a insetos são comercializadas no mundo. No entanto, nenhuma delas apresenta resistência ao bicudo do algodoeiro e, portanto, não controlam a principal praga da cultura do algodão no Brasil.

As principais variedades transgênicas com efeitos entomotóxicos bem estabelecidos expressam toxinas do *Bacillus thuringiensis* (CHRISTOU *et al.*, 2006). Em outras variedades, genes que expressam inibidores de proteinases e lectinas também são utilizados (FERRY *et al.*, 2006; HILDER; BOULTER, 1999). Atualmente especial foco tem sido dado à utilização de RNA de interferência (RNAi) para o controle de pragas (PRICE; GATEHOUSE, 2008).

#### c. RNA interferente (RNAi)

No final da década de 80, Jorgensen e colaboradores (NAPOLI *et al.*, 1990) estavam estudando a síntese de antocianinas que dão cor violeta às petúnias. Ao superexpressarem chalcona sintase, uma enzima envolvida no processo de síntese, esperavam petúnias com coloração violeta mais intensa. Ao contrário, obtiveram petúnias brancas. A baixa expressão da enzima sugeria que de alguma forma a expressão do gene



endógeno estava sendo suprimida por um mecanismo que seria confirmado pelo mesmo grupo em 1996 (JORGENSEN *et al.*, 1996). Os primeiros indícios em animais só vieram algum tempo depois. No início da década de 90, Guo e Kemphues (1995) investigavam a expressão polarizada do gene *par-1*, codificante de uma quinase de Ser/Thr no corpo do embrião de *Caenorhabditis elegans*. Ao tratar os animais com RNA *anti-sense* para *par-1*, o gene não era expresso. No entanto, o controle com RNA *sense* também causava o mesmo efeito.

Esse processo, descrito primeiramente em plantas, foi denominado como silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (*Post-Transcriptional Gene Silencing*) (JORGENSEN *et al.*, 1996). Pouco tempo depois, o termo interferência mediada por RNA, ou apenas RNA interferente (RNAi) foi dado pelos pesquisadores Andy Fire e Craig Mello (FIRE e Mello., 1998) ao silenciamento de um gene específico de *C. elegans* para uma determinada sequência nucleotídica, causado pela aplicação de RNA de fita dupla (dsRNA) exógeno. Seus experimentos mostravam que a aplicação de RNAs de fita simples (ssRNA), sejam *sense* ou *anti-sense* era menos efetiva que dsRNA no silenciamento de um gene no desenvolvimento de *C. elegans*. Foi observado que os ssRNAs só tinham efeito quando o *sense* era administrado logo após o *anti-sense* ou vice-versa, indicando que eles hibridizavam, formando dsRNA, que foi considerado o responsável pelo silenciamento. O silenciamento em *C. elegans* possuía duas características marcantes: a iniciação por RNA de fita dupla e a capacidade de se espalhar de forma sistêmica no organismo. Uma terceira característica foi descoberta depois: em *C. elegans* RNAi era também hereditário. (GRISHOK *et al.*, 2000). Estes estudos iniciais indicavam um fenômeno transiente, que não afetava a sequência no DNA genômico, mas sim mRNA maduro (FIRE *et al.*, 1998; MONTGOMERY; FIRE, 1998; MONTGOMERY *et al.*, 1998). Para que ocorresse o silenciamento, as fitas de dsRNA deveriam desanelar. No entanto, a impossibilidade de se encontrar a fita anti-sense sozinha levou à descoberta de RNA de interferência pequenos (siRNAs - *short interfering RNAs*). A identificação dos siRNAs de 21-28 pares de base, como intermediários comuns entre PTGS (HAMILTON; BAULCOMBE, 1999) e RNAi (PARRISH *et al.*, 2000; TIJSTERMAN *et al.*, 2002; ZAMORE *et al.*, 2000), confirmaram uma intersecção entre os mecanismos dos dois processos de silenciamento específicos para uma determinada sequência. Estes pequenos RNAs guiariam, então, o

reconhecimento e a clivagem ou repressão da tradução de um mRNA complementar. Também foi descrito seu envolvimento com modificações na cromatina.

Passada pouco mais de uma década desde a descoberta do RNAi, os pequenos RNAs envolvidos em mecanismo de silenciamento por RNAi são definidos não só por seu tamanho (~ 20-30 nucleotídeos), mas também por sua associação com proteínas da família Argonauta (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009; KETTING, 2011). A família das argonautas é caracterizada por proteínas que possuem os domínios conservados PAZ e PIWI. O domínio PAZ é a região específica de ligação a RNAs de fita dupla e o domínio PIWI tem uma estrutura parecida com o domínio de clivagem RNase H.

Diferentes classes de pequenos RNAs estão envolvidas em complexos mecanismos de regulação da expressão gênica. siRNAs, por exemplo são derivados de dsRNA, ao contrário de outros pequenos RNAs, como *Piwi-interacting* RNAs (piRNAs). As várias classes de RNAs regulatórios diferem nos tipos proteínas requeridas para sua biossíntese, na constituição dos complexos Argonautas associados, nos modos de regulação dos genes e nas funções biológicas das quais eles participam. A tabela 1 mostra tipos de pequenos RNA envolvidos na regulação gênica por silenciamento (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009).

Muitos artigos foram publicados na última década no intuito de decifrar o mecanismo e as características do processo de silenciamento gênico via RNAi. RNAi foi reconhecido como um processo filogeneticamente antigo, utilizado pelos eucariotos para silenciar elementos genéticos exógenos e para a regulação precisa de genes endógenos durante seu desenvolvimento.

A figura 2 mostra a via de RNAi em *C. elegans* a partir da aplicação de dsRNA exógeno. O dsRNA exógeno entra na célula pela mediação de proteínas SID-1 (*Systemic RNA Interference Defective-1*) e SID-2 (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009; BRODERSEN *et al.*, 2008). O dsRNA é reconhecido por um complexo (RISC – *RNA-Induced Silencing Complex*) formado por proteínas ligantes a dsRNA (helicases) e pela enzima Dicer, que cliva o dsRNA em siRNAs de 21-28 nucleotídeos numa reação dependente de ATP. Após separação das fitas do siRNA, uma delas, que garante a especificidade à sequência-alvo, é retida no RISC (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009; PRICE; GATEHOUSE, 2008). A presença de siRNA fita-simples leva à ativação de outras proteínas da família das argonautas no complexo. A fita simples do siRNA é então direcionada para sequências complementares de RNA transcrito. Algumas argonautas do complexo tem função de

RNase H e degradam o mRNA alvo em aproximadamente 12 nucleotídeos a partir da extremidade 3' do siRNA. No caso dos miRNAs, que não provêm de dsRNAs, as argonautas apenas dirigem a hibridização do siRNA com o mRNA, impedindo a tradução. Além desse processo, em *C. elegans*, ocorre a amplificação do sinal dos siRNAs. No momento em que as duas fitas do siRNA são separadas pelas helicases no RISC, a fita simples pode ser dissociada do complexo e servir de oligonucleotídeo iniciador da síntese de novas moléculas de dsRNA (PRICE; GATEHOUSE, 2008). A fita simples hibridiza com o mRNA complementar e uma RNA polimerase dependente de RNA (RDRP – *RNA-Dependent RNA Polymerase*) conduz a reação de síntese de novos dsRNAs que voltarão a serem substratos para a Dicer e podem ser exportados de uma célula à outra pela ação das proteínas transmembrânicas SID, fazendo do silenciamento um efeito sistêmico e hereditário (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009).

Para uma revisão sobre mecanismos de ação de outros pequenos RNAs descritos na tabela 1, uma vasta literatura está disponível. Com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração, a identificação de novos RNAs reguladores e genes que codificam proteínas envolvidas em seu mecanismo de ação têm sido objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa (BARTEL, 2009; BORSANI *et al.*, 2005; BRODERSEN *et al.*, 2008; FALLER; GUO, 2008; FRIEDMAN *et al.*, 2009; GHILDIYAL; ZAMORE, 2009; KATIYAR-AGARWAL *et al.*, 2006; MOROZOVA *et al.*, 2012; SIOMI *et al.*, 2011; WANG; REINKE, 2008; WINTER *et al.*, 2009)

Como descrito anteriormente, a via de silenciamento por RNAi é conservada em vários organismos, mas difere em alguns pontos devido ao tipo de RNA, dos tipos de proteínas argonautas envolvidas e das funções celulares. O efeito sistêmico encontrado em plantas e *C. elegans*, por exemplo, não é descrito em insetos. Este efeito pode ser subdividido em duas partes: a “absorção” de dsRNA pelas células e o espalhamento sistêmico do silenciamento. A absorção de dsRNA pelas células de insetos é bem parecida com *C. elegans*. No entanto, nos genomas de insetos não foram encontrados genes ortólogos de *sid-2* (GORDON; WATERHOUSE, 2007). Em insetos, homólogos do gene *sid-1* de *C. elegans* foram encontrados em *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori* e *Apis mellifera*, mas não no genoma de *Drosophila* (BELLES, 2010). Em *Drosophila* foi observado que o dsRNA entra nas células por endocitose mediada por um receptor, não envolvendo o mecanismo de SID-1 (SALEH *et al.*, 2006; GORDON; WATERHOUSE,

2007; PRICE; GATEHOUSE, 2008). Mais de 20 genes foram descritos como necessários para a entrada de dsRNA em cultura de células de *Drosophila*. Muitos deles foram previamente identificados em processos de endocitose (ULVILA *et al.*, 2006). Entretanto, a maquinaria do processo de endocitose não é muito diferenciada entre as espécies, impossibilitando ainda uma melhor comparação e compreensão da especificidade aos dsRNAs.

O único animal em que a amplificação do efeito de silenciamento foi descrita, com o dsRNA sendo transmitido de célula para célula foi *C. elegans*. Análise do genoma de *Drosophila* mostra que não há um gene ortólogo que codifique a enzima RDRP. Essa enzima nunca foi descrita para insetos e seu gene não foi detectado em genomas completamente sequenciados (GATEHOUSE, 2008; GORDON; WATERHOUSE, 2007). Recentemente foi realizada uma análise comparativa do genoma de *C. elegans* com o genoma do besouro castanho *Tribolium castaneum*, o inseto-modelo mais caracterizado geneticamente depois do gênero *Drosophila*, com o objetivo de buscar indícios de conservação do mecanismo de amplificação do efeito do RNAi por RDRP (TOMOYASU *et al.*, 2008). Ao contrário de *Drosophila*, *Tribolium* tem três genes para SID-1 e responde sistemicamente à indução de silenciamento via dsRNA. Entretanto foi observado um baixo nível de conservação entre os genes da maquinaria de RNAi dos dois organismos e nenhum homólogo de genes codificantes de RDRP ou argonautas secundárias envolvidos na amplificação do efeito do RNAi foi encontrado. Se alguns trabalhos científicos afirmam que células de mamíferos e insetos podem ter outro processo de amplificação, nenhum ainda conseguiu mostrá-lo.

Figura 2 (Página seguinte). Via de silenciamento gênico por RNAi no nematoide *Caenorhabditis elegans*. O dsRNA exógeno entra na célula pela mediação de proteínas SID-1 e SID-2. O dsRNA reconhecido pela enzima Dicer é clivado em siRNAs de 21-28 nucleotídeos que se ligam a um complexo RISC formado por proteínas ligantes a dsRNA (helicases) e por proteínas argonautas. Após separação das fitas do siRNA, uma delas, que garante a especificidade à sequência-alvo, é retida no RISC. A presença de siRNA fita-simples leva à ativação de outras proteínas da família das argonautas no complexo. A fita simples do siRNA é então direcionada para sequências complementares de RNA transcrito. Além desse processo, ocorre a amplificação do sinal dos siRNAs quando a fita simples pode ser dissociada do complexo e servir de oligonucleotídeo iniciador da síntese de novas moléculas de dsRNA pela enzima RDRP. Os novos dsRNAs podem

ser exportados fazendo do silenciamento um efeito sistêmico e hereditário (Figura de autoria de Alexandre A. P. Firmino, 2012).

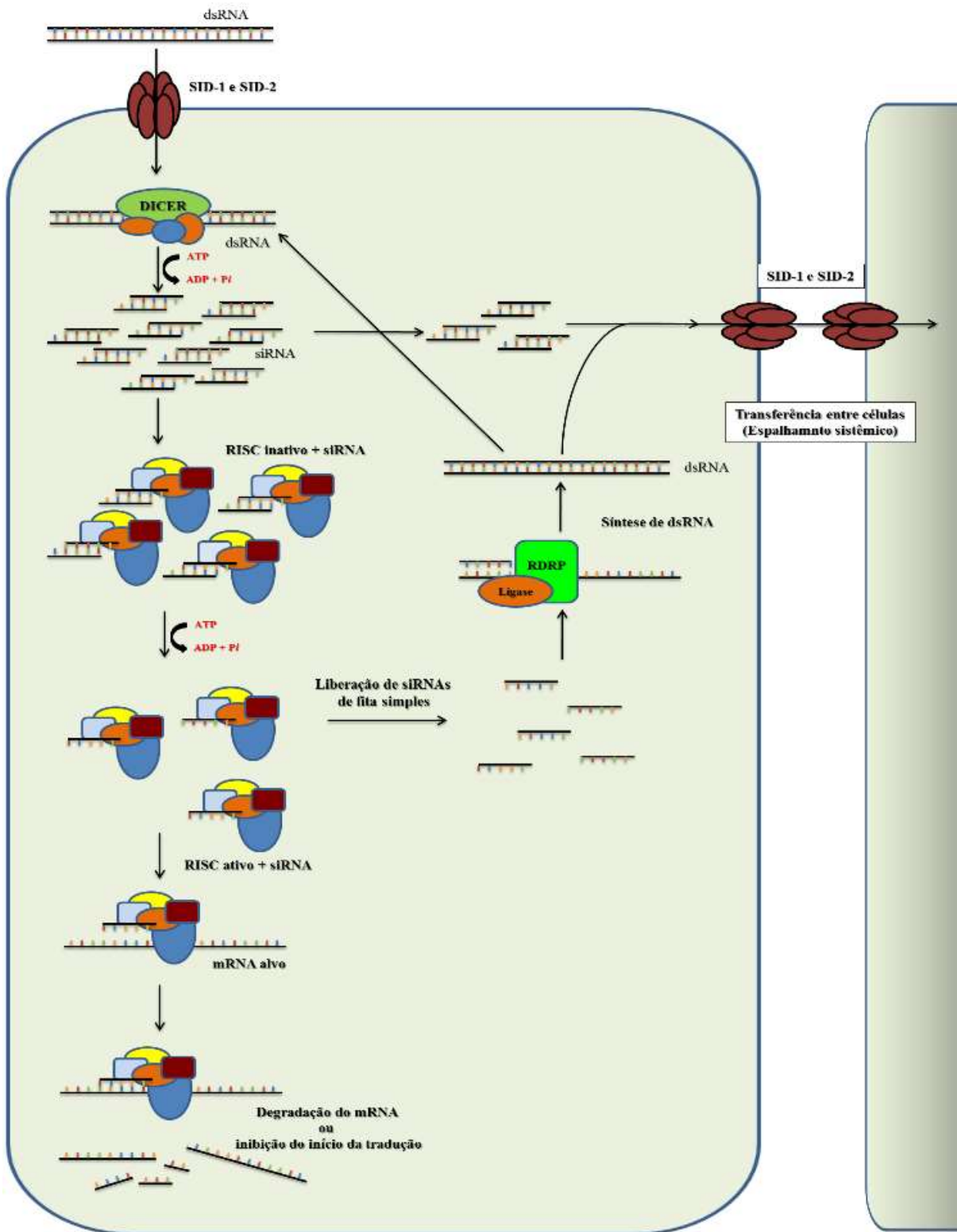


Tabela 1. Tipos de pequenos RNAs (*adaptado de GHILDIYAL; ZAMORE, 2009*)

Tipo	Organismo	Tamanho (nt)	Proteínas associadas	Origem	Função
<b>miRNA</b>	Plantas, algas, animais, vírus e protistas	20-25	Drosha (em animais) e Dicer	Transcrição pela Pol II a partir dos pri-miRNAs	Regulação da estabilidade do mRNA, regulação da tradução.
<b>casiRNA</b>	Plantas	24	DCL3	Transposons, sequências repetidas	Modificação da cromatina
<b>tasiRNA</b>	Plantas	21	DCL4	RNAs clivados dos loci <i>TAS</i> dirigidos por miRNA	Regulação pós-transcricional
<b>natsiRNA</b>	Plantas	21-24	DCL1 e DCL2	Transcritos bidirecionais induzidos por mecanismos de stress	Regulação de genes responsivos ao stress biótico (patógeno) e abiótico (salinidade).
<b>Exo-siRNA</b>	Animais, plantas, fungos e protistas	21-25	Dicer	RNA exógeno transgênico, viral ou sintetizado <i>in vitro</i>	Regulação pós-transcricional, defesa antiviral.
<b>Endo-siRNA</b>	Plantas, algas, animais, fungos e protistas	~21	Dicer (exceto os siRNAs amplificados em <i>C. elegans</i> que são produtos de transcrição pela RDRP)	Transcrição de loci estruturados, convergentes e bidirecionais; mRNAs pareados com transcritos <i>anti-sense</i> de pseudogenes	Regulação pós-transcricional de genes e transposons
<b>piRNA</b>	Metazoários excluindo <i>Trichoplax adhaerens</i>	24-30	Independentes de Dicer	Transcritos primários, longos precursores de DNA	Regulação de retrotransposons; em <i>C. elegans</i> e humanos, essenciais na espermatogênese.
<b>piRNA-like</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>	24-30	Independentes de Dicer	Mutantes do gene <i>ago2</i> em <i>Drosophila</i>	Formação do embrião
<b>21U-RNA piRNAs</b>	<i>C. elegans</i>	21	Independente de Dicer	Transcrição individual de piRNAs	Regulação de transposons
<b>26G RNA</b>	<i>C. elegans</i>	26	RDRP	Enriquecido no esperma	Desconhecido

Abreviaturas: *ago2*, argonauta; casiRNA, cis-acting siRNA; DCL, Dicer-like; endo-siRNA, endogenous small interfering RNA; exo-siRNA, exogenous small interfering RNA; miRNA, microRNA; natsiRNA, natural antisense transcript-derived siRNA; piRNA, Piwi-interacting RNA; Pol II, RNA polymerase II; pri-miRNA, primary microRNA; RDRP, RNA-dependent RNA polymerase; tasiRNA, trans-acting siRNA.

## VII. Objetivos

### a. Objetivo Geral

Diante do que foi apresentado, o objetivo do presente trabalho é estudar o transcrito do Bicudo do Algodoeiro (*Anthonomus grandis*) visando, principalmente, a geração de dados de biologia molecular para este organismo e também a avaliação de genes candidatos que codifiquem moléculas essenciais no desenvolvimento do inseto, para uso no controle deste inseto-praga via silenciamento por RNAi.

### b. Objetivos Específicos

- I. Obter as fases do bicudo do algodoeiro (larvas, pupas e adultos) para a produção de cDNAs enriquecidos e normalizados;
- II. Obter uma biblioteca de todos os genes expressos neste inseto-praga, *A. grandis* nas diferentes fases de desenvolvimento (larva, pupa e adulto) por sequenciamento de ESTs (Expressed Sequence Tags) usando técnica de pirosequenciamento em larga escala 454 (Roche®);
- III. Analisar as sequências e construir um banco de dados de ESTs de bicudo;
- IV. Identificar genes do bicudo do algodoeiro envolvidos no mecanismo de RNAi;
- V. Identificar genes candidatos ao uso no controle do inseto;
- VI. Selecionar genes para uso como referência em estudos de expressão gênica por quantificação relativa por RT-qPCR;
- VII. Determinar o perfil de expressão de gene-alvo ao longo do desenvolvimento do bicudo do algodoeiro;
- VIII. Validar um gene-alvo candidato por silenciamento via RNAi utilizando RT-qPCR e bioensaios.

---

## CAPÍTULO I

### ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DO BICUDO DO ALGODOEIRO (*ANTHONOMUS GRANDIS*)

---



## I.1. Introdução

### a. Sequenciamentos de Nova Geração (NGS)

Desde o descobrimento do DNA como código da vida na Terra, esforços foram feitos para realizar pesquisas que visassem desvendar os detalhes de sua estrutura e dos mecanismos de transmissão da informação genética. Da elucidação da estrutura do DNA aos métodos de sequenciamento, passaram-se quase 20 anos de descobertas sobre os ácidos nucleicos e suas funções celulares. E nos anos seguintes, as ferramentas de bioquímica e biologia molecular, especialmente de engenharia genética, puderam trazer ao século passado, numa velocidade jamais vista, milhares de informações genéticas sobre os diversos organismos e seus processos de regulação gênica.

Entender o alfabeto formado pelas bases nitrogenadas, a estrutura dos genes, a organização do DNA no núcleo e sua interação com outras moléculas fez da biologia molecular e da química de biomoléculas áreas do conhecimento de grandes investimentos para pesquisas. No início da década de 70, vários métodos foram desenvolvidos para sequenciar DNA de vírus e microorganismos. No entanto, o método desenvolvido por Sanger e colaboradores em 1977 (SANGER *et al*, 1977) foi amplamente adotado e se tornou o mais utilizado devido a sua facilidade, repetibilidade e baixa toxicidade quando comparado com os métodos publicados até então. Baseado na reação de replicação (polimerização) do DNA, a reação de sequenciamento pelo método de Sanger utiliza um dideoxynucleotídeo (ddG, ddA, ddT ou ddC) marcado radioativamente e misturado aos deoxynucleotídeos (dG, dA, dT, dC) normalmente encontrados no DNA, além dos outros componentes necessários para a duplicação: *primers*, DNA polimerase e tampão com cofatores. Considerando a fita de DNA que está sendo polimerizada, em cada posição os nucleotídeos são adicionados um a um. Se um desoxinucleotídeo for adicionado, a reação continua, com a adição do próximo. Caso um dideoxynucleotídeo seja adicionado, a reação de polimerização desta fita para. O sequenciamento era feito em quatro reações de polimerização, cada qual contendo um único tipo de dideoxynucleotídeo (A, C, T ou G), mas os quatro desoxinucleotídeos em todas. Após vários ciclos de replicação têm-se praticamente todos os tamanhos possíveis de cópias de moléculas de DNA baseados na sequência inicial, com diferenças de apenas uma base entre as cópias. No método original

que foi por muito tempo utilizado, após a polimerização uma etapa de eletroforese em gel de poli-acrilamida com resolução de uma base nucleotídica era necessária para separar as quatro reações, cada base em uma linha.

Ao longo dos anos, aprimoramentos do método e inovações tecnológicas permitiram sua automatização. Os dideoxinucleotídeos utilizados foram ligados a fluoróforos, possibilitando o abandono da radioatividade e da eletroforese no processo. O sequenciamento de Sanger passou a ser capilar, requerendo pequenas quantidades de amostra. A capacidade de leitura atingiu uma média de 1000 a 1200 pares de bases (pb). Apesar da ampla capacidade e grande aplicação, várias técnicas pré-sequenciamento precisaram ser desenvolvidas, quando o objetivo do sequenciamento era um gene completo, ou uma região de um genoma de um organismo, na tentativa de aumentar o tamanho da sequência.

Foi o advento do sequenciamento de genomas completos (*WGS – Whole Genome Sequencing*) que permitiu a busca de um avanço das técnicas de sequenciamento. Na década de 90, para sequenciar pedaços maiores de DNA, uma abordagem chamada de sequenciamento por *shotgun* foi utilizada pelo Projeto Genoma Humano (HGP) (ZHANG *et al.*, 2011). Neste tipo de sequenciamento, o DNA genômico é quebrado em pedaços menores, por processos enzimáticos ou mecânicos. Os pedaços são clonados em vetores de bactéria e enriquecidos. Após o sequenciamento, pedaços longos de DNA podem ser montados por alinhamento e sobreposição dos fragmentos aleatórios. O Projeto Genoma Humano foi uma iniciativa de determinar a sequência total do genoma humano, identificando e mapeando os aproximadamente 20.000 a 25.000 genes. O consórcio era formado principalmente por cientistas dos Estados Unidos, Reino Unido, França, Austrália, Alemanha e Japão, além de outros colaboradores. O projeto foi iniciado em 1990 com uma estimativa de 15 anos. Após 11 anos, os primeiros rascunhos foram publicados, com cerca de 90% do genoma sequenciado (LANDER *et al.*, 2001; YAMEY, 2000). Concluído em 2003 (CONSORTIUM, 2004), dois anos antes do previsto, o projeto teve um cálculo estimado de gastos de cerca de US\$ 3 a 4 bilhões de dólares. Além do sequenciamento do genoma humano, o consórcio ainda focou em alguns organismos-modelo como a bactéria *Escherichia coli*, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* e o camundongo *Mus musculus*. Em um projeto paralelo, realizado pela iniciativa privada, Venter e colaboradores (2001) publicaram também um sequenciamento do genoma humano. Os

dois projetos juntos iniciaram uma era de estudos de desenvolvimento de técnicas para o estudo de genomas completos.

Nas três décadas que se sucederam ao desenvolvimento da técnica, o sequenciamento capilar de Sanger evoluiu para uma escala que permitia a análise de genomas completos e complexos, das poucas kilobases de genomas virais em 1980, para as gigabases dos genomas do camundongo e humano em 2001. No entanto, a maior revolução aconteceu por volta de 2005, quando as chamadas metodologias de sequenciamento de nova ou segunda geração (NGS - Next-Generation Sequencing; SGS – Second Generation Sequencing) começaram a gerar uma quantidade maior de dados por um custo muito menor, e em muito menos tempo, permitindo o sequenciamento completo de um genoma de mamífero em poucos dias, além de permitirem sequenciamentos *de novo* (HENSON *et al.*, 2012; MARDIS, 2008; ZHANG *et al.*, 2011). Também chamadas de metodologias de sequenciamento massivo em paralelo, as tecnologias SGS leem as sequências de DNA genômico de forma randômica. Em geral, o DNA genômico é quebrado em pequenos pedaços e ligados a adaptadores. Uma leitura randômica é feita durante uma reação de síntese de DNA (sequenciamento por síntese). Uma limitação é o tamanho dos *reads* sequenciados que variam entre 50 e 600 pb dependendo da técnica (ANSORGE, 2009; HENSON *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2011). Até recentemente, as tecnologias NGS eram dependentes de emissão de luz, e, portanto, de um sistema eficiente de detecção luminosa. Uma nova série de plataformas NGS, chamadas de NGS de terceira geração (TGS) já existe com a promessa de diminuir mais os custos e aumentar os tamanhos dos *reads* sequenciados. Metodologias mais recentes, como o sequenciamento de uma única molécula de DNA (SMRT, Helioscope ou RNAP), já permitem a leitura contínua de quilobases (PAREEK *et al.*, 2011; THOMPSON; MILOS, 2011). Para um resumo sobre as principais tecnologias de NGS atualmente em uso e em desenvolvimento, ver (ZHANG *et al.*, 2011).

#### b. Pirosequenciamento

A primeira tecnologia NGS disponível foi desenvolvida pela empresa 454 Life Sciences em 2005. A tecnologia era baseada em um método de monitoramento da síntese de DNA pela polimerase por quimioluminescência descrito por Pal Nyren em 1987 (NYREN, 1987). Em 1998, Ronaghi e colaboradores (RONAGHI *et al.*, 1998)

aperfeiçoaram esse processo chamado então de pirosequenciamento, um método de sequenciamento por síntese, em tempo real, baseado na liberação de pirofosfato.

Os passos da reação de pirosequenciamento estão resumidos na figura 3. A fita de DNA a ser sequenciada é hibridizada com um *primer* e cada deoxinucleotídeo (dNTP) é adicionado por ciclo. A cada incorporação de um dNTP, um pirofosfato (PPi) é liberado pela reação catalisada pela DNA polimerase I. O PPi é incorporado a um substrato 5'-Fosfosulfato de adenosina (APS) por uma sulfúrilase formando ATP. O ATP formado é usado na conversão de luciferina em oxiluciferina mediada pela luciferase, uma reação que libera um fóton em quantidade equimolar à de PPi gerado na reação da polimerase. Assim, cada dNTP ligado ao DNA pela síntese, gera um fóton. Para evitar sucessivas lavagens antes de um novo ciclo com um novo dNTP, Ronaghi inseriu uma quarta enzima, apirase, para degradar o excesso de dNTP e possíveis moléculas de ATP não utilizadas pela luciferase. Além disso, dATP $\alpha$ S ( $\alpha$ -tio-trifosfato de adenosina) é utilizado no lugar do dATP na reação, por ser substrato da polimerase, mas não da luciferase. A quantidade de luz produzida na reação da luciferase pode ser estimada por um aparelho sensível à luz como um luminômetro ou uma câmera de CCD (*charge-coupled device*). A luz gerada em cada ciclo gera um pirograma que é analisado e processado (AHMADIAN *et al.*, 2006; HENSON *et al.*, 2012; HUSE *et al.*, 2007; MARDIS, 2008; THOMPSON; MILOS, 2011; ZHANG *et al.*, 2011).

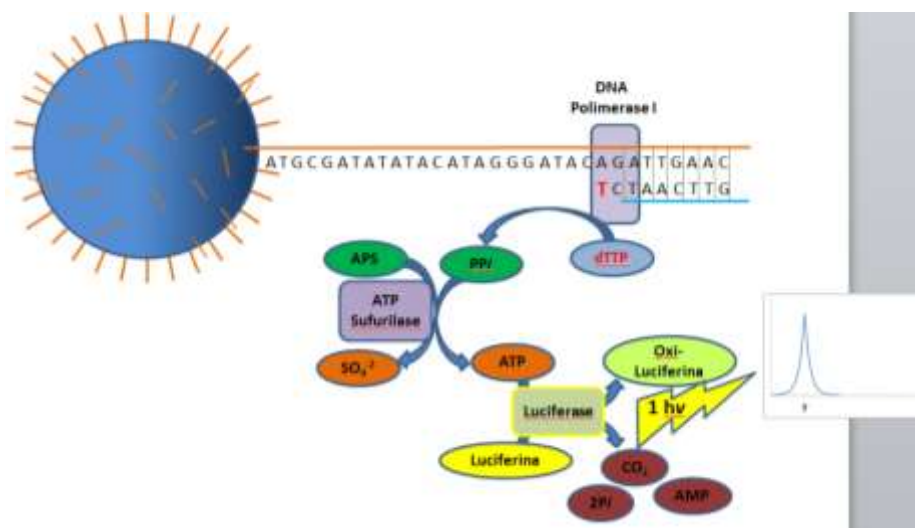


Figura 3. Etapas da reação de pirosequenciamento. A adição de um nucleotídeo específico libera um pirofosfato que é utilizado para gerar ATP. O ATP é utilizado na oxidação da luciferina que libera um fóton em razão equimolar ao número de nucleotídeos incorporados na reação (Figura de autoria de Alexandre A. P. Firmino, 2012).

Em 2005, a 454 Life Sciences lançou a primeira plataforma de NGS, a GS 20, baseada em pirosequenciamento, automatizando o processo (AHMADIAN *et al.*, 2006; MARDIS, 2008). O método teve um grande sucesso devido ao acoplamento de uma PCR de emulsão de uma única molécula com o pirosequenciamento dos 580.000 pb do genoma de *Mycoplasma genitalia* com uma cobertura de 96% e uma acurácia de 99,96% em uma única corrida de GS 20 (MARGULIES *et al.*, 2005).

Na PCR de emulsão, as amostras de DNA fita simples (fragmentos de DNA genômico ou de bibliotecas de cDNA gerados por *shotgun*, ou amplicons, polidos para evitar extremidades coesivas) são previamente ligados a adaptadores específicos. Em seguida, são misturadas a uma população de nanoesferas de agarose que contem oligonucleotídeos complementares aos adaptadores, de forma que, por titulação, cada nanoesfera se ligue a apenas um tipo de fragmento de DNA. Cada complexo fragmento-nanoesfera é isolado em micelas individuais de óleo e água. Cada micela contem todos os reagentes necessários para uma PCR. A PCR de emulsão das micelas produz, então, milhões de cópias de um mesmo fragmento de DNA na superfície de cada nanoesfera.

Cada fragmento do mesmo tipo amplificado em uma única nanoesfera é sequenciado em massa e de forma paralela. Isso acontece porque as nanoesferas são colocadas em poços de 44 µm de diâmetro x 50 µm de altura de uma placa de picotitulação (PicoTiter Plate - PTP) (Figura 4) (ROCHE\_DIAGNOSTICS\_CORPORATION, 2012). Em cada poço da PTP só cabe uma única nanoesfera. Atualmente, uma PTP pode ter até cerca de 1.500.000 poços. A disposição dos poços permite uma localização cartesiana fixa e uma monitoração das reações que ocorrem dentro deles. Esferas menores, contendo as 4 enzimas da reação de pirosequenciamento, são adicionadas à PTP e a mistura é centrifugada. A placa é colocada em no sequenciador e a PTP passa a ser uma célula de fluxo na qual cada dNTP é adicionado por ciclo. Em cada ciclo, após reação da polimerase, e, portanto, a incorporação do dNTP, uma imagem é registrada pela câmera de CCD, que capta a luz emitida por cada nanoesfera. Os primeiros 4 nucleotídeos dos adaptadores ligados aos *primers* de sequenciamento são sempre dTdTdCdGdA. Isso foi determinado para que se possa calibrar o instrumento, a fim de que ele reconheça a luz emitida em cada poço após a incorporação de um único dNTP. Da mesma forma, a adição de dNTP nos ciclos segue a mesma ordem, um dNTP por vez, o que facilita a análise dos dados pelo instrumento, e a atribuição do nome da base em cada posição, chamada de *base calling*

(AHMADIAN *et al.*, 2006; ANSORGE, 2009; HENSON *et al.*, 2012; MARDIS, 2008; ROCHE\_DIAGNOSTICS\_CORPORATION, 2012).

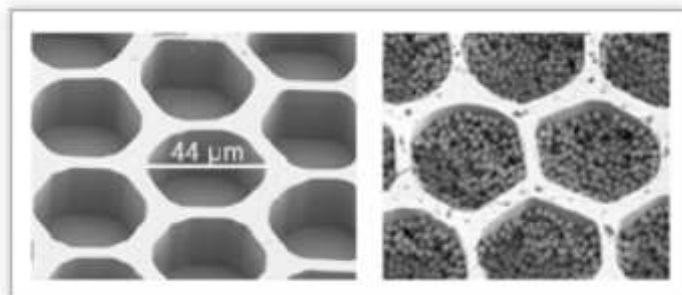


Figura 4. Micrografia eletrônica da placa de pico-titulação (*Picotiter plate*) para pirosequenciamento, na qual esferas de reação de sequenciamento são colocadas nos poços de 44 μm de diâmetro. Foto retirada do *website* 454 Sequencing da empresa Roche ([www.454.com](http://www.454.com)).

No ano de 2007, a empresa Roche Diagnostics comprou a 454 Life Sciences, e lançou a plataforma 454 GS FLX (PAREEK *et al.*, 2011). Esta plataforma conseguia produzir em uma corrida de 10 horas 500.000 sequências (*reads*) de cerca de 250 nucleotídeos por um custo muito baixo em relação aos métodos clássicos. Após o lançamento da plataforma 454 GS FLX com reagentes da série Titanium, o número de nucleotídeos por sequência passou para até 400 e o número de sequências por corrida chegou a 1.000.000. Atualmente, o sistema GS FLX Titanium XL+ promete uma leitura de até 1000 nucleotídeos por sequência numa corrida de 23 horas, com uma acurácia de 99,997% (ROCHE\_DIAGNOSTICS\_CORPORATION, 2012).

O uso do pirosequenciamento trouxe muitas vantagens aos estudos de genômica e transcritômica. É um método de maior acurácia, que garante maior cobertura de sequenciamento, em menor tempo e com um custo menor. Além disso, não necessita de uma etapa de clonagem em vetores, que normalmente produz um viés de sequências menores, preferencialmente clonadas. A incorporação de cada nucleotídeo é específica, por ciclo, garantindo uma diminuição de erros de substituição nas sequências. Apesar de gerar sequências menores que os clássicos sequenciadores com capilares, o tamanho é de cada fragmento multiplicado pela cobertura de sequenciamento é suficiente para obter um genoma bacteriano completo em um só corrida (PAREEK *et al.*, 2011).

Algumas características do processo do pirosequenciamento são indesejáveis e metodologias de tratamento da amostra ou até outros métodos de sequenciamento devem ser utilizados dependendo do tipo de informação que se deseja. Uma biblioteca de cDNA

gerada por RT-PCR, por exemplo, quando sequenciada, pode não conter as sequências dos transcritos menos representados, exigindo uma etapa de normalização (BOGDANOVA *et al.*, 2008; LAI *et al.*, 2012). Outro problema é a presença sequências de DNA ricas em homopolímeros. Acima de 6 nucleotídeos seguidos iguais, o instrumento de 454 é incapaz de diferenciar o número de nucleotídeos incorporados, gerando erros de inserção ou deleção durante o *base calling*. Um maior erro de *base calling* também ocorre nas extremidades 3' das sequências (HUSE *et al.*, 2007; MILLER *et al.*, 2010).

### c. Noções de Bioinformática para Pirosequenciamento 454

A montagem de um genoma ou transcrito é uma estrutura de dados hierárquica que mapeia os dados de uma sequência, agrupando *reads* em *contigs*, e, no caso de genomas, *contigs* em *scaffolds*. *Contigs* são formados por um alinhamento múltiplo de sequências de *reads* com uma sequência consenso, quando esta existir. *Scaffolds* definem a ordem dos *contigs* e sua orientação, além do tamanho dos *gaps* (espaços gerados por sequências não definidas) entre os *contigs*. Para organismos modelo, ou com um genoma ou transcrito de referência, o método de montagem de um transcrito geralmente é menos complicado. No entanto, a quantidade de dados de transcrito de organismos não modelo tem aumentado (KUMAR; BLAXTER, 2010), especialmente insetos. Com o advento das metodologias NGS, a montagem *de novo* de transcritos teve como desafio o desenvolvimento de ferramentas computacionais capazes de processar sequências pequenas. As tecnologias atuais de sequenciamento de DNA compartilham da limitação de que o tamanho dos *reads* são bem menores que os genomas e ou transcritos dos quais fazem parte. Por essa razão, o pirosequenciamento 454 é muito utilizado para transcritos devido ao tamanho maior dos *reads*, até 700 pb, quando comparado com outras tecnologias NGS. O formato mais aceito para montagem com as diversas ferramentas disponíveis é o *.fasta*. Para os *reads* 454 de um transcrito, as ferramentas mais utilizadas para montagem *de novo* são CAP3 (HUANG; MADAN, 1999), MIRA (CHEVREUX *et al.*, 2004), Newbler (Roche), Seqman NGen (DNASStar), CLC bio, e a aplicação web EGAssembler (MASOUDI-NEJAD *et al.*, 2006).

