



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Identificação e perfil de expressão de transcritos relacionados
à olfação no percevejo-marrom *Euschistus heros* (Hemiptera:
Pentatomidae) praga da soja**

Luciana Ramalho de Farias

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Sônia Nair Bão

Brasília, 2011

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Identificação e perfil de expressão de transcritos relacionados
à olfação no percevejo-marrom *Euschistus heros* (Hemiptera:
Pentatomidae) praga da soja**

Luciana Ramalho de Farias

Orientadora: Prof^a Dr^a. Sônia Nair Bão

Co-Orientadores: Dr^a. Débora Pires Paula

Prof. Dr. Bergmann Morais

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.

Brasília, 2011

"Nossa maior fraqueza é desistir. O caminho mais certo para o sucesso é sempre tentar mais uma vez".

Thomas Edson

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho, fazendo dessa jornada uma experiência inesquecível.

Aos meus pais, Valéria e Fernando e ao meu irmão Fernando, por tornar tudo isso possível, pelo amor, carinho, dedicação, paciência, cuidado e apoio incondicional a mim dedicado. Vocês são parte disso tudo e representam a maior motivação para a realização de todas as minhas conquistas. Amo vocês!

À minha orientadora Prof^a Dr^a Sônia Nair Bão, pela confiança, sugestões, oportunidades e atenção dedicadas durante todo o desenvolvimento do meu trabalho. Sua conduta profissional é admirável e inspiradora.

À minha co-orientadora Dr^a Débora Pires Paula, por todos os ensinamentos e atenção a mim dedicados durante esses anos de convivência. Por todas as oportunidades oferecidas, pelo carinho, amizade, sinceridade e por sempre acreditar que eu posso mais. Você é um grande ser humano, com o qual eu tenho o privilégio de aprender sempre mais sobre ciência e sobre a vida.

Ao Dr. Jing-Jiang Zhou, pelo acolhimento, ensinamentos, atenção e oportunidade concedida para realização de parte deste trabalho em seu laboratório, no instituto de pesquisa agropecuária Rothamsted Research, Harpenden, Inglaterra.

À Xiao Li He e Renhu Liu, por dividirem suas experiências comigo, ampliando o meu conhecimento na área molecular.

Aos pesquisadores Dr. Miguel Borges, Dra. Maria Carolina Blassioli de Moraes e Dr. Raul A. Laumann e a todo o grupo de Ecologia Química da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), pela manutenção da colônia de *Euschistus heros* e disponibilização dos insetos para o desenvolvimento do estudo, por suas sugestões, contribuições e esclarecimentos sempre que solicitados.

Ao Prof. Dr. Bergmann Morais, pela colaboração nos projetos que viabilizaram a realização deste mestrado.

Ao Dr. Georgios Pappas, pela colaboração nas análises de bioinformática e sugestões sempre enriquecedoras para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Octávio Franco, por me oferecer a primeira oportunidade de conhecer o mundo fascinante da pesquisa científica. Obrigada pelo carinho e amizade construída durante os cinco anos de convivência. Você contribuiu de maneira significativa para o meu amadurecimento pessoal e profissional e é, de certa forma, responsável por mais essa conquista.

Aos amigos Clarissa Pedrosa, Lúcia Pedrosa, Candido Gomes, Paula Jaccoud, Daniel Carvalho, Karine Vilas Boas, Ana Paula Duda, Gisela Rocha e Diogo Silva, pelas orações, torcida, carinho, conversas, companheirismo e momentos de descontração tão necessários e bem-vindos no decorrer desta e de tantas outras jornadas. Quero vocês na minha vida para sempre.

Aos amigos Valentina Maestri, Kashia Dybal, Carlos Bayon e Eliza Loza, por me fazerem sentir em casa, mesmo estando a milhares de quilômetros de distância. Ainda bem que a internet existe, assim, tenho vocês sempre por perto.

À Denise Andrade, por todos esses anos de carinho e dedicação à nossa família.

Aos amigos Renata Velozo e Ramon Fernandez, por me acompanharem nessa jornada e tornar o dia-a-dia no laboratório mais lúdico. Renata, obrigada por toda ajuda, principalmente as das infindáveis horas de extração das partes dos insetos no fluxo.

Aos amigos Érica Martins, Paulo Queiroz, Leonardo Pepino, Djair Júnior e Roberta Antonino (minha querida), pela troca de experiências, apoio e incentivo durante todo esse período de convivência.

Ao Dr. Maurício Machaim, pela disponibilização do equipamento de PCR quantitativo (qPCR) em Tempo Real e ajuda na delineação experimental; e à Rosana Nishimura, por me ensinar sobre o equipamento e seu programa de execução.

À Dra Diva Dusi, por me acompanhar durante a realização da hibridização *in situ*, pelas sugestões de melhoramento e análise dos resultados obtidos, bem como pela torcida para que tudo desse certo e vibração com os resultados.

À Universidade de Brasília (UnB) e à Embrapa Cenargen pela oportunidade de realização deste Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo e à FAP-DF pela concessão de passagens e diárias para intercâmbio em Rothamsted Research.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	v
Siglas e Abreviaturas	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	2
2.1 Percevejo-marrom	2
2.2 Proteínas relacionadas à olfação	4
3. Objetivos	9
3.1 Objetivo geral	9
3.2 Objetivos específicos	9
4. Material e Métodos	9
4.1 Colônia do percevejo-marrom da soja	10
4.2 Obtenção dos <i>EherOBPs</i>	10
4.3 Análise da expressão dos <i>EherOBPs</i>	17
4.4 Análise estatística	19
4.5 Localização in situ dos <i>EherOBPs</i> nas antenas do percevejo-marrom	20
5. Resultados e Discussão	22
5.1 Identificação das <i>EherOBPs</i> no percevejo-marrom	22
5.2 Expressão dos <i>EherOBPs</i>	29

5.3 Histolocalização dos mRNAs <i>Eher</i> OBP _s nas antenas de <i>E. heros</i>	35
6. Conclusões	40
7. Perspectivas	40
8. Referências Bibliográficas	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Percevejo-marrom *Euschistus heros*. A presença dos espinhos protonais e a coloração marrom-escura representam características marcantes do inseto adulto. Foto: Cecília Vieira.

Figura 2. Representação ilustrativa do sensila. Cada sensila possui entre 2 e 3 neurônios cujos dendritos projetam-se através do lúmen preenchido pela linfa sensilar. Fonte: Blomquist e Vogt, 2003.

Figura 3. Principais etapas da construção da biblioteca de cDNA utilizando o kit *SMART cDNA Library Construction*(Clontech®). Reproduzido do manual do kit.

Figura 4. Mapa de restrição do vetor pDNR-LIB (Clontech®). Fonte: Manual do Usuário *SMART cDNA Library Construction*.

Figura 5. Mapa de restrição do vetor pSPT19 (Roche®). Adaptado do manual do usuário do DIG RNA Labeling (SP6/T7).

Figura 6. Preparação para a construção da biblioteca de cDNA de antenas de machos e fêmeas de *E. heros*. **A.** Checagem da qualidade do cDNA obtido. **B.** Purificação do cDNA em CHROMA SPIN 400 (Clontech®). As frações 7-9 foram agrupadas e concentradas previamente à clonagem. **M:** marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas). Ambos foram fracionados por eletroforese em agarose 1%, corados por brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados a 302 nm.

Figura 7. Obtenção da biblioteca de cDNA de antenas de machos e fêmeas de *E. heros*. **A.** Placa ilustrando colônias de *E. coli* transformadas com o vetor pDNR-LIB contendo os cDNAs clonados. **B.**Verificação da presença dos insertos no vetor pDNR-LIB nos clones obtidos da biblioteca de cDNA. Eletroforese em agarose 1%, corados por

brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados a 302 nm. **M**: marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

Figura 8. Esquema de análise da biblioteca de cDNA realizada para a identificar transcritos relacionados à olfação nas antenas do percevejo-marrom.

Figura 9. Sequências nucleotídicas e dedução das sequências de aminoácidos, parcial e completa, das *EherOBP1* e *EherOBP2*, respectivamente. O sinal '-' representa o códon de terminação da sequência.

Figura 10: Identificação das OBPs de *E. heros* após alinhamento múltiplo pelo BLAST/NCBI. **A.** *EherOBP1*; **B.** *EherOBP2*.

Figura 11. Alinhamento das *EherOBPs* com OBPs mais similares identificadas pelo BLASTp, utilizando-se o programa ClustalW e edição no BOXSHADE.. Os seis resíduos de cisteína são indicados pelos números 1-6. Os resíduos de aminoácidos idênticos estão realçados em preto; enquanto os resíduos similares estão realçados em cinza. LAP: *Lygus lineolaris* (AF091118.1); *AfabOBP*: *Aphis fabae* (FM242556.1); *MperOBP*: *Myzus persicae* (FJ215309.1); *ApisOBP*: *Acyrtosiphon pisum* (NM001160061.1; FM242534.1); *NribOBP*: *Nasonovia ribis-nigri* (FN293391.1); *ClecOBP*: *Cimex lectularius* (EZ419715.1); *RproOBP*: *Rhodnius prolixus* (FN293394.1); *NlugOBP*: *Nilaparvata lugens* (FJ215306.1); *TcasOBP*: *Tribolium castaneum* (CM000279.1; CM000280.2); *RpalOBP*: *Rhynchophorus palmarum* (AY394703.1); *PjapOBP*: *Popillia japonica* (AF031491.1); *AosaOBP*: *Anomala osakana* (AF031492.1); *BmorOBP*: *Bombyx mori* (NM001044035.1); *GmorOBP*: *Glossina morsitans morsitans* (FN432782.1); *ScalOBP*: *Stomoxys calcitrans* (FJ233075.1); *LmigOBP*: *Locusta migratória* (FJ215322.1).

Figura 12. Curva-padrão obtida para os iniciadores utilizados na análise da expressão dos *EherOBPs*.

Figura 13. Curvas de dissociação para o gene de referência rRNA18S. **A-E**: curvas de dissociação obtidas para fêmeas; **(A)**: antenas; **(B)** cabeça; **(C)**: patas; **(D)**: asas e **(E)**:

abdômen. **F-J**: curvas de dissociação obtidas para machos; **(F)**: antenas; **(G)**: cabeça; **(H)**: patas; **(I)**: asas; **(J)**: abdômen.

Figura 14. Curvas de dissociação observadas para os experimentos conduzidos com os *EherOBPs* em diferentes partes do corpo da fêmea. **A-C**: *EherOBP1*; **(A)**: antenas; **(B)**: patas e **(C)**: abdômen. **D-G**: *EherOBP2*; **(D)**: antenas; **(E)** cabeça; **(F)**: patas e **(G)**: abdômen.

Figura 15. Curvas de dissociação observadas para os experimentos conduzidos com os *EherOBPs* em diferentes partes do corpo do macho. **A e C**: *EherOBP1*; **(A)**: antenas; **(B)**: patas. **C-E**: *EherOBP2*; **(C)**: antenas; **(D)** asas; **(E)**: abdômen.

Figura 16. Representação esquemática da expressão significativa dos transcritos *EherOBPs* nos diferentes tecidos do percevejo-marrom analisados. Tecidos onde a expressão foi muito próxima de zero não foram coloridos.

Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura da antena de fêmea de *E. heros*. **(A)** Os cinco segmentos da antena: Sc: escapo; P1: pedicelo 1; P2: pedicelo 2; F1: flagelo 1; F2: flagelo 2. **(B)** Tipos de sensilas presentes na antena: SB: sensilas basicônica; ST: sensilas tricódea. Adaptado de Silva *et al.*, 2010.

Figura 18. Hibridização *in situ* com sonda anti-senso (SP6) *EherOBP1* nas antenas de machos e fêmeas de *E. heros*. **A**: Antena de macho; **B1, B2 e B2**: Antena de fêmea. As setas em vermelho apontam os sítios de hibridização. **F1**: flagelo 1; **P1**: pedicelo 1; **Sc**: escapo.

Figura 19. Perfil de expressão do transcrito *EherOBP2* nas antenas de machos e fêmeas de *E. heros*. **A1 e A2**: Hibridização *in situ whole-mount* com sonda anti-senso (SP6) na antena de macho; **B1 e B2**: Hibridização das antenas de fêmeas com sonda anti-senso (SP6). As setas em vermelho apontam os sinais hibridização. **F1**: flagelo 1; **F2**: flagelo 2; **Sc**: escapo.

Figura 20. Controle negativo da hibridização *in situ* utilizando sonda anti-senso para o rRNA da espécie vegetal *Arabidopsis thaliana*. **F2:** flagelo 2; **P1:** pedicelo 1; **Sc:** escapo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para as análises de confirmação das sequências de DNA das *EherOBP* se para os estudos de expressão gênica em *E. heros*.

Tabela 2. Proporção, determinada pelo método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$, do nível de expressão dos *EherOBPs* em diferentes partes do corpo do macho comparado com o nível de expressão nas antenas.

Tabela 3. Nível de expressão dos *EherOBPs* em diferentes partes do corpo da fêmea comparado com o nível de expressão nas antenas. Análise comparativa realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 4. Análise comparativa do nível de expressão dos *EherOBP1* e *2* nas antenas de fêmeas em relação as antenas de machos

SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	<i>Alkline Phosphatase</i>
°C	Grau Celsius
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CSP	<i>Chemosensory Protein</i>
DIG	Digoxigenina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
GOBP	<i>General Odorant Binding Protein</i>
h	Hora
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
kV	Quilovolt
LB	Luria-Bertani
M	Molar
μF	Micro Faraday
μg	Micrograma
min	Minuto
μL	Microlitro
μM	Micromolar

mL	Mililitro
mm	Milimetro
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NBT-BCIP	Azul de nitro-tetrazólio e fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil
ng	Nanograma
OBP	<i>Odorant Binding Protein</i>
OD	Densidade Óptica
pb	Par de base
PBP	<i>Pheromone Binding Protein</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pI	Ponto isoelétrico
%	Por cento
qPCR	Reação em cadeia da polimerase método quantitativo
rpm	Rotação por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
s	Segundo
sscDNA	DNA complementar de fita simples
3D	Tridimensional
UR	Umidade relativa

Resumo

O percevejo-marrom *Euschistus heros* é uma praga que reduz consideravelmente a produtividade nacional de culturas agrícolas de grande importância econômica, dentre elas a soja. Visando subsidiar o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas alternativas para auxílio no controle dessa praga, o presente trabalho realizou o estudo da expressão de genes relacionados à olfação e análise do perfil e sítios de expressão utilizando as técnicas de qPCR em Tempo Real e hibridização *in situ*, respectivamente. A prospecção foi realizada através da construção de uma biblioteca de cDNA a partir do RNA total extraído das antenas utilizando o kit *Smart cDNA Library Construction* (Clontech®). Mil clones foram sequenciados e, através de bioinformática, foram identificadas duas sequências de 477 e 294 pares bases pertencentes a genes da família das proteínas ligantes de odorantes (*Odorant Binding Protein* - OBP) que foram denominados *EherOBP1* e *EherOBP2*, respectivamente. O *EherOBP1* possui sequência deduzida de aminoácidos de 16 kDa e pI 5,18, peptídeo sinal na extremidade N-terminal, domínio de ligação a feromônio (*Pheromone Binding Protein* – PBP) e seis resíduos de cisteína em posições conservadas, todas características esperadas para proteínas integrantes da família OBP. Embora parcial, a sequência deduzida de aminoácidos de *EherOBP2* já pode também ser atribuída a função hipotética de proteína ligante a odor devido a presença do domínio PBP e cinco resíduos de cisteína em posições conservadas. A análise da expressão diferencial através de RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) indicou que as antenas representam o principal sítio de produção da *EherOBP1* em ambos os sexos, sendo a expressão nas antenas de macho cerca de três vezes maior que nas antenas de fêmeas. Em relação a *EherOBP2*, foi observada uma predominância da expressão nas antenas e abdômen de machos, sendo esta cerca de cinco vezes maior em relação à expressão observada nas antenas de fêmeas. A partir dos resultados obtidos com a localização da hibridização *in situ* nas antenas foi possível inferir que os mRNAs das *EherOBPs* são localizados especificamente na base dos órgãos olfativos (sensilas), havendo diferenças na expressão ao longo da antena entre machos e fêmeas. Neste trabalho foram identificados dois transcritos gênicos relacionados à olfação que codificam duas proteínas com provável função de ligação a odorantes.

