



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília

Estratégias para aumentar a eficiência de dsRNA no silenciamento gênico no
bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*

Autora: Rayssa Almeida Garcia

Orientadora: Maria Fatima Grossi-de-Sa

Co-orientadores: Leonardo Lima Pepino Macedo

François-Xavier Gillet

Brasília – DF

2019



Universidade de Brasília

Estratégias para aumentar a eficiência de dsRNA no silenciamento gênico no bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular

Orientadora: Maria Fatima Grossi-de-Sa

Brasília -DF
2019

Defesa da tese de autoria de Rayssa Almeida Garcia, intitulada " Estratégias para aumentar a eficiência de dsRNA no silenciamento gênico no bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*", apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em (09/01/2019), defendida pela banca examinadora abaixo assinada:

Profa. Dra. Maria Fátima Grossi-de-Sá
Orientadora

Dr. Francisco Aragão
Universidade de Brasília

Dr. Erich Tempel
Embrapa – Hortaliças

Dr. Rodrigo Fragoso
Embrapa – Cerrados

Dra. Isabela Tristan Lourenco-Tessutti
Embrapa – Cenargen

Dedico esta obra

A todas as mulheres na ciência, que atuam num campo majoritariamente masculino.

Às mulheres que lutam todos os dias copiosamente por igualdade de oportunidades.

Às mulheres que batalham para superar essa socialização cruel, limitadora e reducionista.

Às mulheres que conseguem amamentar, criar seus filhos e publicar artigos científicos.

Às mulheres ambiciosas.

Agradecimentos

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, por ser um centro de excelência que me ofereceu condições de realizar minha pesquisa.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa, que me recebeu no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I.

Ao meu co-orientador, Leonardo, que me ensinou que é errando que se aprende.

Aos inestimáveis amigos que fiz no trabalho: Hudson, Clídia, Ana Gabriela, Daniela, Danila e Thuanne.

Aos meus pais, Marijalma e Cleone, pelo amor e carinho incondicionais.

À minha irmã, Paulline, pelos desabafos.

Ao meu esposo, Guilherme, pelo companheirismo, e por ter emoldurado meu primeiro artigo científico.

Resumo

Nos últimos anos diferentes estudos relataram o uso da tecnologia do RNA interferente para o controle de insetos-praga, por meio da produção de plantas geneticamente modificadas. Apesar do impacto, esta estratégia possui algumas limitações para sua aplicação, incluindo a degradação de moléculas de dsRNA no meio ambiente, como no intestino do inseto, bem como sua baixa internalização pelas células do epitélio intestinal do inseto. A presença de nucleases intestinais foi reportada em diferentes insetos de importância na agricultura, incluindo *Schistocerca gregaria*, *Bombyx mori* e *Bemisia tabaci*. Estudos anteriores relataram que para o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), a administração oral de dsRNA, por meio de dieta artificial, não é muito eficiente, não se sabendo o motivo, mas especulando-se a presença de nucleases intestinais. No presente estudo foram identificadas três nucleases no transcrito do bicudo-do-algodoeiro, as quais foram validadas por análises *in silico* e silenciadas via RNAi por microinjeção, a fim de avaliar o motivo da baixa eficiência do dsRNA no silenciamento gênico, quando administrado via oral. Uma vez silenciadas as nucleases, a degradação do dsRNA pelo suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro foi reduzida, o que contribuiu para o aumento do silenciamento gênico do gene-alvo. Demonstrada a presença de nucleases no intestino do bicudo-do-algodoeiro, este estudo abordou duas alternativas envolvendo a proteção da molécula de dsRNA e sua melhor internalização pelas células intestinais do bicudo-do-algodoeiro. Na primeira alternativa foram utilizadas nanopartículas de quitosana e dsRNA a fim de protegê-lo da degradação de nucleases intestinais de *A. grandis*. A tecnologia de nanopartículas de quitosana vem sendo utilizada em estudos realizados com células animais na área farmacológica, bem como no controle de insetos-praga, como *Aedes aegypti*. Essa metodologia não só fez com que o dsRNA não fosse degradado pelas nucleases presentes no intestino do bicudo-do-algodoeiro, como contribuiu para significativa melhoria no silenciamento gênico do gene-alvo, quando comparado ao dsRNA livre. As nanopartículas de dsRNA também se mostraram altamente estáveis, quando aplicadas na superfície de plantas de algodão, demonstrando potencial de serem utilizadas à campo, na forma de pulverização. A outra alternativa utilizada foi a proteína PTD-DRBD, que possui um domínio que facilita a fagocitose (PTD) e um domínio de ligação específico a dsRNA (DRBD). Essa proteína de fusão foi anteriormente caracterizada e vem sendo utilizada para entrega de ácidos nucleicos como droga em estudos da área farmacêutica. Em resumo, essa metodologia se mostrou bastante eficaz na proteção do dsRNA contra degradação de nucleases intestinais do bicudo-do-algodoeiro, além de ter causado melhor silenciamento gênico do gene-alvo, quando comparado ao dsRNA livre. Além disso, o complexo PTD-DRBD mediou a internalização celular do dsRNA pelas células do intestino do inseto. Ao contrário das nanopartículas de quitosana, essa metodologia pode ser utilizada para a produção de plantas transgênicas.

O trabalho aqui apresentado contribuiu para os estudos envolvendo a eficiência do silenciamento gênico no bicudo-do-algodoeiro, inseto-praga de difícil controle via administração oral de RNAi. Os dados demonstram a presença de nucleases no intestino do inseto, que podem ser, em parte, responsáveis pela degradação do dsRNA ingerido. O estudo também apresenta duas alternativas para contornar a degradação do dsRNA no intestino do bicudo-do-

algodoeiro: (1) nanopartículas de quitosana e dsRNA, que podem ser utilizadas na forma de pulverização, e (2) ribonucleoproteínas PTD-DRBD:dsRNA, que podem ser utilizadas, via planta transgênica. Ambas alternativas demonstraram eficiência na proteção do dsRNA e são altamente promissoras para aplicações biotecnológicas contra o bicudo-do-algodoeiro e outros insetos-praga.

Palavras chave: RNAi, dsRNA, nuclease, nanopartícula, quitosana, PTD-DRBD

Abstract

In the last years, different studies reported the use of RNAi on the control of different crop insect pests through genetic modified plants. Despite the positive impact, this strategy has some limitations, including the dsRNA degradation in the environment, such as the insects gut, as well as its poor internalization by the insects gut cells. The presence of gut nucleases has been reported in different insects that are important for the economy, including *Schistocerca gregaria*, *Bombyx mori* and *Bemisia tabaci*. It was reported that the oral administration of dsRNA in artificial diet is not efficient for the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). The reason is not well established, but it can be the presence of gut nucleases. In this study three nucleases were identified in the cotton boll weevil transcriptome, which were validated by *in silico* analysis and by RNAi through microinjection. Once the nucleases were silenced, the dsRNA degradation by the insects gut juice decreased and the gene silencing of the target gene when the dsRNA was orally delivered increased. Therefore, it was demonstrated the reason of the RNAi poor efficiency when orally delivered to cotton boll weevil. Once it was demonstrated the presence of gut nucleases in the cotton boll weevil, this study presented two approaches to protect the dsRNA molecule of gut nuclease degradation. The first approach is chitosan nanoparticles which were used in order to protect the dsRNA from degradation. This technology is already being studied to deliver nucleic acids to animal cells in the pharmaceutical field, as well as to control insect pests, such as *Aedes aegypti*. This methodology hampered the dsRNA degradation by cotton boll weevil gut nucleases, which increased the gene silencing of the target gene when orally delivered. The chitosan:dsRNA nanoparticles showed to be very stable when applied on the surface of cotton leaves which demonstrates the capacity application on fields through pulverization. The other approach is the fusion protein PTD-DRBD. This protein has a cell penetrating peptide domain (PTD) and a dsRNA binding domain (DRBD) and was characterized and studied as a nucleic acid delivery method in the pharmaceutical field. This methodology also showed efficiency in protecting the dsRNA from cotton boll weevil gut nuclease degradation, consequently increasing the gene silencing of the target gene when orally delivered. Besides, PTD-DRBD was able to mediate the dsRNA cell internalization by cotton boll weevil gut epithelial cells. Unlike chitosan nanoparticles, this approach can be used in the production of transgenic plants.

This study is about the reason why the cotton boll weevil is a difficult insect to control via RNAi oral delivery. This difficulty is due to the presence of gut nucleases that are able to degrade the ingested dsRNA. This study also shows two alternatives to hamper the dsRNA degradation in the gut of the cotton boll weevil: chitosan:dsRNA nanoparticles, which can be pulverized, and PTD-DRBD:dsRNA ribonucleoproteins, which can be produced in transgenic plants. Both alternatives showed efficiency in dsRNA protection and are very promising to biotechnological applications against cotton boll weevil and other crop insect pests.

Key words: RNAi, dsRNA, nuclease, nanopartícula, chitosan, PTD-DRBD

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida do bicudo-do-algodoeiro.	17
Figura 2. Mecanismo do RNAi.	19
Figura 3. Análise in silico das nucleases identificadas em <i>A. grandis</i>.	31
Figura 4. Caracterização bioquímica do suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro.	32
Figura 5. Análise da expressão das nucleases do bicudo-do-algodoeiro em diferentes estágios do desenvolvimento por RT-qPCR.	34
Figura 6. Análise da expressão das nucleases do bicudo-do-algodoeiro após silenciamento gênico.	36
Figura 7. Análise da expressão gênica de <i>AgraChSII</i> após silenciamento das nucleases.	37
Figura 8. Nanopartícula de quitosana e dsRNA.	43
Figura 9. Nanopartícula de CS:dsRNA:surfactante por auto-montagem.	45
Figura 10. Administração da nanopartícula ao bicudo-do-algodoeiro.	46
Figura 11. Tamanho e carga das nanopartículas de CS:dsRNA.	49
Figura 12. Análise da degradação da nanopartícula CS:dsRNA na presença de homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro.	50
Figura 13. Análise da expressão gênica de quitina sintase II no bicudo-do-algodoeiro após administração de nanopartículas.	51
Figura 14. Análise da capacidade de dispersão da nanopartícula na superfície de folhas de algodão.	52
Figura 15. Internalização celular da nanopartícula de CS:dsRNA:surfactante.	53
Figura 16. Análise da degradação do dsRNA em complexo com diferentes proteínas recombinantes.	61
Figura 17. Degradação de dsRNA mediado por nucleases.	62
Figura 18. Intestino médio anterior do bicudo-do-algodoeiro e células em suspensão sf9 tratadas com PTD-eGFP.	63
Figura 19. Internalização do complexo PTD-DRBD:dsRNA pelas células do intestino do bicudo-do-algodoeiro.	64
Figura 20. Expressão relativa do gene <i>AgraChSII</i> do bicudo-do-algodoeiro adulto por RT-qPCR após a ingestão do complexo PTD-DRBD:dsRNA.	65
Figura 21. Modelo do mecanismo de entrega oral do dsRNA complexado ao PTD-DRBD ao bicudo-do-algodoeiro.	66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência de primers utilizados no Capítulo I	28
Tabela 2. Sequência de primers utilizados nos Capítulos II e III	49

Sumário

Introdução Geral	13
Revisão Bibliográfica	15
1. Algodão e bicudo-do-algodoeiro	15
2. RNA interferente.....	17
3. Estratégias para proteção e estabilização de moléculas de dsRNA.....	20
Capítulo I – Nucleases como barreira para o silenciamento gênico do bicudo-do-algodoeiro ...	22
1. Introdução	22
2. Objetivo Geral	23
3. Objetivos específicos	23
4. Metodologia	23
4.1. Criação do bicudo-do-algodoeiro	23
4.2. Identificação das nucleases e análise in silico	23
4.3. Extração de RNA e síntese de cDNA	24
4.4. Síntese de dsRNA.....	24
4.5. Coleta do suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro e ensaio de degradação	25
4.6. Microinjeção de dsRNA no bicudo-do-algodoeiro	26
4.7. Análise do padrão de expressão das nucleases por RT-qPCR	26
4.8. Coleta do suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro dois dias após a	
microinjeção de dsRNA das nucleases e digestão do dsRNA.	26
4.9. Análise do padrão de expressão de quitina sintase II após a	
administração de dsRNA via oral dois dias após a confirmação do	
silenciamento das nucleases, bem como mortalidade e oviposição	27
5. Resultados	27
5.1. A análise in silico das nucleases encontradas no transcrito do bicudo-	
do-algodoeiro mostrou um domínio endonuclease G conservado e secreção	
de peptídeo sinal.....	27
5.2. O suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro apresenta atividade nucleásica .	
30	
5.3. Agra-Nuc2 e Agra-Nuc3 são mais expressas no IP do bicudo-do-	
algodoeiro	32
5.4. O silenciamento das nucleases resultou na diminuição da degradação de	
dsRNA pelo suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro.....	33
5.5. O silenciamento gênico das nucleases melhora a eficiência do RNAi, via	
administração oral.....	34
6. Discussão e Conclusão	35
Capítulo II – Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para proteção de dsRNA contra	
bicudo-do-algodoeiro	39
1. Introdução	39
2. Objetivo geral	41
3. Objetivos específicos	41
4. Metodologia	41
4.1. Criação de bicudo-do-algodoeiro.....	41
Os insetos foram criados nos mesmos parâmetros do item 4.1. do Capítulo I. .	
41	
4.2. Coleta do homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro.....	41
4.3. Síntese das nanopartículas CS:dsRNA:surfactante.....	41
4.4. Análise de degradação do dsRNA encapsulado por quitosana com	
homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro	42
4.5. Análise do tamanho e da carga das nanopartículas CS:dsRNA por	
espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta (DLS).....	42
4.6. Bioensaios	43
4.7. Análise da expressão gênica de ChSII por RT-qPCR	43

4.8. Avaliação da capacidade de dispersão da nanopartícula CS:dsRNA na superfície de folhas de algodão	44
5.Resultados	44
5.1. Obtenção de nanopartículas e eficiência de ligação entre CS e dsRNA.	44
5.2. Capacidade de proteção do dsRNA pela CS na presença de homogenato intestinal de <i>A. grandis</i> in vitro	45
5.3. Efeito do silenciamento gênico mediado pela nanopartícula CS:dsRNA na expressão de Quitina sintase 2 do bicudo-do-algodoeiro	46
5.4. A nanopartícula é capaz de ser aplicada e permanecer na folha de algodão devido ao surfactante catiônico.....	47
6.Discussão e conclusão	48
7.Perspectivas.....	50
Capítulo III - Validação do complexo ribonucleoprotéico PTD-DRBD:dsRNA no bicudo-do-algodoeiro	51
1.Introdução	51
2.Objetivo geral.....	52
3.Objetivos específicos	52
4.Metodologia	52
4.1. Criação de bicudo-do-algodoeiro.....	52
4.2. Coleta do intestino médio do bicudo-do-algodoeiro, preparação das células em suspensão e coleta do homogenato intestinal	52
4.3. Clonagem molecular	53
4.4. Expressão e purificação das proteínas	53
4.5. EMSA (electrophoretic mobility shift assay)	54
4.6. Degradação do dsRNA por nucleases.....	54
4.7. Microscopia confocal.....	54
4.8. Administração do complexo PTD-DRBD:dsRNA-AgraChSII na dieta do bicudo-do-algodoeiro	54
4.9. Análise da expressão gênica de AgraChSII por RT-qPCR.....	55
O experimento foi realizado nos mesmos parâmetros de 4.6. do capítulo II.	55
5.Resultados	55
5.1. Formação do complexo PTD-DRBD:dsRNA	55
5.2. Estabilidade do complexo PTD-DRBD:dsRNA.....	56
5.3. Entrega intracelular realizada por PTD	58
5.4. Administração oral do complexo PTD-DRBD:dsRNA ao bicudo-do-algodoeiro	60
6.Discussão e Conclusão	61
7.Perspectivas.....	63
Referências.....	64

Introdução Geral

O bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), é um dos insetos-praga que mais causa dano às plantações de algodão, principalmente na América do Sul. As estratégias mais utilizadas para controlar este inseto na agricultura dependem de pesticidas químicos e, ainda assim, não são muito efetivas devido ao hábito endofítico do inseto em questão. O bicudo-do-algodoeiro ataca preferencialmente as partes reprodutivas da planta, como o botão floral, onde as fêmeas ovipositam e a larva se desenvolve (Oliveira et al, 2011; Magalhães et al, 2012; Azambuja e Degrande, 2014; Belot et al, 2015; Gabriel, 2016; Magalhães et al, 2016). Ainda, os pesticidas estão gradualmente perdendo efeito devido ao desenvolvimento de resistência dos insetos, além do alto dano poluente ao meio ambiente (Ramalho et al, 2003; Silva & Ramalho, 2013). Apesar de alguns estudos relatarem potenciais toxinas contra o bicudo-do-algodoeiro (Silva et al, 2015; Oliveira et al, 2016; Ribeiro et al, 2017), ainda não existe planta geneticamente modificada (GM) contra este inseto disponível no mercado (Neves et al, 2014; Ribeiro et al, 2017). Neste contexto, a tecnologia do RNA interferente (RNAi) surgiu como uma nova estratégia com potencial vantajoso de controlar o bicudo-do-algodoeiro.

O RNAi é um mecanismo que promove silenciamento gênico pós transcricional de maneira específica e efetiva, acionado pela administração de um RNA dupla fita (dsRNA) (Hammond, 2015; Ipsaro & Joshua-Tor, 2015; Joga et al, 2016) e vem sendo utilizado para o controle de insetos-praga (Agrawal et al, 2015; Zhang et al, 2015). Atualmente, existem dois transcritomas de bicudo-do-algodoeiro publicados e disponibilizados (Firmino et al, 2013; Salvador et al, 2014), e um terceiro sendo preparado (Moreira et al, dados não publicados), os quais proporcionam meios para validar genes essenciais deste inseto, via RNAi, a fim de utilizá-los para a seleção de moléculas alvo. Na última década, diferentes relatos mostraram avanços na eficiência do silenciamento gênico em coleópteros, por meio da administração oral de dsRNA, como descrito para *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) (Al-Ayedh et al, 2015), *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Fishilevich et al, 2016), *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Convolvulaceae) (Prentice et al, 2016) and *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) (Powell et al, 2016). No caso do bicudo-do-algodoeiro, estudos de silenciamento gênico vem sendo conduzidos por meio de microinjeção de dsRNA, aplicado na cavidade abdominal do inseto (Baum et al, 2007; Firmino et al, 2013; Coelho et al, 2016; Macedo et al, 2017), porém não demonstra boa eficiência no silenciamento gênico, quando administrado oralmente (Baum et al, 2007). Isso se deve, provavelmente, à pobre internalização celular do dsRNA (Bolognesi et al, 2012) e à presença de nucleases no insetino do inseto, que promovem uma rápida degradação desta molécula (Price & Gatehouse, 2008; Katoch & Thakur, 2012). A presença de atividade nucleásica foi relatada no trato digestivo de outros insetos, incluindo *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Arimatsu et al, 2007) e *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) (Wynant et al, 2014; Spit et al, 2017). Nucleases também foram identificadas na saliva de *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) (Calvo & Ribeiro, 2006), *Glossina morsitans* (Diptera: Muscidae) (Caljon et al, 2012) e *Nezaraviridula* (Hemiptera: Pentatomidae) (Lomate & Bonning, 2016).

O presente estudo mostra a presença e a caracterização de nucleases no intestino do bicudo-do-algodoeiro, as quais são capazes de degradar moléculas de dsRNA.. Ainda, o estudo apresenta duas estratégias que conferem ao dsRNA resistência contra a degradação de nucleases, presentes no intestino do bicudo-do-algodoeiro, além de contribuir para melhor internalização celular e silenciamento gênico. Uma das estratégias é baseada no uso de nanopartículas de quitosana, enquanto a outra é baseada no uso de peptídeos fusogênicos, ambas com potencial aplicação biotecnológica à campo.

Revisão Bibliográfica

1. Algodão e bicudo-do-algodoeiro

O algodão é a fibra natural mais consumida no mundo, sendo utilizada para a confecção de tecidos, o que o torna uma *commodity* importante para a economia mundial. O Brasil se mantém entre os cinco maiores produtores de algodão do mundo, juntamente com a China, a Índia, os Estados Unidos e o Paquistão (Xie et al, 2015; ABRAPA, 2018). As cultivares de algodão são adaptadas a ambientes tropicais e sua produtividade é severamente afetada por fatores bióticos e abióticos. Entre os fatores bióticos encontram-se os insetos-praga, que limitam a produtividade da fibra de algodão (Belot et al, 2015). O custo para o controle desses insetos-praga varia entre 2 e 3 bilhões de dólares por ano, o que equivale a aproximadamente 10% dos custos (Silva et al, 2015). Entre os insetos-praga que mais afetam a cultura do algodão estão incluídos o afídeo, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta da maçã, *Heliopsis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta do tomate, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e o bicudo-do-algodoeiro, *A. grandis* (Artico et al, 2014).

O bicudo-do-algodoeiro foi identificado no Brasil pela primeira vez em 1983, no estado de São Paulo (Martins et al, 2007). Este é um dos insetos-praga que mais causa danos à cotonicultura, podendo chegar a US\$ 250 por hectare (MAPA, 2018), devido, principalmente, ao seu hábito endofítico e a sua alta capacidade de sobrevivência, reprodução e dispersão. As fêmeas adultas ovipositam dentro dos botões florais e dos frutos da planta, onde, após a eclosão dos ovos, as larvas se alimentam do tecido da planta e também o utilizam como *habitat* para completar o ciclo de vida (Magalhães et al, 2012; Azambuja & Degrande, 2014; Belot et al, 2015; Magalhães et al, 2016). Esse hábito resulta no difícil controle do inseto, por meio do uso de pesticidas convencionais e, conseqüentemente, em danos severos à planta, como a abscisão dos botões florais e prejuízo na produção da fibra (Artico et al, 2014; Neves et al, 2014; Silva et al, 2015; Oliveira et al, 2016). O aumento da população de bicudo-do-algodoeiro depende de fatores abióticos, como temperatura e umidade (Lima Jr. et al, 2013), podendo haver mais de 1,5 milhão de insetos adultos em um hectare de plantação de algodão. Nessas condições de alta infestação, as técnicas de controle disponíveis são economicamente inviáveis, levando muitas, vezes à perda da plantação (Silva & Ramalho, 2013). Em condições ótimas, o bicudo-do-algodoeiro leva aproximadamente três semanas até atingir a fase adulta e cada fêmea pode depositar até 300 ovos nos botões florais e nos frutos, podendo ocorrer de sete a 10 gerações por ano (Salvador et al, 2014). Em condições normais, a larva eclode após três dias da oviposição e começa a se alimentar imediatamente. A larva se desenvolve e cresce e, em aproximadamente 12 dias, a larva de terceiro ínstar entra em fase de pupa e, assim, permanece por cinco dias. Insetos adultos podem viver de 20 a 40 dias, fazendo com que o ciclo de vida do bicudo-do-algodoeiro dure aproximadamente 50 dias (Grigolli, 2012) (Figura 1).

No Brasil, o controle do bicudo-do-algodoeiro depende do uso massivo de pesticidas sintéticos que custam milhões de dólares por ano. Esses químicos são tóxicos e acabam eliminando não só o inseto-praga, mas também parasitoides e insetos predadores que interagem com outras pragas. Além disso, os pesticidas sintéticos aceleram o desenvolvimento

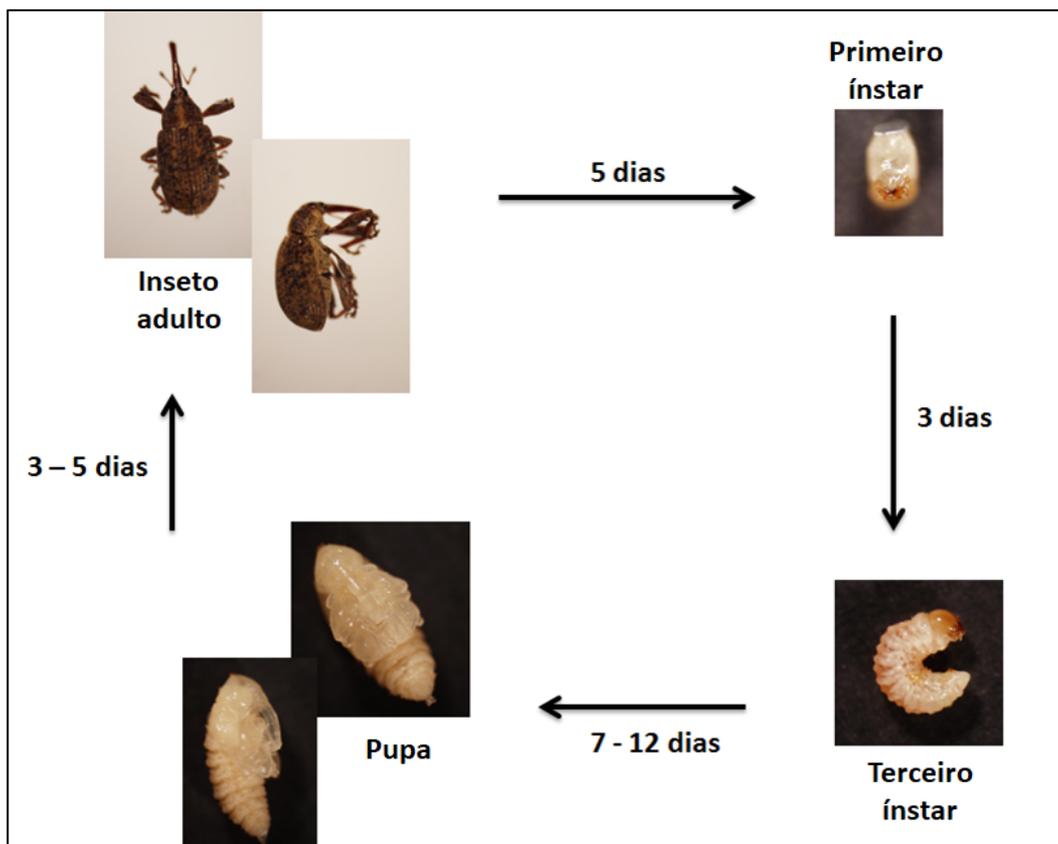


Figura 1. Ciclo de vida do bicudo-do-algodoeiro. O ciclo de vida do bicudo-do-algodoeiro dura aproximadamente 50 dias, passando pelas fases de ovo, larva (primeiro, segundo e terceiro ínstars), pupa e adulto (Grigoli, 2012).

de resistência entre outras pragas e afetam organismos não alvo por meio da contaminação do ar, solo e água (Ramalho et al, 2000). O uso de pesticidas gera altos custos e aumento da população de insetos resistentes, entre outras adversidades, como desbalanço ecológico, poluição ambiental e desperdício da fibra de algodão. Devido a essas complicações, ocorreu o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle do bicudo-do-algodoeiro (Silva & Ramalho, 2013).

Plantas GM que expressam toxinas Cry (plantas *Bt*) são uma poderosa ferramenta no manejo de insetos-praga e começaram a ser comercializadas em 1996. Desde então, a área cultivada de plantas GM expressando toxinas *Bt* aumentou mais de 60 vezes, com um total acima 2 bilhões de hectares (ISAAA, 2016; 2017). Essa tecnologia não demonstrou nenhum perigo à saúde humana e tem demonstrado propiciar diversos benefícios, incluindo a redução da população de insetos-praga, a redução do uso de pesticidas (sintéticos) e o aumento da produção e dos lucros (Dively et al, 2016; Deans et al, 2017).

Com o melhoramento da economia aliado aos benefícios ambientais associados ao uso de plantas *Bt*, houve o aumento do cultivo destas. Contudo, há indicação de que a predominância da toxina Cry nos campos vem criando uma forte pressão seletiva em cima dos insetos-praga. Assim sendo, espera-se que plantas GM expressando toxinas Cry resultem em elevada e contínua seleção de genes de resistência em uma determinada população de

insetos, diminuindo sua suscetibilidade à toxina. A evolução da resistência às plantas que expressam toxinas Cry afeta o controle de populações de insetos-praga que atacam as plantações, podendo resultar em sérios danos à agricultura (Campagne et al, 2016; Deans et al, 2016; Dively et al, 2016; Dovrat & Aharoni, 2016). Dentre os insetos-praga relatado de tem desenvolvidos resistência às toxinas Cry, encontram-se populações da lagarta da raiz do milho, *D. virgifera* (Gassmann et al, 2011; Gassmann, 2016; Jakka et al, 2016); da lagarta do cartucho, *S. frugiperda* (Huang et al, 2014; Omoto et al, 2015; Santos-Amaya et al, 2015; Horikoshi et al, 2016; Yang et al, 2016); da lagarta da espiga do milho, *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) (Dively et al, 2016); da lagarta do tomate, *H. armigera* (Liang et al, 2008; Zhang et al, 2011; Tabashnik et al, 2012; Jin et al, 2013); da lagarta rosada, *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Mohan et al, 2015); dentre outros.