Alguns desafios foram gerados pelas técnicas NGS no estudo de transcritos, que precisam ser solucionados pelas ferramentas de bioinformática para que a montagem gere

*contigs* confiáveis. Além do já citado menor tamanho dos *reads*, transcritomas contêm dados de transcritos com os mais diversos níveis de expressão. Esta é uma característica facilmente resolvida pela normalização do nível de expressão dos transcritos. Mas a normalização nem sempre é interessante experimentalmente, como no caso de transcritômica comparativa.

A presença de regiões repetitivas e de homopolímeros pode levar a erros de montagem. Por exemplo, qualquer ferramenta tolera uma certa margem de erro no alinhamento para evitar perder *reads* que aparentemente não se sobrepõem. Esta tolerância de erro pode levar a montagens quiméricas em regiões de homopolímeros. Por isso a cobertura do sequenciamento de uma base deve ser alta, isto é, o número de *reads* que se alinham contendo uma determinada base deve ser alto.

#### d. Transcritomas de Insetos

Insetos representam mais de um milhão de espécies descritas. Apesar da grande diversidade de espécies e da importância dos insetos, em especial como vetores de doenças e pragas agrícolas, faz-se necessário um aumento dos recursos disponíveis atualmente para estudos de biologia molecular de insetos, para melhor entender sua fisiologia e bioquímica, e para que seja possível encontrar novas moléculas para uso como ferramentas biotecnológicas de controle.

O primeiro genoma completo de um inseto, o da mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, foi publicado há mais de 10 anos pelos cientistas do projeto genoma humano utilizando sequenciadores com capilares baseado na tecnologia de Sanger (ADAMS *et al.*, 2000). Desde então, com o desenvolvimento das tecnologias de NGS, pouco mais de 40 genomas de insetos foram sequenciados completamente e disponibilizados em bancos de dados. Com o avanço dessas tecnologias, especialmente com tecnologia desenvolvida pela empresa Solexa, depois comprada pela empresa Illumina (MARDIS, 2008), alguns genomas foram re-sequenciados, como os das espécies *D. melanogaster* e *Bombyx mori* em projetos de sequenciamento de populações diferentes (TURNER *et al.*, 2011; XIA *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2012).

Ainda que as tecnologias de NGS tenham facilitado bastante o sequenciamento de genomas completos, é na área da genômica funcional que essas tecnologias somam o maior



número de trabalhos publicados. O sequenciamento de transcritomas de vários organismos produz uma grande quantidade de informações sobre a expressão e a regulação de genes de um organismo em determinadas regiões do corpo, tecido ou célula, durante um determinado processo fisiológico ou em uma situação específica, como estresse, por exemplo.

A utilização de pirosequenciamento para estudo de transcritomas tem sido utilizada em preferência aos outros tipos de NGS quando o organismo estudado não tem um genoma sequenciado como referência. Isso se dá porque a montagem dos transcritomas após o sequenciamento se torna mais difícil quando o tamanho das sequências é pequeno, em torno de 100 nucleotídeos, como no caso das plataformas de sequenciamento das empresas Illumina (HiSeq 2000, HiScan) ABI (SOLiD 5500xl), Polonator (G.007), Helicos (Heliscope), Visigen Biotechnologies (FRET base-específico), Life Technologies/Ion torrente systems (sequenciamento baseado em semicondutor iônico), entre outros (MILLER *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011). Apesar disso, existem genomas montados *de novo* com essas tecnologias, como o genoma do panda, sequenciado completamente com tecnologia Illumina (LI *et al.*, 2010).

Após a introdução das técnicas NGS, a análise de transcritomas se tornou rápida e mais eficiente. É possível detectar e identificar microRNAs, regiões 3' e 5' não traduzidas e mRNAs completos (LEGRAND *et al.*, 2010, SHIN *et al.*, 2008).

De forma mais específica, o estudo de transcritomas de insetos tem sido empregado para avaliar o perfil de expressão de genes para um determinado uso biotecnológico e se tornou uma ferramenta efetiva para a busca de moléculas candidatas, potenciais para uso no controle da população de insetos. Particularmente, a estratégia de pirosequenciamento utilizando 454 já foi utilizada para estudar transcritomas de insetos vetores de doenças, (HAHN *et al.*, 2009; LI, S. *et al.*, 2009; ZHANG, F. *et al.*, 2010; GREGORY *et al.*, 2011), metagenômica (WONG GREGORY *et al.*, 2011) e para analisar genes que codificam proteínas da hemolinfa e do intestino médio (ZOU *et al.*, 2008; PAUCHET *et al.*, 2009; DOSTALOVA *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2012; PASCUAL *et al.*, 2012; PENG *et al.*, 2011), e enzimas de vias metabólicas (KARATOLOS *et al.*, 2011; PAUCHET *et al.*, 2010; ZAGROBELNY *et al.*, 2009). Além disso, estudos de transcritoma foram feitos para prover pacotes de dados de ESTs de insetos modelos e não modelos (CAHAIS *et al.*, 2012; KEELING *et al.*, 2012; VERA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011).

## I.2. Materiais e Métodos

### a. Criação de Bicudo do Algodoeiro em Colônia

Ovos, larvas e insetos adultos de *A. grandis* foram criados no Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF. A colônia é alimentada com dieta artificial como descrito por Monnerat e colaboradores (MONNERAT, R.G. *et al.*, 2000; MONNERAT, R. G. *et al.*, 2002) e mantida a  $26 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas.

### b. Extração de RNA total

Para extração de RNA total de cada fase do inseto, foi determinado, na fase larval o número de instares pelo método de medição da cápsula encefálica. Larvas foram separadas ao eclodir do ovo e acompanhadas durante 12 dias em dieta artificial. A cada dia, a cápsula de 10 larvas foi medida em uma lupa em triplicata (30 larvas).

Foi extraído RNA total separadamente de cada uma das fases distintas de desenvolvimento do inseto: ovos, larvas (3 instares), pupa e adulto (macho e fêmea). A sexagem foi feita como descrito por Sappington e Spurgeon (2000).

Para extração de RNA, indivíduos de cada fase de desenvolvimento foram triturados em almofariz com pistilo, contendo N<sub>2</sub> líquido, conforme a tabela 3 (ver Resultados – Extração de RNA Total). A extração de RNA de ovos e larvas foi feita utilizando o reagente de Trizol (Invitrogen Life Technologies) de acordo com instruções do fabricante. A extração de RNA de pupas foi feita com o kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN). As amostras foram tratadas com 2U de DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen Life Sciences) por 30 minutos a 37 °C, de acordo com instruções do fabricante. Após etapa de limpeza em coluna do kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN) e verificação da qualidade em gel de agarose 1,5%, a concentração de RNA foi determinada em um fluorômetro Qubit, utilizando o kit Quant-iT RNA assay (Invitrogen Life Technologies). Foi feito um *pool* equimolar dos RNAs de cada fase do inseto e um total de 30 µg do *pool* de RNA foi enviado para síntese de cDNA e pirosequenciamento para a empresa Eurofins MWG Operon, em Huntsville, AL, USA (<http://www.eurofinsdna.com/>).

#### c. Construção e Normalização da Biblioteca de cDNA e Pirosequenciamento

De acordo com informações da empresa Eurofins, o RNA total foi analisado em um Agilent 2100 Bioanalyzer antes da purificação de mRNA. Para obtenção da biblioteca o cDNA foi sintetizado de um *pool* de quantidades iguais de RNA total de cada fase do inseto, numa reação de transcrição reversa utilizando *primers* randômicos. A síntese foi seguida da ligação de adaptadores 454 A e B (Roche 454 Life Sciences) nas extremidades 5' e 3' do cDNA. O cDNA foi amplificado utilizando uma enzima com mecanismo de verificação (*proof-reading*) e analisado em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos de nucleotídeos variaram em tamanho, de menos de 100pb até cerca de 5000pb e foram processados por *shotgun*. A biblioteca foi normalizada para reduzir a probabilidade de sequenciar apenas os transcritos mais abundantes (ZHULIDOV *et al.*, 2004). A normalização foi feita por um ciclo de desnaturação e reassociação lenta do cDNA, de acordo com o manual do fabricante. Moléculas de cDNA fita dupla reassociadas foram separadas das moléculas normalizadas de fita simples numa coluna de hidroxiapatita (FADROSH *et al.*, 2011). A biblioteca de cDNA normalizada foi amplificada por oito ciclos de PCR. Após purificação e análise em gel de agarose, o cDNA normalizado foi submetido ao pirosequenciamento 454 utilizando tecnologia GS FLX Titanium, de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante (Roche 454 Life Sciences), em uma corrida de meia placa.

#### d. Pré-processamento das Sequências

As sequências provenientes do pirosequenciamento (*reads*) foram enviados em formato *.sff* (*standard flow files*). Antes das etapas de montagem dos *contigs*, foi feito um pré-processamento utilizando o *pipeline* da ferramenta de bioinformática *est2assembly* versão 1.03 (PAPANICOLAOU *et al.*, 2009). Nesta etapa foram removidas as sequências de baixa qualidade, os adaptadores 454, e as extremidades poli-A<sup>+</sup>. Além disso, sequências de organismos contaminantes (procariotos, vírus, DNA mitocondrial, etc.) foram retiradas após análise por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) definida pelo usuário. Estes dados foram depositados no repositório SRA do National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob número de acesso SRA059959.

e. Montagem dos *contigs*, Anotação e Ontologia Gênica

As sequências contíguas (*contigs*) foram montadas utilizando o software MIRA v3.3.0.1 (CHEVREUX *et al.*, 2004) no modo *default*.

As buscas por homologia (BLASTX and BLASTN) de sequências únicas e a anotação funcional por termos de ontologia gênica (GO; [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)), InterPro (InterProScan, EBI), códigos de classificação enzimática (EC) e vias metabólicas (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) foram determinadas utilizando a ferramenta Blast2GO software suite v2.4.3 ([www.blast2go.org](http://www.blast2go.org)). As buscas por homologia foram realizadas de forma remota no servidor NCBI utilizando QBLAST. As sequências foram submetidas a alinhamentos contra o banco de dados não redundante (nr) de proteínas do NCBI via BLASTx, utilizando um limite de *E-value* de  $10^{-5}$  e selecionando as proteínas preditas com um mínimo de 20 aminoácidos. Para o mapeamento da ontologia, o programa extrai os termos GO associados com as homologias identificadas com QBLAST e retorna uma lista de anotações de GO representadas como categorias hierárquicas com especificidade crescente. Blast2GO permite uma seleção de nível de significância para uma taxa de falsos positivos (*False Discovery Rate* - FDR) que foi usada como um limite de 0,05% de nível de probabilidade. Os termos de GO foram modulados com a ferramenta de melhoramento de anotação (ANNEX), seguido da ferramenta GOSlim genérico disponível no Blast2GO ([goslim\\_generic.obo](http://www.blast2go.org/goslim_generic.obo)). GOSlim é um *subset* de vocabulário de ontologia gênica. Gráficos combinados foram construídos nos níveis 2, 3 e 5 das categorias *Biological Process* (Processo Biológico), *Cellular Component* (Componente Celular) e *Molecular Function* (Função Molecular), respectivamente. Os códigos de classificação enzimática e as anotações das vias metabólicas KEGG foram gerados do mapeamento direto dos termos de GO com os seus códigos enzimáticos equivalentes. As buscas de InterPro foram realizadas remotamente a partir do Blast2GO no servidor web InterProEBI. As configurações *default* do Blast2GO foram utilizadas em todos os passos da anotação.

Uma comparação entre a anotação do transcrito do bicudo com a do genoma do coleóptero *Tribolium castaneum* foi realizada utilizando a ferramenta WEGO (Web Gene Ontology Annotation Plotting - <http://wego.genomics.org.cn>) (YE *et al.*, 2006). Além disso, uma comparação dos acessos de pfam do genoma de *Drosophila melanogaster* e *Bombyx mori* com os acessos de pfam do transcrito de *A. grandis* foi realizada

construindo um Diagrama de Venn, com uma ferramenta livre oferecida pelo Laboratório de Bioinformática e Genômica Evolutiva do Departamento de Biologia de Sistemas de Plantas da Universidade de Gent, Bélgica (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

f. Análise *in silico* da Sequência do Domínio PAZ de *contigs*

Uma busca textual e por sequência foi feita no transcrito para as sequências de genes descritos na literatura envolvidos no mecanismo de RNAi, baseadas em sequências disponíveis no *Protein Database* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

Os dois maiores *contigs* contendo um domínio PAZ foram selecionados para comparação com domínios de outros organismos. A sequência do domínio PAZ da Argonauta2 de *Drosophila melanogaster* foi utilizada como modelo e todas as sequências alinhadas contêm o domínio PAZ completo, inclusive os *contigs* do bicudo. O alinhamento foi feito utilizando o Multiple Sequence Alignment do ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (LARKIN *et al.*, 2007) e editado com Jalview (<http://www.jalview.org/>) (WATERHOUSE *et al.*, 2009). Abaixo, seguem as sequências utilizadas para o alinhamento, mantendo o seu nome conforme o depósito no banco de dados de proteínas do NCBI.

>Ce\_Dicer1

```
DMSYTTINMKYVSEVVANMENMPRI PKDEVRRQYKFNADYKDAIVMPWYRNLEQPVFYYVAEILPEWRPSSKF
PDTHFETFNEYFIKKYKLEIYDQNSLLDVDF TSTRNLNLLQPRIQNQP
```

>Ce\_Alg1

```
SMPVIEFIAEVLELFPVQALAEERRALSDAQRVKFTKEIRGLKIEITHCGQMRRKYRVCNVTRRPAQTQTFPLQL
ETGQTIECTVAKYFYDKYRIQLKYPHLPCLQVGQEQKHTYLPPEVCNIV
```

>Ce\_Alg2

```
AMPVIEFVAEVLELFPVQALAEERRALSDAQRVKFTKEIRGLKIEITHCGAVRRKYRVCNVTRRPAQTQTFPLQL
ETGQTIECTVAKYFFDKYRIQLKYPHLPCLQVGQEQKHTYLPPEVCDIV
```

>Dm\_AGO2

```
VDISHKSFPI SMPMIEYLERFSLKAKINNTNLDYSRRFLEPFLRGINVVYTPPQSFQSAPRVYRVNGLSRAP
ASSETFEHDGKKVTIASYFHSRNYPLKFPQLHCLNVGSSIKSILLPIELCSIEEGQALNRKDGATQVANMIKY
AATS
```

>Dm\_AGO1C

```
FYKAQPFVIDFMCEVLDIRDINEQRKPLTDSQRVKFTKEIKGLKIEITHCGQMRRKYRVCNVTRRPAQMOSFPL
QLENGQTVECTVAKYFLDKYRMKLRYPHLPCLQVGQEHKHTYLPPEVCNIVAGQRCIKKLTDMQTSTMIKATA
RS
```

>At\_AGO  
STAFIEANPVIQFVCDLLNRDISSRPLSDADRVKIKKALRGVKEVTHRGNMRRKYRISGLTAVATRELTFFV  
DERNTQKSVVEYFHETYGFRIQHTQLPCLQVGNRNPNYLPMEVCKIVEGQRYSKRLNERQITALLKVTQCR

>At\_AGO1  
HSSFRPTHGGLSLNIDVSTTMILEPGPVIEFLKANQSVETPRQIDWIKVAAKMLKHMVRKATHRNMEFKIIGL  
SSKPCNQQLFSMKIKDGEREVPIREITVYDYFKQTYTEPISSAYFPCLDVGKPDPRPNYLPLEFCNLVSLQRYT  
KPLSGRQRVLLVSSRQK

>Hs\_Ago1  
FYKAQPFVIEFMCEVLDIRNIDEQPKPLTDSQRVRFTEIKGLKVEVTHCGQMRRKYRVCNVTRRPASHQTFPL  
QLESGQTVECTVAQYFKQKYNLQLKYPHLPCLQVQEQKHTYLPLEVCNIVAGQRCIKKLTNDQSTMIKATA  
RS

>Sp\_Ago1  
ISSSAFWRNDSSLQILMEYTDSCSNVRDLTRFDLKRLSRKFRLKVTQHRNNVGTDLANRVYSIEGFSSKSAS  
DSFFVRRNLNGEEQKISVAEYFLENHNVRQLQYPNLPCILVKNGAMLPFIEFCFVVKGQRYTAKLNSDQTANMIRF  
AVQR

>Dm\_Dicer-1  
VKAPAGGKHIDWQFLELIQANGTMPRAVPDEERQAQPFDPQRFQDAVVMWPYRNQDQPPYFYVAEICPHLSP  
LSCFPDGNRYRTFKHYLVKYGLTIQNTSQPLLDVDHTSARLNFLTFRYVNRKGVALPTSSEETKRAKRENLEQ  
KQILVPELCTVHPFPASLWRTAVCLPCILYRINGLL

>Hs\_Dicer-1  
PLNVVNDSSSTLDIDFKFMEDIEKSEARIGIPSTKYTKETPFVFKLEDYQDAV IIPRYRNFDQPHRFYVADVYT  
DLTPLSKFSPSEYETFAEYKTKYNLDLTNLNQPLLDVDHTSSRLNLLTPRHLNQKGGKALPLSSAEKRKAKWE  
SLQNKQILVPELCAIHPIPASLWRKAVCLPSILYRLHCLL

>At\_Dicer-like-1  
ASFVVRASGLLPVRDAFEKEVEEDLSKGLMMADGCMVAEDLIGKIVTAAHSGKRFYVDSICYDMSAETSFP  
RKEGYLGPLEYNTYADYKQKYGVDLNCKQQPLIKGRGVSYCKNLLSPRFEQSGESETVLDKTYVFLPPELC  
VVHPLSGSLIRGAQRLPSIMRRVESML

>A\_grandis\_454\_c1018  
REELGADFWSNLEKLIKNVKVTNHRSPNNRELSFKVSGILQQPASSVMFEIEDKRQSVAEYFAAAYKPLTYP  
NLPVVVVKKRGMTLFFPIEVLDLHDGQKYQKK

>A\_grandis\_454\_c4142  
EEEDYLTQYQTSSEKLLYFLRIARXETKHTNFPKPKFKISGILSKSANEITFMKDDKEISVAEYFASVYGPLKN  
PNYPVAIVKKQKESFFPIEVLKIC

### I.3. Resultados e Discussão

#### a. Determinação dos Instares na Fase Larval do bicudo

Como não foi descrito um método de determinação de instares nos estágios larvais de *A. grandis*, fez-se necessário defini-los antes da extração de RNA. O método mais confiável e comumente utilizado para coleópteros é a medição da cápsula encefálica, ainda que outros parâmetros possam ser utilizados para algumas espécies (LOGAN *et al.*, 1998; CALVO; MOLINA, 2008; HAMMACK *et al.*, 2003; PANZAVOLTA, 2007). No caso do

bicudo do algodoeiro, foi possível determinar 3 grupos com tamanhos diferentes de cápsula encefálica, e 3 instares foram determinados (Tabela 2). Interessante notar que as larvas passaram mais tempo no 3º instar. As mudas ocorreram do segundo para o terceiro dia, e do quinto para o sexto dia após a eclosão. Com 12 dias, as larvas já estão em um estágio de pré-pupa.

Tabela 2. Determinação de instares de larvas de bicudo baseada no tamanho da cápsula encefálica. O número de dias em que a larva permanece em cada instar também foi determinado

Instar	Tamanho da capsula encefálica (mm)	Dias
1	0.32±0.038	2-3
2	0.53±0.023	2-3
3	1.03±0.054	6-8

b. Extração de RNA Total, Pirosequenciamento e Pré-processamento das sequências (*reads*)

A figura 5 mostra um gel de agarose com as frações de RNA total de cada fase do bicudo do algodoeiro. Todas as amostras foram extraídas com Trizol, exceto o RNA de pupas. Todas as vezes que foi tentada esta metodologia com pupas houve degradação do RNA. Por isso, foi testado o kit RNeasy (QIAGEN). Para as primeiras fases de desenvolvimento do bicudo, como ovos e 1º e 2º instares, muitos indivíduos foram necessários para conseguir cerca de 5 µg de RNA total partindo de 1mL de Trizol (Tabela 3). No caso dos das pupas e adultos, o uso de mais que 5 indivíduos provocou a degradação do RNA com os protocolos utilizados. O mesmo aconteceu com as larvas de 3º instar, quando utilizadas mais de 20 indivíduos.

Conforme já descrito por Winnebeck e colaboradores (2010), o perfil de RNA total de insetos observado em gel de agarose, com mais de duas bandas definidas, geralmente reflete os componentes endógenos presentes de RNA ribossômico mais do que um perfil de degradação causado pela extração. A falta de conhecimento sobre a composição das subunidades de RNA ribossômico, que difere entre os organismos, leva geralmente a uma interpretação errada nos experimentos diários de laboratório. Uma análise em um equipamento como BioAnalyzer (Agilent) é mais eficaz para certificar a integridade do RNA. Nos resultados aqui apresentados essa análise foi feita pela empresa Eurofins MWG Operon ([www.eurofinsdna.com](http://www.eurofinsdna.com)). O número de integridade do RNA (RIN - *RNA Integrity*

*Number*) para a amostra foi de 8,8. É aconselhável para obtenção de bibliotecas de cDNA, que o RIN esteja acima de 8,0. De acordo com a empresa, por controle de qualidade, abaixo desse valor, não é realizado o serviço de pirosequenciamento.

Da biblioteca de cDNA submetida ao pirosequenciamento, após uma corrida com meia-placa na plataforma 454 GS FLX Titanium (Roche), foram sequenciadas 179.676.724 pares de bases, gerando 576.297 *reads* (Tabela 4). Este número pode ser considerado muito bom, uma vez que uma corrida com placa completa tinha capacidade de gerar 1.200.000 *reads*. Após o pré-processamento, 310.182 *reads* foram utilizados para montagem. Esse número de *reads* após o pré-processamento é o primeiro indicador de validação da qualidade do RNA e da biblioteca de cDNA. Apesar da diferença no número de *reads*, a quantidade de bases após o processamento não caiu muito, mostrando que os *reads* não selecionados eram muitos, porém de menor tamanho (Tabela 4). O tamanho médio dos *reads* também não alterou muito.

As sequências (*reads*) enviadas após o pirosequenciamento foram analisadas segundo o *pipeline* descrito por Papanicolaou e colaboradores (2009). Os *reads* foram enviados em formato *.sff*, arquivos binários contendo uma identificação (ID), as sequências de nucleotídeos, os valores de qualidade para cada base e o sinal de intensidade. Estes arquivos foram convertidos e salvos em formatos (*.fasta*, *.fna*, *.qual*, e outros) para serem lidos em outros softwares e ferramentas de bioinformática para montagem e anotação do transcrito. A figura 6 mostra um exemplo de dados de um arquivo *.qual* no qual a cada base está atribuída um valor de qualidade com o máximo de 40. Estes valores ajudam a determinar, por exemplo, se o *base calling* de determinada sequência é confiável quando comparada com outros *reads* da mesma região do transcrito.

Durante o pré-processamento, regiões contaminantes, determinadas por BLASTx foram “mascaradas” nos arquivos de sequências. Sequências com e-value limite superior de  $10^{-5}$  que alinhavam com proteínas de procariotos e vírus foram separadas da montagem. Além disso, as sequências de adaptadores 454 utilizados, bem como as extremidades poli-T/A, RNA ribossomal, DNA mitocondrial foram retiradas e não foram para a etapa seguinte de montagem.



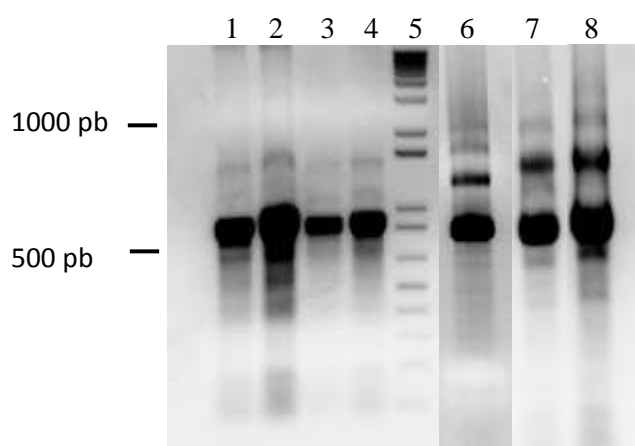


Figura 5. Gel de agarose com amostras de RNA total das diversas fases de desenvolvimento do bicudo. 1 - Ovo; 2, 3 e 4 – Larvas de 1º, 2º e 3º instares; 5 – Marcador 1kb plus (Invitrogen); 6 – Pupa; 7 – Adulto Macho; 8 – Adulto Fêmea.

Tabela 3. Quantidade de RNA extraído por fase de desenvolvimento do Bicudo

<b>Fase de desenvolvimento</b>	<b>Número de indivíduos</b>	<b>RNA total antes da limpeza (µg)</b>	<b>RNA total após limpeza (µg)</b>
<b>Ovos</b>	>1000	3720	1950
<b>1º Instar</b>	>500	3860	1650
<b>2º Instar</b>	50	5612	3000
<b>3º Instar</b>	20	3320	1237
<b>Pupa</b>	20	5990	4250
<b>Adulto Macho</b>	5	3580	1650
<b>Adulto Fêmea</b>	5	3940	2100



c. Montagem e Anotação do transcrito

A montagem do transcrito foi feita utilizando a ferramenta MIRA3. A partir dos 310.182 *reads* utilizados, 20.384 *contigs* foram montados por alinhamento (Tabela 4). O tamanho médio dos *contigs* foi de 676pb, sendo que a maioria se encontra entre 300 e 750pb (Figura 7). A média de cobertura de um *read* por *contig* foi de 9,58, considerada boa para transcritos de organismos que não são modelo e não possuem referência para montagem de sequência.

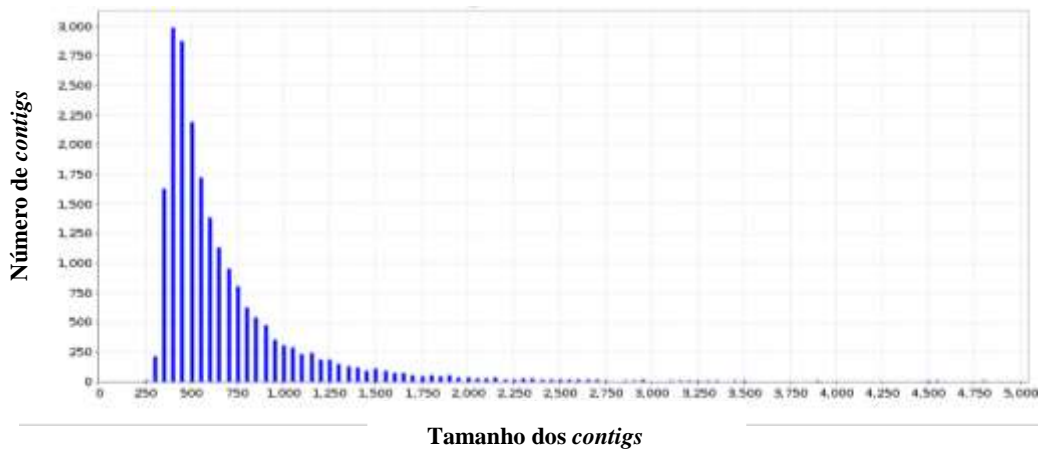


Figura 7. Distribuição dos *contigs* por tamanho. Um maior número de *contigs* tem menos de 1000pb.

Após a montagem dos *reads*, os *contigs* foram submetidos a uma busca por similaridade com a ferramenta BLASTx, contra o banco de dados não redundante (nr) do NCBI. Cerca de 10.600 *contigs* tiveram pelo menos um hit contra nr (Tabela 4). Destes, 84,9% mostraram alinhamento de BLASTx significativo com um limite de e-value  $\leq 10^{-3}$  (Figura 8). *Contigs* com e-value igual 0 foram representados no limite direito do gráfico, e correspondem a 2,5% dos *contigs*.

A figura 9 mostra as principais espécies representadas após a busca de similaridade com BLASTx. Como já era esperado, 65,7% dos *contigs* foram similares a sequências de *Tribolium castaneum*. *T. castaneum* (besouro castanho) é o mais importante coleóptero da família *Tenebrionidae* porque ataca grãos e seus produtos armazenados, gerando grandes perdas para a agricultura após a colheita. Até agora, é o único coleóptero que possui um genoma completo sequenciado (RICHARDS *et al.*, 2008), o que explica o maior número de *contigs* de *A. grandis* com similaridade com sequências de *T. castaneum*.

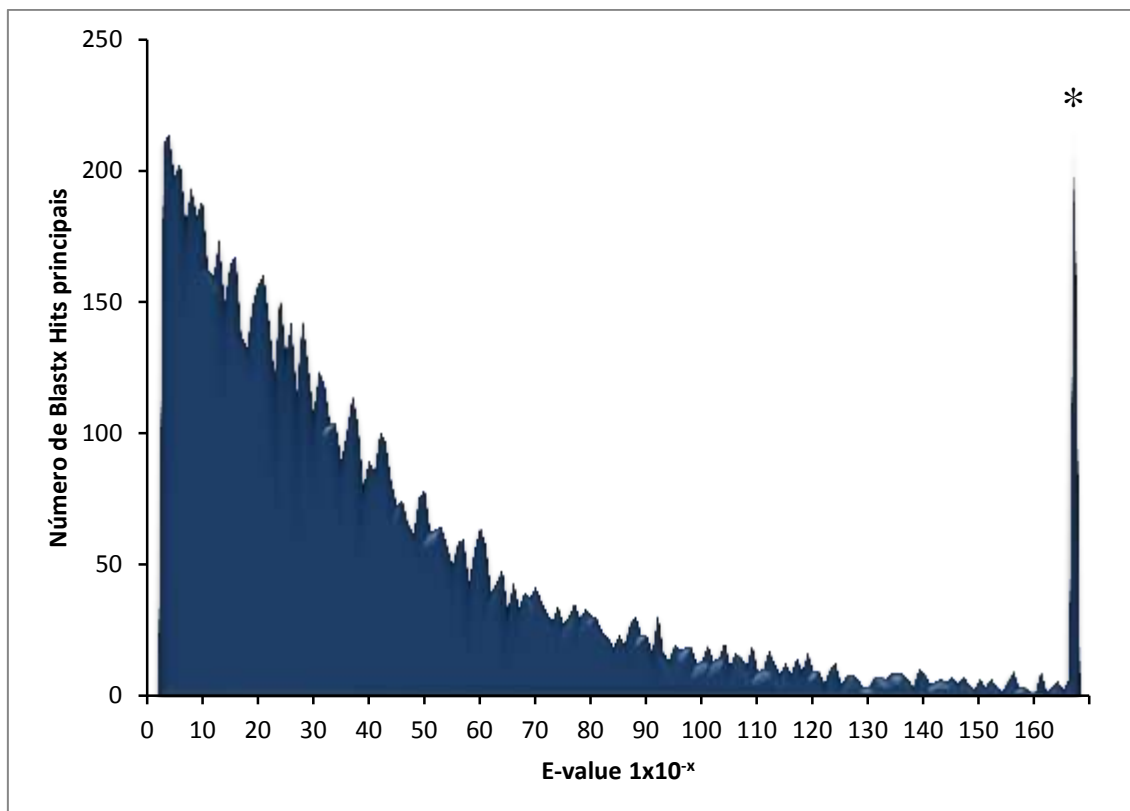


Figura 8. Valores de e-value para os principais hits de BLASTx. *Hits* com e-value igual a 0 estão representados em um pico no lado direito do gráfico (\*).

As três seguintes espécies com maior número de sequências similares são fungos. Outros trabalhos com pirosequenciamento de transcritomas de insetos relatam um número de *contigs* contaminantes do filo Microsporidia. *Nosema* é um gênero de microsporídios conhecido por parasitar um grande número de artrópodes. As ordens de insetos parasitadas incluem Orthoptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera. É uma contaminação muito comum em colônias laboratoriais de bicudo do algodoeiro, e é encontrada geralmente no intestino médio do inseto (MCLAUGHLIN, 1966).

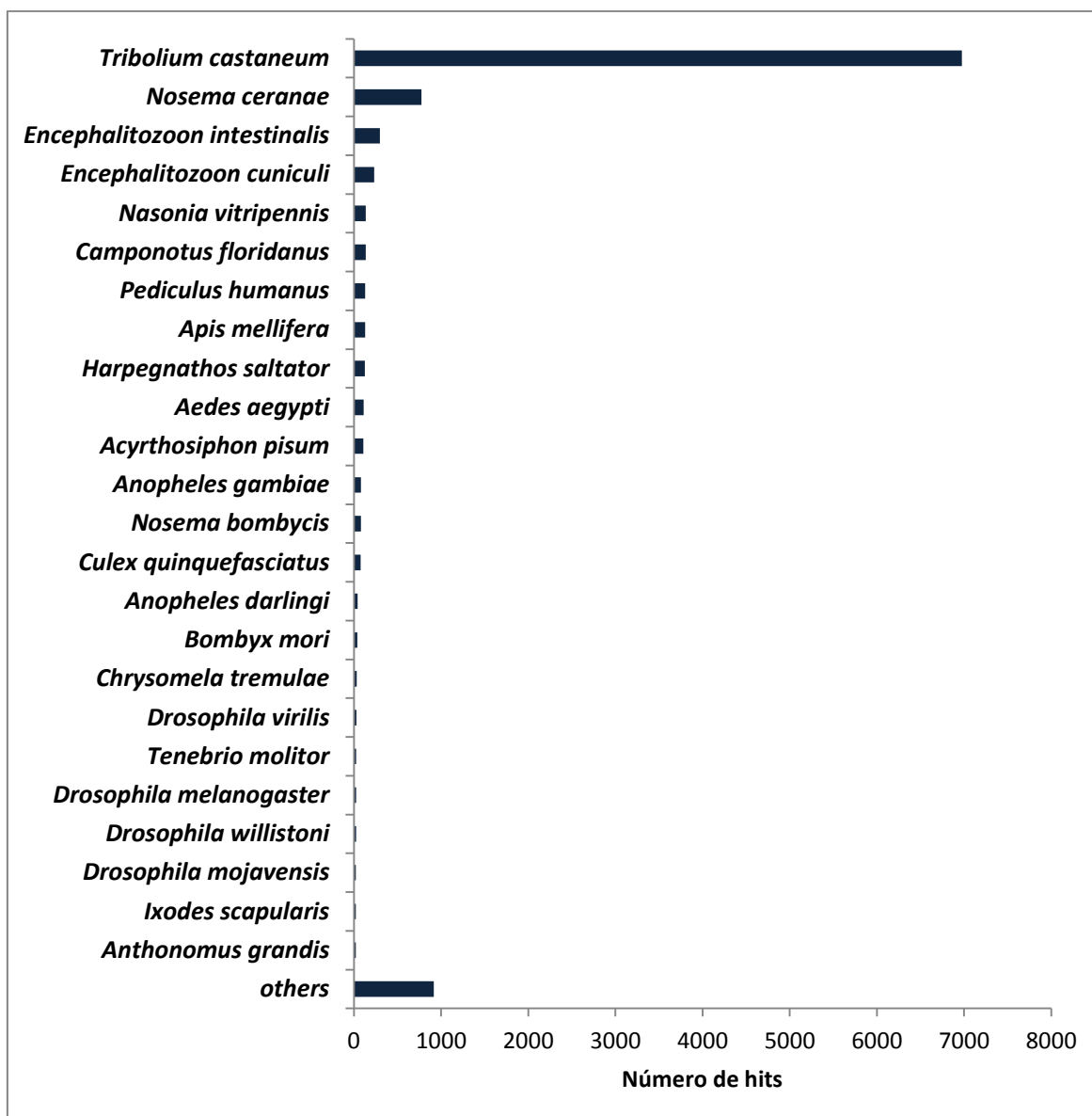


Figura 9. Espécies com principais *hits* após BLASTx. O maior número de *contigs* teve similaridade alta com *Tribolium castaneum*.

A espécie de microsporídeo mais estudada, com genoma completo sequenciado, é *Nosema ceranae*, que causa micose sistêmica em abelhas e grande perda para a apicultura (COX-FOSTER *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008). O gênero de microsporídeo *Encephalitozoon* também é descrito em associação simbiótica com insetos (AGNEW *et al.*, 2003; LANGE *et al.*, 2009). Por ser muito importante para a saúde humana, 7 projetos de sequenciamento de genoma de 3 espécies de *Encephalitozoon* foram depositados no NCBI Genome Bank. As sequências de microsporídios encontradas no transcrito do bicudo sugerem que a colônia de criação dos insetos estava contaminada e alguns dos seus

ESTs foram sequenciados e bem anotados devido ao grande número de sequências disponíveis nos bancos de dados para esses fungos.

A maior parte dos *contigs* do transcrito do bicudo são similares a sequências de insetos. Além do coleóptero *Tribolium castaneum*, as outras espécies com genoma completo sequenciado, apesar de filogeneticamente mais distantes, estão distribuídas nas ordens Hymenoptera (*Nasonia vitripennis*, *Camponotus floridanus*, *Apis mellifera*, *Harpegnathos saltator*), Phthiraptera (*Pediculus humanus*), Diptera (*Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles darlingi*, *Drosophila virilis*, *Drosophila willistoni*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila mojavensis*), Hemiptera (*Acyrtosiphon pisum*), and Lepidoptera (*Bombix mori*). Os coleópteros *Tenebrio molitor* and *Chrysomela tremulae* também estão entre as espécies com maior número de sequências similares, mas com um número mais baixo, provavelmente por não existirem dados de genoma sequenciado.

O transcrito de *A. grandis* foi anotado por ontologia gênica associada a dados de proteínas do InterPro, utilizando Blast2GO (GOTZ *et al.*, 2008). Uma vez que os termos GO nos programas e ferramentas são descritos e gerados na língua inglesa, eles serão mantidos assim na descrição destes resultados. Para agrupar as proteínas com seus termos GO associados, os termos de nível mais alto pra cada categoria GO *Molecular Function*, *Biological Process* e *Cellular Component* foram registrados em diferentes níveis de associação. Os termos dominantes para *Molecular Function* foram claramente *transporter activity* e *binding*, enquanto que o termo dominante para *Biological Process* é *pigmentation*. Dentro da categoria *Cellular Component* os termos dominantes foram *organelle*, *cell part* e *organelle part* (Figura 10 A, B e C).