Palavras-chave: *Euschistus heros*; Percevejo-marrom, Proteínas ligantes a odorantes; Olfação.

Abstract

In Brazil, the stink bug *Euschistus heros* represents an important agricultural plague responsible for economic damages on several cultures, including the soy. Aiming the development of alternatives biotechnological tools, the present work conducted the study of the expression of genes related to olfaction through the construction of a cDNA library from transcripts (mRNA) isolated from the antennae and analysis of the profile and sites of expression using the techniques of real-time qPCR and *in situ* hybridization, respectively. cDNA library was successfully constructed from total RNA extract from adults antenna using the *Smart cDNA Library Construction Kit* (Clontech®). A total of 1000 cDNA clones were randomly selected and submitted to sequencing. Two transcripts encoding OBPs were identified by bioinformatics approaches. The *E. heros* OBPs nucleotide sequences showed 477 and 294 pb and were named as *EherOBP1* and *EherOBP2*, respectively. The deduced amino acid sequence of *EherOBP1* has 16kDa and pI 5.18, signal peptide at the N-terminal, PBP domain and six cysteine residues in conserved positions, all the expected features for members of OBP protein family. Although partial, the deduced amino acid sequence of *EherOBP2* can be assigned as a hypothetical Odorant Binding Protein due the presence of PBP domain and five cysteine residues in conserved positions. Analysis of differential expression by quantitative real time PCR indicated that antenna are the main production site of *EherOBP1* in both sexes, and the expression in male antennae is about three times higher than in female antennae. Regarding to *EherOBP2*, there was a predominance of expression in the antennae and abdomen of males, which is about six times greater than the expression observed in the antennae of females. *In situ* hybridization results showed that *EherOBPs* mRNAs are specifically expressed on the base of the antenna olfactory organs (sensilas) with differences in the localization of the expression along the antenna of male and female. In this work were identified two transcripts related to olfaction encoding proteins with hypothetical function odorant binding.

Key-words: *Euschistus heros*, Stink bug, *Odorant Binding Proteins*, Olfaction.

1. Introdução

A região Centro-Oeste tem se destacado no âmbito do agronegócio nacional com o aumento da produtividade da cultura da soja [*Glycine max*(L.) Merrill, Leguminosae] sendo responsável por 60% da produção nacional (IBGE, 2008), com significativo valor sócio-econômico para a região.

O percevejo-marrom *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) [Hemiptera: Pentatomidae] é uma das principais pragas da fase reprodutiva da soja, devido à frequência, abrangência e severidade de danos provocados nas principais regiões produtoras do país. O ataque à soja inicia-se a partir da formação das vagens até a maturação dos grãos, período em que o percevejo aumenta a população exponencialmente, decorrente da intensa migração proveniente de lavouras recém-colhidas em busca de melhores condições de abrigo, alimentação e reprodução (Gazzoni *et al.*, 1998). As sementes são danificadas através da introdução do aparelho bucal nas vagens da leguminosa, tornando-as murchas e enrugadas, afetando, conseqüentemente, a produção e a qualidade dos grãos (Galileo e Heinrichs 1978a).

O uso de inseticidas não-seletivos tem sido comumente utilizado como medida de controle ao *E. heros*, porém, a utilização desses produtos, além de onerar os custos da produção e representar risco ambiental e à saúde humana, tem proporcionado o surgimento de populações resistentes a inseticidas (Sosa - Gomez *et al.*, 2009). Diante deste cenário, novas estratégias têm sido abordadas no intuito subsidiar novas alternativas no controle de pragas no campo.

Nos últimos anos, estudo de proteínas solúveis que atuam na comunicação química dos insetos tem sido abordado com o intuito de desenvolver estratégias biotecnológicas que possam ser utilizadas no controle de insetos de interesse fitossanitário. Os insetos são capazes de perceber o ambiente ao seu redor através dos

semioquímicos presentes no ar. Os semioquímicos são moléculas essencialmente hidrofóbicas e, uma vez que entram nos órgãos sensoriais (sensilas), são transportados através da linfa que circunda os dendritos olfativos graças às proteínas hidrossolúveis ligantes a odor (*Odorant Binding Proteins* ou OBP).

Atualmente, foram identificadas 909 proteínas ligantes a odor em insetos, sendo 628 em insetos pertencentes à ordem Diptera, 97 à ordem Lepidoptera, 79 à ordem Hemiptera, 78 à ordem Hymenoptera e 27 à ordem Coleoptera. Na ordem Hemiptera, a maioria (61) das OBPs foi identificada em insetos pertencentes à família Aphididae, não havendo relatos, até o momento, de identificação de OBPs na família Pentatomidae.

Tendo em vista a importância das proteínas relacionadas à olfação, tal como OBP, para a sobrevivência e o sucesso reprodutivo do percevejo-marrom, o presente trabalho teve como objetivo a identificação de transcritos gênicos relacionados à olfação e a análise da expressão diferencial desses transcritos em machos e fêmeas de *E. heros*, visando ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de comunicação nessa espécie, o que poderá possibilitar o desenvolvimento de ferramentas alternativas a serem utilizadas no controle da praga.

2. Revisão da Literatura

2.1 Percevejo-Marrom

O *E. heros* (Figura 1) é um pentatomídeo neotropical encontrado na América do Sul e no Panamá (Panizzi *et al.*, 2000). No Brasil, sua ocorrência é abundante, representando a principal praga da fase reprodutiva da soja neste país. Sendo uma espécie bem adaptada a regiões de clima ameno/quente, sua distribuição geográfica se

abrange desde o norte do Paraná à região Centro-Oeste, podendo também ser encontrado, embora em menor número, no Rio Grande do Sul (Panizzi *et al.*, 2000).



Figura 1. Percevejo-marrom *Euschistus heros*. A presença dos espinhos protonais e a coloração marrom-escura representam características marcantes do inseto adulto. Foto: Cecília Vieira.

Embora tenha na soja sua principal fonte de alimento, o *E. heros* é também capaz de se alimentar de plantas das famílias Brassicaceae (Link e Grazia, 1987) e Solanacea (Ferreira e Panizzi, 1982). São classificados como polívoros e, sendo assim, colonizam hospedeiros alternativos em estações desfavoráveis, época em que também entram em dormência e utilizam os lipídeos acumulados no abdômen para retirar energia para sua sobrevivência (Panizzi e Hirose, 1995; Panizzi e Vivan, 1997).

Estudos sobre a biologia do *E. heros* revelaram que o desempenho reprodutivo da fêmea é dependente, entre outros fatores, de sua condição nutricional. Em geral, as fêmeas depositam de 6 a 11 ovos em cada oviposição e cerca de 61 a 99 ovos durante toda a sua vida reprodutiva (Pinto e Panizzi, 1994). As características-diagnóstico desta espécie variam de acordo com o seu estágio de desenvolvimento que incluem 5 ínstaras de ninfa antes de atingir a fase adulta. Cada instar é determinado pelo tamanho da ninfa, sendo os adultos facilmente identificados pela coloração marrom-escura e a presença de uma protuberância em forma de espinho em cada lateral do corpo (Panizzi e Niva, 1994; Mourão, 1999).

Em *E. heros* a produção do feromônio sexual é observada a partir do sexto dia da fase adulta, sendo o macho responsável por essa produção (Borges e Aldrich, 1994). De acordo com Costa *et al.* (1998), as fêmeas ovipositam entre 5 e 13 dias após a primeira cópula. Na natureza, as fêmeas realizam a postura na vagem ou na superfície abaxial das folhas e experimentos em laboratório revelaram que a emergência das ninfas ocorre em média sete dias após a postura, sendo necessários 38 dias para que o inseto complete o ciclo de desenvolvimento da fase imatura e alcance a fase adulta (Costa *et al.*, 1998).

São muitos os danos relacionados à herbivoria do *E. heros* à soja, sendo estes diretamente relacionados com a fase de desenvolvimento da vagem/semente, incluindo: (1) abscisão da vagem ou aborto das sementes quando o ataque é realizado durante o início do desenvolvimento das mesmas; (2) ocorrência de sementes deformadas, quando o ataque é na vagem completamente desenvolvida; (3) pequenas deformações na semente quando o ataque é durante a maturação desta (Panizzi *et al.*, 2000). Nesse processo, os percevejos podem ainda facilitar a infecção fúngica que causam distúrbios fisiológicos, como retenção foliar, e o desenvolvimento de folhas e vagens anormais próximas ao caule principal (Galileo e Heinrichs 1978b).

Uma vez que a soja representa uma importante cultura no do agronegócio do país, buscar alternativas naturais e biotecnológicas que previnam e/ou minimizem os danos provocados pelo *E. heros* se fazem necessárias no contexto econômico e ambiental.

2.2 Proteínas relacionadas à olfação

O estudo das proteínas ligantes a odor surgiu como estratégia biotecnológica a ser utilizada no controle de insetos pragas. Os insetos são capazes de ‘sentir’ o ambiente ao redor através do seu sistema quimiossensor e, a partir deste, detectar substâncias

voláteis que os permitem obter informações sobre localização e qualidade do alimento, presença de parceiros sexuais e locais para oviposição. Este sistema olfatório é representado por neurônios quimiosensores localizados em pêlos sensoriais específicos denominados sensilas que, por sua vez, são encontrados em órgãos e/ou tecidos olfatórios podendo estar distribuídos no corpo do inseto, sendo as antenas o mais especializado e conhecido (Dahanukar *et al.*, 2005).

As moléculas odorantes no ambiente têm acesso aos neurônios quimiosensores do inseto através de poros presentes na parede cuticular da sensilas, sendo a sensila a unidade funcional da sensilas. Cada sensila é preenchida por uma linfa aquosa através da qual as moléculas odorantes são transportadas até os dendritos dos neurônios quimiosensores (Fig. 2) (Ernst, 1969). Em 1981 Vogt e Riddiford identificaram pela primeira vez uma proteína hidrossolúvel ligante a feromônio (PBP) na mariposa gigante *Antheraea polyphemus* (Lepidoptera: Saturniidae). A caracterização das OBPs é baseada em sua seqüência de aminoácidos, na estrutura tridimensional e em sua atividade biológica, tendo sido identificada em diferentes ordens de insetos, incluindo: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera e Hemiptera.

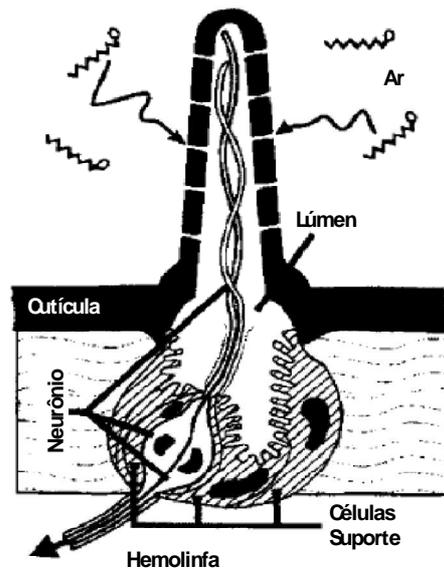


Figura 2. Representação ilustrativa do sensila. Cada sensila possui entre 2 e 3 neurônios cujos dendritos projetam-se através do lúmen preenchido pela linfa sensilar. Fonte: Blomquist e Vogt, 2003.

OBPs são proteínas solúveis em meio aquoso encontradas em altas concentrações (até 10 mM) na linfa sensilar. Essas proteínas apresentam pI ácido (4 - 5) e sua estrutura secundária é caracterizada por um arranjo de seis α -hélices (Sandler *et al.*, 2000). Evidências sugerem que as OBPs podem formar dímeros em sua forma nativa (Leal *et al.*, 2000). Os mRNAs relacionados às OBPs apresentam uma faixa de tamanho variada de 400 até pouco mais de 1000 bases e em média de 500 bases. Esses mRNAs possuem, na extremidade 5', uma sequência que codifica peptídeo sinal, indicando que esta proteína é secretada para fora da célula.

Em insetos, as OBPs estão relacionadas à olfação, atuando como carreadores que facilitam o transporte de moléculas odorantes. A característica principal das OBPs, como já mencionado anteriormente, é a presença de seis resíduos de cisteína em posições conservadas que, na estrutura nativa, formam três pontes dissulfeto.

Com base em sua sequência, conformação nativa, especificidade de ligação à molécula odorante e sítio de expressão, as OBPs podem ser divididas em duas subfamílias: proteínas ligantes de feromônio (PBP – *Pheromone Binding Protein*); e proteínas ligantes de odores gerais (GOBP – *General Odorant Binding Protein*). As PBPs são variáveis entre as espécies e, embora em lepidópteras sejam encontradas predominantemente em fêmeas, há relatos de sua presença em ambos os sexos de algumas espécies de besouros, tais como *Popillia japonica*, *Anomala osakana* e *Phyllopertha diversa* (Wojtasek e Leal, 1999). As GOBP1 e GOBP2 são mais conservadas que as PBPs e estão presentes em ambos os sexos, associadas com neurônios olfatórios que respondem a odorantes gerais (Vogt *et al.*, 1991).

Estudos mais aprofundados sobre a conformação tridimensional em OBPs foram realizados com a *BmorPBP1* do bicho da seda (*Bombyx mori*) através de cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN). As análises da cristalografia de raios-X revelaram que quatro domínios α -hélice formam a região de interação com o feromônio denominada ‘sítio’ de ligação; outra α -hélice parece ocupar a entrada do sítio de ligação quando a proteína encontra-se em pH ácido (Sandler *et al.*, 2000). Acredita-se que a interação feromônio/PBP dependa de modificações na conformação da proteína. Em *B. mori*, a ligação do feromônio ao sítio específico da PBP ocorre por meio de interações hidrofílicas e eletrostáticas que parecem ser fundamentais na garantia da especificidade da ligação (Sandler *et al.*, 2000; Klusák *et al.*, 2003).

Os estudos realizados por meio de RMN da *BmorPBP1* demonstraram que esta proteína pode apresentar duas conformações distintas dependendo do pH em que se encontra: *BmorPBP*^A, quando em pH abaixo de 4.9 e *BmorPBP*^B quando em pH acima de 6 (Damberger *et al.*, 2000). Estudos posteriores sugerem que o mecanismo de ligação e liberação do feromônio pode ser dirigido por diferenças de pH na linfa sensilar sendo,

neste contexto, a conformação *BmorPBP^B* favorável à ligação do feromônio e a conformação *BmorPBP^A* favorável à sua liberação nos receptores de odor (Horst *et al.*, 2001; Leal, 2003). Em pH ácido, uma sétima α -hélice presente na região C-terminal da *BmorPBP1* ocupa o sítio de ligação e a mudança conformacional provocada pela mudança de pH permite a liberação da molécula odorante. Quando em pH básico, esta α -hélice encontra-se na superfície da proteína, permitindo o livre acesso da molécula odorante ao bolso de ligação (Horst *et al.*, 2001).

Embora OBPs apresentem diferenças em relação a sua sequência, surgem indícios de que o padrão geral de sua estrutura seja conservado, como demonstrado em estudos com OBPs de *Apis mellifera* (Hymenoptera) e *Periplaneta americana* (Blattaria), que apresentaram similaridade em relação à presença das α -hélices bem como a forma dimérica quando em cristal (Lartigue *et al.*, 2003a,b). Atualmente, ainda que muitas OBPs tenham sido identificadas, muitas permanecem sem caracterização estrutural, funcional e/ou genética.

Além das OBPs, podem ser encontradas em insetos outra classe de proteína relacionada à olfação: as proteínas quimiossensoras (CSPs). Embora apresentem massa molecular similar à das OBPs (12-20 kDa), estrutura secundária predominante de α -hélices e possam ser encontradas em alguns tecidos onde também há expressão de OBPs, as CSPs foram classificadas a parte uma vez que suas características diferem daquelas que definem uma OBP, tais como: especificidade de ligação à molécula odorante e a presença de seis resíduos de cisteína em regiões conservadas da estrutura primária. Por esse motivo, não foram visadas no presente estudo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Identificar transcritos relacionados à olfação nas antenas do percevejo-marrom e estudar o perfil de expressão e sítios de localização dos transcritos identificados.

