



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**NOVAS BIOMOLÉCULAS POTENCIALMENTE APLICADAS NO CONTROLE  
DE *ANTHONOMUS GRANDIS*, VIA RNA INTERFERENTE**

**Ana Gabriela Borges Leite**

Brasília, 2020

Ana Gabriela Borges Leite

**NOVAS BIOMOLÉCULAS POTENCIALMENTE APLICADAS NO CONTROLE  
DE *ANTHONOMUS GRANDIS*, VIA RNA INTERFERENTE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa

Brasília, 2020

Esta tese intitulada “Novas biomoléculas potencialmente aplicadas no controle de *Anthonomus grandis*, via RNA interferente” foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biologia Molecular e avaliado pela banca examinadora abaixo assinada.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas de ética científica.

Tese avaliada em: 15 / 06 / 2020.

### **Banca Examinadora**

---

Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa (Presidente)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – EMBRAPA-CENARGEN

---

Dr. Elíbio Leopoldo Rech  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – EMBRAPA-CENARGEN

---

Dr. Daniele Heloisa Pinheiro  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – EMBRAPA-CENARGEN

---

Dra. Maria Eugênia Lisei de Sá  
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG

---

Dra. Maria Cristina Mattar  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – EMBRAPA-CENARGEN

**Agradecimentos**

Aos meus pais, Sérgio e Edna, em primeiro lugar, pela dedicação e oportunidade de avanço nos estudos, qualidade de vida, por me incentivarem a alcançar uma vida melhor e ser independente através do estudo e honestidade.

Ao meu namorado, Italo, que esteve comigo em todos os momentos, pela compreensão e amor, mesmo quando precisei estar ausente e tão dedicada à minha carreira e estudos, por acreditar em mim.

Aos meus irmãos, Diogo e Ralfe, pelo carinho de irmãos mais velhos e serem meus grandes espelhos nessa vida de conquistas a serem seguidas.

Aos meus amigos que o laboratório e biologia me trouxeram, Hudson, Clídia, Rayssa, Daniela, Mayara, Thuanne, que participaram e compartilharam dessa história, todo apoio nos momentos bons e difíceis.

Aos meus amigos em geral, que mesmo distantes pela correria do dia a dia, dos intensos estudos e trabalho, se mantiveram presentes de alguma forma.

## Resumo Geral

Em insetos, diversas moléculas podem ser estudadas e utilizadas no controle de pragas, como neuropeptídeos, que atuam como hormônios em processos fisiológicos diversos, como atividade muscular, cardíaca, metamorfose, reprodução, entre outros. Estas moléculas agem e são controladas diretamente pela combinação do sistema endócrino e neural. Neste estudo, inicialmente foram avaliados oito neuropeptídeos e/ou receptores de neuropeptídeos distintos do inseto-praga *Anthonomus grandis*, visando a identificação de moléculas alvo para seu controle, incluindo o receptor de hormônio ecdisona (EcR), e o receptor de hormônio precursor de ecdise (ETHR), hormônio adipocinético e seu receptor (AKH/AKHR), hormônio relacionado a AKH/Corazonin e seu receptor (ACP/ACPR) e hormônio alostatina e seu receptor (AST/ASTR). A validação funcional destas moléculas foi realizada, via RNA interferente, em larvas de 3º instar e fêmeas adultas de *A. grandis*. O silenciamento destes genes através do dsRNA, em larvas, resultou em sete genes com letalidade acima de 40%: *EcR*, *ETHR*, *AKH*, *ACP*, *ACPR*, *AST* e *ASTR*. Em fêmeas adultas, o silenciamento destes genes resultou também em setes genes que possuíam mortalidade acima de 40%: *EcR*, *ETHR*, *AKHR*, *ACP*, *ACPR*, *AST* e *ASTR*. Ademais, as toxinas Cry também podem ser uma alternativa de controle de insetos por sua alta especificidade para determinadas espécies ou ordens. Além disto, essas toxinas não são tóxicas para vertebrados, o que é uma vantagem ambiental e alternativa ao uso de inseticidas. Devido a sua utilização no controle de insetos-praga, surgiram também necessidades de entendimento dos mecanismos de sua ação, ligação aos receptores e pontos que podem modular a resistência às toxinas Cry nas mais variadas ordens de insetos ou espécie de alto interesse agrícola. Os receptores de toxina Cry são fundamentais nos estudos do entendimento da toxicidade dessas toxinas, visto que são o elo entre a atividade tóxica ou resistência. Estes receptores estão localizados no intestino dos insetos e recentemente com a técnica do RNA interferente foi possível elencar com maiores chances os receptores de determinada toxina e em determinada espécie. No presente estudo também foram selecionados possíveis receptores de toxina Cry1Ba6 e Cry10Aa em *A. grandis*, que mostraram atividade tóxica, especialmente a toxina Cry10Aa, que

é de grande interesse e necessidade. A seleção inicial resultou em 5 candidatos finais. Em seguida, foram produzidas as toxinas Cry em sistema de expressão heterólogo *E. coli*, com distintas construções e alterações, mas que não obteve sucesso pela baixa quantidade de toxina resultante, tornando-se inviável. Mesmo sem a toxina para os testes de atividade tóxica e desafio do silenciamento dos candidatos a receptor, o silenciamento destes genes foi testado quanto a letalidade para a dose inicial de 500 ng em larvas de 3º instar. Destes, um se mostrou altamente letal, resultando em mortalidade acima de 90% com 500 ng de dsRNA para o gene *CADERINA* e mesmo em baixa concentração, 5 ng, com mortalidade em torno de 70%, e fenótipo letal de larvas escurecidas não desenvolvidas. Portanto, até o presente momento não foi possível identificar nenhum receptor de toxina Cry10Aa ou Cry1Ba6, mas foi possível identificar diversos neuropeptídeos que demonstraram grande potencial de aplicação no controle de *A. grandis*, e também um possível receptor de toxina Cry, altamente letal, confirmando suas funcionalidades para a sobrevivência e o desenvolvimento desse inseto. Diante de sua importância no desenvolvimento de *A. grandis* e na compreensão da fisiologia desta importante praga, futuramente esses genes poderão ser utilizados junto a ferramentas biotecnológicas mais específicas.

**Palavras-chave:** Bicudo-do-algodoeiro, neuropeptídeos, tecnologia RNA interferente, controle de insetos-praga, validação funcional,  $\delta$ -endotoxinas, receptor de toxina.

## General Abstract

In insects, several molecules can be studied and used in pest control, such as neuropeptides, which act as hormones in different physiological processes, such as muscle, cardiac, metamorphosis, reproduction, among others. These molecules act and are controlled directly by the combination of the endocrine and neural systems. In this study, eight neuropeptides and / or neuropeptide receptors distinct from the pest insect *Anthonomus grandis* were initially evaluated, aiming at the identification of target molecules for their control, including the ecdysone hormone receptor (EcR), and the ecdysis precursor hormone receptor (ETHR), adipokinetic hormone and its receptor (AKH / AKHR), hormone related to AKH / Corazonin and its receptor (ACP / ACPR) and hormone alarostatatin and its receptor (AST / ASTR). The functional validation of these molecules was performed, via interfering RNA, in 3rd instar larvae and adult *A. grandis* females. The silencing of these genes through dsRNA, in larvae, resulted in seven genes with lethality above 40%: EcR, ETHR, AKH, ACP, ACPR, AST and ASTR. In adult females, the silencing of these genes also resulted in seven genes that had mortality above 40%: EcR, ETHR, AKHR, ACP, ACPR, AST and ASTR. In addition, Cry toxins can also be an alternative to insect control due to their high specificity for certain species or orders. In addition, these toxins are not toxic to vertebrates, which is an environmental advantage and an alternative to the use of insecticides. Due to its use in the control of insect pests, there were also needs to understand the mechanisms of its action, connection to receptors and points that can modulate resistance to Cry toxins in the most varied orders of insects or species of high agricultural interest. Cry toxin receptors are essential in studies to understand the toxicity of these toxins, since they are the link between toxic activity or resistance. These receptors are located in the intestine of insects and recently with the interfering RNA technique it was possible to list the receptors of a certain toxin and in a specific species with greater chances. In the present study, possible receptors for toxin Cry1Ba6 and Cry10Aa in *A. grandis* were also selected, which showed toxic activity, especially the toxin Cry10Aa, which is of great interest and need. The initial selection resulted in 5 final candidates. Then, the Cry toxins were produced in a heterologous *E. coli* expression system, with different constructions and alterations, but which was not successful due to the

resulting low amount of toxin, making it unfeasible. Even without the toxin for the tests of toxic activity and challenge of silencing the candidate candidates, the silencing of these genes was tested for lethality for the initial dose of 500 ng in 3rd instar larvae. Of these, one proved to be highly lethal, resulting in mortality above 90% with 500 ng of dsRNA for the CADERINA gene and even in low concentration, 5 ng, with mortality around 70%, and lethal phenotype of undeveloped black larvae. Therefore, up to the present moment it has not been possible to identify any Cry10Aa or Cry1Ba6 toxin receptor, but it has been possible to identify several neuropeptides that have shown great potential for application in the control of *A. grandis*, as well as a possible Cry toxin receptor, highly lethal, confirming its functionalities for the survival and development of this insect. In view of its importance in the development of *A. grandis* and in the understanding of the physiology of this important pest, in the future these genes may be used together with more specific biotechnological tools.

**Keywords:** Cotton Boll Weevil, neuropeptides, interfering RNA technology, insect-prague control, functional validation,  $\delta$ -endotoxins, toxin receptor.

## **Lista de figuras**

### **Introdução Geral**

**Figura 1.** Ciclo de vida do *Anthonomus grandis* em botão floral do algodoeiro.

**Figura 2.** O mecanismo de RNAi, via dsRNA ou hpRNA.

### **Capítulo I**

**Figura 3.** Esquema geral do sistema endócrino e células secretoras de insetos.

**Figura 4.** Esquema didático da síntese e processamento de hormônios em insetos.

**Figura 5.** Esquema do sistema digestório em insetos e importantes estruturas associadas.

**Figura 6.** Mecanismo de ação do neuropeptídeo AKH ao se ligar ao seu receptor, AKHR.

**Figura 7.** Presença de sistemas de sinalização AKH/ ACP/ Corazonin em diferentes espécies de artrópodes.

**Figura 8.** Microinjeção em larva de 3<sup>o</sup> ínstar de *A. grandis*, na região dorsal posterior, utilizando seringa Hamilton 10 uL.

**Figura 9.** Microinjeção em inseto adulto de *A. grandis*, na região dorsal posterior, utilizando seringa Hamilton 10 uL.

**Figura 10.** Desenho esquemático da região do gene *EcR* de *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA.

**Figura 11.** Desenho esquemático da região do gene *ETHR* de *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA.

**Figura 12.** Desenho esquemático da região do gene *AKH* de *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA.

**Figura 13.** Desenho esquemático da região do gene *AKHR* de *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA.

**Figura 14.** Desenho esquemático da região do gene *ACP* de *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA.

**Figura 15.** Desenho esquemático da região do gene *ACPR* de *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA.

**Figura 16.** Desenho esquemático da região do gene *AST* de *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA.

**Figura 17.** Desenho esquemático da região do gene *ASTR* de *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA.

**Figura 18.** Expressão relativa dos transcritos dos genes *EcR* (A) e *ETHR* (B) durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*.

**Figura 19.** Expressão relativa do transcrito do gene *AKH* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*.

**Figura 20.** Expressão relativa do transcrito do gene *AKHR* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*.

**Figura 21.** Expressão relativa do transcrito do gene *ACP* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*.

**Figura 22.** Expressão relativa do transcrito do gene *ACPR* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*.

**Figura 23.** Expressão relativa do transcrito do gene *AST* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*.

**Figura 24.** Expressão relativa do transcrito do gene *ASTR* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*.

**Figura 25.** Síntese do dsRNA de *EcR* e *ETHR*.

**Figura 26.** Síntese do dsRNA de *AKH* e *AKHR*.

**Figura 27.** Síntese do dsRNA de *ACP* e *ACPR*.

**Figura 28.** Síntese do dsRNA de *AST* e *ASTR*.

**Figura 29.** Mortalidade de larvas de 3º instar de *A. grandis* após microinjeção com 500 ng de dsRNA para os genes *EcR* e *ETHR* (A) e caracterização fenotípica dos insetos sobreviventes (B).

**Figura 30.** Fenótipos de insetos de *A. grandis* após microinjeção de dsRNA 500 ng em larvas de 3<sup>o</sup> ínstar.

**Figura 31.** Mortalidade de larvas de 3<sup>o</sup> ínstar de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para os genes *AKH* e *AKHR*.

**Figura 32.** Morfologia externa dos insetos de *A. grandis* após microinjeção de dsRNA para o gene *AKH* em larvas de 3<sup>o</sup> ínstar.

**Figura 33.** Mortalidade de larvas de 3<sup>o</sup> ínstar de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA de *ACP* e *ACPR*.

**Figura 34.** Morfologia externa dos insetos de *A. grandis* após microinjeção de dsRNA para o gene *ACP* em larvas de 3<sup>o</sup> ínstar.

**Figura 35.** Morfologia externa dos insetos de *A. grandis* após microinjeção de dsRNA para o gene *ACPR* em larvas de 3<sup>o</sup> ínstar.

**Figura 36.** Mortalidade de larvas de 3<sup>o</sup> ínstar de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para os genes *AST* e *ASTR*.

**Figura 37.** Morfologia externa dos insetos de *A. grandis* após microinjeção de dsRNA para o gene *AST* em larvas de 3<sup>o</sup> ínstar.

**Figura 38.** Níveis de expressão relativa de *EcR* (A) e *ETHR* (B) em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500 ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para os genes *EcR* e *ETHR* em larva de 3<sup>o</sup> ínstar.

**Figura 39.** Níveis de expressão relativa do gene de *AKH* em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500 ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para o gene *AKH* em larva de 3<sup>o</sup> ínstar.

**Figura 40.** Mortalidade de fêmeas adultas de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene de *EcR* e *ETHR*.

**Figura 41.** Mortalidade de fêmeas adultas de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene de *AKH* e *AKHR*.

**Figura 42.** Mortalidade de fêmeas adultas de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene de *ACP* e *ACPR*.

**Figura 43.** Mortalidade de fêmeas adultas de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene de *AST* e *ASTR*.

**Figura 44.** Níveis de expressão relativa de *EcR* e *ETHR* em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500 ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para o gene de *EcR* (A) e *ETHR* (B) em fêmeas adultas.

**Figura 45.** Níveis de expressão relativa dos genes *EcR* e *ETHR* em fêmeas de *A. grandis* 12, 24, 36 e 48 horas após emergência.

**Figura 46.** Níveis de expressão relativa do gene *AKH* em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500 ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para o gene *AKH* em fêmeas adultas.

**Figura 47.** Esquema didático hipotético da organização dos neuropeptídeos/receptores de neuropeptídeos de *A. grandis* avaliados neste estudo, nas diferentes divisões da ecdise: pré-ecdise, ecdise e pós-ecdise.

## **Capítulo II**

**Figura 48.** Esquema da atividade das variadas toxinas Cry oriundas de Bt em invertebrados, incluindo diferentes ordens de insetos, e em células cancerígenas humanas.

**Figura 49.** Estrutura primária e terciária de toxinas Cry.

**Figura 50.** Mecanismo de ação de toxinas Cry.

**Figura 51.** Mecanismo de ligação de toxinas Cry aos receptores no epitélio do intestino de insetos.

**Figura 52.** Mapa do vetor de expressão pET24-a contendo o gene da pró-toxina Cry1Ba6.

**Figura 53.** Mapa do vetor de expressão pET24-a contendo o gene da pró-toxina Cry10Aa.

**Figura 54.** Mapa do vetor de expressão pET32-a contendo o gene da pró-toxina Cry10Aa.

**Figura 55.** SDS – PAGE das expressões teste para toxinas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa em diferentes temperaturas.

**Figura 56.** Western Blot das proteínas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa utilizando o anticorpo Anti-his.

**Figura 57.** SDS – PAGE dos testes de solubilização da toxina recombinante Cry10Aa nos diferentes vetores, em diferentes soluções.

**Figura 58.** Análise em gel de agarose 1% de moléculas de dsRNAs sintetizadas para os genes *SIMPORTADOR*, *CADERINA*, *ADAM*, *ALP* e *APN*.

**Figura 59.** Expressão relativa do transcrito do gene *CADERINA* durante as diferentes fases do desenvolvimento de *A. grandis*.

**Figura 60.** Mortalidade de larvas de 3º instar de *A. grandis* microinjetadas com diferentes doses de dsRNA para o gene *CADERINA* (dsRNA *CAD*) (500 ng, 50 ng e 5 ng), em relação ao controle dsRNA *GUS*.

**Figura 61.** Fenótipo observado em larvas de 3º instar de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene *CADERINA* (dsRNA *CAD*) comparado ao controle (dsRNA *GUS*).

**Figura 62.** Níveis de expressão relativa do gene *CADERINA* em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para o gene *CAD* em larvas de 3º instar.

**Figura 63.** Esquema didático da validação dos candidatos a receptor de toxinas Cry via RNA interferente em *A. grandis*.

## **Lista de tabelas**

### **Capítulo I**

**Tabela 1.** Sequência dos primers dos neuropeptídeos e/ou receptores de neuropeptídeos utilizados para PCR e RT-qPCR.

**Tabela 2.** Esquema didático dos genes de neuropeptídeos e/ou receptores de neuropeptídeos validados no presente estudo.

### **Capítulo II**

**Tabela 3.** Sequência dos primers dos receptores de toxina Cry utilizados para síntese do dsRNA e RT-PCR.

**Tabela 4.** Esquema didático dos genes de receptores de toxina Cry validados no presente estudo.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução geral.....</b>	<b>1</b>
1.1. A cultura do algodão.....	1
1.2. O <i>Anthonomus grandis</i> .....	3
1.3. O Controle do <i>A. grandis</i> .....	6
1.4. RNA interferente, uma alternativa no controle de insetos-praga.....	8
1.5. Genômica funcional aplicada a insetos.....	12
<b>Capítulo I: Validação funcional de neuropeptídeos e seus receptores de <i>Anthonomus grandis</i>, via RNA interferente, visando aplicação biotecnológica</b>	
<b>2. Conhecendo o sistema endócrino de insetos.....</b>	<b>20</b>
2.1. Os neuropeptídeos de insetos.....	21
2.2. Hormônio Ecdisona (Ec) e Receptor de Hormônio Ecdisona (EcR) .....	23
2.3. Hormônio Precursor de Ecdise (ETH) e Receptor de Hormônio Precursor de Ecdise (ETHR).....	25
2.4. Hormônio Adipocinético (AKH) e Receptor de Hormônio Adipocinético (AKHR)	27
2.5. Hormônio Peptídeo Relacionado a AKH/Corazonin (ACP) e Receptor de Hormônio Peptídeo Relacionado a AKH/Corazonin (ACPR).....	31
2.6. Hormônio Alatostatina (AST) e Receptor de Hormônio Alatostatina (ASTR).....	33
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>37</b>
3.1. Objetivos específicos.....	37
<b>4. Material e métodos.....</b>	<b>38</b>
4.1. Obtenção dos fragmentos gênicos de neuropeptídeos e seus receptores de <i>A. grandis</i> .....	38
4.2. Extração de RNA e síntese de cDNA – fases do desenvolvimento .....	40
4.3. Quantificação relativa de transcritos dos genes estudados durante o desenvolvimento de <i>A. grandis</i> .....	40
4.4. Clonagem gênica.....	41
4.5. Produção de dsRNA.....	42
4.6. Criação de insetos.....	43
4.7. Bioensaios.....	44
4.7.1. Bioensaio com larva de 3º ínstar de <i>A. grandis</i> .....	44
4.7.2. Bioensaio com adulto de <i>A. grandis</i> .....	45

4.8. Avaliação molecular da administração dos dsRNAs em <i>A. grandis</i> .....	46
4.9. Avaliação das possíveis alterações morfofisiológicas causadas pela administração dos dsRNAs em <i>A. grandis</i> .....	46
4.10. Análise estatística dos dados.....	47
<b>5. Resultados.....</b>	<b>48</b>
5.1. Identificação dos genes de neuropeptídeos e/ou receptores de neuropeptídeos de <i>A. grandis</i> .....	48
5.2. Expressão relativa dos transcritos durante o desenvolvimento de <i>A. grandis</i> .....	53
5.3. Síntese dos dsRNAs.....	58
5.4. Efeito da administração dos dsRNAs em larvas de <i>A. grandis</i> .....	61
5.4.1. Análise para os genes <i>EcR</i> e <i>ETHR</i> .....	61
5.4.2. Análises para os genes <i>AKH</i> e <i>AKHR</i> .....	64
5.4.3. Análises para os genes <i>ACP</i> e <i>ACPR</i> .....	65
5.4.4. Análises para os genes <i>AST</i> e <i>ASTR</i> .....	67
5.5. Avaliação molecular da administração do dsRNA – efeito da microinjeção do dsRNA na expressão gênica em larvas de <i>A. grandis</i> .....	69
5.5.1. Análises para os genes <i>EcR</i> e <i>ETHR</i> .....	69
5.5.2. Análises para o gene <i>AKH</i> .....	71
5.6. Efeito da microinjeção do dsRNA em fêmeas adultas de <i>A. grandis</i> .....	71
5.6.1. Análises para os genes <i>EcR</i> e <i>ETHR</i> .....	71
5.6.2. Análises para os genes <i>AKH</i> e <i>AKHR</i> .....	72
5.6.3. Análises para os genes <i>ACP</i> e <i>ACPR</i> .....	73
5.6.4. Análises para os genes <i>AST</i> e <i>ASTR</i> .....	73
5.7. Avaliação molecular da administração do dsRNA – efeito da microinjeção do dsRNA na expressão gênica de fêmeas adultas de <i>A. grandis</i> .....	74
5.7.1. Análises para os genes <i>EcR</i> e <i>ETHR</i> .....	74
5.7.2. Análises para o gene <i>AKH</i> .....	77
<b>6. Discussão.....</b>	<b>78</b>
<b>7. Conclusões e perspectivas.....</b>	<b>90</b>
<b>Capítulo II: Busca e validação de potenciais receptores das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa no intestino de <i>Anthonomus grandis</i>, via RNA interferente</b>	

<b>8. Introdução.....</b>	<b>96</b>
8.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) e toxinas Cry.....	96
8.2. Estrutura das toxinas Cry.....	99
8.3. Mecanismo de ação.....	100
8.4. Especificidade das toxinas Cry e benefícios como bioinseticida.....	102
8.5. Receptores de toxinas Cry.....	103
8.6. Toxinas Cry: a alternativa bioinseticida.....	106
<b>9. Objetivos.....</b>	<b>108</b>
9.1. Objetivos específicos.....	108
<b>10. Materiais e métodos.....</b>	<b>109</b>
10.1. Expressão heteróloga das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa.....	109
10.1.1. Plasmídeo de expressão pET24-a contendo o gene da toxina Cry1Ba6.....	109
10.1.2. Plasmídeo de expressão pET24-acontendo o gene da toxina Cry10Aa.....	110
10.1.3. Plasmídeo de expressão pET32-acontendo o gene da toxina Cry10Aa.....	111
10.1.4. Expressão heteróloga das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa em <i>E. coli</i> .....	112
10.1.5. Western blot da expressão heteróloga das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa.....	113
10.1.6. Solubilização das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa.....	113
10.2. Silenciamento gênico de candidatos a receptor de toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa via RNAi.....	114
10.2.1. Obtenção dos fragmentos gênicos candidatos a receptor de toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa.....	114
10.2.2. Clonagem gênica.....	115
10.2.3. Extração de RNA e síntese de cDNA – todas as fases de <i>A. grandis</i> .....	116
10.2.4. Produção de dsRNA.....	116
10.2.5. Teste da dose não letal para o silenciamento gênico.....	117
10.2.6. Quantificação relativa de transcritos do gene <i>CADERINA</i> estudado durante o desenvolvimento de <i>A. grandis</i> .....	117
10.2.7. Avaliação molecular da administração do dsRNA <i>CAD</i> em <i>A. grandis</i> e possíveis alterações morfológicas.....	118
10.2.8. Análise estatística dos dados.....	118
<b>11. Resultados.....</b>	<b>119</b>
11.1.1. Perfil de expressão das toxinas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa expressas em <i>E. coli</i> .....	119

11.1.2. Western blot das toxinas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa expressas em <i>E. coli</i> .....	120
11.1.3. Teste de solubilização da toxina recombinante Cry10Aa expressa em <i>E. coli</i> .....	120
11.1.4. Seleção de genes candidatos a receptores de toxina Cry1Ba6 e Cry10Aa....	121
11.1.5. Amplificação dos dsRNAs dos receptores candidatos.....	123
11.1.6. Silenciamento dos receptores candidatos e teste de dose não letal.....	123
11.1.7. Silenciamento gênico do gene selecionado de <i>CADERINA</i> em <i>A. grandis</i> ....	124
<b>12. Discussão.....</b>	<b>128</b>
<b>13. Conclusões e perspectivas.....</b>	<b>133</b>
<b>14. Bibliografia.....</b>	<b>134</b>
<b>15. Anexo I – Produção científica.....</b>	<b>164</b>

## 1. Introdução geral

### 1.1. A cultura do algodão

Existem mais de 50 espécies de algodoeiro, e dentre as mais cultivadas está a espécie *Gossypium hirsutum* L., com extensas áreas de cultivo mundial e grande volume de produção. A origem desta planta é africana se espalhando pelo mundo a partir da sua domesticação na Arábia (EMBRAPA, 2004; SOUSA, 2010).

No Brasil, a espécie de algodão mais cultivada é conhecida como algodão herbáceo ou anual. Além disso, outras espécies são também cultivadas no Brasil, incluindo o algodão *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L., mas são exploradas em pequena escala (EMBRAPA, 2004; SOUSA, 2010). O algodoeiro pertence à família das Malváceas, que possuem em seu gênero representantes, como o quiabo e hibisco (CANAL RURAL, 2017).

Em 2019/2020, a produção mundial de algodão colocou a Índia em primeiro lugar, com produção de mais de 6 mil toneladas, seguida pela China, EUA e Brasil. O Brasil ficou em quarto lugar na produção (ABRAPA, 2020). Os dados atualizados das safras de no Brasil mostraram que a região com maior produção foi o Mato Grosso, rendimento de 40% para pluma e 55% caroço. A estimativa atual de produção é de mais de 1.081.500 de toneladas, aumento de 20,3% de área plantada e 11,3% a mais de produção de pluma (ABRAPA, 2020).

A fisiologia da planta do algodão é complexa, e vários eventos podem ocorrer simultaneamente, como por exemplo, a floração e o amadurecimento de frutos, e ambos competem pelos recursos obtidos pela planta. Entre os fatores de suma importância que interferem no ciclo e viabilidade desta planta está a temperatura. A fisiologia demonstra que as estruturas reprodutivas, botões florais e maçãs, se desprendem da planta naturalmente e fatores de interferência negativa, como deficiências nutricionais, acentuam a queda dessas estruturas, e isto é guiado para balancear o gasto energético do organismo (EMBRAPA, 2008; ROSELEM, 2011).

A cultura de algodão necessita de atuação constante no controle de pragas, observação e atuação em outros momentos, como por exemplo, adubação, regulação de crescimento ou maturação. Por conseguinte, seu cultivo é de intensa monitoração e ações para que o plantio seja de qualidade (FACUAL, 2006).

Os produtos, oriundos da cotonicultura, possuem grande importância mundial, principalmente as fibras do algodão, que são de alta demanda para a indústria têxtil (ABRAPA, 2015). São vários os subprodutos oriundos do algodão. O línter é composto pelas fibras curtas que podem ser matéria-prima para produtos rústicos. A proteína do algodão pode ser consumida como suplemento alimentar e são aproveitados do algodoeiro: casca, amêndoa, óleos derivados e outros (EMBRAPA ALGODÃO, 2018). A aplicação dos produtos do algodoeiro é vasta, incluindo tecidos, utilização da celulose produzida pela planta, películas fotográficas, chaves de radiografias, fabricação de sabão, margarina, plásticos e borrachas sintéticas, rações animais, e até mesmo na fabricação de explosivos (EMBRAPA, 2004).

A cotonicultura brasileira possui uma trajetória complexa, tendo sido impulsionada inicialmente para atender às demandas da indústria têxtil externa, principalmente Inglaterra e Portugal. A produção brasileira se iniciou no Nordeste - especificamente no Maranhão - e, posteriormente, outros estados se tornaram produtores - como São Paulo -, havendo alternâncias de períodos de produção. O cultivo primário era de característica familiar e se transformou em industrial e tecnológico, como ocorreu na região do Cerrado (KASSAB, 1983; COSTA; BUENO, 2004; IMAMat, 2015). Em 1930, após a decadência do café, São Paulo passou a ser o maior produtor de algodão no Brasil, impulsionado por incentivos de inúmeros investimentos públicos e privados. Posteriormente em 1960, o Paraná também ganhou grande espaço na cotonicultura e o desenvolvimento desse cultivo nos diversos estados avançou bastante até 1980.

A cotonicultura brasileira e seus produtos comercializados são extremamente importantes desde a colonização e logo sofreram com pragas (BUAINAIN; BATALHA, 2007). Já foram documentadas inúmeras espécies de insetos capazes de causar danos à cultura do algodão - em torno de 20 - por isso é de suma importância o conhecimento sobre a biologia da planta, e das

pragas que a acometem, para o desenvolvimento de medidas de controle eficazes dessas pragas (FACUAL, 2006). Diferentes pragas podem afetar a produção do algodão, incluindo o pulgão (*Aphis gossypii*), a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*) (KASSAB, 1983; CRUZ; PASSOS, 1985; AZAMBUJA; DEGRANDE, 2014).

Outros insetos que podem afetar a cultura de algodão e manifestam-se durante os cultivos de algodão pelo mundo e no Brasil são os tripés (*Frankliniella schultzei*). Esses insetos possuem uma reprodução acelerada, aparecem na cultivar rapidamente e podem permanecer durante todo o ciclo da planta, levando à paralização do crescimento do algodoeiro. Também o curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*), ataca vorazmente as folhas ou as maçãs, reduzindo drasticamente a produtividade pela maturação prematura da planta. A lagarta-militar (*Spodoptera frugiperda*) pode atacar todas as partes da planta em qualquer estágio do ciclo de vida, e seu controle é dificultado por adentrarem à maçã e a consumirem, não sendo de fácil visualização. (FACUAL, 2006).

Apesar de o algodoeiro poder ser alvo de diversos tipos de insetos, um se destaca, sendo considerado o de maior importância para o algodão no Brasil: o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) (BARBOSA et al., 1986; BUAINAIN; BATALHA, 2007). Os prejuízos causados só para o controle do bicudo-do-algodoeiro podem atingir 250 dólares por hectare e medidas fitossanitárias são necessidades urgentes para seu controle (MAPA, 2017).

## **1.2. O *Anthonomus grandis***

O *A. grandis* foi percebido pela primeira vez em 1843, no México, por Boheman, e após anos ficou claro que este inseto é a maior praga da cultura de algodão. Devido à proximidade com a fronteira dos EUA, posteriormente em 1892, também se detectou sua presença em culturas americanas (BASTOS et al., 2005). Em 1949, a América Latina também presenciou o inseto em suas lavouras de algodão, na região da Venezuela (BRANDÃO; LACA-BUENDIA, 1985).

No Brasil, este inseto se disseminou com sucesso por diversas regiões, tendo sido identificado, inicialmente, em 1983, em plantações de algodão na região de Campinas-SP, próximo ao aeroporto de Viracopos, e se alastrou rapidamente para outras áreas produtoras de algodão, sendo observado também nas plantações nordestinas da Paraíba e Pernambuco (BASTOS et al., 2005; AZAMBUJA; DEGRANDE, 2014). Os insetos encontrados no Brasil foram analisados geneticamente quanto à origem em relação aos dos outros países, por meio da comparação do DNA mitocondrial e essas populações brasileiras mostraram maior semelhança às dos Estados Unidos (CONFALONIERI et al., 2000).

Com a constatação de que o *A. grandis* estava disseminado entre as plantações algodoeiras do Brasil, desde meados da década de 1990, foi elaborado um plano de controle desta praga e erradicação com a utilização de diversas técnicas e ferramentas, mas o problema não era de fácil controle (SILVA NETO, 1987). A pesquisa associada à agricultura tornou viável a cotonicultura em diversas regiões brasileiras, incluindo no Cerrado. Os incentivos fiscais, atuação do Estado e união dos produtores em associações locais e inter-regionais foram determinantes para a manutenção e o desenvolvimento deste tipo de produção e no controle do bicudo-do-algodoeiro. (IMAmt, 2015).

Atualmente, no Brasil, ainda permanece a necessidade do controle constante do bicudo-do-algodoeiro na cotonicultura. Na Bahia, durante o período entre 2017 e 2018, foram realizadas ações para o combate do bicudo-do-algodoeiro na região, que consistiu em diversas medidas de prevenção, como: treinamento dos produtores, eliminação de tiguera em rodovias e rotação de cultura, visando uma produção de qualidade e com menos perdas (ABAPA, 2018). Devido ao rápido desenvolvimento do inseto, sem que haja controle os prejuízos podem chegar a 100% da produção (FONSECA et al., 2011; GABRIEL, 2016).

O bicudo-do-algodoeiro é um inseto que pertence a ordem Coleoptera, mede em torno de 7mm, de coloração castanha, rostró bastante alongado e um par de espinhos nas patas dianteiras (GALLO et al., 2002). Seu ciclo de vida (período entre ovo e adulto) varia entre 24 a 35 dias, a depender das condições ambientais. Os ovos depositados pelas fêmeas são de formato elíptico, medindo

em torno de 1mm e a eclosão da larva de 1º ínstar ocorre entre 2 a 4 dias. A larva apresenta formato curculioniforme e irá passar por três ínstaras larvais, com duração total em torno de 12 dias, período de alimentação intensa para acúmulo de reservas que serão utilizadas na metamorfose. A fase pupal pode perdurar até 6 dias. Neste período não há alimentação e ocorre metamorfose para transição à adulto. Os adultos emergem do botão floral e sua longevidade pode chegar até 40 dias (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida do *Anthonomus grandis* em botão floral do algodão. O Estágio de ovo dura entre 2 a 4 dias. Após a eclosão, o desenvolvimento larval dura em média 12 dias. Em seguida, o estágio pupal, com duração de 2 a 6 dias, de onde emerge o adulto, pode apresentar longevidade de 20 a 40 dias. Imagem adaptada ao conteúdo descrito em GALLO *et al.*, (2002). Disponível em: [https://pt.slideshare.net/Intacta/manual-de-pragas-2015?from\\_action=save](https://pt.slideshare.net/Intacta/manual-de-pragas-2015?from_action=save) Acessado em 01 de Outubro de 2019.

O ciclo de vida deste inseto está intimamente relacionado com a temperatura, reduzindo o período de incubação do ovo e estágio pupal em temperaturas mais altas, em torno de 30 °C. Além da temperatura, a umidade também é um fator intrínseco para sua sobrevivência (AZAMBUJA; DEGRANDE, 2014).

As fêmeas de *A. grandis* depositam os ovos preferencialmente nos botões florais, mas também nas maçãs. Quando ocorre a oviposição nos botões florais,

o hábito endofítico das larvas deste inseto causa a queda do botão floral, e abortamento das flores. Quando a oviposição ocorre na maçã, o desenvolvimento e alimentação da larva interrompem sua abertura normal (GALLO et al., 2002).

As lavouras de algodão são atacadas pelo *A. grandis* a partir do início da floração, continuando até o término do ciclo da cultura. No período de entressafra, estes insetos migram para abrigos naturais, podendo permanecer em diapausa por até 180 dias, retornando no próximo ciclo da cultura. Isto significa que há uma redução na condição metabólica, sustentada, principalmente, pelo tecido adiposo do inseto, que o mantém vivo num estado semelhante ao de hibernação. (GALLO et al., 2002; GABRIEL, 2016). Além disso, plantas da família Malvaceae, amplamente distribuídas pela América do Sul, com mais de dois mil representantes, são hospedeiras onde o inseto pode se desenvolver (SANTOS; SANTOS, 1997; GABRIEL, 2016).

### **1.3. O controle do *A. grandis***

Muitas metodologias podem ser aplicadas ao controle do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. Ao nível comportamental, pode-se utilizar feromônios sintéticos, como o *glandure*, que atrai os insetos e é utilizado como armadilhas de atração, captura e monitoramento. As armadilhas de feromônio são mais adequadas para utilização no período de entressafra, visando a fase de reprodução intensa do inseto (AZAMBUJA; DEGRANDE, 2014).

O controle cultural prioriza o manejo em todas as áreas de plantio, associando diferentes estratégias, como por exemplo, precocidade das plantas, plantio em tempos regulares, retirada das soqueiras e aplicação de inseticidas nas bordaduras. O controle biológico busca a utilização de parasitoides contra *A. grandis*, assim como a utilização de predadores e patógenos. Todas estas estratégias buscam viabilizar a redução da utilização de agroquímicos e aumentar o rendimento da produção (AZAMBUJA; DEGRANDE, 2014).

Diversos inseticidas podem ser utilizados no controle de *A. grandis*, mas devido ao hábito endofítico dessa espécie, é necessária a aplicação de maior

quantidade de produto e isto eleva bastante os custos da produção. Também há outros riscos decorrentes do uso de agroquímicos, como por exemplo, ressurgência e aparecimento de novas pragas resistentes, ou surtos de pragas secundárias (GALLO et al., 2002).

Novos inseticidas são testados visando o controle do *A. grandis*, e recentemente foi relatado que o Kaiso Sorbie (Lambda-Cialotrina) pode ser uma nova alternativa no combate a este inseto. Foi solicitada a sua autorização na Secretaria de Defesa Agropecuária no final do ano de 2017, mas devido a sua alta toxicidade e por ser um produto altamente perigoso, deve ser usado com cautela (AGROLINK, 2017).

O controle do *A. grandis* é dificultado por vários fatores, dentre os quais estão as fontes alternativas de alimento para o bicudo durante o período de entressafra do algodão, plantas transgênicas com restos culturais não eliminados no campo, áreas de proteção ambientais permanentes (UPP's) contendo plantas hospedeiras, e onde não é possível a aplicação de produtos inseticidas por consequência de flora e fauna endêmicos (IMA, 2015). As condições ecológicas no Brasil, sem invernos rigorosos, como ocorre nos Estados Unidos, também favorece a continuidade do ciclo de vida do inseto (AZAMBUJA; DEGRANDE, 2014).

O controle químico possui eficiência restrita ao estágio de adulto desta espécie, visto o desenvolvimento do inseto dentro das estruturas da planta, hábito endofítico. Além disso, formas de controle biológico, como predadores naturais e patógenos, também podem ser muito afetados pelas aplicações de inseticidas. Portanto, deve-se utilizar inseticidas seletivos e em períodos fora do estabelecimento desta fauna benéfica que pode auxiliar no controle do bicudo (GABRIEL, 2016).

O *A. grandis* foi erradicado com sucesso nos Estados Unidos devido a implementação interligada de vários programas nos seus estados (CARTER et al., 2001; GABRIEL, 2016). As armadilhas de feromônios foram uma das estratégias utilizadas que garantiram o controle, erradicação e manutenção dos programas já estabelecidos (SAPPINGTON; SPURGEON, 2000). No Brasil, também são utilizadas armadilhas de feromônio nas lavouras de algodão, mas

que isoladamente não são capazes de controlar este inseto-praga a níveis que não causem prejuízos econômicos (GALLO et al., 2002; GABRIEL et al., 2016).

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) do algodoeiro para controle de *A. grandis* utiliza um conjunto de técnicas diversas, podendo ser citada a combinação da poda da planta, aplicação de agroquímicos, capação das plantas em diferentes fases de desenvolvimento e adicional aplicação de cloreto de mepituaat. SOARES et al., (2002) mostraram que foi possível diminuir o número de pulverizações, reduzindo em 50% os custos de produção com defensivos químicos. Entretanto, esta técnica em grandes áreas de cultivo - MIP - não é viável, e as culturas ainda se mostram dependentes da intensa aplicação de inseticidas (AZAMBUJA; DEGRANDE, 2014). A busca por ativos biotecnológicos capazes de controlar o bicudo tem sido constante nos últimos anos. Diferentes estudos demonstraram que toxinas Cry apresentam atividade significativa sobre o *A. grandis* (AGUIAR et al., 2012; OLIVEIRA et al, 2016; RIBEIRO et al, 2017).

#### **1.4. RNA interferente, uma alternativa no controle de insetos-praga**

Em 1998, foi descoberto o RNA interferente (RNAi) em animais, como resultado da administração do RNA, inicialmente como um microRNA (miRNA) (FIRE et al., 1998; WILSON; DOUDNA, 2013). Essa técnica se tornou uma ferramenta de biologia molecular bastante importante que possibilita o estudo da função de genes específicos no desenvolvimento e evolução de diversos organismos e, tem sido aplicada a modelos emergentes e por vários tipos de administração, como alimentação e injeção (PERRIMON et al., 2010).

O RNAi revolucionou a forma de visualizar o papel dos RNAs. Com o entendimento desse processo foi possível observar que junto a proteínas eles são capazes de regular a expressão da informação gênica. Pequenos nucleotídeos, entre 20 e 30, se unem a uma família de proteínas Argonautas e juntos formam uma ribonucleoproteína específica capaz de degradar o RNA mensageiro complementar à sua sequência (WILSON; DOUDNA, 2013). A interferência do RNA pode ocorrer ao nível de tradução ou na estrutura da cromatina.

O silenciamento gênico é um processo natural em organismos eucariotos e sua função está associada a proteção contra infecções virais, induzindo uma resposta para restringir a replicação viral, bloqueio da mobilização de transposons e regulação da expressão de genes endógenos (FIRE et al., 1998; CASTEL; MARTIENSSEN, 2013; BRONKHORST; RIJ, 2014).

Em torno de 5% do genoma humano produz miRNAs, e esses regulam e modulam genes. Processos comuns nos organismos como crescimento, diferenciação e proliferação celular são controlados por RNAi (WILSON; DOUDNA, 2013).

Observou-se, inicialmente, que com a administração de apenas uma das fitas de RNA, *sense* ou *antisense*, era possível silenciar genes específicos. Mais adiante, observou-se que era possível causar também o silenciamento de genes através das duas fitas de RNA (dsRNA), causando aumento de pelo menos dez vezes o silenciamento em relação ao administrado com apenas uma das fitas (FIRE et al., 1998). A exposição de algumas moléculas de dsRNA poderiam desencadear o silenciamento sistemático também na geração F1. Diante disto, posteriormente, surgiu o questionamento se o mecanismo de silenciamento gênico dependente de homologia poderia ter uma origem biológica comum (HANNON, 2002).

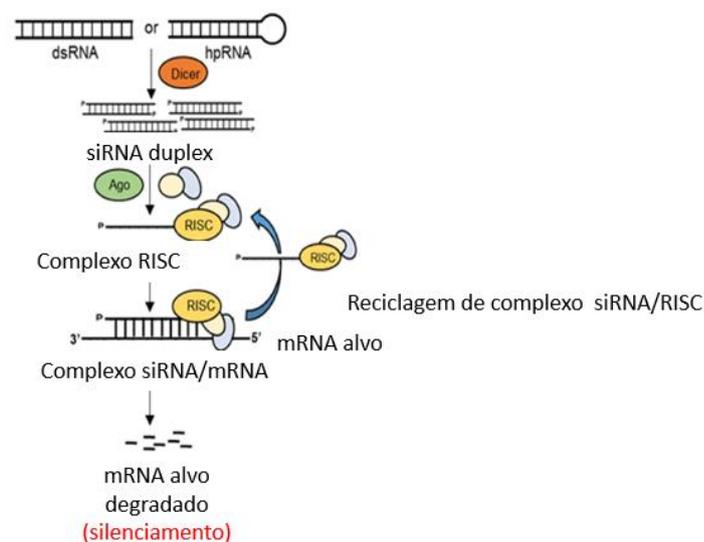
O complexo de transgenes ou replicação de vírus de RNA são capazes de gerar dsRNA e desencadear um silenciamento gênico em plantas, processo no qual elas respondem ao vírus de RNA marcando e destruindo-os, como um mecanismo de resposta imune (RUIZ et al., 1998; BERNSTEIN et al., 2001).

Em geral, o mecanismo do RNAi é conservado, mas há particularidade em determinados organismos, onde o dsRNA é dependente da RNA Polimerase dependente de RNA (RdRP) para sua amplificação (PARK; FIRE, 2007). A RdRP mediando o silenciamento gênico via RNAi não foi identificada em todos os organismos estudados, como por exemplo nos insetos, e acredita-se que sua funcionalidade seja de conversão de transcritos altamente expressos em dsRNA (DALMAY et al., 2000; KURSHEID et al., 2009).