Uma classificação funcional mais detalhada dos *contigs* pode ser obtida na tabela 5, com as 35 categorias mais representadas de InterPro. O número de IPR (IPR016040) mais representado corresponde ao domínio de ligação a NAD(P). Chaperonas, domínios de ligação a ácidos nucleicos e relacionados a estresse oxidativo constituem a maior parte das entradas de InterPro, o que está de acordo com os termos GO agrupados anteriormente descritos.

Tabela 5. Principais categorias de proteínas representadas no transcrito do bicudo

<b>Nº de Acesso de entrada no InterPro</b>	<b>Nº de Contigs</b>	<b>Nome da categoria de InterPro</b>
IPR016040	154	NAD(P)-binding domain
IPR011009	145	Protein kinase-like domain
IPR016196	116	Major facilitator superfamily domain, general substrate transporter
IPR011046	110	WD40 repeat-like-containing domain
IPR015943	101	WD40/YVTN repeat-like-containing domain
IPR015880	94	Zinc finger, C2H2-like
IPR012677	88	Nucleotide-binding, alpha-beta plait
IPR016024	84	Armadillo-type fold
IPR000504	83	RNA recognition motif domain
IPR001680	79	WD40 repeat
IPR012336	77	Thioredoxin-like fold
IPR007087	73	Zinc finger, C2H2
IPR017853	73	Glycoside hydrolase, superfamily
IPR002198	67	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
IPR013781	67	Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic domain
IPR009003	66	Peptidase cysteine/serine, trypsin-like
IPR001254	65	Peptidase S1/S6, chymotrypsin/Hap
IPR011992	59	EF-hand-like domain
IPR001650	55	Helicase, C-terminal
IPR000618	54	Insect cuticle protein
IPR001128	54	Cytochrome P450
IPR001611	49	Leucine-rich repeat
IPR002290	45	Serine/threonine- / dual-specificity protein kinase, catalytic domain
IPR002018	44	Carboxylesterase, type B
IPR009057	44	Homeodomain-like
IPR011989	44	Armadillo-like helical
IPR011990	44	Tetratricopeptide-like helical
IPR016027	44	Nucleic acid-binding, OB-fold-like
IPR015424	42	Pyridoxal phosphate-dependent transferase, major domain
IPR003959	41	ATPase, AAA-type, core
IPR012340	41	Nucleic acid-binding, OB-fold
IPR002557	40	Chitin binding domain
IPR009072	40	Histone-fold
IPR011701	40	Major facilitator superfamily
IPR001353	39	Proteasome, subunit alpha/beta

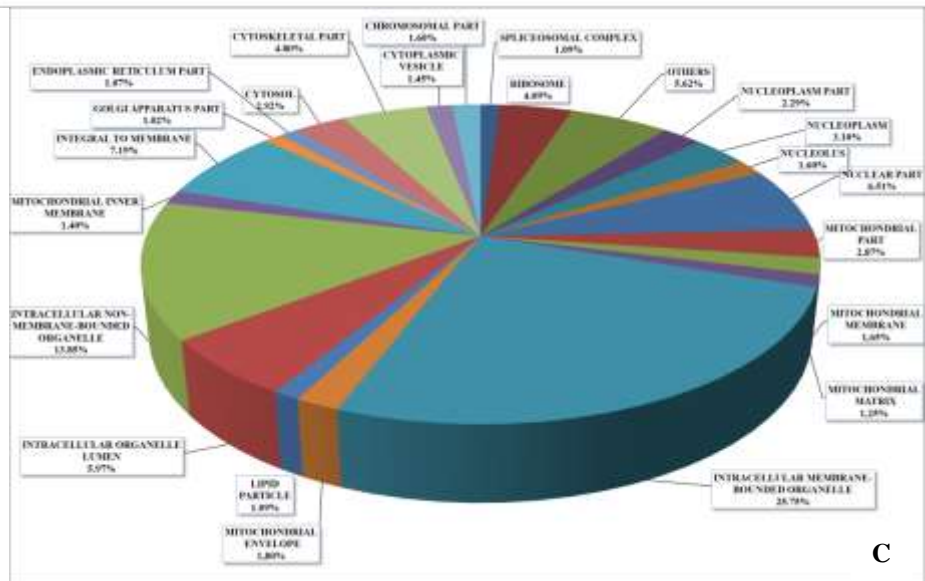
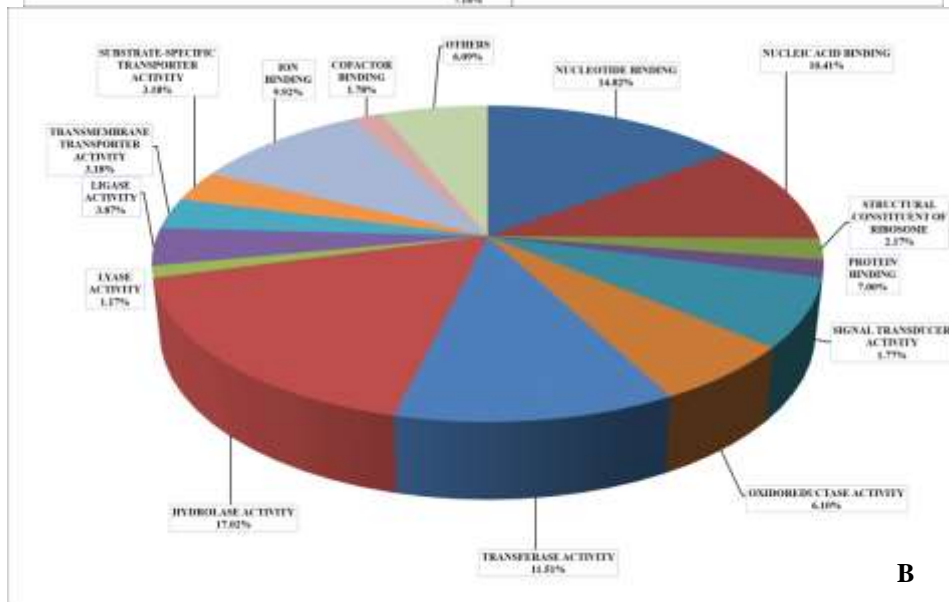
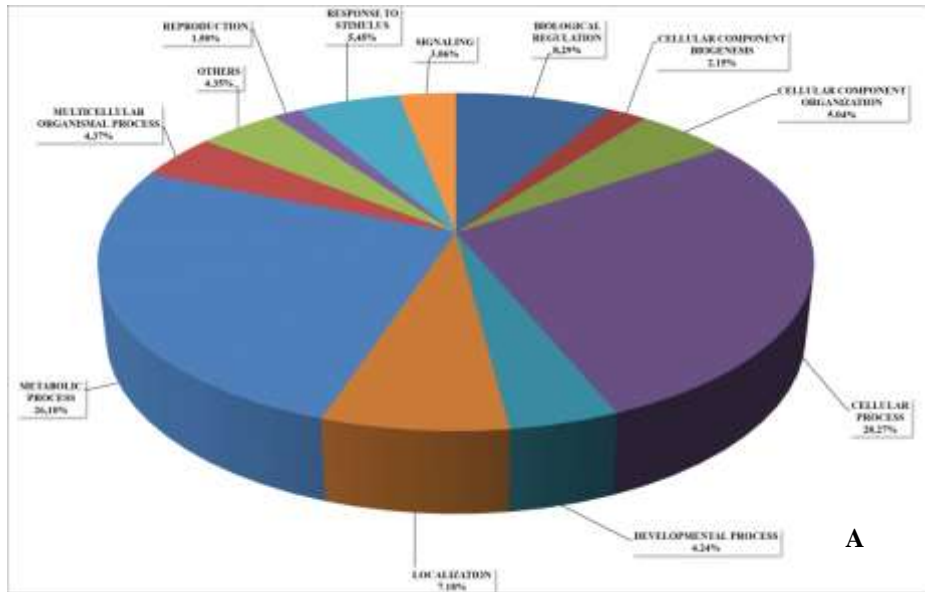




Figura 10 (Página anterior). Categorias de ontologia gênica (GO) para o transcrito de *A. grandis*. Os termos foram classificados nos níveis 2, 3 e 5 nas categorias (A) *Biological Process* (Processo Biológico), (B) *Molecular Function* (Componente Celular) e (C) *Cellular Component* (Função Molecular), respectivamente. A porcentagem de *contigs* em cada termo está representada.

Uma validação da anotação e dos termos GO foi feita utilizando WEGO (Web Gene Ontology Annotation Plot) para visualizar e comparar os resultados de bicudo com a anotação do genoma de *Tribolium* (Figura 11). Um número similar de genes foi anotado para os mesmos termos de GO em ambos os insetos para uma determinada categoria e diferenças significantes não foram notadas. Este resultado mostra que a montagem e anotação *de novo* para *A. grandis* é comparável à anotação do genoma de *T. castaneum*. Com isso, foi cumprido o objetivo de gerar um banco de dados que descreve uma parte significativa e representativa do transcrito do bicudo do algodoeiro.

Uma comparação das entradas de pfam (banco de famílias de proteínas do InterPro) do transcrito de *A. grandis* com os dados de pfam dos transcritos de *Drosophila melanogaster* e *Bombyx mori* extraídos do Flybase (<http://flybase.org/>) (MCQUILTON *et al.*, 2012) e Silkbase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>) (MITA *et al.*, 2003), respectivamente, foi realizada para estabelecer uma sobreposição genética simplificada entre as três espécies. O baixo número de sequências de *A. grandis* que não são similares nem às sequências de *D. melanogaster* nem *B. mori* (Figura 12) é provavelmente devido à soma de *contigs* representando genes específicos, não muito conservados ou *reads* sequenciados erroneamente. Além disso, a similaridade de famílias proteicas é maior com *Drosophila* (Diptera) do que com *Bombyx* (Lepidoptera). Este resultado é importante porque a quantidade de dados de interação planta-praga é muito maior para lepidópteros do que para dípteros, o que leva geralmente os pesquisadores a buscarem sequências ortólogas de coleópteros pragas de plantas em bancos de lepidópteros e não de dípteros.

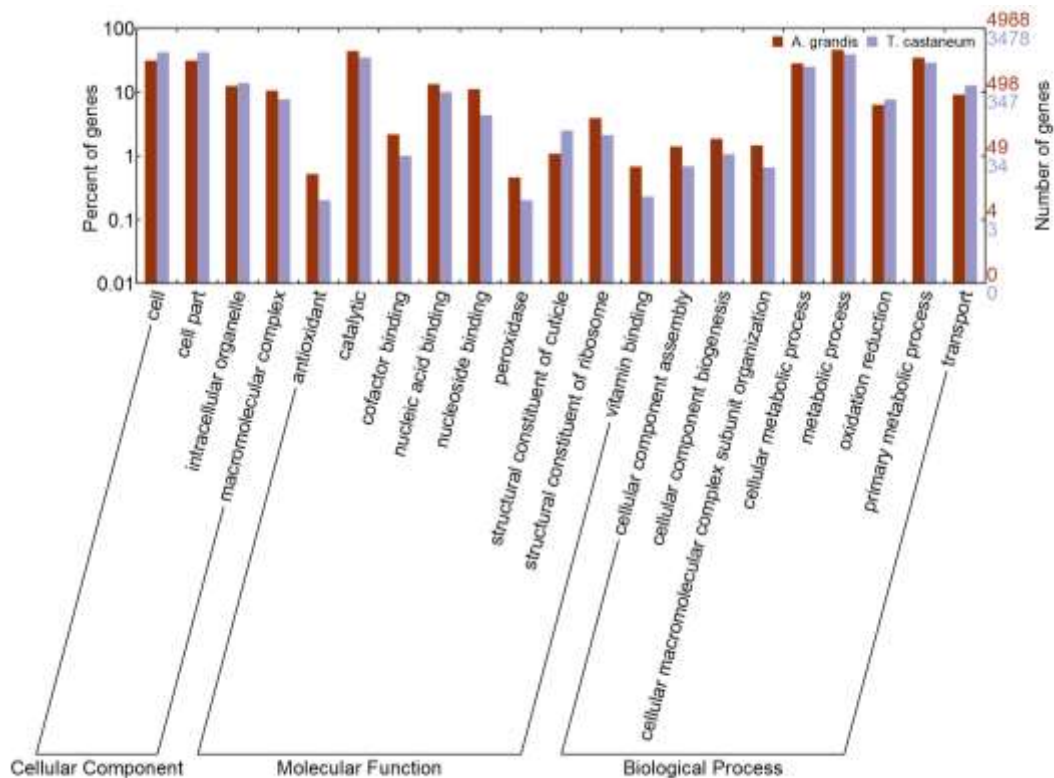


Figura 11. Comparação entre as ontologias gênicas do transcrito de *A. grandis* e *T. castaneum*. O número e a porcentagem de genes anotados nos dois casos são bem similares para os termos das categorias *Cellular Component* (Componente Celular), *Molecular Function* (Função Molecular) e *Biological Process* (Processo Biológico).

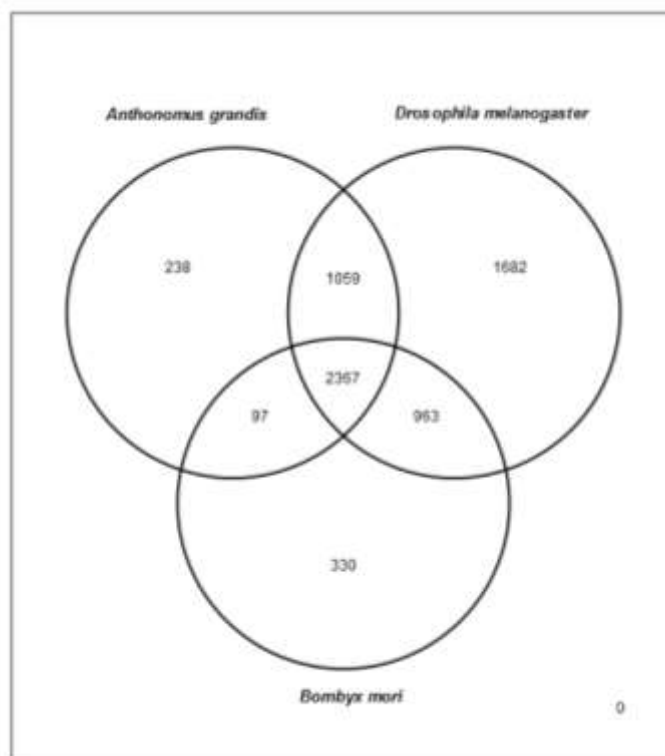


Figura 12. Diagrama de Venn da similaridade entre as famílias de proteínas do transcrito do bicudo as famílias proteicas dos bancos de dados de *D. melanogaster* (Flybase) e *B. mori* (Silkbase). Maior similaridade foi encontrada entre o bicudo e a mosca da fruta.

#### d. Proteínas Envolvidas nos Mecanismos de RNA interferente

Os mecanismos de RNAi são conservados entre as espécies, apesar das diferenças descritas nos processos de amplificação do sinal, efeito sistêmico e hereditariedade. Vários *contigs* relacionados a genes que codificam proteínas envolvidos nos mecanismos de RNAi foram encontrados (Tabela 6). Os *contigs* encontrados são similares a genes de insetos, especialmente de dípteros e coleópteros. A maioria das proteínas encontradas foram da família das argonautas, dicers e helicases.

Para analisar domínios conservados entre proteínas do sistema RNAi, foi feito um alinhamento dos domínios PAZ de dois *contigs* de *A. grandis* (A\_grandis\_454\_c1018 e A\_grandis\_454\_c4142) com dicers e argonautas de 5 espécies diferentes (Figura 13): *Drosophila melanogaster* (Dm\_Dicer-1, Dm\_AGO1C, Dm\_AGO2), *Caenorhabditis elegans* (Ce\_Dicer1, Ce\_Alg1, Ce\_Alg2), *Homo sapiens* (Hs\_Dicer-1, Hs\_Ago1), *Arabidopsis thaliana* (At\_Dicer-like-1, At\_AGO, At\_AGO1) e *Schizosaccharomyces*

*pombe* (Sp\_AGO1). PAZ é um domínio de ligação a dsRNA, presente em todas as argonautas e dicers (SONTHEIMER, 2005; LIU; PAROO, 2010). Os resíduos conservados na maioria dos domínios de argonautas estão presentes nos *contigs* de *A. grandis*, o que pode, de certa forma, validar a montagem do transcrito para esse domínio. Os resíduos conservados ficam normalmente na superfície do domínio e estão localizados em apenas um lado da proteína (SONG *et al.*, 2003). Na figura 13, os resíduos destacados são responsáveis pela estabilidade da região de ligação ao dsRNA, formando estruturas  $7\beta$  e uma  $\alpha$ -hélice. Em amarelo estão os resíduos que formam um subdomínio rico em anéis aromáticos. Por ligações de hidrogênio, estes mantem o dobramento do domínio semelhante a OB-fold (OB – Oligonucleotide/oligosaccharide Binding fold), que se liga a DNA de fita simples inespecificamente (MURZIN, 1993; SUCK, 1997). Junto com uma cisteína (em azul), que é precedida de uma prolina e um glutamato proximais (em amarelo), além de uma Serina ou Treonina (em verde), alguns resíduos invariantes (em vermelho) criam um subdomínio hidrofóbico que interage com o RNA. Em marrom, resíduos diferentes entre dicers e argonautas sugerem que os *contigs* alinhados do bicudo sejam argonautas e não dicers. No entanto, uma avaliação experimental desta sequência deve ser feita, caso se deseje caracterizar estes *contigs*.

Nenhum gene ortólogo de RDRP, enzima envolvida com a amplificação do sinal de RNAi, foi encontrado, confirmando que este processo deve ser mediado por outro mecanismo em insetos, especificamente em coleópteros (GATEHOUSE, 2008). Dois *contigs* de *sid-1*, que codifica a proteína de membrana responsável pela entrada e pelo espalhamento do dsRNA entre as células foram encontrados. O principal alinhamento no BLASTx foram com *sid-1* de *T. castaneum*, que possui no seu genoma 3 genes *sid-1*. Ambos os *contigs* tiveram alta identidade (> 60%) e baixo e-value (<  $5 \times 10^{-31}$ ). Os *contigs* não se sobrepõem, podendo ser sequências de genes diferentes, já que um dos *contigs* teve como principal *hit sid-1A* e outro *sid-1C* de *T. castaneum*. A quantidade de genes *sid-1* varia entre os insetos. Dípteros não tem nenhum gene *sid*. Hemípteros, himenópteros, ortópteros e phtirápteros tem só um gene. Lepidópteros variam mais: enquanto *Bombyx mori* tem 3, *Spodoptera exigua* tem só um. Como para outros insetos, não foi encontrado nenhum gene ortólogo de *sid-2*, presente em nematoides, para *A. grandis*.

Tabela 6. Genes envolvidos no mecanismo de RNAi encontrados no transcrito do bicudo do algodoeiro

<b>Gene</b>	<b>Nº de contigs</b>
<b>Dicer e Dicer-like</b>	5
<b>Família das Argonautas</b>	
Argonautas	8
Auberginas	3
<b>RNA helicases putativas</b>	
Armitages	1
SpindleE	3
Rm62	8
<b>Transporte de dsRNA</b>	
SID-1	2
<b>Outros fatores</b>	
R2D2	1
VIG	1
TudorSN (p100)	2
MUT-7	2

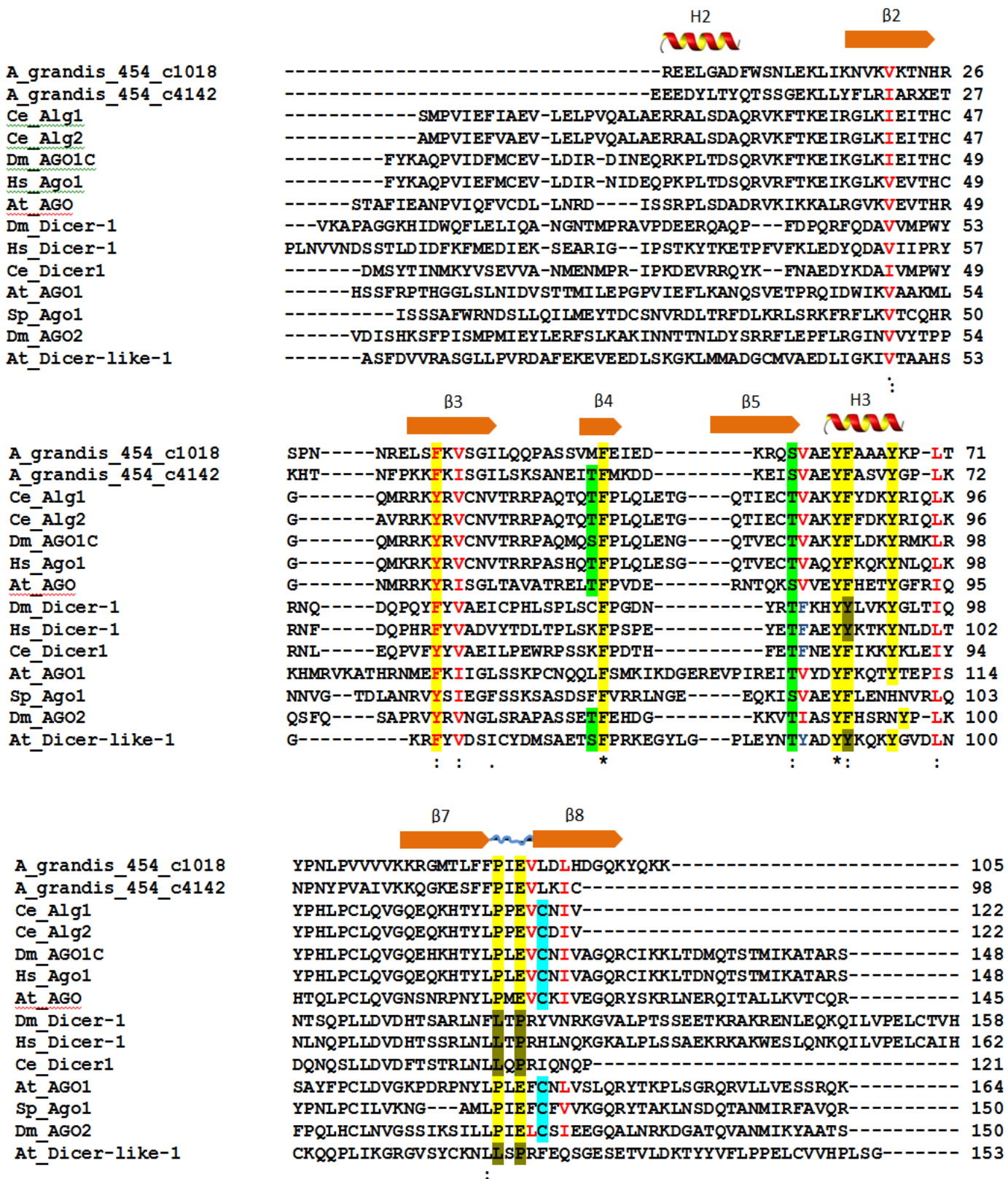


Figura 13. Comparação entre as sequências proteicas do domínio PAZ de dicers e argonautas. Os nomes das sequências foram mantidos como encontrados no Protein Database do NCBI. Os resíduos destacados são responsáveis pela estabilidade da região de ligação ao dsRNA.

Em amarelo estão os resíduos que formam um subdomínio rico em anéis aromáticos. Junto com uma cisteína (em azul), que é precedida de uma prolina e um glutamato proximais (em amarelo), além de uma Serina ou Treonina (em verde), alguns resíduos invariantes (em vermelho) criam um subdomínio hidrofóbico que interage com o RNA. Em marrom, resíduos diferentes entre dicers e argonautas. *Drosophila melanogaster* (Dm\_Dicer-1, Dm\_AGO1C, Dm\_AGO2), *Caenorhabditis elegans* (Ce\_Dicer1, Ce\_Alg1, Ce\_Alg2), *Homo sapiens* (Hs\_Dicer-1, Hs\_Ago1), *Arabidopsis thaliana* (At\_Dicer-like-1, At\_AGO, At\_AGO1) e *Schizosaccharomyces pombe* (Sp\_AGO1).

#### e. Considerações Finais

O trabalho até aqui apresentado gerou um novo banco de dados de biologia molecular altamente representativo para o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*. É o maior conjunto de dados disponível sobre este inseto até o momento. Genes de importância biotecnológica estão bem representados e os resultados mostram que o uso das ferramentas para montagem do transcrito foi adequado. Como o objetivo foi apenas gerar o banco de dados, experimentos de validação dos genes, bem como de sequenciamento e análise da expressão de genes expressos em condições e fases de desenvolvimento específicas devem ser realizados para caracterização de processos, seja com intuito de conhecimento da biologia do inseto, seja para fins biotecnológicos.

---

## CAPÍTULO II

### SILENCIAMENTO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA LACASE 2

---



## II.1. Introdução

### a. Validação de Genes por Silenciamento Gênico em insetos

Vários estudos utilizando RNA interferente para avaliação funcional de um determinado gene têm sido realizados nos mais diversos organismos. Estes estudos variam nos métodos de administração do dsRNA e de avaliação do efeito de silenciamento. Muitos trabalhos feitos com insetos visam estudar a função de um determinado gene para melhor compreensão de um processo fisiológico visando, na maioria das vezes, a uma aplicação biotecnológica. O uso de RNAi tem sido funcional em várias linhagens de células de insetos, ovos, larvas e adultos com o uso de vetores plasmidiais para expressar e sintetizar dsRNAs que podem ser administrados por alimentação, injeção e até mesmo eletroporação, dessa forma causando silenciamento de genes-alvo e mudanças de fenótipo.

Vários trabalhos podem ser encontrados na literatura com uso de RNAi em insetos. No isóptero *Reticulitermes flavipes*, o silenciamento dos genes de hexamerinas *Hex-1* e *Hex-2* demonstrou sua função na regulação de papéis sociais de cupins trabalhadores e sua diferenciação entre o fenótipo reprodutivo ou de soldados (ZHOU *et al.*, 2006). O silenciamento do gene do receptor de ecdisona no blatódeo *Blattella germanica* revelou que este gene é essencial no último instar de ninfas para que estas consigam sofrer muda (CRUZ *et al.*, 2006). Também em lepidópteros, experimentos de RNAi tiveram sucesso. Em *Spodoptera litura*, o silenciamento do gene do receptor de vitelogenina aumentou os níveis desta proteína na hemolinfa, diminuído sua captação no ovário e impedindo a formação correta dos embriões (SHU *et al.*, 2011). O gene que codifica a enzima diacilglicerol transferase, que catalisa o último passo da síntese de triacilgliceróis foi silenciado em *Bombix mori*, reduzindo a produção de feromônio sexual (DU *et al.*, 2012).

Especificamente em coleópteros, um número maior de experimentos tem sido feito com o inseto-modelo *Tribolium castaneum*. A injeção de dsRNA ou siRNA em *T. castaneum* possibilitou diferenciar a função de dois genes de quitina sintase *TcCHS1* e *TcCHS2* (ARAKANE *et al.*, 2005). A regulação endócrina da síntese de vitelogenina, uma proteína sintetizada pelas fêmeas e incorporada nos ovócitos em desenvolvimento para futura alimentação do embrião, foi estudada por silenciamento de genes envolvidos na síntese de hormônios via RNAi em *T. castaneum* (PARTHASARATHY *et al.*, 2010). Identificados no genoma de *T. castaneum*, 21 genes de receptores nucleares foram

silenciados e sua função nos aparelhos reprodutores de machos e fêmeas foram validadas por RT-qPCR e modificações morfológicas e fisiológicas (XU *et al.*, 2012). Estes são apenas alguns das dezenas de exemplos da aplicação de RNAi para validação funcional de genes em insetos.

#### b. RNA interferente para Controle de Insetos

Apesar de muitos desses trabalhos visarem à análise da função dos genes para compreensão da biologia dos insetos, a maioria dos estudos, principalmente de lepidópteros, coleópteros e dípteros busca genes de interesse biotecnológico. Muito utilizado para a análise de expressão gênica, o RNA interferente vem se mostrando uma ferramenta promissora no auxílio ao controle de pragas. Seu mecanismo de ação baseia-se principalmente na introdução de um RNA dupla fita em um organismo alvo, por microinjeção ou ingestão (FIRE *et al.*, 1998). Esse RNA dupla fita inicia um processo de silenciamento gênico pós-transcricional, através da degradação de mRNAs homólogos, causando uma diminuição na síntese da proteína correspondente (MEISTER; TUSCHL, 2004), dificultando a sobrevivência ou até mesmo levando o inseto à morte.

Esta técnica já vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de plantas resistentes a pragas, como no caso do fumo (YADAV *et al.*, 2006) e *Arabidopsis thaliana* (HUANG *et al.*, 2006), ambas apresentando resistência acima de 90% a *M. incognita*. A expressão de RNA dupla fita em células de plantas mostra-se compatível com o hábito sedentário dos principais nematóides endofíticos, uma vez que desenvolvem em seus hospedeiros sítios de alimentação e durante o estágio adulto utilizam material citoplasmático como fonte de nutrientes (DAVIS *et al.*, 2004), e desta forma também ingerem o dsRNA, silenciando o gene alvo.

Desde a sua descrição inicial a técnica transformou-se em uma ferramenta valiosa para a genômica funcional de insetos, em particular no estudo de função gênica em *D. melanogaster* (MISQUITTA; PATERSON, 1999; KENNERDELL; CARTHEW, 2000). A metodologia mais utilizada na maior parte dos estudos com insetos é a microinjeção de dsRNA na hemolinfa do inseto, que para fins práticos é inviável. Este método contrasta com o método utilizado em *C. elegans*, onde os efeitos do RNAi podem ser produzidos pela ingestão de bactérias expressando dsRNA (TIMMONS; FIRE, 1998; TIMMONS *et*

*al.*, 2001), ou mesmo expondo o nematóide em solução com dsRNA (TABARA *et al.*, 1998). A microinjeção de dsRNA nos insetos foi considerada ser necessária para produzir os efeitos de RNAi porque não foram encontrados no genoma de *D. melanogaster* (e, subsequentemente, para outros insetos) genes que codificam a RNA-polimerase dependente de RNA (RdRP). A RdRP é a enzima necessária para a etapa de amplificação do siRNA que conduz a efeitos persistentes e sistemáticos de RNAi (SIJEN *et al.*, 2001). A ausência de RdRP nos insetos sugere que todos os efeitos de RNAi estariam limitados às células que absorvessem diretamente do meio o dsRNA, implicando que os efeitos em insetos produzidos pela ingestão de RNAi poderiam estar limitados. No entanto efeitos sistêmicos já foram observados em insetos.

A especificidade do RNAi para fins inseticidas é uma consideração importante para o uso desta tecnologia em aplicações práticas, já que os efeitos sobre insetos não alvo podem ser minimizados. Dentre outras vantagens, esta técnica permite o uso de apenas fragmentos de sequências, tendo em vista que a tradução de uma proteína não é necessária, o que minimiza as preocupações com biossegurança e alergenicidade, e representa uma forma de controle provavelmente mais eficaz do que as atuais.

Resultados recentes mostraram a viabilidade de plantas que produziam dsRNA na resistência contra insetos-praga. Dois artigos descrevem plantas transgênicas produzindo dsRNAs contra genes essenciais no trato digestivo dos insetos causando mortalidade em 24h depois do contato com o dsRNA (BAUM *et al.*, 2007; MAO *et al.*, 2007). Estas plantas apresentaram resistência aumentada contra pragas importantes da agricultura, a lagarta *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) e a praga da raiz do milho, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera). Baum e colaboradores (2007) prospectaram 290 alvos potenciais e sintetizaram dsRNA *in vitro*, testando seu efeito em dietas artificiais. Assim, 14 genes foram silenciados com baixas concentrações e o procedimento resultou na morte do inseto. O gene que codifica a subunidade A de uma V-ATPase foi o que melhor apresentou resultado de silenciamento, com um rápido decréscimo dos níveis de mRNA 24 horas após a ingestão do dsRNA, e o efeito produzido foi sistêmico. Eventos de milho geneticamente modificados expressando dsRNA de V-ATPase subunidade A de *D. virgifera virgifera* foram gerados. Submetidas ao ataque do inseto, as plantas geneticamente modificadas apresentaram um nível significativo de proteção, com menor dano, quando comparadas a plantas de milho não transformadas.

Mao e colaboradores (2007) identificaram que um gene que codifica o citocromo P450, *CYP6AE14*, é altamente expresso no intestino quando a lagarta de *Helicoverpa armigera* se alimenta em dietas artificiais contendo o metabólito secundário gossipol, produzido por plantas de algodão como defesa contra herbivoria. Concluindo que *CYP6AE14* estava envolvido na tolerância ao gossipol, plantas de fumo e *Arabidopsis thaliana* foram transformadas com dsRNA de *CYP6AE14* e lagartas alimentadas nestas plantas apresentaram alta sensibilidade ao gossipol quando transferidas para dieta artificial contendo o metabólito. Recentemente, o mesmo grupo transformou plantas de algodão expressando dsRNA de *CYP6AE14* e os resultados foram semelhantes (MAO *et al.*, 2011).

### c. Cutícula de insetos: Síntese e Esclerotização

Diferente dos vertebrados que tem um esqueleto mineralizado interno, as milhões de espécies de artrópodes possuem um esqueleto externo não-mineralizado, chamado de exoesqueleto ou cutícula. Várias funções são atribuídas à cutícula como (a) proteção contra predadores, patógenos e estresses ambientais (abrasão, radiação UV, dessecação, camuflagem), (b) percepção sensorial através de espinhos, cerdas, pelos providos de sensilas (mecano e quimiorrecepção), (c) local de ligação de músculos e órgãos e (d) locomoção (terrestre e aérea) (VINCENT; WEGST, 2004; SUDERMAN *et al.*, 2006; ANDERSEN, 2010, 2012). A cutícula é composta de fibrilas de quitina mergulhadas numa matriz de proteínas, lipídeos, N-acetilcatecolaminas e pigmentos. Há muito se sabe que a estrutura e a composição química da cutícula representam, provavelmente, as principais barreiras de defesa do inseto e somente alguns fungos e nematóides são capazes de quebrá-la. Na passagem da cutícula para a hemocele (cavidade do corpo), esses micro-organismos encontram vários componentes antimicrobianos que inibem o crescimento e a penetração na hemocele (DUNN, 1986).

Um esquema geral da cutícula dos insetos pode ser vista na Figura 14. Muitos trabalhos mostram que as células epiteliais sintetizam a cutícula a partir de proteínas sintetizadas nelas próprias ou provenientes da hemolinfa, secretadas junto com filamentos de quitina (ANDERSEN, 2012). Durante a muda, uma estrutura chamada envelope é formada para proteger a camada epitelial de enzimas que digerem a cutícula. Logo é sintetizada a epicutícula, proteica, desprovida de quitina e estabilizada por quinonas.

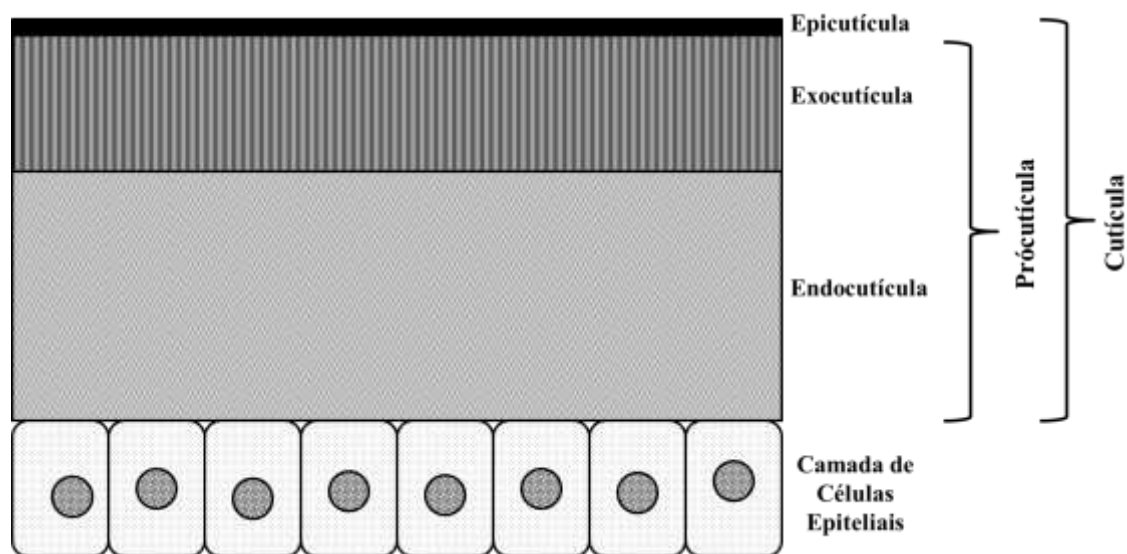


Figura 14. Esquema da estrutura da cutícula de insetos.

A nomenclatura utilizada atualmente (LOCKE, 2001) reúne os termos endocutícula (região mais flexível, recém-sintetizada) e exocutícula (região mais rígida e antiga) no termo procutícula. Essa nomenclatura se deve a uma mudança de conceito. Antes se acreditava que havia uma nítida separação entre exo e endocutícula, mas com estudos de microscopia, bioquímica, biologia molecular e imunológica, descobriu-se que existe uma grande variação de níveis de endurecimento e composição proteica, de quitina e catecolaminas, além de enzimas e pigmentos. A procutícula é a região que contém vários tipos de proteínas e quitina combinadas sozinhas de várias formas, ou combinadas com N-acetilcatecolaminas.

A cutícula é formada por material orgânico e varia em hidrofobicidade, flexibilidade, resistência, dureza, cor e força. Esta variação nas propriedades físicas da cutícula pode ser percebida em fases de desenvolvimento diferentes da mesma espécie e até em áreas diferentes do mesmo indivíduo. Esta estrutura acelular rígida é produto da secreção das células da epiderme e é periodicamente renovada durante o crescimento do inseto. O processo de muda, que nos insetos ocorre nas mudanças de instares das larvas, na fase de pupa e no adulto, é controlado principalmente por ecdisteróides, hormônios que também regulam a maturação definitiva do exoesqueleto (ANDERSEN, 2012).