Apesar de surgirem novas toxinas Cry com capacidade de produzir efeitos tóxicos em insetos resistentes e no bicudo-do-algodoeiro (Grossi-de-Sá et al, 2007; Oliveira et al, 2011; Silva et al, 2015; Oliveira et al, 2016; Ribeiro et al, 2017), faz-se necessário o uso de alternativas que mitiguem o aparecimento dessa resistência. Uma das opções para atrasar a evolução da resistência às toxinas Cry é aplicar a estratégia de refúgio, que consiste em plantar cultivares que não expressem a toxina Cry entre as plantações ou ao seu redor, criando um ambiente favorável à sobrevivência de alguns insetos suscetíveis em um ambiente em que plantas *Bt* são predominantes. Desta maneira, insetos suscetíveis são gerados pelo acasalamento de insetos resistentes que sobrevivem em áreas plantadas com *Bt* com insetos não resistentes, fazendo com que a resistência seja funcionalmente recessiva. Outra estratégia é usar a piramidação de genes, que constitui em usar plantas GM que expressem duas ou mais toxinas *Bt* com alta atividade inseticida contra os mesmos insetos-praga alvo (Campagne et al, 2016; Horikoshi et al, 2016). Ainda, outra possibilidade ao aparecimento da resistência às toxinas *Bt* é o emprego de novas abordagens biotecnológicas, como a tecnologia do RNA interferente, que vem sendo considerada como estratégia promissora no controle de insetos-praga (Baum et al, 2007; Mao et al, 2007; Mao et al, 2011).

2. RNA interferente

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) foi primeiramente descrito por Fire & Mello, em 1998. De acordo com estes autores, moléculas de dsRNAs promovem o silenciamento gênico de seus genes homólogos, impedindo a tradução de RNAs mensageiros (mRNAs). Sabe-se que o RNAi é um processo biológico conservado evolutivamente, estando associado ao desenvolvimento e reorganização celular, regulação de transposons, reparo da cromatina, metilação do DNA e defesa contra dsRNAs exógenos provenientes de vírus (Lam et al, 2015; Hameed et al, 2017).

Pequenos RNAs de interferência (siRNAs- *small interferingRNAs*) são RNAs dupla fita exógenos com cerca de 21 a 24 nucleotídeos e dois nucleotídeos sobressalentes na região 3', tendo como alvo mRNAs complementares. O dsRNA é clivado em siRNAs pela Dicer e o siRNA é incorporado pelo complexo RISC (Complexo Indutor de Silenciamento de RNA-*RNAInducing Silencing Complex*), em que a fita passageira é degradada. Para que o silenciamento gênico

seja efetivo, o pareamento de bases entre o mRNA e a fita guia do siRNA deve ser perfeito, resultando na clivagem do mRNA pela proteína Argonauta do complexo RISC. Os fragmentos gerados são, então, clivados por outras exonucleases (Figura 2). O complexo RISC pode sofrer vários ciclos de clivagem do mRNA para gerar uma resposta de silenciamento gênico mais robusta. Esse processo funciona como um mecanismo de defesa contra vírus em diversos organismos, como nematoides, insetos e plantas (Zamore et al, 2000; Elbashir et al, 2001; Matranga et al, 2005; Valencia-Sanchez et al, 2006; Kim & Rossi, 2007; Davidson & McCray, 2011; Lam et al, 2015; Scherman et al, 2017).

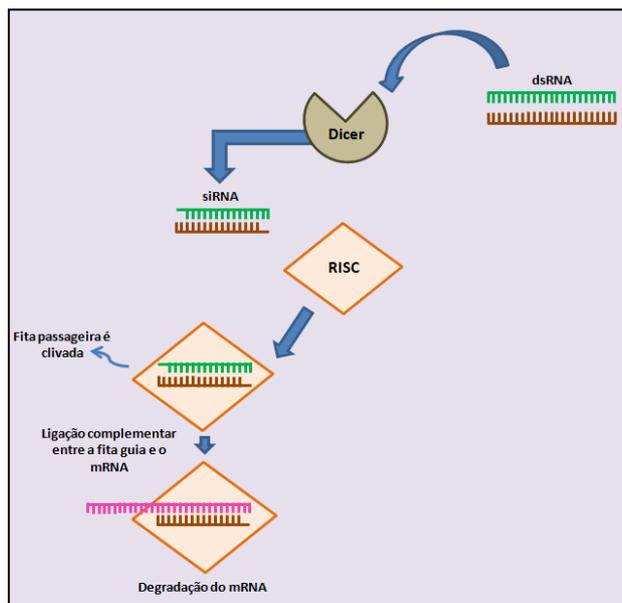


Figura 2. Mecanismo do RNAi. O dsRNA é um material genético exógeno e é introduzido no citoplasma da célula, onde é clivado em siRNAs com nucleotídeos sobressalentes na região 3' pela Dicer. O siRNA é incorporado pelo complexo RISC, onde a fita passageira é clivada. A fita guia norteia o complexo RISC até o mRNA complementar onde ocorre pareamento perfeito e o mRNA é degradado. Caso o pareamento perfeito não ocorra, ocorre a interrupção da tradução do mRNA.

Atualmente, o RNAi é utilizado para estudos de validação de genes (Firmino et al, 2013; Coelho et al, 2016; Macedo et al, 2017), controle de pragas por meio de plantas transgênicas (Baum et al, 2007; Zhang et al, 2015a; Hameed et al, 2017; Majumdar et al, 2017) e terapia gênica (Matsui & Corey, 2016; Schott et al, 2016; van Woensel et al, 2016; Scherman et al, 2017), entre outras.

A disponibilidade de bancos de dados de genomas e transcritomas de insetos permitiram a prospecção para a validação e identificação de genes que possuem potencial uso biotecnológico (Firmino et al, 2013; Salvador et al, 2014; Perera et al, 2015; Macedo et al, 2017). Atualmente, existem mais de 100 transcritomas de insetos disponíveis em bancos de dados, disponibilizados no InsectBase (Yin et al, 2016), o que permite o acesso à sequência de importantes genes essenciais do desenvolvimento do inseto alvo (Pauchet et al, 2009; Pauchet et al, 2010; Fonseca et al, 2015; Nakayama et al, 2017). Com essa perspectiva, o RNAi surgiu como uma poderosa ferramenta biotecnológica para o controle de insetos-praga. O

silenciamento de genes por RNAi em insetos pode causar mortalidade, inibição do crescimento e má formação da prole. Assim sendo, plantas GM que produzam dsRNA podem reduzir a população de insetos nas plantações (Baum et al, 2007; Mao et al, 2007; Mao et al, 2011; Zhang et al, 2015a). Entretanto, o sucesso do RNAi no controle de insetos-praga depende de alguns fatores, que incluem: seleção do gene-alvo, tamanho e concentração do dsRNA (Bolognesi et al, 2012), absorção do dsRNA pelas células do intestino do inseto (Swevers et al, 2011; Bolognesi et al, 2012), pH do intestino do inseto e nucleases intestinais, entre outros (Price & Gatehouse, 2008; Katoch & Thakur, 2012; Katoch & Thakur, 2013; Katoch et al, 2013).

Apesar da administração oral de dsRNA ser muito eficiente em alguns insetos, em outros esta não é efetiva devido à ação de nucleases (Christiaens et al, 2014). Estudos anteriores mostraram que a microinjeção de dsRNA na cavidade abdominal do bicudo-do-algodoeiro é capaz de causar silenciamento gênico nos insetos, além de mudanças fenotípicas no adulto e na prole, mortalidade e redução na oviposição, dependendo do gene estudado (Firmino et al, 2013; Coelho et al, 2016; Macedo et al, 2017). A atividade nucleásica já foi relatada no intestino de alguns insetos, como bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Arimatsu et al, 2007), gafanhoto-do-deserto, *S. gregaria* (Wynant et al, 2014) e mosca branca, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Vyas et al, 2017). Além do intestino, nucleases também foram identificadas na saliva do pernilongo *Culex pipiens* (Calvo & Ribeiro, 2006), da mosca tse-tse, *G. morsitans* (Caljon et al, 2011) e do percevejo-da-soja, *N. viridula* (Lomate & Bonning, 2016).

Além de ser administrado na dieta, o dsRNA também pode ser utilizado de forma eficiente, de maneira tópica, sendo capaz de causar o silenciamento gênico (Jensen et al, 2010; Wu et al, 2015; Wang & Jin, 2017). Pridgeon et al (2008) demonstraram que a aplicação tópica de dsRNA em fêmeas de mosquito da dengue, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), é capaz de causar alta mortalidade nos insetos. El-Shesheny et al (2013) e Killiny et al (2014) mostraram que a aplicação de dsRNA no tórax de psilídeo asiático do citrus, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), tanto em larvas quanto em adultos, permite a internalização do dsRNA pelo exoesqueleto do inseto pelas membranas intersegmentais. Mesmo em baixas doses de dsRNA, houve o silenciamento gênico do gene-alvo. Um estudo semelhante foi realizado por Wang et al (2011), em que o dsRNA foi aplicado diretamente no tegumento de *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae), a broca do milho asiática, levando ao retardo do crescimento e/ou morte. à campo para o controle de insetos-praga, é necessário que a molécula de dsRNA não seja degradada no intestino do inseto, nem no meio ambiente, além de ser capaz de ser absorvida pelas células do inseto e passar esse sinal para as células vizinhas, de forma sistêmica. Entre as alternativas que podem ser aplicadas nesse contexto incluem o uso de nanopartículas de quitosana (Zhang et al, 2010) e de peptídeos com domínio de ligação a dsRNA (DRBD - *dsRNA binding domain*) (Eguchi et al, 2009) para que este não seja degradado.

3. Estratégias para proteção e estabilização de moléculas de dsRNA

Durante os últimos anos, muitos estudos estão sendo voltados à tecnologia RNAi e sua aplicação biotecnológica no controle de insetos-praga. Apesar do potencial de controle, essa tecnologia também possui diversas barreiras e desafios, incluindo a internalização do dsRNA pela membrana celular (Bolognesi et al 2012) e a presença de nucleases, o que, em alguns casos, diminui a eficiência e a ocorrência de silenciamento gênico (Christiaens et al, 2014). Consequentemente, moléculas de dsRNAs desprotegidas são rapidamente degradadas no meio ambiente e no corpo do inseto (Dowdy, 2017). Moléculas de dsRNA não são capazes de atravessar a membrana celular, uma vez que são hidrofílicas e possuem carga negativa. A carga aniônica dos fosfatos do dsRNA faz com que este seja impossível de interagir com a carga negativa dos fosfolipídeos da membrana celular. Na ausência de um carreador, o dsRNA é bloqueado. Sendo assim, fez-se necessário o desenvolvimento de métodos de entrega do dsRNA mais eficientes (Aliabadi et al, 2012; Tatiparti et al, 2017). O uso de vetores virais foi inicialmente cogitado, mas logo descartado, devido a problemas imunogênicos e mutações, o que poderia comprometer a biosegurança da tecnologia (Babu et al, 2016). O uso de nanopartículas para proteção do dsRNA é descrita como uma alternativa a vetores virais, uma vez que, além de proteger o dsRNA contra a degradação de nucleases, também facilita a internalização do dsRNA pelas células por endocitose (Zhang et al, 2010; Arnold et al, 2017; Behzadi et al, 2017; Tatiparti et al, 2017). Existem diferentes tipos de nanopartículas capazes de transportar e proteger o dsRNA. Dentre as nanopartículas poliméricas, estão incluídas a quitosana, polietilenimina, ciclodextrina, dendrímeros, dentre outras. Nanopartículas inorgânicas incluem ouro, fosfato de cálcio, sílica e ferro. Adicionalmente, existem as nanopartículas orgânicas, que abrangem lipídeos, lipossomos e peptídeos. Essas moléculas apresentam alta biocompatibilidade e respostas não imunogênicas, indicando que são ótimos veículos para proteção de dsRNA (Liao et al, 2016; Acharya et al, 2017). As características das nanopartículas são extremamente importantes para sua aplicabilidade, como a forma, tamanho, carga e estabilidade, dependendo da temperatura e do pH. Esses fatores atuam na internalização da nanopartícula pelas células e no seu tempo de circulação, consequentemente, influenciando em sua eficiência (Young et al, 2016; Gupta & Rai, 2017; Tatiparti et al, 2017). Levando esses fatos em consideração, nanopartículas catiônicas são frequentemente usadas para facilitar a penetração do dsRNA na célula, uma vez que estas interagem com os proteoglicanos da membrana celular, que possuem carga negativa, facilitando a endocitose (Arnold et al, 2017; Behzadi et al, 2017).

Sistemas não virais capazes de transportar dsRNA, como as nanopartículas, possuem diversas vantagens, incluindo eficiência de transfecção, especificidade do alvo, biodegradabilidade e baixa citotoxicidade (Tseng et al, 2009; Xiao et al, 2013; Xiao et al, 2017). Dessa forma, é válido e promissor avaliar o uso de nanopartículas complexadas a moléculas alvo aplicadas ao controle de insetos-praga.

Peptídeos penetradores de célula (CPPs - *Cell Penetrating Peptides*) são moléculas catiônicas e/ou anfipáticas que possuem a habilidade de atravessar a membrana celular e entregar macromoléculas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Sabe-se que CPPs, quando associados

a moléculas, são internalizados pelas células por mecanismos dependentes de energia, envolvendo diferentes tipos de endocitose. Assim sendo, esses peptídeos possuem alta aplicação biotecnológica (Nakase et al, 2004; Lehto et al, 2016) e podem ser utilizados no controle de insetos-praga.

Capítulo I – Nucleases como barreira para o silenciamento gênico do bicudo-do-algodoeiro

1. Introdução

Para que a tecnologia do RNAi seja promissora para o controle de insetos-praga, é necessário que o inseto se alimente regularmente do dsRNA, seja pela planta transgênica que produz dsRNA continuamente, seja por meio de pulverização (Wynant et al, 2014). Assim sendo, uma vez que o inseto se alimenta de dsRNA, este logo entrará em contato com o ambiente do intestino do inseto (Price & Gatehouse, 2008).

O intestino é o maior órgão do corpo do inseto (Price & Gatehouse, 2008) e é segmentado em três partes: intestino médio anterior (IMA), intestino médio (IM) e intestino médio posterior (IMP). O IMA está envolvido na ingestão, moagem e transporte de alimentos para a próxima porção do intestino. O IM produz e secreta enzimas e absorve os produtos provenientes da digestão. O IMP é a porção responsável pela absorção de água, sais e outras moléculas (Gullan & Craston, 2014; Price & Gatehouse, 2008; Burand & Hunter, 2013). O intestino dos insetos também possui uma matriz de quitina chamada de membrana peritrófica (MP), que é responsável pela proteção mecânica do intestino do inseto. Além disso, a MP também é responsável pela compartimentalização de enzimas digestivas bem como dos produtos de digestão, neutralização de toxinas ingeridas e prevenção de infecção por microrganismos (Agrawal et al, 2013). Dentre as enzimas encontradas no intestino dos insetos estão as nucleases, as quais são um empecilho para estudos e aplicação da tecnologia do RNAi para o controle de insetos-praga (Katoch & Thakur, 2012).

A atividade nucleásica foi detectada em diferentes insetos em estudos anteriores, como, por exemplo, na saliva de *C. pipiens* (Calvo & Ribeiro, 2006), *G. morsitans* (Caljon et al, 2012) e *N. viridula* (Lomate & Bonning, 2016). Nucleases também foram identificadas no suco gástrico de *B. mori* (Arimatsu et al, 2007) e de *S. gregaria* (Wynant et al, 2014). Todas essas nucleases citadas pertencem a uma família de endonucleases não específica, capaz de degradar tanto dsRNA quanto dsDNA, e conservadas em procariontos e eucariotos (Friedhoff et al, 1996; Rangarajan & Shankar, 2001; Yang, 2011). Essas classes de nucleases evoluíram em ordens filogenéticas distantes, sugerindo a conservação de tais enzimas na taxonomia de insetos (Wynant et al, 2014). Entretanto, a identificação e a caracterização de tais nucleases no intestino de insetos ainda é pouco estudada.

A fim de elucidar o motivo de a entrega oral de dsRNA não ser eficiente contra o bicudo-do-algodoeiro, a presença de nucleases em seu intestino foi avaliada neste capítulo. Análises transcritômicas e abordagens *in silico* permitiram a identificação de sequências que codificam nucleases extracelulares não específicas. Abordagens moleculares e bioquímicas indicaram o potencial envolvimento de tais nucleases na degradação de dsRNA no intestino do bicudo-do-algodoeiro. Os resultados apresentados mostram que nucleases presentes no intestino do bicudo-do-algodoeiro podem ser uma grande barreira para o uso da tecnologia do RNAi no controle deste inseto-praga.

2. Objetivo Geral

Avaliar a atividade de nucleases presentes no intestino do bicudo-do-algodoeiro e silenciá-las por meio da tecnologia de RNAi.

3. Objetivos específicos

- Avaliar a presença de atividade nucleásica presente no suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro;
- Avaliar o pH ótimo de atividade nucleásica presente no suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro;
- Identificar sequências de nucleases no transcrito do bicudo-do-algodoeiro;
- Analisar o padrão de expressão de nucleases intestinais do bicudo-do-algodoeiro;
- Avaliar o potencial de silenciamento do dsRNA contra as nucleases no bicudo-do-algodoeiro;
- Avaliar o efeito do silenciamento das nucleases do bicudo-do-algodoeiro.

4. Metodologia

4.1. Criação do bicudo-do-algodoeiro

Os insetos foram criados na colônia do Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos, da Embrapa Cenargen (Brasília, Brasil), permanecendo em condições constantes de temperatura ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas. Os insetos foram alimentados diariamente com dieta artificial descrita por Monnerat et al (2002).

4.2. Identificação das nucleases e análise *in silico*

A dsRNase extracelular encontrada em *B. mori* (NM_001098274.1) foi utilizada para identificação de proteínas ortólogas no transcrito de *A. grandis* (Firmino et al, 2013) utilizando a ferramenta tBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A busca por ORF (*Open Reading Frame* – sequência de leitura aberta) foi realizada utilizando o ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). O alinhamento das sequências peptídicas e nucleotídicas foi realizado com o BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) utilizando o algoritmo ClustalW 250 (PAM250) (Thompson et al, 1994). A predição de estruturas secundárias foi realizada pelo GeneSilico protein structure Metaserver, o qual proporciona a principal estrutura secundária predita por 16 diferentes algoritmos (Kurowski & Bujnicki, 2003). O peptídeo sinal foi predito utilizando o servidor TargetP (Emanuelsson et al, 2007). Os motivos foram preditos utilizando GLAM2 (Frith et al, 2008) com sequências de 46 aminoácidos. A análise filogenética das sequências de aminoácido do domínio catalítico das nucleases foi obtido utilizando o servidor phylogeny.fr (Dereeper et al, 2008; Dereeper et al, 2010). Os dados gerados foram exportados ao software interativo Tree Of Life (iTOL) para formatar a árvore filogenética (Letunic & Bork, 2011).

4.3. Extração de RNA e síntese de cDNA

Os tecidos de interesse do bicudo-do-algodoeiro (IMA, IM, IP, intestino inteiro e carcaça) foram dissecados em solução de cloreto de sódio (NaCl) 150 mM em microscópio e transferidos a nitrogênio líquido. A extração de RNA de insetos adultos e de larvas foi realizada com Trizol (Invitrogen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Iguais quantidades de RNA (2µg) foram utilizadas para a síntese de cDNA com a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante e 10 mM do primer nvDT30 (Tabela 1). O cDNA foi mantido a -20 °C até que fosse utilizado.

4.4. Síntese de dsRNA

Primers para *AgraNuc1*, *AgraNuc2*, *AgraNuc3*, *AgraChSII* e *gus* foram desenhados e sintetizados (Tabela 1). Foi feita uma PCR utilizando os primers específicos e cDNA sintetizado a partir da extração de RNA de *A. grandis*. Os parâmetros da reação foram: 1 µL de cDNA diluído (1:20), 2 µL de tampão 10X, 0,8 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,4 µL de dNTP (10 mM), 0,4 µL de cada *primer* (10 mM), 0,2 µL (1U) de Taq (Invitrogen) e 14,6 µL de água. O programa para o termociclador consistiu em um passo inicial de 94°C por 2 minutos seguidos por 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos; um terceiro ciclo de 72°C por 5 minutos e, finalmente, 4°C por tempo infinito.

Foi feita PCR com o DNA plasmidial extraído, utilizando os *primers* T7 e T7M13 Rv, como descrito acima. O produto da PCR foi purificado pelo kit QIAquick PCR purification (250), segundo o protocolo do fabricante. O produto da purificação foi utilizado para a síntese de dsRNA e posterior purificação pelo kit Mega Script T7 Ambion INC. A reação de transcrição foi realizada com 1 µg de produto de PCR como molde para um volume de reação de 20 µL. A reação foi incubada por 16 horas a 37°C, seguido por tratamento com DNase I por 15 minutos. Para anelamento do RNA dupla fita, os produtos da reação foram incubados a 70°C por 5 minutos. Para purificação dos produtos de transcrição, seguiu-se extração com fenol/clorofórmio e precipitação com álcool isopropílico. O dsRNA foi dissolvido em tampão TrisHCl, a quantificação foi obtida por espectrofotometria e a integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

As seqüências alvo foram confirmadas por sequenciamento. A clonagem dos genes *AgraNuc1*, *AgraNuc2* e *AgraNuc3* foi feita no vetor pCR 2.1 e células competentes de *Escherichia coli* foram transformadas por eletroporação e crescidas em meio LB sólido com ampicilina (100 mg/mL), IPTG e X-GAL. Colônias positivas foram inoculadas em meio LB líquido com ampicilina e foi feita a extração de DNA plasmidial.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados no Capítulo I

Primer	Sequência (5' → 3')
<i>AgraNuc1</i> Fw	ATGTGACCACCGTAACCTGC

<i>AgraNuc1 Rv</i>	GTCTGTAGGAGGATTTGGAC
<i>AgraNuc2 Fw</i>	GACAATACGCTGCCAGAACTG
<i>AgraNuc2 Rv</i>	TCTATCGAAGGTGAGCCAGG
<i>AgraNuc3 Fw</i>	TTCTGAACGCGCTGCCTCAATG
<i>AgrNuc3 Rv</i>	GATCTGATTGGCTGTCTTG
<i>AgraChSII Fw</i>	AAGGCATTAACGGTGACGAC
<i>AgraChSII Rv</i>	TCCAAGTCGTTGATGACTGC
nvDT30	GAATTCACGCGTCTGACTAGTAGCATATGTAC(T)30VN
T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGA
T7M13 Rv	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGGAAACAGCTATGAC
<i>Agra-β-actin Fw</i>	GTAGCTCACGCCTCGGTACT
<i>Agra-β-actin Rv</i>	AGTGTTGGCCGAGGTATGAC
<i>Agra-β-tubulin Fw</i>	AGATCGTTCGAGGGTCTGATG
<i>Agra-β-tubulin Rv</i>	AAGGCGGGAATGACTTTACC

4.5. Coleta do suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro e ensaio de degradação

Os insetos foram anestesiados previamente em gelo por 10 minutos e dissecados para coletar o intestino e o suco gástrico do IMA do bicudo-do-algodoeiro foi coletado. O conteúdo do intestino foi extraído por maceração e resuspenso em solução de NaCl 150 mM. A concentração total de proteína foi quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O ensaio de degradação da nucleasse foi realizado incubando 500 ng de dsRNA ou dsDNA com o suco gástrico coletado (1 μ g) em Tampão Triplo, como descrito por Schafer et al (2004), com algumas modificações (acetato de sódio 10 mM, Mes 10 mM e Tris 20mM), pH 5.5 a 37°C por 30 minutos em uma reação final de 20 μ L. A fim de observar a integridade do dsRNA, a reação foi analisada em gel de agarose 1%. O pH ótimo para a atividade nucleásica do suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro foi determinado incubando 1 μ g de dsRNA (~ 200 pb) com 2 μ g de suco gástrico em Tampão Triplo (o pH foi ajustado com HCl ou NaOH, de 3,0 a 9,0). A reação foi incubada por 30 minutos em um volume final de 70 μ L a 37°C. Em seguida, o dsRNA foi

purificado com igual volume de fenol clorofórmio e clorofórmio e centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o dsRNA foi precipitado com igual volume de isopropanol e centrifugado por 10 minutos. O pellet foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi diluído em água milliQ. A absorbância foi plotada em gráfico e os produtos foram analisados em gel de agarose 1%. Uma unidade de atividade (UA) nucleásica é definida como a quantidade de enzima que causa a ΔA_{260} de 0,1 em 30 minutos (GE Healthcare). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando 3.3 μ g de proteína obtida do suco gástrico.

4.6. Microinjeção de dsRNA no bicudo-do-algodoeiro

Adultos recém eclodidos de bicudo-do-algodoeiro foram previamente anestesiados em gelo durante 10 minutos. Em seguida, 500 ng de dsRNA contra cada nucleasse foi administrado utilizando uma seringa Hamilton de 10 μ L na cavidade abdominal do inseto. O dsRNA foi administrado separadamente e em mistura. Os insetos utilizados como controle negativo foram microinjetados com dsRNA-*gus*. Após o procedimento, os insetos foram mantidos sob condições controladas de temperatura, umidade relativa e luz por um período de sete dias.

4.7. Análise do padrão de expressão das nucleases por RT-qPCR

A expressão gênica relativa das nucleases em larvas de bicudo-do-algodoeiro e adulto foi validada por PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR) e a expressão relativa foi medida em diferentes porções do intestino do inseto (IMA, IM e IMP), bem como o intestino inteiro e a carcaça. Após dois e sete dias da microinjeção os insetos foram coletados para a análise do silenciamento gênico das nucleases. As reações de RT-qPCR foram realizadas em 7300 Real Time PCR (Applied Biosystems) utilizando SYBR Green como fluoróforo intercalante. Primers específicos para cada nucleasse (Tabela 1) foram utilizados. Cada reação foi realizada utilizando 2 μ L de cDNA diluído, 0,2 μ M de cada primer e 2.5 μ L de SYBR Green em um volume total de 10 μ L.

O programa de RT-qPCR consistiu de um passo inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Para a análise da amplificação o valor da Ct e a eficiência da amplificação de cada primer (variando de 90 a 100%) foi determinada utilizando o programa Real Time PCR Miner (<http://www.miner.ewindup.info/>). A análise da expressão relativa baseada nos valores de Ct foi realizada utilizando qBasePlus 2.0 com o método Pfaffl (Hellemans et al, 2007). Todos os experimentos de RT-qPCR foram realizados em triplicata biológica e técnica. A análise estatística da expressão média das nucleases foi realizada pelo método Tukey com um nível de significância de 0,05% para comparações entre tratamentos. *Agra- β -actin* e *Agra- β -tubulin* foram utilizados como genes de referência.

4.8. Coleta do suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro dois dias após a microinjeção de dsRNA das nucleases e digestão do dsRNA.

Dois dias após a microinjeção do dsRNA, o suco gástrico dos insetos tratados foi coletado e incubado com dsRNA, como descrito anteriormente. Todos os tratamentos foram incubados por 30 minutos a 37°C com o suco gástrico coletado de 10 insetos por tratamento.

4.9. Análise do padrão de expressão de *quitina sintase II* após a administração de dsRNA via oral dois dias após a confirmação do silenciamento das nucleases, bem como mortalidade e oviposição

Dois dias após a microinjeção do dsRNA contra as nucleases na cavidade abdominal do bicudo-do-algodoeiro e verificação do silenciamento gênico destas por RT-qPCR, os insetos foram mantidos sem alimentação durante dois dias. Após esse período de jejum, foi administrado 500 ng de dsRNA contra o gene *quitina sintase II (Agra-ChSII)* via oral com sacarose 5%. Três dias após a administração oral de dsRNA, os insetos foram coletados para avaliar o nível do silenciamento gênico de *Agra-ChSII* por RT-qPCR. Todos os experimentos de RT-qPCR foram realizados em triplicata biológica e técnica. Os insetos foram contados a cada 24 horas para medir mortalidade, bem como os ovos para medir oviposição.