O mecanismo geral do dsRNA se inicia na administração deste, seguida pela clivagem pela enzima Dicer, que pertence ao grupo das endonucleases do

complexo RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA). A Dicer cliva o dsRNA introduzido no organismo em pequenos fragmentos de 20 a 30 pares de bases (pb) – siRNAs – contendo dois nucleotídeos orientadores na extremidade 3', que irão direcionar a degradação do RNA mensageiro (mRNA), e na extremidade 5' do siRNA, que clivam o mRNA entre as bases 10 e 11 (MAJUMDAR et al., 2017; AGRAWAL et al., 2003; VERMEULEN et al., 2005; PRABHA et al., 2015). Os pequenos RNAs (siRNAs) serão então incorporados ao complexo RISC, que selecionará uma das duas fitas, a *antisense* – fita guia, através da ação de uma RNA helicase que abre a fita dupla e degrada a fita que não será utilizada, *sense*. Posteriormente, o complexo RISC conjugado se acopla ao mRNA de sequência homóloga complementar à fita que foi previamente selecionada e a degrada por atividade de enzimas endonucleotídicas, oriundas da atividade de clivagem da Argonata 2, AGO2. Em suma, ocorre a interrupção da tradução daquela proteína específica, através da degradação por enzimas liberadas pelo próprio complexo RISC (MAJUMDAR et al., 2017; AGRAWAL et al., 2003; VERMEULEN et al., 2005; PRABHA et al., 2015).

O mecanismo do RNAi descrito acima pode ser detalhado didaticamente de forma simplificada, conforme MAJUMDAR et al., 2017 (Figura 2).



**Figura 2.** O mecanismo de RNAi via dsRNA (RNA dupla fita) ou hpRNA (RNA hairpin). Esses RNAs são processados pela enzima Dicer em fragmentos menores, originando os siRNAs, e, em seguida, é selecionada apenas uma das fitas. Estes pequenos RNAs se acoplarão ao complexo RISC, que possui a enzima Argonata e, o mRNA complementar ao siRNA será degradado por atividade da Argonata. Esquema adaptado de MAJUMDAR et al., 2017.

Em insetos, o dsRNA pode ter origem exógena ou endógena. A endógena é advinda de transposons, sobreposição de transcritos ou RNA de cadeia longa e estruturados. Estes dsRNAs são clivados pela enzima Dicer, mais especificadamente Dicer-2, originando fragmentos entre 21 e 30 nucleotídeos (siRNA) com saliências na extremidade onde está a hidroxila. Co-fatores da Dicer, isoforma PD Loquacious e R2D2 são requisitados, junto a AGO2. A Dicer então interage com a proteína Arsênico 2 (Ars2) para processar o dsRNA e eliminar uma das cadeias da dupla fita e requisita a endonuclease AGO2 e o complexo C3PO (Componente 3 do Promotor RISC) para clivagem. A fita guia é metilada por uma RNA metiltransferase (DmHen1) e, a partir desse momento, possui capacidade para desencadear o silenciamento gênico de seu alvo pela atividade da AGO2 (BRONKHORST; RIJ, 2014).

A aplicação do RNAi voltada para insetos pode ter atuação apenas em células locais onde foi internalizado o dsRNA, restringindo o silenciamento gênico apenas nessas células, sendo a forma mais relatada de atuação do mecanismo. Além disto, pode ocorrer o efeito sistêmico, onde o dsRNA se espalha pelos tecidos e pode causar silenciamento gênico em diferentes células alvo (VOGEL et al., 2019; HUVENNE; SMAGGHE, 2010).

A genômica funcional é uma das possibilidades de aplicação direta do RNAi, pois a partir de dados genômicos é possível determinar a função de genes específicos através de *knockdown*. Além disso, a genômica funcional pode ser aplicada visando diversos objetivos como tratamento contra oncogenes, doenças virais e áreas de saúde humana, através da redução da expressão gênica de alvos de interesse. Além disso, há inúmeras outras possibilidades, devido a flexibilidade da técnica, até mesmo em necessidades agrícolas emergentes é possível obter o auxílio desta ferramenta para o controle de pragas

que afetem as lavouras (VOGEL et al., 2019; BAUM et al., 2007; ARAKANE et al., 2008; PRABHA et al., 2015; ZOTTI et al., 2018; NIU et al., 2018).

### **1.5. Genômica funcional aplicada a insetos**

A partir da publicação de genomas e transcritomas de vários insetos foi possível identificar genes e estudá-los de maneira mais aprofundada, utilizando a tecnologia do RNAi (MILLER et al., 2008; FIRMINO et al., 2013). Este foi um grande passo para a ciência, visto que possibilita a realização de estudos de genômica funcional além dos insetos modelo, como *Drosophila melanogaster* (VALENNE, 2014).

A eficiência da interferência do RNA em insetos se concentra nas células não autônomas, onde o inseto internaliza o dsRNA e atinge seu gene alvo específico através de alimentação, por exemplo. Posteriormente à introdução, o dsRNA segue para o tecido onde é expresso o gene e o silenciamento se espalha por células e tecidos alvo (HUVENNE; SMAGGHE, 2010; VOGEL et al., 2019). O RNAi também é uma ferramenta que pode ser utilizada além do controle de insetos, como por exemplo, na proteção de insetos polinizadores, protegendo-os de patógenos através da aplicação da ferramenta de RNAi voltada apenas para controle específico desses organismos patogênicos eucariotos (SCOTT et al., 2013).

A utilização de um dsRNA exógeno de interesse para silenciar genes possibilitou o uso dessa ferramenta biotecnológica para aplicação no controle de pragas, infecções por vírus e defesa de insetos de interesse agrícola (VOGEL et al., 2019).

Entre os benefícios do emprego da tecnologia do RNAi está principalmente sua alta especificidade. É importante ressaltar, também, que a metodologia de entrega do dsRNA é muito diversa, podendo ser por via oral, microinjeção, nebulização e até mesmo aplicação tópica (BASNET; KAMBLE, 2018; PERRIMON et al., 2010). Ainda não foi determinado um padrão de metodologia que englobe todos as ordens de insetos, e menos ainda para determinados grupos de genes, devido a lacunas que ainda não foram supridas

em relação ao entendimento total de como o RNAi atua nas mais diversas células e organismos, além de suas peculiaridades (KATOCH et al., 2013; SCOTT et al., 2013).

Dentre as perspectivas para controle de pragas pode-se estudar a exploração de diversos genes com potencial de controle via RNAi como genes que codificam enzimas, a exemplo aminopeptidase N, alostatina, ATPase, arginina quinase, quitina sintase, catalase, além de receptores hormonais, dentre outros. (KOLA et al., 2015). Genes fundamentais ao desenvolvimento de insetos são de grande importância para serem utilizados em estratégias de silenciamento mediado por RNAi, como os neuropeptídeos. Diversos trabalhos têm mostrado que os neuropeptídios, seus receptores e vias hormonais possuem grande potencial de aplicação. Alguns exemplos a serem citados são: o hormônio juvenil (JH) e ecdisona (Ec), que atuam no desenvolvimento e metamorfose e o bursicon (BURS), que atua na esclerotização da cutícula e desenvolvimento das asas (BAI; PALLI, 2010; YU et al., 2014; AREIZA et al., 2015).

Exemplos demonstram a realidade das perspectivas da aplicabilidade do RNAi para o controle de pragas agrícolas, como o inseto *Leptinotarsa decemlineata*, representante da ordem Coleoptera, em que a inserção de uma bactéria recombinante contendo dsRNA causou um elevado índice de mortalidade e retenção no desenvolvimento (ZHU et al., 2011).

O uso de plantas geneticamente modificadas contendo um dsRNA específico mostrou-se bastante promissor, a exemplo a planta de milho transgênica capaz de causar mortalidade em *Diabrotica virgifera*, inseto também da ordem Coleoptera (BAUM et al., 2007; DAVIS-VOGEL et al., 2018). Um outro exemplo mais recente foi a utilização de dsRNA para o gene que codifica o receptor de ecdisona (EcR) em culturas de batatas transgênicas visando o controle do Coleoptera *L. decemlineata* com grande sucesso (HUSSAIN et al., 2019).

Para *A. grandis*, já foram desenvolvidos alguns trabalhos que mostram genes importantes a serem utilizados no controle deste inseto por meio de RNAi,

a exemplo nucleases, vitelogenina, quitina sintase I e lacase (FIRMINO et al. 2013; COELHO et al. 2016; GARCIA et al., 2017; MACEDO et al., 2017).

A maior parte dos estudos sobre neuropeptídeos em coleópteros, que têm sido uma aposta inovadora para controle, envolve principalmente, *Tribolium castaneum* (MARCINIAK et al., 2013; ABDEL-LATIEF; HOFFMAN, 2014). Entretanto, há poucos estudos de validação de neuropeptídios em insetos da família Curculionidae, da qual *A. grandis* faz parte (SOIN et al. 2009).

Visando a aplicação final dos genes potenciais identificados e validados com a ferramenta de RNAi há algumas formas de sua utilização direta na agricultura, por exemplo, aerossóis contendo o dsRNA específico com nanopartículas que pode ser pulverizado nas plantas (THAIRU et al., 2017). Outra abordagem pode ser através de bactérias recombinantes que sejam capazes de produzir o dsRNA específico, sendo posteriormente purificadas e utilizado na planta (ZHU et al., 2011; BENTO et al., 2019).

**CAPÍTULO I – Validação funcional de neuropeptídeos e seus  
receptores de *Anthonomus grandis*, via RNA interferente,  
visando aplicação biotecnológica**

## Resumo

Em insetos, neuropeptídeos atuam como hormônios em processos fisiológicos diversos, incluindo atividade muscular, cardíaca, metamorfose, reprodução, entre outros. Estas moléculas agem e são controladas diretamente pela combinação do sistema endócrino e neural. Neste trabalho foram estudados oito neuropeptídeos e/ou receptores de neuropeptídeos distintos do inseto-praga *A. grandis*, visando a prospecção de genes para o seu controle: o receptor de hormônio ecdisona (*EcR*), o receptor de hormônio precursor de ecdise (*ETHR*), o hormônio adipocinético (*AKH*) e seu receptor (*AKHR*), o hormônio relacionado a *AKH*/Corazonin e seu receptor (*ACP/ACPR*) e o hormônio alostatina (*AST*) e seu receptor (*ASTR*). A validação funcional destas moléculas foi realizada via RNA interferente em larvas de 3º instar e fêmeas adultas de *A. grandis*. A administração de dsRNA para o gene *EcR*, em larvas de 3º instar, resultou em 40% de mortalidade dos insetos microinjetados e nenhum dos insetos sobreviventes atingiu a fase adulta sem alterações morfológicas. O dsRNA para o gene *ETHR* não foi inicialmente letal, mas os sobreviventes apresentaram um fenótipo altamente letal e, apenas 3% de todos os insetos microinjetados se tornaram adultos viáveis. O silenciamento do gene *EcR* resultou em fenótipos variáveis, enquanto os insetos nos quais o gene *ETHR* foi silenciado apresentaram um único fenótipo característico de metamorfose incompleta, um híbrido pupa/adulto. com. Os insetos tratados com dsRNA para o gene *AKH* apresentaram uma mortalidade acima de 80%, e o fenótipo resultante foi similar ao obtido após o silenciamento do gene *ETHR*. Já o silenciamento do receptor do gene *AKH* (*AKHR*) não resultou em mortalidade significativa e fenótipo alterado. Da mesma forma, o silenciamento do gene *ACP* não resultou em mortalidade significativa, mas os insetos apresentaram fenótipo com alterações nas pupas e adultos com malformações nos élitros. Adicionalmente, o silenciamento do gene *ACPR* resultou em 80% de mortalidade e um único fenótipo, pupas com desenvolvimento interrompido. Os efeitos dos silenciamento do gene *AST* foram mortalidade acima de 70% e fenótipos de pupas com desenvolvimento interrompido e larvas com segmentos corporais iniciais aumentados. Já o silenciamento do gene *ACPR* resultou em mortalidade acima de 40%, mas sem alteração de fenótipo. Em fêmeas adultas, o silenciamento dos genes *EcR* e *ETHR* também mostrou que esses transcritos são necessários

para a sobrevivência na fase adulta, resultando em mortalidade acima de 45%. Não houve mortalidade significativa após o silenciamento do gene *AKH* em fêmeas. Em contrapartida, o silenciamento do seu receptor resultou em 40% de mortalidade. A aplicação de dsRNA para os genes *ACP* e *ACPR* resultou em mortalidade acima de 50%. Para o gene *AST*, o silenciamento levou a mortalidade acima de 70%, enquanto para o seu receptor *ASTR* foi de 40%. Em suma, estes transcritos demonstram grande potencial de aplicação no controle do inseto-praga *A. grandis*, confirmando sua funcionalidade para a sobrevivência e desenvolvimento desses insetos. Diante da importância destes neuropeptídeos no desenvolvimento de *A. grandis* e na compreensão da fisiologia desta importante praga, futuramente esses transcritos poderão ser utilizados junto a ferramentas biotecnológicas mais específicas.

**Palavras-chave:** Bicudo-do-algodoeiro, neuropeptídeos, tecnologia RNA interferente, controle de insetos-praga, validação funcional

## **Abstract**

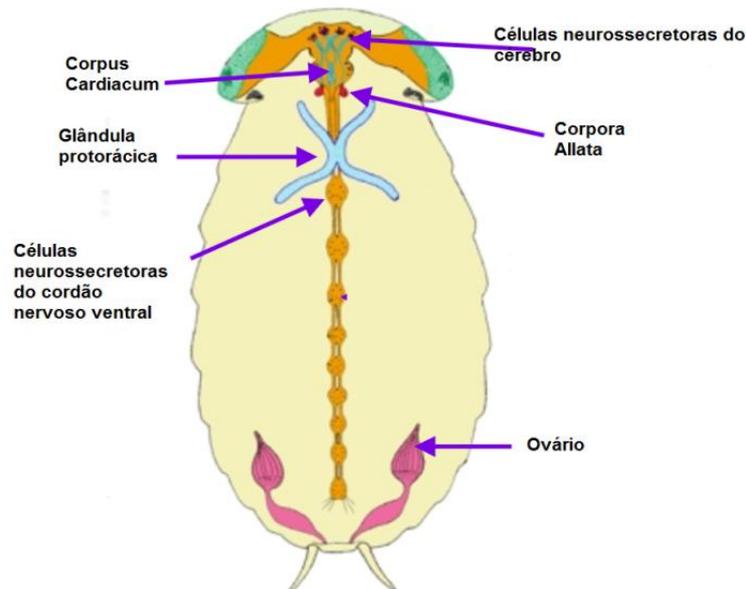
In insects, neuropeptides act as hormones in different physiological processes, including muscle, cardiac, metamorphosis, reproduction, among others. These molecules act and are controlled directly by the combination of the endocrine and neural systems. In this work, eight different neuropeptides and / or neuropeptide receptors from the insect pest *A. grandis* were studied, aiming at prospecting genes for their control: the ecdysone hormone receptor (EcR), the ecdysis precursor hormone receptor (ETHR), the adipokinetic hormone (AKH) and its receptor (AKHR), the hormone related to AKH / Corazonin and its receptor (ACP / ACPR) and the hormone alarostatin (AST) and its receptor (ASTR). The functional validation of these molecules was performed via interfering RNA in 3rd instar larvae and adult *A. grandis* females. The administration of dsRNA for the EcR gene, in 3rd instar larvae, resulted in 40% mortality of microinjected insects and none of the surviving insects reached the adult stage without morphological changes. The dsRNA for the ETHR gene was not initially lethal, but the survivors showed a highly lethal phenotype and only 3% of all microinjected insects became viable adults. The silencing of the EcR gene resulted in variable phenotypes, while the insects in which the ETHR gene was silenced showed a single phenotype characteristic of incomplete metamorphosis, a pupa / adult hybrid. Insects treated with dsRNA for the AKH gene had a mortality rate above 80%, and the resulting phenotype was similar to that obtained after silencing of the ETHR gene. The silencing of the AKH gene receptor (AKHR) did not result in significant mortality and altered phenotype. Likewise, silencing the ACP gene did not result in significant mortality, but the insects showed a phenotype with changes in pupae and adults with malformations in elytra. Additionally, silencing the ACPR gene resulted in 80% mortality and a single phenotype, pupae with interrupted development. The effects of silencing the AST gene were mortality above 70% and pupal phenotypes with interrupted development and larvae with increased initial body segments. The silencing of the ACPR gene, on the other hand, resulted in mortality above 40%, but without alteration in the phenotype. In adult females, silencing the EcR and ETHR genes also showed that these transcripts are necessary for survival in adulthood, resulting in mortality above 45%. There was no significant mortality after silencing

the AKH gene in females. In contrast, the silencing of its receptor resulted in 40% mortality. The application of dsRNA to the ACP and ACPR genes resulted in mortality above 50%. For the AST gene, silencing led to mortality above 70%, while for its ASTR receptor it was 40%. In short, these transcripts demonstrate great potential for application in the control of the insect pest *A. grandis*, confirming its functionality for the survival and development of these insects. Given the importance of these neuropeptides in the development of *A. grandis* and in the understanding of the physiology of this important pest, in the future these transcripts may be used together with more specific biotechnological tools

**Keywords:** Cotton Boll Weevil, neuropeptides, interfering RNA technology, insect-prague control, functional validation

## 2. Conhecendo o sistema endócrino em insetos

Em insetos, o sistema endócrino é interligado ao sistema nervoso, formando centros neuronais, glandulares ou mistos (neuro-glandulares). Os hormônios são sintetizados na forma de peptídeos, em estruturas dentro do sistema nervoso central e periférico (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema geral do sistema endócrino e células neurosecretoras de insetos. São mostradas células neurosecretoras, presentes na região cerebral, *corpus cardiacum*, células neurosecretoras do gânglio subesofágico, *corpus allatum*, glândulas protorácicas células neurosecretoras localizadas no cordão nervoso ventral e ovários. Disponível em: [http://fisioanimal1.blogspot.com.br/2012/12/sistema-endocrino-de-insetos\\_7866.html](http://fisioanimal1.blogspot.com.br/2012/12/sistema-endocrino-de-insetos_7866.html) Acessado em 21 de Fevereiro de 2020.

Grande parte dos hormônios produzidos e secretados em insetos são do tipo neuro-hormônios, compostos por peptídeos pequenos, denominados neuropeptídeos, que regulam inúmeros processos fisiológicos em insetos. Por isso, o sistema hormonal é um sistema de sinalização complexa em insetos, onde os processos vitais são controlados por estas moléculas (GULLAN; CRANSTON, 2014).

O sistema endócrino processa e coordena os hormônios, que são sinais químicos liberados por glândulas endócrinas e transportados pelo sistema circulatório. Em insetos, se ocorresse apenas desta forma seria muito lenta a

difusão até a célula alvo e por isso o sistema nervoso também participa do processo endócrino em insetos, tornando o processo mais rápido (KLOWDEN, 2007).

A ação endócrina no órgão-alvo ocorre por meio da ligação dos neuropeptídeos com receptores específicos de membrana e através da transdução de sinal, resultando em respostas intracelulares. A maioria destes receptores estão acoplados à proteína G. Um receptor pode interagir com mais de um hormônio, como é o caso do Hormônio de Ecdose (EH) (CAERS et al., 2012).

Há diversas células que secretam neuropeptídeos em insetos, como as glândulas protorácicas, *corpora allata* e *corpora cardíaca*. Estas glândulas se concentram na região cefálica e podem se distribuir também ao longo do corpo. As glândulas protorácicas estão localizadas no tórax, próximo a região cefálica, e são responsáveis pela produção de ecdisteróides, como ecdisona. As glândulas *corpora cardíaca* estão localizadas atrás do cérebro e produzem o hormônio adipocinético (AKH) e protociclotrópico (PTTH). A *corpora allata* é encontrada no intestino anterior e produz o hormônio alostatina (AST) e o hormônio juvenil (JH). Há também as células Inka, localizadas nas glândulas epitraqueais, capazes de produzir hormônios relacionados à metamorfose, como hormônio precursor de ecdise (ETH) (GULLAN; CRANSTON, 2014).

## **2.1. Os neuropeptídeos de insetos**

Em 1922, Kopéc, foi o primeiro cientista a sugerir que o sistema nervoso de insetos era capaz de controlar processos de ecdise e metamorfose. Com os avanços científicos foi possível confirmar suas proposições, e que de fato mais do que estes dois processos, o sistema nervoso em insetos participa de inúmeros processos vitais, através de neuropeptídeos. Os dois primeiros neuropeptídeos identificados em artrópodes foram o proctolin e hormônio adipocinético (AKH) (SCHERKENBECK; ZDOBINSKY, 2009).

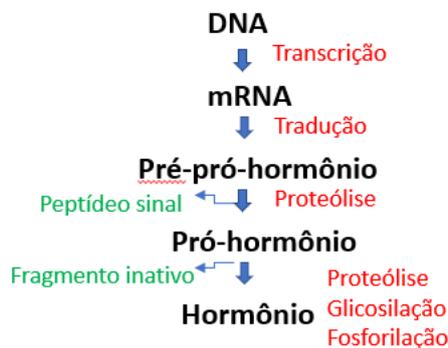
A origem dos neuropeptídeos, de acordo com análises filogenéticas, pode ser oriunda dos primeiros invertebrados, com representantes de Placozoa,

Cnidários (SCHOOFS et al., 2017). Os insetos apresentam uma grande diversidade de neuropeptídeos, alguns podem ser comuns aos vertebrados, como neuropeptídeo F, e outros estão presentes apenas em artrópodes, como os associados à metamorfose (SCHOOFS et al., 2017). Além das estruturas do sistema nervoso que produzem, armazenam ou liberam os neurohormônios, devido a vasta diversidade de neuropeptídeos, ações específicas e tecidos, a natureza fisiológica e interação são mais claras, quando se analisa o processo de interesse separadamente (GILLOTT, 2005).

Neuropeptídeos são pequenos peptídeos bioativos responsáveis por inúmeros processos em insetos, como metamorfose, desenvolvimento, diurese, metabolismo, síntese de hormônios sexuais e até mesmo sono (SCHERKENBECK; ZDOBINKSKY, 2009; HELFRICH-FOSTER, 2018). Além de funções importantes no desenvolvimento dos insetos, alguns neuropeptídeos atuam também no metabolismo de carboidrato e lipídeos, contribuindo para processos importantes, como voo, reprodução, nutrição e atividade locomotora (CHAPMAN, 2013).

A produção de neuropeptídeos ocorre nas células nervosas, na forma de pré-pró-hormônios grandes, que não possuem atividade ainda e passarão por modificações pós-traducionais e processamento por enzimas proteolíticas no retículo endoplasmático, e clivagem das regiões pré e pró-peptídeo. Após o processamento, esses neuropeptídeos ficarão armazenado no axônio, e em seguida serão liberados com a despolarização da célula, conforme descrito didaticamente no esquema adaptado (Figura 4) (KLOWDEN, 2007). A ativação dos receptores de neuropeptídeos pode ocorrer como uma cascata de mensageiros secundários – AMP cíclico, diacilglicerol, cálcio e trifosfato de inositol (BENDENA, 2010).

## Síntese e processamento de hormônios peptídicos em insetos



**Figura 4.** Esquema didático da síntese e processamento de hormônios em insetos. A partir da sequência de DNA que servirá de molde para a transcrição, o mRNA a ser traduzido irá gerar a forma inativa dos hormônios peptídicos (neuropeptídeos) em insetos. Adaptada de KLOWDEN, 2007.

A ação de um neuropeptídeo em uma sua célula-alvo de destino ocorre por meio de receptores específicos, que resultam em modificações fisiológicas. Estes receptores podem apresentar formas distintas e serem expressos em condições celulares e fisiológicas também distintas, não necessariamente estando presente em todos os tipos de tecidos e durante toda o ciclo de vida do inseto, alguns podem variar sua expressão até no momento do dia (CHAPMAN, 2013).

### **2.2. Hormônio Ecdisona (Ec) e Receptor de Hormônio Ecdisona (EcR)**

A ecdisona foi o primeiro hormônio de inseto isolado, em 1954, por Butenandt e Karlson, enquanto estudavam a metamorfose em moscas do gênero *Calliphora* (KARLSON, 1996). A maioria dos ecdisteróides em insetos imaturos são produzidos e secretados pelas glândulas protorácicas, sob a forma 3-dehidroiecdisona (3DE) (VAFOPOULOU; STEEL, 1989, CHAPMAN, 2013).

Quando os insetos chegam a fase adulta, as glândulas protorácicas degeneram, mas a gônada e outros tecidos são capazes de produzir os ecdisteróides, como células neurosecretoras do cérebro e células do folículo em

dípteros (CHAPMAN, 2013). O 3DE é liberado para a hemolinfa e em seguida reduzido a ecdisona ligado a NAD(P)H pela 3 $\beta$ -redutase. A ecdisona é transportada para periferia de tecidos-avos e transformada em 20-hidroxiectdisona (20E) (DAVIES et al., 2006; YAMANAKA et al., 2013).

O ecdisona é um pró-hormônio, sintetizado a partir do colesterol e sua forma ativa é o 20E, que se liga ao citocromo P450 CYP314A1, codificado pelo gene *shade*, da grande família de genes Halloween, identificado em *D. melanogaster* (DE LOOF, 2008). A ação do ecdisona ocorre em picos ao longo do desenvolvimento (VAFOPOULOU; STEEL, 1989; DAVIS et al., 2007).

O nível de ecdisteróides em estágios imaturos aumenta a síntese pelas glândulas, mas em seguida começam a diminuir, assim que ocorre essa elevação. O aumento de ecdisteróides gera a apólise, e as células epidérmicas se preparam para síntese da nova epicutícula. Adiante, com o declínio dos níveis de ecdisteróides, ocorre a produção de quitina e proteínas, que formarão a prócutícula. Na etapa seguinte, tem-se finalmente a ecdise (NIJHOUT, 1994; GARCIA; FERNÁNDEZ, 2012; CHAPMAN, 2013; YU et al., 2017). A ecdise e a metamorfose de insetos são reguladas por ecdisteróides, mas outros hormônios também participam. A partir do aumento de ecdisteróides na hemolinfa, as células da epiderme da cutícula alteram sua síntese de compostos (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2012; YAMANAKA et al., 2013; YU et al., 2017).

O Receptor de Ecdisona (EcR) pertence a uma família de receptores nucleares, correspondendo a fatores de transcrição que podem influenciar domínios após sua ligação (HENRICH, 2005; GONCU et al., 2016; MAZINA et al., 2017).

O primeiro estudo sobre a ecdisona ativa, 20E, e sua ligação ao receptor correspondente foi realizado em *D. melanogaster* (YAO et al., 1992). De acordo com este estudo, 20E se liga ao receptor, que é um heterodímero resultante da transcrição de dois fatores: EcR (Receptor de Ecdisona) e USP (Ultraespiráculo), que é um ortólogo do RXR (Receptor X-retinóide) de vertebrados (YAO et al., 1992).

Além disto, o complexo EcR/USP pode ligar-se ao promotor do gene *let-7-C* depois do pulso de 20E na metamorfose de larva para pupa e isso pode

induzir a transcrição de um grupo de três microRNAs (miR-100, let-7 and miR-125), que estão relacionados à metamorfose que levará a características de adulto (RUBIO; BELLÉS, 2013; CHAWLA; SOKOL, 2012). Este complexo, EcR/USP é ativado por fatores de transcrição controlados por ligantes, funcionando como “interruptores” de genes. A ligação deste receptor ocorre com ecdisteróides ou a elementos de resposta a ecdisteróides (EcREs), disparando a transdução de sinal, que culminará na resposta fisiológica (TRUMAN, 2005).

O receptor de ecdisona pode ter dois ou mais transcritos variantes, anteriormente identificados e estudados em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) e *D. melanogaster* (CRUZ et al., 2006; MELLO et al., 2014). Para a maioria dos insetos foram identificados apenas duas isoformas (A e B1) e ambas são produzidas pelo mesmo locus gênico, diferindo somente quanto ao promotor e *splicing* alternativo (WATANABE et al., 2010). Em *T. castaneum*, a isoforma EcR-A possui função regulatória da expressão de genes que respondem a 20E (TAN; PALLI, 2008). A isoforma EcR-B1 em holometábolos possui mecanismos de regulação da transcrição durante a metamorfose, mas que ainda necessitam de mais estudos (WATANABE et al., 2010).

### **2.3. Hormônio Precursor de Ecdise (ETH) e Receptor de Hormônio Precursor de Ecdise (ETHR)**

O Hormônio Precursor de Ecdise (ETH) é um neuropeptídeo que ativa a ecdise, iniciando o comportamento de contrações específicas, que levarão à liberação da cutícula antiga (ROLLER et al., 2010; SHI et al., 2019). Um dos principais fatores de ativação da ecdise são ETHs, produzidos pelas células Inka, que estão localizadas nas glândulas epitraqueais, descritos pela primeira vez em lepidópteros de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (ZITNAN et al., 2003; ROLLER et al., 2010).

A expressão do gene *ETH* ocorre um a dois dias antes do início da ecdise, que dispara o sinal para o início do processo e queda do nível de ecdisteróides, enquanto outros hormônios são liberados para iniciar o comportamento de ecdise, como hormônio de ecdise (EH) e peptídeo cardioativo de crustáceo (CCAP) (ZITNAN et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2019).

Os genes que codificam para *ETH* podem gerar dois produtos por *splicing* alternativo, ETH-1 e ETH-2, que possuem em comum a região C-terminal e demonstraram diferentes funções e intensidades na ecdise nos diversos estágios de desenvolvimento de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) e *D. melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (PARK et al., 1999; ZITNAN et al., 1999; ZHU et al., 2019). Em mariposas a codificação para *ETH* é conhecida como os produtos PETH e ETH, enquanto em outros insetos ETH-1 e ETH-2, já mencionado anteriormente (CAERS et al., 2012). Ambos iniciam o processo de ecdise por ação direta sobre o sistema nervoso do inseto (PARK et al., 1999, DE OLIVEIRA et al., 2019).

Em baixas concentrações, o ETH é capaz de ativar um segundo gerador de padrões e conduzir os comportamentos de pré-ecdise. Neste momento, ETH estimula a liberação de EH, e dessa forma há um *feedback* positivo entre ETH e EH. Para a ocorrência da ecdise é necessária uma maior liberação de ETH, que é dependente de EH, e o ponto crucial desse mecanismo é a mediação por cGPM (ASUNCION-UCHI et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2019). A região promotora do gene *ETH* contém uma repetição do elemento de resposta ao ecdisona, indicando que a expressão deste gene pode ser controlada diretamente também pelo complexo ecdisteróide-EcR (ZITNAN et al., 2007).

O ETH desencadeia sua ação pela ligação com seus receptores (ETHRs), que irão regular o comportamento de ecdise, diretamente relacionado ao sistema nervoso do inseto (DESHPANDE, 2012). O ETHR é um receptor do tipo acoplado à proteína G, de superfície celular (LAENAERTS et al., 2017; SHI et al., 2017; ZHU et al., 2019).

Sabe-se que são codificados através de *splicing* alternativo do exon 3' dois tipos de receptores que estão acoplados à proteína G, ETHR-A e ETHR-B. Experimentos em *D. melanogaster* sugerem que o ETH é capaz de ser reconhecido pelos dois tipos de receptor, ETHR-A e ETHR-B, enquanto que PETH possui afinidade 10 a 20 vezes mais baixa em relação à ativação dos dois receptores, restringindo-se a algumas fases do desenvolvimento do inseto, como farato, pupa e adulto (IVERSEN et al., 2002, ZITNAN et al., 2007). Estas duas variações de receptor são expressas em diferentes populações de neurônios. ETHR-A é capaz de gerar neuropeptídeos de ação inibitória e excitatória,

respondendo à circulação de ETH na hemolinfa de insetos no evento de ecdise (GILBERT, 2012).

A função do ETHR-B ainda é pouco conhecida. Foi demonstrado que houve um aumento da regulação de cAMP em células expressas com este tipo de receptor (YAMANAKA et al., 2010). DIAO et al., (2015), demonstraram que neurônios de *D. melanogaster* que expressam ETHR-A são recrutados para a ecdise durante todas as fases de desenvolvimento, regulando o comportamento de ecdise e o equilíbrio de líquidos oriundos da muda em pupas. Além disso, foi mostrado que os neurônios que expressam ETHR-B não foram necessários para a ecdise larval, mas foram requeridos para a ecdise de pupa e adulto. Para validar se o *ETH* era requerido de fato para a ecdise, PARK et al., (2002) realizaram microdeleções no locus do neuropeptídeo *ETH* em *D. melanogaster*, e os efeitos incluíram deficiência para desenvolver o novo sistema respiratório e na sequência de comportamentos de ecdise, tendo efeito letal.

#### **2.4. Hormônio Adipocinético (AKH) e Receptor de Hormônio Adipocinético (AKHR)**

O Hormônio Adipocinético (AKH) pertence a uma família de hormônios peptídicos, presente em insetos (MILDE et al., 1995). Esse hormônio foi identificado inicialmente como um fator estimulante para mobilização de lipídeos necessários à atividade locomotora em *Schistocerca gregária* (Orthoptera: Acrididae) e fator hiperglicêmico em *Periplaneta americana* (Blattaria:Blattidae) (KONUMA et al., 2012).

Esse hormônio é um peptídeo pequeno, possuindo em torno de 10 aminoácidos (KONUMA et al., 2012). E é produzido pela *corpora cardíaca*, em células neurosecretoras medianas, localizadas no cérebro de insetos (HORST et al., 1999; KLOWDEN, 2007; CHAPMAN, 2013). Já foram relatadas isoformas distintas de AKH nas diferentes ordens de insetos, além de insetos com mais de uma forma do hormônio, e funções variáveis. Em gafanhotos, por exemplo, já foram relatados três tipos de AKH (KLOWDEN, 2007; LORENZ; GADE, 2009).

Por possuírem diversas ações como neuropeptídeos, as isoformas de AKH podem apresentar outros nomes, como o hormônio hiperglicêmico (HGH), o hormônio hipertralosêmico (HTH, HrTH), o hormônio hiperprolinêmico e quando em crustáceos, hormônio concentrador de pigmento vermelho (RPCH) (LORENZ; GADE, 2009).

As funções do AKH incluem a manutenção nos níveis de lipídeos e carboidratos no estado normal e de privação alimentar (KONUMA et al., 2012). Ademais, liberação do AKH na hemolinfa é bastante relatada para o voo, alterando a mobilização de carboidratos na forma de trealose e lipídeos na forma de sn-1,2-diacilglicerol (DAG) entre hemolinfa e corpos gordurosos, e isso acontece principalmente devido ao triacilglicerol (TAG) enzima como glicogênio fosforilase (KONUMA et al., 2012; CHAPMAN, 2013).

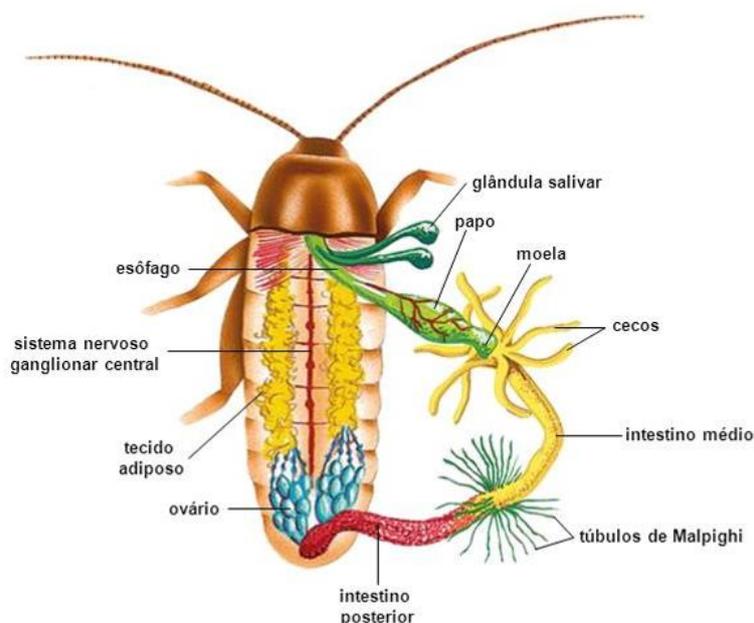
É muito frequente a descrição da funcionalidade do AKH para atividade locomotora e no metabolismo, manutenção da homeostase. Além disso, é importante ressaltar que todos os processos que requisitam energia em grande quantidade dependem da via de mobilização de energia e conseqüentemente do AKH, a exemplo da metamorfose e reprodução (LORENZ; GADE, 2009).

A função do AKH em insetos é análoga ao glucagon e glucorticóides em mamíferos. A atuação do AKH foi mostrada como fundamental no direcionamento da mobilização de energia durante o desenvolvimento e estresse em insetos (GALIKOVA et al., 2015).

Em insetos holometábolos, como os da ordem Coleoptera, não há alimentação durante a fase de metamorfose, por isso o tecido adiposo estoca fontes energéticas para suprir a fase de transição do desenvolvimento até o inseto chegar a fase adulta e poder se alimentar (CHAPMAN, 2013).

O tecido adiposo de insetos está presente em diversos locais, consiste em finas lâminas que geralmente são uniestratificadas, ou nódulos presentes na hemocele e traquéia. Abaixo do exoesqueleto há a gordura corporal parietal e periférica e em torno do intestino há a gordura perivisceral, que se estende desde a região abdominal até a cabeça do inseto. As células do tecido adiposo estão em contato direto com a hemolinfa, o que é essencial para a troca de nutrientes e metabólitos de forma rápida e eficiente (Figura 5).

Em insetos holometábolo, com metamorfose completa, os corpos gordurosos não persistem na transição para fase adulta e se dividem em novas células individualizadas (CHAPMAN, 2013).



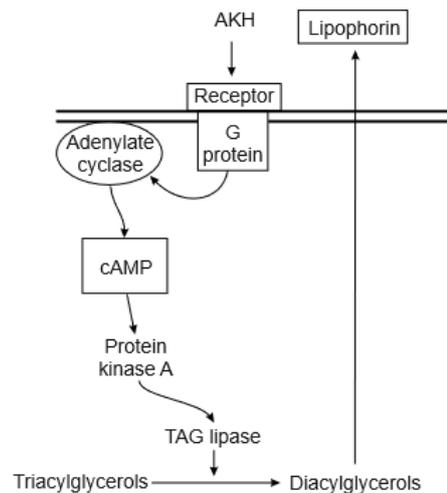
**Figura 5.** Esquema do sistema digestório em inseto e importantes estruturas associadas. O tecido adiposo e outras importantes estruturas, disposto de forma adjacente ao intestino. Esquema adaptado, disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/3187385/> Acessado em 01 de Junho de 2018.

A função do tecido adiposo envolve a síntese de proteínas estruturais ou carboidratos, e produção de energia (GILLOT, 2005). Ademais, vai além das reservas, modulando taxa de crescimento, metamorfose, desenvolvimento de ovos e produção, por exemplo (MIRTH; RIDDIFORD, 2007). A mobilização de reservas do tecido adiposo em insetos ocorre em similaridade com mamíferos. Neste tecido os lipídeos são estocados em forma de gotículas na forma de triacilgliceróis. A enzima triacilglicerol lipase cliva o triacilglicerol e o torna disponível para mobilização via hemolinfa (ATELLA et al., 2012).

No tecido adiposo ocorre também a síntese das proteínas circulantes da hemolinfa, como a vitelogenina, fundamental ao desenvolvimento de ovos e proteínas de diapausa. Foi observado que em insetos da ordem Coleoptera, mesmo em condições desfavoráveis, as proteínas de diapausa e vitelogenina

são sintetizadas. Além disso, carboidratos são armazenados como glicogênio no tecido gorduroso, oriundos de carboidratos ou aminoácidos adquiridos via alimentação, e sua armazenagem é controlada pelos níveis de trealose circulante na hemolinfa, possuindo função crioprotetora e reserva energética rápida (CHAPMAN, 2013).

O receptor de hormônio adipocinético (AKHR) é um receptor acoplado à proteína G (GPCRs) e é expresso em células do tecido adiposo, corpos gordurosos (GALIKOVA et al., 2015, LU et al., 2018). A ligação do receptor a uma proteína G aumenta a atividade da enzima adenilato ciclase, resultando no acúmulo de AMP cíclico (cAMP) dentro da célula. Sinais extracelulares podem regular o mecanismo de funcionamento desta via, como uma proteína quinase e adição de lipase triacilglicerol (TAG) (HUANG et al., 2010). O mecanismo descrito está esquematizado na figura 6.



**Figura 6.** Mecanismo de ação do neuropeptídeo AKH ao se ligar ao seu receptor, AKHR. Mecanismo iniciado pela ativação da enzima TAG lipase, hidrolisando triacilgliceróis em diacilgliceróis, que são transportados para os tecidos alvo pela lipoforina. Fonte: KLOWDEN, 2007.

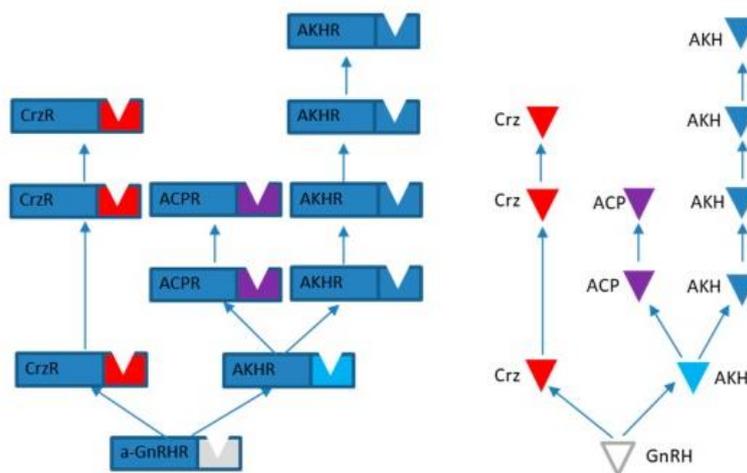
A ligação do AKH ao seu receptor na membrana plasmática ocorre através de transdução de sinal e, como resposta fisiológica ativa enzimas alvo específicas (CHAPMAN, 2013). O AKH e AKHR também podem estar

associados a resistência quanto a estresse alimentar (fome). Baixos níveis de expressão de AKHR resultaram em alta concentração de TAG, como esperado. Adicionalmente, observou-se acúmulo de tecido de gordura e sobrevivência prolongada de *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) através do silenciamento de *AKHR* (LU et al., 2018).

## 2.5. Hormônio Peptídeo Relacionado a AKH/Corazonin (ACP) e Receptor de Hormônio Peptídeo Relacionado a AKH/Corazonin (ACPR)

O Hormônio Peptídeo Relacionado a AKH/Corazonin (ACP) muitas vezes pode ser confundido e anotado erroneamente como AKH, de função desconhecida, como já ocorreu em alguns insetos (HANSEN et al., 2010; SHI et al., 2011; HIDALGO et al., 2016; WAHEDI; PALUZZI, 2018).

Inicialmente, o receptor de ACP (ACPR) foi clonado como um receptor de neuropeptídeo intermediário entre o receptor de AKH e Corazonin, e posteriormente também foi identificado o ligante, ACP, que possui estrutura similar entre os dois hormônios citados, contudo mais intimamente com o AKH, conforme demonstrado na figura 7 (ZANDAWALA et al., 2015, HANSEN et al., 2010, SHI et al., 2011; 2010, ZHU et al., 2009).



**Figura 7.** Presença de sistemas de sinalização AKH/ ACP/ Corazonin em diferentes espécies de artrópodes. Todos os sistemas de neuropeptídeos pertencem ao grupo GnRHR, e Corazonin (Crz) e AKH são sistemas mais antigos, e ACP um sistema mais

novo e apresenta relação filogenética mais próxima de AKH do que Crz. Figura adaptada retirada do estudo de MARCHAL et al., 2018.

Foi sugerido que o sistema ACP/ACPR teria se originado de duplicações, mutações e seleção a partir de um dos sistemas similares, AKH/AKHR e Corazonin/Receptor de Corazonin, originado esse novo sistema independente neuropeptídeo/receptor. Entre os organismos identificados que possuem esse tipo de neuropeptídeo está o *T. castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), além de outros insetos como *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Rhodnius) (HANSEN et al., 2010).

HANSEN et al., (2010) demonstrou que o neuropeptídeo ACP é bem conservado entre insetos. E o ACP foi incapaz de estimular os receptores tanto de AKH quanto Corazonin em *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), sugerindo sua independência quanto a resposta fisiológica. Em *R. prolixus*, foi sugerido que os neuropeptídeos AKH e ACP estão localizados em regiões distintas no sistema nervoso central (SNC), mas que ambos são secretados a partir da *corpora cardíaca* (CC) e também não há interação entre os sistemas neuropeptídeo/receptor (PATEL et al., 2014).

Em fêmeas de *Anopheles coluzzi* (Diptera: Culicidae), a expressão gênica tanto de AKH, quanto de ACP se mostrou elevada em situação de seca intensa, sugerindo que ambos os neuropeptídeos possuem papel importante na manutenção da homeostase nessa situação de estresse (HIDALGO et al., 2016).

O ACP identificado em *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae) mostrou origem de expressão na *corpora allata* e apresentou relação com o metabolismo de lipídios e carboidratos (ZHOU et al., 2017). Entre as funções testadas para ACP em *R. prolixus* estão a mobilização de lipídios e frequência cardíaca, sugerindo alguma semelhança às funções de AKH e Corazonin, respectivamente, e ambas não mostraram não ser funcionalidades de ACP (PATEL et al., 2014; ZANDAWALA et al., 2015). É importante ressaltar que a análise do genoma de insetos da ordem Coleoptera, como *T. castaneum*, mostrou ausência do neuropeptídeo e seu receptor para Corazonin (PREDEL et al., 2007; HAUSER et al., 2008; MARCHAL et al., 2018).