3.2 Objetivos específicos

1. Construir uma biblioteca enriquecida de cDNA a partir do RNA total extraído das antenas de machos e fêmeas de *E. heros*.
2. Seqüenciamento automático de cDNA e análise das sequências nucleotídicas empregando ferramentas de Bioinformática: *data mining* de OBPs e análise *in silico* das hipotéticas OBPs identificadas.
3. Analisar a expressão gênica diferencial de OBPs nas antenas, cabeça, patas, asas e abdômen de machos e fêmeas de *E. heros*.
4. Analisar o perfil de localização de OBPs nos diferentes segmentos das antenas.

4. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Bioquímica e Biologia Molecular da Embrapa Cenargen e no de Microscopia Eletrônica e Virologia, Departamento de Biologia Celular do IB-UnB. Algumas atividades foram conduzidas no *Laboratory of Insect Molecular Biology*, no Instituto Rothamsted Research, Harpenden, Inglaterra.

4.1. Colônia do percevejo-marrom da soja

Os percevejos-marrom foram obtidos da colônia de criação já estabelecida na plataforma de criação de insetos do Núcleo Temático de Controle Biológico da Embrapa Cenargen, conforme descrito a seguir. Os percevejos foram criados em gaiolas plásticas (26 x 22 cm) contendo potes plásticos com algodão embebido em água e alimentados com sementes de amendoim (*Arachis hypogaea*), soja (*Glycine max*), girassol (*Helianthus annuus*) e vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris*), mantidos a temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa (UR) do ar de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. O fornecimento de alimento foi renovado duas vezes por semana. Após a sexagem dos adultos, os percevejos machos e fêmeas foram alojados separadamente em gaiolas plásticas, com densidade de 60 percevejos por gaiola, mantidos sob as mesmas condições abióticas citadas acima. Após 12 dias de maturação sexual, os adultos, ainda virgens, foram utilizados para extração das antenas. Ressalta-se que todos os estudos foram realizados com os percevejos nessa condição.

4.2 Obtenção das *EherOBPs*

A técnica de melhor custo-benefício escolhida para prospectar OBPs no percevejo-marrom foi a de construir e analisar uma biblioteca de cDNAs a partir dos transcritos das antenas de percevejos de ambos os sexos maduros sexualmente e virgens. O processo pode ser dividido em quatro etapas principais, sendo elas: a. Extração do RNA total das antenas de machos e fêmeas adultos virgens; b. Construção da biblioteca de cDNA; c. Análise dos clones gerados e d. Validação das sequências nucleotídicas das *EherOBPs* identificadas. Cada etapa será apresentada detalhadamente, conforme descrição a seguir.

a. Extração do RNA total:

O RNA total foi extraído das antenas de machos e fêmeas adultos (25 insetos/sexo) virgens de *E. heros*, utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen®), baseando-se na metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM de Tris-Base; 25 mM de ácido acético; 1 mM de EDTA), corrida a 94 V e corante brometo de etídio (0,5 µg/mL). Após a quantificação por espectrofotometria a 260 nm em NanoDrop 1000 *Spectrophotometer* (Thermo Scientific®), o RNA total foi utilizado na construção da biblioteca de cDNA.

b. Construção da biblioteca de cDNA:

Um micrograma do RNA total foi utilizado na construção da biblioteca de cDNA utilizando o kit *Smart cDNA Library Construction* (Clontech®), de acordo com o protocolo do fabricante. De maneira resumida, além do RNA total, são empregados três componentes na síntese da primeira-fita de cDNA: o oligonucleotídeo CDSIII/3', o oligonucleotídeo SMART IV e a transcriptase reversa (RT) MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*). O CDSIII/3' é um iniciador oligo dT cuja a sequência apresenta, na sua extremidade 5', o sítio de restrição da enzima *Sfi*I. Este iniciador é utilizado no anelamento à extremidade 3' da cauda Poli (A)+, bem como na reação de síntese da segunda fita do cDNA. O oligonucleotídeo SMART IV possui uma sequência oligo dG em sua extremidade 3' que anela com a sequência de oligo dC criada pela atividade terminal transferase da RT, na extremidade 3' do cDNA. Assim, a RT continua, com sua atividade de polimerase, empregando a sequência molde do oligonucleotídeo SMART IV, resultando na obtenção de cDNA fita simples (sscDNA) que contém a sequência relativa à extremidade 5' completa do mRNA. O mecanismo citado acima está

ilustrado na Fig. 3 e recebeu a denominação SMART (*Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript*) pelo fabricante.

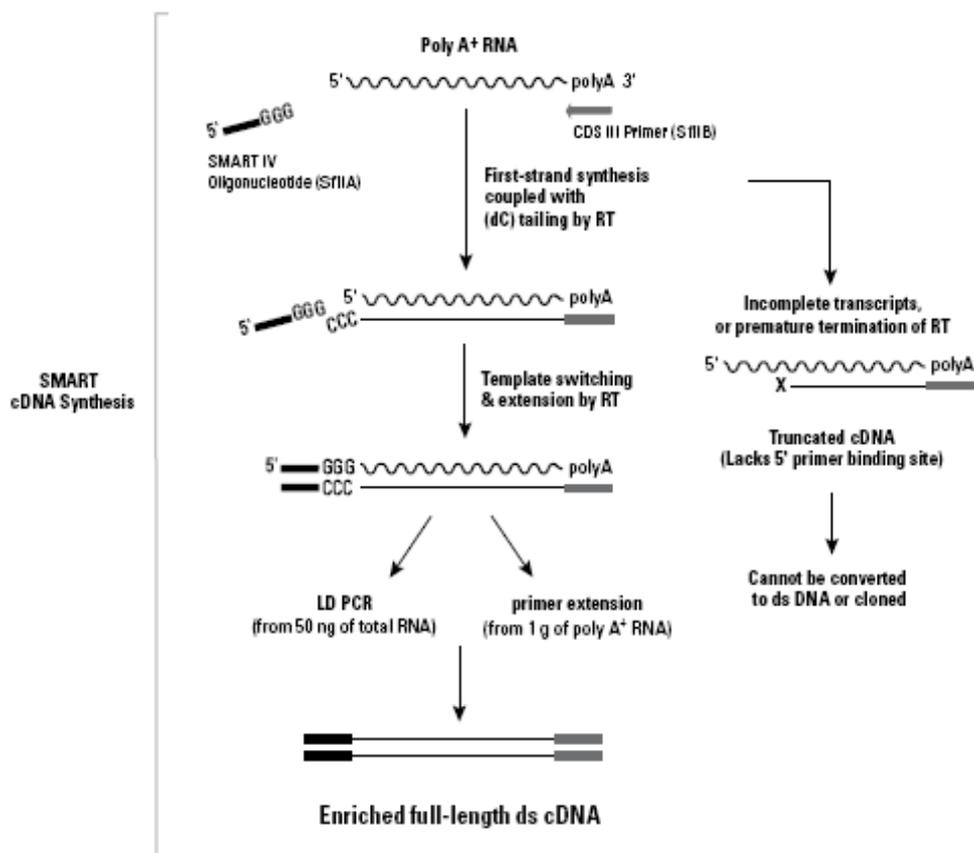


Figura 3. Principais etapas da construção da biblioteca de cDNA utilizando o kit *SMART cDNA Library Construction*(Clontech®). Reproduzido do manual do kit.

O sscDNA recém-sintetizado contém a sequência complementar ao oligonucleotídeo SMART IV, que atua como sítio universal para os iniciadores que serão utilizados na síntese do cDNA dupla-fita (dscDNA) pela PCR *Long-Distance* (LD-PCR). Uma alíquota de 2µL da reação de síntese da primeira-fita foi utilizada na etapa do LD-PCR, que inclui também os demais componentes básicos de uma reação de PCR. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte:

1^a etapa: Desnaturação a 95°C por 1min

2^a etapa: Desnaturação a 95 °C por 15 s

3^a etapa: Anelamento e extensão a 68 °C por 6min

4ª etapa: Repetição das etapas 2 e 3 por 20 vezes.

O dsDNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, sendo posteriormente digerido com a enzima de restrição *Sfi*I a 50°C por 2 h e purificados por cromatografia de exclusão molecular utilizando colunas CHROMA SPIN 400 (Clontech®) fornecida pelo fabricante. As frações 7 a 9, obtidas na cromatografia, foram unidas e precipitadas com acetato de sódio 3M, pH 4,8 (1:10/v:v), 1,3 µL de glicogênio (20 mg/mL) e 2,5 vezes o volume da amostra de etanol 95%, seguido de incubação a -20°C por 1 h e centrifugação a 14.000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o cDNA precipitado foi ressuspensionado em 7 µL de água deionizada. Os fragmentos foram ligados durante a noite a 16 °C ao vetor pDNR-LIB previamente digerido com *Sfi* I. O pDNR-LIB é um vetor que apresenta 4,2 kb, gene de resistência a cloranfenicol e sítio de clonagem para a *Sfi*I (Fig. 4).

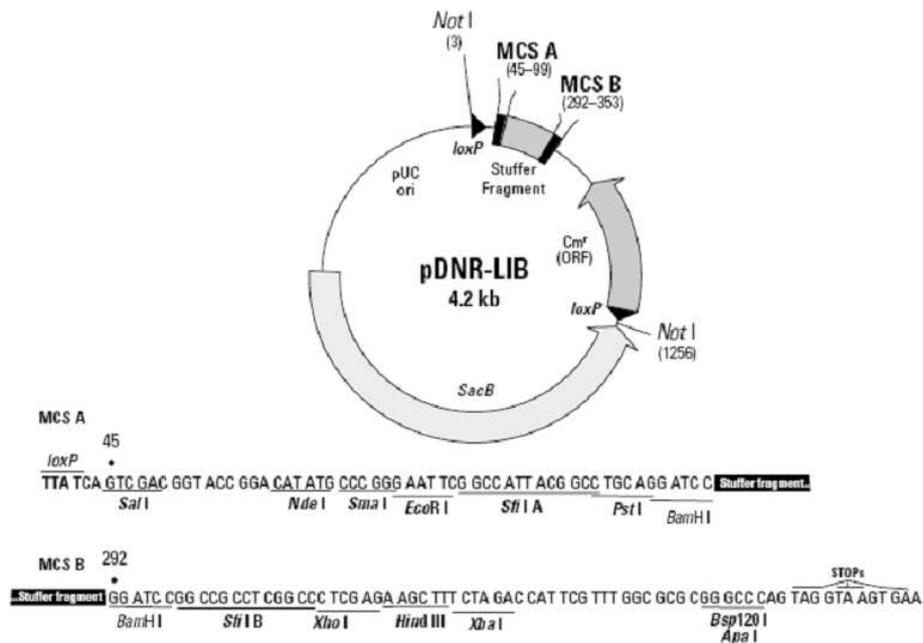


Figura 4. Mapa de restrição do vetor pDNR-LIB (Clontech®). Fonte: Manual do Usuário *SMART cDNA Library Construction*.

Uma alíquota de 2µL da reação de ligação foi utilizada para transformação de células competentes de *Escherichia coli* linhagem XL1 Blue. A transformação foi realizada por eletroporação das células utilizando os seguintes parâmetros: 125 µF de capacitância, 2,5 kV e 200 de resistência por 4,6 s. Após este procedimento, as células foram imediatamente ressuspensas em 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) e transferidas para tubo de 15 mL, sendo incubadas a 37°C por 1 h a 235 rpm. Terminada a incubação, uma alíquota de 200 µL da suspensão de eletroporação foi removida e adicionada a 800 µL de meio LB (diluição 1:5) e plaqueadas em três placas de 145 mm de diâmetro contendo meio LB sólido e 35 µg/mL de cloranfenicol, que foram incubadas a 37°C durante a noite. Após a incubação, foi realizada PCR direto das colônias bacterianas para confirmar a inserção dos cDNAs no vetor e a porcentagem de clones recombinantes, sendo o produto da amplificação analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, de acordo com mesmo protocolo mencionado anteriormente.

Duas mil colônias foram inoculadas em placas de 384 poços contendo 50µL de meio LB líquido e 35 µg/mL de cloranfenicol, sendo incubadas a 37°C durante a noite, sob agitação (235 rpm), e em seguida armazenadas a -80°C em meio LB líquido contendo 4,4% de glicerol. Mil clones foram selecionados aleatoriamente e enviados para seqüenciamento nucleotídico dos insertos.

c. Análise dos clones:

Os mil clones escolhidos foram enviados para a empresa Macrogen (filial Koreana) para mini-preparação de DNA plasmidial (miniprep), seguido de seqüenciamento em 3730xl DNA *Analyzer*, após reação de amplificação utilizando o iniciador direto M13. As seqüências nucleotídicas obtidas foram processadas para remover as extremidades do vetor, utilizando o programa Vector NTI Advance 11

(Invitrogen®), e inspecionadas quanto à qualidade (Phred > 20 e tamanho ≥ 150 pb). O programa ORF *Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) foi utilizado para identificar a região codificadora, sendo a sequência deduzida de aminoácidos obtida pelo programa *Translate Tool* (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). Para identificar OBPs, as sequências nucleotídicas foram alinhadas contra os bancos de dados *GenBank* e *SwissProt* utilizando o programa *Reverse Position-Specific BLAST* (RPS-BLAST) (Marchler-Bauer, *et al.*, 2005) e SisGen (<http://condor.genoma.cenargen.embrapa.br/genoma>). A partir das sequências deduzidas de aminoácidos das OBPs de *E. heros* fez-se a análise *in silico* para predição dos parâmetros físico-químicos de massa molecular, pI, identificação dos domínios OBPs utilizando o programa *Sequence Module Architecture Research Tool* – SMART (Schultz *et al.*, 1998), bem como o alinhamento com sequências OBPs de outros insetos, apresentando maior similaridade, utilizando a ferramenta ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) e edição pelo BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Após a validação das sequências nucleotídicas das *Eher*OBPs hipotéticas, as sequências foram anotadas e depositadas no *GenBank*.

d. Validação das sequências nucleotídicas das EherOBPs:

A fim de confirmar as sequências nucleotídicas das potenciais OBPs e a obtenção de cDNAs de tamanho completo, foram desenhados iniciadores (Tabela 1) para as técnicas de RT-PCR e de Amplificação Rápida das Extremidades de cDNA (*Rapid Amplification of cDNA Ends* – RACE, kit Invitrogen®), de acordo com o manual do fabricante do kit. O produto final de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e purificado através do *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen®),

conforme instruções do fabricante, sendo posteriormente clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega®). Uma alíquota de 2 µL do sistema de ligação foi utilizado para transformação de células competentes de *E. coli* linhagem XL-1 *Blue*. A transformação foi realizada através de choque térmico, onde o sistema de transformação foi incubado em gelo por 30 min seguido de 90 s a 42°C e 2 min em gelo. Após a transformação, o sistema foi ressuscitado em 900 µL de meio LB líquido e incubado a 37°C por 45 min a 145 rpm. Uma alíquota de 100 µL do sistema de transformação foi plaqueada em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina, 0,5 mM de IPTG e 80 µg/mL de X-Gal. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. As colônias brancas foram recuperadas e ressuscitadas em 500 µL de meio 2YT/HMFEM contendo 100 µg/mL de ampicilina e em seguida incubadas a 37°C por 18 h. As amostras foram armazenadas a -80°C e posteriormente enviadas para a empresa Macrogen (filial Koreana) para mini preparação de DNA plasmidial (miniprep) seguido de seqüenciamento em 3730xl DNA Analyzer.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para as análises de confirmação das sequências de DNA das *EherOBP* se para os estudos de expressão gênica em *E. heros*.