A esclerotização, que envolve o endurecimento seguido muitas vezes de pigmentação (*tanning*), é um processo em que a cutícula é estabilizada pela incorporação de compostos fenólicos, cujas principais características já foram bem descritas e estudadas por vários autores (ANDERSEN, 2010). A diversidade de propriedades da cutícula é devida a uma arquitetura molecular variada e a diferenças na composição de proteínas, mas as quantidades relativas de precursores do processo de esclerotização e as várias enzimas envolvidas são essenciais para o estabelecimento correto da estrutura cuticular em uma determinada região. A hipótese geral aceita atualmente é a de esclerotização por quinonas (*quinone tanning*) que afirma que a esclerotização é um processo químico em que ocorre a oxidação de N-acetilcatecolaminas formando quinonas altamente reativas que fazem ligações cruzadas (*crosslinks*) com cadeias laterais nucleofílicas de aminoácidos nas proteínas, estabilizando a estrutura da cutícula (LOCKE, 2001; SUDERMAN *et al.*, 2006; ANDERSEN, 2012). As quinonas podem ainda polimerizar, formando estruturas que expulsam as moléculas de água, aumentando a rigidez da cutícula (DITTMER; KANOST, 2010). Na esclerotização, regiões da cutícula do inseto são transformadas irreversivelmente de um material flexível e elástico em uma estrutura mais rígida, dura e resistente, caracterizada experimentalmente por uma diminuição da deformabilidade, e por um aumento da dificuldade de extração proteica da matriz da cutícula e da resistência à degradação por enzimas como quitinases e proteases. O termo *tanning*, que se refere à pigmentação e escurecimento da cutícula que pode acompanhar a esclerotização, é às vezes usado erroneamente para designar a esclerotização em si. No entanto, o processo de endurecimento da cutícula nem sempre envolve pigmentação, como no caso de mudas de larvas.

Entre as proteínas presentes na cutícula, algumas não são estruturais, como pigmentos (inseticianinas, proteínas amarelas de insetos – IYPs), enzimas (fenol-oxidases, peroxidases), proteínas de defesa (cecropinas, escolexinas) e de função desconhecida (arilforinas). As proteínas cuticulares estruturais foram inicialmente detectadas e chamadas de forma generalista de esclerotinas em 1940 (PRYOR, 1940). Atualmente estão classificadas em 13 famílias (WILLIS, 2010), apesar de algumas continuarem sem classificação. Muito estudo ainda precisa ser feito para caracterizar os mecanismos bioquímicos que diferenciam o papel destas proteínas nas partes da cutícula e nas

diferentes regiões dos insetos, já que a presença delas é diferente nas diversas fases de desenvolvimento das diversas ordens de insetos estudados (ANDERSEN, S. O., 2010).

Duas principais moléculas, chamadas de precursores da esclerotização, são sintetizadas a partir do aminoácido tirosina nas células epiteliais, ou importadas da hemolinfa. A tirosina é hidroxilada formando 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA), que por descarboxilação é transformada em dopamina. Dopamina pode ser *N*-acetilada formando *N*-Acetildopamina (NADA) e *N*- $\beta$ -Alanildopamina (NBAD), os precursores da esclerotização. Exportados das células epiteliais, NADA e NBAD são enzimaticamente oxidados formando as orto-quinonas correspondentes na matriz cuticular. Estas orto-quinonas, altamente reativas, podem reagir com grupos nucleofílicos disponíveis como tiol e amins de cadeias laterais dos aminoácidos cisteína, arginina, glutamina e asparagina. As proteínas ligadas às quinonas e ao polímero de quitina formam uma estrutura rígida e altamente resistente à degradação enzimática, salvo em processos de muda (ANDERSEN, 2010, 2012; SUDERMAN *et al.*, 2006).

#### d. Lacases

Lacases (*p*-difenol:dioxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2) são enzimas da família das multi-cobre oxidases, que inclui também as ascorbato oxidases (L-ascorbato dioxigênio oxidoreductases, E.C.1.10.3.3) e as ferroxidases (Fe(II):dioxigênio oxidoreductase, E.C.1.16.3.1) (DITTMER; KANOST, 2010). São proteínas que contêm átomos de cobre (Cu) que reduzem o oxigênio molecular formando água e simultaneamente oxidam com a transferência de um elétron de vários substratos como difenóis, monofenóis metoxi-substituídos e amins aromáticas e alifáticas (CLAUS, 2004; RIVA, 2006). Normalmente isoladas de plantas superiores, procariotos, insetos e principalmente de fungos, lacases catalisam uma reação de oxirredução dependente de um agrupamento (*cluster*) de 4 átomos de cobre que formam o sítio ativo da enzima, que contêm um motivo de cobre tipo I, um motivo de cobre tipo II e dois motivos de cobre tipo III (RIVA, 2006; DITTMER; KANOST, 2010). O motivo cobre tipo I confere uma coloração típica à enzima devido à absorção eletrônica intensa de uma ligação covalente Cu-cisteína e é o local onde ocorre a oxidação monoelétrica do substrato. Os átomos de cobre tipo II e III formam um cluster trinuclear, para o qual os elétrons são transferidos e

onde ocorre a redução do oxigênio formando água. O resultado final é a oxidação de 4 moléculas de substrato e a redução de 2 moléculas de água (Figura 15) (ANDERSEN, 2012; CLAUS, 2003;2004; DITTMER; KANOST, 2010; RIVA, 2006).

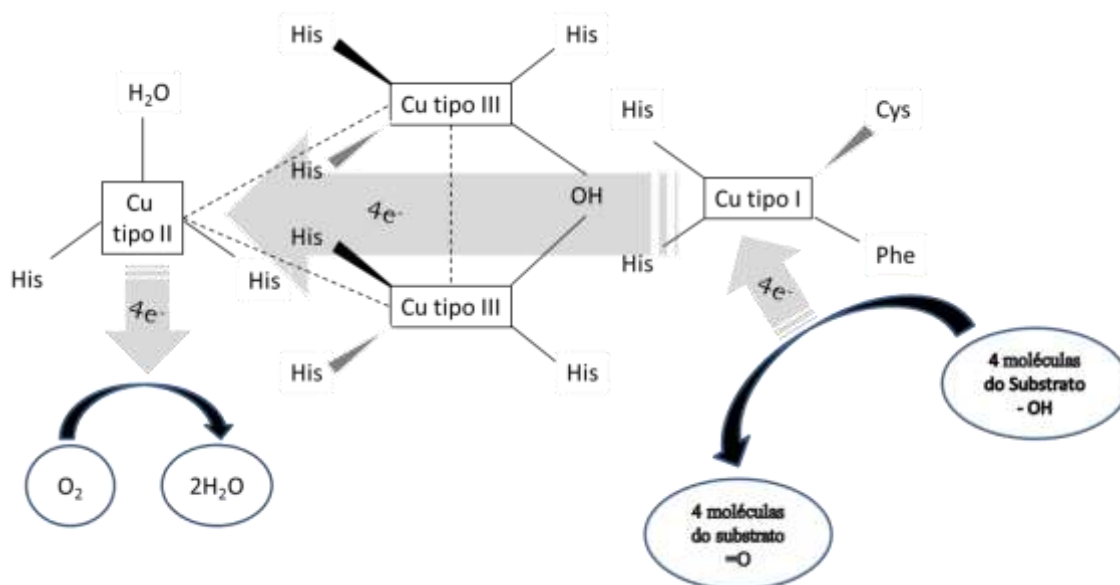


Figura 15. Mecanismo de oxirredução catalisado pelas lacases. A oxidação dos substratos é catalisada elétron por elétron até que 4 elétrons sejam transferidos para uma molécula de oxigênio formando duas moléculas de água. Adaptado de RIVA, 2006; DITTMER; KANOST, 2010; ANDERSEN, 2012.

Devido ao grande número de substratos, lacases estão envolvidas em muitos processos nos diversos organismos como formação de esporos resistentes a radiação UV em bactérias, pigmentação em fungos e plantas, síntese e degradação de lignina e formação de parede celular de plantas, proteção contra taninos e fitoalexinas em fungos e formação e esclerotização da cutícula de insetos (SHRADDHA *et al.*, 2011). Por suas características físico-químicas, tem um papel biotecnológico importante nas indústrias de alimentos, de papel, de cosméticos e na indústria têxtil. Além disso, lacases, principalmente de fungos, têm sido utilizadas em processos de síntese química a partir de compostos fenólicos, biorremediação do solo e biodegradação de poluentes fenólicos e remoção de disruptores endócrinos (COUTO; TOCA HERRERA, 2006; KUNAMNENI *et al.*, 2008). Recentemente lacases têm sido aplicadas eficientemente no campo da nanotecnologia devido a sua habilidade de catalisar reações de transferência de elétrons sem o uso de um



cofator adicional (GE *et al.*, 2012; KUNAMNENI *et al.*, 2008; KUSHWAH *et al.*, 2011; SHRADDHA *et al.*, 2011).

O principal papel das lacases descrito até agora é na esclerotização da cutícula, apesar de atividades de lacase e processos de esclerotização possam ocorrer em casulos e ovos. Sua presença na cutícula e a atividade relacionada com a esclerotização foi primeiro descrita em 1969 (YAMAZAKI, 1969) e seu papel no processo tem sido estudado em insetos desde então (DITTMER; KANOST, 2010; ANDERSEN, 2012). No entanto, poucos trabalhos foram publicados relacionados com mecanismos de ação e caracterização gênica e proteica destas enzimas. Um dos desafios para o estudo desta classe de enzimas em insetos é seu isolamento e purificação, principalmente sua solubilização. Métodos proteolíticos tem sido utilizados para tentar solubilizar a enzima, mas não é conhecido o grau de alteração nas propriedades estruturais, cinéticas e físico-químicas em relação à proteína nativa em seu meio de atuação (DITTMER *et al.*, 2009; YATSU; ASANO, 2009).

Até recentemente, tirosinases e lacases se confundiam nos papéis de oxirredução de quinonas na esclerotização. No entanto, experimentos de localização das tirosinases nas células da epiderme somados às diferenças de especificidades das duas enzimas deram indícios para definir as lacases como responsáveis pelo processo. Tirosinases (*o*-difênol:dioxigênio oxidoreductase, EC.1.10.3.1) são catalisadoras de reações de oxidação específicas para orto-difenóis, enquanto que lacases aceitam tanto orto quanto para-difenóis como substrato. Além disso, ao contrário das lacases de fungos e bactérias, lacases de insetos são insensíveis a quelantes como EDTA, tiouréia, 8-hidroxiquinolina, e *o*-fenantrolina (DITTMER; KANOST, 2010).

Há alguns anos, cDNAs de genes de lacases (*MsLac1*, *MsLac2*) foram identificados no lepidóptero *Manduca sexta*, uma praga do fumo, e no mosquito vetor da malária, *Anopheles gambiae* (*AgLaccase1*) (DITTMER *et al.*, 2004). Destes, *MsLac1* foi descrito como um gene envolvido na esclerotização da cutícula, já que sua expressão era muito alta nas células da epiderme durante o estágio de pupa, quando uma nova cutícula estava sendo formada logo abaixo da antiga cutícula da larva. Recentemente, estudos estruturais e cinéticos da proteína codificada por *MsLac2* foram realizados para caracterizar a enzima comparando a proteína purificada com uma recombinante, com intuito de compreender melhor as lacases para possível uso biotecnológico (DITTMER *et al.*, 2009).

Os cDNAs de dois genes de lacases, TcLac1 e TcLac2, foram isolados do besouro castanho *Tribolium castaneum*, cuja similaridade de sequência de aminoácidos e estruturas de domínios das respectivas proteínas preditas corresponde a MsLac1 e MsLac2 (ARAKANE *et al.*, 2005). Neste estudo, o uso de RNAi para silenciar os genes mostrou que TcLac2 e não TcLac1 causava formação anormal da cutícula e mortalidade após a ecdise. No mesmo estudo foram silenciados por RNAi dois genes de tirosinases, TcTyr1 e TcTyr2, sem efeito para a esclerotização da cutícula. Adultos tiveram cutículas mais finas e moles, com corpos anormais e estruturas cuticulares deformadas.

Nos hemípteros *Riptortus pedestris*, *Nysius plebeius* e *Megacopta punctatissima* o uso de dsRNA de lacase2 também mostrou uma despigmentação, regiões com cutícula deformada e morte (FUTAHASHI *et al.*, 2011). Alterações nos níveis do transcrito de AmLac2, o gene de lacase2 da abelha comum, *Apis mellifera*, foram diminuídos por dsRNA e pela diminuição de ecdisteróides, levando a uma cutícula mal formada (ELIAS-NETO *et al.*, 2010). A função de lacase1 em insetos ainda não foi bem determinada.

Entre os insetos holometábolos, duas isoformas de proteínas codificadas por genes de lacase2 (lacase2A e lacase 2B), que diferem na região C-terminal, foram identificadas no coleóptero *T. castaneum* e no díptero *A. gambiae* (ARAKANE *et al.*, 2005; GORMAN *et al.*, 2008; DITTMER; KANOST, 2010). A hipótese de isoformas resultantes de processamento de mRNA (*splicing*) também foi descrita para *Bombix mori*, *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti* baseada na análise dos genomas sequenciados (DITTMER *et al.*, 2009; YATSU; ASANO, 2009). Apenas uma isoforma foi encontrada no genoma dos himenópteros *A. mellifera* e *Nasonia vitripennis* (ELIAS-NETO *et al.*, 2010). Entre os insetos hemimetábolos, apenas uma forma de lacase2 foi encontrada no genoma do hemíptero *Acyrtosiphon pisum* e do fitiráptero *Pediculus humanus* (FUTAHASHI *et al.*, 2011; KIRKNESS *et al.*, 2010). Importante notar que o gene de lacase2 é expresso constitutivamente em todas as fases de desenvolvimento de *A. gambiae* (GORMAN *et al.*, 2008), diferentemente de todos os insetos em que a expressão de genes de lacase2 foi descrita até agora.

A importância da lacase durante o desenvolvimento faz desta enzima um alvo potencial para uso biotecnológico no controle do inseto. Por isso, neste trabalho, foi avaliada a função de um gene de lacase2 do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, por silenciamento usando RNA interferente, na última fase larval do inseto.

## II.2. Material e Métodos

### 1. Seleção das Sequências dos Genes de Referência Candidatos

#### a. Dissecção das Partes do Bicudo do Algodoeiro

Larvas e insetos adultos de *A. grandis* foram obtidos do Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF, conforme descrito anteriormente. Partes de larvas de 3º instar e adultos machos e fêmeas foram dissecados e separados para análise da estabilidade gênica. As partes das larvas foram separadas e denominadas Cabeça, Intestino, Cutícula e Resto, sendo neste último consideradas todas as estruturas torácico-abdominais do inseto, menos o intestino. As partes dos adultos foram divididas em Cérebro, Cutícula Dorsal, Intestino, Aparelho Reprodutor Masculino e Aparelho Reprodutor Feminino. As dissecções foram feitas conforme mostrado nas figuras 16 para larvas e 17 para adultos.

Na dissecção de larvas, alfinetes entomológicos foram presos, para manter a larva com a parte dorsal para baixo, evitando ao máximo o dano de estruturas (Figura 16,a e b). Uma incisão longitudinal foi feita com tesoura de ponta fina na região ventral (Figura 16c). Após identificar o intestino, um corte foi feito perto da cabeça (intestino anterior) e outro no final do intestino, separando-o. O intestino foi colocado em água-DEPC e lavado para retirar resíduos de dieta (Figura 16d). Todo o conteúdo interno foi então retirado, e a este conteúdo deu-se o nome de Resto (Figura 16e, f). Após esse procedimento, a cutícula e a cabeça restantes, foram separadas (Figura 16g, h, i).

Para dissecção dos adultos, machos e fêmeas foram separados após a sexagem (SAPPINGTON; SPURGEON, 2000). Em primeiro lugar, os élitros, que são as asas anteriores, modificadas por endurecimento, foram retirados (Figura 17a, b). Em uma placa de *petri* contendo massa de modelar, o inseto adulto foi fixado já sem os élitros, com a região dorsal para cima (Figura 17c, d). Utilizando uma tesoura de ponta fina, a cutícula dorsal foi retirada, expondo o abdômen (Figura 17e, f, g). Todo o conteúdo abdominal foi retirado e intestino (Figura 17h), aparelho reprodutor feminino (Figura 17i) e aparelho reprodutor masculino (Figura 17j) foram separados. Além disso, a cabeça do inseto foi cortada e aberta, para retirar o conteúdo cerebral (Figura 17k, l, m).

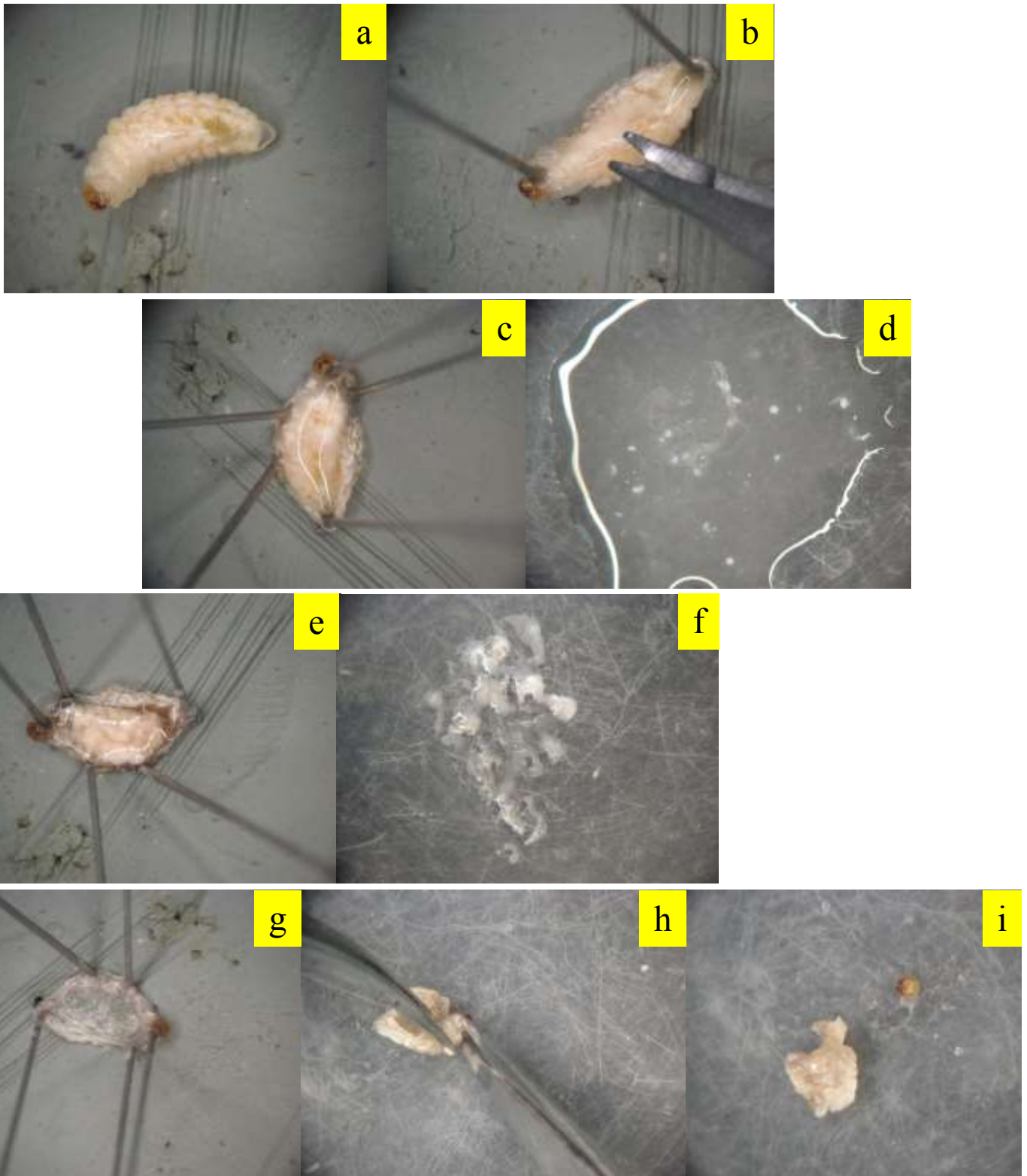


Figura 16. Dissecção da larva de *A. grandis*. Após fixação da larva em massa de modelar (a, b), a cutícula foi aberta na região ventral (c). Após a remoção do intestino (d), foi retirado o conteúdo abdominal, chamado de Resto (e, f). A cutícula, então, foi separada da cabeça (g, h, i). Maiores detalhes no texto.

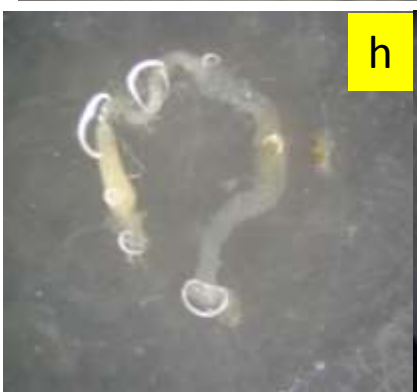


Figura 17 (Página anterior). Após a retirada dos élitros (a, b), o bicudo foi fixado em massa de modelar (c, d) e a cutícula dorsal retirada (e, f, g). Foram retirados intestino (h), aparelho reprodutor feminino (i), aparelho reprodutor masculino (j) e cérebro (k, l, m). Maiores detalhes no texto.

Durante a dissecação, procurou-se preservar toda a estrutura cerebral: lobos ópticos, *corpora allata*, protocérebro, deutocérebro e tritocérebro, e os gânglios circum-esofágico, subesofágico e frontal. Na dissecação de larvas e adultos, todas as estruturas foram imediatamente colocadas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas em freezer a -80 °C até o uso.

#### b. Análise de estabilidade de expressão gênica por RT-qPCR

Nove genes foram escolhidos para análise da estabilidade de expressão, que codificam para síntese de Arginina Quinase (ArgK),  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), Fator de Elongação 1-Alpha (EF1A), Ubiquitina (UBQ) e as Proteínas Ribossomais S3, S11 e S26 (RPS3, RPS11 e RPS26). Os oligonucleotídeos (*primers*) para cada gene foram desenhados utilizando a ferramenta *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (ROZEN; SKALETSKY, 2000) a partir das sequências de nucleotídeos retiradas do banco de dados do transcrito do bicudo do algodoeiro para gerar um fragmento amplificado (*amplicon*) que variou entre 150 a 200 pares de bases, com o intuito de evitar tamanhos muito diferentes a serem amplificados. Para todos os *primers*, a temperatura de desnaturação de metade das moléculas foi de 60 °C. Seguem na tabela 7 as sequências dos pares de *primers* para cada gene. Em cada nome, Fw é para direto e Rv para reverso.

Tabela 7. *Primers* utilizados nos experimentos com genes de referência.

<b>Argina Quinase (ArgK)</b>	
qPCR_AgArgKfw	5'ACAAGGGTGGTCAAGTCGAG3' Tm (°C) 60,15
qPCR_AgArgKRv	5'CTACCGCTACAGCCTGATCC3' Tm (°C) 59,86
Tamanho do <i>amplicon</i> 161 pb	
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	
qPCR_AgB_actina_Fw	5'CCTTTAACACCCCTGCTATG3' Tm (°C) 60,08
qPCR_AgB_actina_Rv	5'TGAGGTAGTCGGTCAAGTCA3' Tm (°C) 59,91
Tamanho do <i>amplicon</i> 192 pb	
<b><math>\beta</math>-Tubulina</b>	
qPCR_AgB_tubulina_Fw	5'GGTTGCGACTGTTTACAAGG3' Tm (°C) 60,11
qPCR_AgB_tubulina_Rv	5'GCACCACCGAGTAAGTGTTTC3' Tm (°C) 60,03
Tamanho do <i>amplicon</i> 156 pb	
<b>GAPDH</b>	
qPCR_AgGAPDH_Fw	5'AGATCGTCGAGGGTCTGATG3' Tm (°C) 59,99
qPCR_AgGAPDH_Rv	5'AAGGCGGGAATGACTTTACC3' Tm (°C) 59,97
Tamanho do <i>amplicon</i> 166 pb	
<b>EF1A</b>	
qPCR_AgEF1Afw	5'CCGTTTTTATTGCCCGTAGA3' Tm (°C) 59,96
qPCR_AgEF1Arv	5'AACATCTCCACTCCCGTGAC3' Tm (°C) 60,47
Tamanho do <i>amplicon</i> 158 pb	
<b>UBQ</b>	
qPCR_AgUBQFw	5'CGCTTCGCGCTACTTGTACT3' Tm (°C) 60,73
qPCR_AgUBQRv	5'ACTCTTCAAGCGCAAACGAT3' Tm (°C) 60,02
Tamanho do <i>amplicon</i> 175 pb	
<b>RPS3</b>	
qPCR_AgRPS3_Fw	5'TTGAGACGGAGTCTTCAAG3' Tm (°C) 60,54
qPCR_AgRPS3_Rv	5'TCCCAATACACGGTCAGTTC3' Tm (°C) 60,63
Tamanho do <i>amplicon</i> 146 pb	
<b>RPS11</b>	
qPCR_AgRPS11Fw	5'ACCCACGGTTTTCTTAACC3' Tm (°C) 60,09
qPCR_AgRPS11Rv	5'GACGACTCCGGTGAGGATAC3' Tm (°C) 59,54
Tamanho do <i>amplicon</i> 178 pb	
<b>RPS26</b>	
qPCR_AgRPS26Fw	5'TCCCAAAGACAAGGCAATC3' Tm (°C) 60,05
qPCR_AgRPS26Rv	5'CCTTCTTGCTCCTGTTACGC3' Tm (°C) 60,02
Tamanho do <i>amplicon</i> 183 pb	

Para síntese de cDNA, foi extraído RNA total das partes dissecadas de larvas e de adultos triturados em almofariz contendo N<sub>2</sub> líquido, utilizando o reagente de Trizol (Invitrogen Life Technologies) de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com 2U de DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen Life Sciences) por 30 minutos a 37 °C, de acordo com instruções do fabricante. Após etapa de limpeza em coluna do kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN) e verificação da qualidade da amostra em gel de agarose 1,5%, a concentração de RNA foi determinada em um fluorômetro Qubit, utilizando o kit Quant-iT RNA assay (Invitrogen Life Technologies). Para síntese de cDNA foi utilizado 1 µg de RNA. A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit Superscript III<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis SuperMix for RT-qPCR (Invitrogen), a partir de 500 ng de RNA, seguindo orientações do fabricante.

Inicialmente, uma PCR foi realizada para amplificar os fragmentos, que foram clonados e sequenciados a fim de testar os *primers* e confirmar a amplificação dos genes selecionados. A PCR foi realizada com um passo de 95 °C por 1 minuto, seguidos por 30 ciclos de incubações a 95 °C por 15s e a 60 °C por 1 min. Após a PCR, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% e o fragmento amplificado correspondente foi excisado. O DNA foi extraído com o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) de acordo com instruções do fabricante. Após quantificação, os produtos de PCR foram clonados em vetor pGEM-T de acordo com o protocolo descrito pelo kit pGEM®-T Easy Vector System I (PROMEGA) e os vetores com inserto foram purificados e submetidos a sequenciamento.

Para realização da RT-qPCR foi utilizado o termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) utilizando *primers* específicos para cada gene (Tabela 7). Cada reação foi feita num volume final de 10 µL, sendo 2,5 µL de SYBR Green Rox Plus PCR Mix (LGC Biotecnologia), 2 µL de cDNA diluído 40 vezes, 4,7 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada e 0,4 µL de cada *primer* (0,2 µM direto e reverso). A reação ocorreu a 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de incubações a 95 °C por 15s e a 60 °C por 1 min. Ao final dos 40 ciclos uma curva de dissociação para cada fragmento amplificado (60-94 °C, a cada 0,5 °C por 1 s) foi feita para verificar a possível formação de dímeros de *primer* ou contaminação da amostra. As reações de RT-qPCR foram feitas em triplicata e controles negativos contendo água ao invés de cDNA foram incluídos para verificar contaminações nas amostras. Um controle negativo contendo 500 ng de RNA total foi feito para garantir a ausência de DNA genômico. Os níveis de expressão foram determinados como o número



de ciclos necessários para alcançar um limite fixo na fase exponencial da PCR. O número de ciclos foi referido como valor de Cq (*quantification cycle*), em substituição ao nomes para os antigos Ct (*threshold cycle*) ou Cp (*crossing point*), de acordo com as normas RDML (LEFEVER *et al.*, 2009). A eficiência de cada *primer* para cada reação e as Cqs foram calculados individualmente a partir do software qPCR miner ([www.miner.ewindup.info](http://www.miner.ewindup.info)) (ZHAO; FERNALD, 2005). A análise da estabilidade do nível de transcrição de cada gene em cada tecido ou região do inseto foi feita utilizando as ferramentas geNorm<sup>plus</sup> (Biogazelle Company) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), Normfinder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) (ANDERSEN *et al.*, 2004) e Bestkeeper (<http://bioinformatics.gene-quantification.info/bestkeeper.html>) (PFAFFL *et al.*, 2004). Bestkeeper usa dados brutos (valores de Cq) e eficiência dos *primers* na PCR para determinar os genes mais estáveis e os combina em um índice. Os valores de quantidade de expressão transformados em uma escala linear (a quantidade relativa maior para cada gene foi padronizada para 1) foram usados como dados de entrada para o geNorm e NormFinder.

## 2. Silenciamento do gene de Lacase 2

### a. Síntese de dsRNA de Lacase 2

Para a clonagem e sequenciamento de uma fragmento de lacase 2 de *A. grandis*, o RNA total foi extraído de larvas e insetos adultos utilizando Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 5µg de um pool de RNA total utilizando o kit Superscript II TM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) utilizando oligo d(T)-AP. Para a amplificação inicial do fragmento de Lacase 2 foram utilizados *primers* desenhados a partir do *contig* A\_grandis\_454\_rep\_c1717, obtido do banco de dados de transcrito de *A. grandis*, cujo tamanho foi de 1817pb (Figura 18). Dentro desta sequência foi selecionada uma região de 332pb para servir de molde para a síntese de moléculas de dsRNA correspondendo a uma região do sitio de ligação ao cobre da Lacase 2 (Figura 18, **negrito**).

O desenho dos *primers* foi realizado com o programa BLOCK-iT™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>), que analisa as sequências e indica regiões de maior probabilidade para uso em silenciamento gênico.

Os RNAs dupla fita foram sintetizados a partir de produtos das PCRs flanqueados pela sequência mínima do promotor T7. A PCR foi realizada nas seguintes condições: a 94°C por 1 min, temperatura de anelamento a 60°C e extensão a 72 °C por 1 minuto por 30 ciclos. Os produtos das PCRs foram clonados e sequenciados. Após a confirmação da sequência a síntese de dsRNA foi realizada utilizando 0,5µg de produto de PCR como molde para um volume de reação de transcrição de 20 µL, conforme descrito no protocolo do manual do kit MEGAscript® T7 High Yield (Ambion). A reação foi incubada por 16 horas a 37 °C, seguido por tratamento com DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen Life Sciences) por 15 minutos. Para alinhamento do dsRNA, os produtos da reação foram incubados a 70 °C por 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente. Para purificação dos produtos da transcrição seguiu-se uma extração com fenol/clorofórmio e subsequente precipitação com álcool isopropílico, conforme protocolo descrito pelo fabricante do produto. O dsRNA foi dissolvido em água tratada com DEPC, e a quantificação foi obtida por espectrofotometria.

#### b. Análise da expressão do gene de Lacase 2

A expressão do gene de lacase2 foi feita nas diversas fases do desenvolvimento do bicudo do algodoeiro. Para isso, RNA total foi extraído de ovos, larvas de todos os instares, pupas e adultos machos e fêmeas, quantificado e analisado conforme descrito anteriormente (Cap. II, Material e métodos, I, b). A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit Superscript III™ First-Strand Synthesis SuperMix for RT-qPCR (Invitrogen), seguindo orientações do fabricante.

A RT-qPCR foi realizada utilizando o termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) com *primers* específicos para o gene da lacase2 (Tabela 8), produzindo um amplicon de 192 pb. Os genes de referência utilizados foram *gapdh* e *β-tubulina* de *A. grandis*, com os mesmos *primers* descritos na tabela 7. Cada reação foi feita num volume final de 10 µL, sendo 2,5 µL de SYBR Green Rox Plus PCR Mix (LGC Biotecnologia), 2 µL de cDNA diluído 40 vezes, 4,7 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada e 0,4 µL de cada *primer* (0,2 µM

direto e reverso). A reação ocorreu a 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Ao final dos 40 ciclos uma curva de dissociação para cada *primer* (60-94 °C, a cada 0,5 °C por 1 s) foi feita para verificar a possível formação de dímeros de *primer* ou contaminação da amostra. As reações de RT-qPCR foram feitas em triplicata e controles negativos contendo água ao invés de cDNA foram incluídos para verificar contaminações nas amostras. Um controle negativo contendo RNA total foi feito para garantir a ausência de DNA genômico. A eficiência de cada *primer* para cada reação e as Cqs foram calculados individualmente a partir do software qPCR miner ([www.miner.ewindup.info](http://www.miner.ewindup.info)) (ZHAO; FERNALD, 2005). A análise da expressão relativa do gene da lacase 2 em cada fase de desenvolvimento do inseto foi feita utilizando a ferramenta geNorm<sup>plus</sup> (Biogazelle Company) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

c. Bioensaio com larvas microinjetadas com dsRNA de lacase2

O bioensaio com bicudo do algodoeiro foi feito por microinjeção de dsRNA. Larvas foram pesadas para que fossem utilizadas apenas indivíduos com peso entre 30 e 40mg. Em cada ensaio, 1µL contendo H<sub>2</sub>O ou 500ng de dsRNA foram injetados em na região dorsal de larvas de 3º instar, tomando o cuidado de não lesar a artéria dorsal. Na microinjeção foi utilizada uma microseringa (Hamilton Co.), tipo Gastight com conexão Luer (LT), modelo 1701LT, volume 10µL, com agulha de 51mm, gauge 26S, estilo de ponta 4 e bisel de 12°. Vinte larvas de bicudo foram microinjetadas e mantidos em dieta artificial mantida em B.O.D a 26 ± 2 °C, umidade relativa de 60 ± 10% e fotofase de 12 horas. Uma avaliação morfológica foi realizada ao longo do tempo até 60 dias após a injeção. Este experimento foi repetido três vezes, em épocas diferentes.

Tabela 8. *Primers* utilizados nos experimentos de lacase 2A

Nome	Sequência	Experimento
<b>iLAC2AGαFwd</b>	5'GCTCCGCTTCTATCTCAGT3'	Síntese de dsRNA, Southern Blot
<b>iLAC2AGαRv</b>	5'GCAATGGTGTCTTTACCG3'	Síntese de dsRNA, Southern Blot
<b>qPCR_Ag_Lac2A_Fwd</b>	5'GGTTGATGAAGTTCAACA3'	RT-qPCR
<b>qPCR_Ag_Lac2A_Rv</b>	5'GCAATGGTGTCTTTACCG3'	RT-qPCR

A\_grandis\_454\_rep\_c1717

ATATTTGAGATACTACAAGGGACCATATACTCCATTACCCCAAGCACCTACTTATGACTTCGGTATTCCACAGGGAGTGGWACTTAA  
TCCTTTGGACGCAATTTGTAATGAAACCAGAGCAGATGCCGTTTGTATCAGTCAATTGAAAAATGCCAGAGAAGTGGACAGGGCG  
CTGCTGATTGAAAAACCAATGTGAAGATATTTTGCATTCCAGATTCCACGTTTATACACCGGAGGATCTTTTAAATCCTAACAGTT  
ACAACAGACATTTAGTTGCGCCAAACGGAGACCAGTAATCAGTTAATCGACGAAATCTCGTACATGGCTGCGCCAGCTCCGCT  
**TCTATCTCAGTACGATGAAATTGACCCCGAGCAATTCTGTAATGGAGATAACAGACCACCCAATTGTGGACCTAACTGCATG**  
**TGTACCCACAAAATTGATATCCATTAATGCGATTGTCGAAGTTGTTCTGGTTGATGAAGTTCAACAACCGAACTTATCCC**  
**ATCCGTTCCATTGACAGGTTATGCTTTTAATGTGGTCCGTTATGGTCCGCTCACCTGACACAAGTGTCAAGAAAATTAACTT**  
**AAAACACGCTTTGGATCTGGATCGGAGAGGTTCTGTTGCATAGGCACTTTGAATCTGCCACCCGGTAAGACACCAATTGCTGT**  
ACCAAACAATGGATACGTAATCTTCAGATTCCGAGCAGACAATCCTGGTTTCTGGCTTTTCCACTGTCACTTCTTGTCCACATAGTT  
ATAGGAATGAATTTGGTCCCTGCAAGTGGGTACACATGCAGACATACCACAGTGCCACCGAATTTCCCTACTTGCGGCGATCACAC  
GCCACGAATCAATTTAGATCCAACGAAAATATGAAGACTTAATACCTAGTATTTTTTTAAGATTAAGGGTCCTTTTTAGTATAGTT  
GGTGTAATAAAGAGTCAAGTCAAAGGTTTGGTAAGTATTACGAGTTAATATATTTGTGAAAAATGTACAGGGTTATGCTACTCAT  
GTATATTATTTAGGTAGGTATAATAACGCAATGTATATAATTTTTACTAGCACAATATGTAAATATAACATATTACACGATCTTATT  
TGTCACCAACTGCTAGTATATTGTAGAGTTACCAAATTAATATCTGAATATTTGGATTAAGTCTTGCCATCCAAAAATGTCGAAAA  
TCAGTATTTCTAAATGAGTGTTTTCTATATTATGATTTTATTTATCTGATATTATCTGTACTGTACCAAATGGTCTTTATCGCCATATT  
ATTATATAATTTAGATATCTACCTCTTCTAIGTGTWTWTGTTTTTTAACTATCACTATTGGTGCTTTCTAAAACTTATA  
AATCAATTATTTGAGTAAAATCTTTAAATATTTTTGATACTTTTCATAATAAGAAAATGTTTTGGTTAATATTTTAATATGGGAAA  
TATTTAAAGATTTAAAGGTATGAACCTTTTCGTAAATAAATTATTTCTCCAGGAAGTAAGCTAAGGTCTTTAATGTAAAAATTCTTAT  
AGTTATAGTAGAAATTTTATGATTATGTCATTGGAAATGTTACCAACATAACGAAGTAAATAAATATGAATTTTATCACATCTATACCA  
CAAAAATAGGCACCTTCATAGTACATTTTTGGTAAAAGAACCACCTAGTCTATTACAAAACCAAGACGAATATGAAAATAAGTCATC  
GTTGTAGATTTGTATATAAAATAAGTGTAAAGTACCAATGTATTAAAGTAATAAAATTTGTGACTATATTTATGT

Figura 18. Sequência do *contig* A\_grandis\_454\_rep\_c1717. A região em negrito representa o amplicon utilizado para síntese de dsRNA para uso no silenciamento do gene da lacase2A e para experimentos de Southern Blot. A sequência sublinhada é o amplicon analisado no RT-qPCR.