Crustáceos estão dentro do mesmo filo dos insetos, Arthropoda, e foi identificado ACP em camarões da espécie *Macrobrachium rosenbergii*. Nestes, o ACP foi relacionado a metabolismo de lipídios e à reprodução, inibindo a proliferação de oócitos (SUWANSA-ARD et al., 2016).

Estudos com os sistemas AKH/AKHR e ACP/ACPR testaram a possível ligação de um dos hormônios em altas concentrações ao receptor do outro sistema em *B. mori* e uma discreta ativação para ambos os sistemas de neuropeptídeo/receptor de forma cruzada foi observada (ZHU et al., 2009; HANSEN et al., 2010; SHI et al., 2011; ZANDAWALA et al., 2015).

HANSEN et al., (2010) sugere que ACP tem função no desenvolvimento inicial das larvas, mas sem conseguir avaliar efetivamente sua funcionalidade. No trabalho realizado por ALEXANDER et al., (2018) foi demonstrado a necessidade de mais estudos desse neuropeptídeo e seu receptor correspondente. Em resumo, a função desse sistema em insetos ainda está muito depende de esclarecimento (HANSEN et al., 2010; ZANDAWALA et al., 2015).

## **2.6. Hormônio Alatostatina (AST) e Receptor de Hormônio Alatostatina (ASTR)**

A alatostatina (AST) é produzida pela *corpora allata*, no cérebro, e existem inúmeros tipos já identificados em insetos. Essas moléculas foram organizadas nas formas mais abundantes encontradas e estudadas, conhecidas como: alatostatina A, B e C (KLOWDEN et al., 2007; CAERS et al., 2012; TOBE; BENDENA, 2013).

Dentre as funções gerais observadas de alatostatinas em insetos estão contração muscular, mobilidade intestinal, inibição de vitelogenina e hormônio juvenil (HJ), alimentação e frequência cardíaca (KLOWDEN et al., 2007, NATION, 2008; TOBE; BENDENA, 2013).

A divisão inicial das alatostatinas se deve primordialmente por: AST A, que são neuropeptídeos aloregulatórios, com função de comportamento alimentar e inibem HJ e regulação da contração de músculos viscerais; AST B,

que é relacionada à contração muscular e AST C, envolvidas com visão e desenvolvimento embrionário. Outras funções ainda não são totalmente conhecidas para as variadas ordens para estes três tipos de AST, mas há de se destacar que todos estão relacionados a inibição do HJ (CAERS et al., 2012; LUBAWY et al., 2018).

A função de cada tipo de alatostatina é particular para cada ordem de inseto, diferindo muito quanto à inibição do HJ, por exemplo, sugerindo que essa função não foi originária da molécula (TOBE; BENDENA, 2013).

Posteriormente, para organizar a divisão das inúmeras alatostatinas e sua funcionalidade, estas foram classificadas quanto a sequência e propriedades. AST A possui uma sequência FGL na região C-terminal; AST B possui uma sequência MIP com dois resíduos de triptofano na região C-terminal; e AST C com uma sequência PISCF-OH na região C-terminal. Por fim, os nomes foram alterados para FGL/AST, MIP/AST e PISF/AST, respectivamente (LANGE et al., 2012; LUBAWY et al., 2019). A função de FGL/AST relacionada ao controle de HJ foi associada às diferentes fases de desenvolvimento dos insetos, mas não foi testada em todas ordens de insetos especificamente (VERLINDEN et al., 2015).

Nos primeiros estudos com *T. castaneum*, sugeriu-se que não havia FGL/AST nestes insetos. Em seguida, foi encontrado em outros insetos da ordem Coleoptera, especificamente na região do cérebro e gânglios subesofágicos, com função inibitória de HJ (HAUSER et al., 2008; ELLIOT et al., 2010; LUBAWY et al., 2018).

O MIP/AST são mioinibidores, tendo a capacidade de inibir as contrações de músculos viscerais e função associada a regulação alatostática. Em *R. prolixus*, essa molécula controla a contração intestinal posterior. Ademais, também foi observada funcionalidade em relação a mioregulação para FGL/AST e, assim como para MIP/AST, a inibição foi dose dependente. FGL/AST também se mostrou importante para regulação do óvulo na reprodução (LANGE et al., 2012; SEDRA et al., 2015). Além das funções já descritas, a busca por alimento parece estar relacionada ao FGL/AST, segundo o estudo realizado em *Aedes*

*aegypti* (Diptera: Culicidae), no qual a administração dessa molécula resultou em queda da procura do inseto por se alimentar (CHRIST et al., 2017).

Em *D. melanogaster*, foi constatado que as mesmas células são capazes de produzir FGL/AST, insulina e AKH. E o FGL/AST foi capaz de interferir na resposta de AKH e na regulação da alimentação de acordo com as demandas nutricionais valoradas pelo inseto (HENTZE et al., 2015). Ademais, foi confirmado que AST de fato é capaz de alterar padrões comportamentais de alimentação, sugerindo que este neuropeptídeo pode modular a alimentação induzida por uma consequência metabólica, de acordo com a inibição ou excitação dos neurônios que o expressam (HERGARDEN et al., 2017).

Diferentes insetos coleópteros como: *Tenebrio molitor*, *Zophobas atratus* e *T. castaneum* mostraram atividade de AST para ovidutos e intestino posterior, sendo que para os dois primeiros também foi constatada atividade para contração do músculo cardíaco (LUBAWY et al., 2018).

Em insetos da ordem Coleoptera ainda são poucos os estudos com neuropeptídeos do tipo alatostatinas e, diante disto, AUDSLEY et al. 2013 investigaram a função de PISCF/AST e ASTR em *T. castaneum*, sugerindo que eles não estão funcionalmente relacionado a contração muscular no intestino e nem ovários, mas foi detectada atividade proteolítica no intestino médio. Além disso, os transcritos para o receptor ASTR estavam presentes nas células adiposas e órgãos de reprodução dos insetos, mas em maior quantidade no cérebro e intestino. Ademais, houve diferença na expressão entre machos e fêmeas.

Os receptores de AST pertencem à família de proteína G e já foram identificados mais de um receptor putativo e com sugestão de funções fisiológicas distintas em *D. melanogaster* para o complexo/ o sistema FGL/AST, o tipo de AST mais estudado e relatado na literatura (LARSEN et al., 2001; LUBAWY et al., 2018).

Devido à importante função fisiológica destes neuropeptídeos e seus receptores em insetos, podendo atuar em diversos processos metabólicos, de homeostase e desenvolvimento, por exemplo, o presente trabalho visa a validação de três neuropeptídeos específicos - AKH, ACP e AST – e seus

receptores - AKHR, ACPR e ASTR -, além de dois receptores fundamentais ao processo de ecdise – EcR e ETHR, via RNA interferente, visando a compreensão das funções desempenhadas por esses genes na morfologia do inseto, além de utilizá-los no controle de *A. grandis*. A necessidade deste estudo é justificada pela relativa escassez de pesquisas nesta área, principalmente para ordem Coleoptera, auxiliando, assim, o esclarecimento do desenvolvimento e suas variantes entre as ordens de insetos de interesse agrícola aliado à biotecnologia.

### 3. Objetivos

Validar funcionalmente neuropeptídeos e/ou seus receptores de *A. grandis* como: o Receptor de Hormônio Ecdisona (EcR) e o Receptor de Hormônio Precursor de Ecdise (ETHR); o Hormônio Adipocinético (AKH) e o Receptor de Hormônio Adipocinético (AKHR); o Hormônio Peptídeo Relacionado a AKH/Corazonin (ACP) e o Receptor de Hormônio Peptídeo Relacionado a AKH/Corazonin (ACPR); o Hormônio Allostatina (AST) e o Hormônio Receptor de Allostatina (ASTR), via RNAi, visando a prospecção de genes alvo para controle de *A. grandis* e compreensão do desenvolvimento deste inseto.

#### 3.1. Objetivos específicos

1 - Avaliar a quantidade relativa de transcritos dos genes que codificam para os neuropeptídeos e/ou seus receptores em todas as fases do desenvolvimento de *A. grandis*.

2 - Clonar os fragmentos gênicos de *EcR*, *ETHR*, *AKH*, *AKHR*, *ACP*, *ACPR*, *AST* e *ASTR* de *A. grandis*.

3 - Realizar a administração do dsRNA para os genes *EcR*, *ETHR*, *AKH*, *AKHR*, *ACP*, *ACPR*, *AST* e *ASTR* em larvas de 3<sup>o</sup> instar e fêmeas adultas de *A. grandis* via microinjeção.

4 - Avaliar os possíveis efeitos resultantes morfológicos e no desenvolvimento após a administração de dsRNA para os genes *EcR*, *ETHR*, *AKH*, *AKHR*, *ACP*, *ACPR*, *AST* e *ASTR* em larvas de 3<sup>o</sup> instar e fêmeas adultas de *A. grandis*.

5 - Avaliar o nível relativo de transcritos dos fragmentos gênicos de *EcR*, *ETHR*, *AKH*, *AKHR*, *ACP*, *ACPR*, *AST* e *ASTR* de *A. grandis* após a administração dos dsRNAs correspondentes.

## 4. Material e métodos

### 4.1. Obtenção de fragmentos gênicos de neuropeptídeos e seus receptores de *A. grandis*.

Por meio de análises *in silico* utilizando banco de transcritos públicos e o transcriptoma de *A. grandis* (FIRMINO *et al.*, 2013) foram identificados fragmentos dos genes *EcR*, *ETHR*, *AKH*, *AKHR*, *ACP*, *ACPR*, *AST* e *ASTR* de *A. grandis*. As sequências dos fragmentos dos genes foram comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST N (versão 2.2.15) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Os oligonucleotídeos iniciadores de PCR (Tabela 1), chamados simplesmente de *primers*, para PCR e RT-qPCR, foram desenhados utilizando o Oligo Perfect™ Designer (Life Technologies).

**Tabela 1.** Sequência dos primers dos neuropeptídeos utilizados para PCR e RT-qPCR.

Gene alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Objetivo
EcR	AG_ECR_ F	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGC TGGGAGAGATAAAATACTTT -3'	290pb	Clonagem
	AG_ECR_ R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTGCGA GGAATTGGCCGGAC - 3'		
ETHR	AG_ETHR _F	5'- GTAGCTCACGCCTCGGTACT -3'	234pb	Clonagem
	AG_ETHR _R	5'- AGTGTTGGCCGAGGTATGAC -3'		
-	M13_F	5' – GTAAAACGACGGCCAGT – 3'	-	Síntese de dsRNA
	M13_R	5' - CAGGAAACAGCTATGAC – 3'		
-	T7 (F e R)	5'- TAATACCACTCACTATAG -3'	-	Síntese de dsRNA

-	T7M13_R	5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGACAG GAAACAGCTATGAC -3'	-	Síntese de dsRNA
GAPDH	GAPDH_F	5'- AGATCGTCGAGGGTCTGATG -3'	166pb	RT-qPCR
	GAPDH_R	5'- AAGGCGGGAATGACTTTACC -3'		
B-TUB	B-TUB_F	5'- GGTTGCGACTGTTTACAAGG -3'	156pb	RT-qPCR
	B-TUB_R	5'- GCACCACCGAGTAAGTGTTCC -3'		
EcR	BW_ECDY Recept_RT F	5'- GCATAACGAAAAACGCAGTG -3'	150pb	RT-qPCR
	BW_ECDY Recept_RT R	5'- ATGCCACCGTCAAACATT -3'		
ETHR	AG_ETHR _F	5'- GGTTTATTGCTGCGGTGTTT -3'	107pb	RT-qPCR
	AG_ETHR _R	5'- AGTGTTGGCCGAGGTATGAC -3'		
AKH	AG_AKH2_ 2_F	5'-AGTTTTGTTGGGTGCGTTTT-3'	326pb	Clonagem
	AG_AKH2_ 2_R	5'ATCTGGCTGGCTAGTTGGAA3'		Clonagem
AKH	AG_AKH2_ qPCR-F	5'-TTCGCCCTTAGTTTTGTTGG-3'	200pb	RT-qPCR
	AG_AKH2_ qPCR-R	5'-CTCCTTGCACCCATAATCGT-3'		RT-qPCR
AKHR	Ag_AKHR dsRNA-F	5'-GAGTCTCTTATGGGAGTTATA-3'	190pb	Clonagem
	Ag_AKHR dsRNA-R	5'-GATGCCATCACTGGTGCTTTTT-3'		Clonagem
ACP	Ag_ACP dsRNA-F	5'-GACCCTGATTCAACTTACTAA-3'	371pb	Clonagem
	Ag_ACP dsRNA-R	5'-TGTCGCCTCCAGATGAAGA-3'		Clonagem
ACPR	ACPR AG dsRNA -F	5'-GAATGTCCGATGCCACAACCTC-3'	178pb	Clonagem
	ACPR AG dsRNA -R	5'-GAACGCATTCTCCACCACATC-3'		Clonagem
AST	Ag_AST dsRNA-F	5'-TGCCAGTCGCTCTTCAGAAG-3'	412pb	Clonagem
	Ag_AST dsRNA-R	5'-GTCTCTTATGGGAGTTATA-3'		Clonagem

ASTR	Ag_AST R dsRNA-F	5'- GACTTATCTTTTCGGTCCAAACAATA-3'	127pb	Clonagem
	Ag_AST R dsRNA-R	5'-GAAGGTGTTAGAGCTTGACC-3'		Clonagem

#### 4.2. Extração de RNA e síntese de cDNA – fases de desenvolvimento

Foi feita a extração de RNA total de todas as fases de desenvolvimento do bicudo do algodoeiro: ovo, larva (1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> ínstaes), pré-pupa, pupa e adultos (machos e fêmeas em conjunto e separadamente), utilizando o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A concentração e qualidade do RNA extraído foram obtidos no espectrofotômetro NanoVue Plus GE Healthcare Life) e confirmados em gel de agarose 1%. O RNA foi tratado com 2U de DNase I (Invitrogen<sup>®</sup>) por 30 minutos. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit M-MLVReverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen<sup>®</sup>), conforme protocolo do fabricante.

#### 4.3. Quantificação relativa de transcritos dos genes estudados durante o desenvolvimento de *A. grandis*

Para a análise da quantidade relativa dos transcritos dos genes em estudo durante o ciclo de vida de *A. grandis*, foram utilizados os cDNAs de todas as fases de desenvolvimento do inseto, como está descrito no tópico anterior.

Para a realização da RT-qPCR, foi utilizado o termociclador CF X96<sup>™</sup> Real-Time System (Bio-Rad) com os *primers* específicos para RT-qPCR de cada gene. Os genes utilizados para normalização interna foram  $\beta$ -tubulina ( *$\beta$ -TUB*) e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (*GAPDH*), de acordo com estudos previamente realizados por Firmino *et al.* (in press), utilizando os *primers* indicados na Tabela 1.

As reações foram realizadas no volume final de 10  $\mu$ L, sendo 5  $\mu$ L do Mix de SYBR Green (LGC), 2  $\mu$ L de cDNA específico, 2,6  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bi-destilada e

0,2 µM de cada *primer*, direto e reverso. O protocolo utilizado no termociclador para o ciclo de tempo e temperatura foi: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação do cDNA, 60 °C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 60 °C por 30 segundos para extensão. Após os 40 ciclos, foi feita uma curva de dissociação para confirmar a especificidades dos *primers* (65-95 °C, aumentando 0,5 °C a cada 5 segundos). Os controles negativos contendo água, em vez de cDNA foram utilizados para verificação de possíveis contaminações nas amostras.

Os dados brutos de amplificação foram analisados no software online qPCR miner (<http://ewindup.info/miner/>) para cálculo das Cts e eficiência dos *primers*. Finalmente, a quantificação relativa foi realizada utilizando o software qBase Plus (Biogazelle, Bélgica).

Ressalta-se que para os genes *EcR* e *ETHR*, as análises foram realizadas em triplicata técnica e biológica, e suas análises foram concluídas. Já para os demais genes, *AKH*, *AKHR*, *ACP*, *ACPR*, *AST*, *ASTR*, foi realizada apenas uma triplicata biológica e técnica, sendo, portanto, resultados preliminares.

Posteriormente, o perfil de expressão dos genes *EcR* e *ETHR* em fêmeas jovens adultas às 12, 24, 36 e 48 horas após a emergência, com a finalidade de determinar como se comporta a expressão desses genes e a relação ao momento da microinjeção. Essa análise foi realizada em triplicata biológica e técnica.

#### **4.4. Clonagem gênica**

Para a clonagem dos fragmentos dos genes em estudos foram utilizados *primers* específicos para PCR de cada um destes genes (Tabela 1). A reação da PCR foi realizada com volume final de 20 µL a partir da utilização dos seguintes reagentes: 14,4 µL de água, 0,4 µL de cada *primer*, direto e reverso, na concentração de 10 µM, 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2 µL de Tampão 10X, 0,4 µL de dNTP à concentração 0,5 mM, 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase e 1 µL de cDNA obtido a partir do conjunto de cDNAs de todos os estágios de *A. grandis*. A PCR foi realizada a 94 °C por 5 minutos para desnaturação do DNA, 30 ciclos a 95 °C

por 30 segundos para desnaturação do DNA, 55 °C para anelamento dos *primers*, e 72 °C por 30 segundos para extensão. Em seguida, 72 °C por 5 minutos para extensão final da fita de DNA e 4 °C por tempo infinito para término e conservação da PCR.

Após a PCR, a amplificação dos transcritos por PCR foi visualizada em gel de agarose 1%.

O fragmento amplificado de *EcR* foi subclonado no vetor pDONR™ 221, utilizando o mix de enzimas BP clonase II do kit de clonagem PCR Cloning System Gateway® *Technology* (Invitrogen), e transferido também por recombinação (utilizando o mix de enzimas LR clonase II) para o vetor pL4440gtwy. A cepa utilizada para ambas as clonagens no sistema Gateway® foi a *Escherichia coli* OmniMAX™ 2-T1R (Invitrogen).

Para o *ETHR*, *AKH*, *AKHR*, *ACP*, *ACPR*, *AST* e *ASTR* as PCR, visando a amplificação do fragmento gênico correspondente, foram purificadas com o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) e cada fragmento foi ligado no vetor pCR2.1, utilizando o kit de clonagem TOPO® TA cloning (Invitrogen). A ligação foi então introduzida em cepa de *E. coli* XL1-Blue.

A confirmação da clonagem ocorreu através da extração do DNA plasmidial de colônias brancas selecionadas no sistema azul/branco utilizando IPTG/X-Gal, seguida da digestão dos clones com nucleases de restrição e sequenciamento dos clones que liberaram o fragmento do tamanho esperado. Em ambas as clonagens os clones selecionados foram aqueles que liberam o fragmento esperado após a digestão com enzimas de restrição.

Para *EcR*, foi utilizada a enzima *EcoRV*, e para os demais *EcoRI* (ambas enzimas da Thermo Fisher Scientific). As condições da reação de digestão para os fragmentos clonados foram: 7,5 µL de água, 1 µL do DNA específico, 0,5 µL da enzima de restrição específica e 1 µL de Tampão Buffer 10X. A reação foi deixada duas horas a 37 °C. Em seguida, os clones que tiveram digestão confirmada em gel de agarose 1% tiveram a sequência confirmada por sequenciamento automático.

Os diferentes fragmentos gênicos foram clonados em momentos temporais distintos, por isso a clonagem não foi padronizada para todos, com enzimas e kit disponíveis também distintos.

#### 4.5. Produção de dsRNA

A síntese dos dsRNAs para silenciamento dos genes em estudo foi realizada a partir do processo de transcrição *in vitro*. Foram adicionados aos fragmentos a região mínima do promotor T7 necessária para ação da T7 RNA polimerase do kit de transcrição, MEGAscript® RNAi Kit (Ambiom, Termo Fisher Scientific).

Para o fragmento de *EcR* clonado anteriormente no vetor pL4440gtwy foi necessária amplificação por PCR a partir de um único *round* com o *primer* T7 (o mesmo *primer* funciona como direto e reverso), devido à presença de dois sítios de ligação T7, externos ao fragmento a ser inserido no vetor. O produto desta PCR foi utilizado para a síntese direta do dsRNA, conforme o protocolo do MEGAscript® RNAi Kit.

No caso dos demais genes, clonados anteriormente no vetor pCR2.1, foi realizada a amplificação por PCR inicial com os *primers* M13, direto e reverso. A reação da PCR de primeiro *round* foi realizada com volume final de 20 µL a partir da utilização dos seguintes reagentes: 14,4 µL de água, 0,4 µL de cada *primer*, direto e reverso, na concentração de 10 µM, 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2 µL de Tampão 10X, 0,4 µL de dNTP a concentração 0,5 mM, 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase e 1 µL de DNA do fragmento clonado.

A PCR de primeiro *round* foi realizada a 94 °C por 5 minutos para desnaturação do DNA, 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos para desnaturação do DNA, 55 °C para anelamento dos *primers*, e 72 °C por 30 segundos para extensão. Em seguida, 72 °C por 5 minutos para extensão final da fita de DNA e 4 °C por tempo infinito para término e conservação da PCR. Após a PCR, a amplificação dos transcritos por PCR foi visualizada em gel de agarose 1%. Desta PCR, 1 µL foi utilizado para PCR de segundo *round* com os *primers*

T7(direto) e T7M13 (reverso), sendo o T7M13 diluído da solução estoque a concentração 10 $\mu$ M em 1:20 para síntese do dsRNA.

A reação da PCR de segundo *round* foi realizada como descrito para o primeiro, com valores e concentrações de reagente iguais, exceto para o DNA, 1  $\mu$ L do primeiro *round*. Foram necessários dois *rounds* de PCR para a amplificação do fragmento devido à presença de apenas um sítio de ligação T7 no vetor.

Finalmente, o dsRNA foi quantificado no espectrofotômetro e visualizado em gel de agarose 1%.

#### **4.6. Criação de insetos**

Ovos, larvas, pré-pupas, pupas e adultos de *A. grandis* foram obtidos da colônia mantida no Laboratório de criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF. Os insetos foram criados em condições controladas de temperatura ( $26 \pm 2$  °C), umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ) e luminosidade (12 horas de fotoperíodo), sendo alimentados diariamente com dieta artificial. O desenvolvimento dos insetos adultos foi sincronizado transferindo-os para uma gaiola diferente após a eclosão.

#### **4.7. Bioensaios**

##### **4.7.1. Bioensaio com larvas de 3<sup>o</sup> ínstar**

Os efeitos da administração dos dsRNAs dos genes em larvas de *A. grandis* foram analisados após ensaio de microinjeção, no qual 500ng/ $\mu$ L de dsRNA foram microinjetados em larvas de 3<sup>o</sup> ínstar. A concentração de dsRNA foi estabelecida em experimentos anteriores para não causar morte imediata e possibilitar a observação de fenótipos.

Para a administração do dsRNA foi utilizada seringa Hamilton de volume 10  $\mu$ L, sendo microinjetado 1  $\mu$ L do dsRNA específico na região dorsal do inseto

(Figura 8). Em cada experimento foram utilizados três tratamentos: dsRNA do gene específico em estudo, dsRNA para um gene não-específico de *A. grandis* ( $\beta$ -glucoronidase-*GUS*) e água bidestilada, os dois últimos são controles negativos.



**Figura 8.** Microinjeção em larva de 3º instar de *A. grandis*, na região dorsal posterior, utilizando seringa Hamilton de 10 $\mu$ l. (Fonte: Leonardo Pepino de Macedo).

Antes da microinjeção, as larvas de 3º instar foram coletadas da dieta e depositadas em placas de petri de vidro, sobre o gelo, para redução da sua atividade locomotora. Para microinjeção, a larva foi colocada com o dorso voltado para cima e a penetração da agulha realizada na região dorso-lateral, visando não atingir a aorta que percorre longitudinalmente a larva. Após a microinjeção, as larvas foram colocadas em dieta nova contendo espaços feitos com contornos circulares de pinça e cobertas suavemente com os resquícios da dieta.

O bioensaio com larvas de 3º instar teve duração máxima de 20 dias, tempo estimado de desenvolvimento normal das larvas até adulto. A coleta das larvas para extração do RNA foi realizada 48 horas após a microinjeção. As larvas mortas foram retiradas ao longo dos dias, contabilizadas e analisadas quanto ao fenótipo e mortalidade. Foram realizadas oito repetições de n igual a 10 para cada grupo e n total de 80 insetos para cada gene em estudo, separadamente aos insetos microinjetados para coleta e extração de RNA.

#### 4.7.2. Bioensaio com adulto de *A. grandis*

Para o bioensaio com adultos, insetos recém-emergidos foram sexados (SAPPINGTON & SPURGEON, 2000), os machos foram marcados com cola glitter nos élitros para facilitar a identificação e apenas as fêmeas foram microinjetadas, visto que são a fonte para deposição de ovos e perpetuação da espécie, podendo indicar diretamente alguma alteração na reprodução. O local de administração do tratamento foi no abdômen, também na região dorso-lateral, elevando-se o élitro e asa para microinjeção (Figura 9).



**Figura 9.** Microinjeção em inseto adulto de *A. grandis*, na região dorsal posterior, utilizando seringa Hamilton de 10 µl. (Fonte: Leonardo Pepino de Macedo).

Para o bioensaio as fêmeas e os machos foram colocados em recipientes de bioensaio na proporção de quatro machos para cada cinco fêmeas. A duração do bioensaio de adultos foi de 15 dias. E coleta das fêmeas para extração de RNA foi realizada 48 horas após a microinjeção. Fêmeas mortas foram contabilizadas ao longo do bioensaio. A variável analisada no bioensaio com adultos foi a mortalidade das fêmeas. Foram realizadas oito repetições com n igual a 10 para cada grupo e n total de 80 insetos para cada gene em estudo, separadamente aos insetos microinjetados para coleta e extração de RNA.

#### 4.8. Avaliação molecular da administração dos dsRNAs em *A. grandis*

A avaliação dos efeitos da administração de dsRNA dos transcritos-alvo nos insetos de *A. grandis* que foram submetidos ao tratamento com microinjeção

foi realizada por RT-qPCR. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir do RNA total extraído dos insetos, de cada tratamento após 48 horas da administração do dsRNA. A análise dos efeitos da microinjeção do dsRNA em *A. grandis* foi feita a partir das duas repetições biológicas dos bioensaios.

Ressalta-se que para os genes *EcR* e *ETHR*, as análises foram realizadas em triplicata técnica e biológica, e suas análises foram concluídas. Já para os demais genes, *AKH*, *AKHR*, *ACP*, *ACPR*, *AST*, *ASTR*, foram realizadas apenas uma triplicata biológica e técnica, sendo, portanto, resultados preliminares.

O controle utilizado para as análises de quantidade relativa de transcritos foi apenas o dsRNA *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase-*GUS*), visto alterações anteriores de expressão observadas se comparado junto à água.

#### **4.9. Avaliação das possíveis alterações morfofisiológicas causadas pela administração do dsRNA em *A. grandis***

As alterações morfofisiológicas causadas pela administração do dsRNA foram analisadas, inicialmente, durante o desenvolvimento das larvas desde o 3º ínstar, quando foram microinjetadas, até chegarem ao estágio adulto. Foram avaliadas no bioensaio de larvas de 3º ínstar as alterações morfológicas da cutícula, nas asas e élitros, pernas, estruturas reprodutivas externas e modificações no abdômen visíveis ao microscópio. Quando fêmeas foram microinjetadas, foi observada a morfologia normal de adulto ao longo do bioensaio. As alterações morfológicas observadas foram comparadas com insetos normais dos tratamentos controle, água e dsRNA *GUS*.

As imagens dos insetos foram adquiridas utilizando o microscópio estereoscópico, modelo MVX10, marca Olympus, disponível na sala de microscopia do Laboratório de Interação Molecular Planta Patógeno I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

#### **4.10. Análise estatística dos dados**

Os dados de mortalidade decorrentes dos tratamentos de microinjeção de dsRNA dos bioensaios com larvas e com adultos foram analisados por análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Todos os experimentos foram feitos com delineamento inteiramente casualizado.

## 5. Resultados

### 5.1. Identificação dos genes de neuropeptídeos e/ou receptores de neuropeptídeos em *A. grandis*

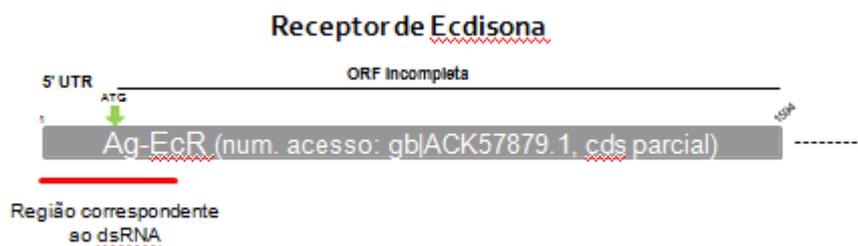
Para melhor compreensão dos genes de neuropeptídeos/receptores de neuropeptídeos validados funcionalmente neste estudo a Tabela 2 fornece os dados resumidos dos genes e respectivos tamanhos que serão apresentados a seguir. Não foi possível desenhar um dsRNA de tamanho comum a todos, visto a grande variação de tamanho dos transcritos em estudo.

**Tabela 2.** Esquema didático dos genes de neuropeptídeos ou receptores de neuropeptídeos validados no presente estudo.

<b>Gene (Neurop.)</b>	<b>Identificado</b>	<b>dsRNA</b>
EcR	1594ppb	290pb
ETHR	408pb	234pb
AKH	462pb	326pb
AKHR	442pb	190pb
ACP	1168pb	371pb
ACPR	660pb	178pb
AST	1659pb	412pb
ASTR	500pb	127pb

Em *A. grandis*, a região correspondente aos genes do presente estudo foi obtida a partir da comparação por identidade das sequências desses genes já descritos em outros insetos que possuem genoma ou transcrito sequenciados e disponíveis. Os fragmentos dos genes foram comparados com outras sequências disponíveis no GenBank, utilizando as ferramentas BLAST N e BLAST X (versão 2.2.15) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

O gene de *EcR* em *A. grandis*, representado por um fragmento de 290pb foi obtido a partir de uma sequência já publicada anteriormente, que corresponde a uma porção da região 5'UTR e da região codante inicial, representada em vermelho, utilizada também para síntese do dsRNA (Figura 10).



**Figura 10.** Desenho esquemático da região do gene *EcR* em *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA. Em cinza encontra-se a região correspondente ao fragmento incompleto do mRNA de *EcR* (N. a.: ACK57879.1) de *A. grandis*, com 1594 pb, encontrado no banco de dados. Em vermelho encontra-se delimitada a região de 290 pb do mRNA de *EcR* que foi clonada e, posteriormente, utilizada para síntese do dsRNA.

Foi encontrado um *contig* no transcrito de *A. grandis* com maior identidade para *ETHR* de *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae). Este *contig* denominado c19804, possui um tamanho de 408 pb. A região clonada de *ETHR* neste trabalho corresponde a uma região do *contig* de 234 pb, e esta mesma região foi utilizada para sintetizar o dsRNA (Figura 11).



**Figura 11.** Desenho esquemático da região do gene *ETHR* em *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA. Em laranja encontra-se representado o mRNA completo de *ETHR* (Número de acesso: ERL87247.1) (1774 pb) de *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae). Em preto encontra-se o *contig* de 408 pb correspondente ao fragmento de *ETHR* encontrado no transcrito de *A. grandis*. Este fragmento possuiu como melhor “hit” no BLAST X o mRNA de *D. ponderosae*, alinhando com a região inicial do gene. Em vermelho encontra-se delimitada a região de 234 pb que foi clonada, e utilizada para síntese de dsRNA de *ETHR*.



**Figura 13.** Desenho esquemático da região do gene *AKHR* em *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA. Em laranja representado o mRNA completo de *AKH* de *T. castaneum*. Em preto encontra-se o *contig* de 442 pb correspondente ao fragmento de *AKHR* encontrado no transcrito de *A. grandis*. Este fragmento possui como melhor “hit” no BLAST X o mRNA de *T. castaneum*. Em vermelho encontra-se delimitada a região de 190 pb que foi clonada, e utilizada para síntese de dsRNA *AKHR*.

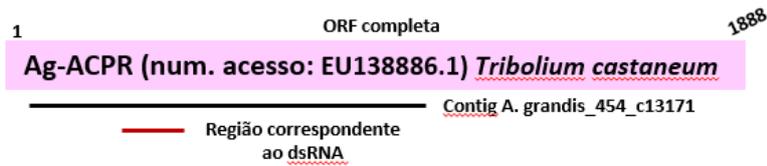
Para *ACP*, foi encontrado um *contig* no transcrito de *A. grandis* com maior identidade para *ACP* de *T. castaneum*. Este *contig* denominado c7040, possui um tamanho de 1168 pb. A região clonada de *ACP* neste trabalho corresponde a uma região do *contig* de 371 pb, e esta mesma região foi utilizada para sintetizar o dsRNA (Figura 14).



**Figura 14.** Desenho esquemático da região do gene *ACP* em *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA. Em verde representado o mRNA completo de *ACP* de *T. castaneum*. Em preto encontra-se o *contig* de 1168 pb correspondente ao fragmento de *ACP* encontrado no transcrito de *A. grandis*. Este fragmento possui como melhor “hit” no BLAST X o mRNA de *T. castaneum*. Em vermelho encontra-se delimitada a região de 371 pb que foi clonada, e utilizada para síntese de dsRNA *ACP*.

Foi encontrado um *contig* no transcrito de *A. grandis* com maior identidade para *ACPR* de *T. castaneum*. Este *contig* denominado c13171, possui um tamanho de 660 pb. A região clonada de *ACPR* neste trabalho corresponde a uma região do *contig* de 178 pb, e esta mesma região foi utilizada para sintetizar o dsRNA (Figura 15).

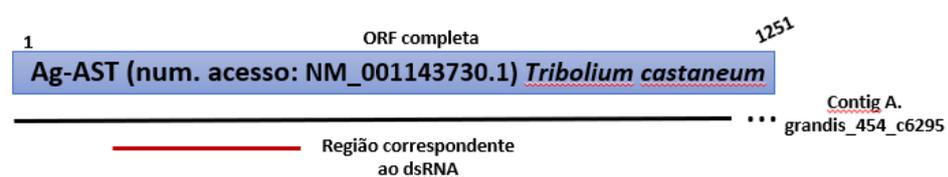
### Receptor de Hormônio Relacionado a AKH/Corazonin (ACPR)



**Figura 15.** Desenho esquemático da região do gene *ACPR* em *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA. Em rosa representado o mRNA completo de *ACPR* de *T. castaneum*. Em preto encontra-se o *contig* de 660 pb correspondente ao fragmento de *ACPR* encontrado no transcrito de *A. grandis*. Este fragmento possuiu como melhor “hit” no BLAST X o mRNA de *T. castaneum*. Em vermelho encontra-se delimitada a região de 178 pb que foi clonada, e utilizada para síntese de dsRNA *ACPR*.

Para *AST*, foi encontrado um *contig* no transcrito de *A. grandis* com maior identidade para *AST* de *T. castaneum*. Este *contig* denominado c6295, possui um tamanho de 1659 pb. A região clonada de *AST* neste trabalho corresponde a uma região do *contig* de 412 pb, e esta mesma região foi utilizada para sintetizar o dsRNA (Figura 16).

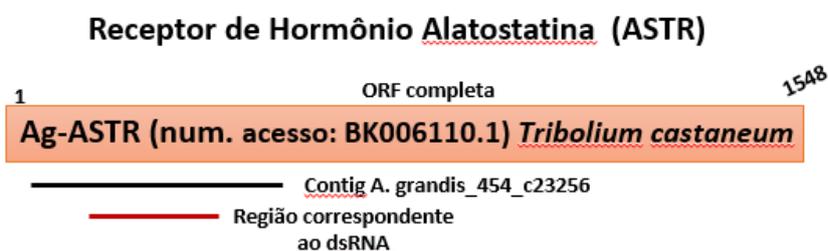
### Hormônio Alatostatina (AST)



**Figura 16.** Desenho esquemático da região do gene *AST* em *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA. Em azul representado o mRNA completo de *AST* de *T. castaneum*. Em preto encontra-se o *contig* de 1659 pb correspondente ao fragmento de *AST* encontrado no transcrito de *A. grandis*. Este fragmento possuiu como melhor “hit” no BLAST X o mRNA de *T. castaneum*. Em vermelho encontra-se delimitada a região de 412 pb que foi clonada, e utilizada para síntese de dsRNA *AST*.

Foi encontrado um *contig* no transcrito de *A. grandis* com maior identidade para *ASTR* de *T. castaneum*. Este *contig* denominado c23256, possui um tamanho de 500 pb. A região clonada de *ASTR* neste trabalho corresponde

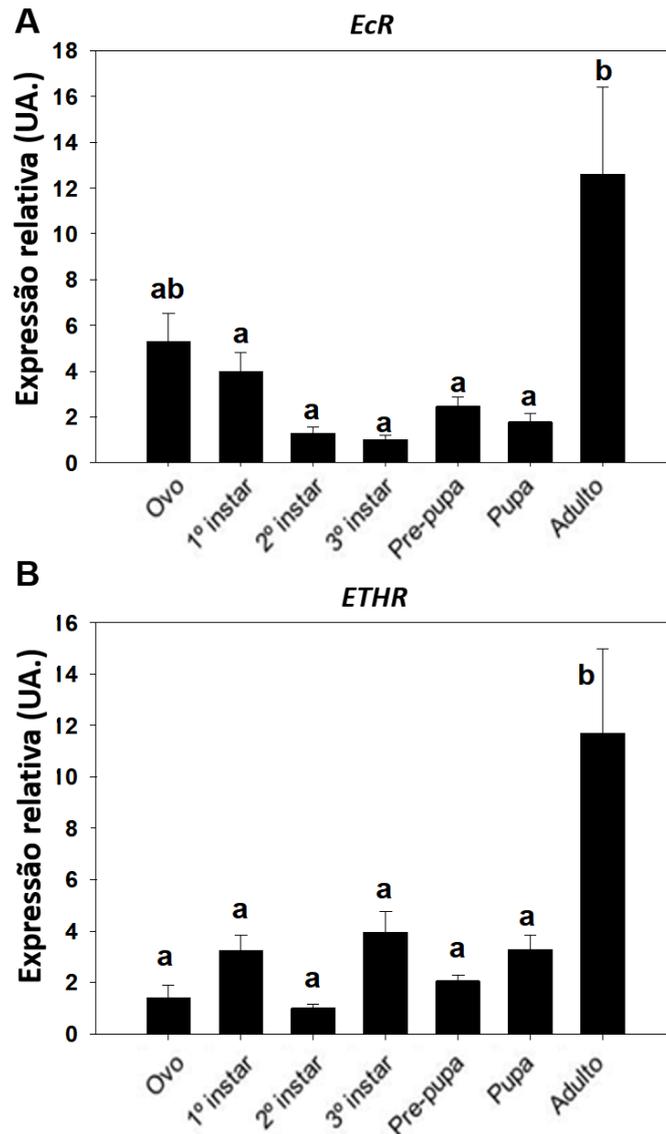
a uma região do *contig* de 127 pb, e esta mesma região foi utilizada para sintetizar o dsRNA (Figura 17).



**Figura 17.** Desenho esquemático da região do gene *ASTR* em *A. grandis* utilizada nos experimentos de administração do dsRNA. Em laranja representado o mRNA completo de *ASTR* de *T. castaneum*. Em preto encontra-se o *contig* de 500 pb correspondente ao fragmento de *ASTR* encontrado no transcrito de *A. grandis*. Este fragmento possui como melhor “hit” no BLAST X o mRNA de *T. castaneum*. Em vermelho encontra-se delimitada a região de 127 pb que foi clonada, e utilizada para síntese de dsRNA *ASTR*.

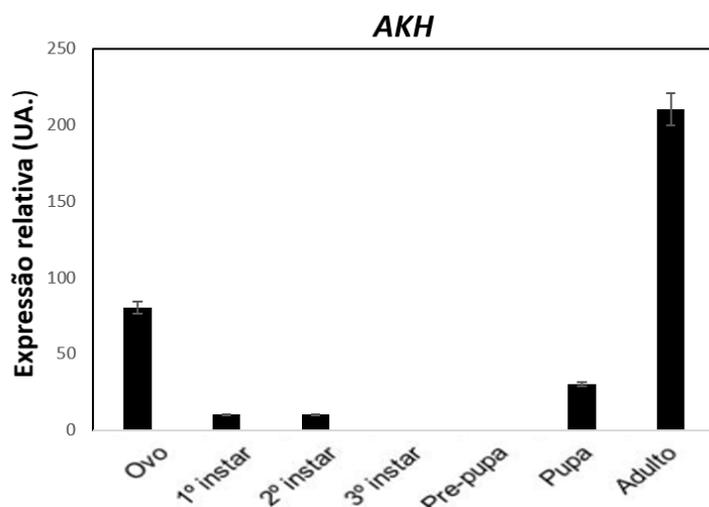
## 5.2. Expressão relativa dos transcritos durante o desenvolvimento de *A. grandis*

Com o objetivo de compreender melhor a importância dos neuropeptídeos e seus receptores durante o desenvolvimento de *A. grandis*, foi realizada a quantificação relativa dos transcritos destes genes por RT-qPCR. O RNA total foi extraído de todos os estágios de desenvolvimento do inseto, conforme descrito anteriormente. A quantificação relativa dos genes foi relativizada com a quantidade da fase de menor expressão. A quantidade de transcritos do gene *EcR* e *ETHR* em *A. grandis* foi maior, em ambos os casos, na fase adulta, com diferença significativa (Figura 18 A e B). Pode-se observar também, na mesma figura que o gene *EcR* possui expressão relativa pouco mais elevada em ovo do que nas demais fases (Figura 18 A). Com isso, demonstra-se a importância destes receptores de neuropeptídeos principalmente na fase adulta de *A. grandis*.



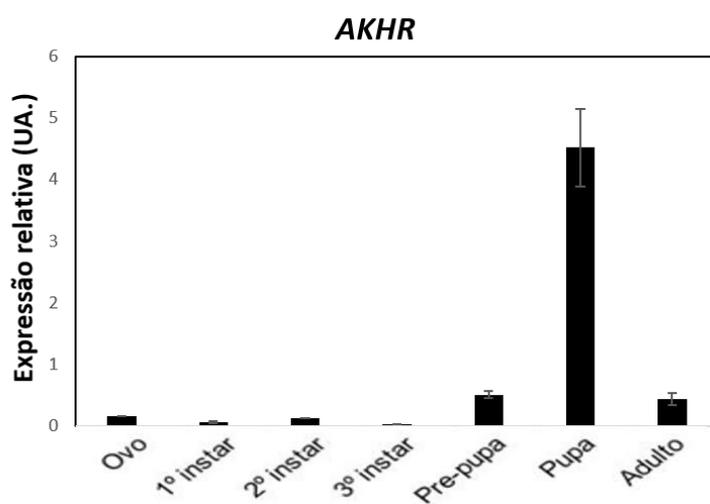
**Figura 18.** Expressão relativa dos transcritos dos genes *EcR* (A) e *ETHR* (B) durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*. Valores de expressão relativa em UA (unidade arbitrária). Ambos os genes possuem maior expressão relativa na fase de adulto.

A quantidade de transcritos do gene *AKH* de *A. grandis* analisada preliminarmente foi maior na fase adulta. Observa-se uma tendência de aumento na quantidade de transcritos também na fase de ovo em relação as demais (Figura 19). Portanto, demonstra-se a importância deste neuropeptídeo, principalmente para a fase adulta de *A. grandis*, assim como para *EcR* e *ETHR*.



**Figura 19.** Expressão relativa do transcrito do gene *AKH* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*. Valores de expressão relativa em UA (unidade arbitrária). O gene *AKH* possui maior expressão relativa na fase de adulto, e aumentada na fase de ovo.

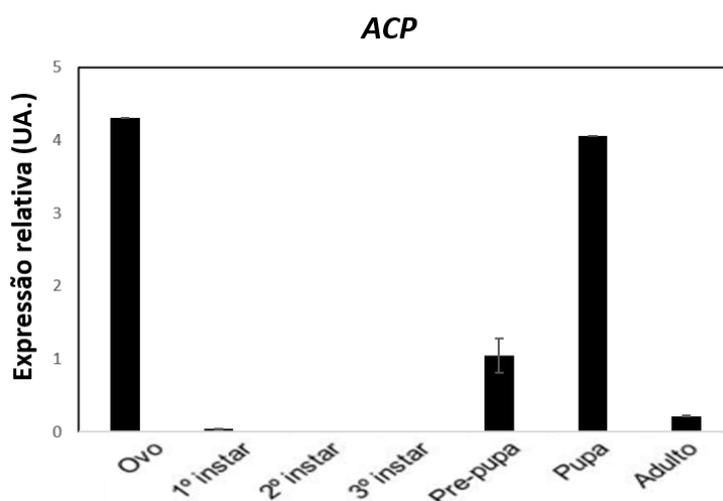
A quantidade de transcritos do gene *AKHR* de *A. grandis* analisada preliminarmente foi maior na fase de pupa. Observa-se uma diminuta tendência de elevação da expressão também das fases pré-pupa e adulto (Figura 20). Diante disto, demonstra-se a importância deste receptor de neuropeptídeo para a fase de pupa, transição entre as fases larval e adulta em *A. grandis*.