5. Resultados

5.1. A análise *in silico* das nucleases encontradas no transcrito do bicudo-do-algodoeiro mostrou um domínio endonuclease G conservado e secreção de peptídeo sinal

A análise tBLASTn utilizando uma sequência de nuclease de *B. mori* (NM_001098274.1) como molde mostrou três genes ortólogos no bicudo-do-algodoeiro, os quais foram nomeados *AgraNuc1* (GABY01017164.1), *AgraNuc2* (GABY01017702.1) e *AgraNuc3* (GABY01006596.1). O peso molecular das proteínas codificadas foi de aproximadamente 45-50 kDa. A conservação dos aminoácidos foi particularmente relevante no domínio catalítico das proteínas pertencentes à família de nuclease não específica (Rangarajan et al, 2001). De fato, o motivo Hx22Nx4Qx5Nx8E, onde “x” representa qualquer aminoácido, é característico a essa família de nucleases e especifica os resíduos diretamente envolvidos em ligação a metais e catálise (Loll et al, 2009; Rangarajan et al, 2001; Schaffer et al, 2004; Wu et al, 2009) (Figura 3A). Ainda, a predição dos motivos mostrou que as três nucleases possuem alta probabilidade de carregarem um peptídeo sinal secretório (SP) (cutoff >90) (Figura 3A). A predição de estruturas secundárias mostrou similaridades entre essas nucleases e a endonuclease não específica G (endoG) de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Figura 3B) (Loll et al, 2009). Ainda, a predição do peptídeo sinal indicou que *AgraNuc1-3* possuem alta probabilidade de conter peptídeo sinal de secreção (SP) (cutoff >0.7).

A família de endonuclease não específica possui três diferentes grupos com nucleases especializadas em diferentes funções fisiológicas, como morte celular e nutrição (Wynant et al, 2014; Loll et al, 2009). A fim de estudar as relações filogenéticas entre *AgraNuc1-3* e as nucleases da família de endonuclease não específica, foi realizado um alinhamento múltiplo utilizando sequências de aminoácidos do domínio catalítico (aproximadamente 50 aminoácidos) de 44 nucleases de diferentes espécies (Figura 3C). As nucleases foram divididas em dois grupos principais (I e II) com valores de bootstrap de 50%. A presença de

parálogos em diferentes espécies, como *Dendroctonus ponderosae* ou *D. melanogaster*, sugere a ocorrência de eventos duplicados na história evolucionária dessa família de genes. O Grupo I inclui ortólogos das proteínas EndoG e ExoG que foram caracterizadas em *D. melanogaster* (Loll et al, 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (Buttner et al, 2007), *Caenorhabditis elegans* (Lin et al, 2016) e *Homo sapiens* (Cymerman et al, 2008). Essas enzimas participam de mecanismos relacionados à morte celular (Loll et al, 2009). O Grupo II possui *AgraNuc1-3*, bem como nucleases de outros insetos que foram caracterizadas por seu papel nutricional em *S. gregária* (Wynant et al, 2014) e *B. mori* (Arimatsu et al, 2007). Assim como *AgraNuc1-3*, esses dois estudos anteriores também identificaram um peptídeo de secreção na porção N terminal da proteína. Esses dados ressaltam o fato de que as nucleases *AgraNuc1-3* pertencem ao grupo de nucleases não específicas que, muito provavelmente, podem ter atividade nucleásica em ambiente extracelular.

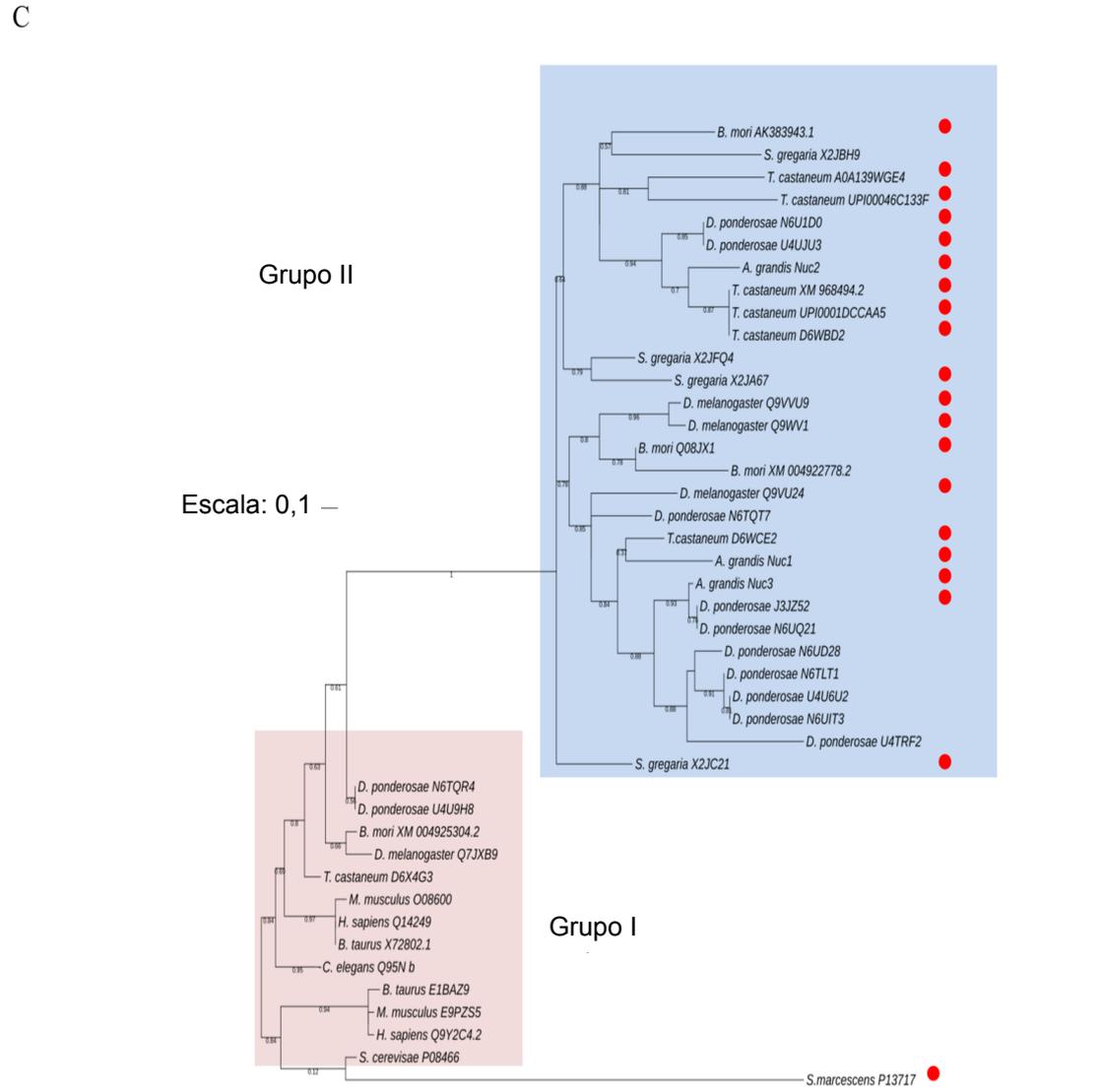
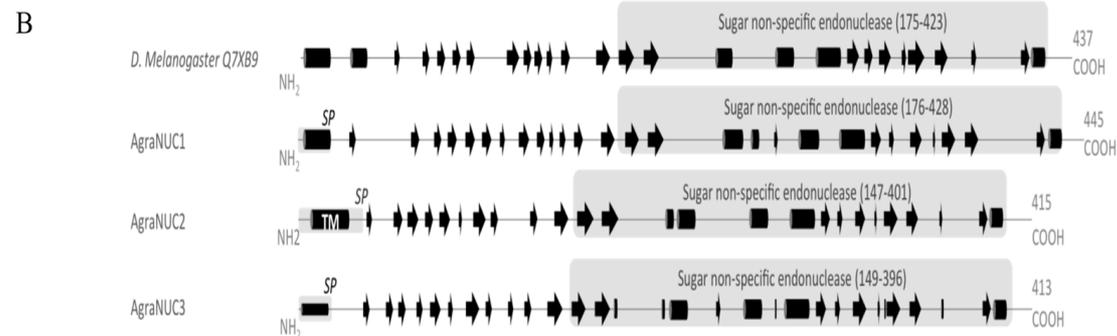
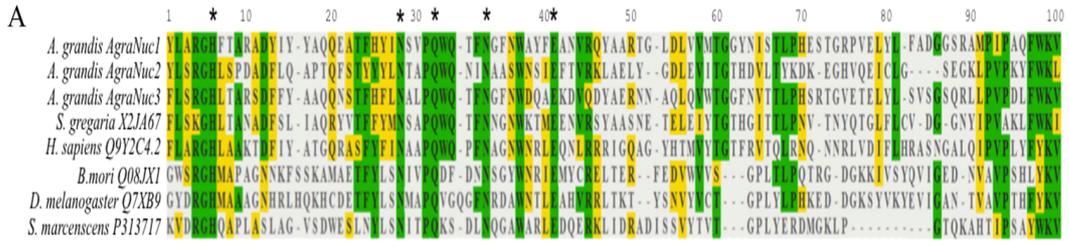


Figura 3. Análise in silico das nucleases identificadas em *A. grandis*. (A) O alinhamento das sequências de aminoácido do bicudo-do-algodoeiro com as nucleases pertencentes a outros insetos e nucleases não específicas (*D. melanogaster*, *B. mori*, *S. gregaria*, *Mus musculus*, *B. taurus*, *H. sapiens*, e *S. cerevisiae*). Os asteriscos indicam o motivo conservado Hx22Nx4Qx5Nx8E, o qual está envolvido em ligação a metais e catálise. Aminoácidos idênticos e similares estão ressaltados em verde e amarelo, respectivamente. (B) As nucleases mostraram na região C-terminal um domínio de endonuclease não específica RNA/DNA e um peptídeo sinal na região N-terminal. As flechas pretas e os cilindros pretos representam as predições de fita β e α hélice, respectivamente. "SP" é o peptídeo sinal de secreção predito e "TM" é o domínio transmembrana predito. Os números de acesso referem-se ao banco de dados de proteína UniProt. (C) A árvore filogenética da família de endonuclease não específica ficou dividida em diferentes espécies de animal. Grupos I e II são incluídos nas áreas vermelha e azul, respectivamente. Os discos vermelhos indicam a predição do peptídeo sinal de secreção ($>0,7$) na região C-terminal das nucleases. Os números de acesso correspondem aos bancos de dados UniProt ou ao NCBI.

5.2. O suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro apresenta atividade nucleásica

A fim de identificar a atividade nucleásica responsável pela digestão de ácidos nucleicos no bicudo-do-algodoeiro, o suco gástrico foi extraído do IMA de insetos adultos. A habilidade do bicudo-do-algodoeiro de digerir diferentes formas de ácidos nucleicos foi validada. A digestão foi observada de maneira não específica, tanto para dsRNA quanto para dsDNA (Figura 4A), o que pode demonstrar a presença significativa de nucleases no intestino do inseto. Em seguida, o pH ótimo das nucleases do suco gástrico foi analisado e os resultados mostraram que a atividade nucleásica ótima varia num pH de 5,5 a 6,5 (Figura 4B).

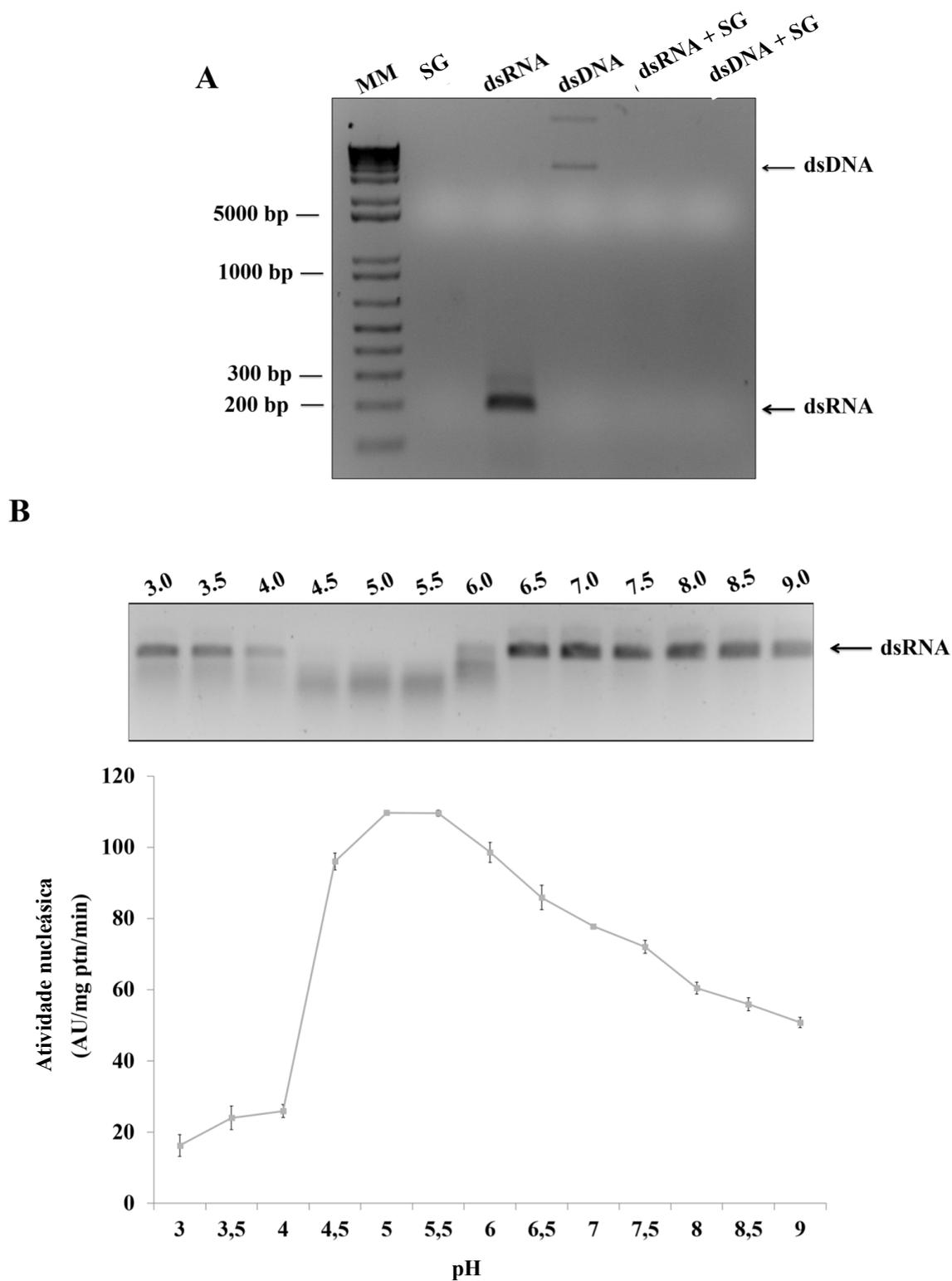


Figura 4. Caracterização bioquímica do suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro. (A). O suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro possui atividade nucleásica não específica e é capaz de degradar tanto dsRNA quanto dsDNA. MM: marcador molecular 1Kb plus; SG: suco gástrico. As amostras foram incubadas com GJ por 30 minutos a 37 °C. (B) O pH ótimo para atividade nucleásica varia de 4,5 a 6,5, indicando que as nucleases funcionam melhor em pH ácido.

5.3. *Agra-Nuc2* e *Agra-Nuc3* são mais expressas no IP do bicudo-do-algodoeiro

As enzimas digestivas são primeiramente produzidas nas células do intestino e são secretadas no suco gástrico (Douglas, 2013). Foi realizada uma comparação do perfil de expressão transcricional das nucleases encontradas no transcrito do bicudo-do-algodoeiro em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto, focando no intestino. A carcaça corresponde ao corpo do inseto sem o intestino. *AgraNuc1* é expressa de maneira semelhante na carcaça e no intestino, tanto na larva, quanto no inseto adulto. Em contrapartida, *AgraNuc2* e *AgraNuc3* mostraram maior expressão no intestino. A expressão relativa de *AgraNuc2* e *AgraNuc3* em larva foi de 600 vezes maior que em adulto (Figuras 5A e 5B). O IMP mostrou alta expressão de *AgraNuc2* e *AgraNuc3* em adultos (500 e 100 vezes) e larva (800 e 550 vezes), respectivamente (Figuras 5C e 5D).

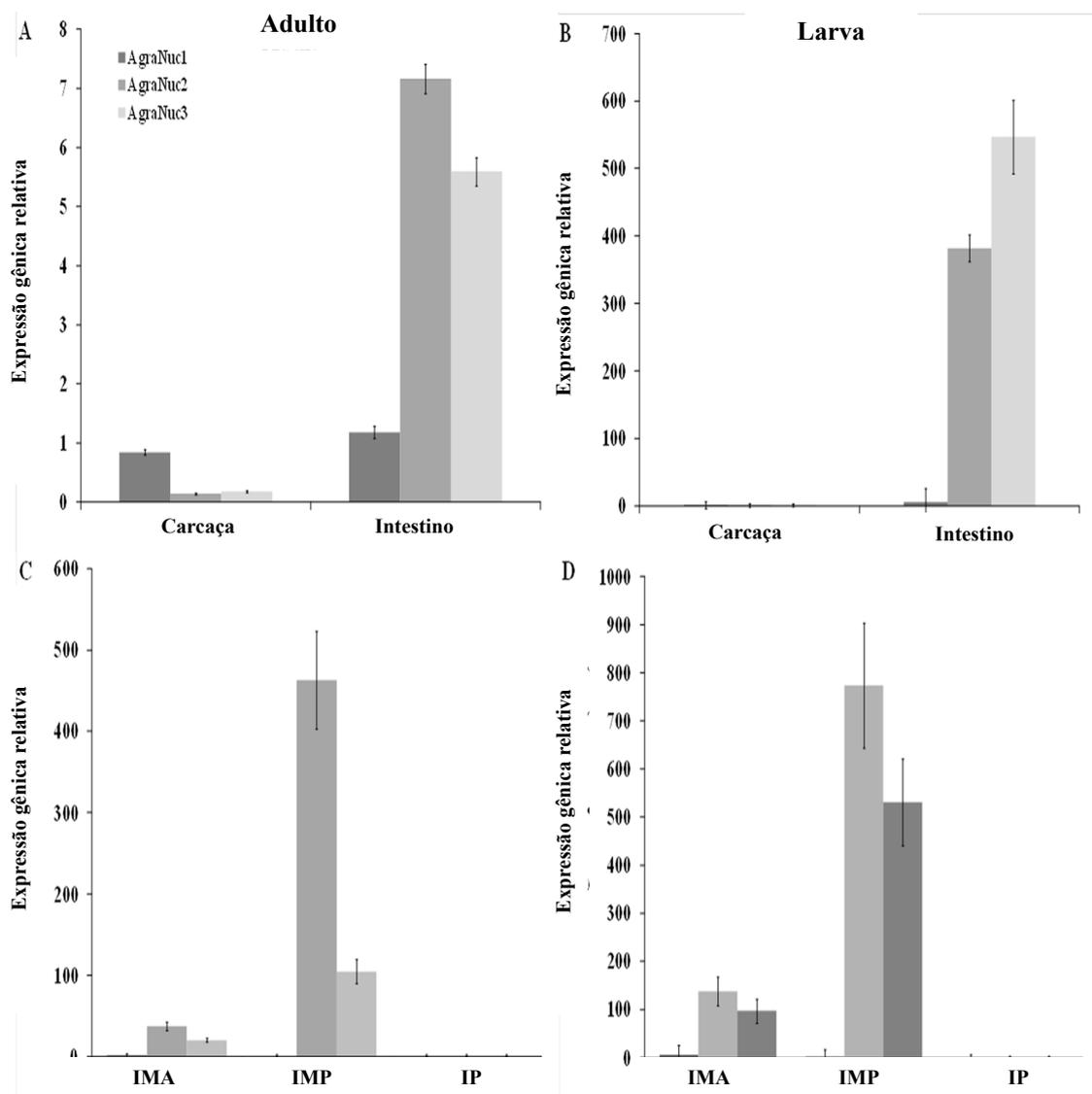


Figura 5. Análise da expressão das nucleases do bicudo-do-algodoeiro em diferentes estágios do desenvolvimento por RT-qPCR. (A e B) O bicudo-do-algodoeiro foi dissecado para obtenção do intestino e da carcaça, onde foi analisada a expressão relativa das nucleases. A expressão de *AgraNuc1* é similar tanto no intestino

quanto na carcaça de adulto (A) e de larva (B), enquanto *AgraNuc2* e *AgraNuc3* são mais expressas no intestino. (C e D) O intestino do inseto foi dividido em IMA, IMP e IP e os níveis de expressão das nucleases nesses compartimentos foram avaliados. *AgraNuc2* e *AgraNuc3* foram mais expressas no IMP tanto em adulto (C) quanto em larva (D), enquanto a expressão de *AgraNuc1* foi similar em todos os compartimentos do intestino. *Agra- β -actina* e *Agra- β -tubulina* foram usados como genes de referência. A expressão relativa (UA) foi calculada baseada no menor valor de expressão que foi obtido. Análises estatísticas da expressão média dos transcritos foram realizadas pelo método Tukey com valor de significância de 0,05% para comparações entre tratamentos.

5.4. O silenciamento das nucleases resultou na diminuição da degradação de dsRNA pelo suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro

Para determinar se o produto dos genes das nucleases contribuem para a digestão de ácido nucléico no intestino do bicudo-do-algodoeiro, foi realizado um ensaio de expressão gênica com os genes das nucleases identificadas. O nível baixo de expressão das nucleases foi significativa dois dias após a microinjeção de dsRNA na cavidade abdominal dos insetos (Figura 6A). Os dados gerados também mostraram que a microinjeção de um determinado dsRNA específico para uma nuclease pode interferir na expressão de outra nuclease. Por exemplo, o dsRNA-*AgraNuc1* também baixou a expressão de *AgraNuc2* e *AgraNuc3*. O mesmo fenômeno ocorreu para os dsRNAs de *AgraNuc2* e *AgraNuc3* (Figura 6A). O ensaio de digestão de dsRNA foi realizado com o suco gástrico extraído de insetos, que foram previamente microinjetados com dsRNAs contra as nucleases e de insetos não microinjetados. O suco gástrico dos insetos não microinjetados resultou na digestão completa do dsRNA (Figura 6B, coluna 3), enquanto que insetos que foram microinjetados com uma mistura de dsRNA contra as nucleases mostraram uma diminuição da degradação do dsRNA (Figura 6B, linha 4). O tratamento com dsRNA contra *AgraNuc1* e *AgraNuc3* levou à degradação do dsRNA pelo suco gástrico do inseto, sugerindo que a atividade nucleásica persistiu, mesmo após o silenciamento gênico desses genes. Entretanto, ocorreu uma diminuição na degradação do dsRNA pelo suco gástrico de insetos microinjetados com dsRNA contra *AgraNuc2* (Figura S4). Esses dados associam o silenciamento gênico de *AgraNuc2* com a perda da atividade nucleásica do suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro, mas não *AgraNuc1* e *AgraNuc3*. Assim, pode-se afirmar que o silenciamento gênico de *AgraNuc2* é necessário a fim de evitar degradação de dsRNA no intestino do inseto. Ainda, o silenciamento gênico das três nucleases levou à diminuição da degradação do dsRNA no intestino do bicudo-do-algodoeiro (Figura 6A).

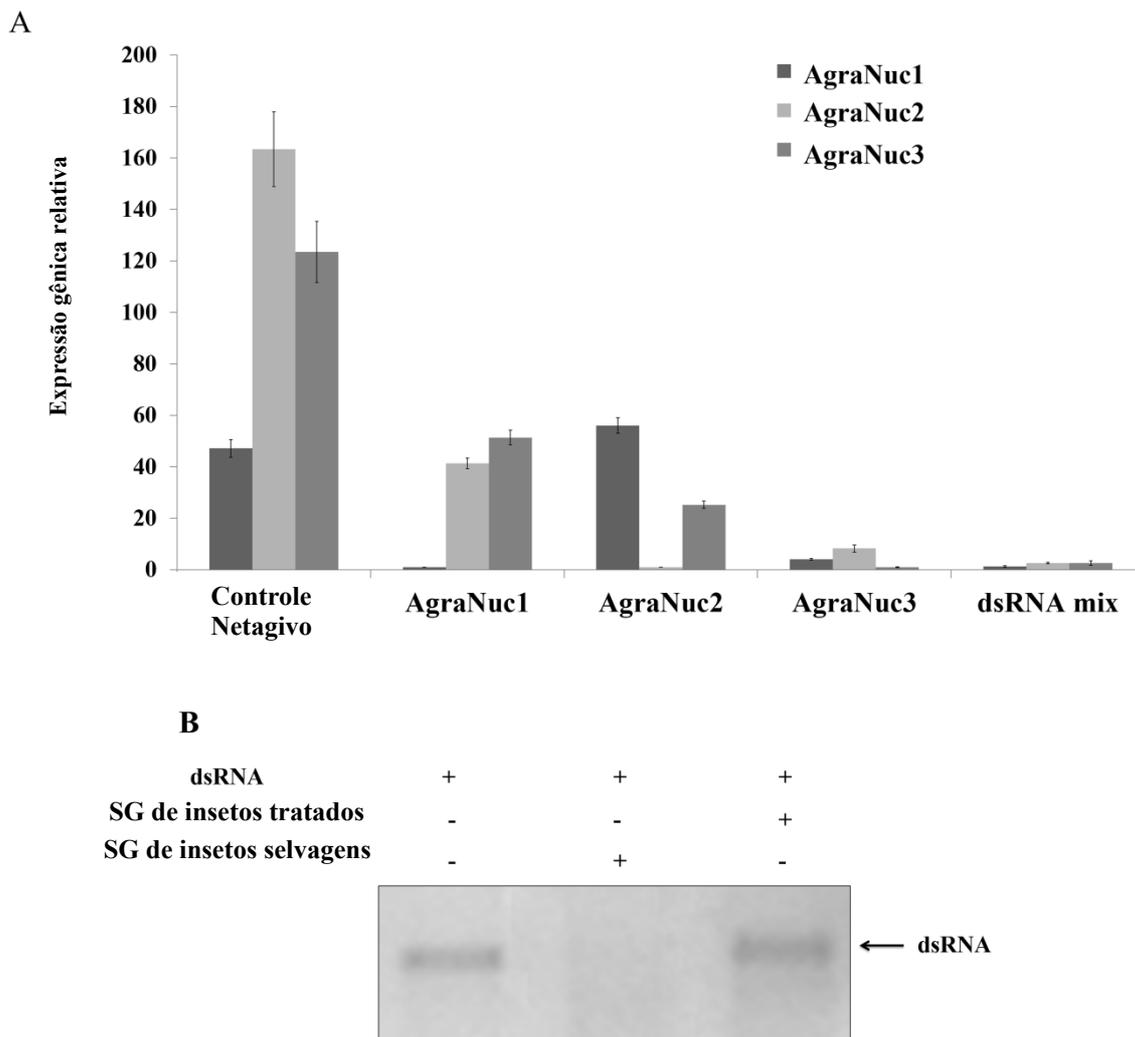


Figura 6. Análise da expressão das nucleases do bicudo-do-algodoeiro após silenciamento gênico por RT-qPCR. (A) A microinjeção nos insetos adultos foi realizada utilizando 500 ng de cada dsRNA e uma mistura de dsRNAs, totalizando 1500 ng, e a análise foi feita dois dias após a microinjeção. Como controle negativo, foi utilizado dsRNA *gus*. *Agra- β -actina* e *Agra- β -tubulina* foram utilizados como genes de referência. A expressão relativa (UA) foi calculada baseada no menor valor de expressão obtido. Análises estatísticas da expressão média de transcritos foi realizada pelo método de Tukey com significância de 0,05% para comparações entre tratamentos. O gráfico mostra que a expressão das nucleases foi diminuída, tanto quando silenciadas individualmente, quanto em grupo. (B) O dsRNA (~200 pb) foi incubado com suco gástrico de bicudo-do-algodoeiro foi 30 minutos a 37 °C. O suco gástrico foi coletado dois dias após o silenciamento gênico das nucleases via RNAi e a digestão do dsRNA foi analisada em gel de agarose 1%. O suco gástrico foi coletado de insetos microinjetados e não microinjetados. GJ: suco gástrico, KD: insetos silenciados, WT: insetos selvagens, CBW: bicudo-do-algodoeiro.

5.5. O silenciamento gênico das nucleases melhora a eficiência do RNAi, via administração oral

Já que o silenciamento gênico das três nucleases juntas resultou na diminuição da digestão de dsRNA pelo suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro, o dsRNA alvo de *quitina sintase II* foi administrado via oral ao inseto, dois dias após o silenciamento gênico das nucleases. *Quitina sintase II* é responsável pela síntese de quitina da membrana peritrófica no intestino médio dos insetos (Gagou et al, 2002; Hogenkamp et al, 2005; Arakane et al, 2008). O gene *AgraChSII* foi silenciado aproximadamente três vezes após a administração oral de dsRNA aos insetos que tiveram suas nucleases previamente silenciadas (Figura 7).