<i>EherOBP</i>	Identificação	Finalidade	Iniciador (5' → 3')
OBP1	<i>EherOBP1_Direto</i>		GGATCCATGAAGGGAATTACGACT GC
	<i>EherOBP1_Reverso</i>		GAATTCTTATTCAAAGAAATCATG CT
	<i>EherOBP1_Sonda_ISH_Direto</i>	Hibridização <i>in situ</i>	GGATCCATGCTGGCATGTATGCTT GA
	<i>EherOBP1_Sonda_ISH_Reverso</i>		GAATTCTCAGGGCCAACCTTCAGAA AC
	<i>EherOBP1_qPCR_Direto</i>	qPCR	ATGCTGGCATGTATGCTTGA
	<i>EherOBP1_qPCR_Reverso</i>		TCAGGGCCAACCTTCAGAAAC
OBP2	<i>EherOBP2_RT-PCR</i>	RT-PCR	GAGTCTTTCCAGCCGATG
	<i>EherOBP2_GSP1</i>	RACE	GCCAGTGA CTCTTTGCA
	<i>EherOBP2_GSP2_EcoRI</i>		GAATTCCTG TAAAAGCTAGTAACC
	<i>EherOBP2_Sonda_ISH_Direto</i>	Hibridização <i>in situ</i>	GGATCCGAGTCTTTCCAGCCGATG A
	<i>EherOBP2_Sonda_ISH_Reverso</i>		GAATTCTGTCTGGGCCAGTGACTC
	<i>EherOBP2_qPCR_Direto</i>	qPCR	GAGTCTTTCCAGCCGATGAC
	<i>EherOBP2_qPCR_Reverso</i>		ACTGTCTGGGCCAGTGACTC
rRNA 18S	<i>Eher18S_qPCR_Direto</i>	qPCR	GGAGGACGATCAAAACATGG
	<i>Eher18S_qPCR_Reverso</i>		CAACTTTAGAGTGGATTGCACAAG

4.3 Análise da expressão dos *EherOBPs*

O estudo foi realizado através de RT-PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) a partir do RNA total extraído das antenas, cabeça, patas, asas e abdômen de 50 insetos machos e fêmeas, sendo a qualidade da extração analisada por eletroforese em gel de agarose 1%.

O RNA total extraído foi quantificado por fluorimetria (Qubit, Invitrogen®) e as concentrações igualadas entre os sexos e tecidos. Os RNAs extraídos foram avaliados quanto a sua integridade através de eletroforese em gel de agarose 1%, seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente. A fim de retirar traços remanescentes de DNA genômico ainda presentes após a extração de RNA total, fez-se o tratamento de 180 ng de RNA de cada tecido com DNase I (Roche®) a 37°C por 30 min. Ao final, a DNase foi desnaturada a 65°C por 10 min. Os cDNAs foram sintetizados utilizando o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen®), de acordo com o manual do fabricante. Na reação de síntese dos cDNAs foi utilizada uma alíquota de 6 µL de RNA (180 ng) à qual foi adicionada 2 µL de iniciadores [hexameros e oligo (dT)₂₀] e 1 µL de tampão de anelamento, sendo a reação incubada a 65°C por 5 min seguida de resfriamento em gelo por 1 min. Em seguida, foram adicionados à reação 10 µL de tampão de reação (2X) e 2 µL da *SuperScript III* e a síntese do cDNA ocorreu a 50°C por 50 min, sendo terminada a 85°C por 5 min.

Inicialmente foi construída uma curva padrão a partir da diluição seriada (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3}) do *pool* de cDNA referente aos dois sexos e aos tecidos a serem analisados a fim de avaliar a eficiência da reação de amplificação de cada iniciador (OBP1, OBP2 e rRNA18S). Os resultados foram plotados em um gráfico e, a partir da regressão linear, foi obtida a equação da reta:

$$y = a x + b \text{ onde, } y = Ct, a = \text{inclinação, } x = \log \text{ da diluição do cDNA e } b = \text{intercessão do eixo Y.}$$

A eficiência dos iniciadores foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{Eficiência} = [10^{(-1/\text{inclinação})}] - 1$$

Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas para cada uma das quais foram extraídas as respectivas partes do corpo a serem analisadas e a qPCR em

Tempo Real foi realizada em triplicata técnica para cada uma das três réplicas biológicas de cada tecido e sexo. Como controle endógeno foi utilizado o rRNA18S, o que possibilitou normalizar a expressão dos genes-alvo e corrigir possíveis variações entre as réplicas. A especificidade de expressão foi analisada com base na curva de dissociação obtida para cada das partes do corpo avaliadas nesse experimento. A comparação do perfil de expressão dos transcritos *EherOBPs* entre os sexos e os diferentes tecidos olfatórios foi realizada através da quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

A qPCR em Tempo Real foi realizada em reações de 12 μ L contendo 6 μ L do Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas®), 1 μ L de cada par de iniciadores (direto e reverso) à concentração de 0,1 μ M, 2 μ L de cDNA e 2 μ L de água no equipamento Applied Biosystems® 7500 *Fast Real-Time PCR System* utilizando o SYBR® *Green* como indicador de fluorescência. As reações foram montadas em placas de 96 poços de 0,1 mL (Applied Biosystem®) e centrifugadas por 1 min a 4000 rpm a fim de evitar possíveis diferenças no volume final das reações. Os parâmetros do ciclo de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 50 s e anelamento/extensão a 60°C por 48 s.

4.4 Análise estatística

A diferença entre o nível de transcrição (ΔCt) dos *EherOBPs* entre as partes do corpo e os sexos foi comparada pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste *t*-Student ($P=0,05$).

4.5 Localização *in situ* dos *Eher*OBDs nas antenas do percevejo-marrom

Para a histolocalização dos transcritos *Eher*OBDs nas antenas, optou-se pela técnica de hibridização *in situ whole-mount*, adaptando-se metodologia de Tautzs e Pfeiffle (1989). Esta técnica possibilita a localização celular ou subcelular dos transcritos (RNAm), tornando possível comparar o perfil da expressão gênica entre e dentro do mesmo tecido. Conforme será apresentado a seguir, a preparação do material biológico consistiu em duas fases: uma de marcação dos fragmentos do mRNA anti-senso relativo às *Eher*OBDs com digoxigenina (obtenção das sondas) e outra da preparação das antenas para a hibridização com as sondas. As hibridizações foram realizadas em triplicatas técnicas e biológicas.

Sondas de RNAm anti-senso (SP6) marcadas com digoxigenina (DIG) foram utilizadas para os estudos de hibridização *in situ*. Os fragmentos molde para a síntese das sondas foram obtidos por PCR utilizando um par de iniciadores desenhados para este fim (Tabela 1). Os produtos purificados da PCR com as regiões codificadoras das *Eher*OBDs foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e clonados em vetor pSPT19 (Fig. 5) (Roche®), previamente linearizado com as mesmas enzimas. O sistema de clonagem foi utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* linhagem DH5 α através de choque térmico, seguindo o protocolo descrito no item 3.2d. As colônias brancas foram recuperadas e o DNA plasmidial foi extraído através de mini preparação plasmidial. As sondas *Eher*OBD1 e *Eher*OBD2 anti-senso, foram sintetizadas através de transcrição *in vitro* com a enzima SP6 RNA polimerase utilizando o DIG RNA *Labeling* SP6/T7 Kit (Roche®) a partir dos fragmentos de cDNA clonados no vetor pSPT19 e linearizados com as enzimas *Nhe*I e *Xba*I.

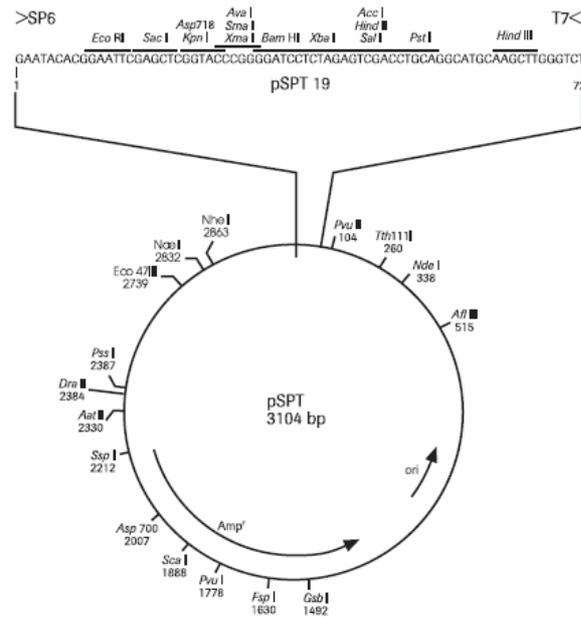


Figura 5. Mapa de restrição do vetor pSPT19 (Roche®). Adaptado do manual do usuário do DIG RNA Labeling (SP6/T7).

Um total de dez antenas recém-extraídas dos percevejos foi seccionada com um bisturi (lâmina 10) e imediatamente fixadas em paraformaldeído 4%/PBS (Cloreto de sódio 1,37 M, Fosfato de Sódio Monoácido 0,1 M, Fosfato de Potássio Monobásico 0,01 M e Cloreto de Potássio 0,027 M) durante a noite a 4°C. Em seguida as amostras foram tratadas com proteinase K (50 mg/mL) em PBS por 1 h a 37°C e posteriormente fixadas por mais 5 min em paraformaldeído 4%/PBS. Após a fixação, as amostras foram lavadas com PBST (PBS contendo 0,1% de Tween 20) três vezes durante 5 min cada, à temperatura ambiente; posteriormente, as amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente em PBS/tampão de hibridização 1:1 (formamida 50%; SSC 5X - cloreto de sódio 3 M e citrato trissódico 0,3 M; Tween 20 0,1%). A reação de hibridização foi conduzida a 60°C por 16 h utilizando as sondas senso e anti-senso *EherOBP1* e *EherOBP2* - DIG numa concentração de 500 ng/mL. Os tecidos das antenas hibridizadas foram então lavados com tampão de hibridização a 60°C por 10 min, seguida de outra lavagem com 1:1 de PBST:Tampão de hibridização por mais 10

min. As amostras foram lavadas três vezes com PBST, 10 min cada lavagem. A detecção da hibridização foi realizada através da incubação das amostras com o anticorpo anti-DIG conjugado à enzima fosfatase alcalina (AP) da Roche® por 1 h na diluição de 1:5000 em PBST, seguido de três lavagens com PBST por 10 min cada e incubação com os substratos cromogênicos azul de nitro-tetrazólio e fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil (NBT-BCIP) por 40 min. As antenas hibridizadas foram analisadas em microscópio óptico AxioPhot (Zeiss®) acoplado a uma câmera digital (AxioCam) e fotografadas em aumento de 40X.

5. Resultados e Discussão

5.1 Identificação de *Eher*OBP's no percevejo-marrom

Do total de 50 antenas/sexo de *E. heros* utilizadas na extração do RNA total obteve-se $60 \pm 5,3$ ng/antena de fêmeas e $75,6 \pm 0,53$ ng/antena de machos. A razão OD_{260}/OD_{280} , que informa sobre a pureza da amostra e tem o seu valor de referência para RNA de 1,8, foi de $1,91 \pm 0,07$ e $1,95 \pm 0,04$ para fêmeas e machos, respectivamente.

O cDNA de ambos os sexos foi obtido com sucesso sendo distribuído numa faixa de 2000 a 500 pb, tal como pode ser observado na Fig. 6A. Após purificação do cDNA pelo sistema CHROMA SPIN (Clontech®), obteve-se três frações de maior concentração (Fig. 6B) que foram recuperadas e clonadas no vetor pDNR-LIB.

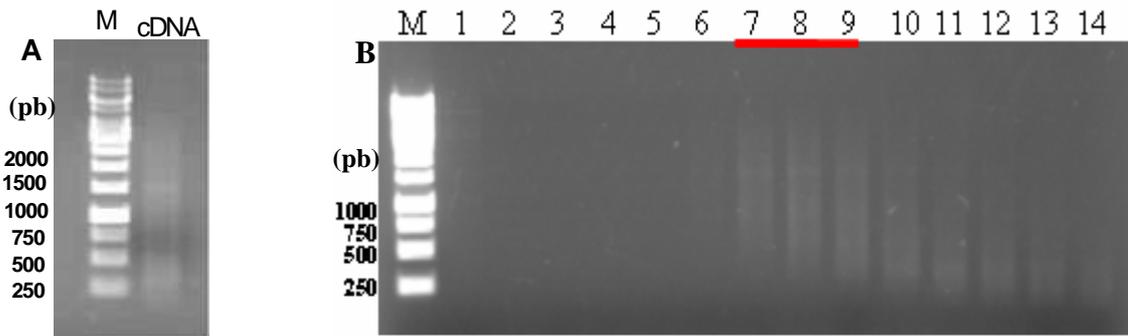


Figura 6. Preparação para a construção da biblioteca de cDNA de antenas de machos e fêmeas de *E. heros*. **A.** Checagem da qualidade do cDNA obtido. **B.** Purificação do cDNA em CHROMA SPIN 400 (Clontech®). As frações 7-9 foram agrupadas e concentradas previamente à clonagem. **M:** marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas). Ambos foram fracionados por eletroforese em agarose 1%, corados por brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados a 302 nm.

Após clonagem, transformação em sistema bacteriano e plaqueamento em meio sólido (Fig. 7A), 12 clones foram selecionados randomicamente, para os quais foi confirmada a presença dos insertos nos vetores recombinantes (Fig. 7B), sendo observada uma taxa de 100% de recombinação.

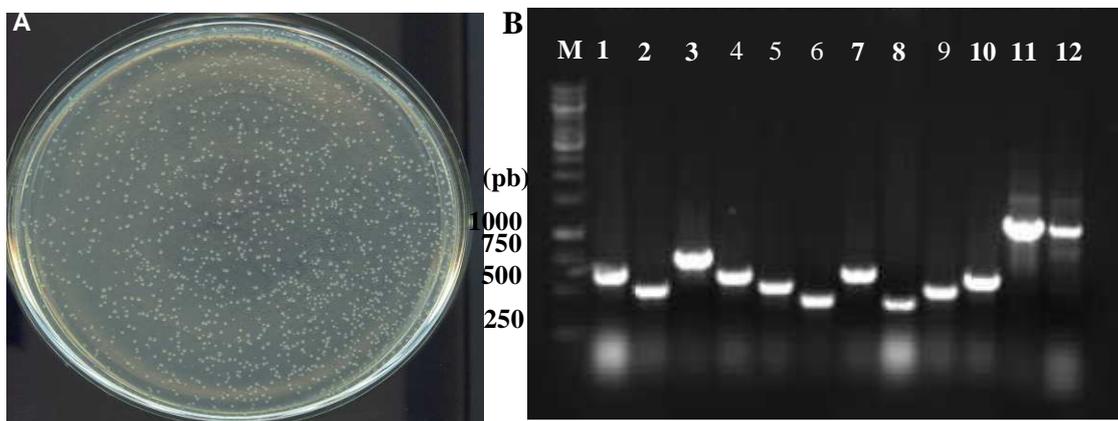


Figura 7. Obtenção da biblioteca de cDNA de antenas de machos e fêmeas de *E. heros*. **A.** Placa ilustrando colônias de *E. coli* transformadas com o vetor pDNR-LIB contendo os cDNAs clonados. **B.** Verificação da presença dos insertos no vetor pDNR-LIB nos clones obtidos da biblioteca de cDNA. Eletroforese em agarose 1%, corados por brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados a 302 nm. **M:** marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

Cinco mil clones foram obtidos na construção da biblioteca de cDNA e dos mil clones com os insertos sequenciados, 750 apresentaram alta qualidade nos eletroferogramas e foram analisadas contra banco de dados (*Genbank* e *SwissProt*) (Fig. 8). Seis produtos gênicos relacionados à olfação foram identificados, sendo dois OBPs e quatro CSPs. Os transcritos relacionados a OBPs receberam a denominação de *EherOBP1* e *EherOBP2* e foram depositados no *GenBank* com número de acesso HM347779 e HQ225621, respectivamente. O tamanho dos produtos gênicos identificados foi de 447 pb para o *EherOBP1* e 291 pb para o *EherOBP2*, sendo a sequência deduzida de aminoácidos composta por 148 e 97 resíduos, respectivamente (Fig. 9).