**Figura 20.** Expressão relativa do transcrito do gene *AKHR* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*. Valores de expressão relativa em UA (unidade

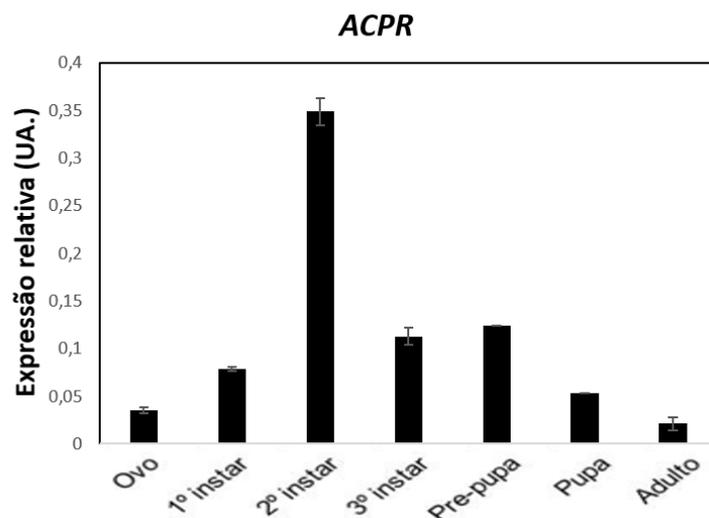
arbitrária). O gene *AKHR* possui maior expressão relativa na fase de pupa, e aumentada nas fases de pré-pupa e adulto.

A quantidade de transcritos do gene *ACP* de *A. grandis* analisada preliminarmente foi maior na fase de ovo e pupa. Observa-se também uma pequena tendência de elevação da expressão também das fases pré-pupa (Figura 21).



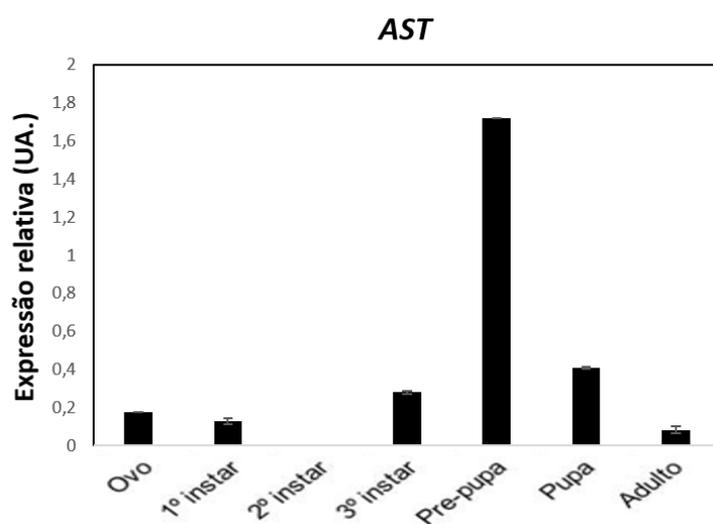
**Figura 21.** Expressão relativa do transcrito do gene *ACP* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*. Valores de expressão relativa em UA (unidade arbitrária). O gene *ACP* possui maior expressão relativa na fase de ovo e pupa, e aumentada na fase de pré-pupa.

A quantidade de transcritos do gene *ACPR* de *A. grandis* analisada preliminarmente foi maior na fase de 2º instar larval. Observa-se uma tendência de elevação da expressão também das fases 1º e 3º instar, e pré-pupa em relação as demais (Figura 22). Assim, observa-se a importância deste receptor de neuropeptídeo proeminente na fase de 2º instar larval em *A. grandis*.



**Figura 22.** Expressão relativa do transcrito do gene *ACPR* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*. Valores de expressão relativa em UA (unidade arbitrária). O gene *ACPR* possui maior expressão relativa na fase de 2º instar larval, e aumentada mais acentuadamente em 1º instar, 3º instar e pré-pupa.

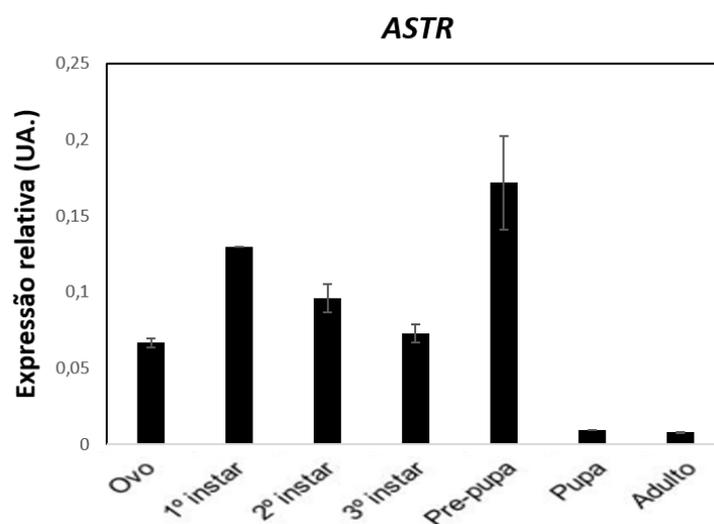
A quantidade de transcritos do gene *AST* de *A. grandis* analisada preliminarmente foi maior na fase pré-pupa. Observa-se uma tendência de elevação da expressão também das fases 3º instar larval e pupa em relação as demais (Figura 23). Logo, demonstra-se a importância deste neuropeptídeo acentuada na fase de pré-pupa em *A. grandis*.



**Figura 23.** Expressão relativa do transcrito do gene *AST* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*. Valores de expressão relativa em UA (unidade

arbitrária). O gene *AST* possui maior expressão relativa na fase de pré-pupa, e aumentada nas fases de 3º instar e pupa.

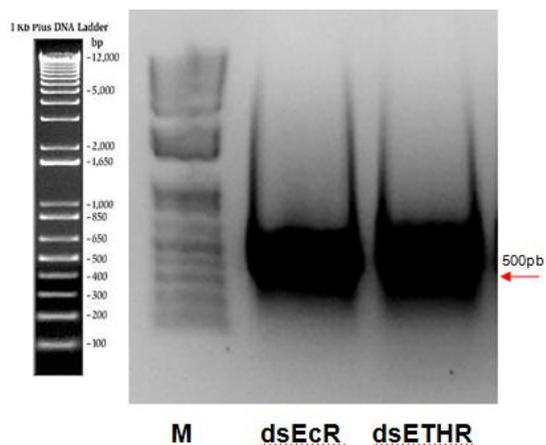
A quantidade de transcritos do gene *ASTR* de *A. grandis* analisada preliminarmente foi maior na fase pré-pupa. Observa-se uma elevação da expressão também das fases de ovo a 3º instar larval em relação às demais (Figura 24). Diante disto, demonstra-se a importância deste receptor de neuropeptídeo acentuada na fase de pré-pupa em *A. grandis*.



**Figura 24.** Expressão relativa do transcrito do gene *ASTR* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*. Valores de expressão relativa em UA (unidade arbitrária). O gene *ASTR* possui maior expressão relativa na fase de pré-pupa, e aumentada entre as fases de ovo a 3º instar.

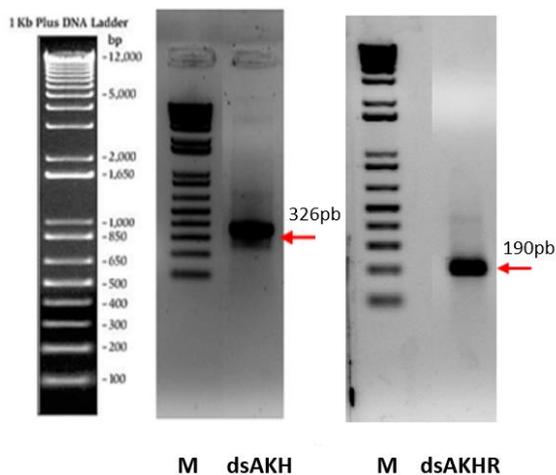
### 5.3. Síntese dos dsRNAs

Os fragmentos dos dsRNAs sintetizados para os genes *EcR* e *ETHR* foram confirmados em em gel de agarose 1% (Figura 25).



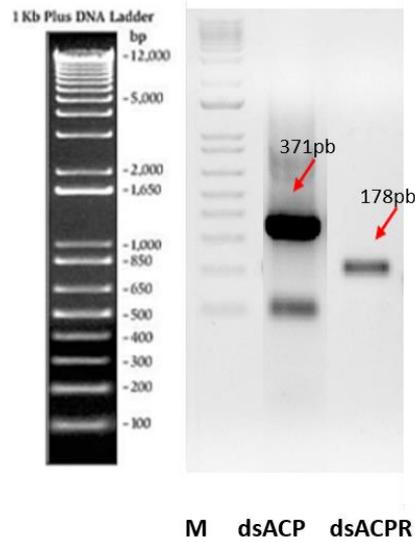
**Figura 25.** Síntese do dsRNA de *EcR* e *ETHR*. O dsRNA de *EcR* possui aproximadamente 500 pb e o dsRNA de *ETHR* possui um fragmento de aproximadamente 454 pb. Legenda: M - Marcador 1Kb, seta vermelha indicando o fragmento do dsRNA sintetizado.

Os fragmentos dos dsRNAs sintetizados para os genes *AKH* e *AKHR* foram confirmados em em gel de agarose 1% (Figura 26).



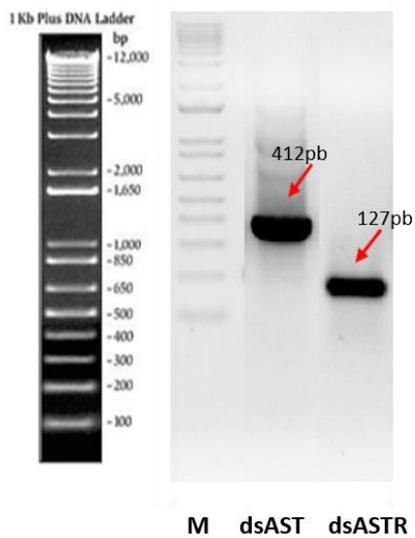
**Figura 26.** Síntese do dsRNA de *AKH* e *AKHR*. Fragmento de dsRNA *AKH* de aproximadamente 300 pb e dsRNA *AKHR* de aproximadamente 200pb. Legenda: M – marcador. A seta vermelha indica o dsRNA utilizado no presente trabalho.

A visualização dos dsRNAs de *ACP* e *ACPR* sintetizados foram confirmadas em gel de agarose 1% (Figura 27).



**Figura 27.** Síntese do dsRNA de *ACP* e *ACPR*. Fragmento de dsRNA *ACP* de aproximadamente 400 pb e dsRNA *ACPR* de aproximadamente 200pb. Legenda: M – marcador. A seta vermelha indica o dsRNA utilizado no presente trabalho.

A visualização dos dsRNAs de *AST* e *ASTR* sintetizados foram confirmadas em gel de agarose 1% (Figura 28).

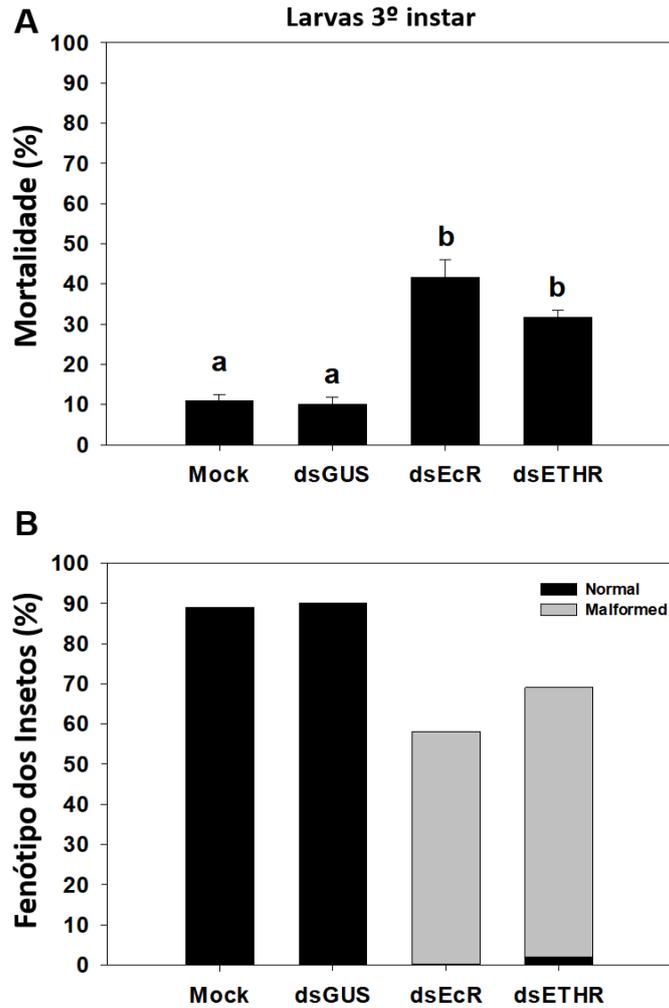


**Figura 28.** Síntese do dsRNA de *AST* e *ASTR*. Fragmento de dsRNA *AST* de aproximadamente 400 pb e dsRNA *ASTR* de aproximadamente 150 pb. Legenda: M – marcador. A seta vermelha indica o dsRNA utilizado no presente trabalho.

## 5.4. Efeito da administração dos dsRNAs em larvas de *A. grandis*

### 5.4.1. Análises para os genes *EcR* e *ETHR*

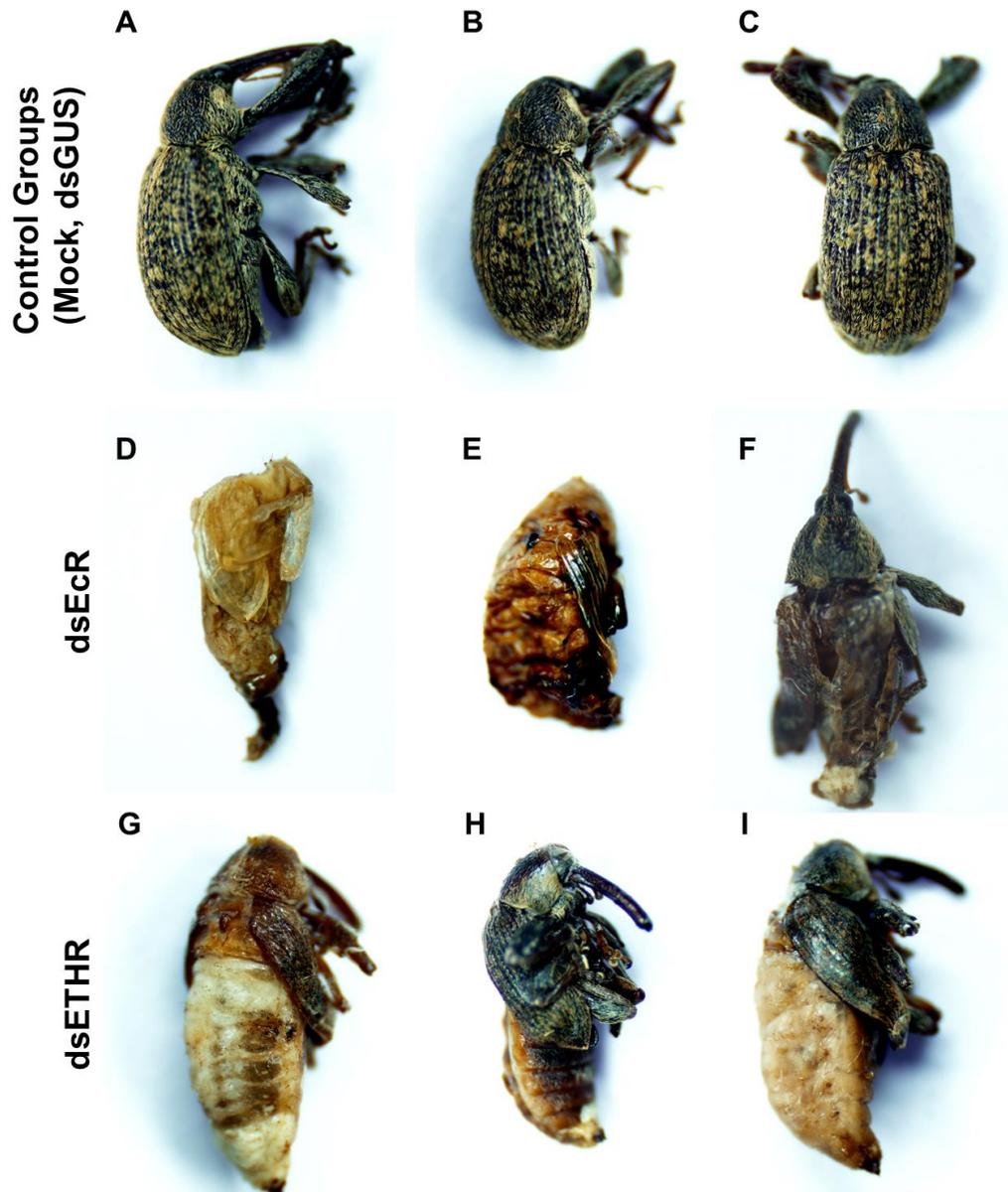
As larvas de 3<sup>o</sup> ínstar microinjetadas com dsRNA para o gene *EcR* apresentaram mediana de mortalidade em torno de 40%, e quando comparadas aos controles, H<sub>2</sub>O (Mock) e dsRNA *GUS*, existindo diferença significativa em relação aos controles. Para o dsRNA de *ETHR* a mediana de mortalidade apresentada foi em torno de 30%, também com diferença significativa (Figura 29 A). A relação das larvas de 3<sup>o</sup> ínstar sobreviventes microinjetadas com dsRNA e que conseguiram chegar a fase adulta sem malformações, portanto adultos viáveis, representou 0% para o dsRNA de *EcR*, enquanto para o dsRNA de *ETHR* o valor foi de 3%, em comparação a aproximadamente 90% para os controles. Quando comparados aos controles, os dsRNAs de *EcR* e *ETHR* inviabilizam os insetos sobreviventes no tratamento, apontando um papel essencial desses genes para sobrevivência e viabilidade de *A. grandis* (Figura 29 B).



**Figura 29.** Mortalidade de larvas de 3<sup>o</sup> instar de *A. grandis* após microinjeção com 500 ng de dsRNA para os genes *EcR* e *ETHR* (A) e caracterização fenotípica dos insetos sobreviventes (B). Letras diferentes mostram diferença estatística após ANOVA e comparação mensural de Tukey ( $p < 0,05$ ). A mortalidade para *EcR* foi em torno de 40%, para *ETHR* foi em torno de 30%, enquanto para o controle foi abaixo de 15%. Em complemento, os insetos que sobreviveram a microinjeção e chegaram a fase adulta apresentando fenótipos normal foram 0% para *EcR* e 3% para *ETHR*, enquanto 100% do controle obteve fenótipo normal.

A administração de 500 ng de dsRNA de *EcR* e *ETHR* em larvas do 3<sup>o</sup> instar resultou em vários fenótipos. Para o dsRNA de *EcR* vários insetos conseguiram chegar à fase adulta, mas apresentavam má-formação nos élitros, asas, abdômen e dorso. Os élitros foram reduzidos, as asas e abdômen aparentaram uma massa de células única não distinguível (Figura 30 D-F). No

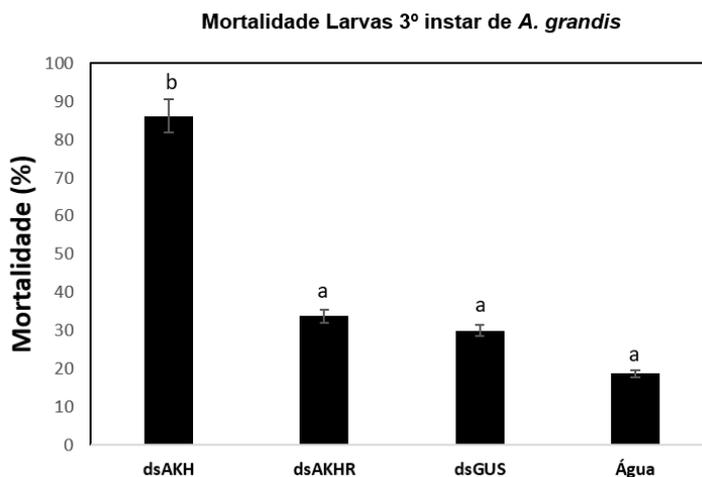
caso do dsRNA de ETHR houve apenas um fenótipo resultante a partir das larvas microinjetadas, um híbrido entre pupa/adulto, fenótipo letal e que inviabilizou a sobrevivência destes insetos (Figura 30 G-I).



**Figura 30.** Fenótipos de insetos de *A. grandis* após microinjeção de dsRNA 500ng em larvas de 3º ínstar. Imagens de insetos sobreviventes dos tratamentos controle (Mock e dsGUS) (A-C); dsRNA de EcR com múltiplos fenótipos de má-formação no abdômen, dorso, asas e élitro (D-F) e dsRNA de ETHR com único fenótipo híbrido entre pupa/adulto (G-I).

#### 5.4.2. Análises para os genes *AKH* e *AKHR*

As larvas de 3º instar microinjetadas com dsRNA *AKH* e *AKHR* apresentaram mediana de mortalidade acima de 80% para a administração do dsRNA *AKH* e em torno de 35% para o dsRNA *AKHR*, e quando comparadas aos controles, água e dsRNA *GUS*, existe diferença significativa apenas quanto ao dsRNA *AKH* em relação aos demais (Figura 31).



**Figura 31.** Mortalidade de larvas de 3º instar de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA de *AKH* e *AKHR*. Letras diferentes mostram diferença estatística após ANOVA e comparação mensural de Tukey ( $p < 0,05$ ). A mortalidade para *AKH* foi acima de 80%, para *AKHR* foi em torno de 35%, enquanto para o controle foi abaixo de 30%.

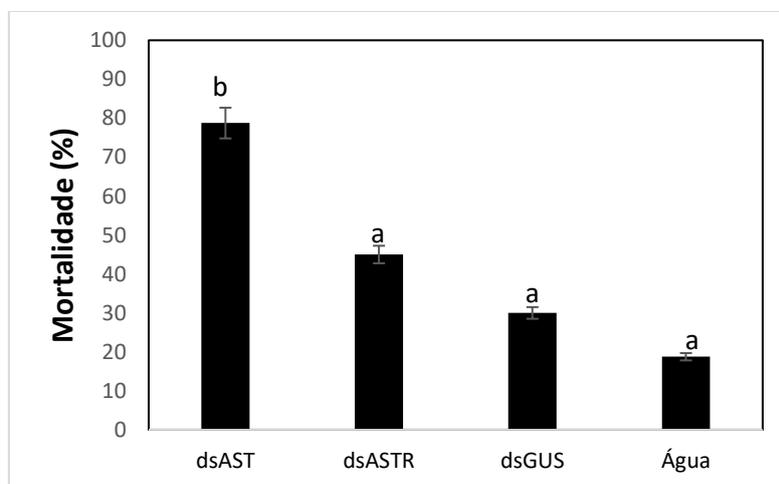
A administração do dsRNA de *AKH* em larvas do 3º instar resultou em um fenótipo híbrido entre pupa/adulto observado nos insetos sobreviventes submetido à administração deste dsRNA, muito similar ao fenótipo letal resultante da administração do dsRNA de *ETHR* (Figura 30 G-I) e que também inviabilizou sua sobrevivência (Figura 32). Para o dsRNA *AKHR* não foram observadas alterações morfológicas nos insetos que foram administrados o dsRNA via microinjeção em relação aos controles.



**Figura 32.** Morfologia externa dos insetos de *A. grandis* após microinjeção de dsRNA para o gene *AKH* em larvas de 3º instar. À direita insetos com fenótipo híbrido pupa/adulto, comparados ao controle, adulto com desenvolvimento normal, à esquerda.

#### 5.4.3. Análises para os genes *ACP* e *ACPR*

As larvas de 3º instar microinjetadas com dsRNA *ACP* e *ACPR* apresentaram mediana de mortalidade em torno de 30% para a administração do dsRNA *ACP* e em torno de 80% para o dsRNA *ACPR*, e quando comparadas aos controles, água e dsRNA *GUS*, existe diferença significativa apenas quanto ao dsRNA *ACPR* em relação aos demais (Figura 33).



**Figura 33.** Mortalidade de larvas de 3º ínstar de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA de *ACP* e *ACPR*. Letras diferentes mostram diferença estatística após ANOVA e comparação mensural de Tukey ( $p < 0,05$ ). A mortalidade para *ACP* foi em torno de 30%, para *ACPR* foi em torno de 80%, enquanto para o controle foi abaixo de 30%.

A administração do dsRNA de *ACP* em larvas do 3º ínstar resultou em vários fenótipos: pupas estacionadas sem desenvolvimento ou escurecidas que não conseguiram completar a metamorfose e adultos com malformações nos élitros e asas (Figura 34).



**Figura 34.** Morfologia externa dos insetos de *A. grandis* resultantes após microinjeção de dsRNA para o gene *ACP* em larvas de 3º ínstar. À direita, insetos estacionados na fase de pupa e escurecidos, e adultos com má-formação nos élitros e asas, comparados ao controle, adulto com desenvolvimento normal, à esquerda.

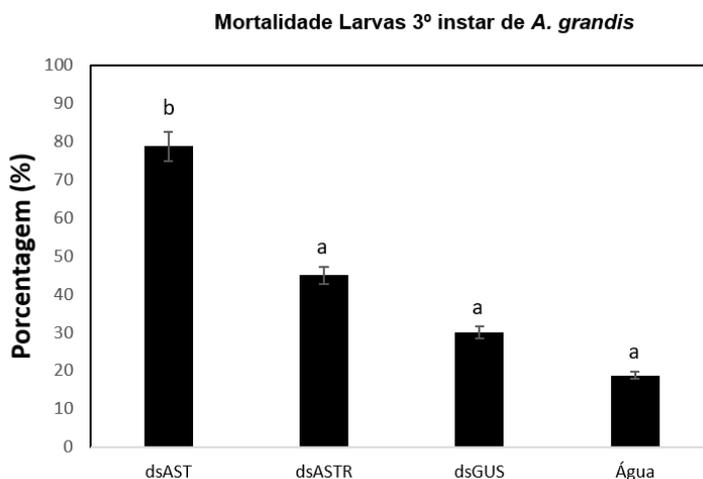
A administração do dsRNA de *ACPR* em larvas do 3º ínstar resultou em um único fenótipo, híbrido pupa/adulto com leve esclerotização, mas sem término da metamorfose para adulto (Figura 35).



**Figura 35.** Morfologia externa dos insetos de *A. grandis* após microinjeção de dsRNA para o gene ACPR em larvas de 3º ínstar. À direita, insetos híbridos pupa/adulto com leve esclerotização, comparados ao controle, adulto com desenvolvimento normal, à esquerda.

#### 5.4.4. Análises para os genes *AST* e *ASTR*

As larvas de 3º ínstar microinjetadas com dsRNA *AST* e *ASTR* apresentaram mediana de mortalidade em torno de 70% para a administração do dsRNA *AST* e em torno de 40% para o dsRNA *ASTR*, e quando comparadas aos controles, água e dsRNA *GUS*, existe diferença significativa apenas quanto ao dsRNA *AST* em relação aos demais (Figura 36).



**Figura 36.** Mortalidade de larvas de 3º ínstar de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA de *AST* e *ASTR*. Letras diferentes mostram diferença estatística após ANOVA e comparação mensural de Tukey ( $p < 0,05$ ). A mortalidade para *AST* foi em torno de 70%, para *ETHR* foi em torno de 40%, enquanto para o controle foi abaixo de 30%.

A administração do dsRNA de *AST* em larvas do 3º ínstar resultou em vários fenótipos: pupas estacionadas sem desenvolvimento, bastante esclerotizada e larvas com segmentos anteriores próximos à região cefálica dilatados em relação aos demais segmentos do corpo (Figura 37). Para o dsRNA *ASTR* não foram observadas alterações morfológicas nos insetos que foram administrados o dsRNA via microinjeção em relação aos controles.



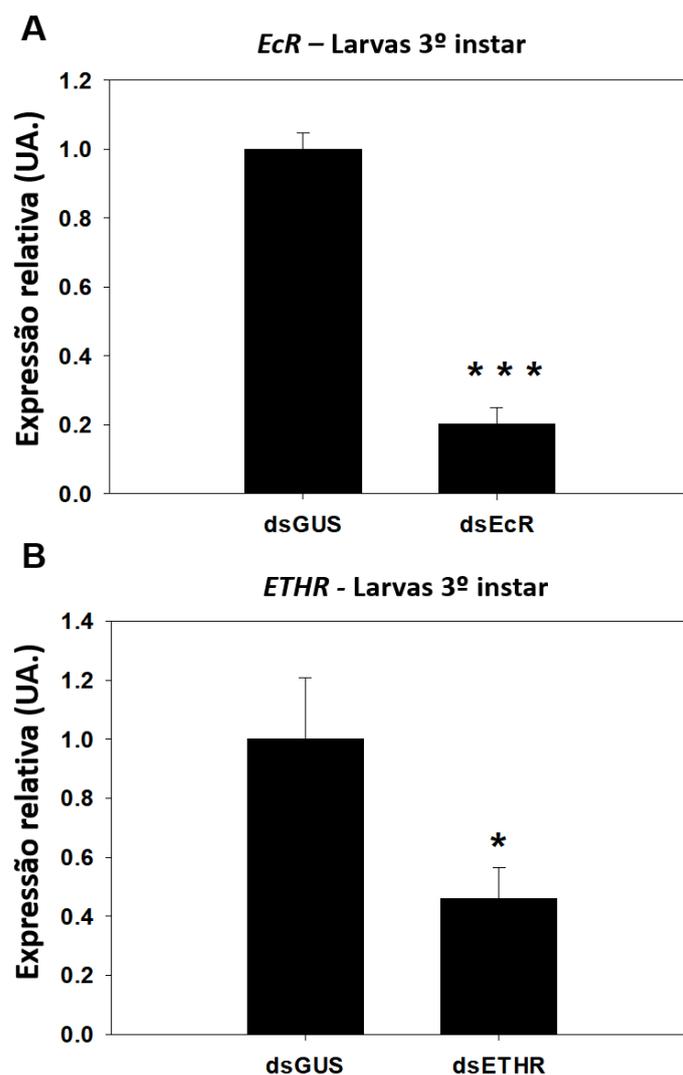
**Figura 37.** Morfologia externa dos insetos de *A. grandis* após microinjeção de dsRNA para o gene *AST* em larvas de 3º ínstar. À direita, insetos estacionados na fase de pupa, com intensa esclerotização e larvas com segmentos anteriores dilatados, comparados ao controle, adulto com desenvolvimento normal, à esquerda.

## **5.5. Avaliação molecular da administração do dsRNA – efeito da microinjeção do dsRNA na expressão gênica em larvas de *A. grandis*.**

### **5.5.1. Análises para os genes *EcR* e *ETHR***

Para compreender os efeitos da administração do dsRNA *EcR* e *ETHR* durante o desenvolvimento de *A. grandis*, foi realizada a quantificação dos transcritos destes genes por RT-qPCR. O RNA total foi extraído de larvas microinjetadas para os diferentes tratamentos, conforme descrito anteriormente. A quantificação relativa do gene foi relativizada com a quantidade de expressão relativa do controle água, sendo considerado um (1).

Para a administração do dsRNA *EcR*, a análise da quantificação dos transcritos demonstrou que a expressão do gene *EcR* foi suprimida em relação ao controle dsRNA *GUS*, em torno de 5 vezes, confirmando seu silenciamento e apresentando diferença significativa (Figura 38 A). Para a administração do dsRNA *ETHR*, a análise mostrou a supressão do gene em relação ao controle dsRNA *GUS*, em torno de 2 vezes, confirmando seu silenciamento e apresentando diferença significativa (Figura 38 B).

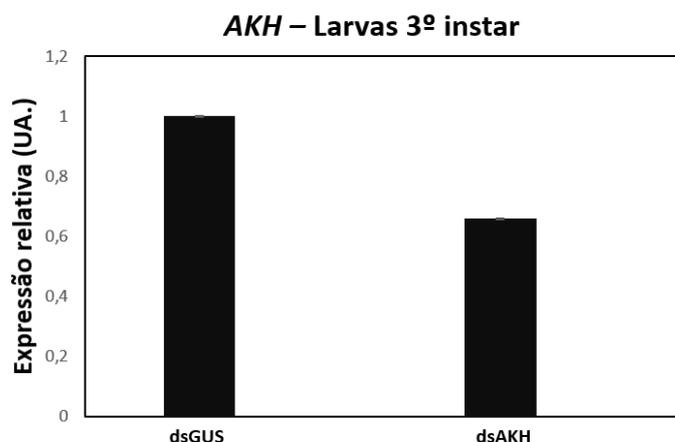


**Figura 38.** Níveis de expressão relativa de *EcR* (A) e *ETHR* (B) em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500 ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para os genes *EcR* e *ETHR* em larvas de 3<sup>o</sup> instar. Valores de expressão relativa em unidade arbitrária (UA). O silenciamento gênico de *EcR* resultou em supressão do nível de transcritos em torno de 5 vezes em relação ao *GUS*. Para o *ETHR* a supressão no nível de transcritos foi em torno de 2 vezes em relação ao *GUS*.

### 5.5.2. Análises para o gene *AKH*

Para compreender os efeitos da administração do dsRNA *AKH* durante o desenvolvimento de *A. grandis*, foi realizada a quantificação dos transcritos deste gene por RT-qPCR, conforme mesma metodologia detalhada anteriormente para *EcR* e *ETHR*. Para a administração do dsRNA *AKH*, a

análise preliminar mostrou a supressão do gene em relação ao controle dsRNA *GUS*, em torno de 1,5 vezes (Figura 39).

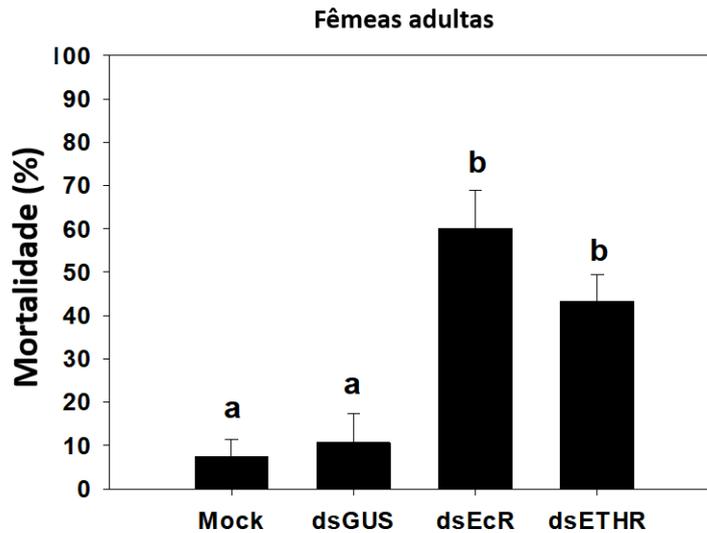


**Figura 39.** Níveis de expressão relativa do gene de *AKH* em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para o gene de *AKH* em larvas de 3º instar. Valores de expressão relativa em unidade arbitrária (UA). O silenciamento gênico de *AKH* resultou em supressão do nível de transcritos em torno de 1,5 vezes em relação ao *GUS*.

## 5.6. Efeito da microinjeção do dsRNA em fêmeas adultas de *A. grandis*

### 5.6.1. Análises para os genes *EcR* e *ETHR*

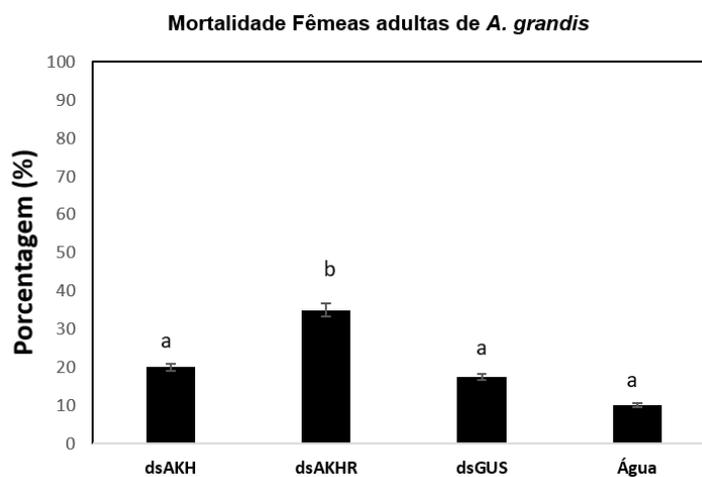
As fêmeas submetidas a administração com dsRNA *EcR* e *ETHR* apresentaram uma mediana para mortalidade de aproximadamente 60% para o dsRNA *EcR*, e aproximadamente 50% para o dsRNA *ETHR*, ambos apresentando diferença significativa em relação aos controles (Figura 40).



**Figura 40.** Mortalidade de fêmeas adultas de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene de *EcR* e *ETHR*. Letras diferentes mostram diferença estatística após ANOVA e comparação mensural de Tukey ( $p < 0,05$ ). A mortalidade para *EcR* foi em torno de 60%, para *ETHR* foi em torno de 50%, enquanto para o controle foi abaixo de 15%.

### 5.6.2. Análises para os genes *AKH* e *AKHR*

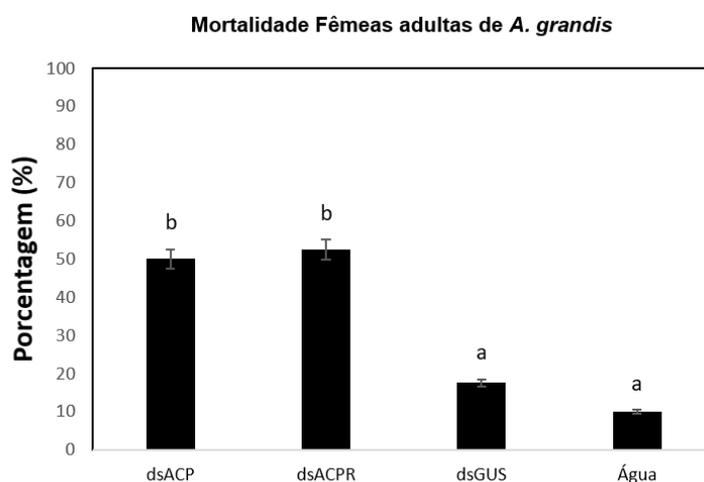
As fêmeas submetidas a administração com dsRNA *AKH* e *AKHR* apresentaram uma mediana para mortalidade de aproximadamente 20% para o dsRNA *AKH*, e aproximadamente 35% para o dsRNA *AKHR*, e apenas o dsRNA *AKHR* apresentou diferença significativa em relação aos demais (Figura 41).



**Figura 41.** Mortalidade de fêmeas adultas de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene de *AKH* e *AKHR*. Letras diferentes mostram diferença estatística após ANOVA e comparação mensural de Tukey ( $p < 0,05$ ). A mortalidade para *AKH* foi em torno de 20%, para *AKHR* foi em torno de 35%, enquanto para o controle foi abaixo de 20%.

### 5.6.3. Análises para os genes *ACP* e *ACPR*

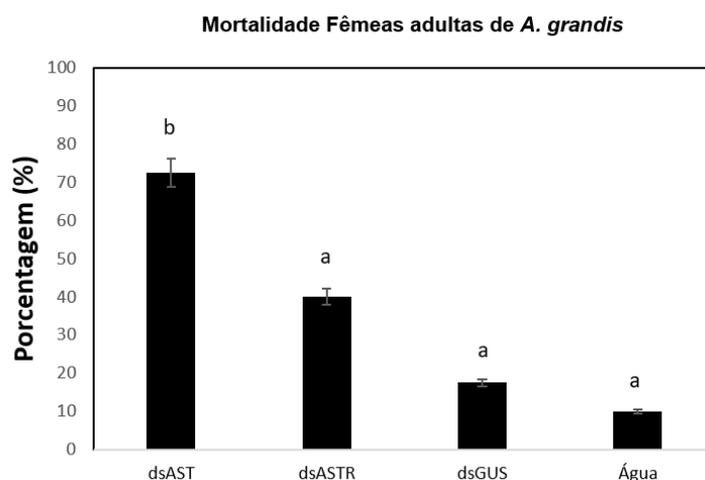
As fêmeas submetidas a administração com dsRNA *ACP* e *ACPR* apresentaram uma mediana para mortalidade de aproximadamente 50% para o dsRNA *ACP* e *ACPR*, e ambos apresentaram diferença significativa em relação aos controles (Figura 42).



**Figura 42.** Mortalidade de fêmeas adultas de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene de *ACP* e *ACPR*. Letras diferentes mostram diferença estatística após ANOVA e comparação mensural de Tukey ( $p < 0,05$ ). A mortalidade para *ACP* e *ACPR* foi em torno de 50%, enquanto para o controle foi abaixo de 20%.

### 5.6.4. Análises para os genes *AST* e *ASTR*

As fêmeas submetidas a administração com dsRNA *AST* e *ASTR* apresentaram uma mediana para mortalidade de aproximadamente 70% para o dsRNA *AST*. Para o dsRNA *ASTR* a mortalidade foi de aproximadamente 40%, e houve diferença significativa apenas do dsRNA *AST* em relação aos demais (Figura 43).



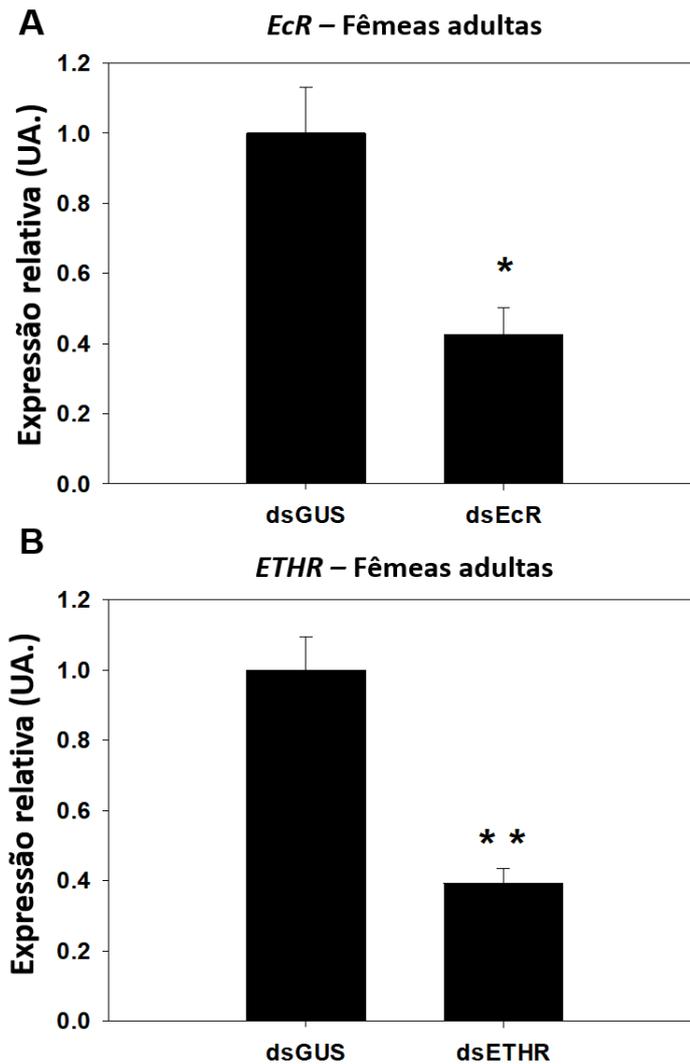
**Figura 43.** Mortalidade de fêmeas adultas de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene de *AST* e *ASTR*. Letras diferentes mostram diferença estatística após ANOVA e comparação mensural de Tukey ( $p < 0,05$ ). A mortalidade para *AST* foi em torno de 70%, para *ASTR* foi em torno de 40%, enquanto para o controle foi abaixo de 20%.

## 5.7. Avaliação molecular da administração do dsRNA – efeito da microinjeção do dsRNA na expressão gênica de fêmeas adultas de *A. grandis*.

### 5.7.1. Análises para os genes *EcR* e *ETHR*

Para a análise molecular resultante da administração do dsRNA em fêmeas adultas o RNA total foi extraído de fêmeas microinjetadas com os diferentes tratamentos, conforme descrito anteriormente. A quantificação relativa do gene foi relativizada com a quantidade de expressão relativa do controle água, sendo considerado um (1), assim como realizado em larvas de 3º ínstar.