#### d. Análise do silenciamento de lacase 2 por RT-qPCR

Bioensaios com microinjeção de dsRNA de lacase 2 foram realizados conforme descrito anteriormente para extração de RNA total e posterior análise por RT-qPCR. Larvas microinjetadas com dsRNA de lacase2 ou com H<sub>2</sub>O foram coletadas 20 dias após a microinjeção. Pupas/Adultos mal formados foram coletados 14 dias após a microinjeção. A quantificação e análise de integridade do RNA foram feitas conforme descrito anteriormente (Cap. II, Material e Métodos, I, b). A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit Superscript III<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis SuperMix for RT-qPCR (Invitrogen), seguindo orientações do fabricante. A RT-qPCR foi realizada como descrito anteriormente (Cap. II, Material e métodos, II, b).

#### e. Determinação do número de cópias do gene de lacase2

Quatro alíquotas de DNA genômico de *A. grandis* foram digeridas com as enzimas *HindIII*, *ScaI*, *EcoRI* ou *XbaI* e submetidas à eletroforese num gel de agarose 0,8% e transferidas para uma membrana de nylon Amersham Hybond N<sup>+</sup> (GE Healthcare Life Sciences) utilizando procedimentos padrão (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Um produto de PCR produzido com os *primers* iLAC2AgαFwd e iLAC2AGαRv (Tabela 8) foi marcado com α-[<sup>32</sup>P]dCTP com alta atividade específica, utilizando o kit Amersham Megaprime DNA-labeling (GE Healthcare Life Sciences) e foi utilizado para hibridização na membrana de nylon. A membrana foi lavada para a estringência de 0,1X SSC com 0,2% SDS a 65°C.

### II.3. Resultados e Discussão

#### 1. Seleção das Sequências dos Genes de Referência Candidatos

Um dos objetivos deste trabalho é a análise da expressão relativa de um gene envolvido em um processo vital para o inseto, o gene que codifica a enzima lacase 2. Uma etapa importante para essa análise é estabelecer quais genes podem ser utilizados como referência para a quantificação relativa da expressão do gene alvo. A confiabilidade de qualquer experimento de análise de expressão relativa por qPCR pode ser maior com a inclusão de genes que funcionem como controles endógenos para corrigir variações na eficiência de amplificação das reações e na quantificação de uma amostra para outra, sendo chamados de genes de referência ou *housekeeping genes*. No caso do Bicudo do Algodoeiro não existe indicação de genes de referência até o momento. Dessa forma, nove genes candidatos foram analisados quanto à sua estabilidade de expressão nas diferentes partes ou órgãos.

A dificuldade de encontrar metodologias e pessoas capazes de dissecar órgãos e tecidos de insetos fez com que fossem escolhidos não só órgãos, mas algumas partes inteiras do inseto consideradas de relevância para futuros estudos. Por exemplo, o intestino é alvo de estudos não só sobre a fisiologia da digestão, mas de moléculas-alvo para controle, visando o uso biotecnológico na indústria, para metagenômica de microorganismos simbiotes. A cabeça, ou o cérebro foram escolhidos por sua importância

nos estudos de moléculas neuroativas, hormônios (a síntese de alguns hormônios de insetos se dá na *corpora allata*, na cabeça do inseto), percepção (visão, calor, feromônios, etc.). A larva de bicudo é muito pequena para que se pudesse dissecar o cérebro e por isso resolveu-se extrair a cabeça toda. Cutícula e aparelhos reprodutores feminino e masculino são sempre objetos de estudo de genes tecido-específicos, já que a adaptação ao ambiente, a muda e o sucesso de reprodução dos insetos estão na lista dos assuntos mais pesquisados, principalmente para controle de pragas e vetores de doenças.

Nove genes candidatos foram escolhidos após uma extensa busca de genes comumente utilizados como referência em experimentos de PCR em tempo real. Apesar de uma grande quantidade de trabalhos específicos de determinação de genes de referência para qPCR para vários organismos, para insetos, esse número é bem menor. Muitos trabalhos de análise de expressão relativa simplesmente assumem que genes comumente utilizados são estáveis em diversas situações, o que muitas vezes não representa a realidade. O ideal seria que para cada organismo e até cada situação biológica (estresse, alimentação, ambiente, etc.), genes de referência sejam estudados. Há certo tempo existe uma preocupação na comunidade científica internacional em relação às inúmeras fontes de erro inerentes a um experimento de qPCR, desde o desenho do experimento, passando pela integridade e garantia de similaridade da extração de RNA e síntese de cDNA, até a PCR propriamente dita e seus métodos de análise (FLEIGE; PFAFFL, 2006; FLEIGE *et al.*, 2006; LEFEVER *et al.*, 2009; BUSTIN, 2010; BUSTIN *et al.*, 2010).

Neste trabalho, procurou-se, quando possível, utilizar as recomendações do MIQE (*The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) para gerar resultados de qPCR mais confiáveis, sem dúvidas de interpretação (BUSTIN *et al.*, 2010). Apesar de utilizar um método fluorimétrico para quantificar o RNA, a eficiência da síntese de cDNAs não foi quantificada. Para tentar diminuir o erro gerado por uma possível diferença de quantidade de cDNA, todas as amostras das partes do inseto foram diluídas previamente 30, 40 e 50 vezes, e uma corrida prévia mostrou que 40 vezes era uma quantidade considerada boa para que os valores de Cq se mantivessem entre os ciclos 15 e 30. Assim, todas as corridas foram feitas diluindo o cDNA 40 vezes. As qPCRs realizadas para os nove genes foram feitas colocando todos os cDNAs para um mesmo gene numa mesma placa. Um mesmo cDNA com o mesmo gene foi sempre utilizado como

normalizador entre as placas. As análises das curvas de dissociação de cada corrida não apresentaram dímeros de *primers* nem amplificações inespecíficas.

O sequenciamento dos amplicons clonados em vetor pGEM-T mostraram que cada um dos fragmentos amplificados correspondia ao gene esperado. Houve uma diferença de duas bases no gene de ArgK e de uma base no gene de RPS26, em relação ao *contig* do transcriptoma (Figura 19). Essas substituições podem ser SNPs (single nucleotide polymorphisms), uma vez que as mudanças nos códons não alteraram os aminoácidos codificados, ou erros de amplificação pela DNA *Taq* Polimerase, ou até erros de sequenciamento. Todas as outras sequências tiveram 100% de identidade com o respectivo *contig*. E a identificação de todas as sequências, sem exceção, foi confirmada por BLASTn.

```

> Argk
ACAAGGGTGGTCAAGTCGAGTCGAAACAGTTGTCAIAGACAGGCATTTCTATTGGTCGGGGACACGCGCCGAGATGCGTCTATCGATTTAAACAAAACCTGC
GCCCTGTTTGT(A)AAGTGCATT(C)GTTAAACGAAAGTCGGGATCAGGCTGTIAGCGGTIAG
                (T)           (G)
> β-Actina
CCTTTAACACCCCTGCTATGTACGTAGCAATCCAAGCCGACTCTCCTTTGACGCTTCGGGTCGTACCACCGGTATCGTCTTGGACTCTGGCGATGGTGTAA
CCCACACCGTCCCAAATTTAAGAAGGTTAIGCTCTTCCCACGCCATCCTTCGTTTGGACTTGGCCGGTCTGTGACTTGACC GACTACTCAITGAAG
> β-Tubulina
GTGCGTAAGGAGGCCGAGGGTTGCGACTGTTTACAAGGGTTCCAAATGACCCACTCTTTGGGGGGCGGTACCGGGTCCGGCAITGGGCACCTTACIAATCT
CGAAGATCCGCGAGGAGTACCCGGACAGGATAATGAACACTTACTCGGTGGTGC
> GAPDH
CCCGTGGCGAAAGTGAITCCAGACAATTCGAGATCGTCGAGGGTCTGATGACGACCGTGCACGCCACCACCGCCACC CAAAAACGGTGCACGGCCCG
TCCGGCAAATGTGGAGGGACGGACGCGGGGCCACGAGAATCATCCCGGGTTCGACCGGTGCGCGAAAGCGGTTCGGTAAAGTCAITCCGCTT
> EF1A
CCGTTTTTATGCCCCGTAAGACACACTTACTCCATCCCTGGTAGAGGCACAGTGGTTCACGGGAAGACTGGAGAGAGGAGTGTAAAAAGGGGGCGGACT
GTGAATTTGTCGGATTTAATAAGGTGATAAAGAGTACGGTACGGGAGTGGAGAIGTT
> RPS3
CACAACTCAAAAAAGCGAAAATTCGTTGGAGACGGAGTCTTCAAGGCTGAATTAACGAATCTTAAACAGAGAACTGTCAGAAAGATGGTACTCAGGTG
TGGAAATACGTGTACCCCGACTCGTACCGAAATCAATCATGGCCACCAGAACTGACCGTGTATTGGGA
> RPS11
ACCCACGGTTTTCTTAAACCCCAAACAAGCCAGCAAAAAGAAGTTGTAAGGTTTCAAGGAATGTAGGGCTCGGGTTCAAACCCCTAGAGAGGCCATCG
AAGGTCACTACATCGACAAAAAATGCCCATTCACCGGCAACGTGTGATCCGAGGCCGATCCTCACCGGAGTCTGC
> RPS26
TCCCAAAAGACAAGGCAATCAAGAAATTCGTCAATGAAAATTTGTCGAAGCTGCGCAGTT(A)GGGATATCACTGAGGCTTCAGTATATAATCAATACCTCC
TTCCAAAGTTGACGGCAAGCTTCACTACTGTGTCTCTTCCGCTATCCACAGCAAAGTCTGTGCTAACAGGAGCAAGAAG
                (G)
> UBQ
CGCTTCGCGCTIACTGTACTTGGCATIACGGTTTAAACGTAACACAGTCTGGACTCGAACTTGGACTCGTAAATTTCTAGTGGATCAGTTATTCACCTGTT
CAACTGTAAAGGATCAGTTCGGCGGGATCAGTTCAGTATTAGGCAALATTGAATCGTTTCCGCTTGAAGAGT

```

Figura 19. Sequências dos produtos de PCR gerados com os *primers* dos genes candidatos de referencia. Em destaque, os nucleotídeos sequências de ArgK e RPS26 foram diferentes no *contig* retirado do transcriptoma (entre parênteses em vermelho).

a. Análise da estabilidade de expressão por Bestkeeper

As análises de estabilidade dos genes foram feitas com as 3 mais utilizadas ferramentas atualmente para estudo de genes de referência, Bestkeeper, geNorm e NormFinder. O mais importante na identificação de genes de referência expressos de forma estável é que os genes precisam ter um perfil de expressão similar entre as amostras, isto é, seus níveis de expressão devem ter uma alta correlação. O Bestkeeper combina candidatos altamente correlacionados em um índice. A partir disso, a correlação de cada gene candidato com este índice é calculada e expressa pelo coeficiente de determinação e pelo *p value*. Bestkeeper ainda determina o desvio-padrão e o “poder” de referência de cada gene, cabendo ao usuário selecionar os melhores genes baseado nessas variáveis (PFAFFL *et al.*, 2004).

Baseado na análise de variações calculadas (SD), o Bestkeeper revelou uma estabilidade de expressão para cada um dos nove genes ( $SD < 1$ ) diferente para cada parte do inseto adulto ou larva (Tabelas 9 e 10, respectivamente). Além disso, os melhores genes candidatos se relacionaram de maneira significativa com o índice do Bestkeeper calculado como a média geométrica dos valores de Cq dos diferentes genes para um determinado cDNA ( $p < 0,05$ ). O coeficiente de determinação (CD) de cada gene indica a maior estabilidade para cada gene quanto mais perto de 1 for o valor de CD. A variância intrínseca (InVar) desses genes para um determinada amostra teve baixa variação dos valores de Cq. O Bestkeeper analisa a integridade da amostra através do cálculo de uma variação intrínseca para uma amostra, entre as diferenças nos valores respectivos de Cq e o valor médio de Cq para cada gene de referência (PFAFFL *et al.*, 2004).

No caso dos adultos, as proteínas ribossomais e a ubiquitina não se apresentaram como bons candidatos a genes de referência. Em primeiro lugar, a amplificação para estes dois genes ocorreu sempre após 35 ciclos. Mas o mais importante é que para a maioria dos casos, a variação intrínseca (InVar) dentro das amostras para estes genes variou muito, e esses dados foram descartados, conforme recomendado (PFAFFL *et al.*, 2004). Para o cérebro, os genes mais estáveis, baseado no coeficiente de determinação são ArgK e EF1A. No entanto, o coeficiente para estes genes foi baixo (Tabela 9). Para a cutícula dorsal, os resultados foram melhores, sendo os genes GAPDH, ArgK, EF1A e  $\beta$ -tubulina e  $\beta$ -actina considerados todos bons candidatos. No caso do intestino de adulto,  $\beta$ -actina e EF1A



foram os mais estáveis. Os genes  $\beta$ -actina e GAPDH foram os mais estáveis para o aparelho reprodutor feminino (ARF). Interessante notar que pelo coeficiente de determinação, o gene RPS3 teve a melhor avaliação. No entanto, devido a sua amplificação tardia, não é aconselhável utilizá-lo como gene de referência. Para o aparelho reprodutor masculino (ARM), apenas ArgK é um razoável gene de referência, segundo análise do Bestkeeper.

A análise das partes das larvas revelou um perfil melhor para os genes candidatos (Tabela 10). Apenas para o gene da ubiquitina (UBQ) os valores de InVar foram muito altos e por isso os dados foram descartados. Para a cabeça da larva os genes candidatos RPS26, GAPDH,  $\beta$ -tubulina, ArgK e EF1A foram os que tiveram melhores resultados. Na cutícula da larva, os genes mais estáveis foram GAPDH, ArgK, EF1A e  $\beta$ -tubulina e  $\beta$ -actina. Os outros genes tiveram Cqs entre 36 e 38, e não foram analisados. Para o intestino, RPS26 e  $\beta$ -tubulina tiveram CDs mais altos. A análise do Resto mostrou que GAPDH e os genes de proteínas ribossomais foram os mais estáveis.

#### b. Análise da estabilidade expressão por geNorm

Apesar de mais confiável, o geNorm tem muitas similaridades com BestKeeper. A principal regra no geNorm é que a taxa de expressão entre dois genes de referência deve ser constante entre as amostras (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Para cada gene candidato, o geNorm calcula o valor de estabilidade M como a variação média no nível dos transcritos entre um gene e todos os outros genes em um dado grupo de amostras, por pares. O valor de estabilidade M é inversamente proporcional à estabilidade. Os genes são, então, classificados de acordo com a estabilidade por um processo de exclusão passo a passo dos genes menos estáveis, gerando o valor de V. Quanto menor este valor, maior a estabilidade e a possibilidade do gene excluído influenciar na expressão relativa de genes-alvo.

Os valores de M obtidos por geNorm estão plotados nas figuras 20 e 21. Os valores de M para todos as partes de adulto (Figura 20) e larva (Figura 21) que estão abaixo de 1,5 indicam que a expressão de diferentes candidatos é relativamente estável. Em alguns casos apenas, como aparelho reprodutor feminino, cérebro e cutícula de adulto, genes tiveram valor de M acima de 1,5. Entretanto, genes estáveis foram diferentes entre as diversas

partes do inseto. Entre os mais estáveis para a maioria das partes estão  $\beta$ -tubulina,  $\beta$ -actina, GAPDH, ArgK e EF1A.

Análise de variação dos pares de genes para estimar o efeito de incluir um gene adicional nos experimentos de qPCR para expressão relativa (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) mostrou que entre as diferentes partes do inseto o uso de 2 genes de referência pode ser suficiente para normalizar os valores de expressão dos genes-alvo, tanto para adultos quanto para larvas (Figuras 22 e 23, respectivamente). A adição de um terceiro gene contribuiu muito pouco para uma diminuição do fator de normalização, a não ser no caso das amostras de cérebro. A inclusão dos genes menos estáveis pode levar a um aumento ou diminuição do fator de normalização. Uma alta variação  $V$  indica que o gene adicionado tem um efeito significativo e não deve ser incluído na normalização. Nas figuras 22 e 23, a linha azul mostra o limite para  $V$  é 0,15 (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

### c. Análise da estabilidade de expressão por NormFinder

NormFinder é uma ferramenta que permite estimar a variação total dos genes de referência candidatos, mas também estima a variação entre e dentro de subgrupos de amostras. Este processo possibilita uma medição direta da variação da expressão, permitindo ao usuário avaliar o erro sistêmico introduzido quando utilizar como modelo um determinado gene. Esta abordagem baseada em um modelo é teoricamente menos sensível a uma correção por genes normalizadores que as abordagens do BestKeeper e do geNorm. Da mesma forma que o geNorm, o NormFinder gera um valor de estabilidade  $M$  para cada gene, que é a medida direta da variação da expressão estimada. Esta variação na expressão está diretamente relacionada com o valor  $M$ , já que um baixo valor  $M$  demonstra menor variação de expressão gênica entre as amostras estudadas (ANDERSEN *et al.*, 2004).

A análise por NormFinder mostrou um perfil parecido com a análise por geNorm.  $\beta$ -tubulina,  $\beta$ -actina, GAPDH, ArgK e EF1A foram mais estáveis para a todas as partes de adulto (Figura 24). Na larva, alguns genes de proteínas ribossomais estão entre os mais estáveis (Figura 25).

O NormFinder foi a única ferramenta que permitiu a análise de todos os genes e todas as partes dos inseto adulto (intragrupo 1) e larva (intragrupo 2) e intergrupos (Figura

26), sendo GAPDH e  $\beta$ -tubulina os dois genes mais estáveis para todas as partes. É interessante notar que as combinações de dois candidatos calculada no NormFinder, reduziu o valor da estabilidade no conjunto de partes de adulto e de larva, mas não correspondem sistematicamente aos genes mais estáveis individualmente para a análise intergrupos (larvas e adultos) (Tabela 11).

#### d. Comparação entre as análises de estabilidade

As análises dos genes candidatos mostrou uma diferença nos resultados gerados pelas 3 ferramentas utilizadas. Apenas o gene para ubiquitina (UBQ) teve um péssimo resultado para todos os casos. Na maioria dos casos, 5 genes ( $\beta$ -tubulina,  $\beta$ -actina, GAPDH, ArgK e EF1A) foram os mais estáveis. No entanto para alguns casos, como intestino, genes para proteínas ribossomais (RPS3, RPS11, RPS26) foram estáveis. A capacidade de RNA ribossomal (rRNA) e mRNAs que codificam proteínas ribossomais de representar níveis estáveis de mRNA já foi questionada por alguns autores, que argumentam que estes não deveriam ser utilizados para corrigir variações entre amostras na quantificação de mRNAs alvo (SOLANAS *et al.*, 2001; TRICARICO *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2011). No entanto, genes como GAPDH e  $\beta$ -actina também foram questionados quanto sua estabilidade. Um dado real sobre genes de proteínas ribossomais ou rRNA é que estão em maior quantidade, o que obriga o investigador a uma diluição às vezes alta antes de realizar a qPCR.

Quais genes devem ser usados, baseado em qual ferramenta de análise? Em muitos trabalhos que utilizam os três algoritmos, ocorre uma convergência entre geNorm e NormFinder, e uma discrepância destes com BestKeeper. Bestkeeper parece ser o menos utilizado dos 3 na escolha da validação de genes-alvo após uma análise de estabilidade. geNorm e NormFinder se baseiam em algoritmos parecidos para análise e por isso o resultado gerado por eles são os mais considerados por muitos trabalhos científicos.

Genes de referência em estudos de RT-qPCR para muitas espécies foram baseados em consenso e experimentos com outros organismos, sem uma evidência empírica que demonstrasse sua estabilidade. Apesar da escolha dos genes aqui testados ser baseada na análise de genes de referencia já testados para insetos, os resultados aqui apresentados, somados aos dados da literatura, mostram que a estabilidade da expressão de genes já

considerados de referência deve ser verificada para cada tipo de experimento, principalmente se algum tratamento específico vai ser analisado (estresse, interação, alimentação, etc). No mínimo, ao mudar uma condição à qual o organismo será submetido, a estabilidade de um gene já utilizado como referência deve ser confirmada. Apesar de não existir um gene universalmente estável em todos os tipos celulares e em todas as condições, a expressão de alguns genes parece ser estável, isto é, é invariável em processos que parecem não afetá-los diretamente. Por isso o uso de um único gene como normalizador pode potencialmente influenciar a análise estatística dos níveis de expressão de genes-alvo. O uso de mais de um gene pode minimizar o potencial erro do uso de um gene só, que pode não ser estável em um determinado experimento. Por isso é recomendável a análise da combinação de dois ou mais genes feita pelo NormFinder ou pelo geNorm. Baseado nas análises deste trabalho, o uso dos genes para GAPDH,  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, Arginina Quinase e EF1A deve ser levado em consideração em experimentos mais generalistas com o bicudo do algodoeiro.

Tabela 9. Sumário da análise estatística gerada pela ferramenta Bestkeeper para os genes candidatos de referencia para as partes de insetos adultos. O Coeficiente de Determinação (CD) indica maior estabilidade quanto mais perto de 1

	ArgK	$\beta$ -act	$\beta$ -tub	GAPDH	EF1A	UBQ	RPS3	RPS11	RPS26
<b>Cérebro</b>									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MG	26,37	25,61	26,45	26,72	26,66	-	-	-	-
SD	0,16	0,32	0,38	0,26	0,89	-	-	-	-
CD	0,58	0,13	0,15	0,02	0,48	-	-	-	-
<i>p</i> value	0,047	0,043	0,038	0,048	0,085	-	-	-	-
<b>Cutícula Dorsal</b>									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MG	24,46	23,74	24,67	24,93	24,00	-	-	-	-
SD	0,36	0,33	0,43	0,46	0,39	-	-	-	-
CD	0,95	0,86	0,90	0,97	0,92	-	-	-	-
<i>p</i> value	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	-	-	-	-
<b>Intestino</b>									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MG	23,08	21,96	23,43	23,45	22,54	-	-	-	-
SD	0,13	0,56	0,14	0,36	0,08	-	-	-	-
CD	0,00	0,69	0,19	0,03	0,64	-	-	-	-
<i>p</i> value	0,977	0,005	0,235	0,653	0,009	-	-	-	-
<b>ARF</b>									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MG	23,23	22,90	24,06	23,99	23,12	-	35,43	-	-
SD	0,13	0,27	0,18	0,31	0,13	-	0,83	-	-
CD	0,65	0,95	0,73	0,83	0,60	-	0,97	-	-
<i>p</i> value	0,054	0,001	0,030	0,011	0,071	-	0,001	-	-
<b>ARM</b>									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MG	24,58	23,04	23,90	24,22	24,17	-	-	-	-
SD	0,25	0,23	0,19	0,38	0,51	-	-	-	-
CD	0,78	0,52	0,00	0,56	0,00	-	-	-	-
<i>p</i> value	0,004	0,043	0,954	0,032	0,893	-	-	-	-

N, número de amostras; MG, Média Geométrica das Cqs; SD, desvio-padrão; CD, coeficiente de determinação; ArgK, Arginina Quinase;  $\beta$ -act,  $\beta$ -actina;  $\beta$ -tub,  $\beta$ -tubulina; GAPDH, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase; EF1A, Fator de Elongação 1-Alpha; UBQ, Ubiquitina; RPS3, RPS11, RPS26 Proteínas Ribossomais S3, S11 e S26; ARM, Aparelho Reprodutor Masculino; ARM, Aparelho Reprodutor Feminino.

Tabela 10. Sumário da análise estatística gerada pela ferramenta Bestkeeper para os genes candidatos de referencia para as partes de larvas. O Coeficiente de Determinação (CD) indica maior estabilidade quanto mais perto de 1

	ArgK	$\beta$ -act	$\beta$ -tub	GAPDH	EF1A	UBQ	RPS3	RPS11	RPS26
<b>Cabeça</b>									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MG	24,35	16,91	18,14	17,77	21,15	-	20,63	18,46	15,99
SD	0,33	0,16	0,35	0,46	0,36	-	0,52	0,34	0,58
CD	0,88	0,58	0,97	0,98	0,86	-	0,87	0,65	0,99
<i>p</i> value	0,001	0,017	0,001	0,001	0,001	-	0,001	0,009	0,001
<b>Cutícula</b>									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MG	25,01	24,20	25,25	25,49	24,59	-	-	-	-
SD	0,25	0,44	0,37	0,49	0,31	-	-	-	-
CD	0,91	0,92	0,89	0,98	0,95	-	-	-	-
<i>p</i> value	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	-	-	-	-
<b>Intestino</b>									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MG	19,11	18,39	15,89	16,77	20,09	-	17,81	15,48	14,29
SD	0,29	0,15	0,30	0,23	0,14	-	0,45	0,19	0,24
CD	0,01	0,03	0,82	0,11	0,65	-	0,79	0,66	0,83
<i>p</i> value	0,789	0,682	0,002	0,018	0,015	-	0,003	0,015	0,002
<b>Resto</b>									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MG	23,06	21,12	20,12	18,81	21,96	-	21,25	19,11	17,20
SD	0,17	0,16	0,28	0,34	0,12	-	0,43	0,23	0,24
CD	0,63	0,49	0,73	0,93	0,76	-	0,84	0,86	0,81
<i>p</i> value	0,010	0,035	0,003	0,001	0,002	-	0,001	0,001	0,001

N, número de amostras; MG, Média Geométrica das Cqs; SD, desvio-padrão; CD, coeficiente de determinação; ArgK, Arginina Quinase;  $\beta$ -act,  $\beta$ -actina;  $\beta$ -tub,  $\beta$ -tubulina; GAPDH, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase; EF1A, Fator de Elongação 1-Alpha; UBQ, Ubiquitina; RPS3, RPS11, RPS26 Proteínas Ribossomais S3, S11 e S26.

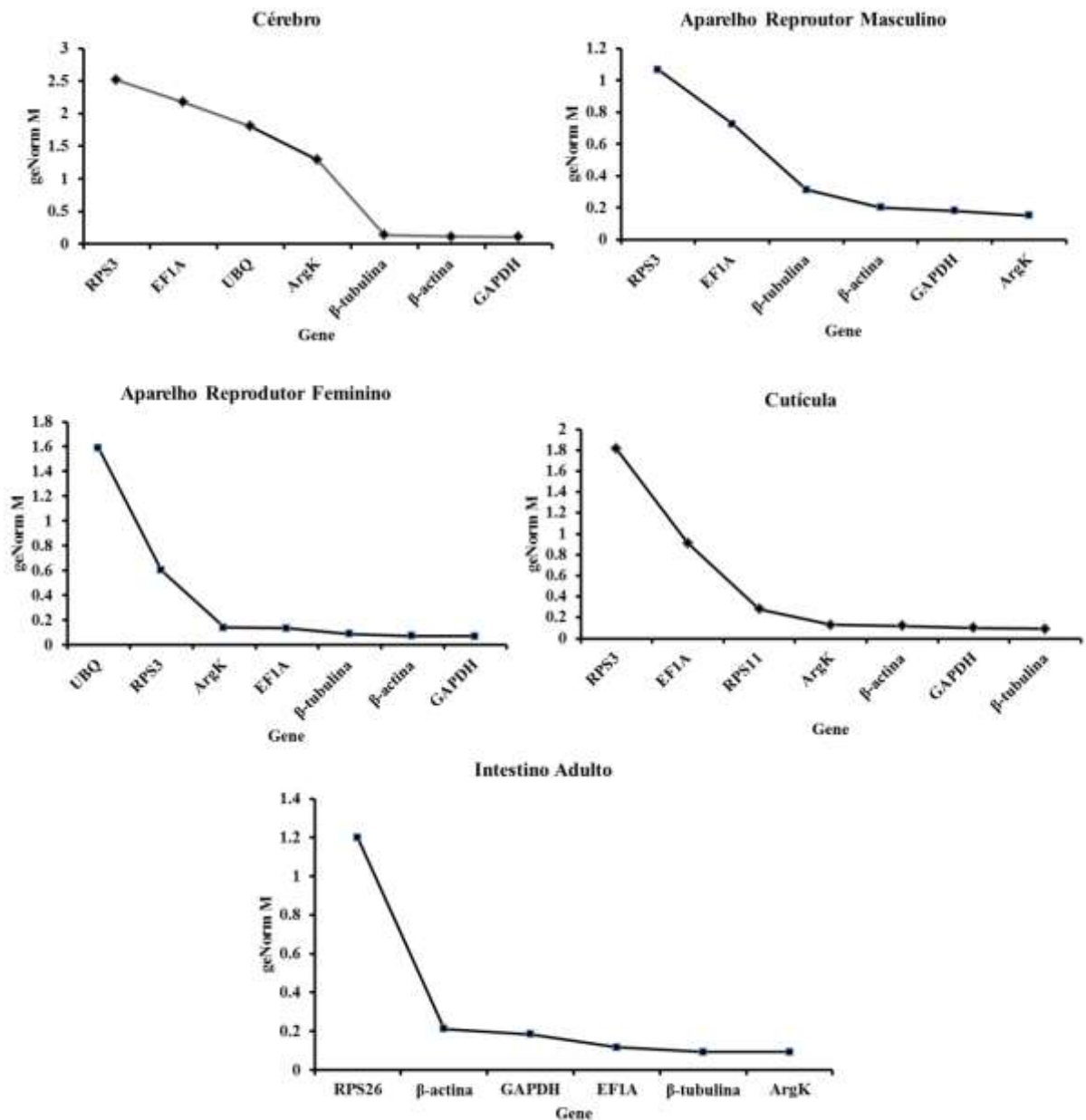


Figura 20. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos Arginina Quinase,  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, GAPDH, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase, Fator de Elongação 1-Alpha, Ubiquitina, e Proteínas Ribossomais S3, S11 e S26, com geNorm nas partes do inseto adulto. Os genes mais estáveis têm valores de M menores que 1,5. Quanto mais à direita do gráfico, maior a estabilidade.

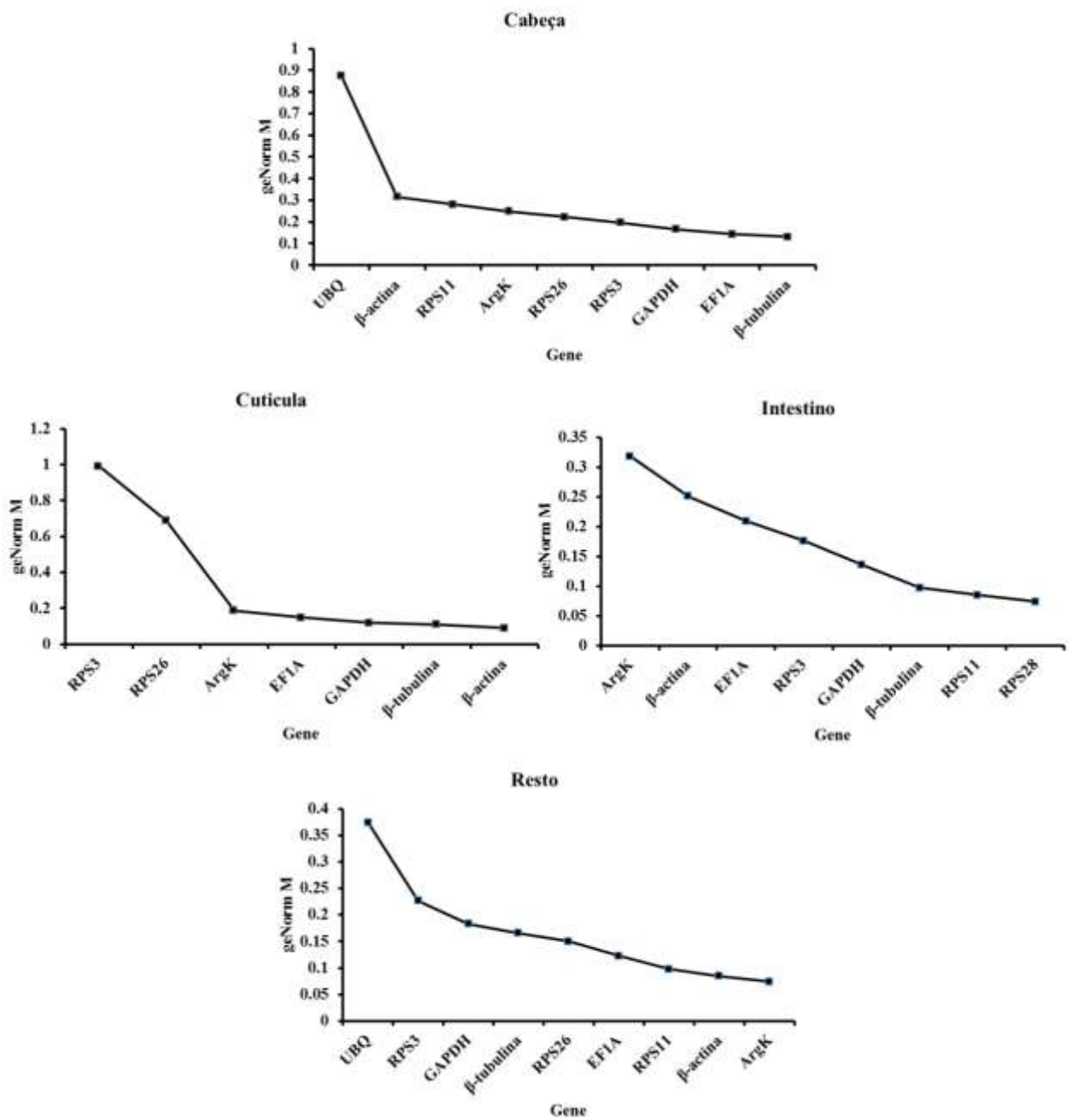


Figura 21. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos Arginina Quinase,  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, GAPDH, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase, Fator de Elongação 1-Alpha, Ubiquitina, e Proteínas Ribossomais S3, S11 e S26, com geNorm nas partes da larva. Os genes mais estáveis têm valores de M menores que 1,5. Quanto mais à direita do gráfico, maior a estabilidade.



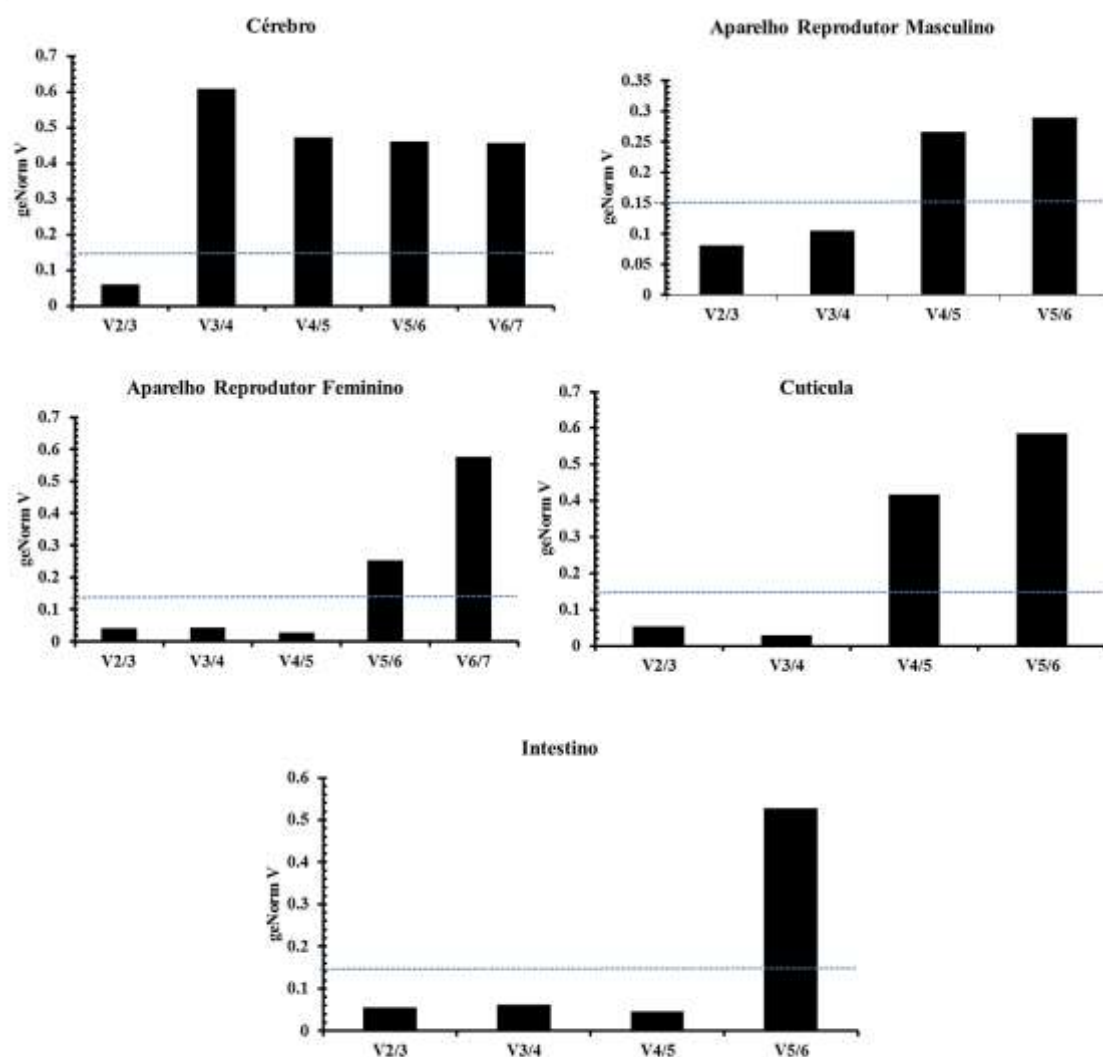


Figura 22. Valores de V após análise da estabilidade dos genes candidatos com geNorm nas partes do inseto adulto. A linha azul mostra o limite superior aceitável de V para estabilidade ( $V = 0,15$ ). Para cada parte do inseto, a adição de um novo gene de referência altera o valor de V. Por exemplo, no cérebro, a adição de um 4º gene (V3/4) de referência não deve ser feita porque o valor de V indica que a baixa estabilidade deste gene influencia de maneira errada na expressão relativa dos genes de interesse.