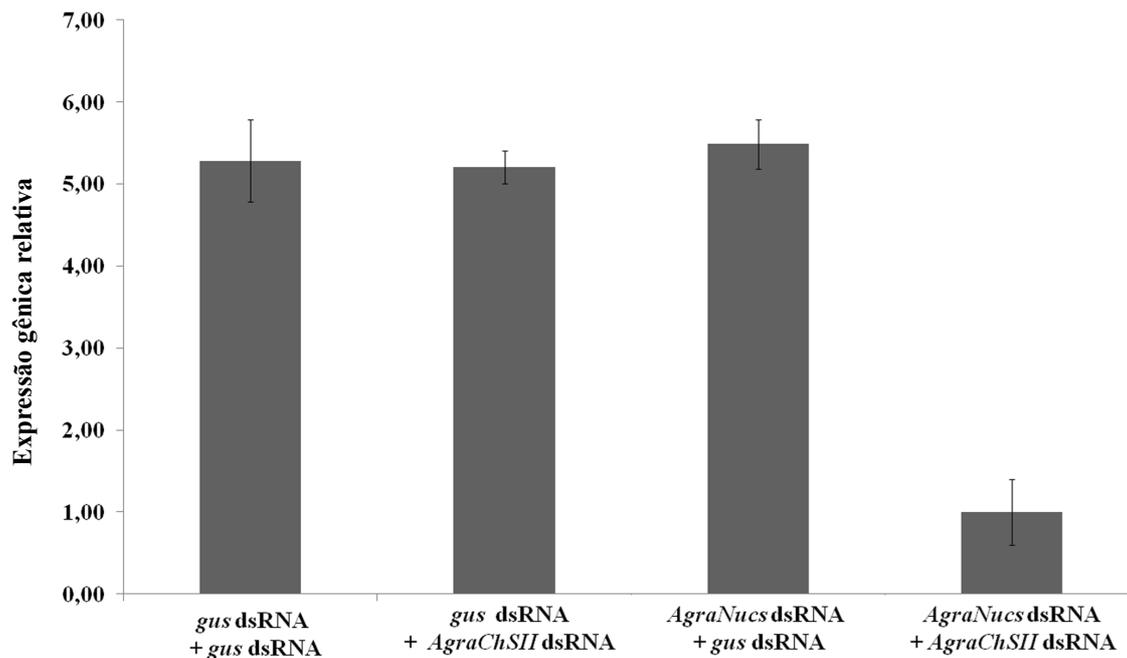


Figura 7. Análise da expressão gênica de *AgraChSII* após silenciamento das nucleases por RT-qPCR. Dois dias após o silenciamento gênico das nucleases, os insetos adultos foram colocados em jejum por dois dias e, após esse período, 500 ng de dsRNA-*AgraChSII* foi administrado via oral. Insetos com as nucleases silenciadas (barra quatro) mostraram diminuição na expressão dos transcritos de *AgraChSII*, quando comparados aos insetos controle (barras um, dois e três). Moléculas de dsRNA-*gus* foram utilizadas como controle negativo e de *Agra-β-actina* e *Agra-β-tubulina* foram utilizadas como genes de referência. A expressão relativa (UA) foi calculada baseada no menor valor de expressão obtido. A média dos transcritos foi realizada utilizando o método de Tukey, com significância de 0,05% para comparações entre tratamentos.

6. Discussão e Conclusão

Uma das principais vantagens em utilizar a tecnologia do RNAi para controlar insetos-praga é a alta especificidade ao gene-alvo, sendo para o meio ambiente e diminuindo efeito em insetos não alvos (Burand & Hunter, 2013). Análises transcritômicas podem ser realizadas para identificar genes que são diferencialmente expressos no ciclo de vida de diferentes insetos (Liu et al, 2017). A partir de informações do transcritoma, a metodologia de RNAi representa um avanço no melhoramento genético de culturas, conferindo resistência a insetos-praga (Ali et al, 2010). Entretanto, a entrega de dsRNA à localização intracelular correta e a interação do dsRNA com a maquinaria do RNAi da célula alvo são importantes fatores na aplicação desta tecnologia. Algumas barreiras impedem que o dsRNA entre no sistema celular (Oliveira et al, 2006). Como o RNA possui carga negativa e um alto peso molecular, sua internalização celular é impedida pela camada de lipídios da célula (Dowdy, 2017). Em insetos, siRNAs induzidos por vírus podem saturar a célula ao ponto de interferir na eficiência do dsRNA exógeno (Kanasty et al, 2012). A interação de dsRNA com receptores celulares e sua internalização pela célula também são importantes barreiras para a entrega de dsRNA. Todavia, a concentração de dsRNA bem como seu comprimento são parâmetros críticos para a efetividade da resposta do RNAi, porque esses fatores interferem na internalização de dsRNA (Ulvila et al, 2006; Bolognesi et al, 2012;; Miller et al, 2012; Li et al, 2015). Nucleases intestinais de insetos estão entre as barreiras para a entrega oral de dsRNA para a aplicação da tecnologia do RNAi como

controle de insetos-praga. A entrega oral de dsRNA ao inseto alvo é dificultada pelas nucleases intestinais, devido ao catabolismo do dsRNA, influenciando em sua eficiência. Entender a interação entre as nucleases intestinais de insetos e o dsRNA é fundamental para o avanço desta ferramenta biotecnológica que é a tecnologia do RNAi, que pode ser aplicada em diferentes campos de estudo (Katoch & Thakur, 2012; Katoch & Thakur, 2013; Wynant et al, 2014; Christianes et al, 2014; Spit et al, 2017).

Estudos anteriores mostraram que a administração de dsRNA, via oral, é eficiente para o silenciamento gênico em diferentes insetos, como *H. armigera* (Cymerman et al, 2008; Mao et al, 2007; Mao et al, 2011), *D. virgifera* (Baum et al, 2007), *A. aegypti* (Singh et al, 2013), *Aphis gossypii* (Gong et al, 2014) e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) (Hunter et al, 2010). Entretanto, essa abordagem não é tão eficiente em outros insetos, como *S. gregaria* (Wynant et al, 2014), *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) (Christiaens et al, 2014), *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) (Allen et al, 2012) e *Locusta migratoria* (Luo et al, 2013). Coelho e colaboradores (2016) mostraram que o bicudo-do-algodoeiro é sensível à microinjeção de dsRNA, o qual interfere na expressão gênica. Entretanto, Baum e colaboradores (2007) demonstraram que o mesmo não ocorre quando o dsRNA é administrado de maneira oral ao inseto. Essa ineficiência do dsRNA, quando administrado via oral, deve-se provavelmente a enzimas digestivas que são capazes de digerir os nutrientes das maçãs do algodão, que são ricas em amido (Oliveira-Neto et al, 2003) e ácido nucléico (Ma et al, 2015). Pode ser inferido que o bicudo-do-algodoeiro evoluiu para produzir nucleases intestinais devido ao seu hábito alimentar, sendo capaz de degradar os ácidos nucléicos, presentes nos tecidos do algodão. Para a tecnologia do RNAi ser eficiente e satisfatória em culturas à campo, é necessário e essencial o desenvolvimento de estratégias que protejam as moléculas de dsRNA da degradação (Eguchi et al, 2009; Eguchi & Dowdy, 2010; Garbutt et al, 2013; Kumar et al, 2016; Wang et al, 2017).

Um estudo conduzido por Shukla e colaboradores (2016) demonstrou a degradação de dsRNA pelo suco gástrico de *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). No presente estudo foi reportado três diferentes nucleases no suco gástrico do bicudo-do-algodoeiro, que são capazes de degradar ácidos nucléicos no sistema digestivo do inseto. Em estudos anteriores, foi identificado que o IMA do bicudo-do-algodoeiro possui pH 5,0, enquanto que o pH do IMP possui pH 7,0 (Macedo et al, 2017). Assim, o dsRNA utilizado neste estudo foi digerido por nucleases intestinais num pH variando de 3,5 a 10,0. Em pHs acima de 7,0, a digestão do dsRNA era menor. Esses dados sugerem que as nucleases são mais ativas no IMA do bicudo-do-algodoeiro, que é ácido, e menos ativas no IMP, em que o pH é mais neutro. Em insetos pertencentes a diferentes famílias de coleópteros, como *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) (Valencia et al, 2000), *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) (Caldeira et al, 2007), *H. hampei* (Rubio et al, 2008) e *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) (Sousa et al, 2013), o IMA é ácido, com pH variando de 4,5 a 5,0 (Terra & Ferreira, 1994). Assim sendo, o pH regula a natureza e a atividade das enzimas digestivas presentes no lúmen do intestino dos insetos (Gillot, 2005). A organização espacial da digestão está relacionada aos compartimentos intestinais; em outras palavras: a ação de certas enzimas

está associada com o compartimento do intestino do inseto, o qual apresenta variações de pH (Terra, 2001).

As três nucleases encontradas no transcrito do bicudo-do-algodoeiro (Firmino et al, 2013) foram identificadas baseado na sequência peptídica da nuclease de *B. mori* (Arimatsu et al, 2007). A análise filogenética mostrou alta similaridade (>50%) entre as nucleases do bicudo-do-algodoeiro e nucleases de outros insetos. Esses dados, somado aos dados de análise *in silico*, sugerem que os genes de *AgraNucs* codificam endonucleases não específicas e, que *AgraNuc2* e *AgraNuc3* provavelmente são extracelulares.

Os resultados mostraram que *AgraNuc2* e *AgraNuc3* são mais expressas no intestino (mais especificamente, no IMP) tanto em adultos quanto em larvas. Esses dados estão de acordo com os que foram relatados por Wynant e colaboradores (2014). Esse grupo também usou a sequência de *B. mori* para identificar nucleases no transcrito de *S. gregaria*, em que as nucleases também eram mais expressas no IMP. A transcrição de *AgraNuc2* e *AgraNuc3* ocorre principalmente no IMP, sugerindo que esses genes contribuem para o processo digestivo. Ainda, essa distribuição da expressão gênica no intestino sustenta a ideia de compartimentalização do intestino em termos de função digestiva (Terra, 2001). Insetos com membrana peritrófica apresentam circulação endo-ecto-peritrófica, a qual permite a absorção de nutrientes que são previamente degradados no espaço endoperitrófico, além de ciclagem enzimática (Terra, 2001). Assim, as enzimas digestivas podem ser sintetizadas, secretadas na saliva e no IMP e, depois, transportadas contra o fluxo ao intestino anterior e ao IMA. Esse processo explica o motivo de a expressão gênica das nucleases do bicudo-do-algodoeiro analisadas neste estudo serem mais expressas no IMP que no IMA, já que sua atividade ocorre majoritariamente em ambiente ácido. Ainda, *AgraNuc1* difere de *AgraNuc2* e *AgraNuc3*, reforçando a ideia de que *AgraNuc1* possui uma função diferente. Finalmente, neste estudo, formou-se a hipótese de que *AgraNuc1-3* estão mais relacionadas a nutrição que a morte celular.

O silenciamento gênico das nucleases foi detectado dois dias após a microinjeção de dsRNA na cavidade abdominal do bicudo-do-algodoeiro. Esse silenciamento gênico permaneceu mesmo após sete dias da microinjeção. Uma identidade de 11 nucleotídeos foi observada nas sequências de nucleases estudadas neste estudo. Apesar de ser uma sequência curta, pode ser o suficiente para causar silenciamento gênico devido à região semente do alvo (Chen et al, 2015; Kamola et al, 2015). Assim sendo, o silenciamento gênico de uma nuclease por RNAi pode interferir na expressão de outra nuclease por silenciamento cruzado. Esses dados sugerem a existência de uma via de amplificação de RNA que é independente de RNA polimerase RNA dependente (RdRp), a qual não foi identificada no transcrito do bicudo-do-algodoeiro (Firmino et al, 2013). Essa via não é conhecida, mas corrobora com os dados reportados por Wynant e colaboradores (2014), que observou o mesmo padrão de silenciamento gênico cruzado em *S. gregaria*.

Os efeitos fisiológicos do silenciamento gênico das nucleases foram observados quando se incubou o dsRNA com o suco gástrico coletado de insetos microinjetados com dsRNA contra as nucleases. Para se obter um efeito fisiológico satisfatório por RNAi é

necessário reduzir a expressão das nucleases o suficiente para que o dsRNA pare de ser degradado. O silenciamento das três nucleases estudadas resultou na redução da degradação do dsRNA, quando incubado com suco gástrico, mostrando que a administração de um ou mais dsRNAs nem sempre é inefetivo. Apesar da competição pela maquinaria de RNAi que deve existir entre os dsRNAs, o resultado indicou que, provavelmente, o sistema não estava saturado (Miller et al, 2012; Joga et al, 2016; Spit et al, 2017). Em contrapartida, o silenciamento de cada nuclease individualmente mostrou a redução da degradação do dsRNA apenas para *AgraNuc2*. Este resultado sugere um limite de silenciamento que deve ser ultrapassado, resultando em baixos níveis da nuclease no suco gástrico.. Este fenômeno precisa ser mais estudado para melhor compreensão em estudos futuros. Vale a pena mencionar que as sequências nucleotídicas das nucleases não apresentam similaridade maior que 20 pb, sugerindo a possibilidade de que o decréscimo no transcrito de nucleases ocorre devido a alta regulação gênica. Os dados gerados aqui corroboram com os gerados por Wynant e colaboradores (2014), que também identificaram nucleases em *S. gregaria* capazes de degradar dsRNA no intestino do inseto.

Como foi observado neste estudo, a presença de nucleases no intestino de insetos-praga é um desafio a ser enfrentado a fim de que a tecnologia de RNAi possa ser utilizada como estratégia efetiva no controle de insetos-praga a nível de campo. O estudo mostra que nucleases presentes no intestino médio do bicudo-do-algodoeiro podem ser silenciadas por RNAi, resultando na proteção do dsRNA no suco gástrico. Estudos futuros ainda são necessários para desenvolver estratégias que melhorem a tecnologia do RNAi para que seja efetiva na entrega de dsRNA aos insetos-praga (Jin et al, 2015; Kumar et al, 2016; Gillet et al, 2017;).

Os dados aqui apresentados contribuíram com os estudos relacionados visando a aplicabilidade do RNAi para controlar insetos-praga. A presença de nucleases no intestino do bicudo-do-algodoeiro leva à diminuição da efetividade do dsRNA ingerido. A inibição da digestão do dsRNA melhora sua internalização celular pelas células do intestino, que parece ser mediado por receptores scavenger (Capelle et al, 2016; Xiao et al, 2015), e fica mais significativo quando o dsRNA é maior que 60 pb em comprimento (Bolognesi et al, 2012). A digestão do dsRNA pode ser evitada pelo desenvolvimento de estratégias que escapam os mecanismos de degradação, incluindo a produção em massa de dsRNA em cloroplastos de plantas (Jin et al, 2015; Zhang et al, 2015), o nanoencapsulamento de dsRNA com quitosana (Das et al, 2015; Kumar et al, 2016; Xiao et al, 2016) e peptídeos penetradores de célula (Eguchi et al, 2009). Esses processos aumentam a meia vida do dsRNA, melhorando sua atividade. Este campo de estudo é relativamente novo e vasto e está associado à biotecnologia de plantas aplicadas à insetos-praga, o que requer mais estudos. Por fim, superar as barreiras ligadas à entrega de dsRNA pode ser vantajoso para a aplicabilidade do RNAi em plantações de grandes culturas de importância econômica.

Capítulo II – Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para proteção de dsRNA contra bicudo-do-algodoeiro

1. Introdução

O fato de moléculas de dsRNA serem sequência-específicas, juntamente com sua habilidade de causar silenciamento de genes essenciais envolvidos no metabolismo e no desenvolvimento de insetos-praga, faz com que moléculas de dsRNA em forma de nanopartículas seja considerada um pulverizador altamente promissor (Whyard et al, 2009). Estudos recentes mostram que o uso de moléculas de dsRNA, de maneira pulverizada, contra patógenos pode conferir proteção às plantas (Koch et al, 2016). Essa abordagem pode ser considerada sustentável e ambientalmente favorável, podendo ser aplicada no controle de insetos-praga, por meio da alimentação (Wang & Jin, 2017). Como se sabe, existem algumas barreiras para a aplicação da tecnologia do RNAi para o controle de insetos-praga, como a internalização do dsRNA pela célula do inseto (Bolognesi et al, 2012) e sua degradação por nucleases (Arimatsu et al, 2007; Wynant et al, 2014; Garcia et al 2017; Vyas et al, 2017). Além disso, moléculas de dsRNA como inseticida não persiste por muito tempo no meio ambiente, por ter uma meia-vida curta, sendo degradada rapidamente (Dubelman et al, 2014). Essas barreiras são atribuídas à falta de métodos eficientes de entrega e de proteção do dsRNA. A fim de aumentar a estabilidade do dsRNA e melhorar sua internalização pela célula, nanopartículas de polímeros, como a quitosana, começaram a ser aplicadas na última década (Zhang et al, 2010).

A quitosana (CS) é um polímero natural renovável de carga líquida positiva obtida a partir da quitina de crustáceos. Esta possui propriedade mucoadesiva, não é tóxica e não causa reações alérgicas, além de ser metabolizada pelo corpo humano e ser biodegradável. A quitosana vem sendo amplamente utilizada como carreador de diversas moléculas, incluindo moléculas de dsRNA, devido a suas propriedades (Raja et al, 2015; Khan et al, 2017; Raja et al, 2017). Esta é obtida quando se coloca a quitina em condições muito básicas ou na presença da enzima quitina desacetilase (Sadreddini et al, 2016; Li et al, 2016; Perez & François, 2016; va Woensel et al, 2016). Em pH baixo, o grupo amino da quitosana fica carregado positivamente por protonação, fazendo com que a quitosana seja solúvel em soluções orgânicas ácidas, incluindo ácido fórmico e ácido acético (Nagpal et al, 2010; Hembram et al, 2014). Numa proporção dsRNA:quitosana ótima, a amina da quitosana e o fosfato do dsRNA formam interações eletrostáticas, condensando em nanopartículas. Essas nanopartículas conferem resistência à ação de nucleases e são compatíveis com a internalização pela célula (Vila et al, 2004; Katas & Alpar, 2006; Salamanca et al, 2006; Rasente et al, 2016; Sadreddini et al, 2016; Sun et al, 2016).

As nanopartículas podem ser preparadas de diversas maneiras, incluindo ou não o uso de agentes intercalantes. Quando se mistura quitosana com moléculas de carga oposta em solução aquosa, ocorre uma auto-montagem de nanopartículas por meio de interações eletrostáticas. A proporção e a concentração de quitosana e das moléculas de carga oposta são fatores que influenciam na estabilidade da nanopartícula (Yang et al, 2014). Sendo assim,

moléculas de dsRNA podem ser utilizadas como contra íons para formar nanopartículas com quitosana por auto-montagem (Mao et al, 2010; Gharehdaghi et al, 2014; Attasart et al, 2016). Outro método de formação de nanopartículas consiste na gelação ionotrópica, que são interações eletrostáticas entre a quitosana e um poliânion, como, por exemplo, sulfato de sódio, que funciona como agente intercalante. O tamanho e a carga das nanopartículas podem ser alterados, de acordo com a razão de quitosana e agente intercalante (Kleine-Brueggeneey et al, 2015; Sacco et al, 2016). Neste método, o dsRNA é adicionado à solução de nanopartículas, ficando adsorvido nas mesmas (Katas & Alpar, 2006; Nagpal et al, 2010). Outra maneira de produzir nanopartículas de CS:dsRNA é pela adição de dsRNA na solução de agente intercalante e, em seguida, adicionar a quitosana. As nanopartículas são formadas pelo aprisionamento do dsRNA nas partículas de quitosana (Kumar et al, 2016; van Woensel et al, 2016). O tamanho e a carga das nanopartículas podem ser alterados, de acordo com a razão de quitosana, dsRNA e agente intercalante (Figura 8) (Raja et al, 2015).

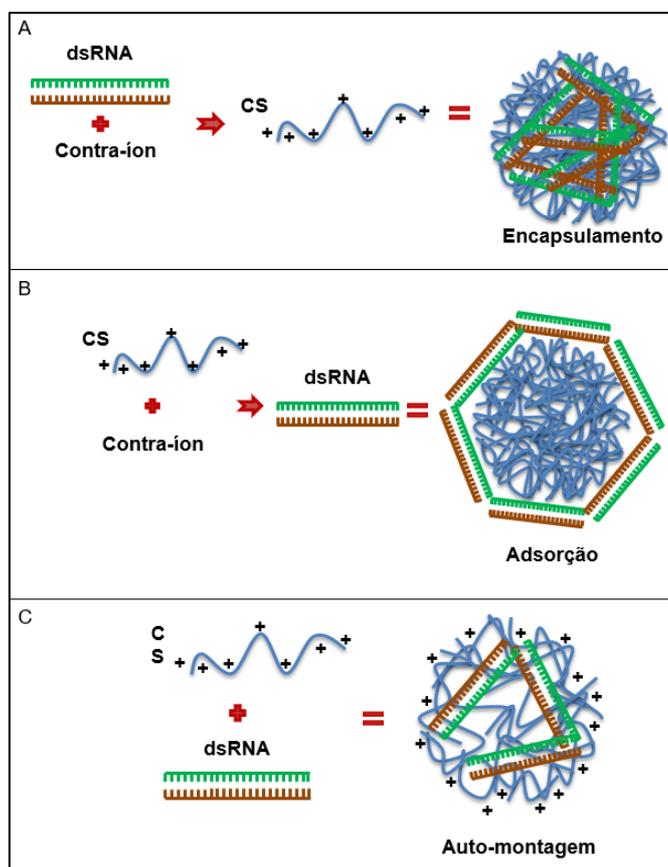


Figura 8. Nanopartícula de quitosana e dsRNA. As fibras de quitosana (CS) possuem aminas livres, o que confere carga positiva às moléculas. O sulfato de sódio funciona como um intercalante, com uma carga altamente negativa, aumentando a estabilidade da nanopartícula. As partículas podem ser formadas por encapsulamento (A), adsorção (B) ou auto-montagem (C).

Alguns estudos foram realizados administrando nanopartículas de CS:dsRNA na dieta de *Anopheles gambiae* (Zhang et al, 2010; Zhang et al, 2015b) e *A. aegypti* (Mysore et al, 2013; Mysore et al, 2014; Das et al, 2015; Kumar et al, 2016), observando-se silenciamento

gênico. Sendo assim, esses estudos auxiliam na produção de novas metodologias para o controle de insetos-praga, aumentando a eficácia do dsRNA como inseticida, na forma de pulverização.

O presente estudo mostra o potencial de aplicabilidade da tecnologia de nanopartículas de quitosana e de dsRNA, direcionada ao inseto-praga, bicudo-do-algodoeiro, *A. grandis*, praga de relevância na cotonicultura. Pela alimentação, o dsRNA protegido por nanopartículas de quitosana foi capaz de causar significativo silenciamento gênico, cerca de três vezes superior, quando comparado ao dsRNA não protegido. Ainda, as nanopartículas fazem com que o dsRNA seja internalizado mais facilmente pelas células do inseto. Os dados demonstram que essa tecnologia apresenta grande potencial de uso no controle de insetos-praga.

2. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo desenvolver estratégias para proteger moléculas de dsRNA contra a degradação por nucleases, presentes no intestino do bicudo-do-algodoeiro, e aumentar sua permeabilidade pelas células epiteliais do intestino do inseto.

3. Objetivos específicos

- Desenvolver um método de produção eficiente de nanopartículas de quitosana:dsRNA
- Validar a eficiência das nanopartículas de quitosana:dsRNA *in vitro*
- Validar a eficiência das nanopartículas de quitosana:dsRNA pela alimentação do bicudo-do-algodoeiro
- Validar a eficiência das nanopartículas de quitosana:dsRNA pelo tegumento do bicudo-do-algodoeiro

4. Metodologia

4.1. Criação de bicudo-do-algodoeiro

Os insetos foram criados nos mesmos parâmetros do item 4.1. do Capítulo I.

4.2. Coleta do homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro

Insetos adultos foram colocados no gelo por 15 minutos, para imobilização. Os élitros do inseto foram removidos e a dissecação foi realizada em lupa (Nikon SMZ1000). O inseto foi colocado em placa de Petri com tampão fosfato pH 5.5 ($\text{Na}_2\text{HPO}_2/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 10 mM, KCl 2.7 mM e NaCl 137 mM). A boca do inseto foi cortada e, em seguida, a cabeça foi separada cuidadosamente, até que o trato digestivo ficasse completamente exposto. O homogenato intestinal foi coletado diretamente do intestino médio anterior do inseto com a ajuda de pipeta. O conteúdo foi quantificado pelo método Bradford (Bradford, 1976) e armazenado a -20°C .

4.3. Síntese das nanopartículas CS:dsRNA:surfactante

O dsRNA para o gene *quitina sintase II* do bicudo-do-algodoeiro (*AgraChSII*) foi adquirido da empresa Genolutions Pharmaceuticals Inc. e a quitosana (95% desacetilada) foi

adquirida da empresa Polymar. A quitosana foi dissolvida em ácido acético 0.1 M, gerando uma solução de quitosana 0,2% (2 µg/µL). O pH da solução foi ajustado para 5.5 e a solução foi filtrada em filtro de seringa 25 mm x 0,22 µm (FilterPro). Uma diluição seriada da solução de quitosana foi feita, com quantidades de 15, 30, 60, 125, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 ng. O dsRNA foi adicionado numa quantidade constante de 300 ng, na proporção de 1:1 para as diferentes quantidades de quitosana, numa reação de 20 µL em tampão triplo pH 5.5 (Schaffer et al, 2004), exceto para 4000 ng, em que a proporção foi 2:1. Foi adicionado surfactante SURFOM 5204 CS (Oxiten) na concentração final de 0,01%. O surfactante possui a capacidade de se incorporar a compostos hidrofóbicos (Chiappisi & Gradzielski, 2015), como a parte externa da membrana celular, melhorando a entrega do dsRNA à célula. Desta maneira, o surfactante cria uma bicamada em volta da superfície da nanopartícula (Pal & Pal, 2017) (Figura 9).

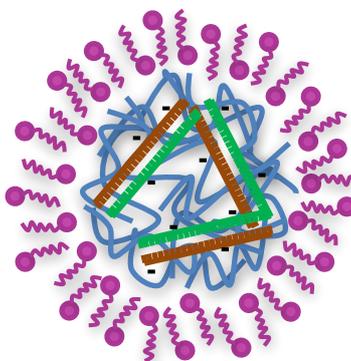


Figura 9. Nanopartícula de CS:dsRNA:surfactante por auto-montagem. O dsRNA (verde e marrom), de carga negativa, se liga à quitosana, que possui carga positiva (azul), formando nanopartículas. O surfactante (rosa) forma uma bicamada em volta da nanopartícula, facilitando sua entrada na célula.

4.4. Análise de degradação do dsRNA encapsulado por quitosana com homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro

A nanopartícula de CS:dsRNA (nas concentrações citadas em 4.2) foi incubada por 30 minutos com 1 µg de homogenato intestinal de *A. grandis*, numa solução de 20 µL, em tampão triplo pH 5.5. O resultado da reação foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.5. Análise do tamanho e da carga das nanopartículas CS:dsRNA por espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta (DLS)

A fim de saber a razão ótima de dsRNA, quitosana e surfactante, foram feitas diferentes análises. A primeira análise foi com uma quantidade constante de dsRNA (300 ng), variando a quantidade de quitosana, em nanogramas (15, 30, 60, 125, 250, 500, 1000 e 2000). Uma quantidade de 5 µL de dsRNA (300 ng/µL) foi adicionado a 5 µL de quitosana (500 ng/µL) e diluído em 90 µL de água milliQ. A solução foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 900 µL de água milli Q e as amostras foram analisadas no DLS. Estabelecida a razão de dsRNA e quitosana em que a carga da partícula é próxima de zero, pois todo o dsRNA se liga à quitosana, uma segunda análise foi feita variando

a concentração de surfactante, em porcentagem (0.1, 0.05, 0.025 e 0.01). Uma quantidade de 5 μ L de dsRNA (300 ng/ μ L) foi adicionado a 5 μ L de quitosana (500 ng/ μ L) e diluído em 90 μ L de água milliQ. A solução foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e, após esse tempo, foi adicionado o surfactante nas diferentes concentrações, misturando bem. As nanopartículas foram incubadas por mais 15 minutos a temperatura ambiente e, depois, foi adicionado 900 μ L de água milliQ para análise no DLS. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6. Bioensaios

4.6.1. Administração da nanopartícula CS:dsRNA na dieta do bicudo-do-algodoeiro - Insetos adultos foram mantidos em jejum por 48 horas (n=10). Em seguida, foi administrada a nanopartícula CS:dsRNA-AgraChSII, na concentração (500 ng dsRNA/ 300 ng quitosana), diluída em sacarose 5% (Figura 10). Como controles, foram utilizadas amostras contendo dsRNA-AgraChSII (300 ng) e quitosana (500 ng). Após 72 horas, os insetos foram congelados em nitrogênio líquido para futuras análises. O ensaio foi realizado em triplicata biológica.