Pipeline da Biblioteca

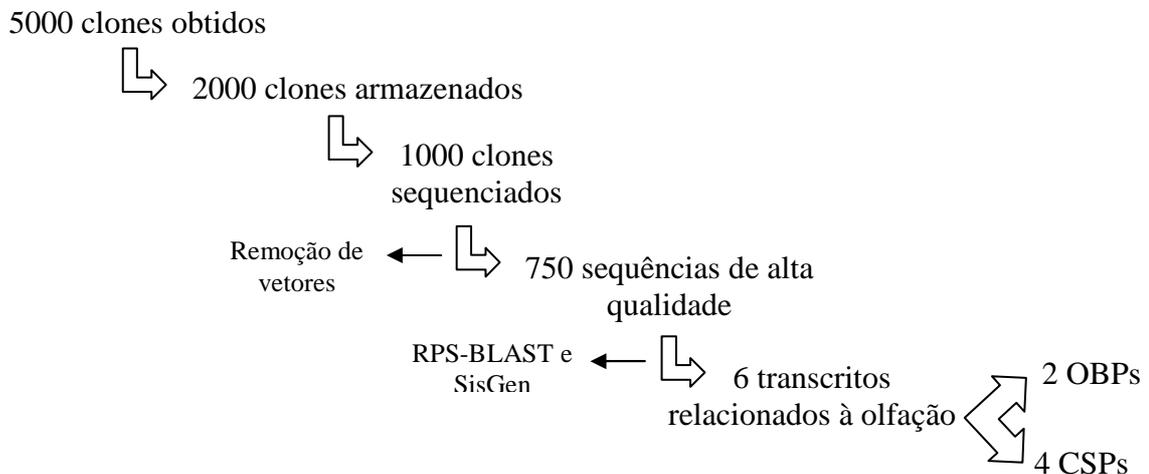


Figura 8. Esquema de análise da biblioteca de cDNA realizada para a identificar transcritos relacionados à olfação nas antenas do percevejo-marrom.

EherOBP1

```
1   atgaaggggaattacgactgctttggcttttacattgctgctcgccactatcgaggcagaa 60
    M K G I T T A L A F T L L L A T I E A E
61   gaaaatgtaaaagcaaaaaataatgaaagtattcaatacttgtaaggaaaagcatcctgtc 120
    E N V K A K I M K V F N T C K E K H P V
121  acagatgatgaacttgagcatttaggaaagcagatataggctttggttattcacatgat 180
    T D D E L A A F R K A D I G F G Y S H D
181  gcaaagtgtatgctggcatgtatgcttgaagaaggaaaatgctgaaagatggaaaatat 240
    A K C M L A C M L E E G K M L K D G K Y
241  ttgaaagagaatgctttaataatggctgatgtttttcacattgatgattttgatgaagca 300
    L K E N A L I M A D V F H I D D F D E A
301  gccaaagccagaaaaagttatagaaaattgttcagtagaagtttctgaagttggccctgac 360
    A K A R K V I E N C S V E V S E V G P D
361  caatgtgaattcgcatataaaaatggccgtatgtggagcaaatgaatctaaaaagcttggga 420
    Q C E F A Y K M A V C G A N E S K K L G
421  atgaaggagcatgatttctttgaataa 447
    M K E H D F F E -
```

EherOBP2

```
1   gggggagcaacagatgatgcatccaagcgactaagaaaggagtctttccagccgatgac 60
    G G A T D D A I Q A T K K G V F P A D D
61   cagaaactgaagtgctatttgaaatgcatttacagcaacatgggtgcatatctgatgat 120
    Q K L K C Y L K C I Y S N M G A I S D D
121  ggagaattagatgcagaagcattctcatcagtgatgccggaggatttaggagctgtttta 180
    G E L D A E A F S S V M P E D L G A V L
181  aatccaatgatcgaaaagtgcaggagtcactggcccagacagttgtgaactggcattc 240
    N P M I E K C K G V T G P D S C E L A F
241  aacttcaatatctgcttgtaacaatgataacaagaattaccttgtcatataa 294
    N F N I C L Y N A D N K N Y L V I -
```

Figura 9. Sequências nucleotídicas e dedução das sequências de aminoácidos, parcial e completa, das *EherOBP1* e *EherOBP2*, respectivamente. O sinal ‘-’ representa o códon de terminação da sequência.

As potenciais *EherOBPs* identificadas apresentaram similaridade significativa com OBPs de diferentes ordens de insetos (Fig. 10). Entre as OBPs que apresentaram similaridade com a *EherOBP1* podem ser citadas a *RproOBP2* do *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) (Zhou *et al.*, 2009) (*E-value*: 10^{-6}); e duas OBPs de Diptera, entre elas a da mosca tse-tse *Glossina morsitans morsitans* (Zhou *et al.*, 2009) (*E-value*: 0,046). Para a *EherOBP2* foram observadas similaridades de sequências com a *Lygus antennal protein* – LAP identificada na espécie *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) (Vogt *et al.*, 1999) (*E-value*: 6×10^{-21}); algumas OBPs de Coleopteros como, por exemplo, a *AosaPBP* (Wojtasek e Leal, 1998) (*E-value*: 9×10^{-12}) de *Anomala osakana*;

e a *BmorABPX* de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Krieger *et al.*, 1996) (*E-value*: 2×10^{-6}).

A fim de identificar as regiões de maior conservação na estrutura primária, fez-se um alinhamento múltiplo entre as *EherOBPs* e as OBPs de similaridade significativa (*E-value* $< 10^{-3}$), selecionadas com base na ordem a qual os insetos pertencem (Fig. 11).

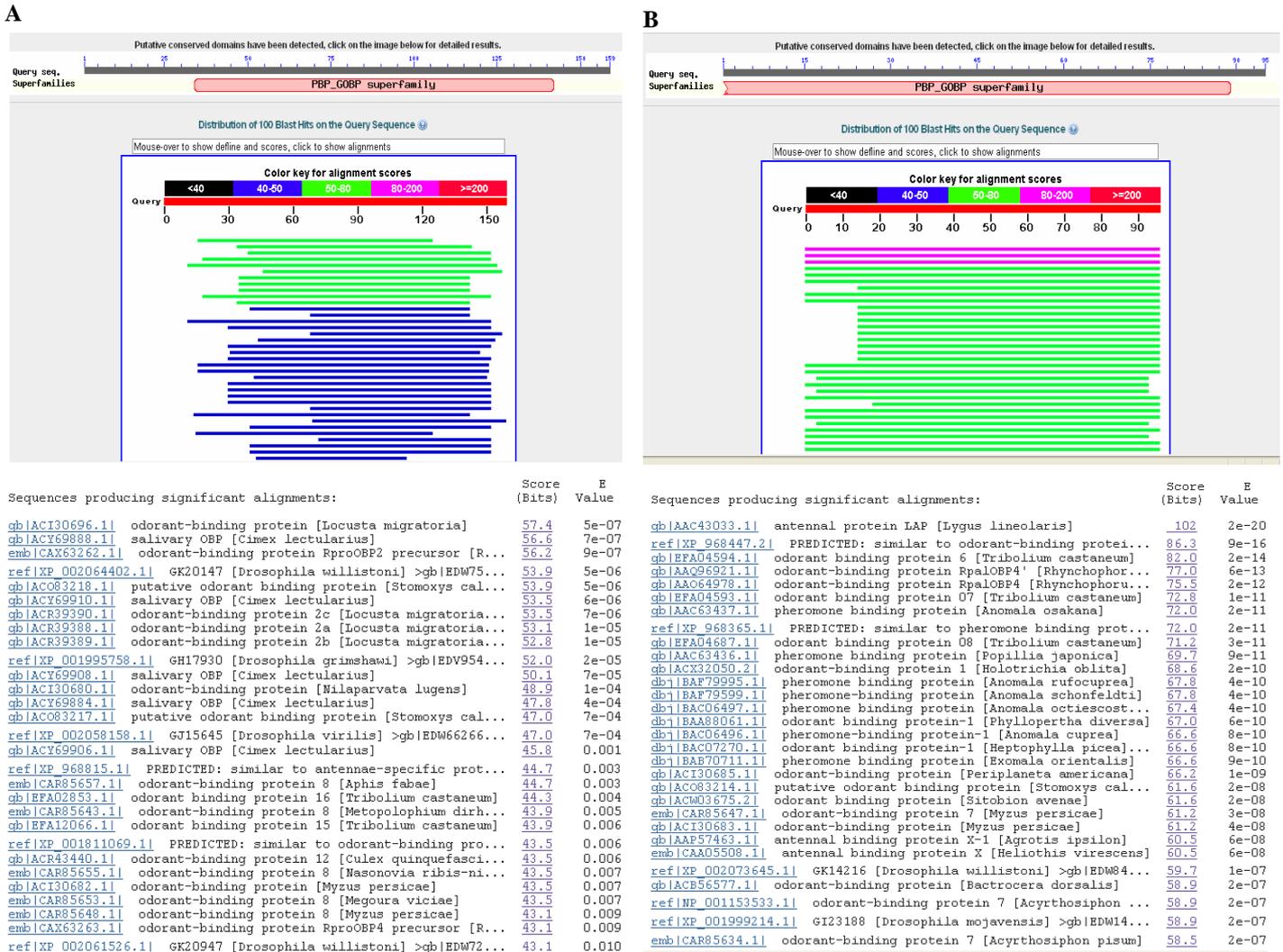


Figura 10: Identificação das OBPs de *E. heros* após alinhamento múltiplo pelo BLAST/NCBI.

A. *EherOBP1*; **B.** *EherOBP2*.

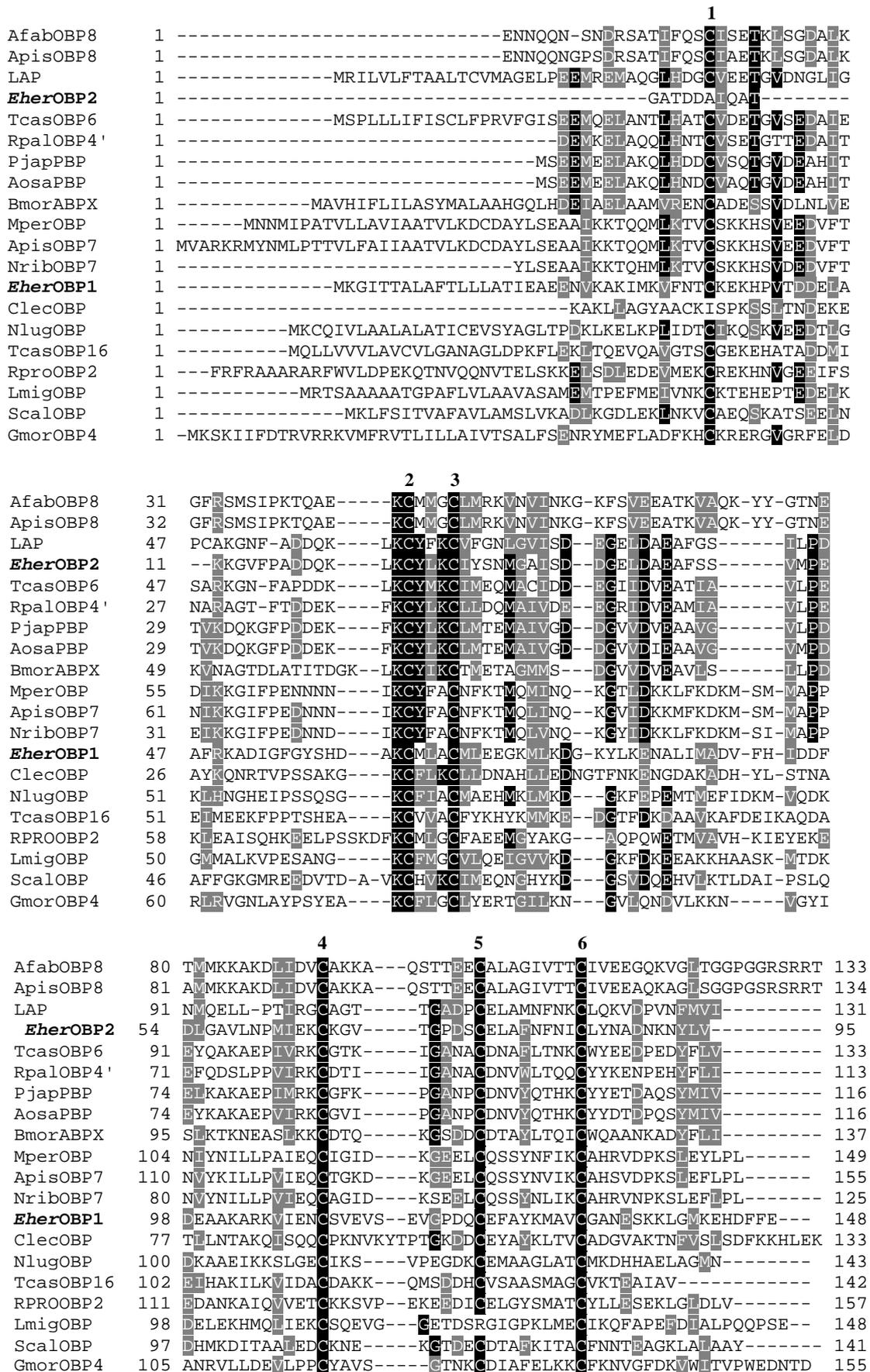


Figura 11. Alinhamento das *EherOBPs* com *OBPs* mais similares identificadas pelo BLASTp, utilizando-se o programa ClustalW e edição no BOXSHADE.. Os seis resíduos de cisteína são

indicados pelos números 1-6. Os resíduos de aminoácidos idênticos estão realçados em preto; enquanto os resíduos similares estão realçados em cinza. LAP: *Lygus lineolaris* (AF091118.1); AfabOBP: *Aphis fabae* (FM242556.1); MperOBP: *Myzus persicae* (FJ215309.1); ApisOBP: *Acyrtosiphon pisum* (NM001160061.1; FM242534.1); NribOBP: *Nasonovia ribis-nigri* (FN293391.1); ClecOBP: *Cimex lectularius* (EZ419715.1); RproOBP: *Rhodnius prolixus* (FN293394.1); NlugOBP: *Nilaparvata lugens* (FJ215306.1); TcasOBP: *Tribolium castaneum* (CM000279.1; CM000280.2); RpalOBP: *Rhynchophorus palmarum* (AY394703.1); PjapOBP: *Popillia japônica* (AF031491.1); AosaOBP: *Anomala osakana* (AF031492.1); BmorOBP: *Bombyx mori* (NM001044035.1); GmorOBP: *Glossina morsitans morsitans* (FN432782.1); ScalOBP: *Stomoxys calcitrans* (FJ233075.1); LmigOBP: *Locusta migratória* (FJ215322.1).

Os resultados do alinhamento evidenciam que as *Eher*OBPs compartilham com as demais OBPs analisadas uma das principais características relacionadas a essas proteínas em insetos: a presença dos seis resíduos cisteínas em posições conservadas e com espaçamento específico entre eles (3 resíduos de aminoácidos entre a segunda e a terceira cisteína; e 8 resíduos de resíduos de aminoácidos entre a quinta e a sexta cisteína). Ainda no alinhamento é possível observar que *Eher*OBP1 e 2 encontram-se em posições distantes uma da outra, indicando que estas proteínas são menos relacionadas entre si em comparação com as OBPs das outras espécies analisadas. Estas observações sugerem que as *Eher*OBPs podem interagir com diferentes odorantes, como também serem produzidas por pelos sensoriais diferentes.

*Eher*OBP1 apresenta sequências nucleotídica e deduzida de aminoácidos com tamanhos condizentes (447 pb e 148 aa) ao das OBPs de outros insetos. Análises preditivas da sequência de aminoácidos permitiram identificar a presença do peptídeo sinal (resíduos de 1 a 19), indicando que esta é uma proteína com função extracelular. As características mencionadas anteriormente, além de conterem seis de cisteína em posições conservadas, sugerem que a *Eher*OBP2 representa uma sequência OBP completa de 16,5 kDa e pI 5,1, tal como os membros da superfamília PBP_GOBP.