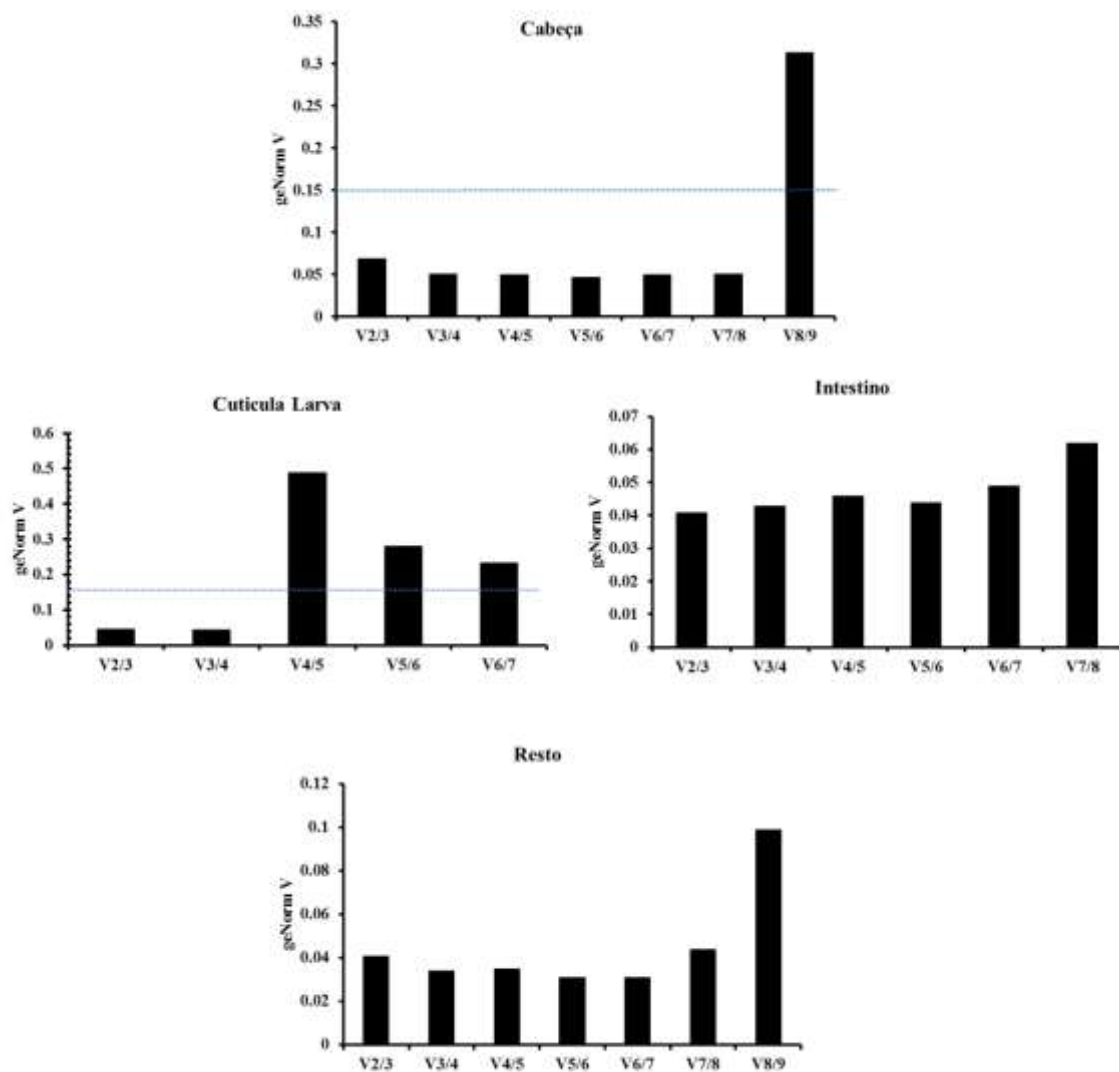


Figura 23. Valores de V após análise da estabilidade dos genes candidatos com geNorm nas partes da larva. A linha azul mostra o limite superior aceitável de V para estabilidade ( $V = 0,15$ ). Para cada parte do inseto, a adição de um novo gene de referência altera o valor de V. Por exemplo, no cérebro, a adição de um 4º gene (V3/4) de referência não deve ser feita porque o valor de V indica que a baixa estabilidade deste gene influencia de maneira errada na expressão relativa dos genes de interesse.

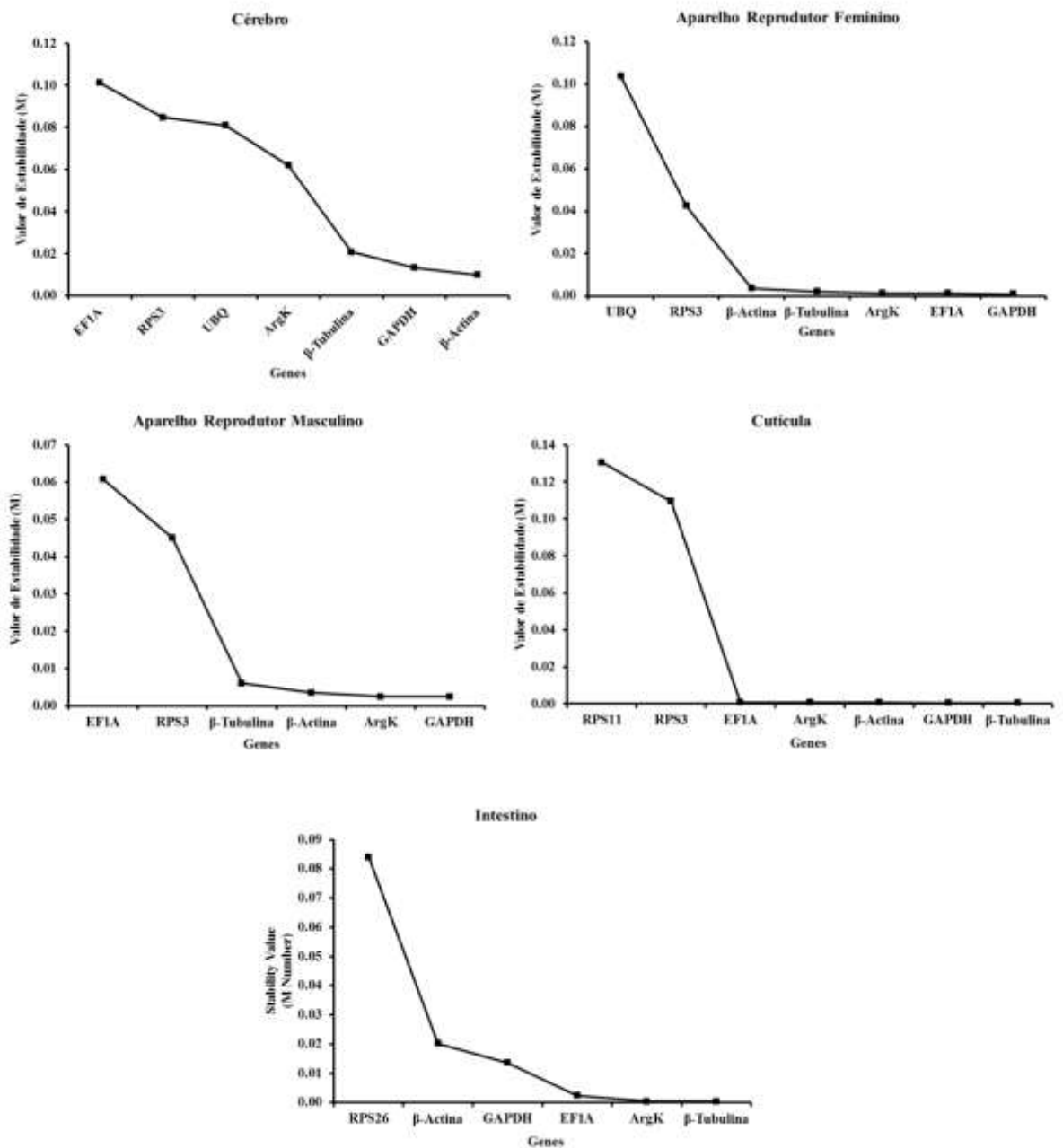


Figura 24. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos Arginina Quinase,  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, GAPDH, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase, Fator de Elongação 1-Alpha, Ubiquitina, e Proteínas Ribossomais S3, S11 e S26, com NormFinder nas partes do inseto adulto. Os genes mais estáveis têm valores de M menores que 1,5. Quanto mais à direita do gráfico, maior a estabilidade.

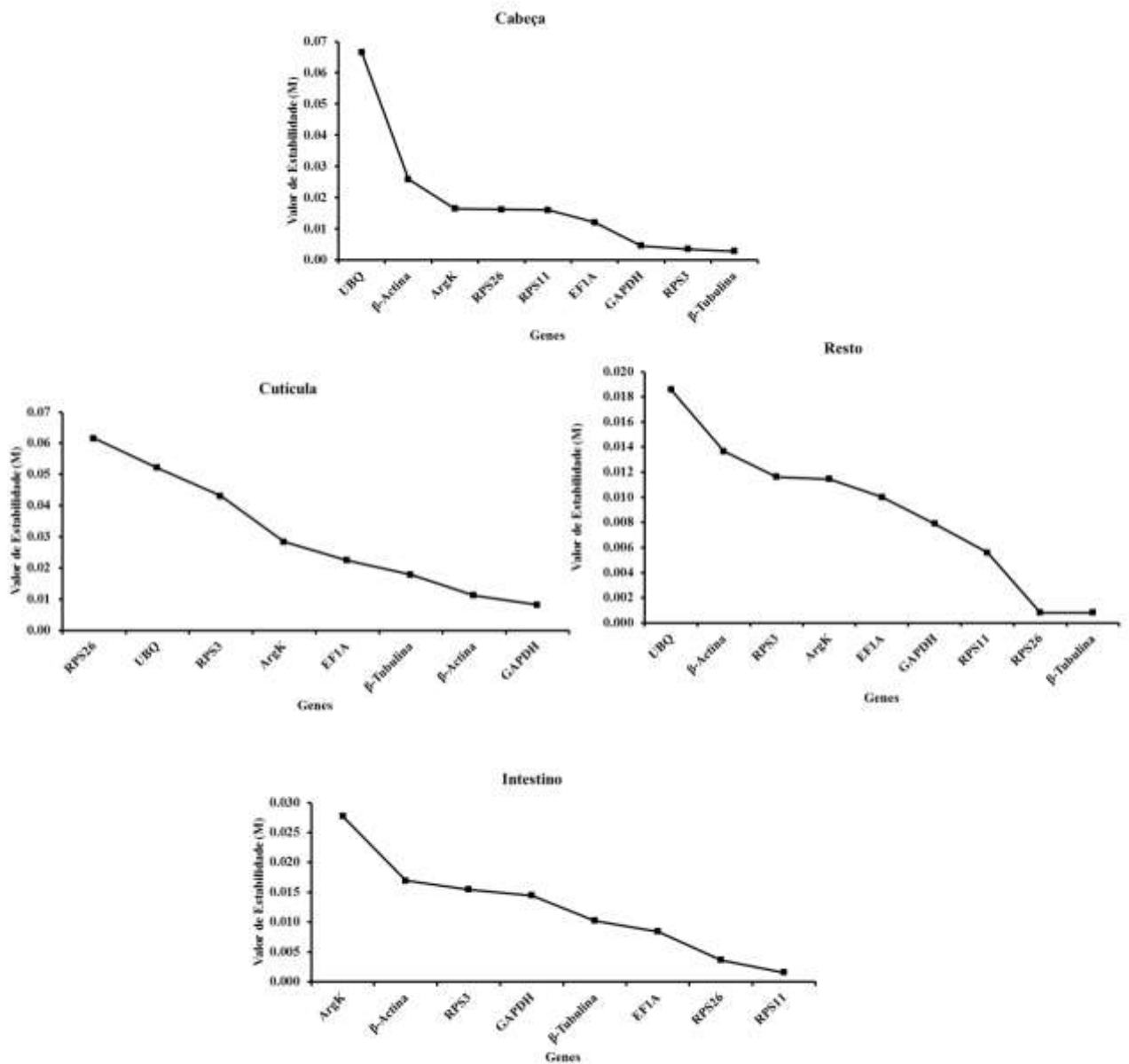


Figura 25. Figura 24. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos Arginina Quinase,  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, GAPDH, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase, Fator de Elongação 1-Alpha, Ubiquitina, e Proteínas Ribossomais S3, S11 e S26, com NormFinder nas partes da larva. Os genes mais estáveis têm valores de M menores que 1,5. Quanto mais à direita do gráfico, maior a estabilidade.

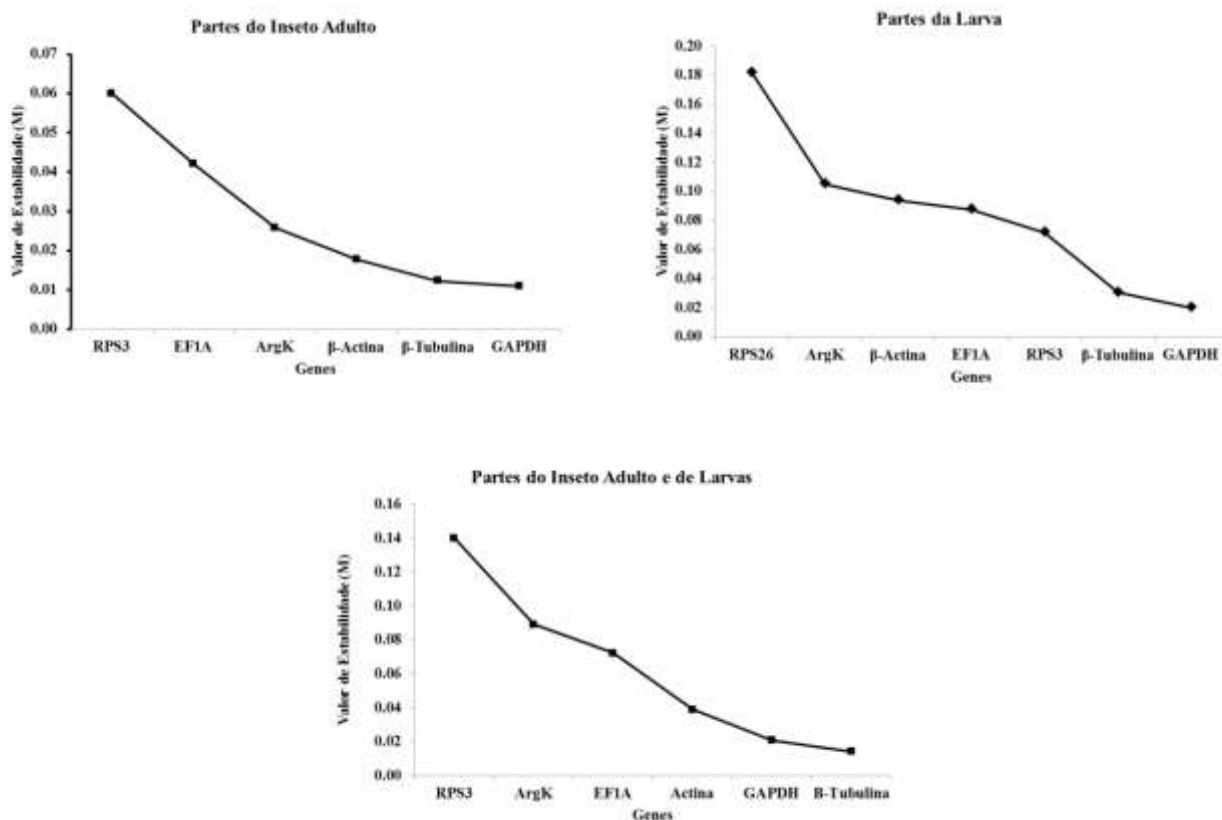


Figura 26. Figura 24. Valores de M após análise da estabilidade dos genes candidatos Arginina Quinase,  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, GAPDH, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase, Fator de Elongação 1-Alpha, Ubiquitina, e Proteínas Ribossomais S3, S11 e S26, com NormFinder nas partes do inseto adulto, da larva e de ambos.. Os genes mais estáveis têm valores de M menores que 1,5. Quanto mais à direita do gráfico, maior a estabilidade.

Tabela 11. Análise da combinação de dois genes candidatos com menor valor de M.

	Partes	Genes	Valor M (NormFinder)
<b>Intragruppo I</b>	Partes de Adulto	GAPDH e $\beta$ -tubulina	0,011
<b>Intragruppo II</b>	Partes da Larva	GAPDH e $\beta$ -tubulina	0,013
<b>Intergrupos</b>	Adulto + Larva	GAPDH e $\beta$ -actina	0,012

## 2. Silenciamento do gene de Lacase 2

### a. Análise da expressão do gene de Lacase 2

Antes de avaliar o silenciamento do gene da lacase 2, foi determinado o perfil de sua expressão nas diversas fases de desenvolvimento do inseto, para que fosse possível restringir o silenciamento às fases onde essa expressão é mais alta.

O *contig* A\_grandis\_454\_rep\_c1717, montado no transcrito de *A. grandis*, foi identificado por BLASTx como uma Lacase2A (Tabela 12). Os *primers* desenhados a partir deste *contig* amplificaram um fragmento de 192 pb com identidade de 100% com o *contig* do transcrito (Figura 27).

Tabela 12. Cinco melhores *matches* da sequência do *contig* A\_grandis\_454\_rep\_c1717 após BLASTx

BLAST Match	E value	Identidade
gi 193211474 ref NP_001034487.2  laccase 2A [ <i>Tribolium castaneum</i> ]	4,795 e-137	81,85%
gi 156481746 gb ABU68466.1  laccase 2 [ <i>Monochamus alternatus</i> ]	1,542 e-135	81,60%
gi 61658224 gb AAX49501.1  laccase-2 isoform A [ <i>Anopheles gambiae</i> ]	1,105 e-133	82,17%
gi 195984431 gb ACG63789.1  laccase-like protein [ <i>Culex pipiens pallens</i> ]	2,085 e-132	82,11%
gi 170063562 ref XP_001867157.1  laccase-like multicopper oxidase 1 [ <i>Culex quinquefasciatus</i> ]	2,084e-131	82,11%

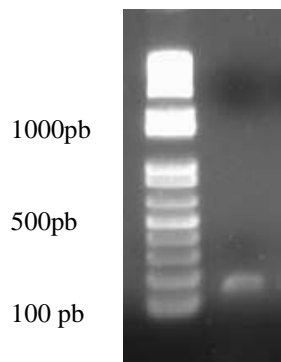


Figura 27. Gel de agarose com o produto de PCR produzido com *primers* de Lacase2.

Nos experimentos de RT-qPCR, as curvas de dissociação mostraram que não houve dímeros de *primers*, nem múltiplas ampliações em uma mesma reação. Os genes de referência utilizados foram *gapdh* e  *$\beta$ -tubulina*, baseando-se nos resultados de estabilidade de expressão obtidos por NormFinder e geNorm.

O gene da lacase 2 é mais expresso nas fases tardias do bicudo, quando o exoesqueleto é mais rígido e o inseto é maior (Figura 28). A expressão aumenta bastante a partir do final da fase larval, atingindo um máximo na fase de pupa. A diferença entre a expressão relativa de lacase 2 entre pupa e adultos machos e fêmeas não foi estatisticamente diferente. O resultado sugere que a expressão do gene diminui até que o inseto esteja pronto para virar pupa. Nas fases primárias do ciclo de vida do inseto, parece que o nível de expressão condiz com a baixa rigidez do exoesqueleto das larvas, ainda que a larva cresça de poucos micrometros para cerca de 5 a 10 milímetros. Além disso, o processo de escurecimento do exoesqueleto não acontece nas larvas, o que pode justificar a baixa expressão da lacase e uma composição menos fenólica do exoesqueleto. Estes resultados confirmam estudos anteriores, em que a expressão do gene de lacase2 é aumentada logo após um pico de um ecdisteróide 20-hidroxiecdisona, que acontece antes da muda de larva para pupa em outras espécies de insetos (DITTMER *et al.*, 2004; YATSU; ASANO, 2009; ELIAS-NETO *et al.*, 2010; FUTAHASHI *et al.*, 2010; FUTAHASHI *et al.*, 2011).

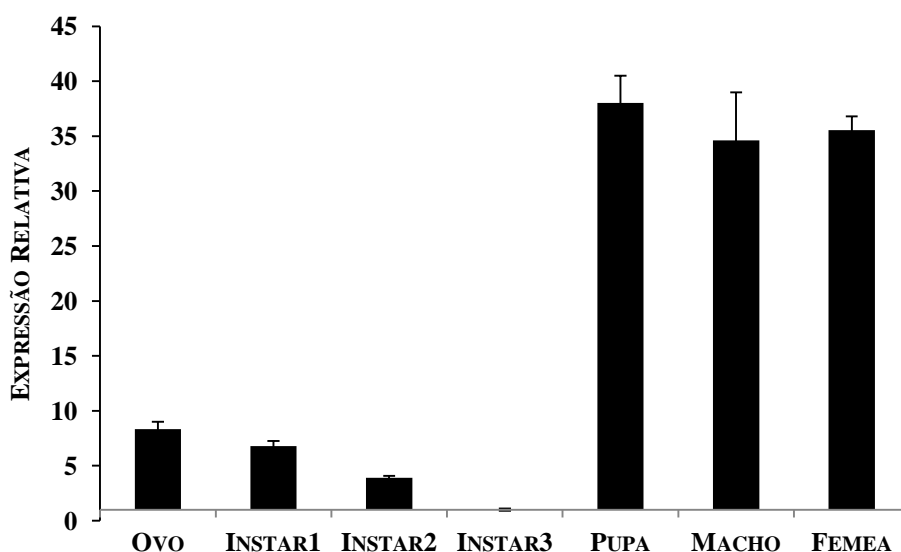


Figura 28. Perfil de expressão do gene de lacase 2 nas diversas fases de desenvolvimento do bicudo do algodoeiro. Os genes de referência utilizados foram *gapdh* e  $\beta$ -*tubulina*. Uma quantidade maior de transcritos é observada nas fases tardias do ciclo de vida do inseto, onde ocorre uma síntese maior da cutícula.

#### b. Microinjeção em bicudo do algodoeiro

Para testar o local da injeção nas larvas foi feita a microinjeção de 1 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada no dorso de 20 larvas (Figura 29, ponto azul). Como controle, foram utilizadas 20 larvas sem injeção mantidas em dieta. A cada 24 horas após a microinjeção, por 3 dias cada larva foi pesada, para verificar se elas continuavam aumentando de tamanho. No terceiro dia, após 48 horas, a maioria das larvas havia morrido. Por ser um local onde passa um grande vaso dorsal, é possível que a lesão da agulha tenha provocado a morte das larvas. Por isso foi estabelecido outro lugar (Figura 29, ponto laranja) para injeção de outras 20 larvas, na lateral (alguns micrometros abaixo do local da injeção dorsal anterior). Após os 3 dias de pesagem, apenas uma larva havia morrido, mostrando que o local da microinjeção escolhido foi adequado. Este local possibilitou não só um melhor manuseio da larva durante a microinjeção, mas também uma precisão de injeção logo abaixo da cutícula.

Além disso, foram testadas três agulhas diferentes. Uma agulha normalmente usada para aplicação de insulina humana (8mm de comprimento e calibre 29G) se mostrou



eficiente. No entanto, as seringas usadas para esse tipo de agulha impossibilitavam a aplicação de pressão adequada para injeção de um volume tão pequeno (1 $\mu$ L), levando à morte do inseto. Preferiu-se então utilizar microsseringas e agulhas da empresa Hamilton Co. (<http://www.hamiltoncompany.com/>). A microsseringa Gastight com conexão Luer (LT), modelo 1701LT, volume 10 $\mu$ L, foi testada com duas agulhas. A agulha mais fina, gauge 30, apesar de ser ideal para diminuir a extensão da lesão, não possibilitou a injeção devido à fragilidade frente à rigidez do exoesqueleto da larva do bicudo. Por isso, agulha de 51mm, gauge 26S, estilo de ponta 4 e bisel de 12° foi a que deu melhor resultado nas microinjeções.

Também foi interessante notar que após a microinjeção, a larva mantida em dieta artificial deve ser coberta de novo com um pouco da própria dieta. Esse cuidado teve que ser tomado, porque a própria larva normalmente criada em dieta artificial cava a dieta e se cobre com ela antes de empupar. Nos experimentos iniciais, quando não se fazia esse procedimento após a injeção, as larvas morriam antes de virar pupa.



Figura 29. Locais de microinjeção testados no bicudo do algodoeiro. A primeira região testada (em azul) causou mortalidade por dano mecânico. A região onde está a agulha (em laranja no lado esquerdo da figura) foi considerada mais fácil e mais adequada para a microinjeção.

c. Bioensaio com larvas microinjetadas com dsRNA de lacase2

As larvas de 3º instar microinjetadas com H<sub>2</sub>O (controle) ou 500ng de dsRNA de lacase2A foram observadas por vários dias para verificar se completavam o ciclo de desenvolvimento. Caso isso acontecesse, as fêmeas adultas colocariam ovos e as larvas eclodidas seriam coletadas para ver se havia efeito hereditário do RNAi. No entanto, dois tipos de fenótipos resultaram da aplicação de dsRNA de lacase2A que impossibilitaram que os insetos se tornassem adultos viáveis.

Neste experimento, insetos com 20 dias após a microinjeção conseguiram entrar na fase de pupa, mas o desenvolvimento foi anormal, gerando um híbrido de pupa/adulto (Figura 30b, c, d), com cutícula mal formada, cheia de protuberâncias anormais (Figura 30a), e coloração mais clara. No entanto, a maioria destes insetos deformados estava morta quando analisada e nenhum dos insetos chegou à fase adulta normalmente, com nenhum sobrevivente 25 dias após a microinjeção.

No mesmo experimento, observou-se que 20 dias após a microinjeção, alguns insetos continuavam na fase larval, vivos, e se alimentando. Porém, com 30 dias, todas estas larvas estavam mortas. O acúmulo de lipídeos que ocorre normalmente no último instar da fase larval foi observado mostrando que a larva continuou se alimentando após a microinjeção (Figura 31b). Este acúmulo de lipídeos serve como depósito de energia para a fase de pupa que não se alimenta. Porém, como estas larvas não entraram na fase de pupa, sua aparência é de larvas “estufadas”, já que aparentemente não houve crescimento da cutícula que acompanhasse o aumento de volume corporal (Figura 31b, d). Estruturas semelhantes ao ovipositor das fêmeas adultas ou edeago (órgão copulador) masculino aparecem nestas larvas (Figura 31e, f).

A figura 32 mostra um esquema do ciclo de vida do bicudo com um resumo do que aconteceu temporalmente nos experimentos. No ciclo de aproximadamente 30 dias, a microinjeção foi feita por volta do 18º dia (Figura 32, seta azul). Observados no 20º dia após a microinjeção, cerca de 50 dias de ciclo (Figura 32, seta vermelha), os três experimentos de bioensaio, com 20 larvas cada um, gerou o resultado visto na figura 33. Cerca de 10% das larvas microinjetadas com H<sub>2</sub>O (controle) e 25% das microinjetadas com dsRNA morreram provavelmente por manipulação. As larvas restantes do experimento-controle (90%) chegaram à fase adulta e a placa estava cheia de ovos e

algumas larvas recentes, mostrando que a injeção de H<sub>2</sub>O aparentemente não afetou a reprodução dos insetos. Das larvas microinjetadas com dsRNA de lacase 2, 33% ainda eram larvas e 42% chegaram a continuar o ciclo (Figura 33), mas pararam em algum momento entre pupa e adulto, sendo que no momento da observação estavam mortas (Figura 30).

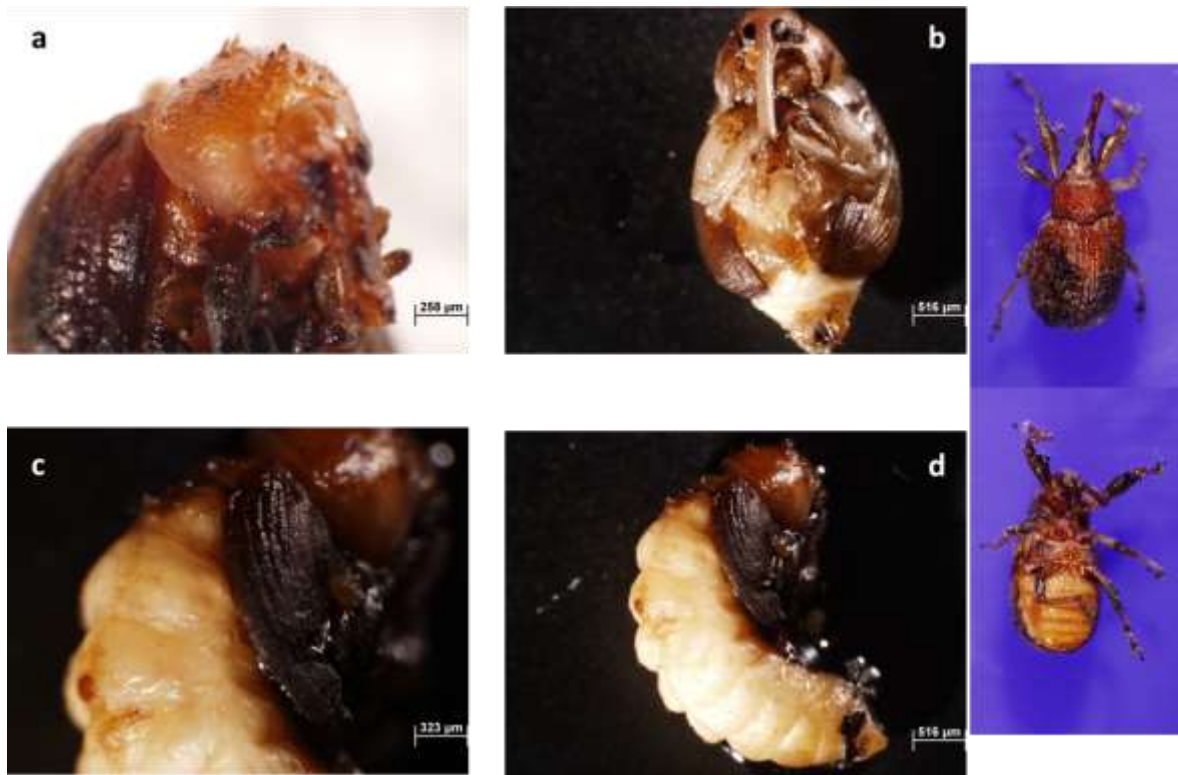


Figura 30. Pupas/Adultos observados 20 dias após microinjeção de dsRNA de lacase2A. É possível notar uma má-formação e menor pigmentação da cutícula na cabeça (a), e deformações no corpo, além da manutenção de um fenótipo pupo-larval (b, c,d) quando comparados com adultos normais (à direita).

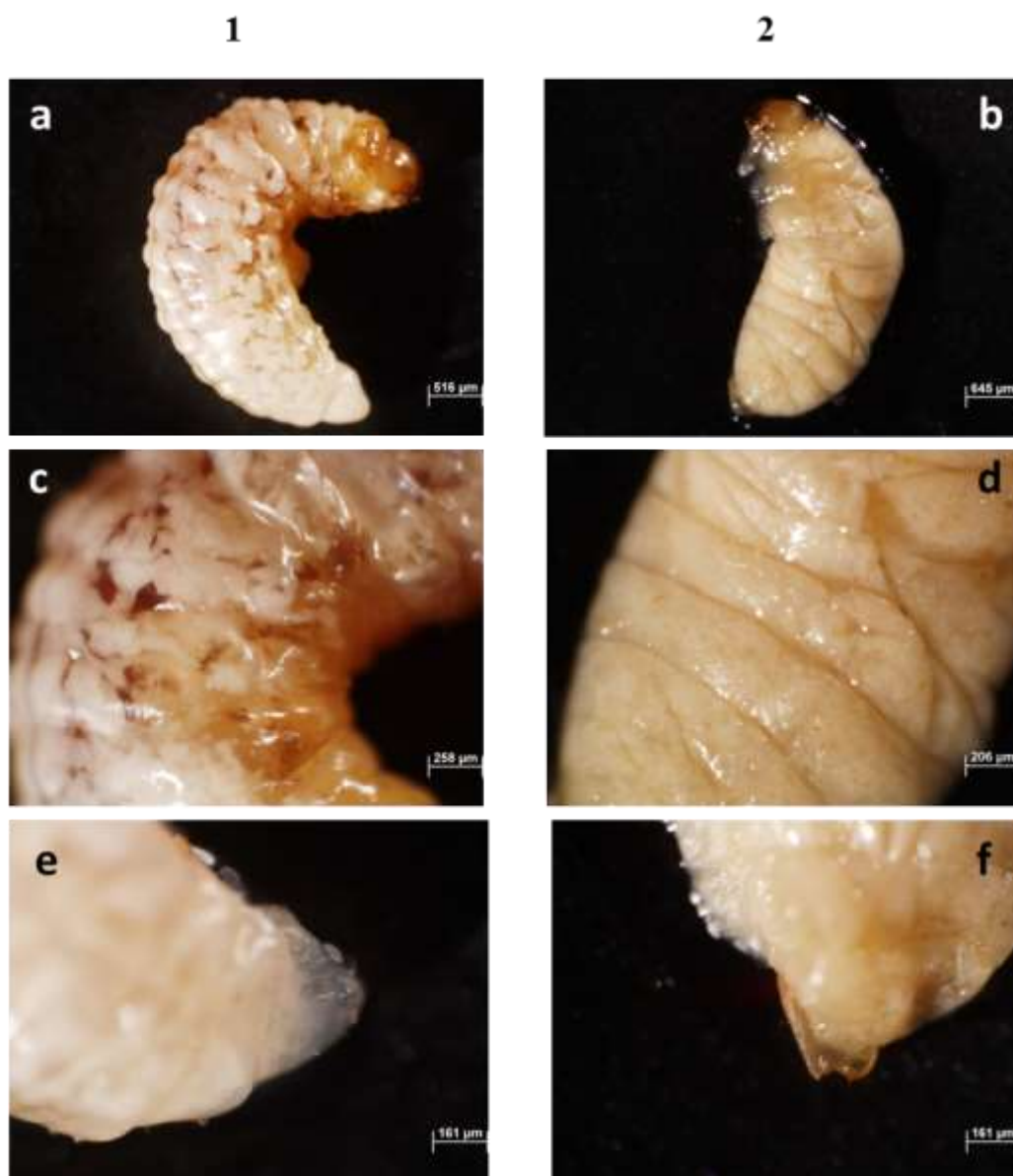


Figura 31. Comparação entre larvas normais de 3º instar (1 – a, c, e) e larvas observadas 20 dias após microinjeção de dsRNA de lacase2A (2 – b, d, f). Em f, é possível observar formação de estrutura que pode ser um ovipositor ou edeago, estrutura presente somente em adultos normais.

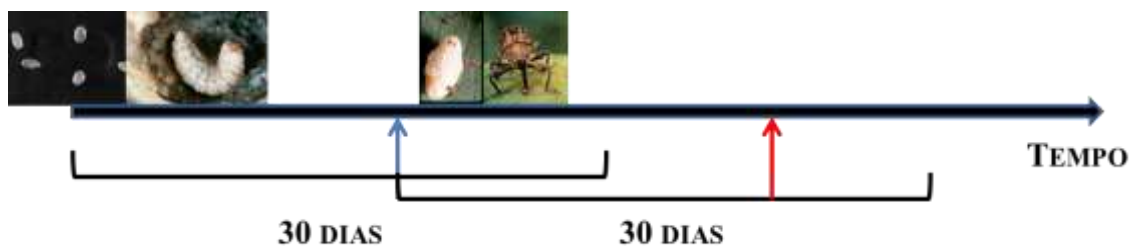


Figura 32. Esquema do bioensaio de bicudo com dsRNA de lacase 2 durante o ciclo de vida do inseto. A seta azul indica o momento da microinjeção e a seta vermelha, o momento da observação dos efeitos. Para mais esclarecimentos, vide texto.

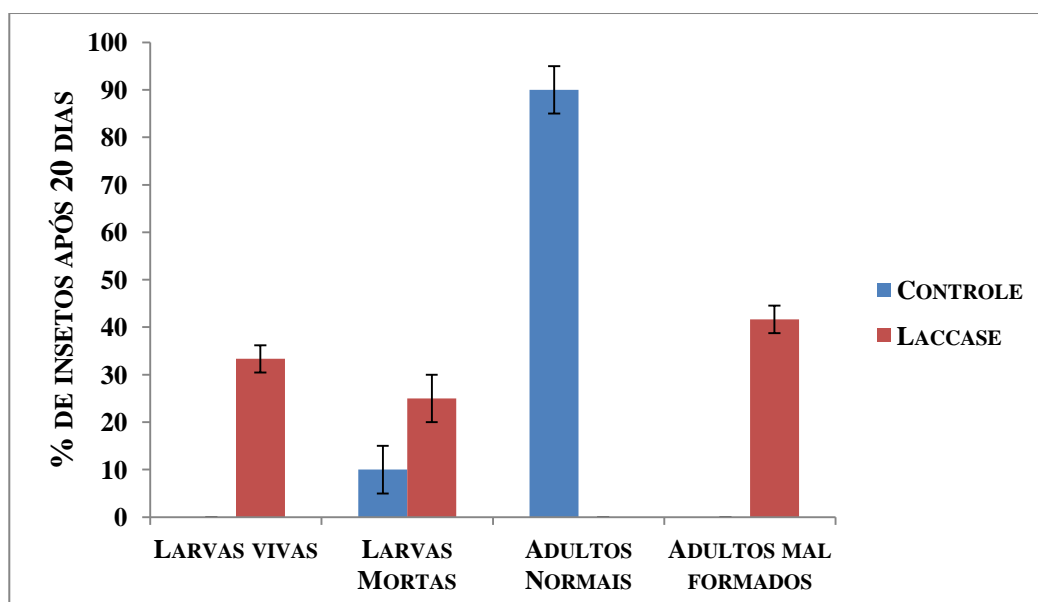


Figura 33. Avaliação do efeito de dsRNA de lacase2 20 dias após a microinjeção. Em vermelho experimento feito com dsRNA de lacase2 e em azul, experimentos controle, feitos com H<sub>2</sub>O bidestilada.

d. Avaliação do silenciamento do gene de lacase2 por RT-qPCR

A partir dos resultados obtidos nos bioensaios, foi realizada uma análise da expressão relativa do gene da lacase2A por RT-qPCR, nos dois tipos de insetos encontrados 20 dias após a microinjeção. As pupas/adultos deformados tiveram que ser coletadas com menos tempo (14 dias após a microinjeção), uma vez que foi difícil

encontrar indivíduos vivos com 20 dias. Nestas, a expressão do gene da lacase2A foi diminuída cerca de 15 vezes (Figura 34A) em relação à expressão do mesmo gene em pupas provenientes de larvas microinjetadas com H<sub>2</sub>O. O gene da lacase2A foi cerca de 3 vezes menos expresso nas larvas microinjetadas com dsRNA e que continuaram larvas vivas após 20 dias (Figura 34B).