Figura 10. Administração da nanopartícula ao bicudo-do-algodoeiro. A nanopartícula, assim como os controles, foi administrada ao inseto via oral, diluídas em sacarose 5%.

4.6.2. Administração da nanopartícula CS:dsRNA pelo tegumento do bicudo-do-algodoeiro - Insetos adultos foram submetidos a banhos com solução contendo as nanopartículas CS:dsRNA-AgraChSII. Como controle, foi utilizado dsRNA-AgraChSII e nanopartícula vazia, como descrito em 4.5.1. O banho foi realizado com *spray* e os insetos foram congelados em nitrogênio líquido após 72 horas para futuras análises.

4.7. Análise da expressão gênica de ChSII por RT-qPCR

As amostras previamente armazenadas a - 80°C foram pulverizadas em nitrogênio líquido e a extração de RNA total foi realizada com TRIzol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com 2.0 μ g de RNA, utilizando o kit MMLV (Invitrogen) e o primer NVdT30 (Tabela 1), de acordo com as instruções do fabricante. A RT-qPCR foi realizada utilizando SYBR Green (Promega) como fluoróforo intercalante e os primers para os genes. Os genes *actina* e *tubulina* foram usados como genes de referência (Tabela 2). A reação foi realizada de acordo com o fabricante e o programa na máquina de PCR (Applied 7300 Real Time PCR System - Applied Biosystems) consistiu de um ciclo de 10

minutos a 95°C, 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C. A análise da expressão relativa foi realizada no programa qBasePlus 2.0 pelo método Pfaffl (Hellemans et al, 2007). O experimento foi realizado em triplicata biológica (n=10) e triplicata técnica. As análises estatísticas foram realizadas pelo método Tukey, com nível de significância de 0.05% para comparação entre os tratamentos.

Tabela 2. Sequência de primers utilizados nos Capítulos II e III

Primer	Sequência (5' → 3')
<i>Agra-B-actina</i> Fw	GTAGCTCACGCCTCGGTACT
<i>Agra-B-actina</i> Rv	AGTGTGGCCGAGGTATGAC
<i>Agra-B-tubulina</i> Fw	GGTTGCGACTGTTTACAAGG
<i>Agra-B-tubulina</i> Rv	GCACCACCGAGTAAGTGTTTC
<i>Agra-Quitina sintase II</i> Fw	AAGGCATTAACGGTGACGAC
<i>Agra-Quitina sintase II</i> Rv	TCCAAGTCGTTGATGACTGC
FXGWattB1-S (forward)	GGGGACAAGTTTGTACAAAA
FXGWattB1-AS 351 (reverso)	GGGGACCACTTTGTACAAG

4.8. Avaliação da capacidade de dispersão da nanopartícula CS:dsRNA na superfície de folhas de algodão

A fim de verificar a capacidade de dispersão da nanopartícula CS:dsRNA na superfície de folhas de algodão, a quitosana foi marcada com o fluoróforo Rhodamina (Sigma). Para tanto, 100 mg de quitosana (95% desacetilada) foi dissolvida em 50 mL de ácido acético 0.1 M, gerando uma solução de quitosana 0.2% (2 mg/mL), que teve o pH ajustado para 5.5. O fluoróforo Rhodamina (1 mg) foi dissolvido em metanol e adicionado à solução de quitosana. A solução foi incubada em agitação por duas horas. Após esse período, a quitosana foi precipitada com acetona 4X, centrifugada e lavada duas vezes com acetona 80%. A quitosana precipitada e marcada com Rhodamina foi liofilizada e, em seguida, resuspendida em ácido acético 0.1 M, gerando uma solução de quitosana 0.2%. As nanopartículas foram preparadas como descrito em 4.3 utilizando a quitosana marcada com Rhodamina.

Nanopartículas marcadas, com e sem surfactante, foram aplicadas na forma de *spray* em folhas de algodão. Após uma hora, as folhas foram coletadas e analisadas em estereomicroscópio binocular fluorescente.

5. Resultados

5.1. Obtenção de nanopartículas e eficiência de ligação entre CS e dsRNA

Devido à carga positiva dos grupos amino da quitosana e à carga negativa dos grupos fosfato do dsRNA, as nanopartículas se formaram sozinhas por autor-montagem, devido a forças eletrostáticas. A razão ótima para a formação de nanopartículas ocorreu com 300 ng de

dsRNA, 500 ng de CS e concentração final de surfactante catiônico de 0.01%. O espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta mostrou nanopartículas esféricas ou elipsoidais com diâmetro aproximado de 280 nm. O potencial zeta dessas partículas foi de 27 mV (Figura 11). O dsRNA em análise possui aproximadamente 200 pares de base e é referente ao gene *quitina sintase II* do bicudo-do-algodoeiro, previamente validado por Macedo et al (2017).

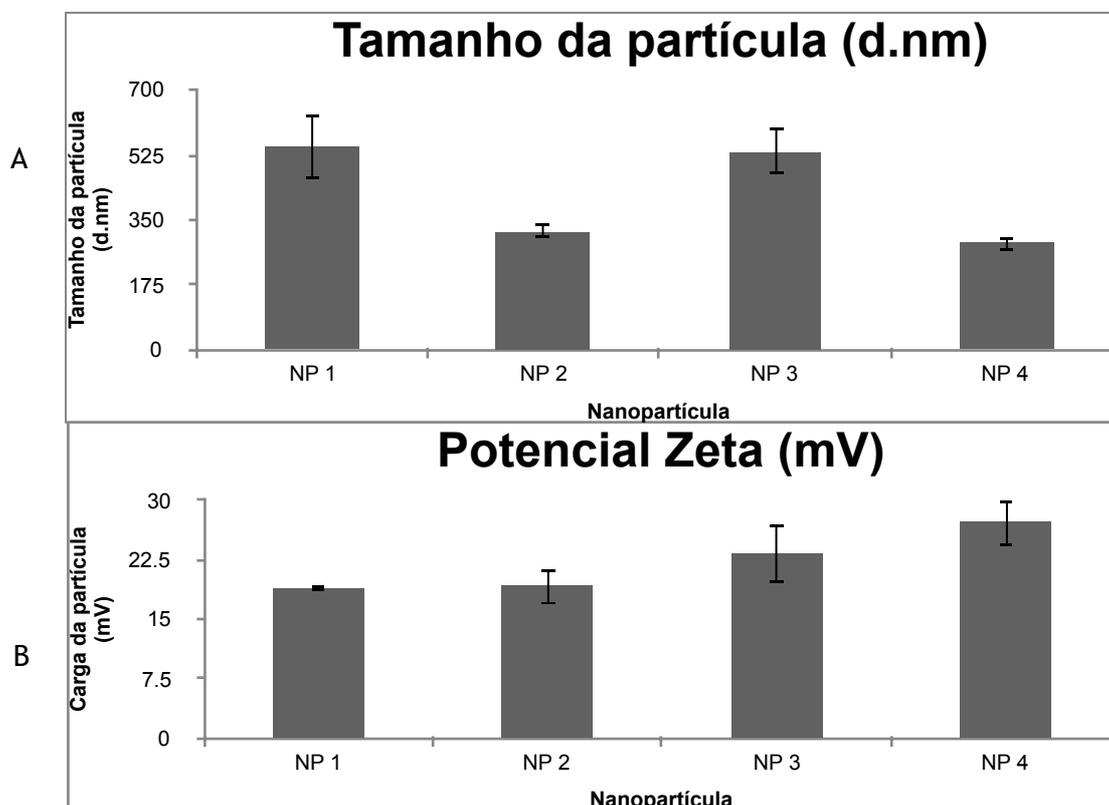


Figura 11. Tamanho e carga das nanopartículas de CS:dsRNA. O tamanho da partícula (A) bem como sua carga (B) foram medidos em diferentes concentrações de surfactante. NP 1: nanopartícula com surfactante 0.1%; NP 2: nanopartícula com surfactante 0.05%; NP 3: nanopartícula com surfactante 0.02%; NP 4: nanopartícula com surfactante 0.01%.

5.2. Capacidade de proteção do dsRNA pela CS na presença de homogenato intestinal de *A. grandis* in vitro

A fim de avaliar *in vitro* a eficiência de ligação da quitosana ao dsRNA, a nanopartícula foi incubada em diferentes concentrações de CS por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois do tempo corrido, foi adicionado homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro para validar se as nanopartículas são capazes de manter o dsRNA intacto na presença de nucleases. Mesmo em pequenas concentrações de quitosana, o dsRNA permanece intacto na presença de homogenato intestinal (Figura 12). Em altas concentrações de quitosana, não há migração do dsRNA, o qual fica retido no poço, tanto no controle quanto na presença de homogenato intestinal. Sem quitosana, o dsRNA é completamente degradado. Pode-se inferir que *in vitro*, mesmo em pequenas quantidades, a quitosana promove a proteção do dsRNA contra a degradação de nucleases presentes no intestino do bicudo-do-algodoeiro.

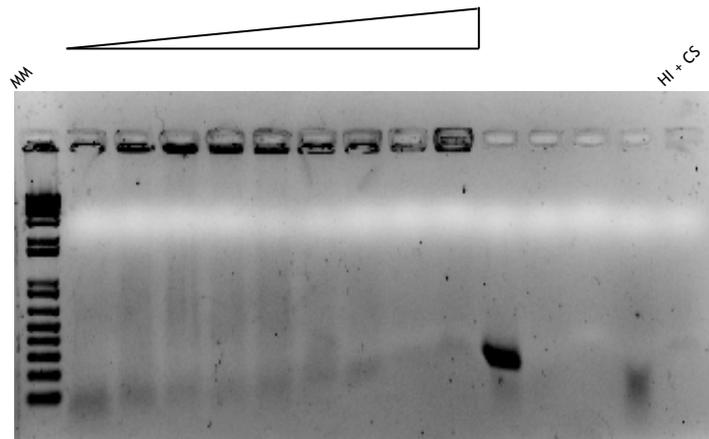


Figura 12. Análise da degradação da nanopartícula CS:dsRNA na presença de homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro. A concentração de dsRNA utilizada não variou (300 ng), ao passo que a concentração de quitosana aumentou (15 ng, 30 ng, 60 ng, 120 ng, 250 ng, 500 ng, 1000 ng, 2000 ng, 4000 ng). Pode-se observar a integridade do dsRNA na reação mesmo com 15 ng de quitosana, conferindo resistência à degradação de nucleases intestinais do inseto. MM: marcador molecular; HI: homogenato intestinal; CS: quitosana.

5.3. Efeito do silenciamento gênico mediado pela nanopartícula CS:dsRNA na expressão de Quitina sintase 2 do bicudo-do-algodoeiro

5.3.1. Pela alimentação - Nos experimentos anteriores foi demonstrado que a quitosana é capaz de proteger o dsRNA contra a degradação de nucleases intestinais de *A. grandis in vitro*, além de ser internalizada pelas células do intestino do inseto, via endocitose. Para avaliar se as nanopartículas de CS:dsRNA são capazes de causar a mesma proteção do dsRNA *in vivo*, as nanopartículas foram administradas via oral e o consequente silenciamento gênico de insetos adultos foi avaliado após 72 horas. O número de transcritos diminuiu pela metade, quando comparado ao dsRNA administrado sem estar incorporado na nanopartícula, e superior a cinco vezes comparado ao controle negativo (quitosana) (Figura 13A). Este resultado corrobora com os anteriores, demonstrando que, de fato, as nanopartículas protegem o dsRNA do ambiente hostil que é o intestino do inseto, além de serem internalizadas pelas células do intestino, sendo capazes de liberar o dsRNA, que promove o silenciamento gênico.

5.3.2. Pelo tegumento do inseto - Como as nanopartículas são capazes de penetrar as células do intestino do inseto, especulou-se se estas também não são capazes de serem internalizadas pelas células do tegumento do inseto. A fim de avaliar se as nanopartículas de CS:dsRNA são capazes de penetrar pelo tegumento do inseto, bicudos adultos foram submetidos a banhos de nanopartícula com *spray*, na concentração de 300 ng/ μ L de dsRNA e 500 ng/ μ L de quitosana. Os insetos foram analisados após 72 horas. Os dados mostram que houve o silenciamento gênico pela penetração da nanopartícula pelo tegumento do inseto, assim como pelo intestino (Figura 13B). Este resultado corrobora com a hipótese de que as nanopartículas de CS:dsRNA são um excelente método de controle de pragas quando aplicadas no campo, uma vez que ao serem aplicadas na forma de *spray*, estas penetrarão

pelo epitélio do inseto, além de também penetrarem pelas células do intestino quando o inseto se alimentar da planta tratada.

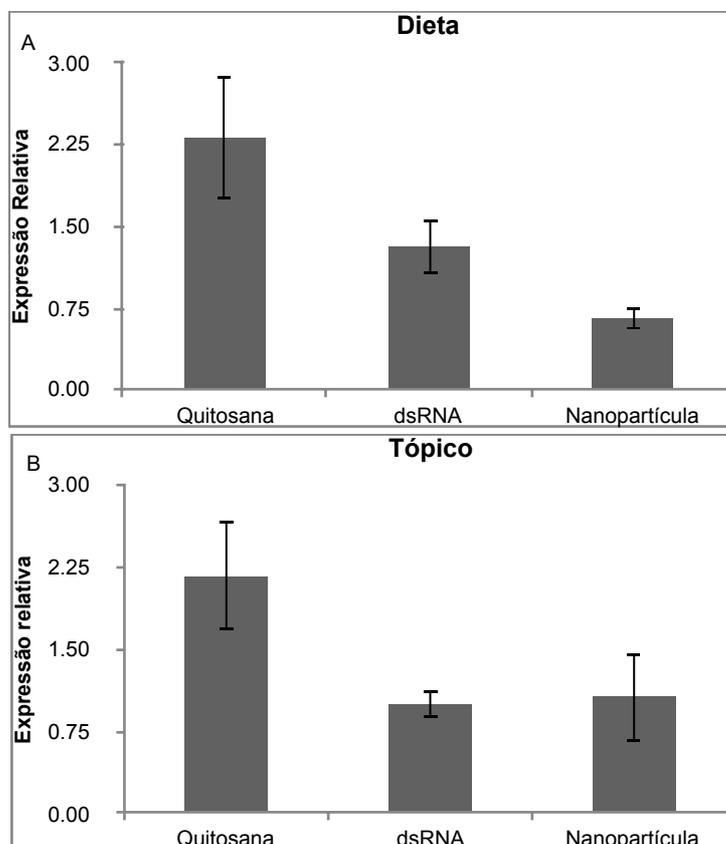


Figura 13. Análise da expressão gênica de *chitina sintase II* no bicudo-do-algodoeiro após administração de nanopartículas. As nanopartículas de CS:dsRNA-AgraChSII foram administradas ao bicudo-do-algodoeiro via oral (A) e em via tópica (B) a análise foi feita três dias após o tratamento. O experimento foi realizado em triplicata biológica e triplicata técnica. Actina e Tubulina foram usados como genes de referência.

5.4. A nanopartícula é capaz de ser aplicada e permanecer na folha de algodão devido ao surfactante catiônico

Foi verificado que a suspensão de nanopartículas contendo surfactante catiônico foi capaz de se dispersar de maneira uniforme pela superfície da folha de algodão (Figura 14). Nanopartículas sem surfactante, por outro lado, se agregaram no local de aplicação da folha. Assim sendo, o uso de surfactantes catiônicos como a isopropilamina estabiliza a nanopartícula e permite que esta se espalhe adequadamente na superfície foliar.

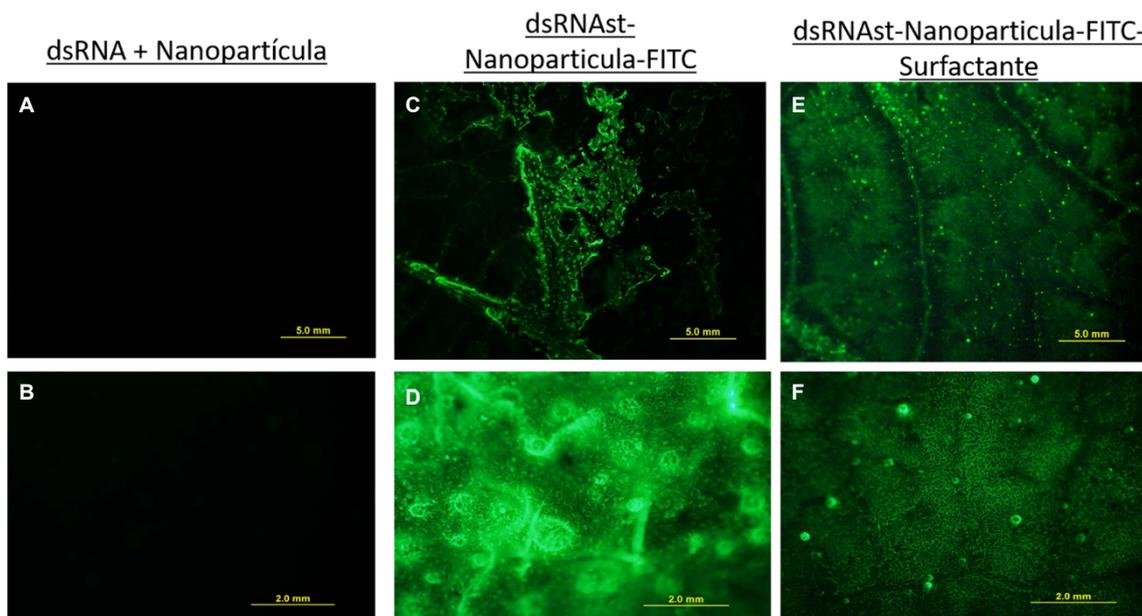


Figura 14. Análise da capacidade de dispersão da nanopartícula na superfície de folhas de algodão. As nanopartículas com e sem surfactante catiônico foram marcadas com Rhodamina e administradas na superfície de folhas de algodão. Como controle, foi utilizada a nanopartícula sem o fluoróforo (A e B) e a nanopartícula sem surfactante (C e D), onde mostraram uma dispersão não uniforme na superfície da folha de algodão. Em contrapartida, as nanopartículas contendo surfactante se espalharam de maneira uniforme na superfície da folha de algodão (E e F).

6. Discussão e conclusão

O estudo referente a este capítulo descreve sobre a proteção de dsRNA com nanopartículas de quitosana e sua administração oral e tópica ao bicudo do algodoeiro. Moléculas de dsRNA possuem uma meia-vida curta, baixa resistência a nucleases e difícil internalização celular (Cavallaro et al, 2017). A inovação do método descrito é a efetividade da entrega oral de dsRNA ao bicudo-do-algodoeiro, protegendo-o da ação de nucleases com nanopartículas de quitosana, o que já foi demonstrado em dípteros (Zhang et al, 2010; Das et al, 2015). A proteção do dsRNA com quitosana prolonga seu tempo de circulação e melhora sua entrega celular, o que já foi observado também em células de mamíferos (Sun et al, 2016; Rudzinski et al, 2016; van Woensel et al, 2016; Xiao et al, 2016; Babu & Ramesh, 2017; Zhang et al, 2017).

O bicudo-do-algodoeiro é um inseto-praga de difícil controle e seu manejo se dá principalmente com o uso de inseticidas químicos (Neves et al, 2014; Spurgeon, 2015; Grigolli et al, 2016). Estes inseticidas químicos fazem mal ao meio ambiente e, por isso, cientistas estão desenvolvendo novas abordagens biotecnológicas, visando aumentar a produtividade das culturas à campo e controlar insetos-praga. Apesar de estudos estarem sendo realizados com o melhoramento de toxinas Cry e plantas transgênicas tendo como alvo o bicudo-do-algodoeiro (Oliveira et al, 2016; Ribeiro et al, 2017), é importante desenvolver outras estratégias devido à plasticidade genética dos insetos (Showler, 2009; Pimenta et al, 2016). O uso excessivo de plantas GM expressando toxinas Cry causou uma pressão seletiva nos insetos, produzindo fenótipos resistentes (Siegfried & Jurat-Fuentes, 2016; Peralta & Palma, 2017). Esta resistência a toxinas Cry já foi relatada em populações de *D. virgifera* (Gassmann, 2012; Andow et al, 2016; Jakka et al, 2016), *O. nubilalis* (Siegfried et al, 2013), *H. armigera*

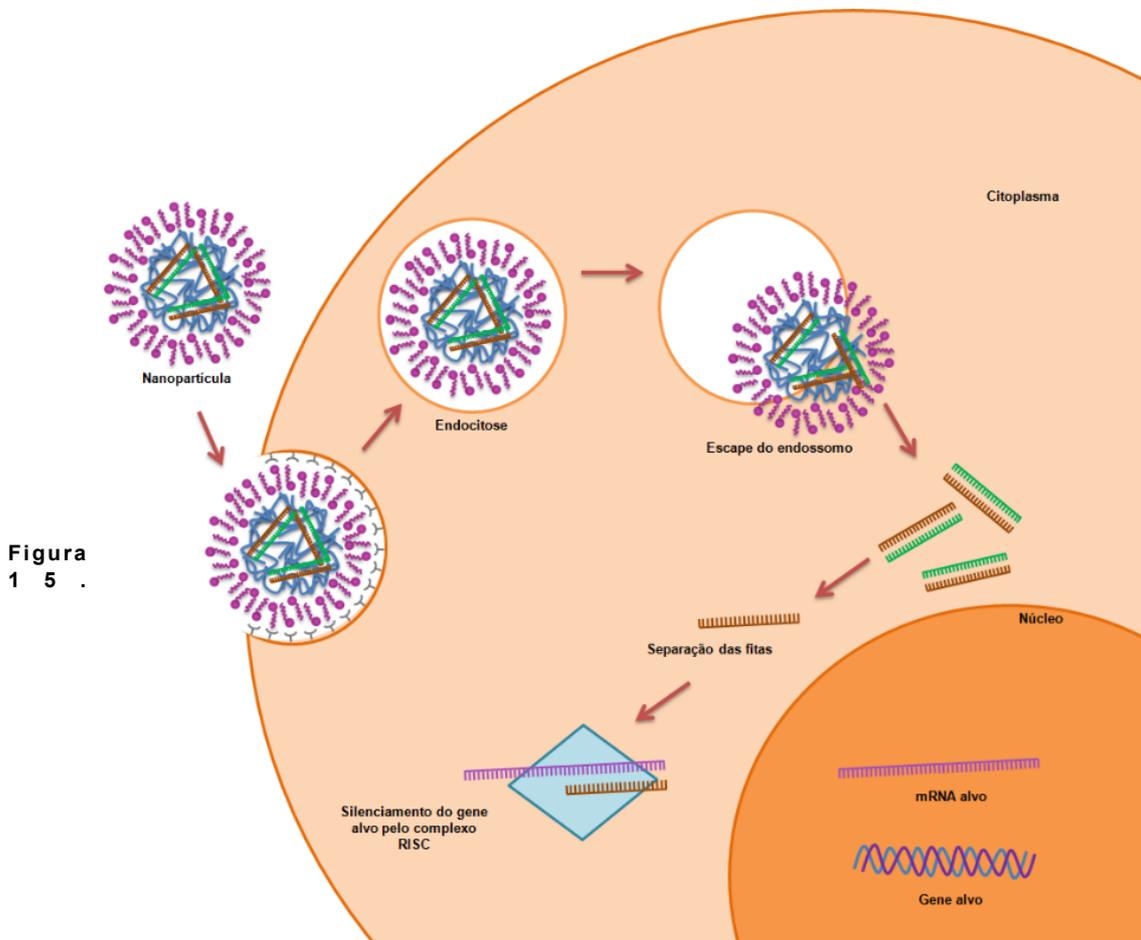
(Downes & Mahon, 2012 a,b), *H. Zea* (Dively et al, 2016; Pan et al, 2016) e *S. frugiperda* (Santos-Maya et al, 2015; Omoto et al, 2015; Horikoshi et al, 2016). Assim sendo, a tecnologia do RNAi é uma estratégia alternativa que vem sendo estudada e aplicada para controlar insetos-praga, pensando no aparecimento de resistência a longo prazo.

O potencial uso de RNAi como técnica de manejo de pragas precisa ser avaliada com muito cuidado, sendo crucial melhor compreender os componentes chave de sua via. Apesar de existirem muitos estudos promissores de plantas transgênicas expressando dsRNA inseticida (Mao et al, 2007; Zhang et al, 2015; Bally et al, 2016), o mecanismo molecular do RNAi sistêmico e da internalização de dsRNA não são muito bem conhecidos em insetos (Swevers et al, 2013). Alguns insetos são menos sensíveis à ingestão de dsRNA que outros (Baum et al, 2007; Christiaens et al, 2014; Shukla et al, 2016) e essa falta de sensibilidade é devido à presença de enzimas capazes de degradar nucleotídeos no suco gástrico de alguns insetos, baixa internalização de dsRNA pelas células do intestino e tamanho do dsRNA (Bolognesi et al, 2012; Katoch e Thakur, 2013; Miller et al, 2012). Assim sendo, o intestino do inseto é uma importante barreira para a entrega eficaz de dsRNA (Price & Gatehouse, 2008; Katoch e Thakur, 2012), sendo de extrema importância melhor compreender esse mecanismo. Além disso, a produção de uma planta GM que expresse dsRNA inseticida demanda tempo maior até que seja aprovada e liberada para comercialização. Uma alternativa à produção de plantas GM é usar o dsRNA como inseticida, na forma de *spray*. Apesar do potencial, deve-se considerar que o dsRNA pode ser degradado no meio ambiente, que é rico em nucleases, além do ambiente hostil que é o lúmen do intestino dos insetos. A fim de contornar essa degradação, o dsRNA pode ser encapsulado por partículas de quitosana (Zhang et al, 2010; Koch et al, 2016; Li et al, 2016; Wang & Jin, 2017).

Estudos realizados envolvendo terapia gênica demonstraram que nanopartículas de quitosana são capazes de realizar a entrega de siRNAs às células, causando significativo silenciamento gênico (Gharehdaghi et al, 2014; He et al, 2015). Extrapolando para o controle de insetos-praga, pode-se usar a mesma estratégia. Neste contexto, este estudo permite o desenvolvimento de um mecanismo carreador de dsRNA, além de ser capaz de protegê-lo. Os resultados mostraram a eficiência das nanopartículas de quitosana e dsRNA em controlar o bicudo-do-algodoeiro por RNAi. Um estudo parecido foi realizado com *A. gambiae*, mostrando o potencial de aplicação de quitosana para controle de insetos como um método não invasivo, como é o caso da microinjeção de dsRNA, e eficiente (Zhang e tal, 2010). Outros estudos mostrando resultados similares e promissores também foram realizados com *A. aegypti* e *A. gambiae* (Das et al, 2015; Zhang et al, 2015). Entretanto, até o presente momento, não há estudos que relacionam o uso de nanopartícula de quitosana a coleópteros. Além disso, a quitosana promove o aumento do crescimento da planta, além de proteger contra a ação de diversos microrganismos (Nge et al, 2006; Jose et al, 2012), podendo ser utilizada também para a liberação controlada de fertilizantes (Chauhan et al, 2016; Perez & François, 2016).

Pode-se inferir que as nanopartículas de quitosana, além de protegerem o dsRNA da degradação de nucleases presentes no ambiente e no intestino do inseto, também facilitam a entrada do dsRNA nas células intestinais dos insetos, pela via de endocitose. Após a ruptura do

endossomo, a nanopartícula é capaz de liberar o dsRNA no citoplasma da célula (Nogueira et al, 2015). As nanopartículas podem ser usadas no campo, na forma de *spray* (Koch et al, 2016; Wang & Jin, 2017), dispensando a produção de plantas transgênicas que produzam dsRNA inseticida. Na mesma perspectiva pode-se extrapolar esses dados e utilizar quitosana para encapsular toxinas Cry, por exemplo.



Hipótese de internalização celular da nanopartícula de CS:dsRNA:surfactante. Nanopartículas de carga positiva interagem com os proteoglicanos da membrana celular e são internalizadas pela célula, por endocitose. O endossomo sofre acidificação, mudando de pH e o conteúdo do endossomo é liberado no citosol, causando o silenciamento gênico do gene-alvo.

7.Perspectivas

Este estudo ainda tem como perspectiva mostrar se as nanopartículas de quitosana são internalizadas pelas células do intestino do bicudo-do-algodoeiro, por meio de endocitose, em estudos de microscopia confocal, além de mostrar o potencial de aplicação das nanopartículas em nível de campo, testando em folhas de algodão, seguida da alimentação pelo inseto-alvo. Outros tipos de formulação de nanopartícula estão sendo avaliadas contra *A. grandis* e outros insetos, incluindo *S. frugiperda* e *H. armigera*, tanto para uso tópico como por dieta artificial.