Em relação a *EherOBP2*, a ausência do peptídeo sinal, bem como o menor tamanho em relação a outras OBPs identificadas, sugere que não está completa, faltando potencialmente parte da extremidade 5' do respectivo cDNA. Entretanto, a identificação do domínio PBP (IPR006170 PBP_GOBP, Pfam PF01395, *SuperFamily* SSF47565), bem como a presença de cinco resíduos de cisteína localizados em regiões conservadas, foram suficientes para identificar similaridade entre a *EherOBP1* e outras OBPs. Foram realizadas tentativas utilizando a técnica de RACE, com a intenção de se obter a extremidade 5' da *EherOBP2*, porém, este objetivo ainda não foi alcançado. Estão previstas novas tentativas a serem realizadas a partir do mês de março de 2011.

5.2 Expressão dos *EherOBPs*

O perfil de expressão dos transcritos *EherOBPs* foi analisado através de qPCR em tempo real. Os níveis de transcrição relativa dos *EherOBPs* foi determinado nos diferentes tecidos (antenas, cabeça, patas, asas e abdômen) de machos e fêmeas utilizando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001). A análise da curva-padrão (Fig. 12) demonstrou que os três iniciadores utilizados nos experimentos apresentaram eficiência acima de 90%, sendo esta calculada de acordo com a equação descrita no item 4.3.

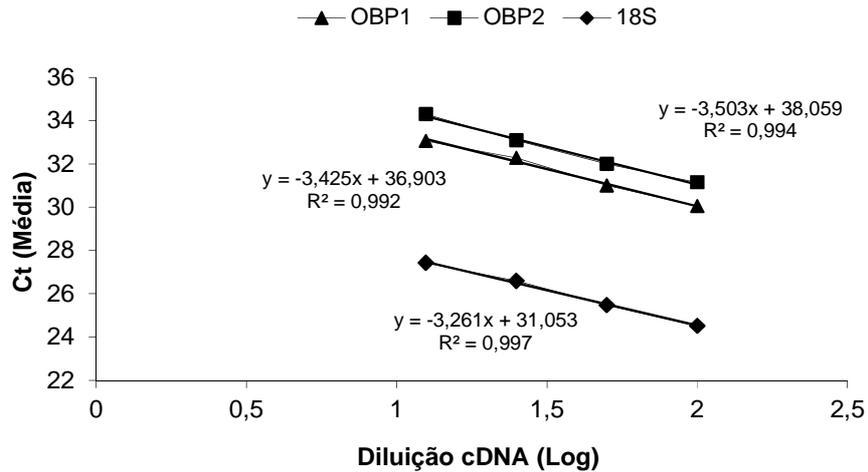


Figura 12. Curva-padrão obtida para os iniciadores utilizados na análise da expressão dos *EherOBPs*.

As análises da expressão dos *EherOBPs* em machos indicaram que são dois os sítio de produção da *EherOBP1*: antenas e patas, e que a expressão é equivalente nessas duas partes do corpo (Tabela 2). Em relação ao *EherOBP2*, a expressão foi observada nas antenas, asas e abdômen. Não houve diferença significativa em relação aos níveis de expressão nas antenas e abdômen (Tabela 2). Em contrapartida, a expressão da *EherOBP2* nas antenas foi 142 vezes maior em relação as asas.

Tabela 2. Proporção, determinada pelo método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$, do nível de expressão dos *EherOBPs* em diferentes partes do corpo do macho comparado com o nível de expressão nas antenas.

Tecido	<i>EherOBP</i>	ΔCT (Média \pm DP) ^a	$\Delta\Delta CT$ ^b	$2^{-\Delta\Delta CT}$ ^c	Valor-P (<i>t</i> -Student)
Antenas	<i>EherOBP1</i>	-6,36 \pm 0,4	0,00 \pm 0,4	1	
Cabeça		0	na	na	na
Patas		-5,4 \pm 0,28	0,96 \pm 0,28	0,51	0,064 ^{ns}
Asas		0	na	na	na
Abdômen		0	na	na	na
Antenas	<i>EherOBP2</i>	-6,18 \pm 0,48	0,00 \pm 0,48	1	
Cabeça		0	na	na	na
Patas		0	na	na	na
Asas		0,97 \pm 0,82	7,15 \pm 0,82	0,007	0,003**
Abdômen		-5,47 \pm 1,88	0,71 \pm 1,88	0,61	0,65 ^{ns}

^aMédia CT *EherOBP*,_{Parte do corpo} – Média CT 18S

^bMédia CT *EherOBP*,_{Parte do corpo} – Média CT *EherOBP*,_{Macho antena}

^cQuantificação relativa dos *EherOBPs* em relação a antena.

^{na} Não se aplica.

^{ns} Não-significativo.

**Diferença significativa pelo teste *t*-Student (P<0,05).

Em fêmeas, a transcrição do *EherOBP1* foi observada nas antenas, patas e abdômen (Tabela 3). Entretanto, o nível de transcrição nas antenas foi cinco vezes maior em relação às patas e 23 mil vezes maior em relação ao abdômen. Das cinco partes do corpo analisadas, a expressão do *EherOBP2* apenas não foi observada nas asas, porém, a transcrição nas antenas foi 53; 123 e 1000 vezes maior em relação às patas, cabeça e abdômen, respectivamente. Os resultados observados para a curva de dissociação dos genes-alvo e do gene de referência indicaram a especificidade da amplificação para todas as amostras analisadas (Fig. 13,14 e 15).

Tabela 3. Nível de expressão dos *EherOBPs* em diferentes partes do corpo da fêmea comparado com o nível de expressão nas antenas. Análise comparativa realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tecido	Gene Alvo	ΔCT (Média $\pm DP$) ^a	$\Delta\Delta CT$ ^b	$2^{-\Delta\Delta CTc}$	Valor-P (t-Student)
Antenas	<i>EherOBP1</i>	-4,73 \pm 0,44	0,00 \pm 0,44	1	
Cabeça		0	na	na	na
Patas		-2,36 \pm 0,39	2,37 \pm 0,39	0,19	0,049**
Asas		0	na	na	na
Abdômen		9,81 \pm 0,94	14,53 \pm 1,88	4,2E-5	0,03**
Antenas	<i>EherOBP2</i>	-3,67 \pm 0,10	0,00 \pm 0,10	1	
Cabeça		3,3 \pm 2,25	6,95 \pm 2,25	0,008	0,013**
Patas		2,06 \pm 0,09	5,73 \pm 0,09	0,018	0,008**
Asas		0	na	na	na
Abdômen		6,38 \pm 2,03	10,05 \pm 2,03	9,4E-4	0,045**

^aMédia CT *EherOBP*_{Parte do corpo} – Média CT 18S

^bMédia CT *EherOBP*_{Partedo corpo} – Média CT *EherOBP*_{Fêmea antena}

^cQuantificação relativa dos *EherOBPs* em relação a antena.

^{na} Não se aplica.

**Diferença significativa pelo teste t-Student(P<0,05).

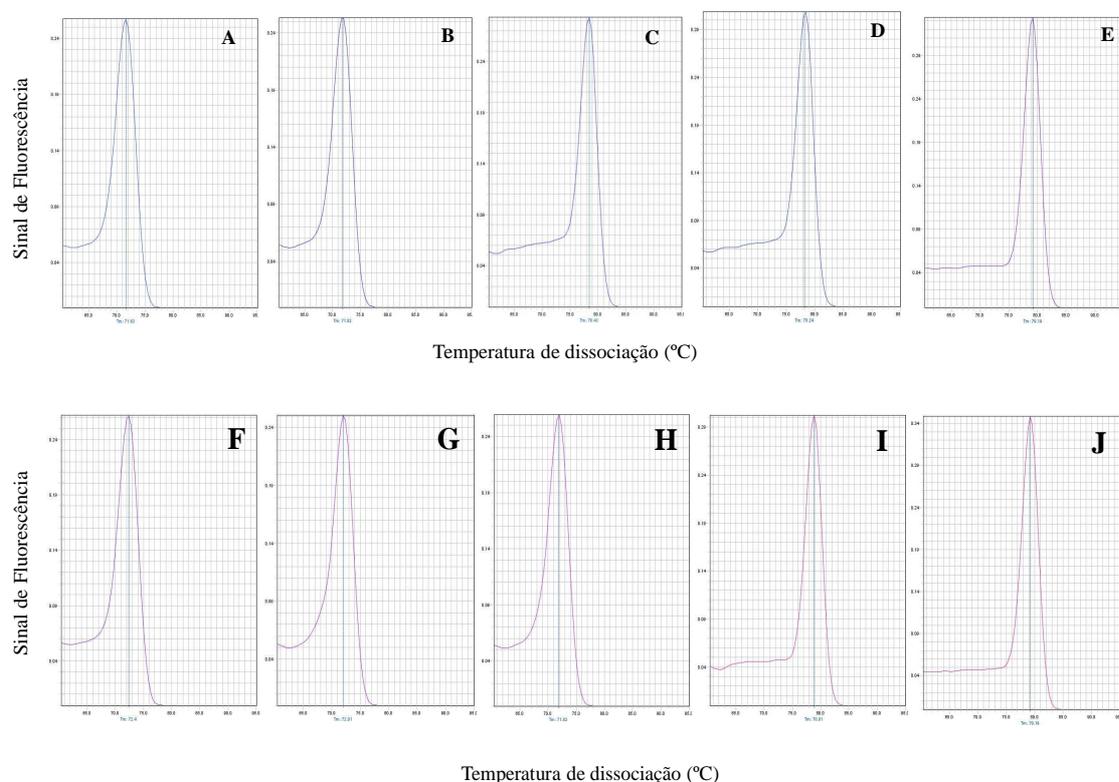


Figura 13. Curvas de dissociação para o gene de referência rRNA18S. **A-E:** curvas de dissociação obtidas para fêmeas; **(A):** antenas; **(B)** cabeça; **(C):** patas; **(D):** asas e **(E):** abdômen. **F-J:** curvas de dissociação obtidas para machos; **(F):** antenas; **(G):** cabeça; **(H):** patas; **(I):** asas; **(J):** abdômen.

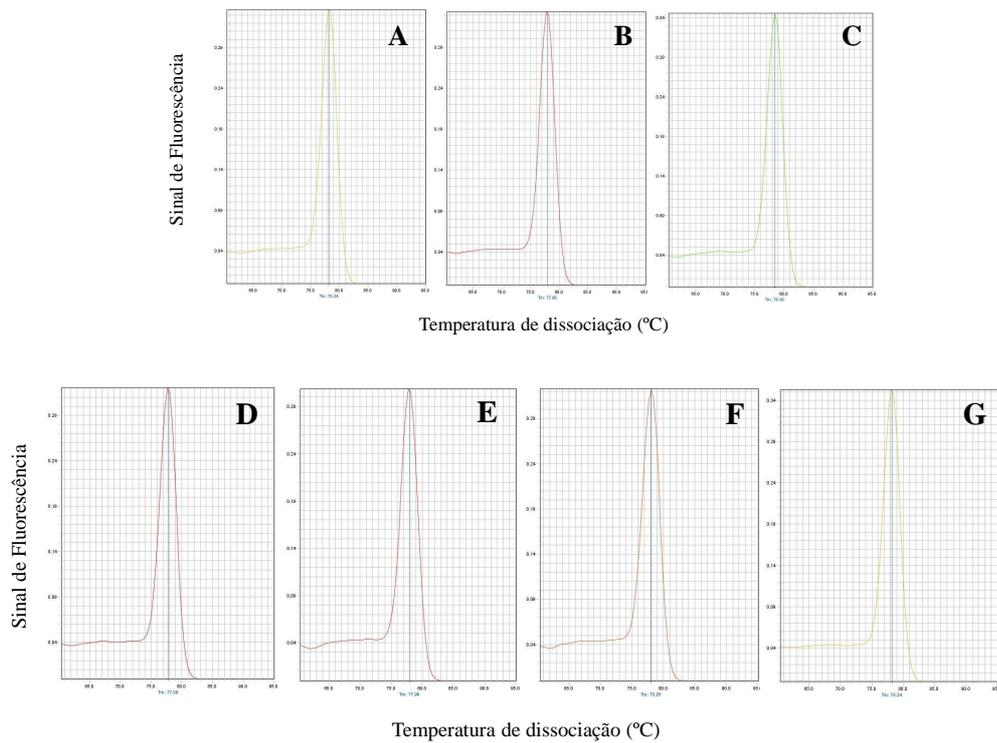


Figura 14. Curvas de dissociação observadas para os experimentos conduzidos com os *EherOBPs* em diferentes partes do corpo da fêmea. **A-C:** *EherOBP1*; **(A):** antenas; **(B):** patas e **(C):** abdômen. **D-G:** *EherOBP2*; **(D):** antenas; **(E)** cabeça; **(F):** patas e **(G):** abdômen.

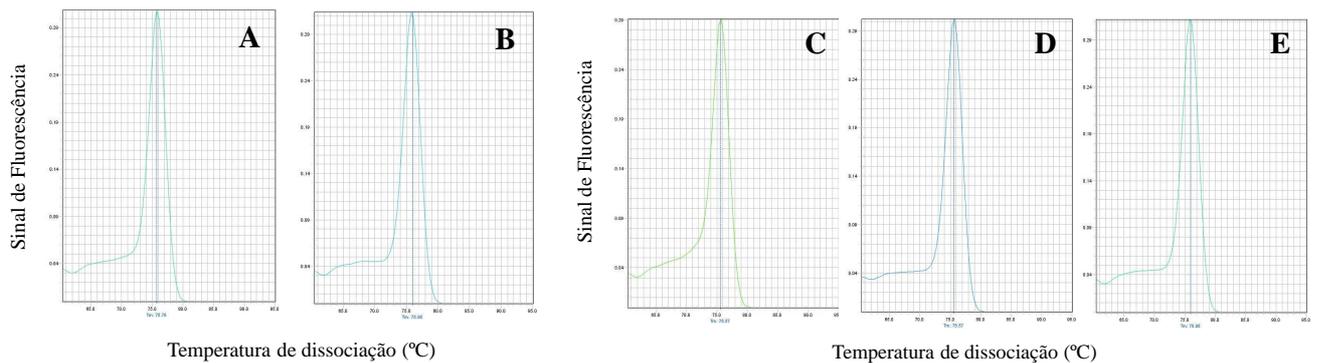


Figura 15. Curvas de dissociação observadas para os experimentos conduzidos com os *EherOBPs* em diferentes partes do corpo do macho. **A e C:** *EherOBP1*; **(A):** antenas; **(B):** patas. **C-E:** *EherOBP2*; **(C):** antenas; **(D)** asas; **(E):** abdômen.

A análise comparativa da expressão dos *EherOBPs* nas antenas de machos e fêmeas revelou que a transcrição do *EherOBP1* e do *EherOBP2* é, respectivamente, três vezes e cinco vezes maior nas antenas de machos em comparação com as antenas das fêmeas (Tabela 4).

Tabela 4. Análise comparativa do nível de expressão dos *EherOBP1* e 2 nas antenas de fêmeas em relação as antenas de machos

Tecido	<i>EherOBP</i>	Δ CT (Média±DP) ^a	$\Delta\Delta$ CT ^b	$2^{-\Delta\Delta$ CT ^c	Valor-P (<i>t</i> -Student)
Antenas ♂	<i>EherOBP1</i>	-6,36 ±0,4	0,00 ±0,4	1	
Antenas ♀		-4,73 ±0,44	1,63 ±0,44	0,32	0,025**
Antenas ♂	<i>EherOBP2</i>	-6,18 ±0,48	0,00 ±0,48	1	
Antenas ♀		-3,67 ±0,10	2,51 ±0,10	0,17	0,01**

^aMédia CT *EherOBP*_{,Antena} – Média CT 18S

^bMédia CT *EherOBP*_{,Fêmea Antena} – Média CT *EherOBP*_{,Macho antena}

^cQuantificação relativa dos *EherOBPs* em relação a antena do macho.