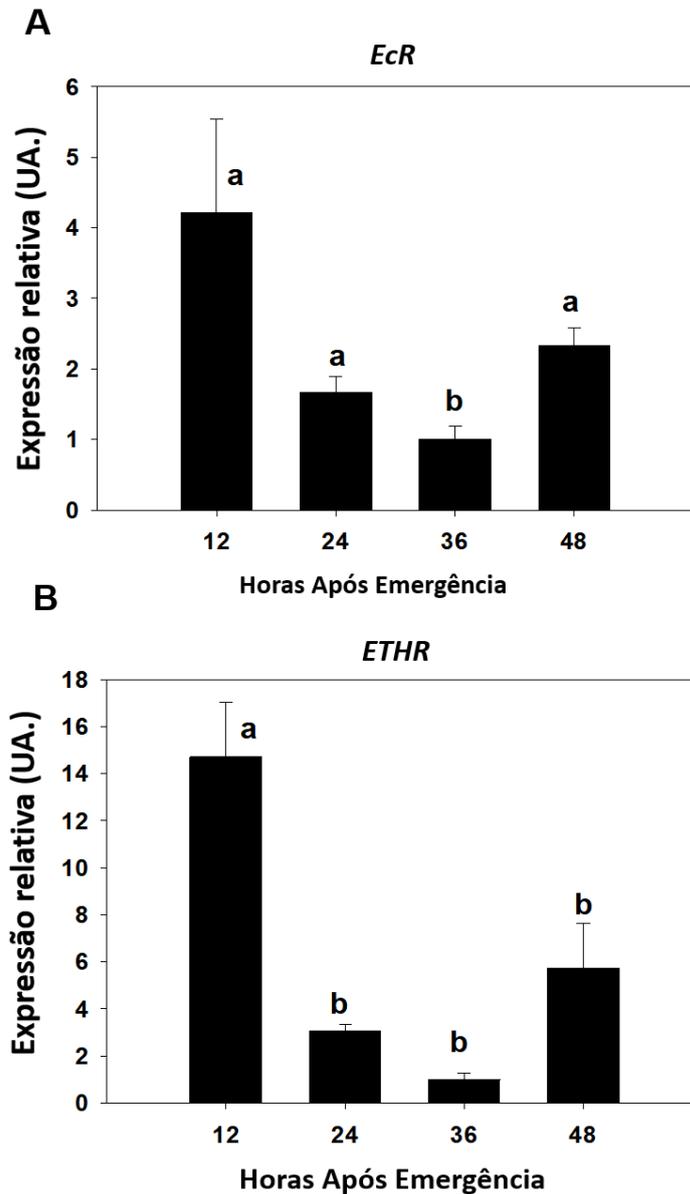
Para compreender os efeitos da administração do dsRNA *EcR* e *ETHR* em fêmeas adultas de *A. grandis*, foi realizada a quantificação dos transcritos demonstrando que a expressão dos genes *EcR* e *ETHR* foi suprimida em relação ao controle dsRNA *GUS*, em torno de 2,5 vezes para ambos, confirmando seu silenciamento e apresentando diferença significativa (Figura 44 A e B).



**Figura 44.** Níveis de expressão relativa de *EcR* e *ETHR* em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para o gene de *EcR* **(A)** e *ETHR* **(B)** em fêmeas adultas. Valores de expressão relativa em unidade arbitrária (UA). Os silenciamentos gênicos de ambos os genes, *EcR* e *ETHR*, resultaram em supressão do nível de transcritos em torno de 2,5 vezes em relação ao *GUS*.

Posteriormente, foi analisado o perfil de expressão dos genes *EcR* e *ETHR* em fêmeas jovens adultas às 12, 24, 36 e 48 horas após a emergência por RT-qPCR. Para *EcR*, a expressão foi menor 36 horas após a emergência, sem diferença estatística entre os demais tempos (Figura 45 A). Embora para *ETHR* a expressão seja significativamente alta apenas 12 horas após a

emergência. Nota-se também um perfil similar de comportamento ao longo das horas, com quedas em 24 e 36 horas e posterior aumento em 48 horas (Figura 45 B). Ambos os resultados demonstram que esses genes são necessários logo após o surgimento da fêmea adulta de *A. grandis*, e a administração do dsRNA ocorreria no período mais baixo da expressão relativa, entre 24 a 36 horas.

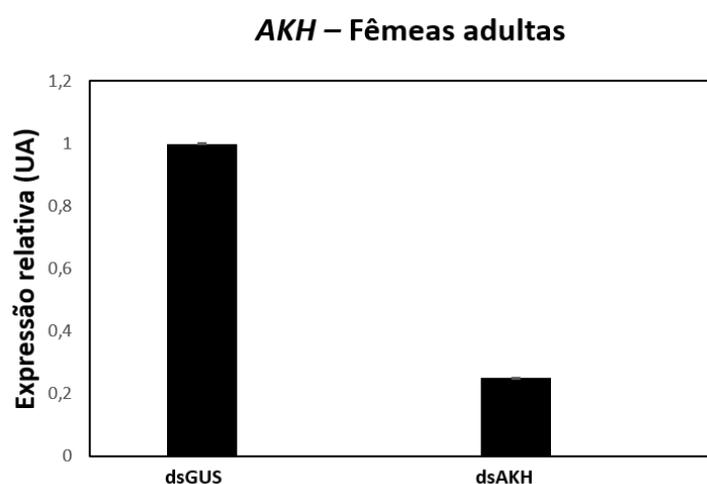


**Figura 45.** Níveis de expressão relativa dos genes *EcR* (A) e *ETHR* (B) em fêmeas de *A. grandis* 12, 24, 36 e 48 horas após emergência. Valores de expressão relativa em unidade arbitrária (UA). Os genes *EcR* e *ETHR* apresentaram níveis de transcritos maiores 12 horas após a emergência das fêmeas adultas. Observa-se também o perfil de queda em 24 e 36 horas e posterior aumento em 48 horas para ambos os genes.

### 5.7.2. Análises para o gene *AKH*

Para compreender os efeitos da administração do dsRNA *AKH* durante o desenvolvimento de *A. grandis*, foi realizada a quantificação dos transcritos deste gene por RT-qPCR, conforme mesma metodologia detalhada anteriormente para *EcR* e *ETHR*.

Para a administração do dsRNA *AKH*, a análise preliminar da quantificação dos transcritos demonstrou que a expressão do gene *AKH* foi suprimida em relação ao controle dsRNA *GUS*, em torno de 3 vezes (Figura 46).



**Figura 46.** Níveis de expressão relativa do gene *AKH* em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para o gene *AKH* em fêmeas adultas. Valores de expressão relativa em unidade arbitrária (UA). O silenciamento gênico de *AKH* resultou em supressão do nível de transcritos em torno de 3 vezes em relação ao *GUS*.

## 6. Discussão

O principal papel da Ecdisona, ETH e seus receptores no processo de ecdise foi comprovado em diferentes insetos (ZITNAN et al., 2007; DAI et al., 2009; PARTHSARATHY et al., 2010; MELLO et al., 2014; DIAO et al., 2015; ISRANI; RAJAM, 2017; SHI et al., 2017). Contudo, em *A. grandis* esse papel não foi ainda confirmado. O presente estudo mostra que *EcR* e *ETHR* são fatores cruciais no processo de ecdise e que o *knockdown* desses genes, mediados por RNAi, resultou em letalidade significativa e interrompeu o processo de ecdise em *A. grandis*.

O Hormônio Ec está intimamente relacionado ao metabolismo de lipídios em *B. mori* e *D. melanogaster*, principalmente durante o estágio de pupa e no processo de ecdise, sugerindo que este hormônio seria importante e capaz de estimular diretamente a lipólise nos corpos gordurosos, em ambos os insetos, nessa fase de alta demanda energética (WANG et al., 2010). No entanto, no presente estudo a maior expressão entre as fases de *A. grandis* ocorreu na fase adulta, mas foi demonstrada a necessidade deste transcrito na transição larva-adulto, devido a mortalidade significativa e as alterações morfológicas observadas.

Em *Zootermopsis nevadensis* (Isoptera: Archotermopsidae), o silenciamento gênico de *EcR* resultou na ecdise interrompida na transição de pré-soldado para soldado, quando administrado o dsRNA nessa primeira fase. Esse processo é de extrema importância, visto que são insetos sociais e a determinação das castas é fundamental para estas espécies. No entanto, quando o silenciamento gênico ocorreu com a administração do dsRNA, já na transição entre estas fases, houve apenas a inibição da esclerotização cuticular, escurecimento do exoesqueleto de insetos, ressaltando assim, a funcionalidade do gene *EcR* em processos que envolvam ecdise e maturação da cutícula nova sintetizada (MASUOKA; MAEKAWA, 2016).

Para *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), a funcionalidade do *EcR* foi testada através da introdução de um microRNA precursor do *EcR* em *E. coli* e entregue via alimentação. Os resultados mostraram que houve problemas no desenvolvimento normal da lagarta e na sobrevivência em relação aos

controles (YOGINDRAN et al., 2016). Em outra análise com *Helicoverpa armigera* e *Plutella xylostella*, a validação funcional do gene *EcR* via alimentação mostrou interrupção e atraso na ecdise, além de alteração na sobrevivência dos insetos (ISRANI; RAJAM, 2017).

No pulgão *Sitobion avenae* (ORDEM: FAMILIA), foi realizada a entrega do dsRNA de *EcR* oralmente, resultando em alterações na sobrevivência e reprodução. Além disso, alterações nas gerações futuras foram observadas (YAN et al., 2016). Um estudo mais recente, em *Drosophila*, demonstra que a ecdisona é capaz de inibir a expressão de outro receptor nuclear, receptor relacionado a estrogênio - ERR, que possui ação no metabolismo de carboidratos, e ambos atuam em conjunto para regulação de fatores transcricionais (KOVALENKO et al., 2019).

A ecdisona é um hormônio bem estudado e conhecido por seu papel na muda e na ecdise de insetos e sua cascata medeia a expressão de diferentes fenótipos e morfologia. O *EcR*, quando silenciado, por exemplo, mostrou diferenças na plasticidade nas asas dos insetos, como pulgões-da-ervilha, barata alemã e *T. castaneum* (CRUZ et al., 2006; TAN; PALLI, 2008; VELLICHIRAMMAL et al., 2017). Para o *EcR*, diferentes fenótipos foram observados, como malformação nas asas, élitros e abdômen. As larvas tratadas também apresentaram metamorfose malsucedida na região cefálica. Fenótipos semelhantes foram encontrados em outros insetos, como *B. germanica*, onde a microinjeção de dsRNA de *EcR* resultou em alterações nas estruturas cuticulares e cefálicas, mandíbula e antena, além de malformação das asas (CRUZ et al, 2006). Quando o *EcR* foi silenciado em *H. armigera*, observou-se a formação de intermediários larvais anormais e anomalias pupais, como a presença de uma cápsula na cabeça e a persistência de muda na larva (ISRANI; RAJAM, 2017). Experimentos realizados com *T. castaneum* mostraram alta mortalidade e os insetos que se tornaram pupas apresentaram fenótipos anormais na extensão da asa (TAN; PALLI, 2008). Recentemente, foi utilizado o dsRNA do receptor de ecdisona (*EcR*) em culturas de batatas transgênicas para controle de *L. decemlineata* com grande sucesso, provando seu grande potencial como gene a ser utilizado no controle de pragas (HUSSAIN et al., 2019).

Todos esses estudos juntos podem ser comparados e se mostram muito similares ao resultado obtido a partir do silenciamento de *EcR* em *A. grandis*, demonstrando uma tendência de conservação de funcionalidade quanto a esse gene em insetos, confirmando também sua importância para metamorfose e ecdise neste coleóptero.

Em seguida, o ETH é o principal fator desencadeante da cascata de ecdisona, atuando diretamente no sistema nervoso central para coordenar as contrações musculares (DAI; ADAMS, 2009; ASCUNCION-UCHI et al., 2010; ROLLER et al., 2010; DIAO et al., 2015). O ETH e seu receptor, ETHR não são tão estudados quanto a Ecdisona e seu receptor, EcR. Iversen et al (2002) investigaram pela primeira vez o receptor *ETH* em *Drosophila* e outros estudos sobre o silenciamento do receptor *ETH* mostraram alta letalidade na ecdise (PARK et al., 2002; ARAKANE et al., 2008; BAI et al., 2011; AREIZA et al., 2014). Em *Schistocerca gregaria* (Ortopetera: Acrididae), o silenciamento de genes mediado por *ETHR* RNAi resultou em 88% de mortalidade na muda de adulto (LENAERTS et al, 2017).

Os fenótipos resultantes da microinjeção de *ETHR* dsRNA em larvas de 3º instar em outros insetos mostraram que estes não são capazes de completar a ecdise, permanecendo em uma forma híbrida, o que também pode ser explicado pela descrição cronológica da ecdise (DAVIS et al., 2007). ARAKANE et al., (2008) realizaram o silenciamento genético de *ETH* e *ETHR* em *T. castaneum* e observaram deficiências na ecdise, especificamente na pré-ecdise. O desenvolvimento dos insetos foi interrompido, não sendo possível concluir o processo e realizar contrações dorso-ventrais, o que resultou em um fenótipo intermediário chamado pré-pupa/adulto. Resumidamente, os insetos eram adultos jovens presos na cutícula da pupa. A esclerotização da cutícula parecia não ser afetada, devido ao escurecimento de partes da cutícula. Portanto, ficou claro que *ETH* e *ETHR* são necessários para a pré-ecdise e sua sequência em *T. castaneum*, um representante da mesma ordem do *A. grandis* e mais estudado.

Outro estudo semelhante ao descrito por BAI et al., (2011), no qual o dsRNA administrado de transcritos de ecdise de pupa-adulto foi realizado em *T. castaneum*, incluindo *ETHR*, resultando em fenótipos aberrantes de uma ecdise

interrompida, malformação nos élitros, desenvolvimento somente da região anterior e esclerotização. Também foram observados fenótipos semelhantes aos observados em *T. castaneum* a partir de pré-ecdise interrompida, descritos como jovens adultos presos na cutícula da pupa (ARAKANE et al., 2008). Os fenótipos resultantes da administração do dsRNA para *ETH* e *ETHR* em *B. dorsalis* mostraram também defeitos na cutícula e letalidade, e, além disso, foram observadas alterações traqueais e restringida a apenas uma das isoformas, *ETHR-A*, que demonstrou funcionalidade quanto a ecdise em larvas (SHI et al., 2017).

Em estudos recentes, com *Schistocerca gregária* (Orthoptera: Acrididae), foi demonstrada a requisição de *ETH* e *ETHR* para a muda através de silenciamento gênico e resultou em um fenótipo único para ambos os genes, com atraso no desenvolvimento da cutícula, exoesqueleto e letalidade (LAENAERTS et al., 2017). Para *Bactrocera dorsalis* (Diptera:Tephritidae) e *Panonychus citri* (Acarida: Tetranychidae), os resultados foram similares, demonstrando a importância destes genes, na ecdise e desenvolvimento normal do inseto (SHI et al., 2017; ZHU et al., 2019).

Todos esses estudos corroboram com os resultados obtidos neste estudo através do silenciamento de *ETHR*, em especial os mais recentes desenvolvidos por SHI et al., 2017 e ZHU et al., 2019, com alta similaridade da descrição morfológica e fenótipo único resultante do silenciamento.

O AKH é um neuropeptídeo associado diretamente ao metabolismo, devido a capacidade de mobilizar estoques energéticos de acordo com as demandas. Em *Drosophila*, foi demonstrado que moscas com grande quantidade de AKH disponível possuíam menores níveis de lipídios (TAG e DAG) do que moscas com níveis de AKH normais. Em contrapartida, as outras fontes energéticas como carboidratos e gorduras não se comportaram como associadas aos níveis de AKH (MOCHANOVÁ et al., 2018). Isso demonstra que a regulação metabólica de mobilização de os estoques energéticos dos três tipos, lipídios, carboidratos e proteínas, não necessariamente deverá estar associada ao AKH e ainda há muito a ser esclarecido sobre a regulação desse neuropeptídeo em insetos. Além das funcionalidades já bem relatadas, de mobilização de gorduras de AKH, este neuropeptídeo também foi testado quanto

a respostas de estresse induzidas por defensivos químicos e insetos de *T. castaneum* que tiveram o *AKH* silenciado e foram expostos a defensivo químico, apresentaram uma mortalidade aumentada em relação ao grupo controle, com *AKH* não silenciado (PLAVSIN et al., 2015). Assim como no presente trabalho, para *A. grandis*, isso confirma sua grande importância no desenvolvimento e sobrevivência em insetos e perspectiva de potencial para aplicação biotecnológica no controle de pragas agrícolas.

O *AKH* é um dos neuropeptídeos mais estudados em insetos, e mutantes de *AKH* em *D. melanogaster* produzidos, utilizando a técnica de CRISPR/ Cas9, mostraram que a regulação de estoques energéticos na fase adulta e resposta ao estresse são mediados por este gene, mas não houve alteração em relação as fases anteriores à metamorfose (GALIKOVA et al., 2015). E isso se contrapõe ao que foi observado neste estudo, demonstrando que para o *A. grandis* este possui importância também em seu desenvolvimento entre as fases larvais e adulto.

Vários estudos demonstram que o *AKH* é fundamental à sobrevivência e reprodução em insetos, demonstrando importância deste neuropeptídeo. Em *A. grandis*, esse transcrito foi testado quanto a sua funcionalidade esperada para o desenvolvimento do inseto, sua alta demanda a longo prazo e corroborou com estudos onde o silenciamento de *AKH* resultou em insetos que eram incapazes de se locomoverem e sobreviverem. (ARRESE et al., 2010; HOU et al., 2017).

O fenótipo resultante do silenciamento de *AKH* em larvas de 3º ínstar foi muito semelhante ao obtido para o silenciamento do gene *ETHR* em *A. grandis*. A microinjeção em larvas de 3º ínstar de ambos os dsRNAs (*AKH* e *ETHR*) foram capazes de interromper a metamorfose entre a fase larval e adulta e geraram um inseto com fenótipo híbrido e más-formações severas que inviabilizam a sobrevivência de *A. grandis* tratados com esses dsRNAs, em comparação aos controles.

O processo de ecdise é complexo, envolvendo a digestão parcial da endocutícula antiga por enzimas a fim de enfraquecer as ligações entre as cutículas e liberá-la para que o inseto possa se desenvolver e chegar à fase adulta. Ademais, alguns compostos também são reciclados e reaproveitados

para síntese da nova cutícula, portanto, é provável também que indiretamente outros hormônios e vias estejam relacionados à ecdise e metamorfose (CHAPMAN, 2013). Outros processos fisiológicos que não aparentam estar relacionados à corpos gordurosos nos insetos, como a ecdise e muda, também estão diretamente ligados ao metabolismo e mobilização de compostos no tecido adiposo. Durante a metamorfose ocorre a apólise, etapa em que há digestão parcial da endocutícula antiga por enzimas a fim de enfraquecer as ligações entre as cutículas e liberar a cutícula antiga para que o inseto possa se desenvolver e chegar à fase adulta (CHAPMAN, 2013).

Pode-se sugerir que as vias hormonais de metamorfose e do metabolismo por transporte de gorduras e carboidratos, necessárias para ecdise e metamorfose de insetos, atuam em conjunto e estão intimamente ligadas através de seus receptores e ligantes que possuem origem evolutiva comum (HAUSER; GRIMMELINKHUIJZEN, 2014).

O ETH possui ação através de uma cascata hormonal induzida pelo hormônio ecdisona (Ec), mas também é estimulado indiretamente através do Hormônio Corazonin (HCRZ) – quando presente na ordem daquele inseto - inicialmente antes da ecdise (ARAKANE et al., 2008; DAVIS et al., 2007). Isto pode ser explicado pela origem evolutiva comum destes receptores AKHR e HCRZR, sugerindo que a partir de duplicações dos receptores e ligantes, seguidas de mutações e seleções surgiram dois sistemas de hormônio-receptor distintos, mas que de certa forma parecem possuir vias metabólicas hormonais que se interligam e podem disparar a resposta fisiológica de forma também semelhante (HAUSER; GRIMMELINKHUIJZEN, 2014).

Seria esperado que assim como para o silenciamento de *AKH*, o silenciamento de seu receptor, *AKHR*, também tivesse grandes alterações na fisiologia de *A. grandis*, devido a sua grande importância relatada na literatura. O silenciamento gênico de *AKHR* em *G. bimaculatus* resultou em diminuição da mobilidade, aumento da frequência de alimentação, e conseqüente aumento de TAG nos corpos gordurosos e resistência à glicose (KONUMA et al., 2012). Em *D. melanogaster* foi visto que as moscas mutantes sem o receptor de *AKH* foram incapazes de mobilizar gorduras e estabelecer o metabolismo normal do inseto (GRONKE et al., 2007).

O silenciamento gênico de *AKHR* em *B. dorsalis* causou a diminuição da atividade sexual em machos no estado não alimentado e diminuição do voo, enquanto em fêmeas a atividade sexual não foi alterada, mas houve queda na fecundidade (HOU et al., 2017).

Há estudos que demonstraram a ausência de sinalização deste hormônio AKH em insetos, como *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), e a ligação não específica de AKH de diversas ordens ao receptor AKHR em *G. bimaculatus* (MARCHAL et al., 2018). Em *N. lugens*, o *AKHR* foi silenciado e resultou em diminuição nos níveis de carboidrato trealose disponíveis e aumentou-os nos corpos gordurosos como estoque. Também foram observadas alterações na reprodução em fêmeas (LU et al., 2019).

Não foi possível esclarecer no presente estudo se em *A. grandis* pode haver outros ligantes mais específicos para o *AKH* como receptores, se há isoformas desse receptor com funcionalidades distintas ou se possuem outras vias alternativas que compensariam seu silenciamento. Com o término do projeto de genoma de *A. grandis* será possível analisar se há isoformas para esses ligantes e com isso estudá-los a fim de estabelecer maiores relações fisiológicas neste inseto, apesar de MARCO e GADE (2019) sugerirem que só há um tipo de *AKHR* para todos os insetos da ordem Lepidoptera, embora possa haver vários ligantes *AKH*.

O neuropeptídeo chamado de ACP com origem evolutiva, também comum a *AKH* e *CRZ*, foi descoberto (HAUSER; GRIMMELINKHUIJZEN, 2014; CHRISTIE et al., 2014). Este peptídeo é estruturalmente intermediário aos dois hormônios. Em *Aedes aegypti*, o estudo de *ACP* demonstrou que ele possui funcionalidade relacionada a pós-ecdise (WAHEDI; PALUZZI, 2018). Atualmente ainda são escassos os estudos com esse neuropeptídeo, devido a sua descoberta ser relativamente recente, ademais, muitas vezes ser anotado como uma forma de *AKH* e *Corazonin*, devido a sua divergência e relação evolutiva próxima, conforme ressaltam ZIEGLER et al., 2010; LI et al., 2016. Além disso, ainda não havia nenhum estudo com *A. grandis* até o presente momento.

Em *T. castaneum*, já foi relatado que esse sistema hormonal ACP/ACPR possui alta expressão relacionado a fase de ovo, e localizado no sistema

nervoso. Em contrapartida, em *R. prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), foi associado ao processo de ecdise em larvas, mas também expresso no sistema nervoso em maior proporção (HANSEN et al., 2010; ZANDAWALA et al., 2015). Em contrapartida ao que foi obtido no presente estudo com *A. grandis*, o ACP sugere estar relacionado a demandas maiores em pré-pupa, pupa, conforme expressão gênica ao longo das fases e fenótipos obtidos a partir do silenciamento de *ACP*, mas também sugere sua íntima relação com ecdise, mais especificamente em adultos. Também em *T. castaneum*, a expressão gênica do receptor de *ACP*, *ACPR*, foram elevados em larvas dos primeiros ínstaes. No entanto, em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), a expressão de *ACP* e seu respectivo receptor, apresentaram-se aumentados nas fases entre pupa e adulto (HANSEN et al., 2010; ZANDAWALA et al., 2015; WAHEDI; PALUZZI, 2018). Os resultados demonstrados para *T. castaneum*, também Coleoptera, corroboram com os dados de expressão ao longo das fases obtidos para *A. grandis* neste estudo, demonstrando maior tendência de expressão nas fases iniciais de larva, especificamente maior em 2º ínstar larval.

Para *T. castaneum* apenas uma isoforma do receptor de *ACP* (*ACPR*) foi identificada, no entanto, para *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) foram identificadas duas isoformas (HANSEN et al., 2010). No presente estudo não foi possível identificar se há isoformas de *ACPR*, mas há perspectivas com o término do projeto genoma de *A. grandis*.

Em *G. bimaculatus*, foi administrado tanto o dsRNA tanto de *AKH*, quanto de *ACP* e houve aumento na busca por alimentação, mas não afetou nos níveis de lipídios circulantes na hemolinfa e sugere que ambos, *AKH* e *ACP* possuem funcionalidade interativa (ZHOU et al., 2018). Esses resultados não sugerem relação para o que foi observado em *A. grandis*, visto que o dsRNA *ACP* gerou interferências mais tardias do que *AKH*, em pupas e adultos, e relacionadas a interferências na sobrevivência em pupas, que podem estar ou não relacionadas à mobilização de estoques energéticos, mas para adultos ficou claro seu papel na ecdise e desenvolvimento normal dos élitros.

No presente trabalho foi realizada a validação funcional do neuropeptídeo *MIP/AST* (AST do tipo B) e o receptor *ASTR* do tipo *PISF/AST* (Receptor AST C) em *A. grandis*. As alostatinas possuem função de regulação hormonal,

principalmente de regulação de hormônio juvenil em alguns tipos e de forma indireta atuam no desenvolvimento e reprodução (STAY; TOBE, 2007). Para *A. grandis*, até o presente momento não havia estudo sobre alostatinas e suas funcionalidades.

O silenciamento gênico de *PISF/AST* (AST C) em *T. castaneum* realizado via microinjeção em pupas mostraram a importância desse neuropeptídeo para o desenvolvimento normal destas, visto que resultou em 50% de insetos com alterações cefálicas, abdominais, nos élitros, atraso no desenvolvimento e esclerotização. A microinjeção com o dsRNA de *MIP/AST* (AST B) na mesma espécie também resultou em alterações morfológicas de 50% e mortalidade de 20%. Alguns insetos conseguiram se desenvolver melhor, mas com alterações no tórax e esclerotização e mortalidade de apenas 10% (ABDEL-LATIEF; HOFFMAN, 2014). Estes resultados confirmam a importância desse neuropeptídeo para o desenvolvimento de insetos, assim como foi observado para *A. grandis*, que resultou em alta mortalidade, em contrapartida as alterações morfológicas foram mais presentes em larvas e pupas.

O silenciamento de *PISF/AST* (AST C) em *S. furgiperda* resultou em elevação dos níveis de HJ na fase larval, e causou uma maior permanência no estágio larval. Em fêmeas adultas houve alterações na reprodução quanto a oviposição (GRIEBLER et al., 2008). Em *A. grandis*, houve também muitos fenótipos resultantes como larvas malformadas, corroborando com sua atuação fundamental na fase larval e desenvolvimento para a fase adulta.

Em *G. bimaculatus*, o silenciamento de *FGL/AST* (AST A) resultou em ganho de peso e redução dos ovários, além de altos níveis de HJ circulantes e baixos níveis de ecdisteróides necessários para a muda. Houve atraso no desenvolvimento larval e mortalidade de 25% causada pela ecdise interrompida, mostrando fenótipos com asas anormais. Para *S. furgiperda*, os níveis de HJ circulantes também se mostraram altos, além de ter causado alta mortalidade, 95%, para larvas e 70% para pupas, além atrofia nos órgãos de reprodução masculinos (MEYERING-VOS et al. 2006). Em contrapartida com o primeiro estudo, a maioria dos insetos de *A. grandis* microinjetado com *MIP/AST* (AST B) não foi capaz de chegar a fase adulta e permaneceu predominantemente na fase

larval ou pupa, se aproximando bastante dos resultados obtidos no segundo estudo, mesmo sendo um tipo de AST distinto.

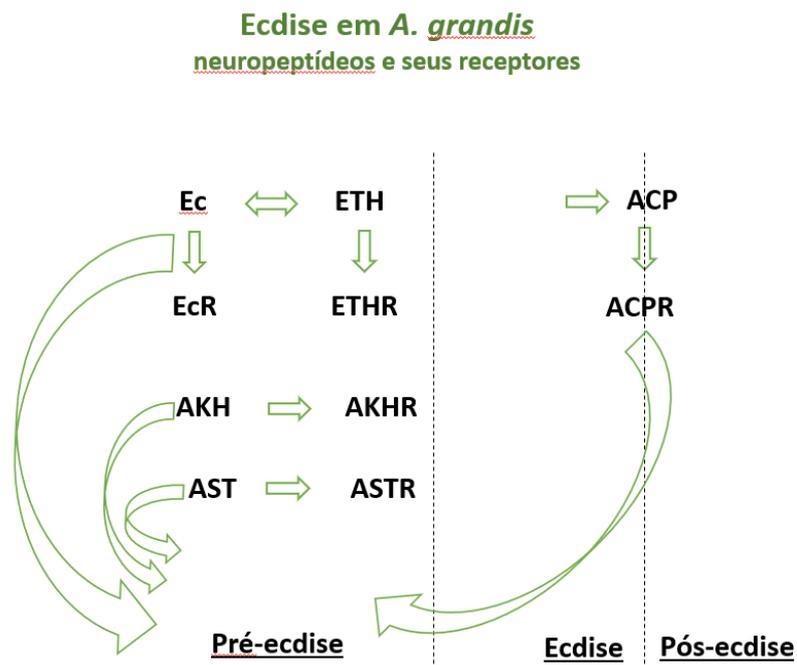
Em *C. anastomosis*, o silenciamento de *PISF/AST* (AST C) mostrou que a administração do dsRNA correspondente resultou em mortalidade em larvas e pupas (DONG et al., 2016). E esse dado também corrobora com nossos resultados obtidos no presente estudo.

Não existem muitos estudos com receptores de alostatinas (ASTRs), sendo predominante o estudo dos neuropeptídeos, mas alguns estudos demonstram sua importância para o desenvolvimento de ferramentas de controle de praga mais específicas através da exploração da ligação neuropeptídeo-receptor ou abordagens filogenéticas (CHRIST et al., 2018; SAHBAZ et al., 2017).

Em *T. castaneum* e coleópteros ainda há muito o que entender sobre alostatinas e principalmente seus receptores. O receptor do tipo *PISCF/AST* (AST C) mostrou alta conservação entre os insetos e com ativação dependente de dose, além de mostrar mais expressão na região cefálica e intestino, mas se mostrou presente em inúmeros tecidos de forma diferenciada, sugerindo funcionalidades diversas (CHRIST et al., 2018). Em *A. grandis*, não foi avaliado o local de maior expressão deste receptor do estudo, mas sugere-se estar presente em diferentes momentos do desenvolvimento, visto os resultados de silenciamento terem resultado em diferentes fenótipos e em diferentes interrompidos em diferentes momentos.

O receptor de *FGL/AST* (AST A) em *Drosophila* mostrou expressão nas células que também produzem AKH. O silenciamento desse receptor causou alteração na resposta de AKH e níveis de lipídios aumentados, sugerindo estar relacionado funcionalmente ao AKH (HENTZE et al., 2015). Em *A. grandis*, não foi possível explorar o local de expressão deste receptor e sua relação com AKH, ressaltando que *FGL/AST* (AST A) não foi alvo do estudo, mas os dados corroboram com o presente estudo em relação a resultar em alterações morfológicas significativas nas larvas em transição para adulto, assim como para *AKH*, mas com fenótipos distintos.

Diante dos resultados obtidos através da validação funcional dos neuropeptídeos e receptores de neuropeptídeos deste estudo, principalmente com os fenótipos resultantes, foi possível traçar um hipotético esquema hipotético da ecdise em *A. grandis*, de acordo com o que já foi descrito na literatura como fases específicas da ecdise, fenótipos e adaptado do esquema inicial proposto por DAVIS et al., 2007. Neste esquema, ficam agrupados com atuação na pré-ecdise, *EcR* e *ETHR*; *AKH* e *AKHR*; *AST* e *ASTR*; e entre a ecdise e pós-ecdise, *ACP* e *ACPR* (Figura 47).



**Figura 47.** Esquema didático hipotético da organização dos neuropeptídeos/receptores de neuropeptídeos de *A. grandis* avaliados neste estudo, nas diferentes divisões da ecdise: pré-ecdise, ecdise e pós-ecdise.

Por fim, não foram observadas alterações na reprodução quanto à quantidade de ovos depositados e viabilidade dos ovos (dados não mostrados). Discute-se sobre a resposta mediada por RNAi ser tecido específico, dependente, ou haver reduzido sinal de amplificação do dsRNA ou de parte de sua maquinaria em tecidos reprodutivos, em algumas espécies como mosca da fruta, *S. gregária* e *L. migratória*, e portanto, quando os tecidos reprodutivos não são alvo a resposta pode se apresentar de forma suprimida ou inexistente

(VOGEL et al., 2019). Para o *A. grandis*, no entanto, não é possível afirmar se isso ocorre.

Estudos com plantas transgênicas que produzem dsRNA contra genes alvo de insetos demonstraram bons níveis de resistência a pragas de insetos, indicando um novo caminho para a obtenção de plantas resistentes a insetos (BAUM et al., 2007; AGRAWAL et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

A aplicação do dsRNA para o controle de pragas é uma perspectiva que vem enfatizando e tem sido a aposta de muitas pesquisas destinadas a melhorar essa ferramenta (KATOCH et al., 2013, NANDETY et al., 2015, PERKIN et al., 2016). O desenvolvimento de pesticidas não agressivos ao meio ambiente utiliza moléculas de insetos, receptores do tipo G, neuropeptídeos, entre outros capazes de regular vários processos fisiológicos (BAUM et al., 2007; AUDSLEY; DOWN, 2015).

Os neuropeptídeos e seus receptores também ganharam destaque nesses estudos por serem a perspectiva de um novo tipo de inseticida altamente seletivo (BENDENA, 2009; SCHERKENBECK; ZDOBINSKY, 2009). Para exemplos atuais, a expressão de dsRNA do hormônio Bursicon em plantas de tabaco demonstrou ser eficaz no controle de *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) e outro exemplo de sucesso é o dsRNA do neuropeptídeo *F* introduzido em plantas de milho, que foi capaz de controlar significativamente *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) (YUE et al., 2017; KHAN et al., 2018).

## 7. Conclusões e perspectivas

Entre os transcritos de neuropeptídeos/receptores de neuropeptídeos avaliados em *A. grandis* que são mais letais (acima de 40% de mortalidade ou com fenótipo letal) a partir da fase larval encontra-se *EcR*, *ETHR*, *AKH*, *ACPR* e *AST*, enquanto para a fase adulta são *EcR*, *ETHR*, *ACP*, *ACPR* e *AST*.

Os genes analisados no presente estudo podem ser usados como ferramentas em plantas transgênicas, inseticidas ou outras metodologias biotecnológicas e podem garantir o controle bem-sucedido de *A. grandis*. Ainda será necessário complementar o estudo com as repetições das análises da expressão gênica ao longo do desenvolvimento e realização das análises de confirmação silenciamento gênico, estatísticas e reorganização dos dados em gráficos definitivos após todas as conclusões experimentais, visto que foram analisados muitos genes com um grande volume de dados obtidos e os que não apresentam análise estatística definida foram ditos preliminares.

Diante disto, a possibilidade de que esses neuropeptídeos ou receptores de neuropeptídeos possam ganhar destaque e serem introduzidos em metodologias de controle de *A. grandis* é grande. O *ETHR* é um bom exemplo de um gene promissor, e já foi introduzido em plantas de algodão geneticamente modificadas (GM) em nosso laboratório. As perspectivas de que esse algodão GM alcance futuramente o mercado é grande, e esforços também estão sendo direcionados para a aplicação dos outros genes potenciais aqui estudados. Ademais, os outros genes também podem ser explorados para utilização no controle e para desvendar como esses neuropeptídeos/receptores atuam em *A. grandis*.

**CAPÍTULO II – Busca e validação de potenciais receptores das toxinas  
Cry1Ba6 e Cry10Aa no intestino de *Anthonomus grandis*, via RNA  
interferente**

## Resumo

As toxinas Cry são uma alternativa de controle de insetos pela especificidade dessas proteínas para determinadas espécies ou ordens. Além disto, essas toxinas não são tóxicas para vertebrados, o que é uma vantagem ambiental e uma alternativa ao uso de inseticidas. Devido a sua utilização no controle de insetos-praga, surgiram também necessidades do entendimento dos mecanismos de ação, ligação aos receptores e pontos que podem modular a resistência às toxinas Cry nas mais variadas ordens de insetos ou espécie de alto interesse agrícola. Os receptores de toxinas Cry são fundamentais nos estudos do entendimento da toxicidade dessas proteínas, visto que são o elo entre a atividade tóxica e a resistência. Estes receptores estão localizados no intestino dos insetos e, recentemente, com a técnica do RNAi foi possível elencar os receptores de determinada toxina em determinada espécie. Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa foi mostrado que plantas geneticamente modificadas expressando a toxina Cry10Aa são eficientes no controle do *A. grandis*, e Cry1Ba6 também se mostrou tóxica. Nesse contexto, no presente estudo foram selecionados possíveis receptores, presentes no intestino médio de *A. grandis*, as toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa. A seleção inicial resultou em 5 candidatos. Em seguida, foram produzidas as toxinas Cry em sistema de expressão heterólogo em *E. coli*, com distintas construções e alterações, mas sem sucesso, pela baixa quantidade de toxina resultante, tornando-se inviável a expressão. Mesmo sem a toxina para os testes de atividade tóxica, os candidatos a receptores foram silenciados para validação gênica e observância de parâmetros como mortalidade. Os experimentos foram realizados em larvas de 3º ínstar e com dose de 500 ng de dsRNA específico para cada gene alvo. Destes, o silenciamento de um gene se mostrou altamente letal, resultando em mortalidade acima de 90% com 500 ng de dsRNA, o gene que codifica para uma proteína tipo *CADERINA* e, mesmo em baixa concentração, 5 ng, a mortalidade foi em torno de 70%. O silenciamento desse gene resultou em um fenótipo letal de larvas escurecidas não desenvolvidas. Portanto, até o presente momento não foi possível validar nenhum receptor de *A. grandis* para a toxina Cry10Aa e Cry1Ba6, mas foi possível identificar um gene altamente letal e que poderá ser utilizado no controle específico de desta importante praga agrícola. via RNAi.

**Palavras-chave:**  $\delta$ -endotoxinas, receptor de toxina, RNA interferente, validação funcional, bicudo-do-algodoeiro

## Abstract

Cry toxins are an insect control alternative due to the specificity of these proteins for certain species or orders. In addition, these toxins are not toxic to vertebrates, which is an environmental advantage and an alternative to the use of pesticides. Due to its use in the control of insect pests, there were also needs to understand the mechanisms of action, connection to receptors and points that can modulate resistance to Cry toxins in the most varied orders of insects or species of high agricultural interest. Cry toxin receptors are essential in studies to understand the toxicity of these proteins, since they are the link between toxic activity and resistance. These receptors are located in the intestine of insects and, recently, with the RNAi technique it was possible to list the receptors of a certain toxin in a certain species. In studies carried out by our research group, it was shown that genetically modified plants expressing the Cry10Aa toxin are efficient in controlling *A. grandis*, and Cry1Ba6 was also toxic. In this context, in the present study, possible receptors, present in the midgut of *A. grandis*, the toxins Cry1Ba6 and Cry10Aa were selected. The initial selection resulted in 5 candidates. Then, the Cry toxins were produced in a heterologous expression system in *E. coli*, with different constructions and alterations, but without success, due to the resulting low amount of toxin, making expression impossible. Even without the toxin for the tests of toxic activity, the candidates for receptors were silenced for gene validation and observance of parameters such as mortality. The experiments were performed on 3rd instar larvae and with a dose of 500 ng of specific dsRNA for each target gene. Of these, silencing a gene proved to be highly lethal, resulting in mortality above 90% with 500 ng of dsRNA, the gene that codes for a CADERIN protein and, even at low concentration, 5 ng, mortality was around 70%. Silencing this gene resulted in a lethal phenotype of undeveloped blackened larvae. Therefore, until now, it has not been possible to validate any *A. grandis* receptor for the toxin Cry10Aa and Cry1Ba6, but it was possible to identify a highly lethal gene that could be used in the specific control of this important agricultural pest. via RNAi.

**Keywords:**  $\delta$ -endotoxins, toxin receptor, interfering RNA, functional validation, cotton boll weevil.

## 8. Introdução

### 8.1. *Bacillus thuringiensis* (Bt) e toxinas Cry

Em 1901, foi isolada a primeira cepa de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (SANCHIS, 2011). Inicialmente, esta bactéria de solo, gram-positiva e aeróbia foi caracterizada pela sua produção de inclusões na forma de cristais e descrita como um agente patogênico para insetos que pode ser encontrada nos mais variados ambientes e locais (BRAVO et al., 1998).

Primariamente, os Bts foram considerados um problema para a indústria que utilizava fontes de criação de bicho-da-seda, mas logo o foco foi voltado para sua utilização entomopatogênica, no controle de insetos que pudessem gerar problemas em culturas de plantas principalmente (SANCHIS, 2011). Um dos patógenos descritos mais bem-sucedido no controle de insetos-praga foram as toxinas oriundas de Bt e tem grande aplicação para o mercado agrícola (BRAVO et al., 2012).

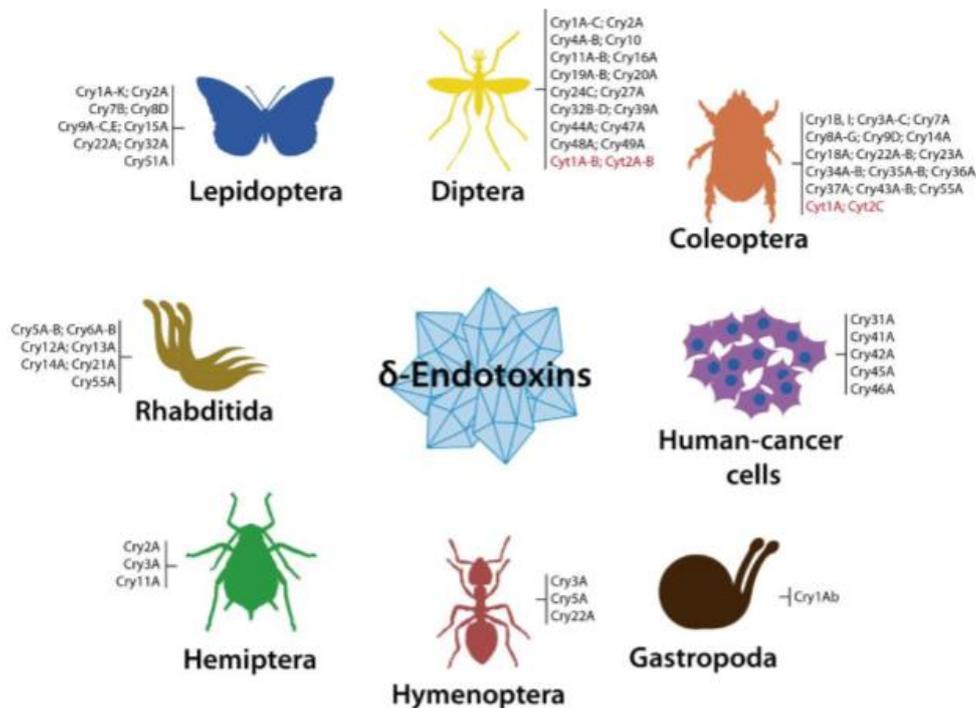
Com o advento da Segunda Guerra Mundial, foram feitos muitos progressos científicos e descobertas das propriedades inseticidas do DDT e dos organofosforados como potenciais inseticidas químicos. Estes compostos foram utilizados largamente na agricultura, controlando as pragas agrícolas, mas sendo altamente nocivo para humanos, animais e o meio ambiente. Os estudos com Bts também continuaram em vários países, buscando um produto à base deste tipo de inseticida, e alguns foram extremamente promissores, como o HD-1, cepa isolada do lepidóptero *Pectinophora gossypiella* (SANCHIS, 2011).

A toxicidade destas bactérias é devida, principalmente, aos cristais paraesporais que a bactéria produz durante a fase de esporulação, mais especificamente na fase estacionária do crescimento. Os cristais produzidos nesta fase são compostos por proteínas Cry ou também chamadas delta-endotoxinas (BRAVO et al., 1998). Além disso, a toxicidade do Bt pode se dar por um conjunto de fatores associados, proteínas tóxicas alternativas também podem ser produzidas em associação, como alfa-exotoxina, beta-exotoxina e

muitas outras. Além disso, o próprio esporo pode atuar aumentando a ação tóxica junto as proteínas Cry (JOHNSON; MCGAUGEY, 1996).

Existe uma grande variedade de estirpes de *B. thuringiensis* e de proteínas tóxicas para muitos invertebrados. Além disso, diversas estirpes de Bt são capazes de produzir mais de uma estrutura cristalina proteica e podem ter ação integrada (SANCHIS, 2011). Estes cristais podem apresentar variados formatos, como por exemplo, esférico ou cúbico (MONNERAT; BRAVO, 2000), e serem compostos por mais de uma toxina Cry com diferentes massas moleculares. Os genes para estas toxinas são encontrados principalmente nos plasmídeos e não no DNA cromossômico da bactéria (DE MAAGD et al., 2003).

Foram isoladas até o momento em torno de 800 toxinas Cry (<http://www.btnomenclature.info/>) que são capazes de interagir especificamente com receptores de diversas ordens de insetos e outros tipos de invertebrados (OHBA et al., 2009). Essas toxinas são classificadas de acordo com a sequência primária de aminoácidos e, dessa forma, elas são organizadas em grupos (CRICKMORE et al., 2011). O maior grupo de proteínas Cry são as que possuem 3 domínios (3D) e essas toxinas apresentam atividade específica individual contra diferentes ordens de insetos, nematoides, outros invertebrados e até células humanas cancerígenas, conforme descrito na Figura 48 (PALMA et al., 2014).