Capítulo III - Validação do complexo ribonucleoprotéico PTD-DRBD:dsRNA no bicudo-do-algodoeiro

1. Introdução

É descrito na literatura que o CPP TAT (transativador da transcrição) - RKKRRQRRR - ou PTD (domínio de transdução), proveniente do vírus da imunodeficiência humana (HIV), possui a capacidade de entregar macromoléculas às células, atravessando sua membrana (Baoum et al, 2012; Kawabata et al, 2012; Alhakamy & Berkland, 2013; Dinca et al, 2016; Ishiguro et al, 2017). O PTD foi usado para entregar diversos tipos de macromoléculas, incluindo peptídeos (Chu et al, 2017), nanopartículas de ouro (Huang et al, 2016; Wang et al, 2017) e de ferro (Zhao et al, 2016), hormônio (Zhou et al, 2016) e siRNAs (Eguchi et al, 2009; Eguchi et al, 2010; Ishiguro et al, 2017). Entretanto, a conjugação direta de PTD a siRNAs causa a precipitação das moléculas, resultando em baixo rendimento da entrega do siRNA à célula e em alta citotoxicidade (Eguchi & Dowdy, 2010). Alguns estudos mostram que modificações estruturais no peptídeo PTD podem melhorar a sua penetração nas células e sua entrega de macromoléculas (Eguchi et al, 2009; Bahadoran et al, 2016; Bivalkar-Mehla et al, 2016; Ishiguro et al, 2017).

Não se sabe ao certo como o PTD é internalizado pelas células, mas o modelo mais aceito é que seja por endocitose. Os resíduos de arginina carregados positivamente são responsáveis por interações eletrostáticas na superfície da célula com os lipídeos carregados negativamente. Após se ligar na superfície celular, o PTD é internalizado pela célula, formando endossomos. Após a internalização por endocitose, o PTD precisa ser capaz de escapar do endossomo para que a molécula seja liberada no citoplasma da célula ou no núcleo (Gump & Dowdy, 2007; Zhang et al, 2012; Zhang et al, 2015c; Zou et al, 2016).

Eguchi et al (2009) geravam um peptídeo fusogênico PTD-DRBD, em que DRBD é um domínio de ligação a dsRNA proveniente da proteína kinase PKR. A PKR é um agente de resposta anti viral induzido por interferon que sofre dimerização e autofosforilação na presença de dsRNA (Bevilacqua & Cech, 1996). O domínio DRBD mascara a carga negativa do dsRNA, permitindo que o PTD faça a entrega eficiente do siRNA à célula (Eguchi & Dowdy, 2010). No presente estudo, PTD-DRBD foi capaz de entregar siRNAs às células, causando silenciamento gênico do gene-alvo de maneira eficiente e sem toxicidade. Como PTD-DRBD se liga ao dsRNA de maneira inespecífica, este é capaz de entregar qualquer dsRNA às células de interesse (Eguchi et al, 2009; Eguchi & Dowdy, 2010). Ainda, Zhou et al (2016) produziu plantas transgênicas que expressam PTD complexado ao hormônio de diapausa e administrou ao inseto-praga, *H. armigera*. Os resultados mostraram que houve aumento da estabilidade do hormônio, sendo uma maneira eficiente e de menor custo de controlar o inseto-praga alvo, quando comparada à síntese química do peptídeo.

Nessa perspectiva, a estratégia de usar moléculas de PTD-DRBD (Eguchi et al, 2009) pode ser aplicada biotecnologicamente contribuindo para a proteção de moléculas dsRNA contra degradação e sua entrega às células do inseto.

Estudos com plantas GM que expressam dsRNA contra insetos-praga estão sendo bastante estudadas (Baum et al, 2009; Zhang et al, 2015; Meng et al, 2017; Niu et al, 2017). Apesar de seu potencial, essa estratégia também possui algumas limitações, que incluem a sensibilidade do dsRNA a nucleases, presentes no intestino do inseto alvo (Garcia et al, 2017) e a baixa penetração do dsRNA pela membrana celular (Bolognesi et al, 2012). Proteínas quiméricas podem ser produzidas em plantas, visando o transporte de moléculas, incluindo dsRNA (Zhou et al, 2016). O foco deste capítulo contribui para os estudos envolvendo a proteína quimérica PTD-DRBD, complexada ao dsRNA, formando uma ribonucleoproteína, aplicada ao controle do bicudo-do-algodoeiro. Os dados mostraram que a proteína é capaz de proteger o dsRNA contra a degradação de nucleases presentes no intestino do inseto, assim como ser internalizada pelas células do intestino, causando significativo silenciamento gênico do gene-alvo duas vezes maior, quando comparada ao dsRNA sem proteção. Atrair a produção desta proteína e de dsRNA inseticida por uma planta GM poderá contribuir para a melhoria da eficiência do dsRNA contra insetos-praga, representando, assim, uma estratégia molecular que poderá ser aplicada com finalidade de geração de produtos biotecnológicos.

2. Objetivo geral

O estudo tem como objetivo avaliar se o peptídeo fusogênico PTD-DRBD é capaz de entregar moléculas de dsRNAs às células do intestino do bicudo-do-algodoeiro, causando silenciamento gênico, além de proteger o dsRNA contra degradação de nucleases intestinais.

3. Objetivos específicos

- Produzir o complexo PTD-DRBD:dsRNA *in vitro*
- Validar a eficiência do complexo PTD-DRBD:dsRNA *in vitro*
- Validar a eficiência do complexo PTD-DRBD:dsRNA pela alimentação do bicudo-do-algodoeiro

4. Metodologia

4.1. Criação de bicudo-do-algodoeiro

Os insetos foram criados nos mesmos parâmetros de item 4.1. do Capítulo I.

4.2. Coleta do intestino médio do bicudo-do-algodoeiro, preparação das células em suspensão e coleta do homogenato intestinal

Insetos adultos foram colocados no gelo por 15 minutos, para imobilização. Após os 15 minutos, os élitros foram removidos e o inseto foi colocado em tampão fosfato pH 5.5 (Na₂HPO₂/KH₂PO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM e NaCl 137 mM) numa placa de Petri. Em seguida, a boca do inseto foi cortada e a cabeça foi separada cuidadosamente para expor o trato digestivo, até que ficasse completamente exposto. O intestino médio anterior (IMA) foi separado do restante do intestino do inseto por um corte longitudinal e lavado com tampão fosfato para eliminar o homogenato intestinal. O tecido foi transferido para um tubo Eppendorf

contendo tampão fosfato pH 5.5 e submetido aos experimentos. As células em suspensão do bicudo-do-algodoeiro foram obtidas deixando o tecido previamente coletado em agitação (100 rpm) em tampão fosfato pH 5.5 por aproximadamente 30 minutos, a temperatura ambiente. Para coletar o homogenato intestinal, foram usados os mesmos parâmetros de 4.2.

4.3. Clonagem molecular

Plasmídeos pUC57Kan contendo as sequências referentes a PTD-eGFP e PTD-DRBD foram sintetizados pela empresa Epoch Biolabs Inc (EUA). O plasmídeo pUC57Kan-PTD-eGFP foi digerido com a enzima de restrição *NcoI* (New England Biolabs) para gerar o plasmídeo pUC57Kan-eGFP. As construções foram clonadas no vetor pDEST24 (Invitrogen), usando a tecnologia de clonagem Gateway (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de PTD-eGFP e PTD-DRBD foram amplificados por PCR utilizando Taq Platinum Polymerase (Invitrogen) com primers FXGWattB1-S FWe FXGWattB1-AS 351 RV (Tabela 2). Cada construção foi inserida no vetor pDONR221 (Invitrogen), seguindo a reação BP-clonase, e no plasmídeo pDEST2,4 seguindo a reação LR.

4.4. Expressão e purificação das proteínas

Células de *Escherichia coli* da cepa BL21 (DE3) Codon Plus (RIL) da Novagen foram usadas para expressar as proteínas PTD-DRBD, PTD-eGFP e eGFP. As bactérias foram inoculadas em 600 mL de meio LB, em frascos de 2 L, e ficaram em agitação a 200 rpm, a 37°C. Quando a OD atingiu um valor entre 0.7 e 0.9, a expressão das proteínas foi induzida com 0.4 mM de IPTG por 16 a 18 horas. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm, a 4°C e resuspendidas em tampão A (TrisHCl 50 mM pH 7.6, NaCl 0.5M) num volume final 30 vezes menor que o volume inicial da cultura. As células foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

A extração foi sonicada três vezes em gelo, utilizando sonicador (Branson Digital) com a ponta cônica de 1/8" (20 % de amplitude, por 30" e intervalo de 20"). O extrato proteico foi centrifugado a 14000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em uma membrana de 0.45 µm de PVDF (Millipore). Todos os passos da purificação foram realizados em cromatografia líquida (FPLC) fast protein (AKTA pure 25L, GE Healthcare Life Sciences). O extrato proteico foi carregado numa coluna HisTrap FF 1 mL, pré equilibrada com tampão A e 5 % do tampão B (tampão A + imodazol 0.5 M). A coluna foi lavada com tampão A e a proteína recombinante foi eluída seguindo um gradiente linear do tampão B (5 - 100% por 30 CV - volume da coluna). As proteínas recombinantes foram carregadas diretamente numa coluna HisTrap FF SP 1 mL (GE Healthcare Life Sciences) pré equilibradas com tampão A. A eluição foi realizada com tampão C (tampão A + NaCl 2M), seguindo um gradiente não linear (40 % 3 CV, 50% 3 CV, 100% 3 CV). A última purificação consistiu de uma troca de tampões para PCS pH 7.4 (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM), utilizando uma coluna de dessalinização de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences). A proteína recombinante eGFP foi purificada seguindo a mesma metodologia, com exceção na parte de troca de íons, em que o gradiente de eluição foi linear parando em 50% do tampão C em 30 CV. A concentração das proteínas recombinantes foi

avaliada baseada na absorvância de luz UV e as proteínas foram alíquotadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

4.5. EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Os dsRNAs utilizados nos experimentos foram adquiridos da empresa Genolutions Pharmaceuticals Inc. O EMSA foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Hellman & Fried (2007). As proteínas recombinantes (PTD-DRBD, PTD-eGFP eeGFP), armazenadas a -80°C, foram incubadas no gelo por uma hora, antes dos experimentos serem realizados. Os dsRNAs e as proteínas recombinantes foram diluídos nas concentrações desejadas em um tampão de ligação (Tris-acetato 50 mM pH 7.4, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, BSA 0.1 mg/mL, glicerol 10%, NP-40 0.015% e NaCl 0.2 M). A reação foi misturada gentilmente e incubada em gelo por 20 minutos. Foi adicionado à reação glicerol 5% e a análise foi feita em um gel de acrilamida:bis-acrilamida 5% (75:1) em tampão TAE 1X. A eletroforese foi realizada a voltagem constante de 3.5 V/cm por 15 minutos e 7 V/cm por 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio por 10 minutos antes da detecção da fluorescência.

4.6. Degradação do dsRNA por nucleases

A benzonase (25KU, Novagen 71206-3) foi diluída em PBS pH 7.4 para obter concentrações entre 25 U e 0.65 U. As concentrações de PTD-DRBD e dsRNA foram de 3.5 µM e 0.4 µM, respectivamente. O complexo foi incubado com benzonase por 20 minutos à temperatura ambiente e a reação foi parada com tampão *stop-and-load* 3X. O resultado foi analisado em gel de agarose 1%. Para o ensaio com homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro, o complexo PTD-DRBD:dsRNA (3.5 µM e 0.2 µM, respectivamente) foi incubado com 5.5 µg de homogenato intestinal, numa reação final de 220 µL em tampão Tris pH 6.5. Em 20 minutos de reação amostras de 20 µL foram retiradas, foi adicionado tampão *stop-and-load* 3X e as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1%.

4.7. Microscopia confocal

Os ensaios foram realizados num microscópio confocal Leica SP8 utilizando objetivas de 20X (HCX PL APO CS 20x/NA 0.70 DRY) e 100X (HCX PL FLUOTAR 100x/NA 1.30 OIL). O dsRNA foi conjugado ao fluoróforo Cy3 (Mono-Reactive Dye pack Amersham, GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Os fluoróforos DAPI e FM4-64 foram usados para corar núcleo e membrana, respectivamente.

4.8. Administração do complexo PTD-DRBD:dsRNA-AgraChSII na dieta do bicudo-do-algodoeiro

Insetos adultos ficaram em jejum por 48 horas e depois desse período foram alimentados com complexo PTD-DRBD:dsRNA (7µM e 500ng, respectivamente) diluídos em solução de sacarose 5%. Após 48 horas, os insetos foram coletados e congelados em nitrogênio líquido. Para extração de RNA total, os insetos coletados foram pulverizados em

nitrogênio líquido e a extração foi realizada com TRIzol (Invitrogen), de acordo com o fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com o kit MMLV (Invitrogen) e o primer NVdT30(Tabela 2), de acordo com o fabricante.

4.9. Análise da expressão gênica de AgraChSII por RT-qPCR

O experimento foi realizado nos mesmos parâmetros de 4.6. do capítulo II.

5. Resultados

5.1. Formação do complexo PTD-DRBD:dsRNA

Sabe-se que as células do intestino de coleópteros são capazes de internalizar apenas dsRNAs longos, entre 60 e 200 nucleotídeos (Bolognesi et al, 2012). Contudo, o complexo PTD-DRBD:dsRNA foi apenas validado com pequenos RNAs, visando terapia gênica (Eguchi et al, 2009; Eguchi et al, 2010). Foi feito um ensaio EMSA (*electrophoretic shift mobility assay*) para determinar se PTD-DRBD é capaz de se ligar a longos dsRNAs, visando o controle de insetos-praga, mais especificamente, do coleóptero bicudo-do-algodoeiro. O ensaio foi realizado usando PTD-DRBD purificado de *E. coli* e dsRNA de aproximadamente 150 e 200 pares de base (Figura 16). O complexo proteína-dsRNA diminuiu na medida em que a concentração de PTD-DRBD aumentou. O mesmo resultado foi obtido tanto para o dsRNA de 150 pares de base, quanto para o de 200 pares de base, indicando que PTD-DRBD não é sequência específico. Foi observado que em baixas razões molares, de aproximadamente 3:1, o complexo ficou retido no poço, sugerindo que PTD-DRBD pode se ligar a mais de uma molécula de dsRNA. Estudos anteriores mostraram que as cargas positivas do PTD podem fazer com que este forme agregados, também se ligando a moléculas de dsRNA, e precipite (Eguchi & Dowdy, 2010). A fim de determinar o efeito do PTD na ligação do complexo PTD-DRBD ao dsRNA, foi realizado um EMSA com a proteína recombinante PTD-eGFP e com a proteína eGFP, que não se liga a dsRNA. O ensaio foi realizado nos mesmos parâmetros utilizados para PTD-DRBD. A ligação de PTD-eGFP ao dsRNA apareceu como um leve borrão e não foi detectada ligação alguma de eGFP ao dsRNA. Esses dados indicam que DRBD é o principal agente a se ligar ao dsRNA, mas que PTD também contribui para essa ligação e formação do complexo. Assim sendo, os resultados indicam que PTD-DRBD se liga a longos dsRNAs, de maneira dose dependente e sequência inespecífica.

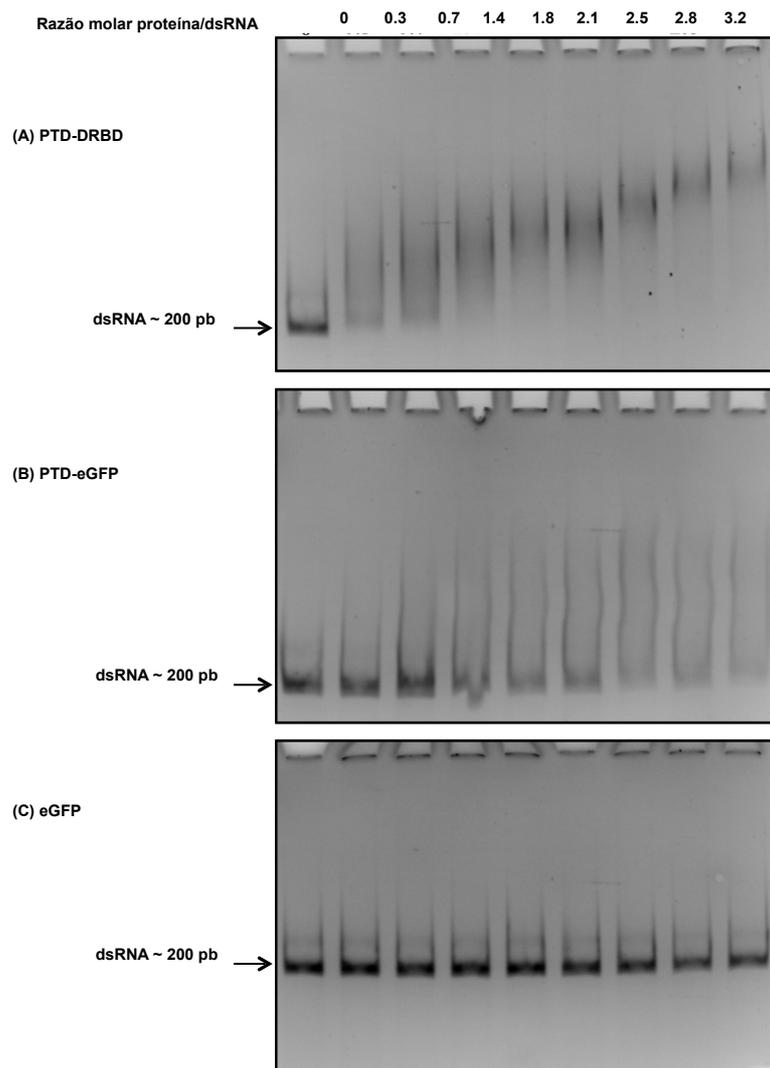


Figura 16. Análise da degradação do dsRNA em complexo com diferentes proteínas recombinantes. O EMSA foi realizado com diferentes concentrações de dsRNA/proteína (eGFP, PTD-eGFP e PTD-DRBD). A concentração do dsRNA foi constante (200 ng), enquanto a concentração de proteínas variou de 25 nM a 225 nM.

5.2. Estabilidade do complexo PTD-DRBD:dsRNA

O complexo PTD-DRBD:dsRNA precisa ser estável, uma vez que este será exposto a nucleases presentes no intestino do bicudo-do-algodoeiro. Assim sendo, especula-se que PTD-DRBD seja capaz de proteger o dsRNA da degradação de nucleases intestinais. Sabe-se que o bicudo-do-algodoeiro possui nucleases presentes em seu conteúdo intestinal (Garcia et al, 2017) e que RNAi não funciona por ingestão (Baum et al, 2007). Para testar a capacidade de proteção do PTD-DRBD ao dsRNA contra a ação de nucleases, o complexo foi incubado com benzonase, uma nuclease que possui similaridades com as nucleases encontradas no intestino do bicudo-do-algodoeiro. Em concentrações maiores de benzonase, o dsRNA só permaneceu intacto na presença de PTD-DRBD, mostrando que o peptídeo é capaz de proteger o dsRNA de ser degradado. Posteriormente, o complexo PTD-DRBD foi incubado com homogenato

intestinal do bicudo-do-algodoeiro e a degradação do dsRNA foi acompanhada ao longo de 20 minutos. Sem a presença de PTD-DRBD, observa-se a degradação do dsRNA, com um sinal muito fraco após 20 minutos. O sinal do dsRNA pode ser detectado após 20 minutos na presença de PTD-DRBD, apesar de o sinal ser fraco. Esses dados indicam que PTD-DRBD é capaz de diminuir a atividade nucleásica do homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro. (Figura 17).

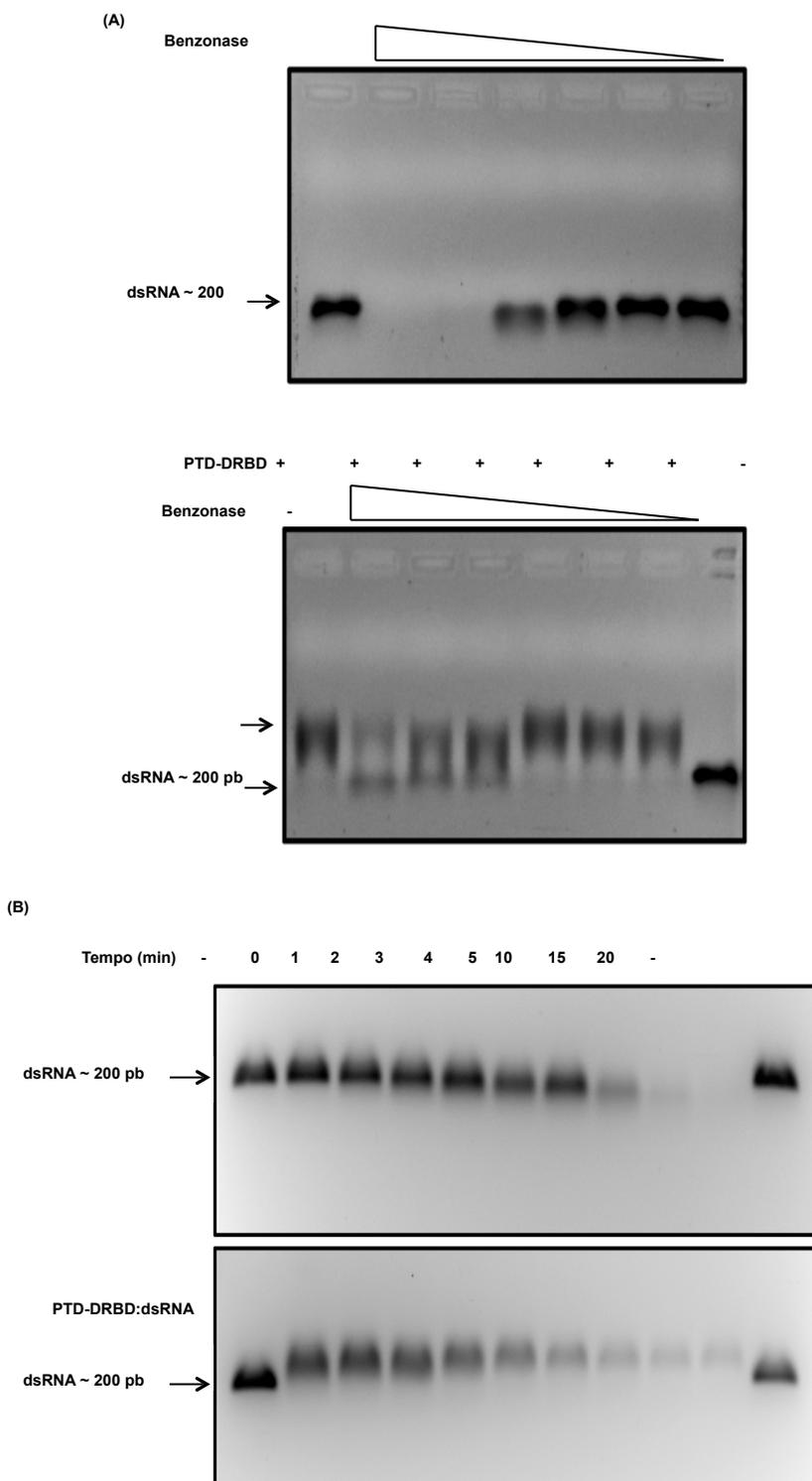


Figura 17. Degradação de dsRNA mediado por nucleases. O dsRNA foi incubado com benzonase, com diluição de 1 a 1:40 (A), sem e com PTD-DRBD (painel de cima e de baixo, respectivamente). O dsRNA também foi incubado com homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro (B), sem e com PTD-DRBD (painel de cima e de baixo, respectivamente).

5.3. Entrega intracelular realizada por PTD

A habilidade do PTD de fazer entregas intracelulares foi avaliada por microscopia confocal. Os experimentos foram realizados com o intestino médio do bicudo-do-algodoeiro dissecado e células em suspensão, tratados com DAPI e FM4-64 e os respectivos tratamentos. Primeiramente, o intestino do inseto foi tratado com eGFP, em que se pôde observar uma difusão no meio. No tratamento com PTD-eGFP pôde-se observar uma camada se formando ao redor da superfície celular e um padrão pontuado. Dentro da célula, o complexo PTD-eGFP ficou colocalizado com vesículas de tamanho aproximado de 5 μm . O próximo passo foi avaliar como a célula se comportaria na presença de PTD, a fim de estabelecer o tempo necessário para sua internalização pela célula. Para tal, PTD-eGFP foi adicionado às células em suspensão do intestino do bicudo-do-algodoeiro. Após dois minutos do tratamento (tempo necessário para ajustar os parâmetros do microscópio), foi possível identificar PTD-eGFP aglomerado na superfície celular e em colocalização com vesículas dentro da célula (Figura 18).

A fim de avaliar a internalização do complexo PTD-DRBD:dsRNA, o intestino médio do bicudo-do-algodoeiro foi incubado com o complexo PTD-DRBD:dsRNA-Cy3 e com dsRNA-Cy3, como controle. No tratamento controle, dsRNA-Cy3 foi detectado no citoplasma com sinal difuso e no núcleo, colocalizado com DAPI. No tratamento com PTD-DRBD:dsRNA-Cy3 pôde-se observar partículas concentradas na superfície da membrana celular, criando uma camada de 0.5 a 2.0 μm . As partículas se associaram a extensões da membrana celular e vesículas, como observado com PTD-eGFP. Esses dados sugerem que PTD-DRBD é capaz de internalizar dsRNA em células do intestino do bicudo-do-algodoeiro, via endocitose (Figura 19).

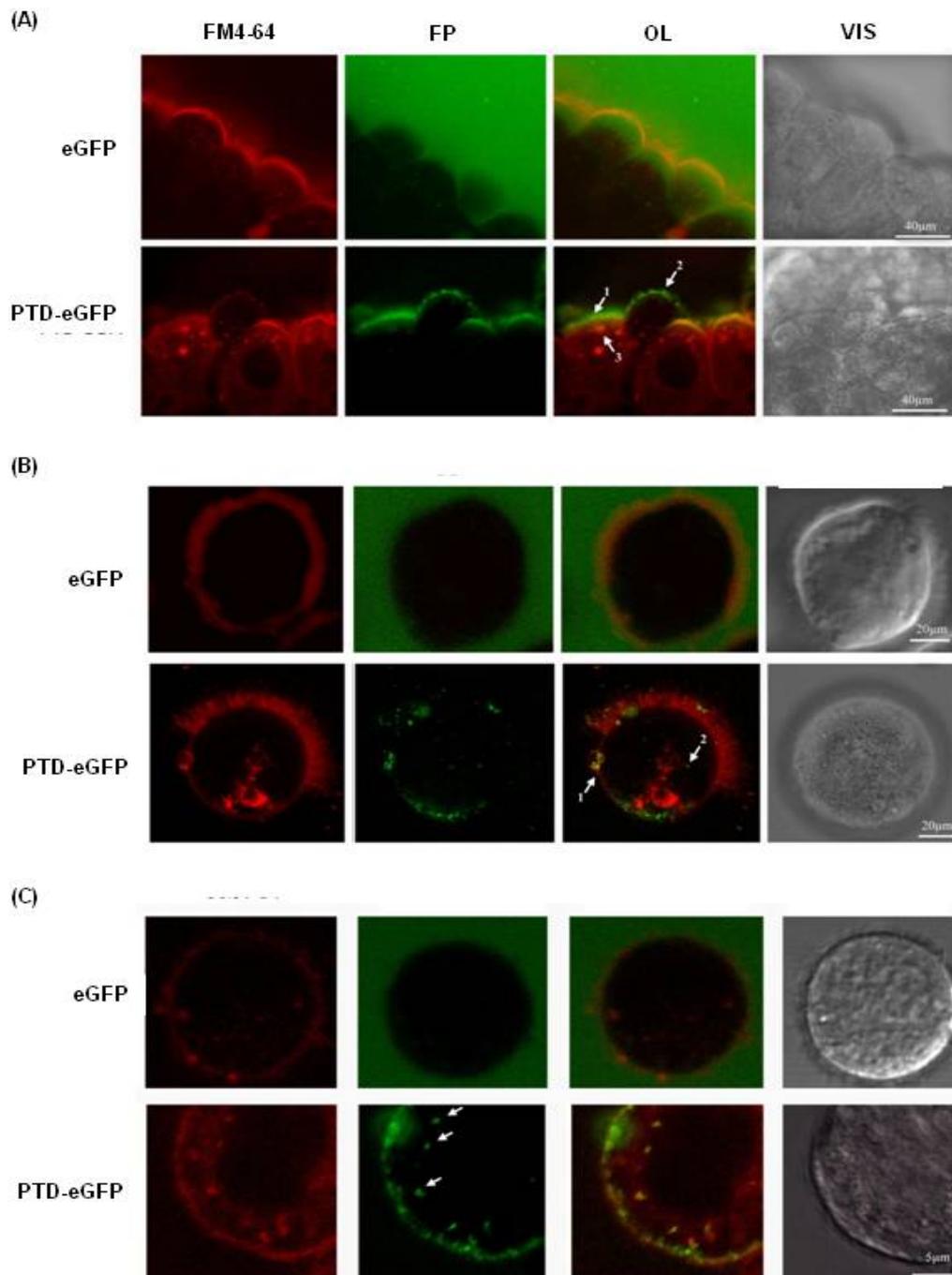


Figura 18. Intestino médio anterior do bicudo-do-algodoeiro e células em suspensão Sf9 tratadas com PTD-eGFP. O IMA do bicudo-do-algodoeiro foi tratado com o marcador fluorescente FM4-64 (vermelho) e incubado com PTD-eGFP e eGFP. (A) Pode-se observar a formação de uma camada de PTD-eGFP na superfície da membrana celular (1), colocalização de PTD-eGFP com FM4-64 (2) e endovesícula (3). (B) Pode-se observar uma modificação na membrana plasmática (1) e colocalização de PTD-eGFP com uma endovesícula (2). (C) Células em suspensão Sf9 foram tratadas com PTD-eGFP, em que as flechas indicam pequenas endovesículas em colocalização com PTD-eGFP. OL: overlay (sobreposição), FP: fluorescent protein (proteína fluorescente), Vis: luz visível.