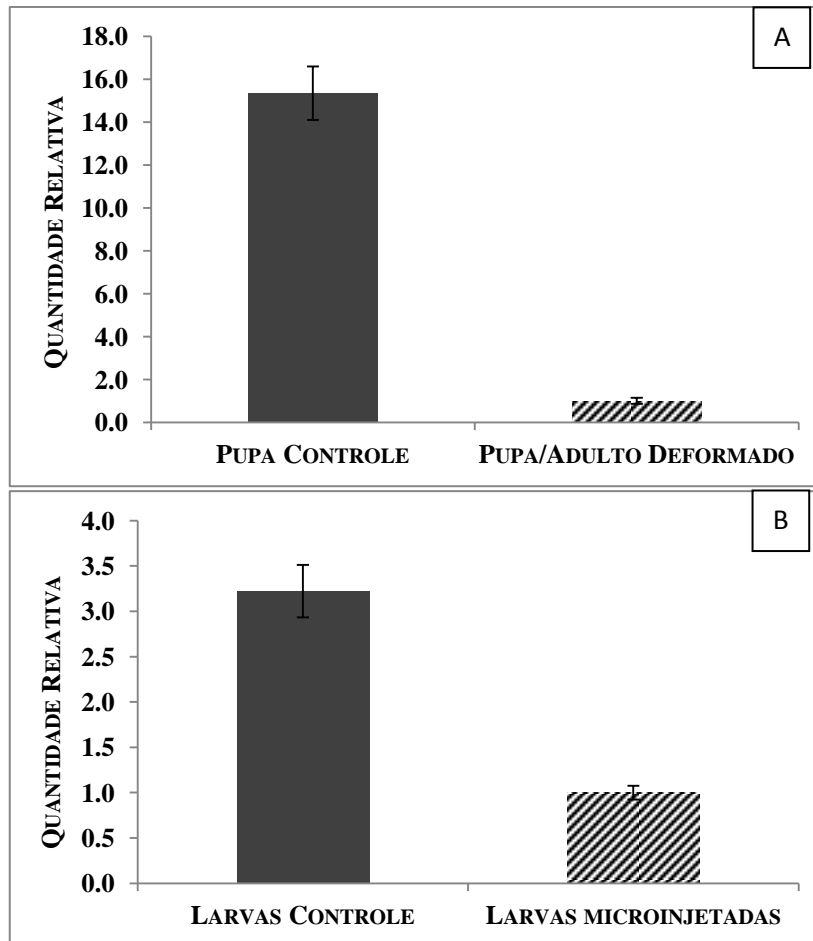


Figura 34. Comparação da quantidade de transcritos de lacase2 entre os insetos-controle e as pupas/adultos (A) ou larvas (B) após a microinjeção com dsRNA. Os genes de referência utilizados foram *gapdh* e  *$\beta$ -tubulina*.

Estes resultados indicam um efeito sobre a formação e esclerotização da cutícula do inseto, uma vez que o gene de lacase2A é expresso nas células epiteliais subcuticulares, quando há formação de nova cutícula e esclerotização, como nos casos de muda.

Mas por que houve larvas que conseguiram continuar o ciclo, ainda que não o terminassem? Isso pode ser explicado pela inexatidão da escolha das larvas para microinjeção. Apesar de todas terem mais ou menos o mesmo peso, e estarem no 3<sup>o</sup> instar,

a expressão de lacase2 ocorre com um pico na fase de pré-pupa (Figura 28) e devem seguir a queda dos níveis de hormônio juvenil e aumento de ecdisona, que ocorre quando a larva deve empupar (YATSU; ASANO, 2009; ELIAS-NETO *et al.*, 2010; FUTAHASHI *et al.*, 2011). Em algumas das larvas utilizadas estes eventos podem já ter se iniciado, e por isso, uma expressão de lacase2A já teria ocorrido quando foi feita a microinjeção, permitindo a formação da cutícula. No entanto, após a microinjeção, o dsRNA foi capaz de diminuir o nível de expressão do gene e a formação da cutícula foi interrompida causando a má-formação. Interessante notar que menos cutícula é observada perto do abdômen, no dorso do inseto, local da microinjeção (Figura 30). Provavelmente a maior concentração de dsRNA ficou nesta região, sendo espalhado em menor proporção para o tórax e a cabeça, onde também foram percebidas alterações (Figura 30a), indicando um nível de espalhamento do efeito não descrito em outras ordens de insetos, a não ser Coleoptera (TOMOYASU *et al.*, 2008). Este resultado indica que além das proteínas SID-1 envolvidas no mecanismo de espalhamento, uma amplificação do sinal pode estar ocorrendo através de um mecanismo ainda não conhecido, independente de RdRP.

A diferença de quantidade de inibição da transcrição entre os as larvas que conseguiram continuar o ciclo e as que permaneceram na fase larval se deve à pequena quantidade de transcritos lacase2 presente normalmente em larvas, em relação à quantidade presente em pupas e adultos.

Outro fato importante é que as larvas que permaneceram nesta fase após 20 dias parecem estar “estufadas”. Este fato sugere que a formação da nova cutícula não acompanhou o crescimento do inseto, que aparentemente se preparou para a muda e pode ter até entrado na fase de pupa, sem que as mudanças na cutícula tenham ocorrido. Isto pode indicar que o nível de expressão do gene da lacase2A pode ter diminuído pela presença de dsRNA.

A identificação do *contig* A\_grandis\_454\_rep\_c1717 como lacase2A foi feita por busca em banco de dados. O resultado do *Southern blotting* (Figura 35) sugere mais de uma isoforma. Nenhuma das enzimas utilizadas na digestão do DNA genômico corta a sequência do *contig*. Quatro bandas distintas podem ser vistas após a hibridização com a sonda de lacase2A (Figura 35). Este resultado pode ser a identificação das duas isoformas de lacase2, bem como de lacase1, já que a sonda utilizada foi muito pequena e reconhece uma região comum entre elas. Infelizmente não foi possível utilizar outra sonda, específica

para lacase1, uma vez que este gene não foi identificado em nenhum *contig* do transcrito. A confirmação se o bicudo tem mais de um isoforma de lacase2 ainda precisa ser feita, já que não há genoma deste inseto sequenciado. O isolamento e clonagem dos genes de lacase de bicudo é um experimento que ainda precisa ser realizado para melhor caracterizá-los. O resultado do *Southern blot* sugere a possibilidade de que as análises de RT-qPCR e os bioensaios reflitam o silenciamento do conjunto de parálogos de lacase. Nenhum trabalho mostrou que lacase1 esteja envolvido na formação da cutícula, e há indícios de que a enzima seja responsável pela desintoxicação de compostos fenólicos ingeridos na alimentação do inseto, e por isso o gene é expresso preferencialmente nos túbulos de Malpighi, glândulas salivares e intestino (DITTMER *et al.*, 2004; LIANG, 2006). Alguns estudos já mostraram, no entanto, que em coleópteros e hemípteros, apenas genes de lacase2A são envolvidos na esclerotização da cutícula (ARAKANE *et al.*, 2005; ELIAS-NETO *et al.*, 2010; FUTAHASHI *et al.*, 2011). No intuito de entender o melhor o papel da lacase2 no inseto, experimentos de hibridização *in situ* precisam ser feitos para localizar o dsRNA de lacase2 no inseto e microscopia deve ser feita para verificar a estrutura da cutícula após o silenciamento.

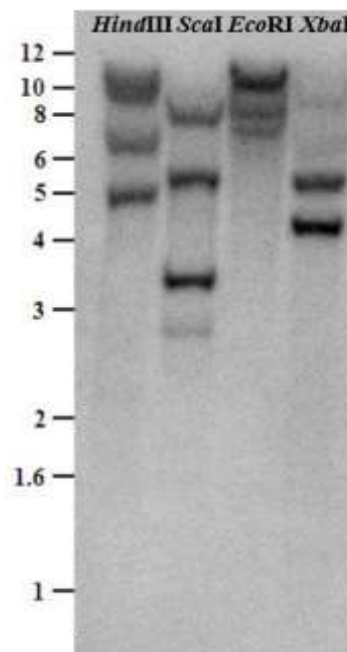


Figura 35. Análise de lacase2A de *A. grandis* por Southern blot. Os valores à esquerda indicam kilobases.



#### e. Considerações finais

Para os fins futuros de aplicação biotecnológica, o silenciamento de lacase2 se mostra eficaz na mortalidade dos insetos. Ainda que possibilite um aumento do ciclo de algumas larvas, os resultados somados mostram que 75% dos insetos testados morreram antes de virarem adultos viáveis. A transformação de plantas de algodão com construção expressando dsRNA de lacase2 pode diminuir bastante a população de bicudo do algodoeiro na próxima geração. Algumas questões, porém, permanecem sem resposta e muito precisa ser feito para a geração de um evento de algodão geneticamente modificado resistente ao bicudo. Por exemplo, obviamente, o sucesso depende do efeito observado por microinjeção ser repetido quando o inseto se alimentar nos botões florais. Neste trabalho tentou-se, primeiramente alimentar o bicudo com dsRNA. Em dieta artificial seria impossível, uma vez que o dsRNA seria degradado. Um teste foi feito deixando adultos e larvas 12 horas sem se alimentar e após isso, colocando-os em contato com gotas de solução de sacarose contendo dsRNA de lacase. Porém, nenhum inseto se alimentou, morrendo alguns dias depois (dados não mostrados). Pensou-se também na possibilidade de utilizar bactérias transformadas com vetor que expressa o dsRNA de lacase, inseridas na dieta artificial. Devido ao longo ciclo de vida do bicudo, a proliferação das bactérias tornou esta abordagem também inviável. Além disso, quantidades menores de dsRNA ainda estão sendo testados, para estabelecer uma quantidade mínima de dsRNA capaz de reproduzir os efeitos já obtidos. Para evitar um efeito de inibição do silenciamento por uma superexpressão de dsRNA na planta, promotores específicos de botões florais do algodão estão sendo isolados e analisados. Ainda mais o uso concomitante deste gene de lacase2 com outros genes validados de bicudo na transformação de plantas de algodão pode aumentar a capacidade de gerar eventos com uma resistência maior ao bicudo do algodoeiro.

## Referências Bibliográficas

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P. G.; SCHERER, S. E.; LI, P. W.; HOSKINS, R. A.; GALLE, R. F.; GEORGE, R. A.; LEWIS, S. E.; RICHARDS, S.; ASHBURNER, M.; HENDERSON, S. N.; SUTTON, G. G.; WORTMAN, J. R.; YANDELL, M. D.; ZHANG, Q.; CHEN, L. X.; BRANDON, R. C.; ROGERS, Y. H.; BLAZEJ, R. G.; CHAMPE, M.; PFEIFFER, B. D.; WAN, K. H.; DOYLE, C.; BAXTER, E. G.; HELT, G.; NELSON, C. R.; GABOR, G. L.; ABRIL, J. F.; AGBAYANI, A.; AN, H. J.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; BALDWIN, D.; BALLEW, R. M.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BAYRAKTAROGLU, L.; BEASLEY, E. M.; BEESON, K. Y.; BENOS, P. V.; BERMAN, B. P.; BHANDARI, D.; BOLSHAKOV, S.; BORKOVA, D.; BOTCHAN, M. R. BOUCK, J.; BROKSTEIN, P.; BROTTIER, P.; BURTIS, K. C.; BUSAM, D. A.; BUTLER, H.; CADIEU, E.; CENTER, A.; CHANDRA, I.; CHERRY, J. M.; CAWLEY, S.; DAHLKE, C.; DAVENPORT, L. B.; DAVIES, P.; DE PABLOS, B.; DELCHER, A.; DENG, Z.; MAYS, A. D.; DEW, I.; DIETZ, S. M.; DODSON, K.; DOUP, L. E.; DOWNES, M.; DUGAN-ROCHA, S.; DUNKOV, B. C.; DUNN, P.; DURBIN, K. J.; EVANGELISTA, C. C.; FERRAZ, C.; FERRIERA, S.; FLEISCHMANN, W.; FOSLER, C.; GABRIELIAN, A. E.; GARG, N. S.; GELBART, W. M.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GONG, F.; GORRELL, J. H.; GU, Z.; GUAN, P.; HARRIS, M.; HARRIS, N. L.; HARVEY, D.; HEIMAN, T. J.; HERNANDEZ, J. R.; HOUCK, J.; HOSTIN, D.; HOUSTON, K. A.; HOWLAND, T. J.; WEI, M. H.; IBEGWAM, C.; JALALI, M.; KALUSH, F.; KARPEN, G. H.; KE, Z.; KENNISON, J. A.; KETCHUM, K. A.; KIMMEL, B. E.; KODIRA, C. D.; KRAFT, C.; KRAVITZ, S.; KULP, D.; LAI, Z.; LASKO, P.; LEI, Y.; LEVITSKY, A. A.; LI, J.; LI, Z.; LIANG, Y.; LIN, X.; LIU, X.; MATTEI, B.; MCINTOSH, T. C.; MCLEOD, M. P.; MCPHERSON, D.; MERKULOV, G.; MILSHINA, N. V.; MOBARRY, C.; MORRIS, J.; MOSHREFI, A.; MOUNT, S. M.; MOY, M.; MURPHY, B.; MURPHY, L.; MUZNY, D. M.; NELSON, D. L.; NELSON, D. R.; NELSON, K. A.; NIXON, K.; NUSSKERN, D. R.; PACLEB, J. M.; PALAZZOLO, M.; PITTMAN, G. S.; PAN, S.; POLLARD, J.; PURI, V.; REESE, M. G.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; SAUNDERS, R. D.; SCHEELER, F.; SHEN, H.; SHUE, B. C.; SIDEN-KIAMOS, I.; SIMPSON, M.; SKUPSKI, M. P.; SMITH, T.; SPIER, E.; SPRADLING, A. C.; STAPLETON, M.; STRONG, R.; SUN, E.; SVIRSKAS,

R.;TECTOR, C.;TURNER, R.;VENTER, E.;WANG, A. H.;WANG, X.;WANG, Z. Y.;WASSARMAN, D. A.;WEINSTOCK, G. M.;WEISSENBACH, J.;WILLIAMS, S. M.;WOODAGE,T.;WORLEY, K. C.;WU, D.;YANG, S.;YAO, Q. A.;YE, J.;YEH, R. F.;ZAVERI,J. S.;ZHAN, M.;ZHANG, G.;ZHAO, Q.;ZHENG, L.;ZHENG, X. H.;ZHONG, F. N.;ZHONG, W.;ZHOU, X.;ZHU, S.;ZHU, X.;SMITH, H. O.;GIBBS, R. A.;MYERS, E. W.;RUBIN, G. M.;VENTER, J. C. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185-95, 2000.

AGNEW, P.; BECNEL, J. J.; EBERT, D.; MICHALAKIS, Y. Symbiosis of Microsporidia and Insects. In: BOURTZIS, K. e MILLER, T. A. (Ed.). **Insect symbiosis**. Boca Raton, FL, USA: CRC, v.1, p.145-163, 2003.

AHMADIAN, A.; EHN, M.; HOBBER, S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. **Clinica Chimica Acta**, v. 363, n. 1-2, p. 83-94, 2006.

ALMEIDA, R. P.; SILVA, C. A. D. Manejo integrado de pragas do algodoeiro. In: BELTRÃO, N. E. D. M. (Ed.). **O Agronegócio do Algodão no Brasil. Comunicação para Transferência de Tecnologia Embrapa**. Brasília - DF, v.2, 1999. p.753-820.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245-50, 2004.

ANDERSEN, S. O. Cuticular Sclerotization and Tanning. In: GILBERT, L. I. (Ed.). **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. London, NW1, UK: Elsevier B.V. Academic Press, 2012.

ANDERSEN, S. O. Insect cuticular sclerotization: a review. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 166-78, 2010.

ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 195-203, 2009.

ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; BEEMAN, R. W.; KANOST, M. R.; KRAMER, K. J. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11337-42, 2005.

ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J.; SPECHT, C. A.; TOMOYASU, Y.; LORENZEN, M. D.; KANOST, M.; BEEMAN, R. W. The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 5, p. 453-63, 2005.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-33, Jan 23 2009.

BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322-6, 2007.

BELLES, X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 111-28, 2010.

BOGDANOVA, E. A.; SHAGIN, D. A.; LUKYANOV, S. A. Normalization of full-length enriched cDNA. **Molecular Biosystems**, v. 4, n. 3, p. 205-12, 2008.

BORSANI, O.; ZHU, J.; VERSLUES, P. E.; SUNKAR, R.; ZHU, J. K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 123, n. 7, p. 1279-91, 2005.

BRODERSEN, P.; SAKVARELIDZE-ACHARD, L.; BRUUN-RASMUSSEN, M.; DUNOYER, P.; YAMAMOTO, Y. Y.; SIEBURTH, L.; VOINNET, O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. **Science**, v. 320, n. 5880, p. 1185-90, 2008.

BUSOLI, A. C. Práticas culturais , reguladores de crescimento, controle químico e feromônios no manejo integrado de pragas do algodoeiro. In: DEGRANDE, P. F. (Ed.). **Bicudo do algodoeiro: Manejo Integrado**. Dourados, MS: EMBRAPA-UEPAE, 1991. p.29-52.

BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines? - The case for MIQE. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 217-26, 2010.

BUSTIN, S. A.; BEAULIEU, J. F.; HUGGETT, J.; JAGGI, R.; KIBENGE, F. S.; OLSVIK, P. A.; PENNING, L. C.; TOEGEL, S. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. **BMC Molecular Biology**, v. 11, p. 74-79, 2010.

CAHAIS, V.; GAYRAL, P.; TSAGKOGEOGA, G.; MELO-FERREIRA, J.; BALLENGHIEN, M.; WEINERT, L.; CHIARI, Y.; BELKHIR, K.; RANWEZ, V.; GALTIER, N. Reference-free transcriptome assembly in non-model animals from next-generation sequencing data. **Molecular Ecology Resources**, 12 (5), 834-845, 2012.

CALVO, D.; MOLINA, J. M. Head Capsule Width and Instar Determination for Larvae of *Streblote panda* (Lepidoptera: Lasiocampidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 5, p. 881-886, 2008.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CERA, C. F. E. R. A. GM Crop Database. Washington, DC USA, June 2012 2012. Disponível em: < <http://cera-gmc.org/> >. Acesso em: 10-07-2012.

CHEN, D.; PAN, X.; XIAO, P.; FARWELL, M. A.; ZHANG, B. Evaluation and identification of reliable reference genes for pharmacogenomics, toxicogenomics, and small RNA expression analysis. **Journal of Cell Physiology**, v. 226, n. 10, p. 2469-77, 2011.

CHEN, Y; EVANS, J. D.; SMITH, I. B.; PETTIS, J. S. Nosema ceranae is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 2, p. 186-8, 2008.

CHEVREUX, B.; PFISTERER, T.; DRESCHER, B.; DRIESEL, A. J.; MULLER, W. E.; WETTER, T.; SUHAI, S. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. **Genome Research**, v. 14, n. 6, p. 1147-59, 2004.

CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; KOHLI, A.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 6, p. 302-308, 2006.

CLAUS, H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. **Archives of Microbiology**, v. 179, n. 3, p. 145-50, 2003.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, v. 35, n. 1-2, p. 93-6, 2004.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos. Décimo levantamento.** ABASTECIMENTO, C. N. D. Brasília - DF: Ministério da Agricultura. 10 2012.

CONSORTIUM, I. H. G. S. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931-45, 2004.

COUTO, S. R.; TOCA HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances** v. 24, n. 5, p. 500–513, 2006.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; VAN ENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S. K.; SIMONS, J. F.; EGHOLM, M.; PETTIS, J. S.; LIPKIN, W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283-7, 2007.

CRUZ, J.; MANE-PADROS, D.; BELLES, X.; MARTIN, D. Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. **Developmental Biology**, v. 297, n. 1, p. 158-71, 2006.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 3, p. 134-41, 2004.

DEVILLIERS, S. M.; HOISINGTON, D. A. The trends and future of biotechnology crops for insect pest control. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 23, p. 4677-4681, 2011.

DITTMER, N. T.; GORMAN, M. J.; KANOST, M. R. Characterization of endogenous and recombinant forms of laccase-2, a multicopper oxidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 9, p. 596-606, 2009.

DITTMER, N. T.; KANOST, M. R. Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 179-88, 2010.

DITTMER, N. T.; SUDERMAN, R. J.; JIANG, H.; ZHU, Y. C.; GORMAN, M. J.; KRAMER, K. J.; KANOST, M. R. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm,

*Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 29-41, 2004.

DOSTALOVA, A.; VOTYPKA, J.; FAVREAU, A. J.; BARBIAN, K. D.; VOLFF, P.; VALENZUELA, J. G.; JOCHIM, R. C. The midgut transcriptome of *Phlebotomus* (Larrousius) *perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies. **BMC Genomics**, v. 12, p. 223-243, 2011.

DU, M.; Zhang, S.; Zhu, B.; Yin, X.; An, S. Identification of a diacylglycerol acyltransferase 2 gene involved in pheromone biosynthesis activating neuropeptide stimulated pheromone production in *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 5, p. 699-703, 2012.

DUNN, P. E. Biochemical Aspects of Insect Immunology. **Annual Review of Entomology**, v. 31, p. 321-339, 1986.

ELIAS-NETO, M.; SOARES, M. P.; SIMOES, Z. L.; HARTFELDER, K.; BITONDI, M. M. Developmental characterization, function and regulation of a Laccase2 encoding gene in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 241-51, 2010.

FADROSH, D. W.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; WILLIAMSON, S. J. Separation of single-stranded DNA, double-stranded DNA and RNA from an environmental viral community using hydroxyapatite chromatography. **Journal of Visualized Experiments**, n. 55, 3186-3187, 2011.

FALLER, M.; GUO, F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1779, n. 11, p. 663-7, 2008.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, A. M. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Transgenic Research**, v. 15, n. 1, p. 13-9, 2006.



FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-11, 1998.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time RT-qPCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 126-39, 2006.

FLEIGE, S.; WALF, V.; HUCH, S.; PRGOMET, C.; SEHM, J.; PFAFFL, M. W. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 19, p. 1601-13, 2006.

FREIRE, E. C. **Algodão no Cerrado**. 2a Edição Revisada. Brasília - DF: ABRAPA - Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2011.

FRIEDMAN, R. C.; Farh, K. K.; Burge, C. B.; Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92-105, 2009.

FUTAHASHI, R.; BANNO, Y.; FUJIWARA, H. Caterpillar color patterns are determined by a two-phase melanin gene prepatterning process: new evidence from tan and laccase2. **Evolution and Development**, v. 12, n. 2, p. 157-67, 2010.

FUTAHASHI, R.; TANAKA, K.; MATSUURA, Y.; TANAHASHI, M.; KIKUCHI, Y.; FUKATSU, T. Laccase2 is required for cuticular pigmentation in stinkbugs. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 3, p. 191-6, 2011.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN,

J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba - SP: FEALQ, 2002.

GATEHOUSE, J. A. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 881-7, 2008.

GE, J.; LEI, J.; ZARE, R. N. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 7, p. 428-32, 2012.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 2, p. 94-108, 2009.

GONDIM, D. M. C.; JEAN-LOUIS, B.; SILVIE, P.; PEITI, N. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil**. Cascavel -PR: COODETEC/CIRAD-CA, 2001.

GORDON, K. H.; WATERHOUSE, P. M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1231-2, 2007.

GORMAN, M. J.; DITTMER, N. T.; MARSHALL, J. L.; KANOST, M. R. Characterization of the multicopper oxidase gene family in *Anopheles gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 9, p. 817-24, 2008.

GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; WILLIAMS, T. D.; NAGARAJ, S. H.; NUEDA, M. J.; ROBLES, M.; TALON, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420-35, 2008.

GREENBERG, S. M.; SAPPINGTON, T. W.; SÉTAMOU, M. **Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Feeding and Reproduction as Functions of Cotton Square Availability**. Lincoln, Nebraska - USA: Publications from USDA-ARS / UNL Faculty, 2003.

GREGORY, R.; DARBY, A. C.; IRVING, H.; COULIBALY, M. B.; HUGHES, M.; KOEKEMOER, L. L.; COETZEE, M.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; HALL, N.; WONDJI, C. S. A *de novo* expression profiling of *Anopheles funestus*, malaria vector in Africa, using 454 pyrosequencing. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17418, 2011.

GRISHOK, A.; TABARA, H.; MELLO, C. C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. **Science**, v. 287, n. 5462, p. 2494-7, 2000.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 611-20, 1995.

HAHN, D. A.; RAGLAND, G. J.; SHOEMAKER, D. D.; DENLINGER, D. L. Gene discovery using massively parallel pyrosequencing to develop ESTs for the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 234, 2009.

HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 950-2, 1999.

HAMMACK, L.; ELLSBURY, M. M.; ROEHRDANZ, R. L.; PIKUL, J. L., JR. Larval sampling and instar determination in field populations of northern and western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p. 1153-9, 2003.

HENSON, J.; TISCHLER, G.; NING, Z. Next-generation sequencing and large genome assemblies. **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 8, p. 901-15, 2012.

HILDER, V. A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. **Crop Protection**, v. 18, n. 3, p. 177-191, 1999.

HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and

essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 39, p. 14302-6, 2006.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868-77, 1999.

HUSE, S. M.; HUBER, J. A.; MORRISON, H. G.; SOGIN, M. L.; WELCH, D. M. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. **Genome Biology**, v. 8, n. 7, p. R143, 2007.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011 **ISAAA Brief No.43. ISAAA: Ithaca, NY**, v. 43, 2011. ISSN 978-1-892456-52-4.

JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D.; ENGLISH, J.; QUE, Q.; NAPOLI, C. A. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant Molecular Biology**, v. 31, n. 5, p. 957-73, 1996.

KARATOLOS, N.; PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; CHAUHAN, R.; DENHOLM, I.; GORMAN, K.; NELSON, D. R.; BASS, C.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; WILLIAMSON, M. S. Pyrosequencing the transcriptome of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* reveals multiple transcripts encoding insecticide targets and detoxifying enzymes. **BMC Genomics**, v. 12, p. 56, 2011.

KATIYAR-AGARWAL, S; MORGAN, R., DAHLBECK, D., BORSANI, O., VILLEGAS, A., JR., ZHU, J. K.; STASKAWICZ, B. J.; JIN, H. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 47, p. 18002-7, 2006.

KEELING, C. I.; HENDERSON, H.; LI, M.; YUEN, M.; CLARK, E. L.; FRASER, J. D.; HUBER, D. P.; LIAO, N. Y.; RODERICK DOCKING, T.; BIROL, I.; CHAN, S. K.; TAYLOR, G. A.; PALMQUIST, D.; JONES, S. J.; BOHLMANN, J. Transcriptome and

full-length cDNA resources for the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major insect pest of pine forests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 8, p. 525-36, 2012.

KENNERDELL, J. R.; CARTHEW, R. W. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 896-8, 2000.

KETTING, R. F. The many faces of RNAi. **Developmental Cell**, v. 20, n. 2, p. 148-61, 2011.

KIRKNESS, E. F.; HAAS, B. J.; SUN, W.; BRAIG, H. R.; PEROTTI, M. A.; CLARK, J. M.; LEE, S. H.; ROBERTSON, H. M.; KENNEDY, R. C.; ELHAIK, E.; GERLACH, D.; KRIVENTSEVA, E. V.; ELSIK, C. G.; GRAUR, D.; HILL, C. A.; VEENSTRA, J. A.; WALENZ, B.; TUBIO, J. M.; RIBEIRO, J. M.; ROZAS, J.; JOHNSTON, J. S.; REESE, J. T.; POPADIC, A.; TOJO, M.; RAOULT, D.; REED, D. L.; TOMOYASU, Y.; KRAUS, E.; MITTAPALLI, O.; MARGAM, V. M.; LI, H. M.; MEYER, J. M.; JOHNSON, R. M.; ROMERO-SEVERSON, J.; VANZEE, J. P.; ALVAREZ-PONCE, D.; VIEIRA, F. G.; AGUADE, M.; GUIRAO-RICO, S.; ANZOLA, J. M.; YOON, K. S.; STRYCHARZ, J. P.; UNGER, M. F.; CHRISTLEY, S.; LOBO, N. F.; SEUFFERHELD, M. J.; WANG, N.; DASCH, G. A.; STRUCHINER, C. J.; MADEY, G.; HANNICK, L. I.; BIDWELL, S.; JOARDAR, V.; CALER, E.; SHAO, R.; BARKER, S. C., CAMERON, S.; BRUGGNER, R. V.; REGIER, A.; JOHNSON, J.; VISWANATHAN, L.; UTTERBACK, T. R.; SUTTON, G. G.; LAWSON, D.; WATERHOUSE, R. M.; VENTER, J. C.; STRAUSBERG, R. L.; BERENBAUM, M. R.; COLLINS, F. H.; ZDOBNOV, E. M.; PITTENDRIGH, B. R. Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 27, p. 12168-73, 2010.

KUMAR, S.; BLAXTER, M. L. Comparing de novo assemblers for 454 transcriptome data. **BMC Genomics**, v. 11, p. 571, 2010.

KUNAMNENI, A.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Laccases and their applications: a patent review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 10-24, 2008.

KUSHWAH, B. S.; UPADHYAYA, S.C.; SHUKLA, S.; SIKARWAR, A.S.; SENGAR, R.M.S.; BHADAURIA, S. Performance of nanopolyaniline-fungal enzyme based biosensor for water pollution. **Advanced Material Letters**, v. 2, n. 1, p. 43-51, 2011.

LAI, Z.; ZOU, Y.; KANE, N. C.; CHOI, J. H.; WANG, X.; RIESEBERG, L. H. Preparation of normalized cDNA libraries for 454 titanium transcriptome sequencing. **Methods in Molecular Biology**, v. 888, p. 119-33, 2012.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J. P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, A.; SOUGNEZ, C.; STANGE-THOMANN, N.; STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, A.; WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, A.; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, A.; JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, A.; MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J. C.; MUNGALL, A.; PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; HILLIER, L. W.; MCPHERSON, J. D.; MARRA, M. A.; MARDIS, E. R.; FULTON, L. A.; CHINWALLA, A. T.; PEPIN, K. H.; GISH, W. R.; CHISSOE, S. L.; WENDL, M. C.; DELEHAUNTY, K. D.; MINER, T. L.; DELEHAUNTY, A.; KRAMER, J. B.; COOK, L. L.; FULTON, R. S.; JOHNSON, D. L.; MINX, P. J.; CLIFTON, S. W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGGETT, N.; CHENG, J. F.; OLSEN, A.; LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R. A.; MUZNY, D. M.; SCHERER, S. E.; BOUCK, J. B.; SODERGREN, E. J.; WORLEY, K.

C.; RIVES, C. M.; GORRELL, J. H.; METZKER, M. L.; NAYLOR, S. L.; KUCHERLAPATI, R. S.; NELSON, D. L.; WEINSTOCK, G. M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; YADA, T.; TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBACH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.; WINCKER, P.; SMITH, D. R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; ROSENTHAL, A.; PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.; DAVIS, R. W.; FEDERSPIEL, N. A.; ABOLA, A. P.; PROCTOR, M. J.; MYERS, R. M.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D. R.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G. A.; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; ROE, B. A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W. R.; DE LA BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; BLOCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J. A.; BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D. G.; BURGE, C. B.; CERUTTI, L.; CHEN, H. C.; CHURCH, D.; CLAMP, M.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; EDDY, S. R.; EICHLER, E. E.; FUREY, T. S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J. G.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L. S.; JONES, T. A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W. J.; KITTS, P.; KOONIN, E. V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T. M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKELSEN, T.; MORAN, J. V.; MULDER, N.; POLLARA, V. J.; PONTING, C. P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, A. F.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWSKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, A.; WOLF, Y. I.; WOLFE, K. H.; YANG, S. P.; YEH, R. F.; COLLINS, F.; GUYER, M. S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K. A.; PATRINOS, A.; MORGAN, M. J.; DE JONG, P.; CATANESE, J. J.; OSOEGAWA, K.; SHIZUYA, H.; CHOI, S.; CHEN, Y. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LANGE, C. E.; JOHNY, S.; BAKER, M.D.; WHITMAN, D.W.; SOLTER, L.F. A new Encephalitozoon species (Microsporidia) isolated from the lubber grasshopper, *Romalea*

*microptera* (Beauvois) (Orthoptera: Romaleidae). **The Journal of parasitology**, v. 95, n. 4, p. 976-986, 2009.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-8, 2007.

LEFEVER, S.; HELLEMANS, J.; PATTYN, F.; PRZYBYLSKI, D. R.; TAYLOR, C.; GEURTS, R.; UNTERGASSER, A.; VANDESOMPELE, J. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 7, p. 2065-9, 2009.

LEGRAND, S.; VALOT, N.; NICOLE, F.; MOJA, S.; BAUDINO, S.; JULLIEN, F.; MAGNARD, J. L.; CAISSARD, J. C.; LEGENDRE, L. One-step identification of conserved miRNAs, their targets, potential transcription factors and effector genes of complete secondary metabolism pathways after 454 pyrosequencing of calyx cDNAs from the Labiate *Salvia sclarea* L. **Gene**, v. 450, n. 1-2, p. 55-62, 2010.

LI, R.; FAN, W.; TIAN, G.; ZHU, H.; HE, L.; CAI, J.; HUANG, Q.; CAI, Q.; LI, B.; BAI, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; WANG, W.; LI, J.; WEI, F.; LI, H.; JIAN, M.; NIELSEN, R.; LI, D.; GU, W.; YANG, Z.; XUAN, Z.; RYDER, O. A.; LEUNG, F. C.; ZHOU, Y.; CAO, J.; SUN, X.; FU, Y.; FANG, X.; GUO, X.; WANG, B.; HOU, R.; SHEN, F.; MU, B.; NI, P.; LIN, R.; QIAN, W.; WANG, G.; YU, C.; NIE, W.; WANG, J.; WU, Z.; LIANG, H.; MIN, J.; WU, Q.; CHENG, S.; RUAN, J.; WANG, M.; SHI, Z.; WEN, M.; LIU, B.; REN, X.; ZHENG, H.; DONG, D.; COOK, K.; SHAN, G.; ZHANG, H.; KOSIOL, C.; XIE, X.; LU, Z.; LI, Y.; STEINER, C. C.; LAM, T. T.; LIN, S.; ZHANG, Q.; LI, G.; TIAN, J.; GONG, T.; LIU, H.; ZHANG, D.; FANG, L.; YE, C.; ZHANG, J.; HU, W.; XU, A.; REN, Y.; ZHANG, G.; BRUFORD, M. W.; LI, Q.; MA, L.; GUO, Y.; AN, N.; HU, Y.; ZHENG, Y.; SHI, Y.; LI, Z.; LIU, Q.; CHEN, Y.; ZHAO, J.; QU, N.; ZHAO, S.; TIAN, F.; WANG, X.; WANG, H.; XU, L.; LIU, X.; VINAR, T.; WANG, Y.; LAM, T. W.; YIU, S. M.; LIU, S.; HUANG, Y.; YANG, G.; JIANG, Z.; QIN, N.; LI, L.;



BOLUND, L.; KRISTIANSEN, K.; WONG, G. K.; OLSON, M.; ZHANG, X.; LI, S.; YANG, H. The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. **Nature**, v. 463, n. 7279, p. 311-7, 2010.

LI, S.; MEAD, E. A.; LIANG, S.; TU, Z. Direct sequencing and expression analysis of a large number of miRNAs in *Aedes aegypti* and a multi-species survey of novel mosquito miRNAs. **BMC Genomics**, v. 10, p. 581, 2009.

LIANG, Q. **Laccase-1 in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (harris)**. 2006. Thesis - Master of Science. Biochemistry Department, Kansas State University, Manhattan, KS.

LIU, Q.; PAROO, Z. Biochemical principles of small RNA pathways. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 295-319, 2010.

LOCKE, M. The Wigglesworth Lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 4-5, p. 495-507, 2001.

LOGAN, J. A.; BENTZ, B.J.; VANDYGRIFF, J.C.; TURNER, D.L. General Program for Determining Instar Distributions from Headcapsule Widths: Example Analysis of Mountain Pine Beetle (Coleoptera: Scolytidae) Data. **Environmental Entomology**, v. 27, n. 3, p. 553-563, 1998.

MA, W.; ZHANG, Z.; PENG, C.; WANG, X.; LI, F.; LIN, Y. Exploring the midgut transcriptome and brush border membrane vesicle proteome of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e38151, 2012.

MAO, Y. B.; CAI, W. J.; WANG, J. W.; HONG, G. J.; TAO, X. Y.; WANG, L. J.; HUANG, Y. P.; CHEN, X. Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1307-1313, 2007.

MAO, Y. B.; TAO, X. Y.; XUE, X. Y.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. **Transgenic Research**, v. 20, n. 3, p. 665-73, 2011.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Estatísticas e Dados Básicos de Economia Agrícola. 2012.

MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, p. 387-402, 2008.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALLENQUER, M. L.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J. B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-80, 2005.

MASOUDI-NEJAD, A.; TONOMURA, K.; KAWASHIMA, S.; MORIYA, Y.; SUZUKI, M.; ITOH, M.; KANEHISA, M.; ENDO, T.; GOTO, S. EGAssembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Web Server issue, p. W459-62, 2006.

MCLAUGHLIN, R. E. Laboratory Techniques for Rearing Disease-Free Insect Colonies: Elimination of *Mattesia grandis* McLaughlin, and *Nosema* sp. from Colonies of Boll Weevils. **Journal of Economic Entomology**, v. 59, n. 2, p. 401-404, 1966.

MCQUILTON, P.; ST PIERRE, S. E.; THURMOND, J. FlyBase 101--the basics of navigating FlyBase. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D706-14, 2012.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343-9, 2004.

MILLER, J. R.; KOREN, S.; SUTTON, G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**, v. 95, n. 6, p. 315-27, 2010.

MISQUITTA, L.; PATERSON, B. M. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 4, p. 1451-6, 1999.

MITA, K.; MORIMYO, M.; OKANO, K.; KOIKE, Y.; NOHATA, J.; KAWASAKI, H.; KADONO-OKUDA, K.; YAMAMOTO, K.; SUZUKI, M. G.; SHIMADA, T.; GOLDSMITH, M. R.; MAEDA, S. The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14121-6, 2003.

MONNERAT, R. G.; DIAS, S. C.; OLIVEIRA-NETO, O. B. de; NOBRE, S. D.; SILVA-WERNECK, J. O.; SÁ, M. F. G. de. Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. **Comunicado Técnico - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v. 46, p. 4, 2000.

MONNERAT, R. G.; NOBRE, S. D. N.; OLIVEIRA NETO, O. B. de; SCHMIDT, F. G. V.; DIAS, S.; LAUMAN, R.; SA, M. de F. G. de; SUJII, E. R. Parâmetros bionômicos do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) criado em dieta artificial para a realização de bioensaios. . **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 29, p. 20, 2002.

MONTGOMERY, M. K.; FIRE, A. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. **Trends in Genetics**, v. 14, n. 7, p. 255-8, 1998.

MONTGOMERY, M. K.; XU, S.; FIRE, A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15502-7, 1998.