**Figura 48.** Esquema da atividade das variadas toxinas Cry oriundas de *Bt* em invertebrados, incluindo diferentes ordens de insetos, e em células cancerígenas humanas. A separação por hífen significa grupo de toxinas e dois pontos significa diferentes toxinas. Fonte: PALMA *et al.*, 2014.

Recentemente foram relatadas atividades tóxicas das proteínas Cry para outros organismos, como o protozoário *Trichomonas vaginalis*, eritrócitos de coelhos, caramujos hospedeiros do verme de esquistossomose e toxicidade hemolítica. Esta última considerada uma ação indesejada observada para a toxina Cry15A. Uma das descobertas de maior importância foi a atividade antibacteriana apresentada por algumas toxinas Cry, como relatado para a toxina Cry13A e Cry14A, visto que muitos estudos utilizam a expressão heteróloga desta toxina em *Escherichia coli* (PALMA *et al.*, 2014).

As delta-endotoxinas Cry estão dentro da classe de proteínas capazes de formar poros (PFTs), que possuem características estruturais e de funcionalidade comuns, causando modificações na membrana e alterações

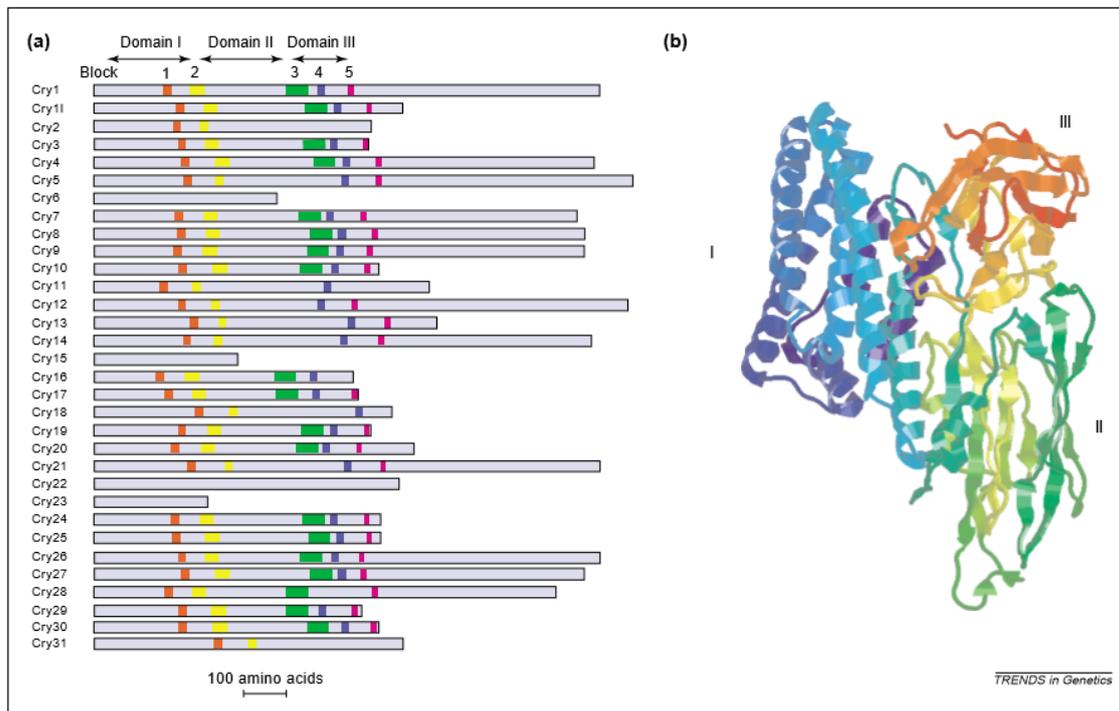
drásticas nas células, pois penetram na membrana alvo em uma forma solúvel. Essas toxinas podem ser classificadas em dois grupos: alfa-PFTs, que formam poros em feixes de alfa-hélice, como exotoxina e colixina, e beta-PFTs, que formam poros através de barril beta, como aerolisina e citolisina (BRAVO et al., 2007, XU et al., 2014).

## **8.2. Estrutura das toxinas Cry**

O cristal da toxina Cry é classificado em relação à homologia da sequência de aminoácidos. Cada pró-toxina recebe um nome que as distingue de acordo com a filogenia, buscando-se identidade entre a sequência primária das proteínas. Há 5 blocos conservados que são comuns à maioria das toxinas (PALMA et al., 2014). Os cinco blocos conservados entre as variedades de toxinas Cry estão em regiões inter-relacionadas aos domínios, o que sugere que são estas estruturas muito importantes para a funcionalidade da proteína e evidenciado por possuírem mecanismo de ação similar (XU et al., 2014; BRAVO et al., 2012; MONNERAT; BRAVO, 2000).

As proteínas Cry 3D possuem três domínios proteicos, o domínio I está relacionado à inclusão da proteína na membrana e na formação dos poros (PRIETO-SAMSÓNOV et al., 1997). Os domínios II e III fazem parte do processo de reconhecimento e ligação ao receptor específico. Em alguns casos, o domínio III também pode contribuir para a formação do poro e participar da organização da estrutura proteica (XU et al., 2014; SANAHUJA et al., 2011; DE MAAGD et al., 2001).

Quanto à constituição, o domínio I, N-terminal, é formado por 7 alfa-hélices, sendo 6 hélices anfipáticas em torno de uma outra hélice. O domínio II é composto por 3 folhas-beta simétricas em conformação de chave grega. O domínio III, C-terminal, é composto por 2 folhas-beta antiparalelas, conforme organizado na figura 49 (PALMA et al., 2014; DE MAAGD et al., 2001).



**Figura 49.** Estrutura primária e terciária de toxinas Cry. **(a)** Blocos conservados – 5, entre as pró-toxinas, quando presentes. Os 3 domínios da toxina ativa mostrados em relação às posições dos blocos. As regiões coloridas são sequências conservadas entre as toxinas. A toxina ativa corresponde aos domínios I, II e III. **(b)** Estrutura tridimensional de uma toxina ativa, Cry1Aa. Fonte: DE MAAGD, 2001.

### 8.3. Mecanismo de ação

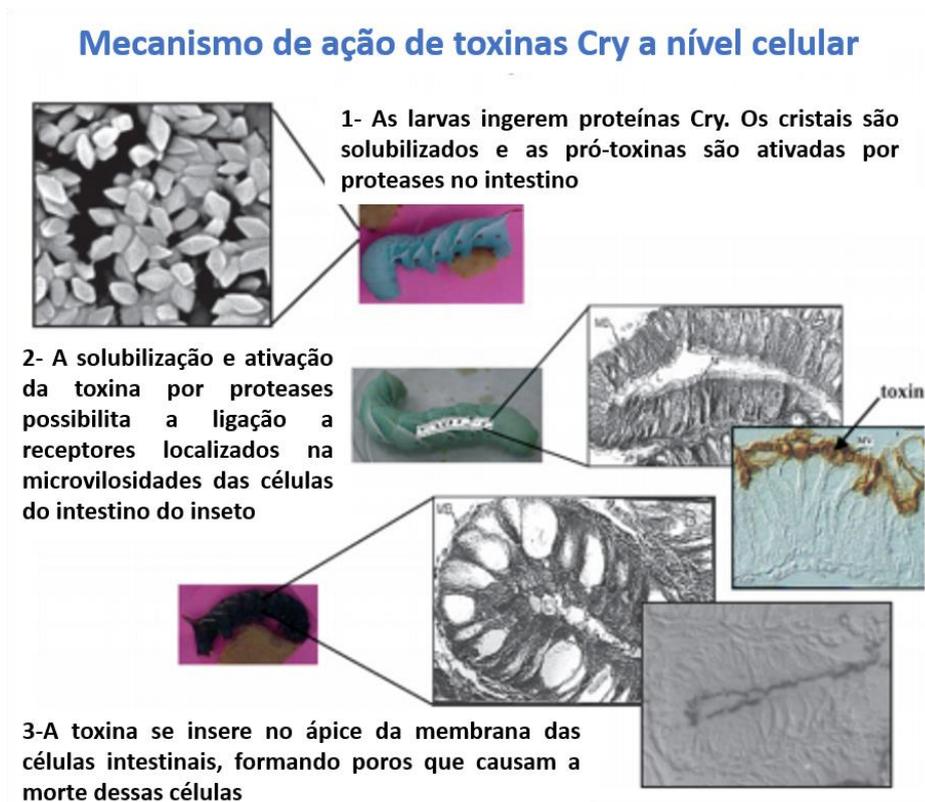
A ação inseticida do Bt por meio das proteínas Cry foi demonstrada pela primeira vez em 1959, utilizando-se inclusões proteicas cristalinas resultantes da esporulação na alimentação de lagartas do bicho-da-seda, *B. mori*, que após a ingestão apresentavam paralisação e septicemia (ANGUS, 1959). A partir daí começou-se o desenvolvimento de bioinseticidas Bt para controlar insetos, principalmente pragas agrícolas (SCHNEPF et al., 1998).

Estas proteínas foram usadas como agentes de controle, inicialmente, em insetos da ordem Lepidoptera e até a década de 70 acreditava-se que só possuía atividade para esta ordem de insetos e, posteriormente, com a descoberta de novas linhagens, cepas de Bt, em dípteros e coleópteros (FRANKENHUYZEN,

2009). Ademais, descobriu-se que algumas proteínas Bt também podem ser tóxicas para nematoides (WEI et al., 2003).

O modelo de mecanismo de ação geral mais aceito para as toxinas Cry inicia com a ingestão e dissolução do cristal no intestino pela ação do pH, ácido, no caso de insetos da ordem Coleoptera, liberando uma ou mais pró-toxinas. Em seguida, ocorre a clivagem da pró-toxina (130 a 140 KDa) no intestino médio por proteases, gerando fragmentos menores de 55KDa a 65KDa (XU et al., 2014; BRAVO et al., 2012; BRAVO et al., 2011; HOFFMANN et al., 1988).

A toxina ativa interage com receptores presentes nas microvilosidades do epitélio intestinal, onde se desencadeia o processo de inserção e formação de poro, que culmina com a desregulação osmótica e lise celular (BRAVO et al., 2012; BRAVO et al., 2007). O sistema digestório do inseto pode ser paralisado e causar a morte dias após a ingestão dos cristais de proteínas. Também pode haver a ingestão dos esporos de Bt, que conseqüentemente germinarão, causando uma septicemia e um efeito sinérgico com as toxinas, conforme mostrado na Figura 50 (SANCHIS, 2011).



**Figura 50.** Mecanismo de ação das toxinas Cry. Ao serem ingeridas pelo inseto, as pró-toxinas são solubilizadas no intestino por proteases, tornando a toxina ativa, que então se ligará ao receptor localizado na membrana das células do intestino. Após a ligação ocorre a formação de poros nestas células e morte por septicemia do inseto. Também é mostrada a ligação da toxina marcada aos receptores no intestino do inseto, à esquerda. Fonte: Adaptado de BRAVO et al., 1992.

Portanto, após serem ingeridas pelo inseto, as proteínas Cry podem ser reconhecidas e ligadas aos receptores específicos na superfície do intestino médio larval e é essa ligação que delimita a ação tóxica das Cry e seu efeito inseticida (JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2017; XU et al., 2014; DE MAAGD et al., 2001).

#### **8.4. Especificidade das toxinas Cry e benefícios como bioinseticida**

Os *Bt* são reconhecidos por sua especificidade na ação tóxica e segurança ambiental para espécies não alvo. Esta ação específica é determinada pela estrutura tridimensional das proteínas que possuem 3 domínios. O domínio I possui similaridade com domínios deformadores de estruturas bacterianas, sustentando seu papel de inserção na membrana celular. O domínio II é variável e é sugerido com alta afinidade para ligação à carboidratos de forma seletiva, acreditando-se que este é o domínio que confere a especificidade do receptor das variadas toxinas. O domínio III está relacionado mais ao reconhecimento de estruturas determinantes em carboidratos e proteínas. (JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2017).

Apesar de haver uma busca por classificar e isolar as toxinas quanto aos ligantes e sua forma de ligação específica, já foi relatado que uma mesma toxina Cry pode ter ação contra insetos de mais de uma ordem, sugerindo que não é apenas a toxina que determina a ação tóxica, mas também outros fatores que são determinados pelos insetos, como possivelmente a estrutura e ligação aos receptores, a solubilização e proteólise da toxina, a passagem pela membrana peritrófica no intestino do inseto, dentre outros (JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2017, PALMA et al., 2014).

Culturas de plantas transgênicas contendo genes de toxinas Cry são utilizados há décadas, em plantas como milho, tomate, batata e algodão e foram essenciais para a redução do custo da produção devido à redução da utilização de inseticidas químicos para controle de insetos-praga (PERLAK et al., 1990; DIVELEY et al., 2016; JAKKA et al., 2016). Entretanto, logo percebeu-se que existem vários processos que podem resultar no desenvolvimento de resistência ao Bt, como mutações que diminuem a atividade de proteases do intestino médio, observadas no inseto *P. interpunctella* (OPPERT et al., 1997). No trabalho de RIE et al. (1990) foi demonstrado que a resistência na população de insetos era causada pela diminuição significativa da afinidade entre a toxina Cry1Ab e seu receptor. Em 2002, FERRÉ e RIEV, provaram que a resistência a toxinas Bt observada para as populações de insetos era devido a mutações específicas no receptor e causam a diminuição da afinidade da toxina pelo receptor.

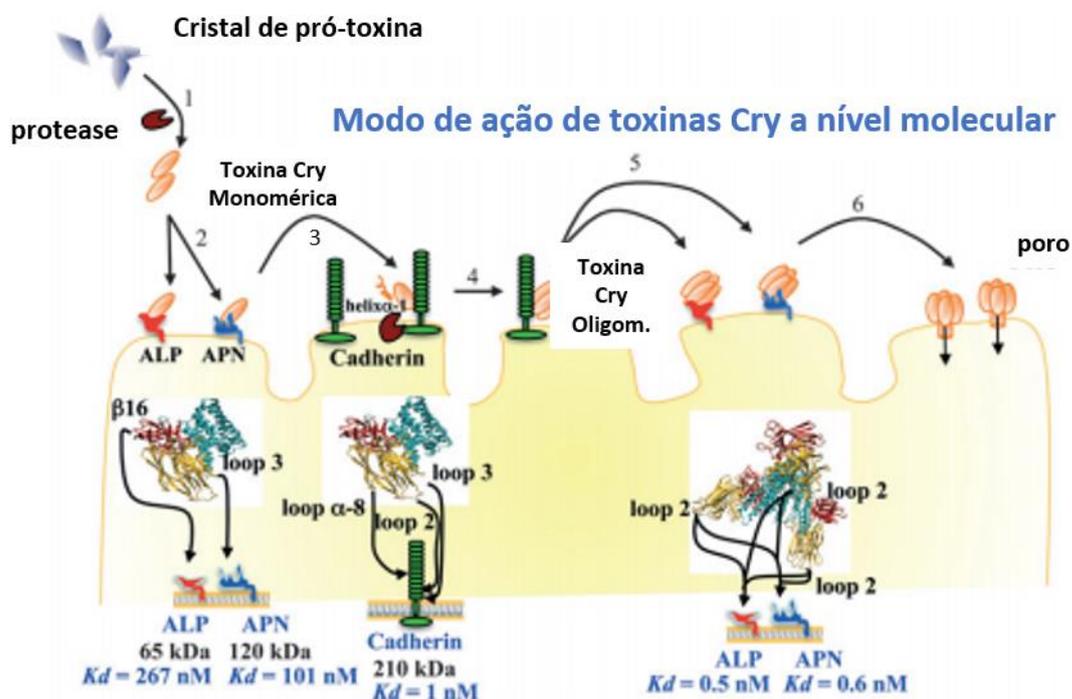
### **8.5. Receptores de toxina Cry**

Existem vários modelos descrevendo a ação das toxinas Cry e ligação ao receptor. Dentre estes, um mecanismo dos mais aceitos para a ligação da toxina ao receptor, e mais comumente estudado e descrito em insetos da ordem Lepidoptera é o modelo descrito a seguir. Inicialmente, o cristal contendo a toxina Cry e outras proteínas ao ser ingerido é solubilizado no intestino médio e as toxinas são clivadas por proteases. Após a clivagem têm-se a toxina ativa a ser reconhecida e ligada ao receptor. Em seguida, ocorre a ligação inicial com proteínas ancoradas a glicosil-fosfatidil-inositol, relatadas como fosfatase alcalina (ALP) e aminopeptidase-N (APN) e com proteínas do tipo caderina, os principais receptores descritos para toxinas Cry. A partir desta ligação primária ocorre a alteração da estrutura da toxina de conformação monomérica para oligomérica. Posteriormente, esta estrutura oligomérica é inserida na membrana, ocasionando a formação de poros e lise celular (BRAVO et al., 2012).

Foi proposto também que a toxina ativa se liga com baixa afinidade aos receptores primários, como ALP e APN, em seguida, ocorre a modificação da conformação monomérica na membrana das células epiteliais do intestino do

inseto e, posteriormente, a toxina se liga com alta afinidade à caderina. A caderina é responsável por remover uma hélice do domínio I, causando a oligomerização da toxina e sua ligação de alta afinidade para inserção na membrana e formação do poro, conforme representado na figura 51 (BRAVO et al., 2011; PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

Outro modelo distinto sugere que a ligação a somente à proteína caderina já seria de alta afinidade, fazendo com que a toxina se insira na membrana e forme os poros, sem o mecanismo descrito nos outros modelos de alteração da conformação monomérica em oligomérica (ZHANG et al., 2006).



**Figura 51.** Mecanismo de ligação da toxina Cry aos receptores no epitélio do intestino de insetos. O cristal da toxina ao ser ingerido é clivado por proteases, resultando na estrutura monomérica da toxina que se ligará aos receptores primários (ALP e APN) e, em seguida, à caderina, que tornará a estrutura da toxina oligomérica. A toxina oligomérica se ligará ao receptor secundário, sendo internalizada na membrana celular, formando poros e causando a lise dessas células e a morte do inseto por septicemia. Fonte: PARDO-LÓPEZ et al., 2013.

O estudo dos receptores para toxinas Cry é mais frequente em insetos da ordem Lepidoptera (JURAT-FUENTES; ADANG, 2006; OCHOA-CAMPUZANO

et al., 2007). Entre os exemplos de estudo com toxinas Cry em Coleoptera, pode-se citar o estudo de metaloprotease do tipo ADAM, que foi descrita como receptor para Cry3Aa no besouro da batata do Colorado (*L. decemlineata*). No entanto, ainda são poucos os estudos sobre receptores dessas toxinas em Coleoptera comparado a Lepidoptera.

Algumas proteínas candidatas a receptores de toxinas Cry para *A. grandis* já foram descritas anteriormente. No trabalho de MARTINS et al. (2010) foi demonstrado que a toxina Cry1Ba6 pode se ligar a proteínas que apresentam atividade de fosfatase alcalina e ancoradas a GPI localizadas no intestino médio deste inseto. A toxina Cry8Ka5 apresentou toxicidade moderada para *A. grandis* e capacidade de se ligar a proteínas do tipo choque térmico, do tipo V-ATPase e proteínas de função ainda não esclarecida (NAKASU et al., 2010). Ademais, um vírus recombinante (Baculovirus) contendo a toxina Cry10Aa demonstrou toxicidade elevada para as larvas do bicudo-do-algodoeiro, mas ainda não foram descritos receptores para esta toxina (AGUIAR et al., 2012).

A ação das toxinas Cry em insetos da ordem Coleoptera foram identificadas em alguns representantes. Em *T. molitor* foi identificada uma caderina como receptor da toxina Cry3Aa e foi demonstrado também que a ligação a esse receptor facilitou a oligomerização da toxina (FABRICK et al., 2009). A mesma toxina foi testada para *D. virgifera* e foi possível identificar também uma caderina como receptor específico (PARK et al., 2009).

Em resumo, receptores de toxina Cry podem ser identificados em diferentes ordens de insetos a partir das similaridades dos 3 domínios, que sugere ser conservado entre os insetos, visto que o mecanismo de ação é reproduzido de forma semelhante (BRAVO et al., 2011). Além disso, o estudo de receptores e da interação toxina-receptor são essenciais para entendimento do mecanismo de ação das toxinas Cry. Este tipo de conhecimento auxilia na prevenção e na superação de casos de resistência de insetos a toxinas Cry, conferindo estratégias de controle de inseto-pragas mais eficientes (BADRAN et al., 2016; DIVELY et al., 2016; RIE et al., 1990; FERRÉ; RIE, 2002).

## 8.6. Toxinas Cry: a alternativa bioinseticida

Controles alternativos aos inseticidas de origem química contra insetos-praga que não sejam agressivos ao meio ambiente e gerem problemas ecológicos e aos demais seres vivos é uma necessidade que está presente desde a década de 1990 (ESTRUCH et al., 1997). O uso descontrolado de inseticidas também prejudicou humanos expostos a estes, incluindo aumento da incidência de câncer e alterações no sistema nervoso e imunológico (DEVINE; FURLONG, 2007). Por conseguinte, pressões ambientais que restringem o uso de inseticidas químicos tornaram o uso de bioinseticidas uma alternativa favorável e segura, como os produtos à base de Bt, que têm se destacado (SANCHIS, 2011).

As toxinas Cry produzidas por estas bactérias estão sendo estudadas e utilizadas nas culturas através de pulverizações ou expressas em plantas transgênicas e têm demonstrado sucesso no controle de insetos-praga, reduzindo o uso de inseticidas (PARDO-LÓPEZ et al, 2009; BRAVO et al., 2011).

A proteína Cry1Ba6, quando introduzida em uma linhagem de Bt acristalífera e produzida na forma de proteína heteróloga, apresentou toxicidade para *A. grandis*, sendo capaz de se ligar às vesículas da membrana da borda em escova (BBMVs) presentes no intestino deste inseto com uma LC<sub>50</sub> (concentração letal mediana) de 305,32 µg/mL (MARTINS et al., 2010). Já a proteína Cry10Aa introduzida em um baculovírus, *Autographa californica* vírus nucleopoliedro múltiplo (AcMNPV) e seu vírus recombinante apresentou alta toxicidade e ligação de forma específica às BBMVs presentes no intestino de *A. grandis* com uma LC<sub>50</sub> de 7,12 µg/mL, demonstrando seu grande potencial no controle deste inseto-praga (AGUIAR et al., 2012).

Plantas de algodão geneticamente modificadas expressando a toxina Cry10Aa, desenvolvidas no mesmo grupo do presente trabalho de tese, demonstraram ser eficientes para o controle do bicudo-do-algodoeiro (RIBEIRO et al., 2017) e os experimentos já estão em fase de análise em campo. Como não existe no mercado nenhuma planta GM de algodão resistente ao bicudo-do-algodoeiro, a probabilidade é grande de que essas plantas, capazes de

expressar a toxina Cry10a, venham ocupar este espaço no mercado e sejam de grande importância para a cotonicultura brasileira. Diante disso, o estudo da ligação/interação entre a toxina com seu(s) receptor(es), que ainda não foram identificados e caracterizados, é extremamente necessário, uma vez que devido à pressão de seleção que poderá ser exercida nos insetos, existe a possibilidade de surgir populações resistentes ao longo dos anos.

Ao compreender o mecanismo de ação das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa, que possuem ação tóxica para *A. grandis*, e identificar seu(s) receptor(es) neste inseto será possível desenvolver ferramentas biotecnológicas que solucionem ou otimizem o controle desta praga através da interação toxina-receptor e, também, auxiliar no entendimento da ação das toxinas Cry em coleópteros.

## **9. Objetivos**

Identificação de possíveis receptores das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa no transcrito do intestino médio de larvas de 3<sup>o</sup> instar de *A. grandis* e validação desses receptores utilizando silenciamento gênico mediado por RNA interferente.

### **9.1. Objetivos específicos**

1 - Produzir e purificar as toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa através de sistema de expressão heterólogo de proteínas em *E. coli* para bioensaio de toxicidade em larvas de 3<sup>o</sup> instar de *A. grandis*.

2 - Validar funcionalmente candidatos a receptores de Cry1Ba6 e Cry10Aa via RNA interferente e entrega das toxinas em larvas de 3<sup>o</sup> instar de *A. grandis*.

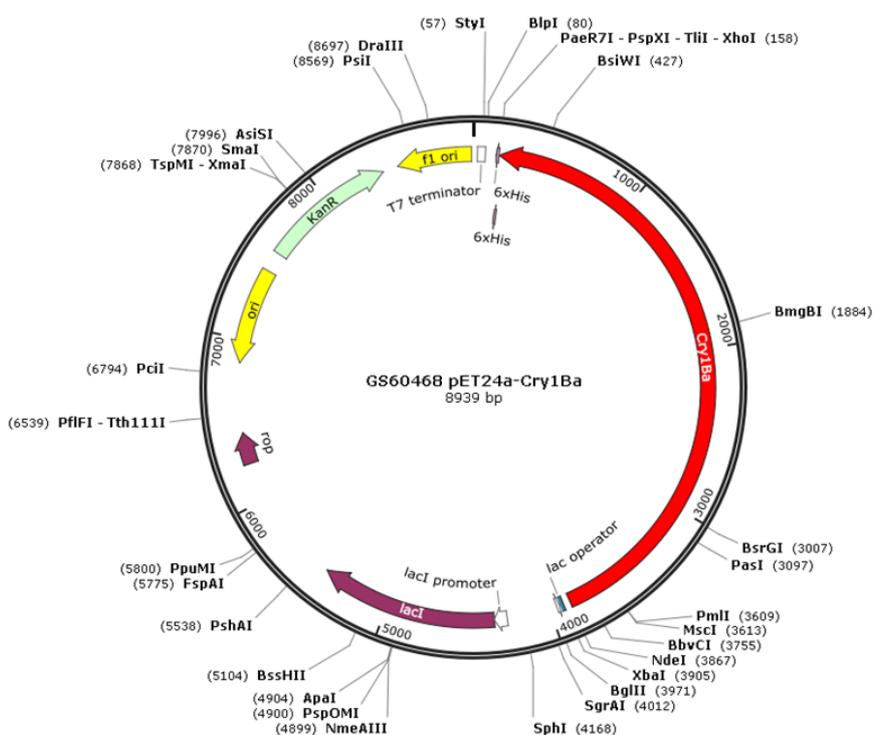
3 – Validar genes identificados como possíveis alvos de controle para *A. grandis*

## 10. Material e métodos

### 10.1. Expressão heteróloga das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa

#### 10.1.1. Plasmídeo de expressão pET24-a contendo o gene da toxina Cry1Ba6

Foi sintetizado comercialmente plasmídeo de expressão pET24-a com a inserção do gene da pró-toxina Cry1Ba6 (Epoch Life Science), conforme mostrado no mapa do vetor (Figura 52).



**Figura 52.** Mapa do vetor de expressão pET24-a contendo o gene da pró-toxina Cry1Ba6.

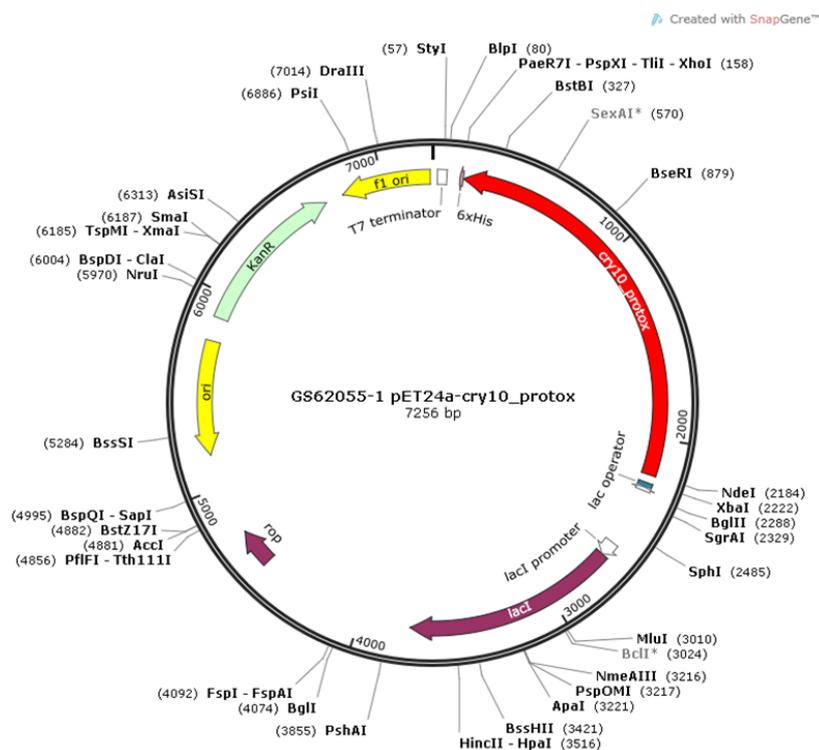
Com a obtenção deste vetor, foi realizada a transformação em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) Origami (Novagen). O vetor foi diluído 100 vezes para transformação por choque térmico com 1  $\mu$ L dessa diluição adicionado à 200  $\mu$ L de células competentes. Essa mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e em seguida, foi realizado o choque térmico a 42 °C por 2

minutos e incubação no gelo. Posteriormente, foi adicionado 500 µL de meio LB líquido foram adicionados à mistura e esta foi incubada por 40 minutos a 37 °C e 200 rpm de agitação.

Após a incubação, as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o antibiótico de seleção, Kanamicina, como mostrado no mapa do vetor (Figura 52) e Cloranfenicol para a célula BL21 (DE3) Origami, e crescidas por 16h em estufa a 37 °C. As colônias que cresceram nesta placa foram selecionadas para outra placa de meio LB sólido e foram feitos os pré-inóculos para digestão e confirmação da transformação. As enzimas utilizadas para a digestão foram NdeI e XhoI, na seguinte reação: 5 µL de água, 0,5 µL de cada uma das enzimas, 1 µL de Tampão 2X e 3 µL de DNA diluído 100 vezes.

### 10.1.2. Plasmídeo de expressão pET24-a contendo o gene da toxina Cry10Aa

Foi sintetizado comercialmente plasmídeo de expressão pET24-a com a inserção do gene da pró-toxina Cry10Aa (Epoch Life Science), conforme mostrado no mapa do vetor (Figura 53).

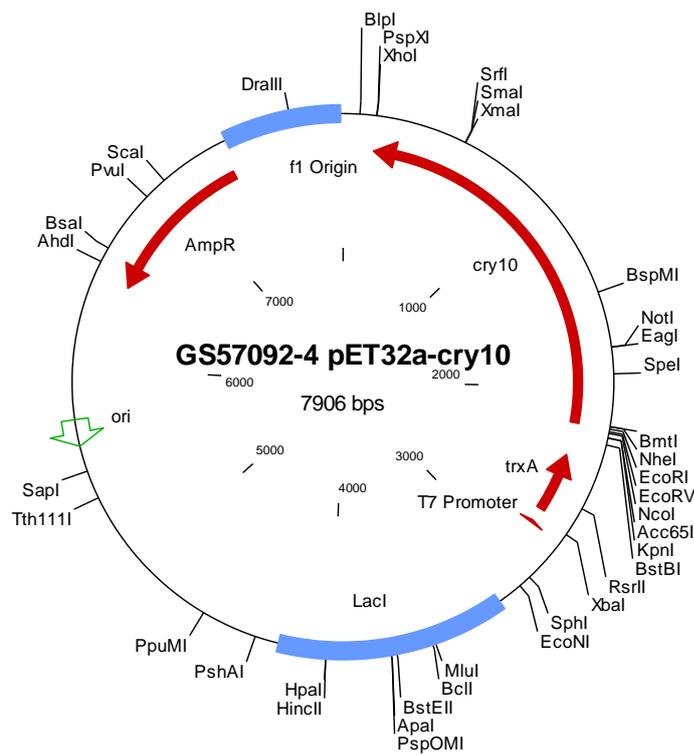


**Figura 53.** Mapa do vetor de expressão pET24-a contendo o gene da pró-toxina Cry10Aa.

Com a obtenção deste vetor, foi realizada a transformação conforme detalhado anteriormente no item 9.1.1.

### 10.1.3. Plasmídeo de expressão pET32-a contendo o gene da toxina Cry10Aa

Foi sintetizado comercialmente plasmídeo de expressão pET32-a com a inserção do gene da pró-toxina Cry10Aa (Epoch Life Science), conforme mostrado no mapa do vetor (Figura 54).



**Figura 54.** Mapa do vetor de expressão pET32-a contendo o gene da pró-toxina Cry10Aa.

Com a obtenção deste vetor, foi realizada a transformação conforme detalhado anteriormente no item 10.1.1., exceto quanto ao antibiótico utilizado, neste caso a ampicilina.

#### **10.1.4. Expressão heteróloga das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa em *E. coli*.**

Após confirmada a transformação, foram realizados os testes das expressões das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa. Para 100 mL de meio LB foram adicionados 1 mL dos receptivos pré-inóculos e os antibióticos de seleção. As culturas foram cultivadas sempre contendo 100 mL de meio TB em Erlenmeyer de volume 1 L de volume. As células foram incubadas a 37°C e 200 rpm de agitação até atingirem a DO<sub>600</sub> de 2.0, adicionado 0,1 mM de IPTG e crescido *over night* em duas diferentes temperaturas para Cry1Ba6 – pET24-a (28 °C e 37 °C), para Cry10Aa – pET 24-a três diferentes temperaturas (15 °C, 28 °C e 37 °C), e para Cry10Aa – pET 32-a 37°C, a fim de se obterem as proteínas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa.

As expressões testes foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%, que continham para cada gel separador 12%: 3,4 mL de água, 4 mL de Bis-Acrilamida/Acrilamida, 2,5 mL de Tris-HCl (pH: 8,8 para o gel separador), 100 µL de SDS 10%, 50 µL Persulfato de Amônio 10% e 20 µL de TEMED. E para o gel concentrador 5%: 1,4 mL de água, 415 µL de Bis-Acrilamida/Acrilamida, 630 µL de Tris-HCl (pH: 6,8 para o gel concentrador), 25 µL de SDS 10%, 25 µL Persulfato de Amônio 10% e 7,5 µL de TEMED.

Foi retirado 1 mL da cultura de expressão sem a indução com IPTG e após a indução com 0,1 mM de IPTG, essas culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e apenas o pellet foi utilizado para adição de 30 µL de tampão de amostra de proteína 1X na presença de beta-mercaptoetanol e SDS. Com a adição do tampão de amostra, o conteúdo foi fervido por 15 minutos e centrifugado a 5000 rpm por mais 30 segundos. As amostras preparadas foram adicionadas ao gel de acrilamida previamente preparado. Nos géis foi aplicado também 7µL do marcador BenchMark Protein Ladder (Termo Fisher Scientific). A migração ocorreu nas seguintes condições: 20 mA por aproximadamente 3

horas e corados com Azul de Comassie *over night*. No dia seguinte, o gel foi descorado com solução descorante para análise dos perfis de expressão das proteínas recombinantes expressas.

#### **10.1.5. Western blot da expressão heteróloga da toxina Cry1Ba6 e Cry10Aa em *E. coli***

Para confirmação das proteínas recombinantes expressas, Cry1Ba6 e Cry10Aa, via Western Blot foram realizadas as mesmas condições de expressão padronizadas e preparação das amostras para análise em gel de acrilamida SDS-PAGE 12% para migração primária neste gel. Além das amostras de interesse, foram aplicados ao gel 7 µL do marcador BenckMarck Pre-Stained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Após a migração em SDS-PAGE 12%, as amostras foram transferidas para membrana PVDF nas seguintes condições: 1 hora a 10 V. A membrana contendo as proteínas foi então bloqueada *over night* com 3% de gelatina e 0,5% PVA. No dia seguinte, a membrana foi lavada inicialmente com gelatina 1%, tampão TBS e Tween por 3 vezes e 1 vez apenas com TBS, por 5 minutos cada lavagem. Em seguida, foi adicionado o anticorpo anti-histidina (Anti-His [C-terminal]/AP Ab – Invitrogen) diluído 5000 vezes v/v em TBS-T, por 4 horas. As membranas foram lavadas, conforme descrito anteriormente e a estas foram adicionadas as soluções de revelação, A – 50 uL, B – 50 uL e tampão (Biorad) – 100 uL, completadas para o volume final de 5 mL com água destilada.

#### **10.1.6. Solubilização das toxinas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa produzidas em *E. coli***

Analisados os perfis de expressão e determinada a melhor condição para tal, a expressão foi padronizada nos seguintes parâmetros: crescimento até a OD 2.0, indução com 0,1 mM de ITPG, temperatura 37 °C *over night* (em torno de 16 horas). A partir disto foram realizados testes de solubilização das proteínas recombinantes expressas, centrifugadas após a expressão e armazenadas em ambiente refrigerado. As três soluções distintas para ressuspender as células

foram: SDS (0,1%), Triton X-100 (0,1%) e Tampão Tris (1M) – NaCl (300mM). As expressões proteicas finais resultantes foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, ressuspendidas nas três soluções distintas, sonicadas por 2 minutos na amplitude 30% a cada 20 segundos e preparadas para análise em gel SDS-PAGE 12%, conforme descrito anteriormente para as análises preliminares de amostras proteicas.

## 10.2. Silenciamento gênico de candidatos a receptor das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa via RNA interferente

### 10.2.1. Obtenção de fragmentos gênicos dos candidatos a receptor das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa

Por meio de análises *in silico* utilizando banco de transcritos públicos e o transcriptoma do intestino médio de larvas de 3<sup>o</sup> instar de *A. grandis* (dados não publicados) foram identificados fragmentos de genes candidatos a receptores de toxina Cry1BA6 e Cry10Aa de *A. grandis*. As sequências dos fragmentos dos genes foram comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST N (versão 2.2.15) (ALTSCHUI *et al.*, 1990).

Os oligonucleotídeos iniciadores de PCR (Tabela 2), chamados simplesmente de *primers*, para clonagem e síntese do dsRNA foram desenhados utilizando o Oligo Perfect™ Designer (Life Technologies). A diferença entre os primers de clonagem e síntese de dsRNA é apenas a presença da sequência de T7 conjugada no início dos primers para dsRNA.

**Tabela 3.** Sequência dos primers dos neuropeptídeos utilizados para PCR e RT-PCR.

Gene alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Objetivo
ALP	AG_ALP_F	5'- CTGGGAATGCGAAGCTAA -3'	325pb	Clonagem e dsRNA
	AG_ALP_R	5'- GCCGTTGGCAAATATGCC -3'		
APN	AG_APN_F	5'- AGCTCATCAGTGACACCTTTAACT -3'	295pb	Clonagem e dsRNA
	AG_APN_R	5'- CAACGCCTGCTTGGTGGTATA -3'		

ADAM 10	AG_ADAM _F	5' – GCGGCATGTACCAGTCGA – 3'	334pb	Clonagem e dsRNA
	AG_ADAM _R	5' - ACCACAAAACGCACCTGC – 3'		
SIMP.	AG_SIMP_ F	5'- CCATCTACCCAGTAGCAA -3'	340pb	Clonagem e dsRNA
	AG_SIMP_ R	5'- CGGGAGCATATATTACAA -3'	340pb	Clonagem e dsRNA
CAD	AG_CAD_ R	5'- TGCGCCAAATTTCACTAAATCC -3'	250pb	Clonagem e dsRNA
	AG_CAD_ R	5'- TGCCATCAAATGCTTTTACA –3'		
-	T7 (F e R)	5'- TAATACCACTCACTATAG -3'	*	Síntese de dsRNA

### 10.2.2. Clonagem gênica

A amplificação dos fragmentos gênicos foi realizada por PCR a partir da reação de 20µL de PCR contendo: 14,4 µL de água, 0,4 µL de cada *primer* (10 µM), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µL de tampão 10X, 0,4 µL de dNTP (0,5 mM), 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL) da Ludwig Biotec, e 1 µL de cDNA obtido a partir do conjunto de cDNAs de todos os estágios de desenvolvimento de *A. grandis*. O programa aplicado para PCR foi 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos; entre 55 e 63 °C para anelamento por 30 segundos (variável de acordo com os primers específicos – Tabela 3), e 72 °C por 30 segundos para extensão. Em seguida, 72 °C por 5 minutos. O produto da amplificação dos transcritos foi analisado em gel de agarose 1% e purificado com o Kit QIAQUICK EXTRACION QIAGEN (250), conforme protocolo do fabricante. Esses fragmentos foram purificados com o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) e clonados no vetor pCR2.1 utilizando o kit de clonagem TOPO® TA cloning (Invitrogen®). O DNA foi utilizado para transformar a cepa de *E. coli* XL1-Blue preparada para competência na eletroporação. As clonagens foram confirmadas pela digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição - enzima *EcoR* I (ThermoFisher Scientific). Nas reações de digestão foram

utilizados 7,5 µL de água, 1µL do DNA molde (10µg), 0,5 µL da enzima de restrição específica (5U na concentração 12 U/µL) e 1 µL de Tampão 10X específico para a enzima. As reações foram incubadas por duas horas a 37 °C.

### **10.2.3. Extração de RNA e síntese de cDNA – todas as fases de *A. grandis***

Foi feita a extração de RNA total de todas as fases de desenvolvimento do bocado do algodoeiro: ovo, larva (1º, 2º e 3º instares), pré-pupa, pupa e adultos (machos e fêmeas em conjunto e separadamente), utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A concentração e qualidade do RNA extraído foram obtidos no espectrofotômetro NanoVue Plus GE Healthcare Life) e confirmados em gel de agarose 1%. O RNA foi tratado com 2U de DNase I (Invitrogen®) por 30 minutos. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit M-MLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen®), conforme protocolo do fabricante.

### **10.2.4. Produção de dsRNA**

As sínteses dos dsRNAs para uso na análise do silenciamento dos candidatos a receptores de toxina Cry1Ba6 e Cry10Aa foi realizado pelo processo de transcrição *in vitro*, utilizando o kit de transcrição MEGAscript® RNAi Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific). A síntese dos dsRNAs foi feita a partir da PCR utilizando como DNA o pool de 5µL de cada cDNA das fases de desenvolvimento de *A. grandis*. A PCR foi realizada com 20 µL a partir de: 14,4 µL de água, 0,4 µL de cada *primer* (10 µM); 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µL de tampão 10X, 0,4 µL de dNTP (0,5 mM), 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase (5u/µl) da Ludwig Biotec, e 1 µL de DNA plasmidial (2 µg/µL). O programa da PCR foi 94 °C por 5 minutos para desnaturação, 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos, entre 55 e 63 °C para anelamento por 30 segundos (variável de acordo com os *primers* específicos – Tabela 3, com a sequência T7 nas extremidades), e 72 °C por 30 segundos para extensão. Em seguida, 72 °C por 5 minutos para extensão final. O produto da amplificação dos transcritos por PCR

foi visualizado em gel de agarose 1%. Em seguida, visando a síntese do dsRNA, 8µL do produto desta reação foi utilizado como molde para a reação de síntese de dsRNA. Após a síntese, o dsRNA foi purificado conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. A quantificação dos dsRNAs obtidos foi feita no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences) e estes foram analisados em gel de agarose 1%.

#### **10.2.5. Teste da dose não letal para o silenciamento gênico**

Os dsRNAs produzidos foram testados via microinjeção em larvas de 3<sup>o</sup> ínstar de *A. grandis* na concentração inicial de 500ng/uL a fim de avaliar uma dose que não causasse a mortalidade ou alterações de fenótipo do inseto, mas possibilitasse a supressão gênica específica, a ser confirmada posteriormente por RT-qPCR junto aos controles, água e dsRNA GUS. O percentual de mortalidade aceito como ideal para os experimentos foi de no máximo 20% para todos os tratamentos microinjetados, conforme estabelecido no laboratório para os grupos controle de microinjeção em padronizações anteriores. Foi utilizado o n total igual a 30 de larvas de 3<sup>o</sup> ínstar para cada gene.

#### **10.2.6. Quantificação relativa de transcritos do gene *CADERINA* estudado durante o desenvolvimento de *A. grandis***

Para a análise da quantidade relativa dos transcritos do gene em estudo durante o ciclo de vida de *A. grandis*, foram utilizados os cDNAs de todas as fases de desenvolvimento do inseto, conforme tópico 10.2.3.

Para a realização da RT-qPCR, foi utilizado o termociclador CF X96™ Real-Time System (Bio-Rad) com os *primers* específicos para RT-qPCR de cada gene. Os genes utilizados para normalização interna foram β-tubulina (*β-TUB*) e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (*GAPDH*), de acordo com estudos previamente realizados por Firmino *et al.* (in press), utilizando os *primers* desenhados. As reações foram realizadas no volume final de 10 µL, sendo 5 µL do Mix de SYBR Green (LGC), 2 µL de cDNA específico, 2,6 µL de H<sub>2</sub>O bi-destilada e 0,2 µM de cada *primer*, direto e reverso. O protocolo utilizado no

termociclador para o ciclo de tempo e temperatura foi: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação do cDNA, 60 °C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 60 °C por 30 segundos para extensão. Após os 40 ciclos, foi feita uma curva de dissociação para confirmar a especificidades dos *primers* (65-95 °C, aumentando 0,5 °C a cada 5 segundos). As reações foram realizadas com triplicata técnica e duplicata biológica, e controles negativos contendo água, em vez de cDNA foram utilizados para verificação de possíveis contaminações nas amostras.