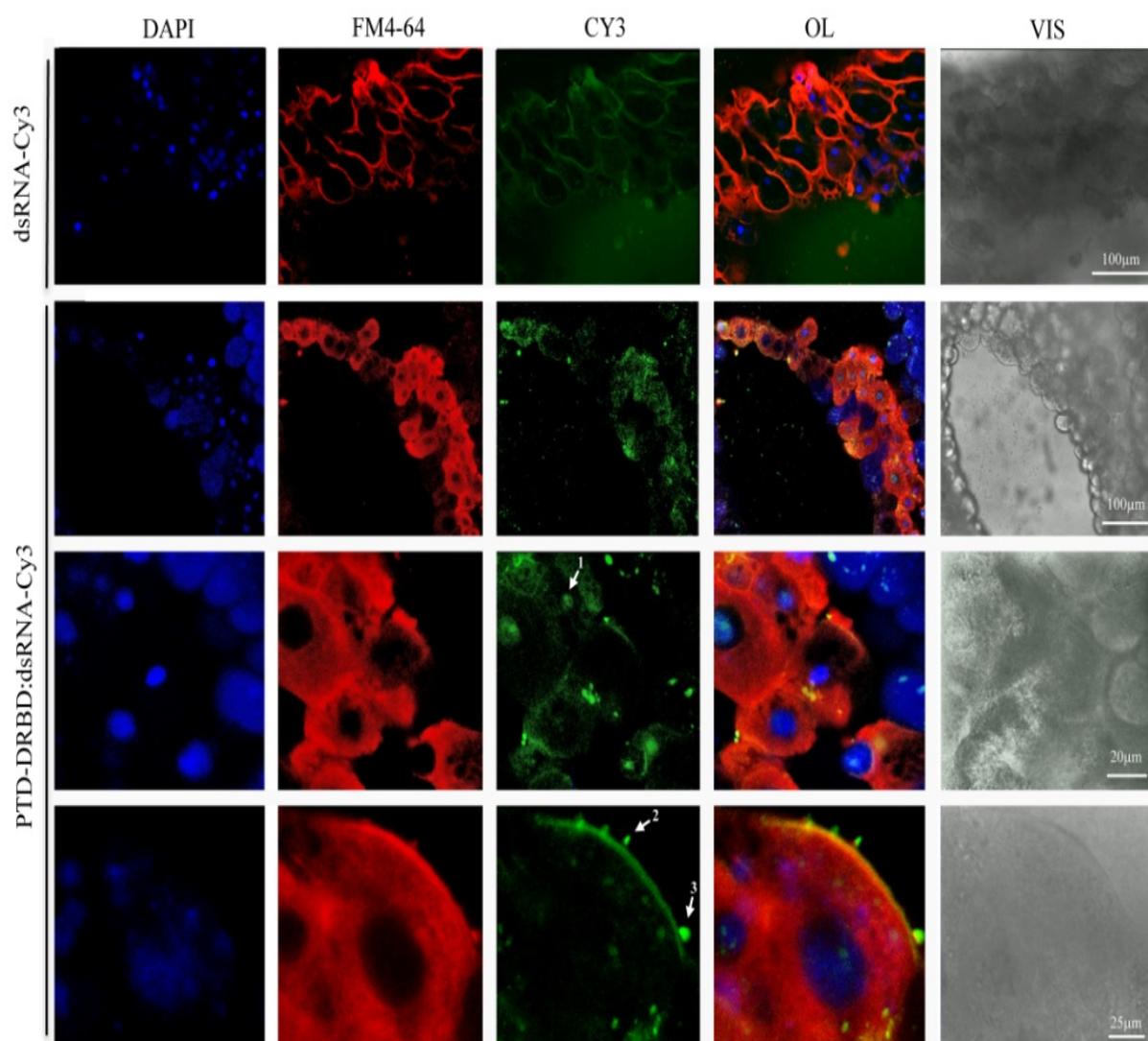


Figura 19. Internalização do complexo PTD-DRBD:dsRNA pelas células do intestino do bicudo-do-algodoeiro. O IMA do bicudo-do-algodoeiro foi previamente tratado com os marcadores fluorescentes FM4-64 (vermelho) e DAPI (azul) antes de ser tratado com o complexo PTD-eGFP:dsRNA-Cy3. Pode-se observar a presença de dsRNA no núcleo (1), em colocalização com extensões da membrana celular (2) e em endovesículas (3). DAPI: corante azul para o núcleo, Cy3: proteína fluorescente em verde, OL: overlay (sobreposição), Vis-DIC: luz visível por interferência diferencial de contraste.

5.4. Administração oral do complexo PTD-DRBD:dsRNA ao bicudo-do-algodoeiro

Foi observado que PTD-DRBD é capaz de contribuir positivamente para a entrega do dsRNA às células intestinais do bicudo-do-algodoeiro *in vitro*. Posteriormente, foi avaliado o comportamento do complexo *in vivo* e se este era capaz de causar melhoria no silenciamento gênico no inseto. Para esses experimentos, foi utilizado um dsRNA de aproximadamente 200 pares de base para o gene *quitina sintase II* do bicudo-do-algodoeiro (*AgraChSII*), que foi validado anteriormente pelo grupo de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa Cenargen (Macedo et al, 2017). Insetos adultos foram deixados sem alimentação por 48 horas e, em seguida, alimentados com o complexo PTD-DRBD:dsRNA, numa solução de sacarose 5%. O

nível da expressão dos transcritos referentes à *AgraChSII* foi avaliado por RT-qPCR após 48 horas de alimentação. A expressão de *AgraChSII* foi aproximadamente 1.5 vezes menor que os controles (sacarose 5% e PTD-DRBD). Já a administração do complexo PTD-DRBD:dsRNA levou à expressão de *AgraChSII* seis vezes menor, quando comparado aos controles. Esse dado sugere que o dsRNA em complexo com PTD-DRBD aumenta o silenciamento gênico no bicudo-do-algodoeiro (Figura 20).

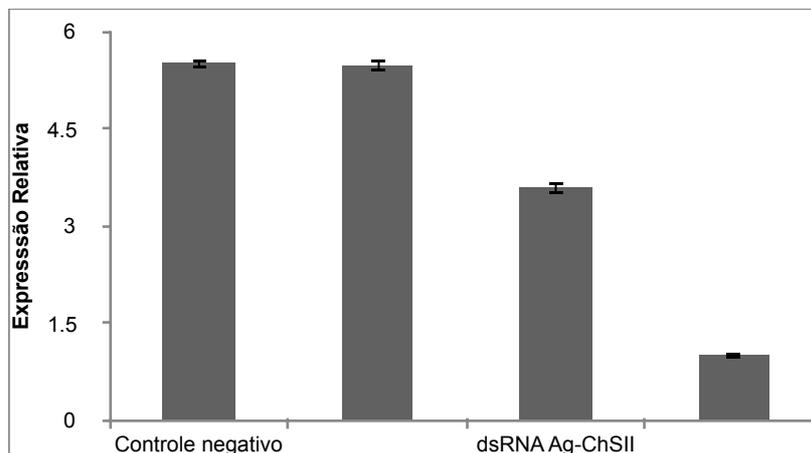


Figura 20. Expressão relativa do gene *AgraChSII* do bicudo-do-algodoeiro adulto por RT-qPCR após a ingestão do complexo PTD-DRBD:dsRNA. O complexo PTD-DRBD:dsRNA foi administrado ao bicudo-do-algodoeiro via oral e a análise foi realizada dois dias após o tratamento. O experimento foi realizado em triplicata biológica e triplicata técnica. Os genes β -actina e β -tubulina foram utilizados como genes de referência.

6. Discussão e Conclusão

Um dos maiores desafios associados ao RNAi aplicado ao controle de insetos-praga é a estabilidade do dsRNA no intestino do inseto, que é um ambiente rico em nucleases (Wynant et al, 2014; Garcia et al, 2017). No estudo aqui apresentado foi mostrado que o CPP PTD fusionado a um domínio de ligação a dsRNA (DRBD) é capaz de contribuir para a melhoria da entrega de dsRNA às células do inseto alvo, por via oral, além de melhorar sua estabilidade no ambiente hostil que é o lúmen intestinal do inseto, aumentando sua estabilidade.

Estudos anteriores, principalmente relacionados à terapia gênica, mostraram que o CPP PTD modificado ou fusionado a outros peptídeos é capaz de entregar biomoléculas às células, como, por exemplo: nanopartículas de $\text{SiO}_2@Fe_3O_4$ (Zhao et al, 2016) e de ouro (Wang et al, 2017), peptídeos (Chu et al, 2017), DNA (Bahadoran et la, 2016) e siRNAs (Eguchi & Dowdy, 2010). Dados recentes do estudo de PTD em insetos de Zhou et al (2016) mostraram que o PTD ligado ao hormônio da diapausa de *H. armigera*, e administrado ao inseto via oral, é capaz de persistir no intestino do inseto sem sofrer degradação, inibindo o crescimento da larva.

Os resultados do presente estudo mostraram que as células do intestino do bicudo-do-algodoeiro são capazes de internalizar PTD, num espaço de tempo muito curto, num mecanismo que parece ser endocitose ou macropinocitose. Alguns modelos sobre como PTD é internalizado pelas células foram propostos e o mais aceito é pelo mecanismo de

macropinocitose (Gump & Dowdy, 2007). Devido à alta carga positiva do PTD, ocorrem interações eletrostáticas com organelas de carga negativa da superfície da membrana celular (Figura 21), como lipídeos, fosfolipídeos e proteoglicanos (Erazo-Oliveras et al, 2012; Zhang et al, 2012; Kim et al, 2014). O mecanismo de endocitose gera endossomos com diâmetro abaixo de 0.2 μm , enquanto macropinocitose gera vesículas com tamanhos variando de 5 a 10 μm . Nossos resultados mostraram vesículas de 600 nm a 2 μm , sugerindo que PTD-DRBD pode estimular o processo de macropinocitose em células do intestino do bicudo.

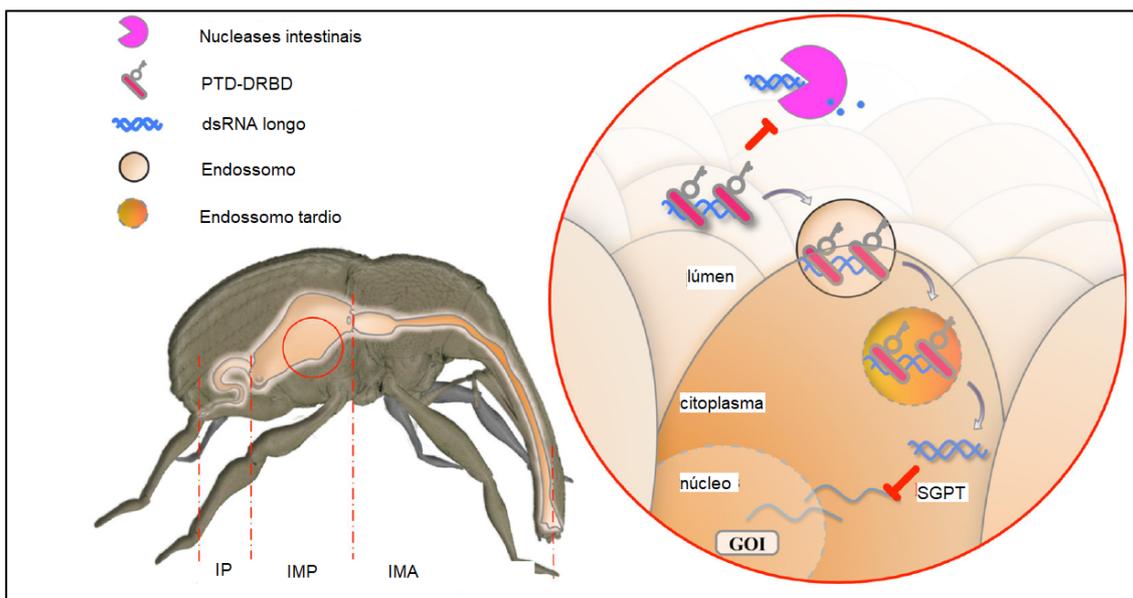


Figura 21. Modelo do mecanismo de entrega oral do dsRNA complexo ao PTD-DRBD ao bicudo-do-algodoeiro. No intestino médio posterior (IMP), o dsRNA é protegido pelo PTD-DRBD, o que limita sua degradação pelas nucleases produzidas no intestino. PTD estimula a endocitose na membrana celular, formando endossomos, permitindo que a ribonucleoproteína dsRNA:PTD-DRBD seja endocitada. A maturação do endossomo leva à sua acidificação, o que ativa o peptídeo fusogênico. A liberação do dsRNA no citoplasma desencadeia o silenciamento gênico pós transcricional (SGPT) do gene de interesse (GOI) de maneira sequência-específica (Gillet et al, 2017).

Assim como PTD, existem outros CPPs ricos em arginina que podem ser estudados para entrega de biomoléculas, como dsRNAs. Alguns exemplos são: ATF (fator de transcrição de antenapedia de *Drosophila*) e M918 (derivado do supressor de tumor p14ARF) (Chugh et al, 2010; Li et al, 2015). Na mesma perspectiva, existem supressores virais de silenciamento (VSRs - *viral silencing* suppressor) que atuam como DRBDs, ligando-se a dsRNAs de diferentes maneiras, proporcionando novas perspectivas para sua proteção. O VSR mais estudado é o P19, proveniente de tombusvirus, que se liga a siRNAs de 21 nucleotídeos (Law et al, 2013; Kontra et al, 2016). Alguns trabalhos mostram que a proteína pode ser melhorada com fins biotecnológicos, aumentando sua afinidade por siRNAs (Cheng et al, 2011; Danielson et al, 2013). Diferentemente de P19, os VSRs 2B e B2, provenientes de *Tomato aspermy virus* e *Flock house virus*, respectivamente, se ligam tanto a siRNAs quanto a dsRNAs longos (Qi et al, 2011; Seo et al, 2012; Choi et al, 2014; Park et al, 2014). Sendo assim, existe uma vasta

gama de possibilidades e combinações de CPPs e DRBDs que podem ser utilizadas para a proteção do dsRNA para uso em biotecnologia, seja na agricultura ou em terapia gênica.

Além de ser capaz de fazer a entrega intracelular de dsRNA, o peptídeo fusogênico PTD-DRBD é capaz de liberar o dsRNA, a fim de que este atue na maquinaria do RNAi, promovendo o silenciamento gênico. Pode-se pensar na possibilidade de gerar plantas transgênicas que expressem PTD-DRBD como ferramenta molecular, visando melhorar a entrega e a proteção do dsRNA no controle de insetos-praga.

Estudos do presente projeto geraram uma prova de conceito, contribuindo para que PTD-DRBD possa ser utilizado no controle do bicudo-do-algodoeiro, uma vez que melhora a entrega de dsRNA e sua estabilidade no ambiente intestinal do inseto, promovendo significativo silenciamento gênico do gene-alvo. Os dados gerados abriram portas para se pensar no desenvolvimento de novos e melhores peptídeos fusogênicos para o mesmo fim.

7. Perspectivas

Em futuros estudos tem-se como uma das perspectivas de validar a produção de PTD-DRBD em plantas de tabaco, por transformação estável, via *Agrobacterium tumefaciens*, e avaliar se a proteína não causará nenhuma alteração fisiológica ou anatômica nas plantas transformadas.

Referências

- Acharya, R.; Saha, S.; Ray, S.; Hazra, S.; Mitra, M. K.; Chakraborty, J. siRNA-nanoparticle conjugate in gene silencing: A future cure to deadly diseases? *Materials Science and Engineering C*, 76, 1378 - 1400, 2017.
- Agrawal, N.; Sachdev, B.; Rodrigues, J.; Sree, K. S.; Bhatnagar, R. K. Development associated profiling of chitinase and microRNA of *Helicoverpa armigera* identified chitinase repressive microRNA. *Scientific Reports*, 3, 2292, 1-6, 2013
- Agrawal, A.; Rajamani, V.; Reddy, V. S.; Mukherjee, S. K.; Bhatnagar, R. K. Transgenic plants over-expressing insect-specific microRNA acquire insecticidal activity against *Helicoverpa armigera*: an alternative to Bt-toxin technology. *Transgenic Research*, 24, 5, 791 – 801, 2015.
- Al-Ayedh, H.; Rizwan-ul-Haq, M.; Hussain, A.; Aljabr, A. M. Insecticidal potency of RNAi-based catalase knockdown in *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver) (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science*, 72, 11, 2118 – 2127, 2016.
- Alhakamy, N. A.; Berkland, C. J. Polyarginine molecular weight determines transfection efficiency of calcium condensed complexes. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 1940 - 1948, 2013.
- Ali N, Datta SK, Datta K. RNA interference in designing transgenic crops. *GM crops*, 1, 4, 207 – 213, 2010.
- Allen, M.L.; Walker, W.B. 3rd. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. *Journal of insect physiology*, 58, 3, 391 – 396, 2012.
- Andow, D.A.; Pueppke, S.G.; Schaafsma, A.W.; Gassmann, A.J.; Sappington, T.W.; Meinke, L.J.; Mitchell, P.D.; Hurley, T.M.; Hellmich, R.L.; Pat Porter, R. Early detection and mitigation of resistance to Bt maize by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 109, 1, 1 – 12, 2016.
- Arakane, Y.; Specht, C.A.; Kramer, K.J.; Muthukrishnan, S.; Beeman, R.W. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38, 10, 959 – 962, 2008.
- Arimatsu, Y.; Kotani, E.; Sugimura, Y.; Furusawa, T. Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 37, 176 - 183, 2007.
- Arnold, A. E.; Czupiel, P.; Shoichet, M. Engineered polymeric nanoparticles to guide the cellular internalization and trafficking of small interfering ribonucleic acids. *Journal of Controlled Release*, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.02.019, 2017.
- Artico, S.; Ribeiro-Alves, M.; Oliveria-Neto, O. B.; Macedo, L. L. P.; Silveira, S.; Grossi-de-Sá, M. F.; Martinelli, A. P.; Alves-Ferreira, M. Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. *BMC Genomics*, 15, 854, 2 - 24, 2014.
- Attasart, P.; Boonma, S.; Sunintaboon, P.; Tanwilai, D.; Pothikasikorn, J.; Noonpakdee, W. T. Inhibition of *Plasmodium falciparum* proliferation in vitro by double-stranded RNA nanoparticle against malaria topoisomerase II. *Experimental Parasitology*, 164, 84 - 90, 2016.

Azambuja, R.; Degrande, P. E. Trinta anos do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81, 4, 377 – 410, 2014.

Babu, A.; Muralidharan, R.; Amreddy, N.; Mehta, M.; Munshi, A.; Ramesh, R. Nanoparticles for siRNA-based gene silencing in tumor therapy. *IEE Transactions on Nanobioscience*, 15, 8, 849 - 863, 2016.

Bahadoran, A.; Moeini, H.; Bejo, M. H.; Hussein, M. Z.; Omar, A. R. Development of Tat-conjugated dendrimer for transdermal DNA vaccine delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 19, 3, 325 - 338, 2016.

Bally, J.; McIntyre, G.J.; Doran, R.L.; Lee, K.; Perez, A.; Jung, H.; Naim, F.; Larrinua, I.M.; Narva, K.E.; Waterhouse, P.M. In-plant protection against *Helicoverpa armigera* by production of long hpRNA in chloroplasts. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1453, 1 – 9, 2016.

Baoum, A.; Ovcharenko, D.; Berkland, C. Calcium condensed cell peptide complexes offer highly efficient, low toxicity gene silencing. *International Journal of Pharmaceutics*, 427, 134 - 142, 2012.

Baum, J. A.; Bogaert, T.; Clinton, W.; Heck, G. R.; Feldmann, P.; Ilgan, O.; Johnson, S.; Plaetinck, G.; Munyikwa, T.; Pleau, M.; Vaughn, T.; Roberts, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature*, 25, 11, 1322 - 1326, 2007.

Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M. A.; Alkawareek, M. Y.; Dreaden, E. C.; Brown, D.; Alkilany, A. M.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Cellular uptake of nanoparticles; journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*. doi: 10.1039/c6cs00636a, 2017

Belot, J. L. O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle. *Boletim de P&D*, 2, IMAmt, 2015.

Bevilacqua, P. C.; Cech, T. R. Minor-groove recognition of double-stranded RNA by the double-stranded RNA-binding domain from the RNA-activated protein kinase PKR. *Biochemistry*, 35, 9983 - 9994, 1996.

Bivalkar-Mehla, S.; Mehla, R.; Chauhan, A. Chimeric peptide mediated siRNA transduction to inhibit HIV-1 infection. *Journal of Drug Targeting*, 4, 307 - 319, 2016.

Bolognesi, R.; Ramaseshadri, P.; Anderson, J.; Bachman, P.; Clinton, W.; Flannagan, R.; Ilgan, O.; Lawrence, C.; Levine, S.; Moar, W.; Mueller, G.; Tan, J.; Uffman, J.; Wiggins, E.; Heck, G.; Segers, G. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Plos One*, 7, 10, 1 - 11, 2012.

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

Burand, J.P.; Hunter, W.B. RNAi: future in insect management. *Journal of invertebrate pathology*, 112, S68 – S74, 2013.

Buttner, S.; Eisenberg, T.; Carmona-Gutierrez, D.; Ruli, D.; Knauer, H.; Ruckenstuhl, C. et al. Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Molecular cell*, 25, 2, 233 – 246, 2007.

Caldeira, W.; Dias, A.B.; Terra, W.R.; Ribeiro, A.F. Digestive enzyme compartmentalization and recycling and sites of absorption and secretion along the midgut of *Dermestes maculatus* (Coleoptera) larvae. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 64, 1, 1 – 18, 2007.

Caljon, G.; de Ridder, K.; Stijlemans, B.; Coosemans, M.; Magez, S.; de Baetselier, P.; van den Abbeele, J. Tsetse salivary gland proteins 1 and 2 are high affinity nucleic acid binding proteins with residual nuclease activity. *Plos One*, 7, 10, 2011.

Calvo, E.; Ribeiro, J. M. A novel secreted endonuclease from *Culex quinquefasciatus* salivary glands. *Journal of Experimental Biology*, 209, 2651 - 2659, 2006.

Campagne, P.; Capdevielle-Dulac, C.; Pasquet, R.; Cornell, S. J.; Kruger, M.; Silvain, J. F.; LeRu, B.; van den Ber, J. Genetic hitchhiking and resistance evolution to transgenic Bt toxins: insights from the african stalk borer *Busseola fusca* (Noctuidae). *Heredity*, 1 - 10, 2016.

Cappelle, K.; de Oliveira, C.F.; Van Eynde, B.; Christiaens, O.; Smagghe, G. The involvement of clathrin mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut. *Insect molecular biology*, 25, 3, 315 – 323, 2016.

Callavaro, G.; Sardo, C.; Craparo, E.F.; Porsio, B.; Giammona, G. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: production and applications. *International Journal of Pharmaceuticals*, 525, 2, 313 – 333, 2017.

Chauhan, N.; Dilbaghi, N.; Gopal, M.; Kumar, R.; Kim, K. H.; Kumar, S. Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 616 - 624, 2016.

Chen, J.S.; Revilla, A.C.; Guerrero, M.; Gumbayan, A.M.; Zeller, R.W. Properties and kinetics of microRNA regulation through canonical seed sites. *Journal of RNAi and gene silencing: an international journal of RNA and gene targeting research*, 11, 507 – 514, 2015.

Cheng, J.; Danielson, D. C.; Naseri, N.; Singaravelu, R.; Pezacki, J. P. Enhanced specificity of the viral suppressor of RNA silencing protein p19 toward sequestering of human microRNA-122. *Biochemistry*, 50, 7745 - 7755, 2011.

Chiappisi, L.; Gradzielski, M. Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 220, 92 - 107, 2015.

Choi, K. M.; Jang, M.; Kim, J. H.; Ahn, H. J. Tumor-specific delivery of siRNA supramolecular assembly of hyaluronic acid nanoparticles and 2b RNA-binding protein/siRNA complexes. *Biomaterials*, 35, 7121 - 7132, 2014.

Christiaens, O.; Swevers, L.; Smagghe, G. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides*, 53, 307 - 314, 2014.

Chu, Y.; Chen, N.; Yu, H.; Mu, H.; He, B.; Hua, H.; Wang, A.; Sun, K. Topical ocular delivery to laser-induced choroidal neovascularization by dual internalizing RGD and TAT peptide-modified nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1353 - 1368, 2017.

Chugh, A.; Eudes, F.; Shim, Y. S. Cell-penetrating peptides: nanocarrier for macromolecule delivery in living cells. *IUBMB Life*, 62, 3, 183 - 193, 2010.

Coelho, R. R., Souza Jr, J. D. A.; Firmino, A. A. P.; Macedo, L. L. P.; Fonseca, F. C. A.; Terra, W. R.; Engler, G.; Engler, J. A.; Silva, M. C. M.; Grossi-de-Sá, M F. Vitellogenin knockdown strongly

- affects cotton boll weevil viability but not the number of eggs laid by females. *Meta Gene* 9, 173 - 180, 2016.
- Connerty, P.; Ahadi, A.; Hutvagner, G. RNA binding proteins in the miRNA pathway. *Int J Mol Sci*, 17, 31, 1 - 16, 2016.
- Cymerman IA, Chung I, Beckmann BM, Bujnicki JM, Meiss G. EXOG, a novel paralog of Endonuclease G in higher eukaryotes. *Nucleic acids research*, 36, 4, 1369 – 1379, 2008.
- Danielson, D. C.; Pezacki, J. P. Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein. *FEBS Letters*, 587, 1198 - 1205, 2013.
- Das, S.; Debnath, N.; Cui, Y. C.; Unrine, J.; Palli, S. R. Chitosan, carbon quantum dot and silica nanoparticle mediated dsRNA delivery for gene silencing in *Aedes aegypti*: a comparative analysis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7, 35, 19530 - 19535, 2015.
- Davidson, B. L.; McCray Jr, P. B. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Reviews*, vol 12, 329 - 340, 2011.
- Deans, C. A.; Sword, G. A.; Behmer, S. T. Nutrition as a neglected factor in insect herbivore susceptibility to Bt toxins. *Current Opinion in Insect Science*, 15, 97 - 103, 2016.
- Deans, C. A.; Behmer, S. T.; Tessnow, A. E.; Tamez-Guerra, P.; Pusztai-Carey, M.; Sword, G. A. Nutrition affects insect susceptibility to Bt toxins. *Scientific Reports*, 7, 39705, 1 - 9, 2017.
- Dereeper, A.; Guignon, V.; Blanc, G.; Audic, S.; Buffet, S.; Chevenet, F. et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 4, 4, 2008.
- Dereeper, A.; Audic, S.; Claverie, J.M.; Blanc, G. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC evolutionary biology*, 10, 8, 2010.
- Dinca, A.; Chien, W. M.; Chin, M. T. Intracellular delivery of proteins with cell-penetrating peptides for therapeutic uses in human disease. *International Journal of Molecular Science*, 17, 263, 1 - 13, 2016.
- Dively, G. P.; Venugopal, P. D.; Finkenbinder, C. Field-evolved resistance in corn earworm to cry proteins expressed by transgenic sweet corn. *Plos One*, 11, 12, 1 - 22, 2016.
- Douglas, A. Alimentary canal, digestion and absorption. In: Simpson J, Douglas A, editors. *The Insects*. 5th ed. New York: Cambridge University Press; 2013.
- Dovrat, D.; Aharoni, A. Evolved to overcome Bt-toxin resistance. *Nature*, 533, 39 - 40, 2016.
- Dubelman, S.; Fischer, J.; Zapata, F.; Huizinga, K.; Jiang, C.; Uffman, J.; Levine, S.; Carson, D. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *Plos One*, 9, 3, 1 - 7, 2014.
- Downes, S.; Mahon, R. Success and challenges of managing resistance in *Helicoverpa armigera* to Bt cotton in Australia. *GM Crops & Food*, 3, 3, 228 – 324, 2012.
- Downes, S.; Mahon, R. Evolution, ecology and management of resistance in *Helicoverpa* ssp. to Bt cotton in Australia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 281 – 286, 2012.