MOROZOVA, N.; ZINOVYEV, A.; NONNE, N.; PRITCHARD, L. L.; GORBAN, A. N.; HAREL-BELLAN, A. Kinetic signatures of microRNA modes of action. **RNA**, 18(9), 1635-55, 2012.

MORTON, R. L.; SCHROEDER, H.E.; BATEMAN, K.S.; CHRISPPEELS, M.J.; ARMSTRONG, E.; HIGGINS, T.J. Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 3820-3825, 2000.

MURZIN, A. G. OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. **EMBO Journal**, v. 12, n. 3, p. 861-7, 1993.

NAKANO, O.; MARCHINI, L. C.; BATISTA, C. G. D. Pragas do algodoeiro. In: (Ed.). **Curso de entomologia aplicada à agricultura**. Piracicaba - SP: FEALQ, 1992. p.760.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NATIONAL\_COTTON\_COUNCIL\_OF\_AMERICA. Pest Management - Boll Weevil Eradication Program. U.S. and Northern Mexico . Acesso em: March 2012., Memphis, TN, USA, 2009.

NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A. **A CADEIA DO ALGODÃO BRASILEIRO: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS**. Brasília - DF: Markestrat, 2012.

NYREN, P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 167, n. 2, p. 235-8, 1987.

PANZAVOLTA, T. Instar determination for *Pissodes castaneus* (Coleoptera: Curculionidae) using head capsule widths and lengths. **Environmental Entomology**, v. 36, n. 5, p. 1054-1058, 2007.

PAPANICOLAOU, A.; STIERLI, R.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; HECKEL, D. G. Next generation transcriptomes for next generation genomes using est2assembly. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 447-450, 2009.

PAREEK, C. S.; SMOCZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, n. 4, p. 413-35, 2011.

PARRISH, S.; FLEENOR, J.; XU, S.; MELLO, C.; FIRE, A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. **Molecular Cell**, v. 6, n. 5, p. 1077-87, 2000.

PARTHASARATHY, R.; SUN, Z.; BAI, H.; PALLI, S. R. Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 5, p. 405-14, 2010.

PASCUAL, L.; JAKUBOWSKA, A. K.; BLANCA, J. M.; CANIZARES, J.; FERRE, J.; GLOECKNER, G.; VOGEL, H.; HERRERO, S. The transcriptome of *Spodoptera exigua* larvae exposed to different types of microbes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 8, p. 557-70, 2012.

PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; VAN MUNSTER, M.; AUGUSTIN, S.; PAURON, D.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar

leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 5-6, p. 403-13, 2009.

PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; VOGEL, H.; NELSON, D. R.; REYNOLDS, S. E.; HECKEL, D. G.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 1, p. 61-75, 2010.

PENG, X.; ZHA, W.; HE, R.; LU, T.; ZHU, L.; HAN, B.; HE, G. Pyrosequencing the midgut transcriptome of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 745-62, 2011.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509-15, 2004.

PRAÇA, L. B. **Anthonomus grandis Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae)**. Documentos, 216. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

PRICE, D. R.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 393-400, 2008.

PRYOR, M. G. M. On the hardening of cuticle of insects. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 128, p. 393-407, 1940.

RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; WEINSTOCK, G. M.; BROWN, S. J.; DENELL, R.; BEEMAN, R. W.; GIBBS, R.; BUCHER, G.; FRIEDRICH, M.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. J.; KLINGLER, M.; LORENZEN, M.; ROTH, S.; SCHRODER, R.; TAUTZ, D.; ZDOBNOV, E. M.; MUZNY, D.; ATTAWAY, T.; BELL, S.; BUHAY, C. J.; CHANDRABOSE, M. N.; CHAVEZ, D.; CLERK-BLANKENBURG, K. P.; CREE, A.; DAO, M.; DAVIS, C.; CHACKO, J.; DINH, H.; DUGAN-ROCHA, S.; FOWLER, G.;

GARNER, T. T.; GARNES, J.; GNIRKE, A.; HAWES, A.; HERNANDEZ, J.; HINES, S.; HOLDER, M.; HUME, J.; JHANGIANI, S. N.; JOSHI, V.; KHAN, Z. M.; JACKSON, L.; KOVAR, C.; KOWIS, A.; LEE, S.; LEWIS, L. R.; MARGOLIS, J.; MORGAN, M.; NAZARETH, L. V.; NGUYEN, N.; OKWUONU, G.; PARKER, D.; RUIZ, S. J.; SANTIBANEZ, J.; SAVARD, J.; SCHERER, S. E.; SCHNEIDER, B.; SODERGREN, E.; VATTAHIL, S.; VILLASANA, D.; WHITE, C. S.; WRIGHT, R.; PARK, Y.; LORD, J.; OPPERT, B.; BROWN, S.; WANG, L.; WEINSTOCK, G.; LIU, Y.; WORLEY, K.; ELSIK, C. G.; REESE, J. T.; ELHAIK, E.; LANDAN, G.; GRAUR, D.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.; BEIDLER, J.; DEMUTH, J. P.; DRURY, D. W.; DU, Y. Z.; FUJIWARA, H.; MASELLI, V.; OSANAI, M.; ROBERTSON, H. M.; TU, Z.; WANG, J. J.; WANG, S.; SONG, H.; ZHANG, L.; WERNER, D.; STANKE, M.; MORGENSTERN, B.; SOLOVYEV, V.; KOSAREV, P.; BROWN, G.; CHEN, H. C.; ERMOLAEVA, O.; HLAVINA, W.; KAPUSTIN, Y.; KIRYUTIN, B.; KITTS, P.; MAGLOTT, D.; PRUITT, K.; SAPOJNIKOV, V.; SOUVOROV, A.; MACKEY, A. J.; WATERHOUSE, R. M.; WYDER, S.; KRIVENTSEVA, E. V.; KADOWAKI, T.; BORK, P.; ARANDA, M.; BAO, R.; BEERMANN, A.; BERNS, N.; BOLOGNESI, R.; BONNETON, F.; BOPP, D.; BUTTS, T.; CHAUMOT, A.; DENELL, R. E.; FERRIER, D. E.; GORDON, C. M.; JINDRA, M.; LAN, Q.; LATTORFF, H. M.; LAUDET, V.; VON LEVETSOW, C.; LIU, Z.; LUTZ, R.; LYNCH, J. A.; DA FONSECA, R. N.; POSNIEN, N.; REUTER, R.; SCHINKO, J. B.; SCHMITT, C.; SCHOPPEMEIER, M.; SHIPPY, T. D.; SIMONNET, F.; MARQUES-SOUZA, H.; TOMOYASU, Y.; TRAUNER, J.; VAN DER ZEE, M.; VERVOORT, M.; WITTKOPP, N.; WIMMER, E. A.; YANG, X.; JONES, A. K.; SATTELLE, D. B.; EBERT, P. R.; NELSON, D.; SCOTT, J. G.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J.; ARAKANE, Y.; ZHU, Q.; HOGENKAMP, D.; DIXIT, R.; JIANG, H.; ZOU, Z.; MARSHALL, J.; ELPIDINA, E.; VINOKUROV, K.; OPPERT, C.; EVANS, J.; LU, Z.; ZHAO, P.; SUMATHIPALA, N.; ALTINCICEK, B.; VILCINSKAS, A.; WILLIAMS, M.; HULTMARK, D.; HETRU, C.; HAUSER, F.; CAZZAMALI, G.; WILLIAMSON, M.; LI, B.; TANAKA, Y.; PREDEL, R.; NEUPERT, S.; SCHACHTNER, J.; VERLEYEN, P.; RAIBLE, F.; WALDEN, K. K.; ANGELI, S.; FORET, S.; SCHUETZ, S.; MALESZKA, R.; MILLER, S. C.; GROSSMANN, D. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 949-55, 2008.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219-26, 2006.

ROCHE\_DIAGNOSTICS\_CORPORATION. 454 Sequencing. 2012. Disponível em: <<http://454.com/products/gx-flx-system/index.asp>>. Acesso em: 10-07-2012.

RONAGHI, M.; UHLEN, M.; NYREN, P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 363, 365, 1998.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. *Primer3* on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 365-86, 2000.

SALEH, M. C.; VAN RIJ, R. P.; HEKELE, A.; GILLIS, A.; FOLEY, E.; O'FARRELL, P. H.; ANDINO, R. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 8, p. 793-802, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd Edition. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.

SANTOS, W. J. D. Monitoramento e controle das pragas do algodoeiro. In: CIA, E., FREIRE, E.C. E SANTOS, W.J. DOS (Ed.). **Cultura do Algodoeiro**. Piracicaba - SP: Potafos, v.1, 1999. p.133-174.

SAPPINGTON, T. W.; SPURGEON, D. W. Preferred Technique for Adult Sex Determination of the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomology Society of America**, v. 93, n. 3, p. 610-615, 2000.



SAPPINGTON, T. W.; SPURGEON, D. W. Preferred Technique for Adult Sex Determination of the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomology Society of America**, v. 93, n. 3, p. 610-615, 2000.

SHIN, H.; HIRST, M.; BAINBRIDGE, M. N.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.; MOERMAN, D. G.; MARRA, M. A.; BAILLIE, D. L.; JONES, S. J. Transcriptome analysis for *Caenorhabditis elegans* based on novel expressed sequence tags. **BMC Biology**, v. 6, p. 30, 2008.

SHRADDHA, S. R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 217861, 2011.

SHU, Y. H.; WANG, J. W.; LU, K.; ZHOU, J. L.; ZHOU, Q.; ZHANG, G. R. The first vitellogenin receptor from a Lepidopteran insect: molecular characterization, expression patterns and RNA interference analysis. **Insect Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 61-73, 2011.

SIJEN, T.; FLEENOR, J.; SIMMER, F.; THIJSSSEN, K. L.; PARRISH, S.; TIMMONS, L.; PLASTERK, R. H.; FIRE, A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 465-76, 2001.

SIOMI, M. C.; SATO, K.; PEZIC, D.; ARAVIN, A. A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 4, p. 246-58, 2011.

SOLANAS, M.; MORAL, R.; ESCRICH, E. Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors. **Analytical Biochemistry**, v. 288, n. 1, p. 99-102, 2001.

SONG, J. J.; LIU, J.; TOLIA, N. H.; SCHNEIDERMAN, J.; SMITH, S. K.; MARTIENSSEN, R. A.; HANNON, G. J.; JOSHUA-TOR, L. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 12, p. 1026-32, 2003.

SONTHEIMER, E. J. Assembly and function of RNA silencing complexes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 127-38, 2005.

SUCK, D. Common fold, common function, common origin? **Nature Structural Biology**, v. 4, n. 3, p. 161-5, 1997.

SUDERMAN, R. J.; DITTMER, N. T.; KANOST, M. R.; KRAMER, K. J. Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 353-65, 2006.

TABARA, H.; GRISHOK, A.; MELLO, C. C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. **Science**, v. 282, n. 5388, p. 430-1, 1998.

THOMPSON, J. F.; MILOS, P. M. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. **Genome Biology**, v. 12, n. 2, p. 217, 2011.

TIJSTERMAN, M.; KETTING, R. F.; OKIHARA, K. L.; SIJEN, T.; PLASTERK, R. H. RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. **Science**, v. 295, n. 5555, p. 694-7, 2002.

TIMMONS, L.; COURT, D. L.; FIRE, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, n. 1-2, p. 103-12, 2001.

TIMMONS, L.; FIRE, A. Specific interference by ingested dsRNA. **Nature**, v. 395, n. 6705, p. 854, 1998.

TOMOYASU, Y.; MILLER, S. C.; TOMITA, S.; SCHOPPEMEIER, M.; GROSSMANN, D.; BUCHER, G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. **Genome Biology**, 9 (1), p. R10, 2008.

TRICARICO, C.; PINZANI, P.; BIANCHI, S.; PAGLIERANI, M.; DISTANTE, V.; PAZZAGLI, M.; BUSTIN, S. A.; ORLANDO, C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. **Analytical Biochemistry**, v. 309, n. 2, p. 293-300, 2002.

TURNER, T. L.; STEWART, A. D.; FIELDS, A. T.; RICE, W. R.; TARONE, A. M. Population-based resequencing of experimentally evolved populations reveals the genetic basis of body size variation in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 3, p. e1001336, 2011.

ULVILA, J.; PARIKKA, M.; KLEINO, A.; SORMUNEN, R.; EZEKOWITZ, R. A.; KOCKS, C.; RAMET, M. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14370-5, 2006.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 34-40, 2002.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P. D.; ZHANG, J.; GABOR-MIKLOS, G. L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A. G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V. A.; ZINDER, N.; LEVINE, A. J.;

ROBERTS, R. J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A. E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T. J.; HIGGINS, M. E.; JI, R. R.; KE, Z.; KETCHUM, K. A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G. V.; MILSHINA, N.; MOORE, H. M.; NAIK, A. K.; NARAYAN, V. A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D. B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M. L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y. H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N. N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J. F.; GUIGO, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K. V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-

STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y. H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1304-51, 2001.

VERA, J. C.; WHEAT, C. W.; FESCEMYER, H. W.; FRILANDER, M. J.; CRAWFORD, D. L.; HANSKI, I.; MARDEN, J. H. Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 7, p. 1636-47, 2008.

VINCENT, J. F.; WEGST, U. G. Design and mechanical properties of insect cuticle. **Arthropod Structure and Development**, v. 33, n. 3, p. 187-99, 2004.

WAGNER, T. L.; VILLAVASO, E. J.; WILLERS, J. L. Diapause in the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) : Life-Stage Sensitivity to Environmental Cues. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 92, n. 3, p. 392-402, 1999.

WAHAB, S. Biotechnological approaches in the management of plant pests, diseases and weeds for Sustainable Agriculture. **Journal of Biopesticides**, v. 2, n. 2, p. 115-134, 2009.

WANG, G.; REINKE, V. A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. **Current Biology**, v. 18, n. 12, p. 861-7, 2008.

WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M.; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-91, 2009.

WILLIS, J. H. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 189-204, 2010.

WINNEBECK, E. C.; MILLAR, C. D.; WARMAN, G. R. Why does insect RNA look degraded? **Journal of Insect Sciences**, v. 10, p. 159-165, 2010.

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R. I.; DIEDERICHS, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 228-34, 2009.

WONG, C. N.; NG, P.; DOUGLAS, A. E. Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1889-900, 2011.

XIA, Q.; GUO, Y.; ZHANG, Z.; LI, D.; XUAN, Z.; LI, Z.; DAI, F.; LI, Y.; CHENG, D.; LI, R.; CHENG, T.; JIANG, T.; BECQUET, C.; XU, X.; LIU, C.; ZHA, X.; FAN, W.; LIN, Y.; SHEN, Y.; JIANG, L.; JENSEN, J.; HELLMANN, I.; TANG, S.; ZHAO, P.; XU, H.; YU, C.; ZHANG, G.; LI, J.; CAO, J.; LIU, S.; HE, N.; ZHOU, Y.; LIU, H.; ZHAO, J.; YE, C.; DU, Z.; PAN, G.; ZHAO, A.; SHAO, H.; ZENG, W.; WU, P.; LI, C.; PAN, M.; YIN, X.; WANG, J.; ZHENG, H.; WANG, W.; ZHANG, X.; LI, S.; YANG, H.; LU, C.; NIELSEN, R.; ZHOU, Z.; XIANG, Z. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx mori*). **Science**, v. 326, n. 5951, p. 433-6, 2009.

XU, J.; RAMAN, C.; ZHU, F.; TAN, A.; PALLI, S. R. Identification of nuclear receptors involved in regulation of male reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 5, p. 710-7, 2012.

YADAV, B. C.; VELUTHAMBI, K.; SUBRAMANIAM, K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. **Molecular Biochemistry and Parasitology**, v. 148, n. 2, p. 219-22, 2006.

YAMAZAKI, H. I. The cuticular phenoloxidase in *Drosophila virilis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 15, n. 12, p. 2203-2211, 1969.

YAMEY, G. Scientists unveil first draft of human genome. **BMJ**, v. 321, n. 7252, p. 7, 2000.

YATSU, J.; ASANO, T. Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 4, p. 254-62, 2009.

YE, J.; FANG, L.; ZHENG, H.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; WANG, J.; LI, S.; LI, R.; BOLUND, L. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server issue, p. W293-7, 2006.

ZAGROBELNY, M.; SCHEIBYE-ALSING, K.; JENSEN, N. B.; MOLLER, B. L.; GORODKIN, J.; BAK, S. 454 pyrosequencing based transcriptome analysis of *Zygaena filipendulae* with focus on genes involved in biosynthesis of cyanogenic glucosides. **BMC Genomics**, v. 10, p. 574-580, 2009.

ZAMORE, P. D.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A.; BARTEL, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Cell**, v. 101, n. 1, p. 25-33, 2000.

ZHANG, F.; GUO, H.; ZHENG, H.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; WANG, S.; FANG, R.; QIAN, W.; CHEN, X. Massively parallel pyrosequencing-based transcriptome analyses of small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*), a vector insect transmitting rice stripe virus (RSV). **BMC Genomics**, v. 11, p. 303, 2010.

ZHANG, J.; MARSHALL, K. E.; WESTWOOD, J. T.; CLARK, M. S.; SINCLAIR, B. J. Divergent transcriptomic responses to repeated and single cold exposures in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 23, p. 4021-4029, 2011.

ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of Genetic and Genomics**, v. 38, n. 3, p. 95-109, 2011.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 8, p. 1047-64, 2005.

ZHOU, X.; OI, F. M.; SCHARF, M. E. Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 12, p. 4499-504, 2006.

ZHU, Y.; BERGLAND, A. O.; GONZALEZ, J.; PETROV, D. A. Empirical Validation of Pooled Whole Genome Population Re-Sequencing in *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41901, 2012.

ZHULIDOV, P. A.; BOGDANOVA, E. A.; SHCHEGLOV, A. S.; VAGNER, L. L.; KHASPEKOV, G. L.; KOZHEMYAKO, V. B.; MATZ, M. V.; MELESHKEVITCH, E.; MOROZ, L. L.; LUKYANOV, S. A.; SHAGIN, D. A. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 3, p. e37, 2004.

ZOU, Z.; NAJAR, F.; WANG, Y. ROE, B.; JIANG, H. Pyrosequence analysis of expressed sequence tags for *Manduca sexta* hemolymph proteins involved in immune responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 6, p. 677-82, 2008.



## ANEXOS

### Publicações do Aluno

#### Artigos relacionados a tese

Alexandre A. P. Firmino; Fernando C. A. Fonseca; Leonardo L. P. Macedo; Roberta R. Coelho, Roberto C. Togawa; Orzenil B. Silva-Junior; Georgios J. Pappas-Jr; Maria F. Grossi-de-Sá. **Pyrosequencing analysis of the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) transcriptome. *BMC Genomics* 2012.** Submetido.

Alexandre A. P. Firmino; Fernando C. A. Fonseca; Leonardo L. P. Macedo; Roberta R. Coelho, Maria F. Grossi-de-Sá . **Housekeeping genes for *Anthonomus grandis* studies.** Em preparação.

Alexandre A. P. Firmino; Diogo Martins de Sá; Fernando C. A. Fonseca; Leonardo L. P. Macedo; Roberta R. Coelho, Maria F. Grossi-de-Sá. **Lethal Phenotype caused by RNAi-mediated Silencing of a Cotton Boll Weevil *Laccase2* gene .** Em preparação.

#### Outros Artigos

Macedo, L.L.P; Fonseca, F.C.A; Firmino, A.A.P; Coelho, R.R; Fragoso, R.R.; Oliveira-Neto, O. B.; Silva, M. C. M.; Oliveira, RS; Grossi-de-Sa, M. F. **A midgut-specific chitin synthase in *Anthonomus grandis* as target for pest control.** Em preparação.

Fonseca, F.C.A; Firmino, A.A.P; Macedo, L.L.P; Antonino-de-Souza Jr.; Coelho, R.R; Togawa, R.C; Silva Junior, O. B; Pappas Jr, G. J; Grossi-de-Sá, M. F. **Pyrosequencing of the sugarcane giant borer (*Telchin licus licus*) transcriptome for identification of genes potentially involved with insect survival and development.** BMC Genomics. Em preparação.

Fonseca, F.C.A; Redorat, F.S; Lourenço, I.T; Firmino, A.A.P.; Macedo, L.L.P.; Grossi-de-Sá, M.F. **Reference genes for gene expression analysis of different developmental stages of sugarcane giant borer.** BMC Biotechnology. Em preparação.

Macedo, L.L.P; Fonseca, F.C.A; Firmino, A.A.P; Coelho, R.R; Fragoso, R.R.; Oliveira-Neto, O. B.; Silva, M. C. M.; Grossi-De-Sa, M. F. **A midgut-specific chitin synthase in *Anthonomus grandis* as target for pest control: cloning, molecular characterization and silencing.** Insect Biochemistry and Molecular Biology. Em preparação.

Macedo, L.L.P; Fonseca, F.C.A; Fragoso, R.R.; Firmino, A.A.P.; Oliveira-Neto, O. B.; Silva, M. C. M.; Grossi-De-Sa, M. F. **Sequences of cDNAs, expression patterns and silencing of gene encoding chitin synthase in *Anthonomus grandis*: potential target for pest control.** Insect Biochemistry and Molecular Biology. Em preparação.

Coelho, R.R.; Souza Jr, J.A.D.; Firmino, A.A.P.; Macedo, L.L.P.; Grossi de Sa, M.F. **Silencing of a vitelogenin gene as a tool for *Anthonomus grandis* control.** Insect Molecular Biology and Biochemistry, Em preparação.

T. L. Rocha, B. A. Boughton, T. S. Silva, K. Oldach, A. G. W. Murray, A. A. P. Firmino, D. L. Callahan, J. Sheedy, R. E. Silveira, R. N. D. G. Carneiro, L. P. Silva, V. L. P. Polez, P. B. Pelegrini, M. F. Grossi de Sa, A. Bacic, U. Roessner. **A comprehensive approach to identify nematotoxic metabolites present in seeds of leguminous antagonistic plants to *Meloidogyne incognita*.** Metabolomics. Submetido.

Sá, Maria Eugênia Lisei de ; Lopes, Marcus José Conceição ; Campos, Magnólia de Araújo ; Paiva, Luciano Vilela ; Santos, Regina Maria Amorim dos ; Beneventi, Magda Aparecida; Firmino, Alexandre Augusto Pereira; Sá, Maria Fátima Grossi de. **Transcriptome analysis of resistant soybean roots infected by *Meloidogyne javanica*.** Genetics and Molecular Biology, v. 35, p. 272-282, 2012.

Oliveira, Gustavo R ; Silva, Maria CM ; Lucena, Wagner A ; Nakasu, Erich YT ; Firmino, Alexandre AP ; Beneventi, Magda A ; Souza, Djair SL ; Gomes, Jose E ; de-Souza, Jose DA ; Rigden, Daniel J ; Ramos, Hudson B ; Soccol, Carlos R ; Grossi-de-Sa, Maria F .

**Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*).** BMC Biotechnology, v. 11, p. 85, 2011.

Nakasu, Erich Y.T. ; Firmino, Alexandre A.P. ; Dias, Simoni C. ; Rocha, Thales L. ; Ramos, Hudson B. ; Oliveira, Gustavo R. ; Lucena, Wagner; Carlini, Célia R. ; Grossi-de-Sá, Maria Fátima . **Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut.** Journal of Invertebrate, v. 104, p. 227-230, 2010.

Marra, Brenner M. ; Souza, Djair S.L. ; Aguiar, João N. ; FIRMINO, A. A. P. ; Sarto, Rafael P.D. ; Silva, Francine B. ; Almeida, Charles D.S. ; Cares, Juvenil E. ; Continho, Marise V. ; Martins-de-Sa, Cezar . **Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots.** Peptides, v. 30, p. 825-831, 2009.

Patente em preparação

"Controle genético de infestação do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) por silenciamento do gene da Lacase 2 mediado por RNA dupla fita"

## **FIRMINO, A. A. P.**

### **1. DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Alexandre Augusto Pereira Firmino

**Local e data de nascimento:** Juiz de Fora, MG, 14-09-1973

#### **Endereço profissional:**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga

PqEB- Parque Estação Biológica Norte

Final AV. W5 Norte

70770-900 - Brasília-DF

**Telefone profissional:** 61 34484705 **E-mail:** alexfirm@gmail.com

### **2. FORMAÇÃO:**

Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) (Conceito CAPES 6).  
Universidade de Brasília, UNB, Brasil.

Título: Transdução de Sinais em *Trichoderma harzianum*: aspectos da indução da atividade de N-acetilglicosaminidase, 1996-1998. Orientador: Carlos André Ornelas Ricart.

Graduação em Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, UNB, Brasil. 1991-1994.

### **3. ESTÁGIOS:**

Exercício de Monitoria Remunerada na disciplina Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia, UnB. 1994 - Carga horária: 6

Bolsista de Iniciação Científica, CNPq. Estagiário no Laboratório de Enzimologia, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, UnB. Carga horária: 20

Purificação e Caracterização de Queratinase de *Aspergillus fumigatus fresenius*. 1992-1994

Bolsista de DTI, Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia., Laboratório de Patologia.

Patologia da Leishmaniose Tegumentar. 1997-1998

Bolsista DTI, 1999-2000. Carga horária: 40. Pesquisa e desenvolvimento , Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Área de Reprodução Animal e Imunologia.

Consultoria, 2000 - 2001. Carga horária: 40. Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Área de Reprodução Animal e Imunologia.

#### **4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES**

Menção Honrosa - Premio Professor Antonio Rodrigues Cordeiro, II Simposio Brasileiro de Biologia Molecular de Plantas. 2009.

#### **5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR**

Coordenador Geral de Projetos, Instituto Matogrossense do Algodão-IMA. 2007.

Professor em treinamento didático da disciplina Metabolismo Celular ministrada para turma de Graduação em Ciências Biológicas e Graduação em Química, UnB 1995-1996.

#### **6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS**

Sá, Maria Eugênia Lisei de ; Lopes, Marcus José Conceição ; Campos, Magnólia de Araújo ; Paiva, Luciano Vilela ; Santos, Regina Maria Amorim dos ; Beneventi, Magda Aparecida; Firmino, Alexandre Augusto Pereira; Sá, Maria Fátima Grossi de. **Transcriptome analysis of resistant soybean roots infected by *Meloidogyne javanica*.** Genetics and Molecular Biology, v. 35, p. 272-282, 2012.

Oliveira, Gustavo R ; Silva, Maria CM ; Lucena, Wagner A ; Nakasu, Erich YT ; Firmino, Alexandre AP ; Beneventi, Magda A ; Souza, Djair SL ; Gomes, Jose E ; de-Souza, Jose DA ; Rigden, Daniel J ; Ramos, Hudson B ; Soccol, Carlos R ; Grossi-de-Sa, Maria F .

**Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*).** BMC Biotechnology, v. 11, p. 85, 2011.

Nakasu, Erich Y.T. ; Firmino, Alexandre A.P. ; Dias, Simoni C. ; Rocha, Thales L. ; Ramos, Hudson B. ; Oliveira, Gustavo R. ; Lucena, Wagner; Carlini, Célia R. ; Grossi-de-Sá, Maria Fátima . **Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut.** Journal of Invertebrate, v. 104, p. 227-230, 2010.

Marra, Brenner M. ; Souza, Djair S.L. ; Aguiar, João N. ; FIRMINO, A. A. P. ; Sarto, Rafael P.D. ; Silva, Francine B. ; Almeida, Charles D.S. ; Cares, Juvenil E. ; Continho, Marise V. ; Martins-de-Sa, Cezar . **Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots.** Peptides, v. 30, p. 825-831, 2009.

Almeida, Charles D.S. ; LIMA, D. S. ; Sarto, Rafael P.D. ; FIRMINO, A. A. P. ; SILVA, T. S. ; GROSSI-DE-SA, M. F. ; ROCHA, T. L. . **Fracionamento de extrato aquoso de sementes de *Crotalaria spectabilis* efetivo no controle de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.** Brasília-DF: Embrapa, 2008 (Comunicado Técnico).

ROCHA, T. L. ; COSTA, P. H. A. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; Oliveira-Neto, O. B. ; Souza, Djair S.L.; FIRMINO, A. A. P. ; Fragoso, R. R. ; VASCONCELOS, E. A. R. ; GROSSI-DE-SA, M. F. **Análise proteômica de raízes de algodoeiro resistente e susceptível infectadas com *Meloidogyne incognita*.** Brasília-DF: Embrapa, 2007 (Comunicado Técnico).

ROCHA, T. L. ; Murad, A. M. ; Espindola, L. S. ; FIRMINO, A. A. P. ; Oliveira-Neto, O. B. ; Continho, Marise V. ; SILVA, M. C. M. ; GROSSI-DE-SA, M. F. **Prospecção de Moléculas de Extratos vegetais do Bioma Cerrado para o Controle de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Meloidogyne incognita*.** Brasília-DF: Embrapa, 2007 (Comunicado Técnico).

Kashino, Suely S. ; Resende, Janaina ; Sacco, Ana Maria S. ; Rocha, Clarisse ; Proença, Laila ; Carvalho, Wanessa A. ; Firmino, Alexandre A. ; Queiroz, Rosevaldo ; Benavides,

Magda ; Gershwin, Laurel J. ; De Miranda Santos, Isabel K.F. ***Boophilus microplus: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations.*** Experimental Parasitology, v. 110, p. 12-21, 2005.

Firmino, Alexandre A. P. ; Ulhoa, Cirano J. ; Sousa, Marcelo V. ; Ferreira Filho, Edivaldo X. ; Ricart, Carlos A.O. ***Involvement of G proteins and cAMP in the production of chitinolytic enzymes by Trichoderma harzianum.*** Brazilian Journal of Microbiology, v. 33, p. 12, 2002.

Santos, Regina M.D.B. ; Firmino, Alexandre A. P. ; Sá, Cezar M. de ; Felix, Carlos R. ***Keratinolytic Activity of Aspergillus fumigatus Fresenius.*** Current Microbiology, v. 33, p. 364-370, 1996.

## **7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

ROCHA, T. L. ; SILVA, T. S. ; BOUGHTON, B. A. ; FIRMINO, A. A. P. ; OLDACH, K. ; MURRAY, A. G. W. ; CALLAHAM, D. L. ; SHEEDY, J. ; SILVEIRA, R. E. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; GROSSI-DE-SA, M. F. ; BACIC, A. ; ROESSNER, U. . A comprehensive approach to identify toxic metabolites present in seeds of leguminous antagonistic plants to juveniles of plant parasitic nematode.. In: XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 2011, Brasília-DF. CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 2011. v. 1. p. 257-258.

FIRMINO, A. A. P. ; Fonseca, F. C. A. ; Macedo, L. L. P. ; Togawa, R. C. ; Silva-Junior, O. B. ; Pappas Jr, G. J. ; GROSSI-DE-SA, M. F. . Cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) transcriptome pyrosequencing and insect-pest control by RNAi gene silencing. In: III Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza-CE. III Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010.

Fonseca, F. C. A. ; FIRMINO, A. A. P. ; Macedo, L. L. P. ; Togawa, R. C. ; Silva-Junior, O. B. ; Pappas Jr, G. J. ; GROSSI-DE-SA, M. F. . Pyrosequencing of the giant borer (*Telchin licus licus*) transcriptome for gene evaluation and silencing through RNAi Fo. In:

III Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza-CE. III Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010.

Macedo, L. L. P. ; PESSOA, C. E. S. G. ; Oliveira-Neto, O. B. ; SOUZA-JUNIOR, J. D. A. ; COELHO, R. R. ; FIRMINO, A. A. P. ; GROSSI-DE-SA, M. F. . Functional evaluation of genes involved in the formation of chitinous structures of *Anthonomus Grandis* using RNA interference (RNAI).. In: III Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza-CE. III Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010.

FIRMINO, A. A. P. ; SILVA, T. S. ; Evaristo, R.G.S ; Franco, O. L. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; Silveira E. R. ; SILVA, M. C. M. ; GROSSI-DE-SA, M. F. ; ROCHA, T. L. . Secondary Metabolites from the seeds of *Canavalia ensiformis*: Perspectives for the use of metabolic engineering to control nematodes. In: II Simposio Brasileiro de Genetica Molecular de Plantas, 2009, Buzios-RJ. II Simposio Brasileiro de Genetica Molecular de Plantas, 2009. v. 1.

Sarto, Rafael P.D. ; Lacerda, A. F. ; FIRMINO, A. A. P. ; ROCHA, T. L. ; GROSSI-DE-SA, M. F. . Nematicidal activity of plant defensins.. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF TROPICAL NEMATOLOGY, 2009, Maceió AL. INTERNATIONAL CONGRESS OF TROPICAL NEMATOLOGY, 2009. v. 2.

SILVA, T. S. ; FIRMINO, A. A. P. ; Sarto, Rafael P.D. ; GROSSI-DE-SA, M. F. ; ROCHA, T. L. . Investigation of molecules from a Solanaceae species found in the Brazilian cerrado effective toward phytonematode.. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF TROPICAL NEMATOLOGY, 2009, Maceió AL. INTERNATIONAL CONGRESS OF TROPICAL NEMATOLOGY, 2009. v. 2.

Oliveira, R. S. ; COSTA, P. H. A. ; Oliveira-Neto, O. B. ; Mulinari, E. ; FIRMINO, A. A. P. ; Lourenço, I. T. ; Continho, Marise V. ; SILVA, M. C. M. ; ROCHA, T. L. ; GROSSI-DE-SA, M. F. . Development of insect-resistant transgenic cotton plants with cry1Ia12 gene.. In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009, Buzios - RJ. II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas - Programa e Resumos, 2009.



ROCHA, T. L. ; Evaristo, R.G.S ; FIRMINO, A. A. P. ; Franco, O. L. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; Silveira E. R. ; Salmen, E. L. ; LIMA, D. S. ; Silva, L. P. ; Magalhães, B. S. ; SILVA, M. C. M. ; GROSSI-DE-SA, M. F. . Secondary metabolites present in *Canavalia ensiformis* seeds are toxic to juvenile plant parasitic nematodes. In: 5th International Congress on Nematology, 2008, Brisbane. Annals of 5th International Congress on Nematology, 2008.

FIRMINO, A. A. P. ; Evaristo, R.G.S ; Franco, O. L. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; Silveira E. R. ; Souza, Djair S.L. ; Silva, L. P. ; Magalhães, B. S. ; GROSSI-DE-SA, M. F. ; ROCHA, T. L. . Identification of secondary metabolites from *Canavalia ensiformis*: perspectives for the use of metabolic engineering to control nematodes.. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador-BA. 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

COSTA, P. H. A. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; VIEIRA, G. C. ; LIMA, D. S. ; BRILHANTE, O. ; FIRMINO, A. A. P. ; GROSSI-DE-SA, M. F. ; ROCHA, T. L. . Proteomic approach to study gelatinous matrix of *Meloidogyne incognita*. In: XXVII Brazilian Congress of Nematology, 2007, Goiania. XXVII Brazilian Congress of Nematology, 2007.

de MIRANDA SANTOS, I. K. F. ; ROCHA, C. ; RESENDE, J. L. ; QUEIROZ, R. ; FIRMINO, A. A. P. ; KASHINO, S. S. ; PROENCA, L. ; GERSHWIN, L. ; ARAUJO, W. . Tick saliva-specific immunoglobulin classes and subclasses and patterns of antigen recognition in tick-resistant and susceptible cattle infested with *Boophilus microplus*. In: 7th Meeting of the Society for Tropical Veterinary Medicine, 2003, Foz do Iguaçu. Program 7th Meeting STVM, 2003.

de MIRANDA SANTOS, I. K. F. ; FIRMINO, A. A. P. ; FONSECA, C. N. ; PROENCA, L. ; QUEIROZ, R. ; SACCO, A. M. S. ; ROCHA, C. ; FRANCO, P. . Recognition of the tick *Boophilus microplus* salivary antigens by antibodies from cattle undergoing high and low infestations. In: Sixth International Veterinary Immunology Symposium, 2001, Uppsala. Swedish University of Agricultural Sciences, 2001.

FIRMINO, A. A. P. ; ULHOA, C. J. ; FERREIRA FILHO, E. X. ; SOUZA, M. V. ; RICART, C. A. O. . Modulation of fungi enzyme production using signal transduction effectors and analysis of protein expression via proteome analysis. In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000, Caxambu-MG. Anais da XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000.

FIRMINO, A. A. P. ; RICART, C. A. O. ; ULHOA, C. J. . Signal Transduction in *Trichoderma harzianum*: more aspects in the induction of N-acetylglucosaminidase induction. In: XXVII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia, 1999, Caxambu. XXVII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia, 1999.

FIRMINO, A. A. P. ; de MIRANDA SANTOS, I. K. F. ; COSTA, L. R. ; ISSEL, C. J. ; HARN, D. A. B Cell activation in equine infectious anemia: lacto-N-fucopentaose III (Lewis x) is a target of the antibody response. In: XXIV Annual Meeting of the Brazilian Society for Immunology, 1999, Águas de Lindóia-SP. XXIV Annual Meeting of the Brazilian Society for Immunology, 1999.

RICART, C. A. O. ; FIRMINO, A. A. P. ; ULHOA, C. J. . Envolvimento de Proteínas G e AMPc na produção de N-acetilglicosaminidase por *Trichoderma harzianum*. In: 4o Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática-ENZITEC 99, 1999, Rio de Janeiro. Anais do 4o Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática-ENZITEC 99, 1999.

FIRMINO, A. A. P. ; RICART, C. A. O. ; ULHOA, C. J. . Signal Transduction in *Trichoderma harzianum*: some aspects in the induction of a N-acetylglucosaminidase activity. In: XXVI Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia, 1998, Caxambu. XXVI Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia, 1998.

FIRMINO, A. A. P. ; FÉLIX, C. R. ; SANTOS, R. M. B. . Purificação e caracterização de Queratinase de *Aspergillus fumigatus* Fresenius. In: IV Encontro de Pesquisadores da Universidade Federal de Goiás - UFG, 1996, Goiânia. IV Encontro de Pesquisadores da Universidade Federal de Goiás - UFG, 1996.

## **Palestras em Congresso**

FIRMINO, A. A. P. . Leguminous metabolites with potential on plant nematode control. 2012. II Workshop sobre Produtos Naturais. Universidade de Caxias do Sul – UCS, Caxias do Sul, RS, Brasil.

FIRMINO, A. A. P. . Application of RNAi technique on insect-pest control. 2010. III Congresso Brasileiro de Biotecnologia. Fortaleza, CE, Brasil.

FIRMINO, A. A. P. . Secondary metabolites from the seeds of *Canavalia ensiformis*: perspectives for the use of metabolic engineering to control nematodes. 2009. 2nd International Congress of Tropical Nematology. Maceió, AL, Brasil.