Os dados de amplificação brutos foram analisados no software online qPCR miner (<http://ewindup.info/miner/>) para cálculo das Cts e eficiência dos *primers*. Finalmente, a quantificação relativa foi realizada utilizando o software qBase Plus (Biogazelle, Bélgica).

Foi realizada apenas uma triplicata biológica e técnica, sendo, portanto, resultados preliminares.

#### **10.2.7. Avaliação molecular da administração do dsRNA *CAD* em *A. grandis* e possíveis alterações morfológicas**

A avaliação dos efeitos da administração de dsRNA do gene *CADERINA* em larvas de 3º instar de *A. grandis* que foram submetidos ao tratamento com microinjeção foi realizada por RT-qPCR. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir do RNA total extraído dos insetos de cada tratamento após 48 horas da administração do dsRNA. A análise foi realizada apenas para a concentração de 500 ng e com apenas uma repetição biológica até o presente momento, sendo uma análise preliminar.

As alterações morfofisiológicas causadas pela administração do dsRNA foram analisadas, durante o desenvolvimento das larvas desde o 3º instar. As imagens dos insetos foram adquiridas utilizando o microscópio estereoscópico, modelo MVX10, marca Olympus, disponível na sala de microscopia do Laboratório de Interação Molecular Planta Patógeno I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

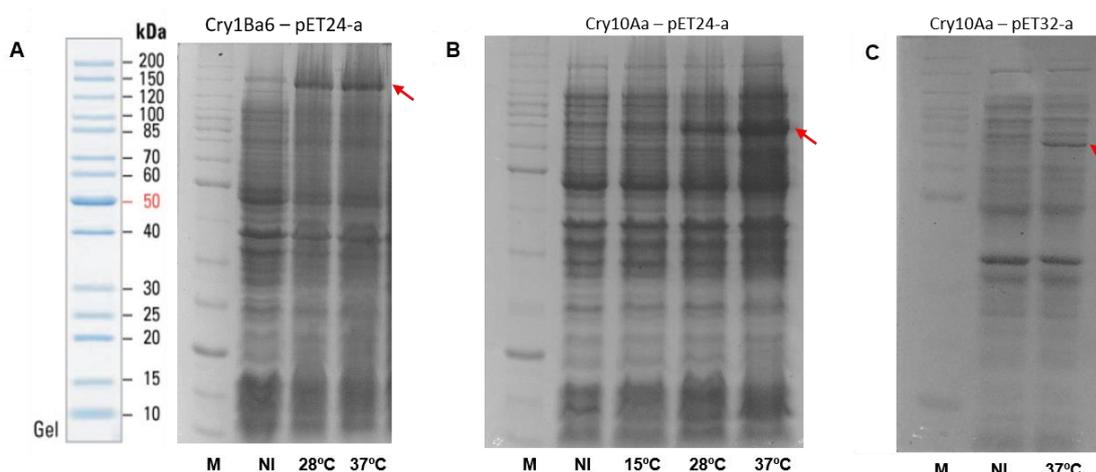
#### **10.2.8. Análise estatística dos dados**

Os dados de mortalidade decorrentes dos tratamentos de microinjeção de dsRNA dos bioensaios com larvas e com adultos foram analisados por análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 11. Resultados

### 11.1.1. Perfil de expressão das toxinas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa expressas em *E. coli*

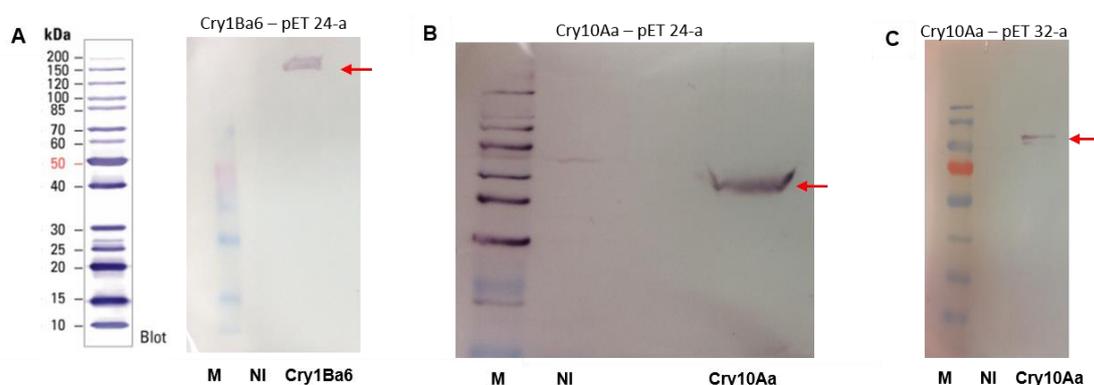
Após a confirmação da transformação da célula para expressão heteróloga com os plasmídeos contendo as toxinas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa, foram realizados os testes de expressões em diferentes condições de temperatura: 28 °C e 37 °C para Cry1Ba6 – pET 24-a; 15 °C, 28 °C e 37 °C para Cry10Aa – pET 24-a e 37 °C para Cry10Aa – pET32-a. Ambas as proteínas, nas condições citadas acima, foram deixadas *over night* após a indução com 0,1mM de IPTG e comparado ao não induzido com IPTG (Figura 55). Com isso foi possível padronizar a expressão de ambas as toxinas para a temperatura de 37°C, onde a banda do tamanho esperado se apresentou mais forte em relação ao controle não induzido (NI).



**Figura 55.** SDS – PAGE das expressões teste para toxinas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa em diferentes temperaturas. **(A)** Toxina recombinante Cry1Ba6 – pET24-a. **(B)** Toxina recombinante Cry10Aa – pET 24-a. **(C)** Toxina recombinante Cry10Aa – pET 32-a. Legenda: M - marcador BenchMark Protein Ladder, NI - não induzido com IPTG, diferentes temperaturas após indução com 0,1mM de IPTG. A seta vermelha indica a toxina Cry recombinante expressa em destaque e no tamanho correto: aproximadamente 133 KDa – Cry1Ba6 e 75 KDa – Cry10Aa.

### 11.1.2. Western blot das toxinas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa expressas em *E. coli*

Para confirmação das toxinas recombinantes expressas Cry1Ba6 e Cry10Aa, não apenas por perfil proteico em gel SDS-PAGE 12%, foi realizado o Western blot com o anticorpo Anti-His. Na figura 56 é possível observar uma única banda com o tamanho predito para ambas as toxinas (Figura 56). E devido a alta  $LC_{50}$  da toxina Cry1Ba6 e baixa obtenção da toxina de forma recombinante, não foi viável dar continuidade aos testes de expressão e solubilização da mesma, apenas para toxina Cry10Aa.

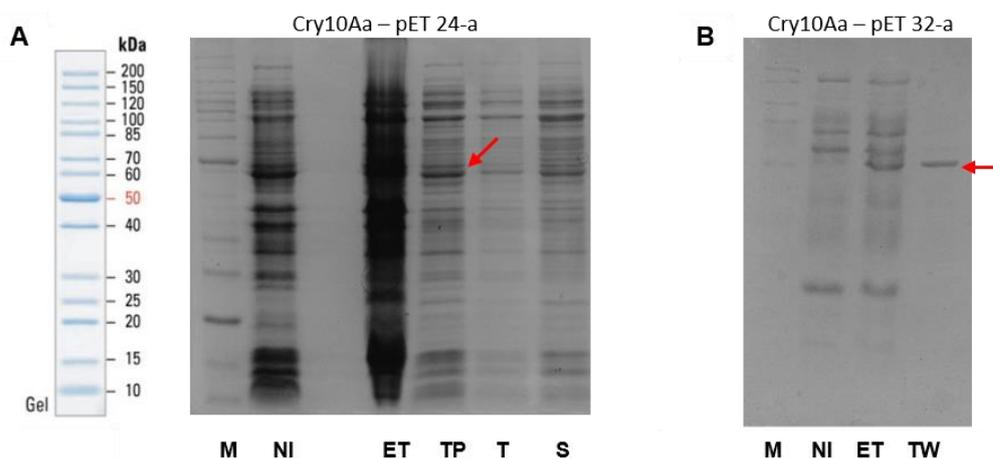


**Figura 56.** Western Blot das proteínas recombinantes Cry1Ba6 e Cry10Aa utilizando o anticorpo Anti-his. Legenda: M - marcador BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, NI - não induzido com ITPG. **(A)** Proteína recombinante Cry1Ba6. **(B)** Proteína recombinante Cry10Aa. As setas em vermelho indicam marcação das proteínas recombinantes expressas.

### 11.1.3. Teste de solubilização da toxina recombinante Cry10Aa expressa em *E. coli*

A toxina recombinante Cry10Aa, foi testada quanto a sua solubilidade, para cada 100mL de expressão algumas soluções para solubilização da proteína foram testadas a fim de, posteriormente, utilizar a proteína em dieta para teste de toxicidade para larvas de 3º ínstar de *A. grandis*. As seguintes soluções foram utilizadas: SDS (0,1%), Triton X-100 (0,1%) e Tampão Tris (1M) – NaCl (300mM) para Cry10Aa – pET24-a e Tween (0,1%) para Cry10Aa – pET 32-a, e as

proteínas foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% para Cry10Aa – pET24-a e Cry10Aa – pET32-a. Dentre as soluções testadas, o Tween foi o que apresentou melhor resultado de solubilização específica entre os dois vetores utilizados para Cry10Aa (Figura 57).



**Figura 57.** SDS – PAGE dos testes de solubilização da toxina recombinante Cry10Aa nos diferentes vetores, em diferentes soluções. Legenda: M - marcador BenchMark Protein Ladder, NI - não induzido com IPTG, ET- Extrato total, TP – Tampão Tris-NaCl, T – Triton X-100 0,1%, S – SDS 0,1% e TW – Tween 0,1%. As setas vermelhas indicam a toxina Cry10Aa recombinante expressa em destaque e no tamanho correto: aproximadamente 75 KDa – Cry10Aa.

#### 11.1.4. Seleção de genes candidatos a receptores de toxina Cry1Ba6 e Cry10Aa

Para melhor compreensão dos genes selecionados como possíveis genes de receptores de toxina Cry a serem validados neste estudo, a organização dos genes e respectivos tamanhos dos fragmentos que serão apresentados a seguir (Tabela 4).

**Tabela 4.** Esquema didático dos possíveis genes de receptores de toxina Cry selecionados no presente estudo.

<b>Gene (Receptor)</b>	<b>Identificado</b>	<b>dsRNA</b>	<b>Teste dose</b>
ALP	1945ppb	325pb	500ng
APN	1945pb	295pb	500ng
ADAM10	2793pb	334pb	500ng
SIMP.	984pb	340pb	500ng
CAD*	4497pb	250pb	>5ng

\*Este gene foi escolhido para validação funcional quanto a aplicação do controle de *A. grandis*.

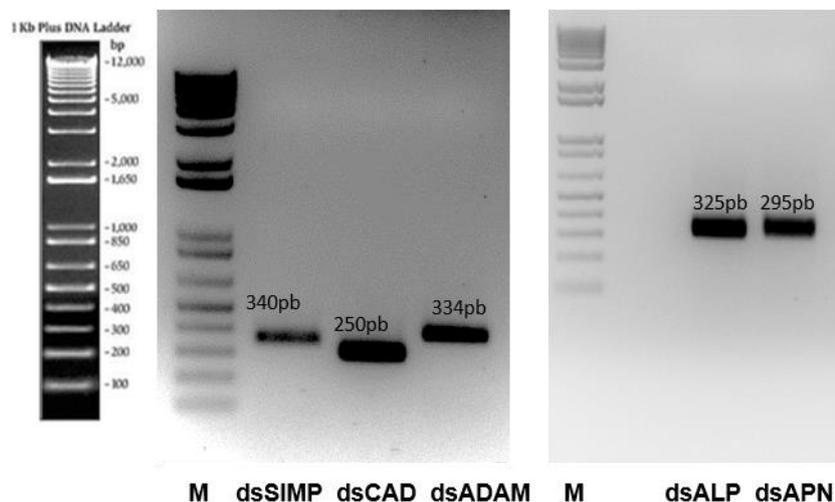
Os possíveis genes receptores das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa que foram identificados no transcrito do intestino médio de larvas de 3º ínstar *A. grandis* através da similaridade nos perfis do domínio transmembrana e peptídeo sinal dos já identificados ou preditos como ligantes para toxinas Cry em insetos através dos sites de análise (Signal P4.1 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> e TMHMM Server v. 2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, respectivamente) e para síntese de dsRNA encontrados foram listados a seguir:

- *Contig* 9461 com maior identidade para *T. castaneum*. Este *contig* denominado *ALP* – *fosfatase alcalina*, possui um tamanho de 1945 pb. Para o desenho e síntese de dsRNA utilizou-se o corresponde a região do *contig* de 325 pb.
- *Contig* 33356 com maior identidade para *Asymmathetes vulcanorum*. Este *contig* denominado *APN* – *aminopeptidase N*, possui um tamanho de 1945 pb. Para o desenho e síntese de dsRNA utilizou-se o corresponde a região do *contig* de 295 pb.
- *Contig* 55497 com maior identidade para *L. decemlineata*. Este *contig* denominado *ADAM- Metaloprotease ADAM 10*, possui um tamanho de 2793 pb. Para o desenho e síntese de dsRNA utilizou-se o corresponde a região do *contig* de 334 pb.

- *Contig* 44798 com maior identidade para *T. castaneum*. Este *contig* denominado *SIMPORTADOR - SIMPORTADOR DE SÓDIO*, possui um tamanho de 984 pb. Para o desenho e síntese de dsRNA utilizou-se o corresponde a região do *contig* de 340 pb.
- *Contig* 9369 com maior identidade para *Alphitobius diaperinus*. Este *contig* denominado *CADERINA*, possui um tamanho de 4497 pb. Para o desenho e síntese de dsRNA utilizou-se o corresponde a região do *contig* de 250 pb.

### 11.1.5. Amplificação dos dsRNAs dos receptores candidatos

A síntese do dsRNA descrita anteriormente foi realizada a partir dos fragmentos gênicos clonados e utilizados para a síntese do dsRNA específico utilizando o kit MEGAscript® RNAi Kit (Ambiom, Termo Fisher Scientific). Os fragmentos sintetizados de dsRNAs para os genes correspondentes ao *SIMPORTADOR*, *CADERINA*, *ADAM*, *ALP* e *APN* podem ser visualizados na Figura 58.



**Figura 58.** Análise em gel de agarose 1% de moléculas de dsRNA sintetizadas para os genes *SIMPORTADOR*, *CADERINA*, *ADAM*, *ALP* e *APN*. Todos os fragmentos com tamanho especificado em cima. Legenda: M - Marcador 1Kb, dsSIMP - dsRNA *SIMPORTADOR*; dsCAD – dsRNA

*CADERINA*; dsADAM – dsRNA *ADAM*; dsALP – dsRNA *ALP*; dsAPN – dsRNA *APN*.

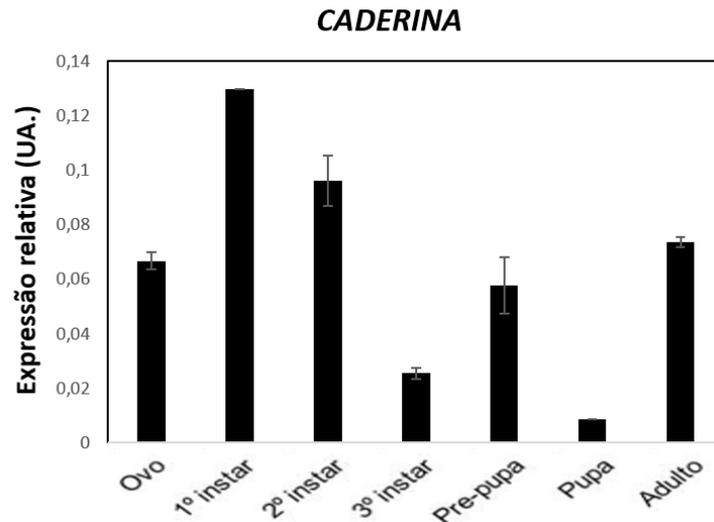
#### **11.1.6. Silenciamento dos receptores candidatos e teste de dose não letal**

O teste da dose não letal para os dsRNAs se iniciou com 500 ng e obteve sucesso para os dsRNA para os genes *ADAM*, *ALP*, *APN* e *SIMPORTADOR*, não causando mortalidade. Nestas condições os insetos chegaram a fase adulta sem apresentar fenótipos variantes e com a mortalidade de no máximo 20% dos insetos microinjetados, conforme estipulado anteriormente. Já para o dsRNA *CADERINA* a dose de 500 ng não se mostrou adequada para o objetivo do estudo, apresentando mortalidade acima de 90%.

#### **11.1.7. Silenciamento gênico do gene selecionado de *CADERINA* em *A. grandis***

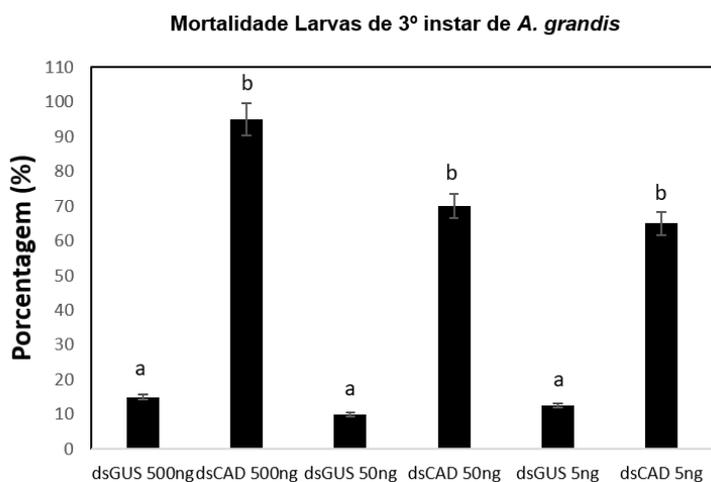
O presente estudo buscou inicialmente selecionar candidatos a receptores de toxinas Cry específicos, no entanto, a administração do dsRNA para o gene *CADERINA* em *A. grandis* se mostrou altamente letal em larvas de 3º instar e por esse motivo foi dado destaque ao aprofundamento de sua validação funcional, visando aplicação para o controle deste inseto-praga.

Inicialmente, foi analisada a expressão deste transcrito ao longo do desenvolvimento de *A. grandis*. A quantidade de transcritos do gene *CADERINA* analisada preliminarmente foi maior no 1º instar larval. Pode-se observar também uma tendência de elevação maior em 2º instar e adulto (Figura 59). A partir disto, demonstra-se sua importância acentuada na fase inicial larval e em outros momentos do desenvolvimento de *A. grandis*.



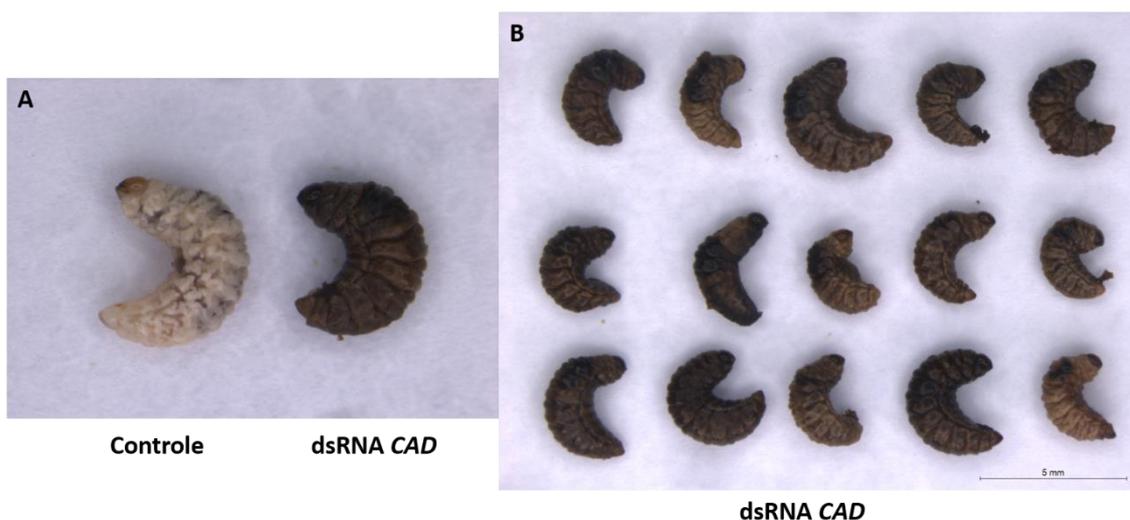
**Figura 59.** Expressão relativa do transcrito do gene *CADERINA* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *A. grandis*. Valores de expressão relativa em UA (unidade arbitrária). O gene *CADERINA* possui maior expressão relativa na fase de 1º instar larval, e aumentada de forma mais acentuada nas fases de 2º instar e adulto.

Em seguida, as larvas de 3º instar foram microinjetadas com 500 ng, 50 ng e 5 ng de dsRNA específico para o gene *CADERINA* (dsRNA *CAD*), buscando estabelecer uma curva de dose. Como controle foi utilizada a mesma concentração de dsRNA *GUS*. A administração de 500 ng de dsRNA *CAD* resultou em mortalidade acima de 90%. Já para a administração de 50 ng do dsRNA a mortalidade foi em torno de 70% e para 5 ng em torno de 65%. Quando comparado ao controle, que apresentou mortalidade de 20%, o silenciamento do gene da *CADERINA* mostrou que esse gene é altamente essencial para o desenvolvimento de larvas de 3º instar de *A. grandis* (Figura 60).



**Figura 60.** Mortalidade de larvas de 3º instar de *A. grandis* microinjetadas com diferentes doses de dsRNA para o gene *CADERINA* (dsRNA *CAD*) (500 ng, 50 ng e 5 ng) em relação ao controle dsRNA *GUS*. A mortalidade causada pelo dsRNA *CAD* 500 ng foi acima de 90%, para 50 ng foi em torno de 70% e 5 ng, em torno de 65%, enquanto para o *GUS* a mortalidade foi menor do que 20%.

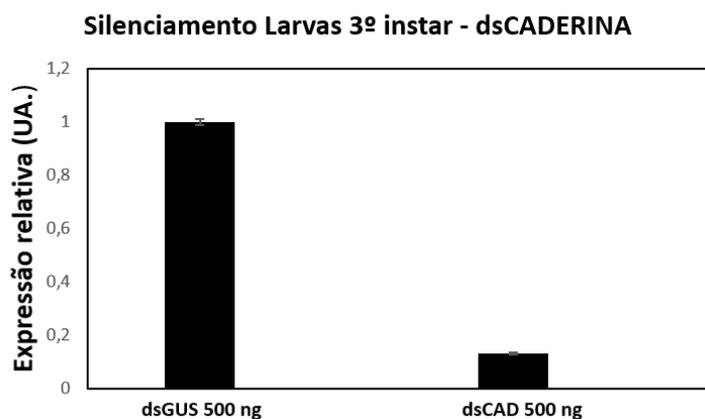
A administração do dsRNA de *CADERINA* em larvas do 3º instar resultou em único fenótipo letal: larvas escurecidas, com tecido escurecido e necrosado (Figura 61 A e B). Com isto, confirma-se a importância deste gene no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de 3º instar de *A. grandis*.



**Figura 61.** Fenótipo observado em larvas de 3º instar de *A. grandis* microinjetadas com 500 ng de dsRNA para o gene *CADERINA* (dsRNA

*CAD*) comparado ao controle dsRNA *GUS* **(A)**. Fenótipo único de larvas mortas após administração com dsRNA *CAD*, com tecido escurecido e necrosado **(B)**.

Para a análise molecular resultante da administração do dsRNA em larvas de 3º instar o RNA total foi extraído de larvas microinjetadas com os tratamentos de 500 ng de dsRNA *GUS* e dsRNA *CAD*. A quantificação relativa do gene foi relativizada com a quantidade de expressão relativa do controle *GUS*, sendo considerado um (1). Para compreender os efeitos da administração do dsRNA para o gene *CAD* em larvas de 3º instar de *A. grandis*, foi realizada a quantificação dos transcritos deste gene por RT-qPCR. Para a administração do dsRNA *CAD*, a análise preliminar da quantificação dos transcritos demonstrou que a expressão do gene *CADERINA* foi suprimida em relação ao controle dsRNA *GUS*, em torno de 10 vezes, confirmando seu silenciamento (Figura 62).



**Figura 62.** Níveis de expressão relativa do gene *CADERINA* em *A. grandis* 48 horas após microinjeção de 500ng de dsRNA controle (dsRNA *GUS*) e dsRNA para o gene *CAD* em larvas de 3º instar. Valores de expressão relativa em unidade arbitrária (UA). O silenciamento gênico de *CAD* 500 ng resultou em supressão do nível de transcritos em torno de 10 vezes em relação ao *GUS*.

## 12. Discussão/Conclusão

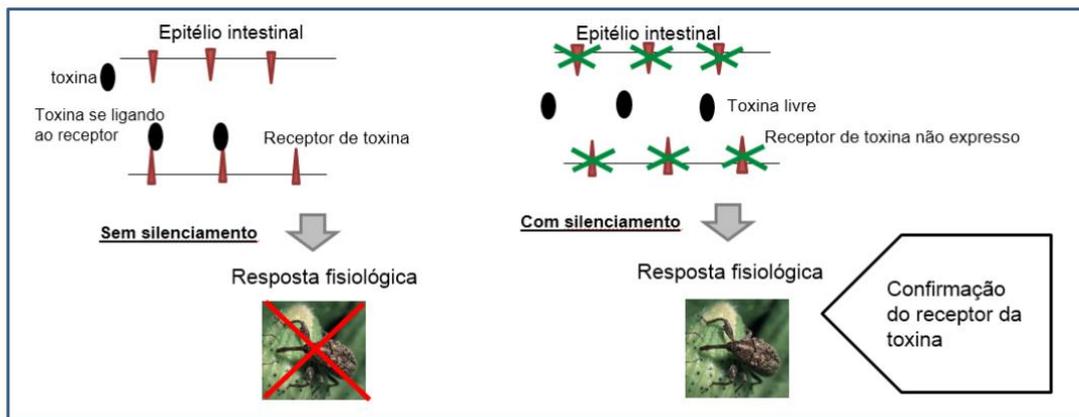
A expressão heteróloga das proteínas Cry1Ba6 e Cry10Aa comparadas aos perfis de expressão proteica em condições não induzida e induzida com IPTG a partir de 0,1mM de IPTG, a 37°C e *over night* foram as condições mais promissoras na produção das proteínas recombinantes. As proteínas foram detectadas e confirmadas no extrato bruto das expressões através de Western blot utilizando anticorpo Anti-His, que se liga aos resíduos de histidinas inseridas no plasmídeo na região C-terminal das toxinas. Posteriormente, foi descoberto que o sistema pET24-a não é indicado para a célula utilizada para transformação e recepção de ambos os plasmídeos, BL21 DE3 Origami. Conforme o fabricante, estas células não são indicadas para a utilização de plasmídeos com antibiótico de seleção Kanamicina (NOVAGEN). Diante disto, mesmo após a padronização apresentada e os resultados obtidos, será necessário alterar a célula utilizada para expressão heteróloga das toxinas Cry em estudo.

As proteínas produzidas apresentaram baixa produção no sistema utilizado, principalmente para Cry1Ba6 que possui uma LC<sub>50</sub> de 305,32 µg/mL e tornou inviável a continuidade de sua produção e posteriores bioensaios. Por isso foi dada continuidade dos testes de solubilização apenas com a toxina Cry10Aa, mas não foi possível purificar as proteínas produzidas expressas no plasmídeo pET24a e pET32a por cromatografia de afinidade a níquel (Ni), mesmo após a solubilização com os diferentes tampões. A única purificação obtida foi da Cry10Aa inserida no vetor pET32-a, mas em rendimento com e insuficiente para os ensaios de toxicidade dessa proteína em quantidade suficientes e tempo hábil para esses ensaios e assim, não foi dada continuidade à produção destas toxinas Cry. AZIZOGLU (2016), em seu estudo usando como controle do experimento de atividade tóxica as células utilizadas para recepção do plasmídeo de expressão, como a BL 21 DE3, realizou a expressão heteróloga de toxina Cry em *E. coli*, mas não obteve a proteína purificada, usando como controle do experimento de atividade tóxica as células utilizadas para recepção do plasmídeo de expressão, como a BL 21 DE3, e que também pode ser realizado futuramente em continuidade dos testes de toxicidade do presente trabalho.

Deve-se destacar que para a toxina Cry10Aa, relatada como altamente tóxica para *A. grandis* por AGUIAR et al., (2012), foi testada quanto a toxicidade por sua introdução no genoma de baculovírus e posterior exposição do inseto à infecção. Não se sabe, portanto, se a expressão em *E. coli* será tão eficiente tóxica quanto em baculovírus, ou mesmo em outros organismos não oriundos da toxina. Alguns trabalhos realizados com coleópteros demonstraram que a proteína recombinante de toxinas Cry expressas em organismos/sistemas distintos do original, como *E. coli*, apresenta menor toxicidade quando comparada ao organismo fonte (LÓPEZ-PAZOS & GÓMEZ 2009; ZHANG et al., 2013). Outros trabalhos mostraram que a expressão heteróloga de toxinas Cry em *E. coli* pode ser bastante eficiente e tóxico para diversas ordens de insetos (AZIZOGLU et al., 2016; DE LARA, 2013; SWAMY et al., 2013; MAGALHÃES, 2006). Ademais, será necessário estabelecer a dose letal a partir da expressão heteróloga das proteínas em ensaios de silenciamento dos genes candidatos a receptores.

Proteínas Cry podem ser produzidas a partir da expressão heteróloga em *E. coli*. Muitas vezes este sistema é escolhido pela vantagem de cultivo e manutenção das células, além da grande quantidade final de proteínas que pode ser obtida (MARTINS, 2010; DE LARA, 2013; MAGALHÃES, 2006; ROCHA et al., 2012). Em contrapartida, para o presente estudo não se mostrou viável à produção das toxinas Cry selecionadas.

Os candidatos a receptor de toxina Cry foram selecionados e as larvas de *A. grandis*, submetidas ou não a experimentos de silenciamento, deverão ser desafiadas com as toxinas Cry em estudo para a validação desses genes como receptores efetivos conforme o esquema didático mostrado abaixo (Figura 63).



**Figura 63.** Esquema didático da validação dos candidatos a receptor de toxina Cry via RNA interferente em *A. grandis*. Os receptores de toxina Cry são expressos no intestino do inseto e, naturalmente, na presença da toxina ocorre seu reconhecimento, lise celular e morte do inseto. A hipótese para o modelo representado acima é que, com o silenciamento gênico do receptor candidato haverá a redução da expressão deste transcrito e, conseqüentemente, diminuição da proteína/receptor codificado por este. Assim, não ocorrerá o reconhecimento da toxina pelo receptor, afetando a toxicidade da proteína Cry e, confirmando assim, que este é um receptor efetivo para a toxina específica. Fonte: própria autoria.

A seleção inicial dos candidatos a receptores das toxinas Cry foi filtrada pela similaridade nos perfis do domínio transmembrana e peptídeo sinal e conseqüentemente os que foram encontrados para a ordem Coleoptera foram os mais similares. Observa-se que estes transcritos identificados como receptores de toxinas Cry são proteínas com atividades celulares comuns, como a fosfatase alcalina (ALP) e aminopeptidase (APN) (RUIZ-ARROYO *et al.*, 2016; HUA *et al.*, 2014; CONTRERAS *et al.*, 2013; GÓMEZ *et al.*, 2012;). Isto pode sugerir que receptores de toxinas Cry não são específicos apenas para esse ligante, atuando de forma versátil entre os diferentes organismos e são capazes de reconhecer em ordens restritas a estrutura das variadas toxinas Cry, devido ao aspecto restrito de atividade destas toxinas.

A ligação da toxina ao receptor é de extrema importância para o entendimento da especificidade da ação destas proteínas aos tipos de insetos e organismos, mas muitas vezes há fatores limites do estudo devido à alta taxa de degradação proteolítica observada em alguns insetos (DE MAAGD *et al.*, 2001).

Existem inúmeras variáveis quanto à atividade das toxinas Cry em insetos. No Coleoptera *L. decemlineata* foi observado que a pró-toxina só era ativada e possuía atividade tóxica após o tratamento da toxina com tripsina, demonstrando que a toxina sozinha não possuía atividade (LAMBERT *et al.*, 1992).

As caderinas são bastante estudadas como receptores de toxinas Cry em insetos e, recentemente, foram validadas como receptores através do silenciamento mediado por RNAi, silenciando o gene candidato de interesse e desafiando com a toxina (HUA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017).

No geral, sabe-se que as caderinas são proteínas essenciais a adesão entre as células. Elas atuam com grande importância no desenvolvimento de tecidos, e podem se ligar a outras moléculas e desempenhar funções distintas, como vias de sinalização e interação com actina. A dependência crucial de caderina para os tecidos, como na morfogênese, contato celular, adesão, estabilidade, entre outros é bastante conhecida em biologia celular aplicada aos estudos em animais (HALBLEIB & NELSON, 2006; MAITRE & HEISENBERG, 2013).

Em insetos, as caderinas do tipo I e IV funcionam como o conector que faz as junções entre os tecidos do epitélio. Não se conhece detalhadamente o processo de evolução das caderinas até insetos, partindo de Metazoa, mas há muitas regiões conservadas e não esclarecidas dessa evolução (SASAKI *et al.*, 2017).

São poucos os estudos de validação funcional em insetos para Caderina ou similares, da mesma família, visto que o interesse maior é relacionado às toxinas Bt. Em *Drosophila*, um tipo de Caderina, Caderina - DE, dependente de cálcio e que está relacionada a ligação celular foi estudada e, utilizando RNAi, foi possível entender como essas proteínas interagem e se sobrepõem no processo celular para sua função mais conhecida, adesão. Foram 400 proteínas identificadas para este processo e que mostraram função conservada até mesmo com mamíferos (TORET *et al.*, 2014).

Diante disto, ainda há muito o que se explorar sobre a caderina, seus tipos e funcionalidades em insetos, além da extensa aplicação para identificação de receptores de toxina Cry. Esta proteína mostrou-se de alta demanda no

desenvolvimento e sobrevivência de larvas de 3<sup>o</sup> ínstar de *A. grandis*, causando uma mortalidade muito elevada mesmo com a variação de 500 ng a 5 ng de administração do dsRNA para o gene.

Até o presente momento, pode-se comparar o estudo preliminar de validação funcional do gene *CADERINA* com outros exemplos de aplicação de RNAi quanto a mortalidade, demonstrando a importância do gene para a sobrevivência e desenvolvimento do inseto e como potencial alvo de controle. No entanto, não foi possível comparar o estudo deste gene como receptor de toxina Cry, sendo necessário posteriormente a redução das doses já testadas para tal finalidade e desafio com a toxina.

Devido a escassez de trabalhos que possam esclarecer a fisiologia e a função dos genes em *A. grandis*, é de extrema importância estudos que possam identificar genes potenciais para o controle desse inseto-praga. A busca de novas moléculas é de grande importância e torna possível a utilização da biotecnologia no controle eficaz deste inseto. A identificação de genes de receptores para toxinas ativas contra esse importante praga agrícola também é uma necessidade, principalmente para a toxina Cry10Aa, por já haver plantas GM contendo essa toxina que deverão ganhar espaço no mercado em breve.

### 13. Considerações e perspectivas

Serão realizadas novas transformações utilizando células BL21 DE3 com novos plasmídeos e os protocolos com as condições previamente padronizadas de expressão, solubilização e purificação serão repetidos. Após a padronização e confirmação da viabilidade da expressão heteróloga das toxinas Cry1Ba6 e Cry10Aa, deverá ser estabelecida a dose letal de ambas as toxinas expressas para *A. grandis*, preferencialmente com ambas purificadas, ou alternativamente com a célula utilizada para expressão como controle.

Até o presente momento, foram selecionados os cinco receptores candidatos, testados quanto à dose não letal em larvas de 3º ínstar, mas não foi confirmado o silenciamento gênico destes candidatos, visto que não foi possível realizar a produção das toxinas através da expressão heteróloga em *E. coli* e consequentes bioensaios. Posteriormente, quando as toxinas estiverem disponíveis, serão confirmados os silenciamentos gênicos e desafios com as toxinas Cry, a fim de identificar receptor(es) dessas toxinas.

O gene de *CADERINA* encontrado em *A. grandis* se mostrou bastante promissor para o controle deste inseto e sua validação funcional deverá ser terminada, analisando também se há efeitos em fêmeas adultas. Os dados serão analisados em conjunto e estudos posteriores serão desenvolvidos com outras ferramentas biotecnológicas, como plantas transgênicas, nanopartículas, dentre outros, visando a utilização desse alvo para o controle de *A. grandis*.

## 14. Bibliografia

ABAPA – Associação Baiana dos Produtores de Algodão. <http://abapa.com.br/mais-noticias/programa-fitossanitario-alcancou-resultados-de-excelencia-na-guerra-ao-bicudo-em-lavouras-do-oeste-e-sudoeste-da-bahia/>  
Acessado em: 22 de fevereiro de 2020.

ABDEL-LATIEF, M., & HOFFMANN, K. Functional activity of allatotropin and allatotatin in the pupal stage of a holometabolous insect, *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). **Peptides.**, V. 53, p. 172-184, 2014.

ABRAPA – Associação Brasileira de Produtores de Algodão. Reunião - **Algodão no mundo, Dados realizados e previstos:** <https://www.abrapa.com.br/Paginas/Dados/Algod%C3%A3o%20no%20Mundo.aspx>  
Acessado em: 19 de Fevereiro de 2020.

ABRAPA – Associação Brasileira de Produtores de Algodão. Reunião – **Dados do algodão no Brasil.** <https://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-brasil.aspx>. Acessado em: 19 de fevereiro de 2020.

AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology.** V.177, p. 6027–6032, 1995.

AGRAWAL, N., DASARADHI, P., MOHMMERD, A., MALHOTRA, P., BHATNAGAR, RK., MULHERJEE, SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 67, p. 657-85, 2003.

AGUIAR, A.; MARTINS, E.; RIBEIRO, B.; MONNERAT, R. Cry10Aa Protein is Highly Toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an Important Insect Pest in Brazilian Cotton Crop Fields. **Bt Research.** v.3, p. 20-28, 2012.

[https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/kaiso-sorbie\\_10401.html](https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/kaiso-sorbie_10401.html)

Acessado em: 26 de maio, 2018.

ALEXANDER, J.; OLIPHANT, A.; WILCOCKON, D.; AUDSLEY, N.; DOWN, R.; LAFONT, R.; WEBSTER, S. Functional characterization and signaling systems of corazonin and red pigment concentrating hormone in the green shore crab, *carcinus maenas*. **Frontiers in Neuroscience**. V. 11, p. 752, 2018.

ALTSCHUL, S. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**., v. 215, p. 403-410, 1990.

ANGUS, T. A. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. **Nature**. V. 173, p. 545–546. 1954.

ARAKANE, Y., LI, B., MUTHUKRISHNAN, S., BEEMAN, R. W., KRAMER, K. J., PARK, Y. Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Mechanisms of development I**. V. 25, p. 984-995, 2008.

AREIZA, M.; NOUZOVA, M.; RIVERA-PEREZ, C.; NORIEGA, G. 20-hydroxyecdysone stimulation of juvenile hormone biosynthesis by the mosquito corpora allata. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** doi: 10.1016/j.ibmb.2015.08.001. 2014.

ARRESE, E.; SOULAGES, J. INSECT FAT BODY: ENERGY, METABOLISM, AND REGULATION. **Annu Rev Entomol**. V. 55, p. 207–225, 2010.

ASUNCION-UCHI, M.; SHAWA, H.; MARTIN, T.; FUSE, M. Different actions of Ecdysis-Triggering Hormone on the brain and ventral nerve cord of the hornworm, *Manduca sexta*. **Gen Comp Endocrinol**. V. 166(1), p. 54–65, 2010.

ATELLA, G.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. Metabolismo de Lipídeos. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular - **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM** –Capítulo 6, 2012.

ADUSLEY, N.; VANDERMISSEN, H.; WEAVER, R.; DANI, P.; MATTHEWS, J.; DOWN, R.; VUERINCKX, K.; KIM, Y.; BROECK, J. Characterization and tissue distribution of the PISCF allatostatin receptor in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. 43, p. 64-74. 2013.

AUDSLEY, N. DOWN, R. G protein coupled receptors as target for next generation pesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. 67, p. 27-37. 2015.

AZAMBUJA, R.; DEGRANDE, P. E. Trinta anos de bicudo-do-algodoeiro no Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo. 2014.

AZIZOGLU, U.; AYAZ, A.; YILMAZ, S.; KARABORKLU, S.; TEMIZGUL, R. Expression of *cry1Ab* gene from a novel *Bacillus thuringiensis* strain SY49-1 active on pest insects. **Brazilian Journal of Microbiology**. V. 47, p. 597–602, 2016.

BADRAN, A. *et al.* Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. **Nature**. V. 533(7601), p. 58–63, 2016.

BAUM, J.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.; 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, p. 1322-1326, 2007.

BARBOSA, S.; LUKEFAHR, M. J.; SOBRINHO, R. B. O Bicudo do algodoeiro. **Departamento de Difusão de Tecnologia (DDT)**. Brasília, DF, 1986.

BASNET, S.; KAMBLE, S. RNA Interference of the Muscle Actin Gene in Bed Bugs: Exploring Injection Versus Topical Application for dsRNA Delivery. **Journal of Insect Science**. V. 18(3): p. 1–5, 2018.

BASTOS, C. S.; PEREIRA, M. J. B.; TAKIZAWA, E. K.; OHL, G.; AQUINO, V. R. Bicudo do algodoeiro: Identificação, biologia, amostragem e táticas de controle. Campina Grande: **Embrapa Algodão**. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 79); p. 31, 2005.

BAI, H.; PALLI, S. Functional characterization of bursicon and genome-wide analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi. **Developmental Biology**. V. 344, p. 248-258, 2010.

BAI, H. ZHU, F.; PALLI, S. Large-scale RNAi screen of G protein-coupled receptors involved in larval growth, molting and metamorphosis in the red flour beetle. **BMC Genomics**. V. 12, p. 388, 2011.

BENDENA, W. Neuropeptide Physiology in Insects. Chapter 9, **Landes Bioscience and Springer Science + Business Media**. 2010.

BENTO, F.; MARQUES, R.; CAMPANA, F.; DEMETRIO, C.; LEANDRO, R.; PARRA, J.; FIGUEIRA, A. Gene silencing by RNAi via oral delivery of dsRNA by bacteria in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**. V. 76, p. 287-295, 2019.

BERNSTEIN, E.; DENLI, A.; HANNON, G. The rest is silence. **RNA**. V. 7, p.1509–1521, 2001.

DIVELY, G.; VENUGOPAL, D.; FINKENBINDE, C. Field-Evolved Resistance in Corn Earworm to Cry Proteins Expressed by Transgenic Sweet Corn. **PLOS ONE**. doi:10.1371/journal.pone.0169115. 2016

BRANDÃO M.; LACA-BUENDÍA, J. P. Plantas hospedeiras do bicudo-do- -algodoeiro em Minas Gerais. Belo Horizonte: **EPAMIG**, p. 40, 1985.

BRAVO, A.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Immunocytochemical Localization of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins in Intoxicated Insects. **Journal of invertebrate pathology**. V. 60, p. 237-246, 1992.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, J.; PENA, G. NUNEZ-VALDEZ, M.; SOBERON, M; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ Microbiol**. V.64, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**. V. 49, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANONG, S.; GILL, S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem Mol Biol**. V. 41(7), p. 423–431, 2011.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microbial technology. Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, **Microbial Biotechnology**. V. 6, p. 17–26, 2012.

BRONKHORST, A.; RIJ, R. The long and short of antiviral defense: small RNA-bases immunity in insects. **Current Opinion in Virology**. V. 7, p. 19-28, 2014.

BUAINAIN, A.; BATALHA, M. Cadeia produtiva do algodão. Série Agronegócios. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Secretaria de Política Agrícola – SPA, Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura – **IICA**., V. 4, 2007.

CAERS, J.; VERLINDEN, H.; ZELS, S.; VANDERMISSEN, H.; VUERINCKX, K.; SHOOF, L. More than two decades of research on insect neuropeptide GPCRs: an overview. **Frontiers in Endocrinology**., v.3, 151, 2012.

CANAL RURAL – Notícias sobre o algodão: <http://www.canalrural.com.br/noticias/algodao/curiosidades-que-voce-precisa-saber-sobre-algodao-68417> Acessado em 25 de Abril de 2018.

CASTEL, S.; MARTIENSSEN, R. RNA interference in the nucleus: role for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. **Nature Reviews Genetics**. V. 14, p. 100, 2013.

CARTER, F. *et al.* U.S. cotton declares war on the boll weevil. In: DICKERSON, W.A. *et al.* (Eds.). Bollweevil eradication in the United States through 1999. Memphis: **The Cotton Foundation Publisher**., p. 25-54, 2001.

CHAPMAN, R. The Insects, Structure and Function. Fifth edition, **Cambridge University Press.**, p. 132-137, 2013.

CHAWLA, G.; SOKOL, N. Hormonal activation of *let-7-C* microRNAs via EcR is required for adult *Drosophila melanogaster* morphology and function. **Development.** V.139, 1788–1797, 2012.