**Diferença significativa pelo teste *t*-Student (P<0,05).

A expressão específica nas antenas é um dos critérios adotados na identificação de OBPs na ordem Lepidoptera, porém, este critério não é aplicado para outras ordens de insetos com, por exemplo, Hymenoptera (Ishida *et al.*, 2002; Krieger e Ross, 2002; Calvello *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009), Blattaria (Rivieri *et al.*, 2003), Diptera (Hekmat-Safe *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2003) e na espécie *Adelphocoris lineolatus* (Hemiptera: Miridae) (Gu *et al.*, 2011), onde foram identificadas OBPs em diferentes partes do corpo incluindo cabeça, patas, asas, palpas maxilares e abdômen. O perfil de expressão dos *EherOBPs* observado nas antenas, patas e abdômen (Fig. 16) pode ser mais um indício de que essas proteínas hipotéticas apresentam especificidade de ligação a diferentes tipos de odorantes, porém, apenas através de estudos funcionais e caracterização das proteínas é que será possível classificá-las como proteínas ligantes a feromônio ou proteínas ligantes a odores gerais, bem como determinar a especificidade da molécula odorante.

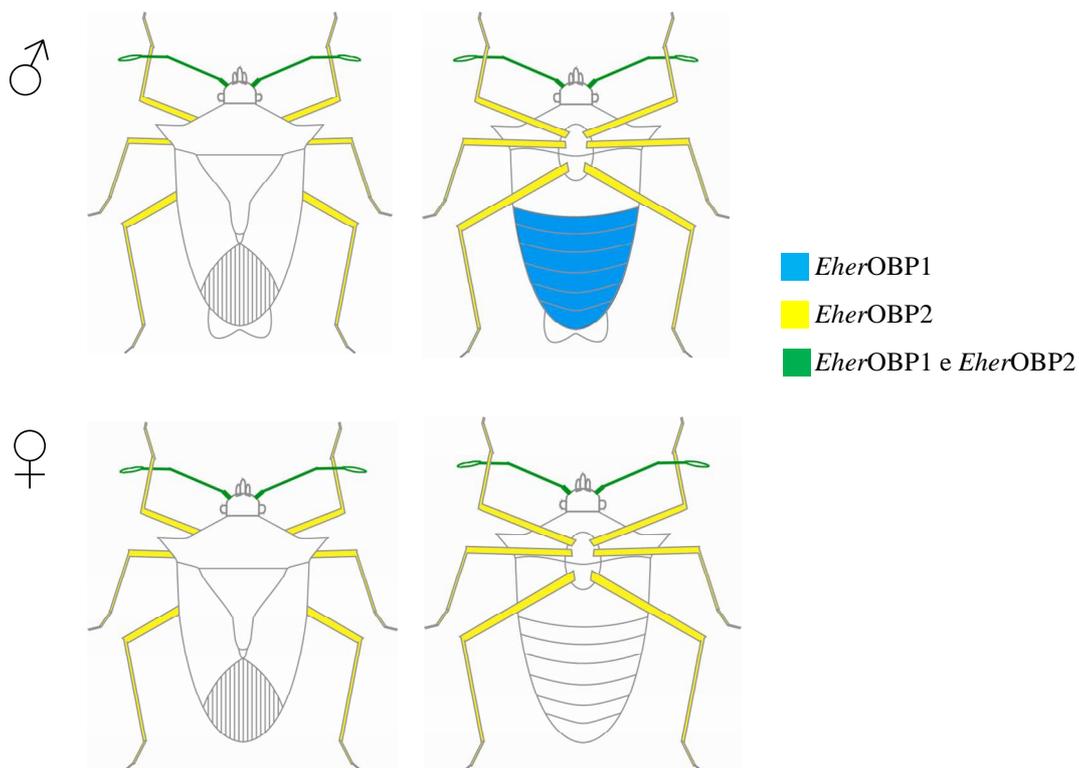


Figura 16. Representação esquemática da expressão significativa dos transcritos *EherOBPs* nos diferentes tecidos do percevejo-marrom analisados. Tecidos onde a expressão foi muito próxima de zero não foram coloridos.

5.3 Histolocalização dos mRNAs *EherOBPs* nas antenas de *E. heros*

Os experimentos de hibridização *in situ* foram realizados para avaliar a distribuição dos transcritos relacionados às *EherOBP1* e *EherOBP2* nas antenas de machos e fêmeas adultas de *E. heros*. A antena desta espécie é dividida em cinco segmentos, sendo eles da base ao ápice: dois flagelos, dois pedicelos e um escapo (Fig. 17A), ao longo dos quais encontram-se distribuídos seis tipos de sensilas morfológicamente distintas (Fig. 17B): dois subtipos tricódeas (ST1 e ST2), três subtipos basicônica (SB1, SB2 e SB3) e um tipo peculiar de sensilas basicônica denominada *knob-shaped* (Silva *et al.*, 2010). Baseada na morfologia e distribuição nas antenas foram atribuídas funções hipotéticas aos diferentes subtipos: a sensilas ST1 está relacionada a funções mecânica e quimiorreceptoras; sensilas SB1 está relacionada a

detecção do feromônio; as sensilas SB2, SB3 e *knob-shaped* parecem estar relacionadas à quimiorrecepção. O padrão de distribuição das sensilas demonstrou um dimorfismo sexual entre machos e fêmeas, essas últimas apresentando maior número de sensilas ST2, SB2 e SB1 (pontas das antenas) e os machos com predominância das sensilas ST1 e SB1 (porção mediana do segundo flagelo). Não foi observada diferença sexual na distribuição das sensilas SB3 e *knob-shaped*.

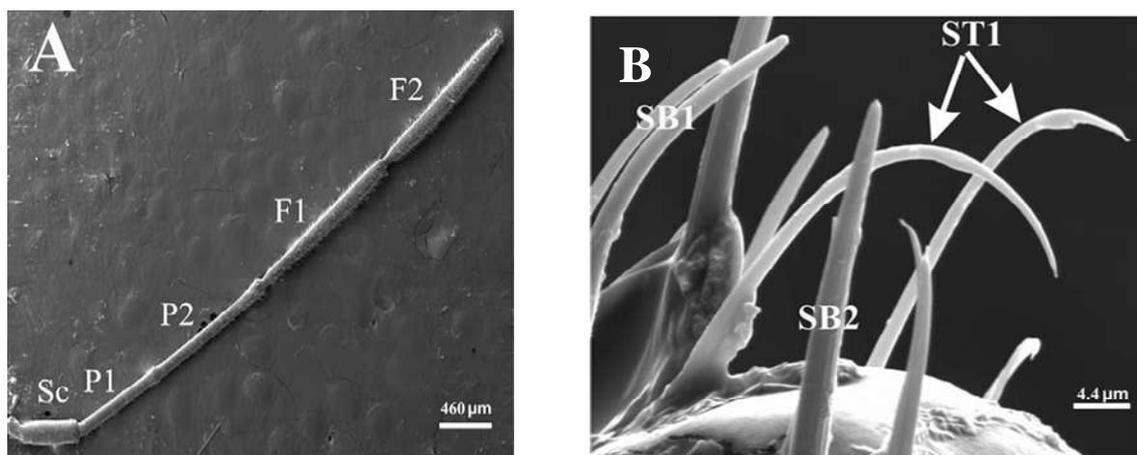


Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura da antena de fêmea de *E. heros*. (A) Os cinco segmentos da antena: Sc: escapo; P1: pedicelo 1; P2: pedicelo 2; F1: flagelo 1; F2: flagelo 2. (B) Tipos de sensilas presentes na antena: SB: sensilas basicônica; ST: sensilas tricódeas. Adaptado de Silva *et al.*, 2010.

Os resultados obtidos nesse trabalho de mestrado revelaram diferenças entre os sexos em relação ao padrão de distribuição dos transcritos *EherOBPs* até agora identificados e analisados nas antenas de *E. heros*. Em machos, a localização do mRNA *EherOBP1* foi observada apenas na região do flagelo 1 (Fig. 18A), sendo a distribuição nas fêmeas mais abrangente, na qual foi possível localizar hibridização nas regiões do flagelo 1, pedicelo 1 e escapo (Fig. 18-B1, B2 e B3).

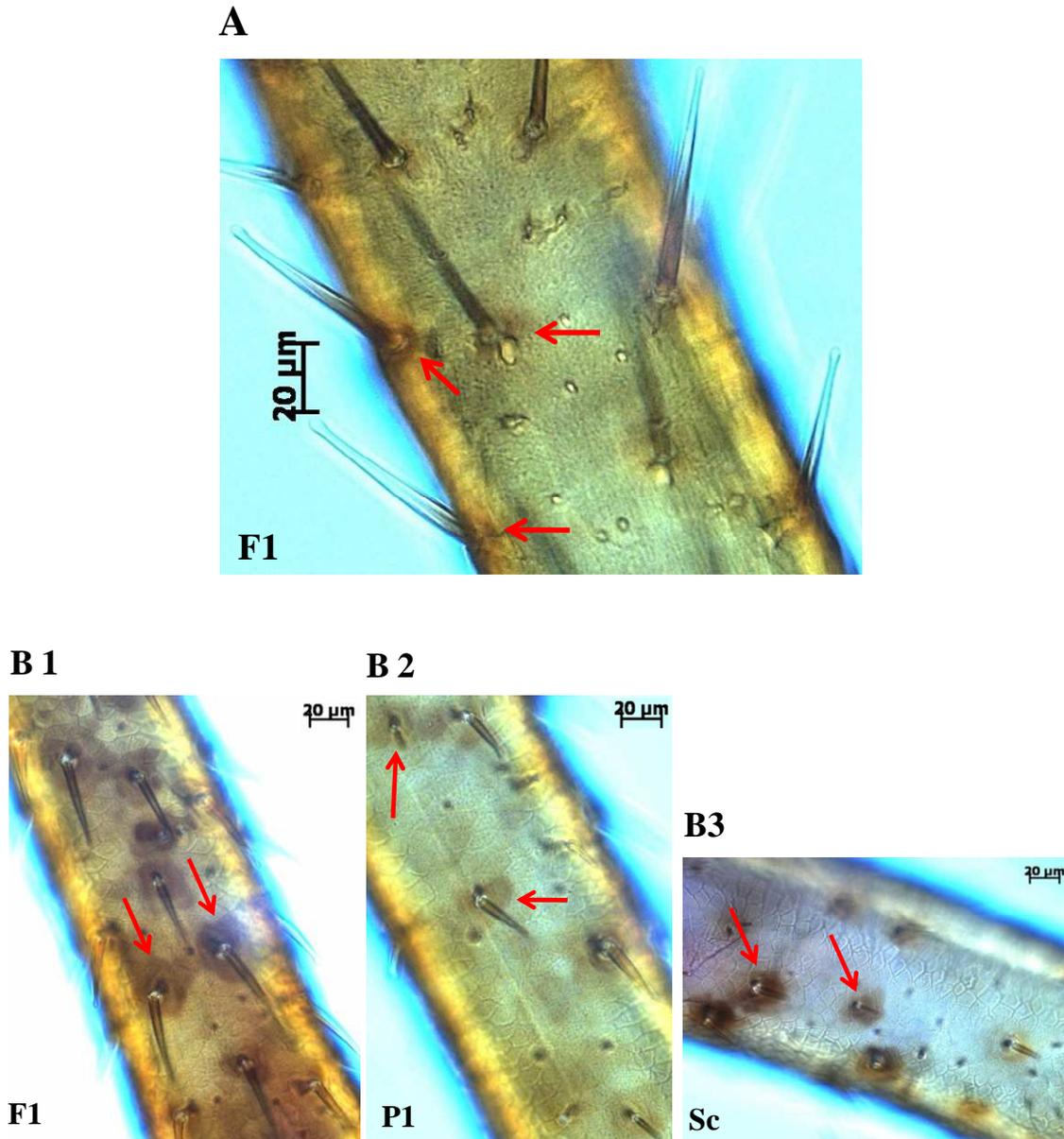


Figura 18. Hibridização *in situ* com sonda anti-senso (SP6) *EherOBP1* nas antenas de machos e fêmeas de *E. heros*. **A:** Antena de macho; **B1, B2 e B3:** Antena de fêmea. As setas em vermelho apontam os sítios de hibridização. **F1:** flagelo 1; **P1:** pedicelo 1; **Sc:** escapo.

Para *EherOBP2*, a hibridização no macho foi detectada nas sensilas localizadas na região do flagelo 2 e do escapo (Fig. 19-A1 e A2), enquanto nas fêmeas a localização da hibridização foi observada apenas na região do flagelo 1 (Fig. 19-B1 e B2). A figura 20 representa os resultados obtidos com o controle negativo utilizando a sonda anti-senso para o rRNA da espécie vegetal *Arabidopsis thaliana*.

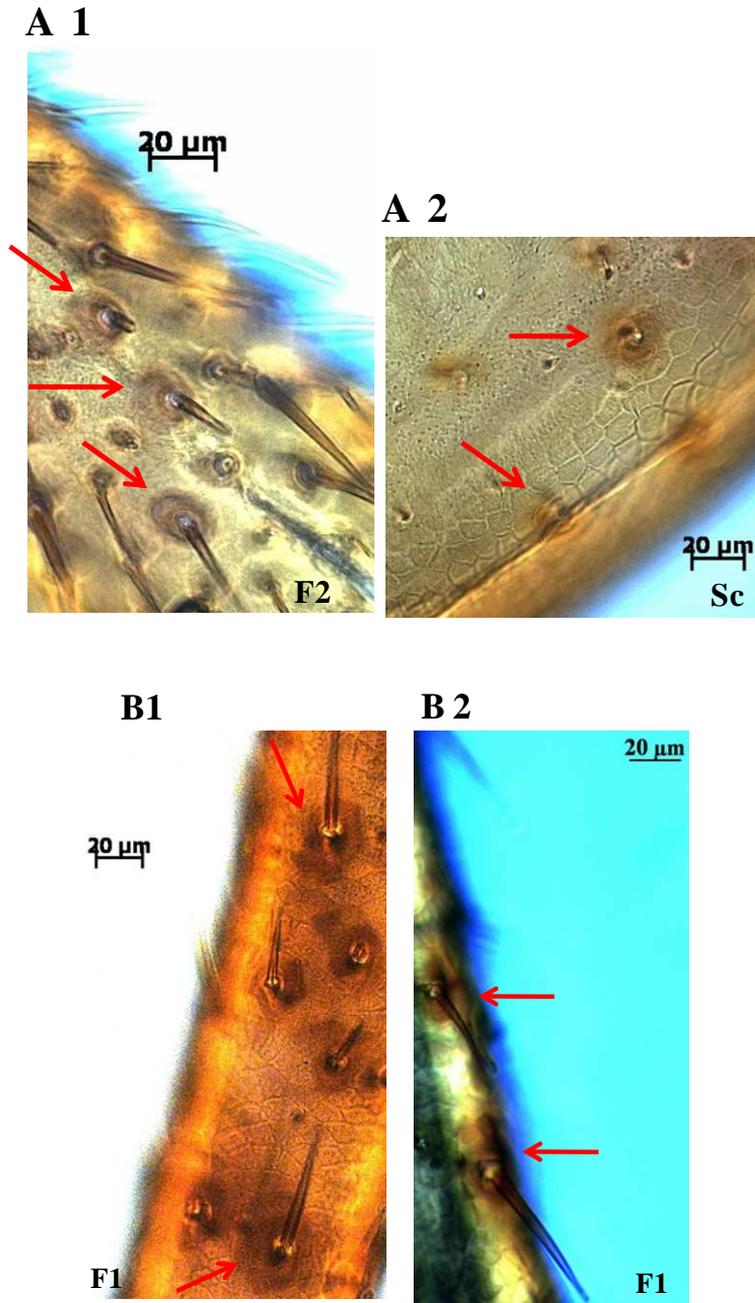


Figura 19. Perfil de expressão do transcrito *EherOBP2* nas antenas de machos e fêmeas de *E. heros*. **A1 e A2:** Hibridização *in situ whole-mount* com sonda anti-senso (SP6) na antena de macho; **B1 e B2:** Hibridização das antenas de fêmeas com sonda anti-senso (SP6). As setas em vermelho apontam os sinais de hibridização. **F1:** flagelo 1; **F2:** flagelo 2; **Sc:** escapo.