COELHO, R. *et al.* *Vitellogenin* knockdown strongly affects cotton boll weevil egg viability but not the number of eggs laid by females. **Meta Gene.** V. 9, p. 173-180, 2016.

CONFALONIERI, V. A.; SACTAGLINI, M. A.; LANTERI, A. Origin and dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: a mtDNA Phylogeographic study. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA**, 18. 2000. Foz do Iguaçu, PR. Resumos. Foz do Iguaçu: SEB, p. 567, 2000.

CONTRERAS, E.; SCHOPPEMEIER, M.; REAL, D.; RAUSELL, C. Sodium Solute Symporter and Cadherin Proteins Act as *Bacillus thuringiensis* Cry3Ba Toxin Functional Receptors in *Tribolium castaneum*. **Journal of Biological Chemistry.** v. 288, n. 25, 2013.

COSTA, S. R.; BUENO, M. G. A saga do algodão: das primeiras lavouras à ação na OMC. Rio de Janeiro: **Insight Engenharia.** p. 144, 2004.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., SCHENPF, E., VAN, J., LERECLUS, D., BAUM, J., *et al.* '***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**' [WWW document]. URL [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). 2011.

CHRIST, P.; REIFENRATH, A.; KAHNT, J.; HAUSER, F.; HILL, S.; SCHACHTNER, R. Feeding-induced changes in allatostatin-A and short neuropeptide F in the antennal lobes affect odor-mediated host seeking in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Plos One.** V. 12(11), 2017.

CHRIST, P.; HILL, S.; SCHACHTNER, J.; HAUSER, F.; IGNELL, R. Functional characterization of the dual allatostatin-A receptors in mosquitoes. *Peptides.* V. 99, p. 44-55. 2018.

CHRISTIE, A. E. Prediction of the first neuropeptides from a member of the Remipedia (Arthropoda, Crustacea). **Gen. Comp. Endocrinol.** V. 201, p. 74–86, 2014.

CRUZ, J.; MANÉ-PRADROZ, D.; BELLÉS, X. Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. **Developmental Biology.** V. 297, p. 158–171, 2006.

CRUZ, V. R.; PASSOS, S. M. G. As pragas do algodão e os controles convencional e integrado. Campinas: **CATI** (CATI. Documento Técnico, 59). p. 36, 1985.

DAVIES, L.; WILLIAMS, D.; TURNER, P.; REES, H. Characterization in relation to development of an ecdysteroid agonist-responsive cytochrome P450, CYP18A1, in Lepidoptera. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** V. 453, p. 4–12, 2006.

DAVIS, M.; KEEFE, S.; PRIMROSE, D.; HODGETTS, R. A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. **Development.** V. 134, p. 4395-4404, 2007.

DAVIS-VOGEL *et al.* Knockdown of RNA interference pathway genes impacts the fitness of western corn rootworm. **Scientific RePORTS.** V. 8, p. 7858, 2018.

DAVIDSON B.; MCCRAY P. Current prospects for RNA interference-based therapies. **Nat. Rev. Genet.** V. 12(5), p. 329–40, 2011.

DAI, LI; ADAMS, M. Ecdysis triggering hormone signaling in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **General and Comparative Endocrinology.** V. 162. p. 43-51. 2009.

DALMAY, T.; HAMILTON, A.; RUDD, S.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. **Cell.** V. 101, p. 543–553, 2000.

DE LARA, A. Expressão heteróloga da Toxina Cry 11Aa de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1919) var. israelensis em *Escherichia coli* (Escherich, 1885), visando o controle biológico. **UFP, Pelotas. Dissertação de mestrado.** 2013.

DE LOOF, A. Ecdysteroids, juvenile hormone and insect neuropeptides: recent successes and remaining major challenges. **General and Comparative Endocrinology.** V.155, p. 3–13, 2008.

DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genetic.** V.17, p.193–199. 2001.

DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, E. Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.** V. 37, p. 409-33, 2003.

DE OLIVEIRA, A.; CALCINO, A.; WANNINGER, A. Ancient origins of arthropod moulting pathway components. *Evolutionary Biology, Genetics and Genomics – Short Report.* V. 8, p. 46113, 2019.

DESHPANDE, S. Ecdysis Triggering Hormone Signaling in Adult *Drosophila melanogaster*. Tese (Doctor of Philosophy in Entomology) – University of California, Riverside, 2012.

DEVINE, G.; FURLONG, M. Insecticide use: contexts and ecological consequences. **Agr. Hum. Values.** V. 24, p. 281–306, 2007.

DIAO, F.; MENA, W.; SHI, J.; PARK, D.; DIAO, F.; TAGHERT, P.; EWER, J.; WHITE, B. The Splice Isoforms of the *Drosophila* Ecdysis Triggering Hormone Receptor Have Developmentally Distinct Roles. **Genetics.** V. 115, p. 182121, 2015.

DONG, Y.; WANG, Z.; JING, T. Functional characterization of ASTC (allatostatin C) and ASTCC (allatostatin double C) in *Clostera anastomosis* (Lepidoptera: Notodontidae). **Gene.** V. 598, p. 1-8. 2017.

ELLIOT, K.; CHAN, K.; STAY, B. Evidence for a Phe-Gly-Leu-amide-like allatostatin in the beetle *Tenebrio molitor*. **Peptides**. V. 31, p. 402-407. 2010.

EMBRAPA ALGODÃO - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Coleção 500 perguntas 500 respostas: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília – DF, 2004.

EMBRAPA ALGODÃO - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Subprodutos do Algodão. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/subprodutos.htm> Acessado em 1 de Dezembro de 2018.

EMBRAPA ALGODÃO - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. O agronegócio do algodão no Brasil. 2ª edição revista ampliada, volume 1, Brasília - DF, p. 21-63, 2008.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; NICHOLAS, B.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**. V. 15, p. 137-141. 1997.

FABRICK, J.; OPPERT, C.; LORENZEN, M.; MORRIS, K.; OPPERT, B.; JURAT-FUENTES, J. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. **J. Biol. Chem.** V. 284, p. 18401–18410, 2009.

FACUAL – **Fundação de Apoio à Cultura do Algodão**. **Algodão** – Pesquisas e resultados para o campo. Cuiabá, p. 206-239, 2006.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Entomol.** V. 47, p. 501 e 533. 2002.

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

FIRMINO, A.; FONSECA, F.; MACEDO, L.; COELHO, R.; SOUZA, J.; TOGAWA, O.; PAPPAS, G.; SILVA, M.; ENGLERS, J.; GROSSI, M. Transcriptome Analysis

in Cotton Boll Weevil(*Anthonomus grandis*) and RNA Interference in Insect Pests. **PLOS ONE.**, v. 8, 2013.

FONSECA, P.; JUNIOR, I.; SORIA, M.; KODAMA, C.; DEGRANDE, P. Inseticidas neonicotinoides no controle do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae) e a falha de controle do endossulfan. **Arq. Inst. Biol.** v.78, p.545-551, 2011.

FRANKENHUYZEN, K. V. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology.** V. 101, p.1-16, 2009.

GABRIEL, D. APTA – **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento.** O bicudo do algodoeiro – documento técnico. p. 1-20, 2016.

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

GALIKOVÁ, M.; DIESNER, M.; KLEPSATEL, P.; HEHLERT, P.; XU, Y.; BICKMEYER, Y.; PREDEL, R.; KUHNLEIN R. Energy Homeostasis Control in *Drosophila* Adipokinetic Hormone Mutants. **Genetics**, V. 201, p.665–683, 2015.

GARCIA, R. *et al.* Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **PLoS ONE** V.12, 2017.

GARCIA, S.; FERNÁNDEZ, C. Embriologia. **Artmed.**, 3ª edição, p. 241-258, 2012.

GILBERT, L. Insect Endocrinology. **Academic Press.**, First edition, 2012.

GILLOT, C. Entomology. Third Edition, **Published by Springer.**, 2005.

GÓMEZ, J.; LÓPEZ-PAZOS, S.; CÉRON, J. Determination of Cry toxin activity and identification of an aminopeptidase N receptor-like gene in *Asymmetetes vulcanorum* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology.** V. 111, p. 94–98, 2012.

GONCU, E.; URANLI, R.; SELEK, G.; PARLAK, O. Developmental expression of ecdysone-related genes associated with metamorphic changes during midgut remodeling of silkworm *bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Journal of Insect Science**. V. 16(1), p. 1-13. 2016.

GRIEBLER, M.; WESTERLUND, S.; HOFFMANN, K.; MEYERING-VOS, M. RNA interference with the allatoregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. **Journal of Insect Physiology**. V. 54, p. 997-1007. 2008.

GRONKE, S. *et al.* Dual Lipolytic Control of Body Fat Storage and Mobilization in *Drosophila*. **PLoS Biology**. V. 5. 2007.

GULLAN, P.; CRANSTON, P. The insects. An outline of Entomology. Fifth Edition. **John Wiley & Sons, Ltd.** 2014.

HANNON, G. RNA interference. Insight review articles. **Nature.**, v. 418, 2002.

HALBLEIB, J.; NELSON, W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. **Genes & Development**. V. 20, p. 3199-3214. 2006.

HANSEN, K.; STAFFLINGER, E.; SCHNEIDER, M.; HAUSER, F.; CAZZAMALI, G.; WILLIAMSON, M.; KOLLMANN, M.; SCHACHTNER, J.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. Discovery of a novel insect neuropeptide/GPCR signaling system closely related to the insect Adipokinetic Hormone and Corazonin Hormonal systems. **Journal of Biological Chemistry**. V. 285, p. 10736-10747, 2010.

HAUSER, F.; CAZZAMALI, G.; WILLIAMSON, M.; PARK, Y.; LI, B.; TANAKA, Y.; PREDEL, R.; NEUPERT, S.; SCHACHTNER, J.; VERLEYEN, P.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Frontiers in Neuroendocrinology**. V. 29, p. 142-165, 2008.

HAUSER, F.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. Evolution of the AKH/corazonin/ACP/GnRH receptor superfamily and their ligands in the Protostomia. **General and Comparative Endocrinology**. V. 209, p. 35–49, 2014.

HELFRICH-FORSTER, C. Sleep in insects. **Annu. Rev. Entomol.** V. 63, p. 69–86, 2018.

HENRICH, V. The ecdysteroid receptor. In.: Gilbert, L; Iatrou, K. & Gill, S. (Eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science**, v. 3842, 2005.

HENTZE, J.; CARLSSON, M.; KONDO, S.; NASSEL, D.; REWITZ, K. The Neuropeptide Allatostatin A Regulates Metabolism and Feeding Decisions in *Drosophila*. **Scientific Reports**. V. 5, p. 11680, 2015.

HERGARDEN, A.; TAYLER, T.; ANDERSON, D. Allatostatin-A neurons inhibit feeding behavior on adult *Drosophila*. **PNAS**. V. 109, p.3967-3972, 2012.

HIDALGO, K.; SIAUSSAT, D.; BRAMAN, V.; DABIRÉ, K.; SIMARD, F.; MOULINE, K.; RENAULT, D. Comparative physiological plasticity to desiccation in distinct populations of the malarial mosquito *Anopheles coluzzi*. **Parasites & Vectors**. V. 9, p. 565, 2016.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HOFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ - endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V. 85, p. 7844–7848, 1998.

HORST, D.; MARREWIJK, W.; VULLINGS, H.; DIEDEREN, J. Metabolic neurohormones: Release, signal transduction and physiological responses of adipokinetic hormones in insects. **Eur. J. Entomol.** V. 96, p. 299-308, 1999.

HOU, Q.; CHEN, E.; JIANG, H.; WEI, D.; GUI, S.; JIN-JUN, W.; SMAGGHE, G. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol mobilization and sexual behavior in the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*).

**Insect Biochemistry and Molecular Biology.** doi: 10.1016/j.ibmb.2017.09.006. 2017.

HUA, G.; PARK, Y.; ADANG, M. Cadherin AdCad1 in *Alphitobius diaperinus* larvae is a receptor of Cry3Bb toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** V. 45, p. 11 e 17, 2014.

HUANG, H.; HE, X.; DENG, X.; LI, G.; YING, G.; SUN, Y.; SHI, L.; BENOVIC, J.; ZHOU, N. Bombyx Adipokinetic Hormone Receptor Activates Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 via G Protein-Dependent PKA and PKC but  $\beta$ -Arrestin-Independent Pathways. **Biochemistry.** V. 49, p. 10862–10872, 2010.

HUSSAIN, T.; AKSOY, E.; ÇAHSKAN, M.; BAKHSH, A. Transgenic potato lines expressing hairpin RNAi construct of molting-associated *EcR* gene exhibit enhanced resistance against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say). **Transgenic Res.** V. 28, p. 151-164, 2019.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology.** V. 56, p. 227-235, 2010.

IMA – **Instituto Mato-Grossense do Algodão.** Boletim de P&D: O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros, Biologia e medidas de controle. Disponível em: [http://www.imamt.com.br/system/anexos/arquivos/301/original/Boletim\\_Pesquisa\\_Bicudo\\_completo.pdf?1441842704](http://www.imamt.com.br/system/anexos/arquivos/301/original/Boletim_Pesquisa_Bicudo_completo.pdf?1441842704) Acessado em 28 de Maio, 2015.

IMAmt- **Instituto Mato-Grossense De Algodão.** O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle. Boletim de P&D, número 2, 2015.

IHARA, H.; KURODA, E.; WADANO, A.; HIMENO, M. Specific toxicity of d-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** V. 57, p; 200–204, 1993.

ISRANI, B.; RAJAM, M. Silencing of ecdysone receptor, insect intestinal mucin and sericotropin genes by bacterially produced double-stranded RNA affects larval growth and development in *Plutella xylostella* and *Helicoverpa armigera*. **Insect Molecular Biology**. V. 26 (2), p.164-180, 2017.

IVERSEN, A.; CAZZAMALI, G.; WILLIAMSON, M.; HAUSER, F.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. Molecular Identification of the first insect ecdysis triggering hormone receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 299, p. 924-931, 2002.

JAKKA, S. *et al.* Field-Evolved Mode 1 Resistance of the Fall Armyworm to Transgenic Cry1Fa-Expressing Corn Associated with Reduced Cry1Fa Toxin Binding and Midgut Alkaline Phosphatase Expression. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 82, 2016.

JOHNSON, D.; MACGAUGHEY, W. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores do toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. **Curr. Microbiol.** V. 33, p. 54-59, 1996.

JURAT-FUENTES, F. L.; ADANG, M. J. The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in Drosophila S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. **Biochemistry**. V. 45(32), p. 9688-9695, 2006.

JURAT-FUENTES, J.; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology**. V. 142, p.5–10, 2017.

KARLSON, P. On the hormonal control of insects metamorphosis. A historical review. **Int. J. Dev. Biol.** p. 93-96, 1996.

KASSAB, A. L. Algodão. São Paulo: **Ícone Editora Ltda.**, p. 91, 1983.

KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N.; MURDOK, L. RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges. **Appl Biochem Biotechnol**. Doi: 10.1007/s12010-013-0399-4. 2013.

KHAN, M.; DALVIN, S.; WAHEED, Q.; NILSEN, F.; MALE, R. Molecular characterization of the lipophorin receptor in the crustacean ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. **Plos One**. 13 (4): e0195783. 2018.

KLOWDEN, M. Physiological systems in insects. Second Edition, **Academic Press is an imprint of Elsevier**. 2007.

KOLA, V.; RENUKA, P.; MADHAV, M.; MANGRAUTHIA, S. Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. **Frontiers in Physiology**. V. 6, 2015.

KOKALENKO, E.; MAZINA, M.; KRASNOV, A.; VOROBYEVA, N. The *Drosophila* nuclear receptors EcR and ERR jointly regulate the expression of genes involved in carbohydrate metabolism. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. 112, p. 103184. 2019.

KONUMA, T.; MOROOKA, N.; NAGASAWA, H.; NAGATA, S. Knockdown of the Adipokinetic Hormone Receptor Increases Feeding Frequency in the Two-Spotted *Cricket Gryllus bimaculatus*. *Endocrinology*. V. 153(7), p. 3111–3122, 2012.

KURSCHEID, S. *et al.* Evidence of a tick RNAi pathway by comparative genomics and reverse genetics screen of targets with known loss-of-function phenotypes in *Drosophila*. **BMC Molecular Biology**. V. 10, 2009.

LAMBERT, B.; HOFTE, H.; ANNYS, K.; JANSSENS, S., SOETAERT, P.; PEFFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Appl Environ Microbiol**. V. 5, p. 2536–2542, 1992.

LANGE, A.; ALIM, U.; VANDERMISSEN, H.; MIZOGUCHI, A.; BROECK, J.; ORCHARD, I. The distribution and physiological effects of the myoinhibiting peptides in the kissing bug, *Rhodnius prolixus*. **Frontiers in Neuroscience**. V. 6, p. 98, 2012.

LARSEN, M.; BURTON, K.; ZANTELO, M.; SMITH, V.; LOWERY, D.; KUBIAK, T. Type A allatostatins from *Drosophila melanogaster* and *Diptera punctata* activate two *Drosophila* allatostatin receptors, DAR-1 and DAR-2, expressed in CHO cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 286, p. 895-901, 2001.

LENAERTS, C.; COOLS, D.; VERDONCK, R.; VERBAKEL, L.; BROECK, J.; MARCHAL, E. The ecdysis triggering hormone system is essential for successful moulting of a major hemimetabolous pest insect, *Schistocerca gregaria*. **Scientific Reports**. V. 7, p. 46502, 2017.

LI, S.; HAUSER, F.; SKADBORG, F.; NIELSEN, S.; KIRKETERP-MOLLER, N.; GRIMMELJKHUIJZEN, C. Adipokinetic hormones and their G protein-coupled receptors emerged in Lophotrochozoa. **Nature, Scientific Reports**. V. 6, p.32789, 2016.

LU, K.; WANG, Y.; CHEN, X.; ZHANG, X.; LI, W.; CHENG, Y.; LI, Y.; ZHOU, J.; YOU, K.; SONG, Y.; ZHOU, Q.; ZENG, R. Adipokinetic hormone receptor mediates trehalose homeostasis to promote vitellogenin uptake by oocytes in *Nilaparvata lugens*. **Frontiers in Physiology**. V. 9, p. 1904. 2019.

LIMA-OLIVEIRA, A. ALEVI, K.; ANHE, A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. Alkaline phosphatase activity in salivary gland cells of *Rhodnius neglectus* and *R. prolixus* (Hemiptera, Triatominae). **Genetics and Molecular Research**. V. 15 (3), p. gmr.15038339, 2016.

LORENZ, M.; GADE, G. Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. **Integrative and Comparative Biology**. doi:10.1093/icb/icp019. V. 49, number 4, p. 380–392. 2009.

LÓPEZ-PAZOS, S.; GÓMEZ. J. Cry1B SAC. Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). **J. Invertebr. Pathol**. V. 101, p. 242–245.17, 2009.

LU, K.; ZHANG, X.; CHEN, X.; LI, W.; CHENG, Y.; ZHOU, J.; YOU, K.; ZJOU, Q. Adipokinetic Hormone Receptor mediates lipid mobilization to regulate starvation

resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Frontiers in Physiology**. V. 9, p. 1730, 2018.

LUBAWY, J.; MARCIANIAK, P.; KUCZER, M.; ROSINSKI, G. Myotropic activity of allatostatins in tenebrionid beetles. **Neuropeptides**. V. 70, p. 26-36. 2018.

MACEDO, L. *et al.* Knocking down *chitin synthase 2* by RNAi is lethal to the cotton boll weevil. **Issue 1**. V.1, p. 72-86, 2017.

MAGALHÃES, M. Toxinas Cry: Perspectivas para obtenção de algodão transgênico brasileiro. **UFRGS, Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado**. 2006.

MAITRE, J.; HEISENBERG, C. Three functions of Cadherins in cell adhesion. **Current Biology**. V. 23, p. 626-633. 2013.

MAJUMDAR, R.; RAJASEKARAN, K.; CARY, J. RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: concepts and considerations. **Frontiers in Plant Science**. V. 8, p. 200, 2017.

MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/acordo-de-r-18-milhoes-permite-acelerar-pesquisa-de-algodao-resistente-ao-bicudo> Acessado em 03/04/2018. Acessado em Julho de 2018.

MARCHAL, E.; SCHELLENS, S.; MONJON, E.; BRUYNINCKX, E.; MARCO, H.; GADE, G.; BROECK, J. VERLINDEN, H. Analysis of Peptide Ligand Specificity of Different Insect Adipokinetic Hormone Receptors. **Int. J. Mol. Sci.** v. 19, p. 542, 2018.

MARCINIAK, P., SXYMCZAK, M., BOGALSKA, J., AUDSLEY, N., ROSINSKI, G. Identification and localization of selected myotropic neuropeptides in the ventral nerve cord of tenebrionid beetles. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, V. 166, p. 44-51, 2013.

MARCO, H.; GADE, G. Five neuropeptide ligands meet one receptor: how does this tally? A structure-activity relationship study using adipokinetic bioassays with

the SpHINGID Moth, *Hippotion eson*. **Frontiers in Endocrinology**. V. 10, p. 231. 2019.

MARTINS, E. Estudo da atividade de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas para insetos-praga do algodoeiro. **UnB, Brasília. Tese de doutorado**. 2009.

MARTINS, E.; MONNERAT, R.; QUEIROZ, P.; DUMAS, V.; BRAZ, S.; AGUIAR, R.; GOMES, A.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A.; RIBERIO, B. Midgut GPI-anchored proteins with phosphatase activity from the cotton weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Bioc. And Molecular Biology**. V. 40, p. 138-145. 2010.

MAZINA, M.; KOCHERYZHKINA, E.; NIKOLENKO, J.; KRASNOV, A. Nuclear receptors EcR, Usp, E75, DHR3, and ERR regulate transcription of ecdysone cascade genes. **Biochemistry, biophysics, and molecular biology**. V. 473, p. 736-738. 2017.

MELLO, T.; ALEIXO, A.; PINHEIRO, D.; NUNES, F.; BITONDI, N.; HARTFELDER, K.; BARCHUK, A.; SIMÕES, Z. Developmental regulation of ecdysone receptor (EcR) and EcR-controlled gene expression during pharate-adult development of honeybees (*Apis mellifera*). **Frontiers in Genetic.**, v.4, p. 445, 2014.

METTE, M.; AUFSATZ, W.; VAN DER WINDEN, J.; MATZKE, M.; MARZKE, A. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. **EMBO J**. V. 19, p. 5194–5201, 2000.

MEYERING-VOS, M.; MERZ, S.; SERTKOL, M.; HOFFMAN, K. Functional analysis of the allatostatin-A type gene in the cricket *Gryllus bimaculatus* and the armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. 36, p. 492-504. 2006.

MILDE, J.; ZIEGLER, R.; WALLSTEIN, M. Adipokinet hormone stimulates neurones in the insect central nervous system. **The journal of experimental biology**. V. 198. p. 1307-1311, 1995.

MIRTH C.; RIDDIFORD L. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. **Bio Essays**. V. 29, p. 344–55, 2007.

MILLER, S.; BROWN, S.; TOMOYASU, Y. Larval RNAi in *Drosophila*. **Development Genes and Evolution**. V. 218, p. 505–510, 2008.

MOCHANOVÁ, M.; TOMCALA, A.; SVOBODOVÁ, Z.; KODRÍK, D. Role of adipokinetic hormone during starvation in *Drosophila*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. V. 226, p. 26-35, 2018.

MONNERAT, R.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. Controle Biológico, eds. Melo, I.S. Azevedo, J. L. Jaguariúna – SP, **Embrapa Meio Ambiente**. V. 3, p.163-200, 2000.

NAKASU, E. *et al.* Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. **Journal of Invertebrate Pathology**. V. 104, p. 227-230, 2010.

NANDETY, R.; KUO, Y.; NOURI, S.; FALK, B. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. **Bioengineered**. V. 6, p. 8-19; 2015.

NIJHOUT, H. Insect Hormones. Princeton, NJ: **Princeton University Press**. 1994.

NIU, J.; SHEN, G.; CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G.; WANG, J. Beyond insects: current status, achievements and future perspectives of RNAi in mite pests. **Pest Management Science**. V. 74, p. 2680-2687, 2018.

NOVAGEN. pET system manual, 1999. Disponível em: <https://research.fhcrc.org/content/dam/stripes/hahn/methods/biochem/pet.pdf>  
Acessado 14 de Maio de 2018.

NOVAGEN.

disponível

em:

[https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Origami-BDE3-Competent-Cells-Novagen,EMD\\_BIO-70837#documentation](https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Origami-BDE3-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-70837#documentation) Acessado em 29 de Julho de 2018.

OCHOA-CAMPUZANO, C.; REAL, M.; AMPARO, C.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.; BRAVO, A.; RAUSSEL, C. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 362(2), p. 437-42, 2007.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer Res.** V. 29, p. 427– 434, 2009.

OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA-NETO, O.; MOURA, H.; MACEDO, L.; ARRAES, F.; LUCENA, W.; LOURENÇO-TESSUTTI, I.; BARBOSA, A.; GROSSI-DE-SA, M. Transgenic cotton plants expressing Cry1Ia12 toxin confer resistance to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Frontiers in Plant Science**. V. 7, p. 165, 2016.

OPPER, B.; KRAMER, J.; BEEMAN, R. JOHNSON, D.; MCGAUGHEY, W. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **J. Biol. Chem.** V. 272, p. 23473–23476, 1997.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. **Toxins**. V. 6, p. 3296-3325, 2014.

PALU, R.; PRAGGASTIS, S.; THUMMEL, C. Parental obesity leads to metabolic changes in the F2 generation in *Drosophila*. **MOLECULAR METABOLISM**. V. 6, p. 631 e 639, 2017.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiol Rev.** p.1–20, 2013.

PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; PORTA, H.; RODRIGUEZ-ALMAZÁN, C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**. V. 30(3), p. 589–595, 2009.

PARTHASARATHY, R.; ZHENTAO, S.; ZHIYANG, S.; PALLI, S. Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochem Mol Biol**. V. 40(6), p. 429–439, 2010.

PARK, J.; FIRE, A. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. **Science**. V. 315, p. 241–244, 2007.

PARK, Y.; FILIPPOV, V.; GILL, S.; ADAMS, M. Deletion of the ecdysis-triggering hormone gene leads to lethal ecdysis deficiency. **Development**. V.129, p. 493-503, 2002.

PARK, Y.; ABDULLAH, M.; TAYLOR, M.; RAHMAN, K.; ADANG, M. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. **Appl. Environ. Microbiol**. V. 75, p. 3086–3092, 2009.

PARK, Y.; ZITNAN, D., GILL, S.; ADAMS, M. Molecular cloning and biological activity of ecdysis-triggering hormones in *Drosophila melanogaster*. **FEBS Lett.**, V. 463, p. 133–138, 1999.

PERRIMON, N.; NI, J-Q.; PERKINS, L. In vivo RNAi: Today and Tomorrow. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. V. 2, p. a003640, 2010.

PERLAK, F.; DEATON, R.; ARMSTRONG, T.; FUCHS, R.; SIMS, S.; GREENPLATE, J.; FISCHOFF, D. **Insect resistant cotton plants. Biotechnology**. V.8, p. 939-943, 1990.

PERKIN, L.; ADRIANOS, S.; OPPERT, B. Gene Disruption Technologies Have the Potential to Transform Stored Product Insect Pest Control. **Insects**. V. 7, p. 46, 2016.

PETEL, H.; ORCHARD, I.; VEENSTRA, J.; LANGE, A. The distribution and physiological effects of three evolutionarily and sequence-related neuropeptides

in *Rhodnius prolixus*: Adipokinetic hormone, corazonin and adipokinetic hormone/corazonin-related peptide. **General and Comparative Endocrinology**. V. 195, p.1-8, 2014.

PLAVSIN, I.; STASKOVÁ, T.; SERÝ, M.; SMÝKAL, V.; HACKENBERGER, B.; KODRÍK, D. Hormonal enhancement of insecticide efficacy in *Tribolium castaneum*: oxidative stress and metabolic aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. V. p. 170, 19-27, 2015.

PRIETO-SAMSÓNOV, D.; VÁSQUEZ-PÁDRON, R.; AYRA-PARDO, C.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; RIVA, G. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**. V. 19, p. 202–219, 1997.

PRABHA, S.; VYAS, R.; GUPTA, N.; AHMED, B.; CHANDRA, R.; NIMESH, S. RNA interference technology with emphasis on delivery vehicles-prospects and limitations. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**., Early Online: 1–9, 2015.

PREDEL, R.; NEUPERT, S.; RUSSEL, W.; SCHEIBNER, O.; NACHMAN, R. **Peptides**. V. 29, p. 3-10. 2007.

RIBEIRO *et al.* Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. **Plant Biotechnology Journal**. p. 1–13, 2017.

RUBIO, M.; BELLÉS, X. Subtle roles of microRNAs let-7, miR- 100 and miR-125 on wing morphogenesis in hemimetabolan metamorphosis. **J. Insect Physiol.** V. 59, p. 1089–1094, 2013.

RUIZ, M.; VOINEET, O.; BAULCOMBE, D. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **Plant Cell**. V. 10, p. 937–946, 1998.

RIE, V.; MCGAUGHEY, W.; JOHNSON, D.; BARNETT, B.; VAN M. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**. V. 247, p. 72–74, 1990.

ROCHA, F.; VARIAL, L.; GITAHY, P.; BALDANI, J. Análise da expressão heteróloga do gene cry1Aa no controle da broca de cana-de-açúcar. XII Semana Científica Johanna Dobereiner – **Embrapa Agrobiologia**, iniciação científica. 2012. Disponível em:

<http://www.ojs.cnpab.embrapa.br/index.php/scjd/article/viewFile/1325/250>

Acessado em 14 de Maio de 2018.

ROLLER, L.; ZITNANOVA, I.; DAI, L.; SIMO, L.; PARK, Y.; SATAKE, H.; TANAKA, Y.; ADAMS, M.; ZITNAN, D. Ecdysis triggering hormone signaling in arthropods. **Peptides**. V. 31, p. 429-441, 2010.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**. V. 24, n.1, 2006.

ROSELEM, C. Ecofisiologia e manejo da cultura do algodoeiro – **Encarte técnico, Patafos**. INFORMAÇÕES AGRONÔMICAS Nº 95, p. 1-9, 2001.

RUIZ-ARROYO, V. *et al.* Validation of ADAM10 metalloprotease as a *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin functional receptor in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). **Insect Molecular Biology**. V. 26, p. 204-214, 2016.

SAHBAZ, B.; SEZERMAN, O.; TORUN, H.; LYISON, N. Ligand binding pocket of a novel allatostatin receptor type C of stick insect, *Carausius morosus*. **Scientific Reports**. V. 7, p. 41266, 2017.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R.; CAPELL, T.; CRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**. V. 9, p. 283–300, 2011.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agron. Sustain. Dev.** V. 31, p. 217 e 231, 2011.

SANTOS, R.; SANTOS, J. Crise na cadeia produtiva do algodão. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas.**, v. 1, p. 25-36, 1997.

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, p. 610-615, 2000.

SASAKI, M.; AKIYAMA-ODA, Y.; ODA, H. Evolutionary origin of type IV classical cadherins in arthropods. **BMC Evolutionary Biology**. V. 17, p.142, 2017.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, J.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. V. 62, n.3, SEP, 1998.

SCHERKENBECK, J., ZDOBINSKY, T. Insect neuropeptides: Structures, chemical modifications and potencial for insect control. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V.17, p. 4071-4084, 2009.

SCHOOFS, L.; LOOF, A.; HIEL, M. Neuropeptides as Regulators of Behavior in Insects. **Annu. Rev. Entomol.** V. 62, p.35–52, 2007.

SCOTT, J.; MICHEL, K.; BARTHOLOMAY, L.; SIEGFRIED, B.; HUNTER, W.; SMAGGIE, G.; ZHU, K.; DOUGLAS, A. Towards the elements of successful insect RNAi. **J. Insect Physiol.** V. 59(12), 2013.

SEDRA, L.; HADDAD, A.; LANGE, A. Myoinhibitors controlling oviduct contraction within the female blood-gorging insect, *Rhodnius prolixus*. **General and Comparative Endocrinology**. V. 211, p. 62-68. 2015.

SHI, Y.; HUANG, H.; DENG, X.; HE, X.; YANG, J.; YANG, H.; SHI, L.; MEI, L.; GAO, J.; ZHOU, N. Identification and functional characterization of two orphan G-protein-coupled receptors for Adipokinetic Hormones from Silkworm *Bombyx mori*. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 286, p. 42390-42402, 2011.

SHI, Y.; JIANG, H.; GUI, S.; LIU, X.; PEI, Y.; XU, L.; SMAGGHE, G.; WANG, J. Ecdysis triggering hormone signaling (ETH/ETHR-A) is required for the larva-larva ecdysis in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Frontiers in Physiology**. V. 8, p.587, 2017.

SILVA NETO, P. C. Diagnóstico da ocorrência do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman, no Brasil. In: SILVA NETO, P. C. Informações técnicas sobre a ocorrência das pragas. Brasília: **SDSV (SDSV, Boletim Técnico, 1)** p. 8-34, 1987.

SOARES, J.; CARVALHO, O.; MOULIM, M.; SILVA, M.; ALENCAR, A. Validação de um sistema de Manejo Integrado de Pragas para o Oeste da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19. Manaus, AM. *Resumos*. Manaus: **INPA/SEB.**, p. 289, 2002.

SOIN, T.; IGA, M.; SWEVERS, L.; ROUGÉ, P.; JANSSEN, CR.; SMAGGHE, G. Towards Coleoptera-specific high-throughput screening system for compounds with ecdysone activity: development of EcR reporter assays using weevil (*Anthonomus grandis*)-derived cell lines and in silico analysis of ligand binding to A. grandis EcR ligand-binding pocket. **Insect Biochem Mol Biol**. V. 39(8), p. 523-534, 2009.

SOUSA, L. O algodoeiro: Alguns aspectos importantes da cultura. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**. Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA) ISSN, p.1981-8203, 2010.

SWAMY, M. ASOKAN, R.; THIMMEGOWDA, G. MAHMOOD, R. Expression of *cry3A* gene and its toxicity against Asian Gray Weevil *Mylokerus undecimpustulatus undatus* Marshall (Coleoptera: Curculionidae). **J. Basic Microbiol**. V. 53, p. 664–676, 2013.

STAY, B.; TOBE, S. The Role of Allatostatins in Juvenile Hormone Synthesis in Insects and Crustaceans. **Annu. Rev. Entomol**. V. 52, p. 277-99, 2007.

SUWANSA-ARD, S.; ZHAO, M.; THONGBUAKAEW, T.; CHANSELA, P.; VENTURA, T.; CUMMINS, S.; SOBHON, P. Gonadotropin-releasing hormone and adipokinetic hormone/corazonin-related peptide in the female prawn. **General and Comparative Endocrinology**. V. 236, p. 70-82, 2016.

TAN, A.; PALLI, S. Ecdysone receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Mol Cell Endocrinol.** V. 291, p. 42-49, 2008.

THAIRU, M.; SKIDMORE, I.; BANSAL, R.; NOVÁKOVÁ, E.; HANSEN, T.; LIBYARLAY, H.; WICKLINE, S.; HANSEN, A. Efficacy of RNA interference knockdown using aerosolized short interfering RNAs bound to nanoparticles in three diverse aphid species. **Insect Molecular Biology.** V. 26(3), p. 356–368, 2017.

TOBE, Stephen S.; BENDENA, William G. **In Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition).** 2013.

TORET, C.; D'AMBROSIO, M.; VALE, R.; SIMON, M.; NELSON, W. A genome-wide screen identifies conserved protein hubs required for cadherin-mediated cell-cell adhesion. **JCB: Tools.** V. 204, 2014.

TRUMAN, J. Hormonal control of insect ecdysis: endocrine cascades for coordinating behavior with physiology. **Vitamins and Hormones.** V. 73, 0083-6729, Elsevier Inc. 2005.

VAFOPOULOU, X.; STEEL, C. Developmental and diurnal changes in ecdysteroid biosynthesis by prothoracic glands of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) in vitro during the last larval instar. **General and Comparative Endocrinology.** V. 74, p. 484-493, 1989.

VALLENE, S. Functional genomic analysis of the Drosophila immune response. **Developmental and Comparative Immunology.** V. 42, p. 93-101, 2014.

VELLICHIRAMMAL, N.; GUPTA, P.; HALF, T./ BRISSON, J. Ecdysone signaling underlies the pea aphid transgenerational wing polyphenism. **PNAS.** V. 114, 6, p. 1419-1423, 2017.

VERMEULEN, A., BEHLEN, L. REYNOLDS, A., WOLFSON, A. MARSHALL, WS, KARPILOW, J. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. **RNA.** V. 11, p. 674-682, 2005.

VERLINDEN, H.; GIJBELS, M.; LISMONT, E.; LANAERTS, C.; BROECK, J.; MARCHAL, E. The pleiotropic allatoregulatory neuropeptides and their receptors: A mini-review. *Journal of Insect Physiology*. V. 80, p. 2-14, 2015.

VOGEL, E.; SANTOS, D.; MINGELS, L.; VERDONCKT, T.; BROECK, J. RNA interference in insects: protecting beneficials and controlling pests. **Frontiers in Physiology**. V. 9, p. 1912, 2019

WAHEDI, A.; PALUZZI, P. Molecular identification, transcript expression, and functional deorphanization of the adipokinetic hormone/corazonin-related peptide receptor in the disease vector, *Aedes aegypti*. **Scientific RepoRts**. V. 8, 2146, 2018.

WANG, S.; LIU, S.; LIU H.; WANG, J.; ZHOU, S.; JIANG, R.; BENDENDA, W.; LI, S. 20-hydroxyecdysone Reduces Insect Food Consumption Resulting in Fat Body Lipolysis During Molting and Pupation. **Journal of Molecular Cell Biology**. V. 2, p. 128–138, 2010.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, H.; KUBO, T. Structural diversity and evolution of the N-terminal isoform-specific region of ecdysone receptor-A and -B1 isoforms in insects. **BMC Evolutionary Biology**. V. 10, 40, 2010.

WEI, J.; HALE, K.; CARTA, L.; PLATZER, E.; WONG, C.; FANG, S.; AROJAN, R. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proc. Natl. Acad. Sci**. V. 100, p. 2760–2765, 2003.

WILSON, R.; DOUDNA, J. Molecular mechanism of RNA interference. **Annu. Rev. Biophys**. V. 42, p. 217–39, 2013.

ZANDAWALA, M.; HADDAD, A.; HAMOUDI, Z.; ORCHARD, I. Identification and characterization of the adipokinetic hormone/corazonin-related peptide signaling system in *Rhodnius prolixus*. **The FEBS Journal**. V. 282, p. 3603-3617, 2015.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.; TAUSSING, R.; BULLA, L. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proc Natl Acad Sci**. V. 103, p. 9897–9902, 2006.

ZHANG, Y.; ZHENG, G.; TAN, J.; LI, C.; CHENG, L. Cloning and characterization of a novel *cry8Ab1* gene from *Bacillus thuringiensis* strain B-JJX with specific toxicity to Scarabaeid (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. **Microbiol Res.** V. 168, p. 512–517, 2013.

ZHANG, Z.; TENG, X.; MA, W.; LI, F. Knockdown of two Cadherin genes confers resistance to Cry2A and Cry1C in *Chilo suppressalis*. **Scientific Reports.** V. 7, 5992, 2017.

ZHOU, Y.; FUKUMURA, K.; NAGATA, S. Effects of adipokinetic hormone and its related peptide on maintaining hemolymph carbohydrate and lipid levels in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.** V. 82, p. 274-284, 2018.

ZHU, C.; HUANG, H.; HUA, R.; LI, G.; YANG, D.; LUO, J.; ZHANG, C.; SHI, L.; BENOVIC, J.; ZHOU, N. Molecular and functional characterization of adipokinetic hormone receptor and its peptide ligands in *Bombyx mori*. **NIH Public Access.** V. 583(9), p.1463-1468, 2009.

ZHU F.; XU J.; PALLI R.; FERGUSON J.; PALLI, S. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Pest Manag Sci.** V. 67, p. 175-82, 2011.

ZHU, L.; ZHANG, W.; LI, G.; SUN, Q.; WANG, J.; SMAGGHE, G. Molecular characterization of ecdysis triggering hormone and its receptor in citrus red mite (*Panonychus citri*). **Comparative Biochemistry and Physiology.** V. 230, p. 100-105, 2019.

ZIEGLER, R.; ISOE, J.; MOORE, W.; RIEHLE, M.; WELLS, M. The putative AKH Receptor of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its expression. **Journal of Insect Science.** V. 11, Article 40, 2011.

ZITNAN, D.; ZITNANOVA, I.; SPALOVSKAS, I.; TAKAE, P.; PARK, Y.; ADAMS, M. Conservation of ecdysis-triggering hormone signalling in insects. **J. Exp. Biol.** V. 206, p. 1275–1289, 2003.

ZITNAN, D.; KIM, Y.; ZITNANOVA, I.; ROLLER, L.; ADAMS, M. Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. **Gen. Comp. Endocrinol.** V. 153, p. 88–96, 2007.

ZOTTI, M. *et al.* RNAi technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science.** V. 74, p. 1239-1250, 2018.

YAMANAKA, N.; HUA, Y.; ROLLER, L. SPALOVSKA-VALACHOVA, I.; MIZOGUCHI, A.; KATAOKA, H. *Bombyx* prothoracicostatic peptides activate the sex peptide receptor to regulate ecdysteroid biosynthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.** V. 107, p. 2060–2065, 2010.

YAMANAKA, N.; REWITZ, K.; CONNOR, M. Ecdysone Control of Developmental Transitions: Lessons from *Drosophila* Research. **Annu Rev Entomol.** V. 58, p. 497–516, 2013.

YAN, T.; CHEN, H.; SUN, Y.; YU, X.; XIA, L. RNA interference of the ecdysone receptor genes EcR and USP in Grain Aphid (*Sitobion avenae* F.) affects its survival and fecundity upon feeding on wheat plants. **International Journal of Molecular Sciences.** 17, 2098. 2016.

YAO, T.; SAFRAVES, W.; MCKEOWN, M.; EVANS, R. *Drosophila ultra-spiracle* modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. **Cell.** V. 71, p. 63–72, 1992.

YOGINDRAN, S.; RAJAM, M. Artificial miRNA-mediated silencing of ecdysone receptor (EcR) affects larval development and oogenesis in *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** V. 77, p. 21-30, 2016.

YU, R.; XU, X.; LIANG, Y.; TIAN, H.; PAN, Z.; JIN, S.; WANG, N.; ZHANG, W. The Insect Ecdysone Receptor is a Good Potential Target for RNAi-based Pest Control. **J. Biol. Sci.** V. 10, 2014.

YUE, Z.; LI, X.; ZHANG, E.; LIU, Z.; ZHAO, Z. A potential and novel type transgenic corn plant for control of the Corn Borer. **Scientific Reports.** V. 7, 44105, 2017.

XU, C.; WANG, B.; YU, Z.; SUN, M. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. **Toxins**. V. 6, p. 2732-2770, 2014.

## 15. Anexo I – Produção científica (2016 - 2020)

*Patente depositada no INPI, BR 102020004312\_9 Março de 2020:*

**LEITE, A.; ANTONINO, J.; COELHO, R.; MOREIRA-PINTO, C.; MACEDO, L.; MATTAR DA SILVA, C.; GROSSI-DE-SA, M. dsRNA INSETICIDA aplicado ao SILENCIAMENTO GÊNICO DE MOLÉCULAS RECEPTORES DE NEUROPEPTÍDEOS.**

*Patente aprovada na EMBRAPA, Novembro de 2019:*

**LEITE, A.; MACEDO, L.; MATTAR DA SILVA, C.; GROSSI-DE-SA, M. Silenciamento do gene Caderina – controle biotecnológico para *A. grandis*, via RNA interferente.**

*Manuscrito aceito em Novembro de 2019:*

**FREITAS, E.; MELO, B.; LOURENÇO-TESSUTTI, I.; ARRAES, F.; AMORIM, R.; LISEI-DE-SA, M.; COSTA, J.; LEITE, A.; FAHEEM, M.; FERREIRA, M.; MORGANTE, C.; FONTES, E.; GROSSI-DE-SA, M. Identification and characterization of the *GmRD26* soybean promoter in response to abiotic stresses: potential tool for biotechnological application. *BMC Biotechnology*.**

*Manuscrito submetido em 17 de setembro de 2019:*

**MOREIRA-PINTO, CLIDIA EDUARDA; COELHO, ROBERTA R.; LEITE, ANA GABRIELA B.; AMARAL, DANIELA S.; DE SOUZA, DANIELA A.; LOPES, ROGERIO B.; MATTAR DA SILVA, MARIA C.; MACEDO, LEONARDO L. P.; ANTONINO, JOSÉ DIJAI; GROSSI-DE-AS, MARIA FATIMA. Increasing *Anthonomus grandis* susceptibility to *Metarhizium anisopliae* through RNAi-induced *AgraRelish* knockdown: a perspective to combine biological control and biotechnology. *Journal of Pest Science*.**

### **Futuras publicações**

*Manuscrito em fase de término e submissão:*

**LEITE, A.; COELHO, R.; ANTONINO, J.; GARCIA, R.; MATTAR DA SILVA, C.; GROSSI-DE-SA, M. Receptors required for insect metamorphosis are potential targets for *Anthonomus grandis* control using RNAi-based strategies.**