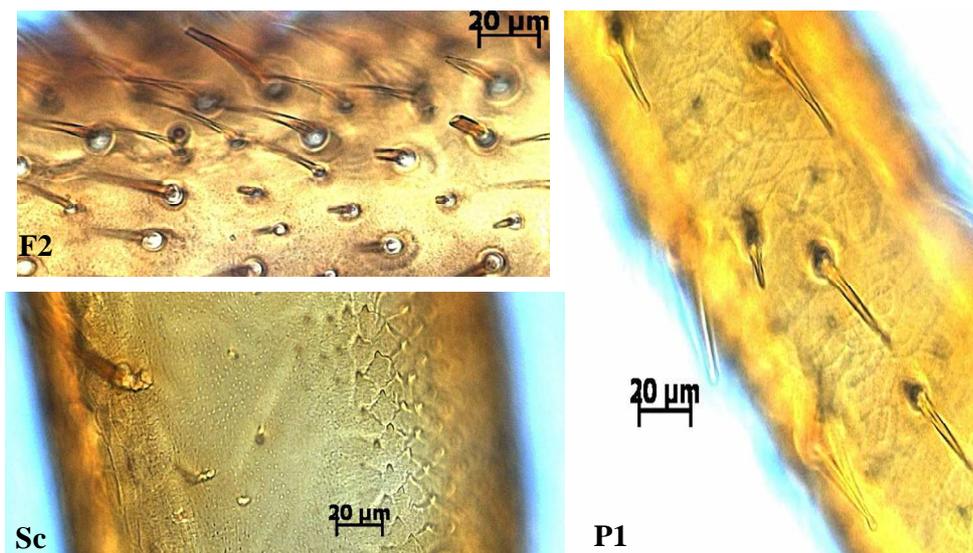


Figura 20. Controle negativo da hibridização *in situ* utilizando sonda anti-senso para o rRNA da espécie vegetal *Arabidopsis thaliana*. **F2**: flagelo 2; **P1**: pedicelo 1; **Sc**: escapo.

A localização da hibridização para os transcritos *EherOBP1* e *EherOBP2* em machos e fêmeas foi observada na base das sensilas indicando que, possivelmente, a síntese das respectivas proteínas (*EherOBPs*) está associada as células suporte dos pêlos olfativos nas antenas, resultados semelhantes aos obtidos em Lepidoptera (Steinbrecht *et al.*, 1992 e 1995), Diptera (Hekmat-Schafe *et al.*, 1997) e no Hemiptera *Lygus lineolaris* (Vogt *et al.*, 1999). Os resultados do perfil de distribuição dos transcritos *EherOBPs* nas antenas de machos e fêmeas sugere que as respectivas proteínas *EherOBPs* podem estar relacionada ao tipo de sensilas (basicônica ou tricodea), uma vez que nos machos, os segmentos da antena nos quais foram observados hibridização apresentam maior concentração de sensilas do tipo tricodea; enquanto nas fêmeas a hibridização foi observada nos segmentos da antena onde a concentração de sensilas basicônica é maior (Silva *et al.*, 2010). Estão previstos estudos que visam à caracterização funcional das sensilas de *E. heros* através de imunolocalização associada à fluorescência, com o intuito de elucidar a presença dessas proteínas nos diferentes tipos de sensila nessa espécie.

6. Conclusões

O estudo de proteínas que atuam na comunicação química dos insetos surge como proposta emergente em âmbito internacional para controle de insetos de interesse fitossanitário. Neste trabalho foram identificados dois derivados gênicos relacionados à olfação no percevejo-marrom praga da soja, *E. heros*.

A expressão diferencial observada a partir dos resultados do qPCR em tempo real dos *EherOBPs* nas antenas, patas e abdômen de macho e nas antenas e patas de fêmeas, bem como o perfil de distribuição observado a partir da hibridização *in situ* dos transcritos nas antenas de ambos os sexos indica uma possível especificidade funcional das *EherOBPs* hipotéticas.

A identificação de derivados gênicos relacionados à olfação descrita neste trabalho representa o primeiro registro em uma espécie da família Pentatomidae. Sendo assim, as informações disponibilizadas neste trabalho podem contribuir para uma melhor compreensão do comportamento da espécie no campo, bem como gerar conhecimento passível de ser aproveitado no manejo da praga.

7. Perspectivas

1. Validação funcional dos *EherOBPs* identificados.
2. Estudo da expressão das *EherOBPs* de acordo com o tipo de *sensillum* e em diferentes condições bióticas (idade, acasalamento, etc.) e abióticas.
3. Continuação da prospecção de *EherOBPs*.

8. Referências Bibliográficas

Borges, M. e Aldrich, J. R. (1994) Attractant pheromone for Nearctic stink bug, *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae): insight to Neotropical relative. *J. Chem. Ecol.* 20: 1095-1102.

Callahan, F. E., Vogt, R. G., Tucker, M. L., Dickens, J. C. e Mattoo, A. K. (2000) High level expression of male specific pheromone binding proteins (PBPs) in antennae of female noctuid moths. *Ins. Biochem. and Mol. Biol.* 30: 507-514.

Calvello, M., Brandazza, A., Navarini, A., Dani, F. R., Turillazzi, S., Felicoli, A. e Pelosi, P. (2005) Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 297-307.

Chomczynski, P. e Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.

Costa, M. L. M., Borges M. e Vilela E. F.. 1998. Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *An. Soc.Entomol. Brasil* 27: 559-568.

Dahanukar, A., Hallem, E. A. e Carlson, J. R. (2005) Insect chemoreception. *Current Opinion in Neurobiology*, 15:423–430.

Damberger, F., Nikonova, L., Horst, R., Peng, G., Leal, W. S., e Wuthrich, K. (2000). NMR characterization of a pH-dependent equilibrium between two folded solution

conformations of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori*. *Protein Sci.* 9: 1038–1041.

Ernst, K. D. (1969) Die Feinstruktur Von Reichsensillen auf der Antenne des Aaskafers *Necrophorus* (Coleoptera). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 94: 72 – 102.

Ferreira, B. S. C. e Panizzi, A. R. (1982) Percevejos-pragas da soja no norte do Paraná: abundância em relação a fenologia da planta e hospedeiros intermediários. *An. II Semin. Nac. Pesq. Soja*, Vol II, PP. 140-151.

Galileo, M. H. M., Heinrichs E. A. (1978a) Efeito dos danos causados por *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera, Pentatomidae), em diferentes níveis e épocas de infestação, no rendimento de grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 7: 20-25.

Galileo, M. H. M., Heinrichs, E. A. (1978b) Retenção foliar em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) resultantes da ação de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera, Pentatomidae), em diferentes níveis e épocas de infestação. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 7: 85-98.

Gazzoni, D. L., Oliveira, E. B., Corso, I. C., Ferreira, B. S. C., Villas Bôas, G. L., Moscardi, F., Panizzi, A. R. (1998) Manejo de pragas da soja. Londrina: Embrapa, CNPSo. 44p. (Circular Técnica, 5).

Gu, S-H., Wang, S. P., Zhang, X. Y., Wu, K. M., Guo, Y. Y., Zhou, J. J. e Zhang, Y. Z.

(2011) Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the Lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect. Biochem. And Mol. Biol.* In press.

Hekmat-Schafe, D. S., Steinbrecht, R. A. e Carlson, J. R. (1997) Coexpression of two odorant-binding protein homologs in *Drosophila*: implication for olfactory coding. *J. Neurosci.* 17, 1616-1624.

Hekmat-Schafe, D. S., Schafe, C. R., McKinney, A. J. e Tanouye, M. A. (2002) Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 12: 1357-1369.

Horst, R., Damberger, F., Luginbuhl, P., Guntert, P., Peng, G., Nikonova, L., Leal, W. S., Wuthrich, K. (2001) NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 14374-14379.

IBGE. Indicadores IBGE, Estatística da Produção Agrícola. Fevereiro de 2008.

Ishida, Y., Chiang, V. e Leal, W. S. (2002) Protein that make sense in the Argentine ant. *Naturwissenschaften.* 89: 505-507.

Klusák, V., Havlas, Z., Rulisek, L., Vondrásek, J., Svatos, A. (2003) A Sexual attraction in the silkworm moth. Nature of binding of bombykol in pheromone binding protein - an Ab Initio study. *Chem. Biol.*, 10: 331-340.

Krieger, J., Von Nickisch-Rosenegk, E., Mameli, M., Pelosi, P. e Breer, H. (1996) Bindings proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect.Biochem. Mol. Biol.*, 26:297-307.

Krieger, M. J. e Ross, K. G. (2002) Identification of a major gene regulating complex social behavior. *Science*. 295: 328-332.

Lartigue, A., Gruez, A., Briand, L., Pernollet, J. C., Spinelli, S., Tegoni, M., Cambillau, C. (2003a) Optimization of crystals from nanodrops: crystallization and preliminary crystallographic study of a pheromone-binding protein from the honeybee *Apis mellifera* L. *Acta Crystallogr D Biol Crystalogr*.59: 919-921.

Lartigue, A., Gruez, A., Spinelli, S., Rivière, S., Brossut, R., Tegoni, M., Cambillau, C. (2003b) The crystal structure of a cockroach pheromone binding protein suggests a new ligand binding and release mechanism. *J. Biol. Chem.*, 278: 30213-30218.

Leal, W. S. (2000) Duality monomer-dimer of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori*. *Biochem.Biophys. Res. Commun*. 268:521-529.

Leal, W. S. (2003) Proteins that Make Sense. In *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*. (eds. GJ Blomquist e RG Vogt), pp. 447-476. Elsevier Academic Press, London.

Link, D. e J. Grazia. (1987) Pentatomídeos da região central do Rio Grande do Sul (Heteroptera). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 16(1): 115-129.

Livak, K. J. e Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 25: 402-408.

Liu, R., Lehane, S., He, X., Lehane, M.J., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., Pickett, J.A., Field, L.M. e Zhou, J.J. (2009) Functional characterisations of odorant binding proteins and chemosensory proteins in tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Cell.Mol. Life Sci*. 67: 919-929.

Marchler-Bauer, A., Anderson J. B., Cherukuri P.F., DeWeese-Scott C., Geer L.Y., Gwadz M., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Lu F., Marchler G.H., Mullokandov M., Shoemaker B.A., Simonyan V., Song J. S., Thiessen P.A., Yamashita R.A., Yin J., Zhang D. e Bryant S. H. (2005) CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res*. 33: 192-6.

Meillour, P. N. L. e Jacquin-Joly, E. (2003) Biochemistry and diversity of insect odorant-binding proteins. In *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*. (eds. Blomquist, G. J. and Vogt, R.G.), pp. 509-538. Elsevier Academic Press, London.

Mourão, A. P. M. (1999) Influência do fotoperíodo na indução da diapausa do percevejo-marrom *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemíptera: Pentatomidae). *M. Sc. Thesis, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil*. 76p.

Meillour, P., Francois, M.C. e Jacquin-Joly, E. (2004) Identification and molecular cloning of putative odorant-binding proteins from the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *J. Chem. Ecol*. 30(06): 1213-1223.

Nakabachi,A., Shigenobu,S., Sakazume,N., Shiraki,T., Hayashizaki,Y., Carninci,P., Ishikawa,H., Kudo,T. e Fukatsu,T. (2005) Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, *Buchnera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(15): 5477-5482.

Olafson, P. U. e Lohmeyer, K. H. (2008) Identification of olfactory pathway-related genes expressed in antennae of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. Submetido para publicação.

Ozaki, M., Takahara, T., Kawahara, Y., Wada-Katsumata, A., Seno, K., Amakawa, T., Yamaoka, R. e Nakamura, T. (2003) Perception of noxious compounds by contact chemoreceptors of the blowfly, *Phormia regina*: putative role of an odorant-binding protein. *Chem. Senses* 28: 319-332.

Panizzi, A. R. e Niva, C. C. (1994) Overwintering strategy of the Brown stink bug in northern Paraná. *Pesq. Agropec. Bras.* 29: 509-511.

Panizzi, A. R. e Hirose, E. (1995) Seasonal body weight , lipid content and impact of starvation and water stress on adult survivorship and longevity of *Nezara viridula* and *Euschistus heros*. *Entomol. Exp. Appl.* 76: 477-481.

Panizzi, A. R. e Vivan, L. M. (1997) Seasonal abundance of Neotropical of brown stink bug, *Euschistus heros* in overwintering sites and the breaking of dormancy. *Entomol. Exp. Appl.* 82: 213-217.

Panizzi, A. R., McPherson, J. E., James, D. G., Javahery, M. e McPherson, R. M. (2000) Stink Bugs (Pentatomidae). In: *Heteroptera of Economic Importance*. (eds. Schaefer, C. W. e Panizzi, A. R.), pp. 421-474. CR Press LCC, Flórida.

Pinto, S. B. e Panizzi, A. R. (1994) Performance of nymph and adult *Euschistus heros* (F.) on milkweed and on soybean and effect of food switch on adult survivorship, reproduction and weight gain. *An. Soc. Entomol. Brasil* 23: 549-555.

Ribeiro, J.M.C., Francischetti, I.M.B., Calvo, E., Pham, V.M., Favreau, A.J., Barbian, K.D., Romero, A. e Valenzuela, J.G. (2009) An insight into the sialome of the bed bug *Cimex lectularius*. Submetido para publicação.

Riviere, S., Lartigue, A., Quenedey, B., Campanacci, V., Farine, J. P., Tegoni, M., Cambillau, C. e Brossut, R. (2003) A pheromone-binding protein suggests from the cockroach *Leucophaea maderae*: cloning, expression and pheromone binding. *Biochem.* 371: 573-579.

Sandler, B.H., Nikonova, L, Leal W. S. e Clardy J. (2000) Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. *Chem Biol.* 7: 143-151.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. e Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5857-5864.

Silva, C., Capdeville, G., Moraes, M. C. B., Falcão, R., Solino, L. F., Laumann, R. A., Silva, J. P. e Borges, M. (2010) Morphology, distribution and abundance of antennal sensilla in three stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *Micron*. 41: 289-300.

Sosa-Gomez, D. R.; Silva, J. J.; Lopes, I. ; Corso, I. C.; Almeida, A. M.; Moraes, G. C.; Baur, M. E. (2009) Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 102: 1209-1216.

Steinbrecht, R. A., Ozaki, M. e Ziegelberger, G. (1992) Immunocytochemical localization of pheromone-binding protein in moth antennae. *Cell Tissue Res*. 270: 287-302.

Steinbrecht, R. A., Laue, M. e Ziegelberger, G. (1995) Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res*. 282: 203-217.

Tautzs, D. e C. Pfeiffle. (1989) A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma*, 98: 81-85.

Vogt, R. G. e Riddiford, L. M. (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161-163.

Vogt, R. G., Rybczynski, R. e Lerner, M. R. (1991) Molecular cloning and sequencing of general odorant binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hornworm

Manduca sexta: comparison with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.* 11: 2972 - 2984.

Vogt, R. G., Callahan, F. E., Rogers, M. E. e Dickens, J. E. (1999) Odorant binding protein diversity and distribution among insects Orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses* 24: 481-495.

Wojtasek, H., Hansson, B.S. e Leal, W.S. (1998) Attracted or repelled: A matter of two neurons, one pheromone binding protein, and a chiral center. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250(2): 217-222.

Wojtasek H. e Leal W. S. (1998) Identification and cloning of odorant binding proteins from the scarab beetle *Phyllopertha diversa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263(3):832-837.

Wojtasek H. e Leal W. S. (1999) Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes. *J. Biol. Chem.* 274: 30950-30956.

Xu, Y.-L., He, P., Zhang, L., Dong, S.-L. e Li, F. (2008) Odorant-binding protein (OBP) sequences. Submetido para publicação.

Zhang, S., Zhang, Y. J., Su, H. H., Gao, X. W. e Guo, Y. Y. (2009) Identification and expression pattern of putative odorant-binding proteins and chemosensory proteins in

antennae of the *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Chem. Senses*. 34: 503-512.

Zhou,J.J., Vieira,F.G., He,X.L., Liu,R., Qiao,H., Pelosi,P., Rozas,J. e Field,L.M. (2008) Genome-wide and comparative analyses of Aphid odorant-bindingProteins. Submetido para publicação.

Zhou,J.J., Vieira,F.G., He,X.L., Smadja,C., Liu,R., Rozas,J. e Field,L.M. (2009) Comparative analyses of the odorant-binding proteins in *Acyrtosiphon pisum*. Submetido para publicação.