- Dowdy, S. F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nature Biotechnology*, 35, 3, 222 - 229, 2017.
- Eguchi, A.; Meade, B. R.; Chang, Y. C.; Fredrickson, C. T.; Willert, K.; Puri, N.; Dowdy, S. F. Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nature Biotechnology*, 27, 6, 567 - 572, 2009.
- Eguchi, A.; Dowdy, S. F. Efficient siRNA delivery by novel PTD-DRBD fusion proteins. *Cell Cycle*, 9, 3, 424 - 425, 2010.
- Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes Development*, 15, 188 - 200, 2001.
- El-Shesheny, I.; Hajeru, S.; El-Hawary, I.; Gowda, S.; Killiny, N. Silencing abnormal wing disc gene of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality. *Plos One*, 8, 5, 1 - 8, 2013.
- Emanuelsson, O.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature protocols*, 2, 4, 953 – 971, 2007.
- Erazo-Oliveras, A.; Muthukrishnan, N.; Baker, R.; Wang, T. Y.; Pellois, J. P. Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: strategies and challenges. *Pharmaceuticals*, 5, 117 - 1209, 2012.
- Firmino, A. A. P.; Fonseca, F. C. A.; Macedo, L. L. P.; Coelho, R. R.; Souza Jr, J. D. A.; Togawa, R. C.; Silva-Junior, O. B.; Pappas-Jr, G. J.; Silva, M. C. M.; Engler, G.; Grossi-de-Sá, M. F. Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. *Plos One*, 8, 12, 1 - 15, 2013.
- Fishilevich, E.; Vélez, A. M.; Storer, N. P.; Li, H.; Bowling, A. J.; Rangasamy, M.; Worden, S. E.; Narva, K. E.; Siegfried, B. D. RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Pest Management Science*, 72, 9, 1652 – 1663, 2016.
- Fonseca, F.C.A.; Firmino, A.A.P.; Macedo, L.L.P.; Coelho, R.R.; Sousa Júnior, J.D.A.; Silva-Junior, O.B.; Togawa, R.C.; Pappas, G.J.; Góis, A.B.; Da Silva, M.C.M.; Grossi-de-Sá, M.F. Sugarcane giant borer transcriptome analysis and identification of genes related to digestion. *PLoS One*, 10, 2, 2015.
- Friedhoff, P.; Gimadutdinow, O.; Pingoud, A. Identification of catalytically relevant amino acids of the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease by alignment-guided mutagenesis. *Nucleic Acid Research*, 22, 16, 3280-3287, 1994.
- Frith, M.C.; Saunders, N.F.; Kobe, B.; Bailey, T.L. Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. *PLoS Computational Biology*, 4, 4, 2008.
- Gabriel, D. O bicudo-do-algodoeiro. Documento técnico 25, 1 – 20, Governo do Estado de São Paulo, 2016.
- Gagou, M.E.; Kapsetaki, M.; Turberg, A.; Kafetzopoulos, D. Stage-specific expression of the chitin synthase DmeChSA and DmeChSB genes during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 2, 141 – 146, 2002.

Garbutt JS, Reynolds SE. Induction of RNA interference genes by double-stranded RNA; implications for susceptibility to RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 49, 2, 621 – 628, 2012.

Garcia, R. A.; Macedo, L. L. P.; Nascimento, D. C.; Gillet, F. X.; Moreira-Pinto, C. E.; Faheem, M.; Basso, A. M. M.; Silva, M. C. M.; Grossi-de-Sá, M. F. Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Plos One*, 12, 12, 1 – 22, 2017.

Gassmann, A. J.; Petzold-Maxwell, J. L.; Keweshan, R. S.; Dunbar, M. W. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. *Plos One*, 6, 7, 2011.

Gassmann, A. J. Resistance to Bt maize by western corn rootworm: insights from the laboratory and the field. *Current Opinion in Insect Science*, 15, 1 - 5, 2016.

Gharehdaghi, EE; Amani, A; Khoshayand, MR; Banan, M; Gharehdaghi, EE; Amini, MA; Faramarzi, MA. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimization of processing/formulation parameters. *Nucleic Acid Therapeutics*, 00, 0, 2014.

Gillet, F. X.; Garcia, R. A.; Macedo, L. L. P.; Albuquerque, E. V. S.; Silva, M. C. M.; Grossi-de-Sá, M. F. Investigating engineered ribonucleoprotein particles to improve oral RNAi delivery in crop insect pests. *Frontiers in Physiology*, 8, 256, 1 – 14, 2017.

Gillot, C. *Entomology*. 3rd ed. Dordrecht: Springer; 2005.

Gong, Y.H.; Yu, X.R.; Shang, Q.L.; Shi, X.Y.; Gao, X.W. Oral delivery mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover. *PloS one*, 9, 8, e102823, 2014.

Grigolli, J. F. J. Comportamento alimentar e distribuição vertical de botões florais atacados por *Anthonomus grandis* Boh. *cultivares de algodoeiro*. 2012.

Grossi-de-Sá, M. F.; Magalhães, M. Q.; Silva, M. S.; Silva, S. M. B.; Dias, S. C.; Nakasu, E. Y. T.; Brunetta, P. S. F.; Oliveira, G. R.; Oliveira Neto, O. B.; Oliveira, R. S.; Soares, L. H. B.; Ayub, M. A. Z.; Siqueira, H. A. A.; Figueira, E. L. Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 5, 773 - 782, 2007.

Gullan, P. J.; Cranston, P. S. *The insects: an outline of entomology*. Quinta edição. Oxford, Reino Unido, John Wiley & Sons, Ltd, 2014.

Gump, J. M.; Dowdy, S. F. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends in Molecular Medicine*, 13, 10, 443 - 448, 2007.

Guo, H.; Ingolia, N. T.; Weissman, J. S.; Bartel, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466, 12, 835 - 841, 2010.

Gupta, R.; Rai, B. Effect of size and surface charge of nanoparticles on their skin permeability: a molecular dynamics study. *Scientific Reports*, 7, 45292, 1 - 13, 2017.

Hameed, A.; Tahir, M. N.; Asad, S.; Bilal, R.; Eck, J. V.; Jander, G.; Mansoor, S. RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato. *Molecular Biotechnology*, 59, 73 - 83, 2017.

Hammond, S. M. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3 – 14, 2015.

He, C.; Yin, L.; Song, Y.; Tang, C.; Yin, C. Optimization of multifunctional chitosan-siRNA nanoparticles for oral delivery applications, targeting TNF- α silencing in rats. *Acta Biomaterials*, doi: 10.1016/j.actbio.2015.01.041, 2015.

Hellemans, J.; Mortier, G.; Paepe, A. D.; Speleman, F.; Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8, 2, 1 - 14, 2007.

Hembram, KC, Prabha, S, Chandra, R, Ahmed, B, Nimesh, S. Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44, 1, 305 - 314, 2014.

Hogenkamp, D.G.; Arakane, Y.; Zimoch, L.; Merzendorfer, H.; Kramer, K.J.; Beeman, R.W. et al. Chitinsynthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 6, 529 – 540, 2005.

Horikoshi, R. J.; Bernardi, D.; Bernardi, O.; Malaquias, J. B.; Okuma, D. M.; Miraldo, L. L.; Amaral, F. S. A.; Omoto, C. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. *Science Reports*, 6, 34864, 1 - 8, 2016.

Huang, F.; Qureshi, J. A.; Meagher Jr, R. L.; Reisig, D. D.; Head, G. P.; Andow, D. A.; Ni, X.; Kerns, D.; Buntin, G. D.; Niu, Y.; Yang, F.; Dungal, V. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. *Plos One*, 9, 11, 1 - 10, 2014.

Huang, X.; Lai, Y.; Braun, G. B.; Reich, N. O. Modularized gold nanocarriers for TAT-mediated delivery of siRNA. *Small*, 13, 8, 1 - 8, 2016.

Hunter W, Ellis J, Vanengelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, Glick E, et al. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS pathogens*, 6, 12, e1001160, 2010.

Ishiguro, S.; Alhakamy, N. A.; Uppalapati, D.; Delzeit, J.; Berkland, C. J.; Tamura, M. Combined local pulmonary and systemic delivery of AT2R gene by modified TAT peptide nanoparticles attenuates both murine and human lung carcinoma xenografts in mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 385 - 394, 2017.

Ipsaro, J. J.; Joshua-Tor, L. From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nature Structure & Molecular Biology*, 22, 1, 20 – 28, 2015.

ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications). Brief 52 - Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2016.

ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications). Brief 53 - Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2017.

Jakka, S. R. K.; shrestha, R. B.; Gassmann, A. J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins by western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *Science Reports*, 6, 27860, 1 - 9, 2016.

- Jensen, D. M. K.; Cun, D.; Maltesen, M. J.; Frokjaer, S.; Nielsen, H. M.; Foged, C. Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. *Journal of Controlled Release*, 142, 138 - 145, 2010.
- Jin, L.; Wei, Y.; Zhang, L.; Yang, Y.; Tabashnik, B. E.; Wu, Y. Dominant resistance to Bt cotton and minor cross-resistance to Bt toxin Cry2Ab in cotton bollworm from China. *Evolutionary Applications*, 6, 8, 1222 - 1235, 2013.
- Jin S, Singh ND, Li L, Zhang X, Daniell H. Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450monooxygenase, V-ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 3, 435 - 446, 2015.
- Joga, M. R.; Zotti, M. J.; Smagghe, G.; Christiaens, O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Frontiers in Physiology*, 7, 553, 1 - 14, 2016.
- Jose, S.; Fangueiro, J. F.; Smitha, J.; Cinu, T. A.; Chacko, A. J.; Premaletha, K.; Souto, E. B. Cross-linked chitosan microspheres for oral delivery of insulin: Taguchi design and in vivo testing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 175 - 179, 2012.
- Kamola PJ, Nakano Y, Takahashi T, Wilson PA, Ui-Tei K. The siRNA Non-seed Region and Its Target Sequences Are Auxiliary Determinants of Off-Target Effects. *PLoS computational biology*, 11, 2, e1004656, 2015.
- Kanasty, R.L.; Whitehead, K.A.; Vegas, A.J.; Anderson, D.G. Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Molecular Therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20, 3, 513 - 524, 2012.
- Katas, H, Alpar, HO. Development and characterization of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 115, 2, 216 - 225, 2006.
- Katoch, R.; Thakur, N. Insect gut nucleases: a challenge for RNA interference mediated insect control strategies. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1, 8, 198 - 203, 2012.
- Katoch, R.; Sethi, A.; Thakur, N.; Murdock, L. L. RNAi for insect control: current perspectives and future challenges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 847 - 873, 2013.
- Katoch, R.; Thakur, N. Advances in RNA interference technology and its impact on nutritional improvement, disease and insect control in plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 1579 - 1605, 2013.
- Kawabata, A.; Baoum, A.; Ohta, N.; Jacquez, S.; Seo, G. M.; Berkland, C.; Tamura, M. Intratracheal administration of a nanoparticle-based therapy with angiotensin II type 2 receptor gene attenuates lung cancer growth. *Cancer Research*, 72, 8, 2057 - 2067, 2012.
- Khan, FI; Rahman, S; Queen, S; Ahamad, S; Ali, S; Kim, J; Hassan, I. Implications of molecular diversity of chitin and its derivatives. *Applied Microbiology Biotechnology*, 101, 9, 3513 - 3536, 2017.

- Killiny, N.; Hajeri, S.; Tiwari, S.; Gowda, S.; Stelinski, L. L. Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. *Plos One*, 9, 10, 1 - 8, 2014.
- Kim, H. Y.; Kim, S.; Pyun, H. J.; Maeng, J.; Lee, K. Cellular uptake mechanism of TCTP-PTD in human lung carcinoma cells. *Molecular Pharmaceutics*, 12,1, 194 - 203, 2014.
- Kim, D. H.; Rossi, J. J. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev*, vol 8, 173 - 184, 2007.
- Kleine-Brueggene, H.; Zorzi, G.K.; Tobias, F.; El-Gueddari, N.E.; Moerschbacher, B.M.; Goycoolea, F.M. A rational approach towards the design of chitosan-based nanoparticles obtained by ionotropic gelation. *Colloids and Surfaces B*, 1, 135, 99 - 108, 2015.
- Koch, A.; Biedenkopf, D.; Furch, A.; Weber, L.; Rossbach, O.; Abdellatef, E.; Linicus, L.; Johannsmeier, J.; Jelonek, L.; Goesmann, A.; Cardoza, V.; McMillan, J.; Mentzel, J.; Kogel, K. H. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *Plos Pathogens*, 12, 10, 1 - 22, 2016.
- Kontra, L.; Csorba, T.; Tavazza, M.; Luciola, A.; Tavazza, R.; Moxon, S.; Tisza, V.; Medzihradsky, A.; Turina, M.; Burgyán, J. Distinct effects of p19 RNA silencing suppressor on small RNA mediated pathways in plants. *Plos Pathogens*, 12, 10, 1 - 26, 2016.
- Kumar, D. R.; Kumar, P. S.; Gandhi, M. R.; Al-Dhabi, N. A.; Paulraj, M. G.; Ignacimuthu, S. Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development vestigial (vg) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 89 - 95, 2016.
- Kurowski, M.A.; Bujnicki, J.M. Gene Silico protein structure prediction meta-server. *Nucleic acids research*, 31, 13, 3305 – 3307, 2003.
- Lam, J. K. W.; Chow, M. Y. T.; Zhang, Y.; Leung, S. W. S. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 4, 252, 1 - 20, 2015.
- Law, S. M.; Zhang, B. W.; Brooks III, C. L. pH-sensitive residues in the P19 protein silencing suppressor protein from carnation Italian ringspot virus affect siRNA binding stability. *Protein Science*, 22, 5, 595 - 604, 2013.
- Lehto, T.; Ezzat, K.; Wood, M. J. A.; Andaloussi, S. E. L. Peptides for nucleic acid delivery. *Advanced Drug Delivery Review*, 2016, 172 - 182, 2016.
- Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue), W475 – W478, 2011.
- Lewis, B. P.; Shih, I. Jones-Rhoades, M. W.; Bartel, D. P.; Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115, 787 - 798, 2003.
- Li, H.; Tsui, T. Y.; Ma, W. Intracellular delivery of molecular cargo using cell penetrating peptides and the combination strategies. *International Journal of Molecular Science*, 16, 19518 - 19536, 2015.

- Li, W.; Koutmou, K.S.; Leahy, D.J.; Li, M. Systemic RNA Interference Deficiency-1 (SID-1) Extracellular Domain Selectively Binds Long Double-stranded RNA and Is Required for RNA Transport by SID-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 31, 18904 – 18913, 2015.
- Li, Y.; Qin, Y.; Liu, S.; Wang, S.; Yu, H.; Li, K.; Li, P. Preparation, characterization, and insecticidal activity of avermectin-grafted-carboxymethyl chitosan. *Biomed Research International*, 1 - 8, 2016.
- Liang, G. M.; Wu, K. M.; Yu, H. K.; Li, K. K.; Feng, X.; Guo, Y. Y. Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to Cry1Ac toxin. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 142 - 149, 2008.
- Liao, W.; Li, W.; Zhang, T.; Kirberger, M.; Liu, J.; Wang, P.; Chen, W.; Wang, Y. Powering up the molecular therapy of RNA interference by novel nanoparticles. *Biomaterials Science*, doi: 10.1039/c6bm00204h, 2016.
- Lima Jr, I. S.; Degrande, P. E.; Miranda, J. E.; dos Santos, W. J. Evaluation of the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) suppression program in the state of Goiás, Brazil. *Neotropical Entomology*, 42, 82 - 88, 2013.
- Lin, J.L.; Wu, C.C.; Yang, W.Z.; Yuan, H.S. Crystal structure of endonuclease G in complex with DNA reveals it nonspecifically degrades DNA as a homodimer. *Nucleic acids research*, 44, 21, 10480 – 10490, 2016.
- Liu, Z.; Wang, X.; Lei, C.; Zhu, F. Sensory genes identification with head transcriptome of the migratory armyworm, *Mythimna separata*. *Scientific reports*, 7, 46033, 2017.
- Loll, B.; Gebhardt, M.; Wahle, E.; Meinhardt, A. Crystal structure of the EndoG/EndoGI complex: mechanism of EndoG inhibition. *Nucleic acids research*, 37, 21, 7312 – 7320, 2009.
- Lomate, P. R.; Bonning, B. C. Distinct properties of proteases and nuclease in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Science Reports*, 6, 27587, 1 - 10, 2016.
- Luo, Y.; Wang, X.; Wang, X.; Yu, D.; Chen, B.; Kang, L. Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and feeding. *Insect Molecular Biology*, 22, 5, 574 - 583, 2013.
- Ma J, Guo TL, Wang QL, Wang KB, Sun RR, Zhang BH. Expression profiles of miRNAs in *Gossypium raimondii*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 16, 4, 296 – 303, 2015.
- Macedo, L. L. P.; Antonino-de-Souza Júnior, J. D.; Coelho, R. R.; Fonseca, F. C. A.; Firmino, A. A. P.; Silva, M. C. M.; Fragoso, R. R.; Albuquerque, E. V. S.; Silva, M. S.; de Almeida Engler, J.; Terra, W. R.; Grossi-de-Sá, M. F. Knocking down chitin synthase 2 by RNAi is lethal to the cotton boll weevil. *Biotechnology Research and Innovation*, 2017.
- Magalhães, D. M.; Borges, M.; Laumann, R. A.; Sujii, E. R.; Mayon, P.; Caulfield, J. C.; Midega, C. A. O.; Khan, Z. R.; Pickett, J. A.; Birkett, M. A.; Blassioli-Moraes, M. C. Semiochemicals from herbivory induced cotton plants enhance the foraging behavior of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 1528 - 1538, 2012.

Magalhães, D. M.; Borges, M.; Laumann, R. A.; Woodcock, C. M.; Pickett, J. A.; Birkett, M. A.; Blassioli-Moraes, M. C. Influence of two acyclic homoterpenes (tetranorterpenes) on the foraging behavior of *Anthonomus grandis* Boh. *Journal of Chemical Ecology*, 2016.

Majumdar, R.; Rajasekaran, K.; Cary, J. W. RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: concepts and considerations. *Frontiers in Plant Science*, 8, 200, 2017.

Mao, Y. B.; Cai, W. J.; Wang, J. W.; Hong, G. J.; Tao, X. Y.; Wang, L. J.; Huang, Y. P.; Chen, X. Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25, 11, 1307 - 1313, 2007.

Mao, S.; Sun, W.; Kissel, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 12 -27, 2010.

Mao, Y. B.; Tao, X. Y.; xue, X. Y.; Wang, L. J.; Chen, X. Y. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Research*, 60, 665 - 673, 2011.

Martins, W. F. S.; Ayres, C. F. J.; Lucena, W. A. Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the major cotton pest in the New World. *Genetics and Molecular Research*, 6, 1, 23 - 32, 2007.

Matranga, C.; Tomari, Y.; Shin, C.; Bartel, D. P.; Zamore, P. D. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123, 607 - 620, 2005.

Matsui, M.; Corey, D. R. Non-coding RNAs as drug targets. *Nature Reviews*, 1 - 13, 2016.

Meng, F.; Li, Y.; Zang, Z.; Li, N.; xue, R.; Cao, Y.; Li, T.; Zhou, Q.; Li, W. Expression of the double-stranded RNA of the soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Tortricidae) ribosomal protein P0 gene enhances the resistance of transgenic soybean plants. *Pest Management Science*, 73, 12, 2447 - 2455, 2017.

Miller, S.C.; Miyata, K.; Brown, S.J.; Tomoyasu, Y. Dissecting systemic RNA interference in the red flourbeetle *Tribolium castaneum*: parameters affecting the efficiency of RNAi. *PLoS one*, 7, 10, 2012.

Mohan, K. S.; Ravi, K. C.; Suresh, P. J.; Sumerfor, D.; Head, G. P. Field resistance to the *Bacillus thuringiensis* protein Cry1Ac expressed in Bollgard hybrid cotton in pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders), populations in India. *Pest Management Science*, 72, 738 - 746, 2015.

Monnerat, R. G.; Nobre, S. D. N.; Oliveira Neto, O. B.; Schmidt, F. G. V.; Dias, S.; Lauman, R.; Grossi-de-Sá, M. F.; Sujii, E. R. Parâmetros bionômicos do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) criado em dieta artificial para a realização de bioensaios. *Boletim de Desenvolvimento e Pesquisa, Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 2002.

Mysore, K.; Flannery, E. M.; Tomchaney, M.; Severson, D. W.; Duman-Scheel, M. Disruption of *Aedes aegypti* olfactory system development through chitosan/siRNA nanoparticle targeting of semaphorin-1a. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7, 5, 1 - 12, 2013.

Mysore, K.; Andrews, E.; Li, P.; Duman-Scheel, M. Chitosan/siRNA nanoparticle targeting demonstrates a requirement for single-minded during larval and pupal olfactory system development of the vector mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Developmental Biology*, 14, 9, 1 - 16, 2014.

Nagpal, K, Singh, SK, Mishra, DN. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58 (11) 1423-1430, 2010.

Nakase, I.; Niwa, M.; Takeuchi, T.; Sonomura, K.; Kawabata, N.; Koike, Y.; Takehashi, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Simpson, J. C.; Jones, A. T.; Sugiura, Y.; Futaki, S. Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Molecular Therapy*, 10, 6, 1011 - 1022, 2004.

Nakayama, D.G., Júnior, C.D.S.; Kishi, L.T., Pedezzi, R., Santiago, A.C., Soares-Costa, A., Henrique-Silva, F. A transcriptome survey of *Migdolus fryanus* (sugarcane rhizome borer) larvae. *PLoS One*, 12, 3, 2017.

Neves, R. C. S.; Colares, F.; Torres, J. B.; Santos, R. L.; Bastos, C. S. Rational practices to manage coll weevils colonization and population growth on family farms in the semiárido region of Brazil. *Insects*, 5, 818 - 831, 2014.

Nge, K. L.; Nwe, N.; Chandkrachang, S.; Stevens, W. F. Chitosan as a growth stimulator in orchid culture. *Plant Science*, 170, 1185 - 1190, 2006.

Niu, X.; Kassa, A.; Hu, X.; Robenson, J.; McMahon, M.; Richtman, N. M.; Steimel, J. P.; Kernodle, B. M.; Crane, V. C.; Sandahl, G.; Ritland, J. L.; Presnail, J. K.; Lu, A. L.; Wu, G. Control of Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) reproduction through plant-mediated RNA interference. *Scientific Reports*, 3, 7, 12591, 2017.

Nogueira, D. R., Scheeren, L. E.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M.; Infante, M. R.; Rolim, C. M. B. Nanoparticles incorporating pH-responsive surfactants as a viable approach to improve the intracellular drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, 57, 100 - 106, 2015.

Oliveira, S.; Storm, G.; Schiffelers, R.M. Targeted delivery of siRNA. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2006, 4, 63675, 2006.

Oliveira, G. R.; Silva, M. C. M.; Lucena, W. A.; Nakasu, E. Y. T.; Firmino, A. A. P.; Beneveti, M. A.; Souza, D. S. L.; Gomes Jr, J. E.; Souza Jr, J. D. A.; Rigden, D. J.; Ramos, H. B.; Soccol, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *BMC Biotechnology*, 11, 85, 1 - 13, 2011.

Oliveira, R. S.; Oliveria-Neto, O. B.; Moura, H. F. N.; Macedo, L. L. P.; Arraes, F. B. M.; Lucena, W. A.; Lourenço-Tessuti, I. T.; Barbosa, A. A. D.; Silva, M. C. M.; Grossi-de-Sá, M. F. Transgenic cotton plants expressing Cry11a12 toxin confer resistance to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Frontiers in Plant Science*, 7, 165, 1 - 11, 2016.

Oliveira-Neto, O.B.; Batista, J.A.; Rigden, D.J.; Franco, O.L.; Falcao, R.; Fragoso, R.R., et al. Molecular cloning of alpha-amylases from cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: an approach to insect resistance. *Journal of protein chemistry*, 22, 1, 77 - 87, 2003.

- Omoto, C.; Berardi, O.; Salmeron, E.; Sorgatto, R. J.; Dourado, P. M.; Crivellari, A.; Carvalho, R. A.; Willse, A.; Martinelli, S.; Head, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72, 9, 1727 - 1736, 2015.
- Pal, P.; Pal, A. Surfactant-modified chitosan beads for cadmium ion adsorption. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.042, 2017.
- Pan, Z.; Onstad, D.; Crain, P.; Crespo, A.; Hutchison, W.; Buntin, D.; Porter, P.; Catchot, A.; Cook, D.; Pilcher, C.; Flexner, L.; Higgins, L. Evolution of resistance by *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) infesting insecticidal crops in the Southern of United States. *Journal of Economic Entomology*, 109, 2, 821 – 831, 2016.
- Park, E. Y.; Jang, M.; Kim, J. H.; Ahn, H. J. Genetically modified Tomato aspermy virus 2b protein as a tumor-targeting siRNA delivery carrier. *Acta Biomaterials*, 10, 11, 4778 - 4786, 2014.
- Pauchet, Y., Wilkinson, P., Munster, M., Augustin, S., Pauron, D., Ffrench-Constant, R.H. Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 5-6, 403-413, 2009.
- Pauchet, Y., Wilkinson, P., Vogel, H., Nelson, D.R., Reynolds, S.E., Heckel, D.G., Ffrench-Constant, R.H. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. *Insect Molecular Biology*, 19, 1, 61-75, 2010.
- Peralta, C.; Palma, L. Is the insect world overcoming the efficacy of *Bacillus thuringiensis*? *Toxins*, 9, 39, 2 – 5, 2017.
- Perera, O.P.; Shelby, K.S.; Popham, H.J.; Gould, F.; Adang, M.J.; Jurat-Fuentes, J.L. Generation of a transcriptome in a model lepidopteran pest, *Heliothis virescens*, using multiple sequencing strategies for profiling midgut gene expression. *PLoS One*, 10(6): 0128563. 2015.
- Perez, J. J.; François, N. J. Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers. *Carbohydrate Polymers*, 148, 134 - 142, 2016.
- Price, R.G., Gatehouse, J.A. RNAi-mediated crop protection against insects. *Cell*, 26, 7, 393-400, 2008.
- Piao, X.; Zhang, X.; Wu, L.; Belasco, J. G. CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Molecular Cell Biology*, 30, 6, 1486 - 1494, 2010.
- Pimenta, M.; Mata, R.A.; Venzon, M.; Cunha, D.N.C.; Fontes, E.M.G.; Pires, C.S.S.; Sujii, E.R. Survival and preference of cotton boll weevil adults for alternative food sources. *Brazilian Journal of Biology*, 76, 2, 387 – 395, 2016.
- Powell, M. E.; Bradish, H. M.; Gatehouse, J. A.; Fitches, E. C. systemic RNAi in the small hive beetle *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae), a serious pest of the European honey bee *Apis mellifera*. *Pest Management Science*, 73, 1, 53 – 63, 2017.
- Prentice, K.; Pertry, I.; Christiaens, O.; Bauters, L.; Bailey, A.; Niblett, C.; Ghislain, M.; Gheysen, G.; Smagghe, G. Transcriptome analysis and systemic RNAi response in the African sweet potato weevil (*Cylas puncticollis*, Coleoptera, Brentidae). *Plos One*, 10, 1, 1 – 18, 2015.

- Pridgeon, J. W.; Zhao, L.; Becnel, J. J.; Strickman, D. A.; Clark, G. G.; Linthicum, K. J. Topically applied AaelAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*, 45, 3, 414 - 420, 2008.
- Price, D. R. G.; Gatehouse, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 26, 7, 393 - 400, 2008.
- Qi, N.; Cai, D.; Qiu, Y.; Xie, J.; Wang, Z.; Si, J.; Zhang, J.; Zhou, X.; Hu, Y. RNA binding by a novel helical fold of B2 protein from *Wuhan Nodavirus* mediates the suppression of RNA interference and promotes B2 dimerization. *Journal of Virology*, 85, 18, 9543 - 9554, 2011.
- Raja, M.A.G., Katas, H., Wen, T.J. Stability, intracellular delivery, and release of siRNA from chitosan nanoparticles using different cross-linkers. *Plos One*, 10, 6, 2015.
- Raja, M.A., Arif, M., Feng, C., Zeenat, S., Liu, C.G. Synthesis and evaluation of pH-sensitive, self-assembled chitosan-based nanoparticles as efficient doxorubicin carriers. *Nanotechnology in Biomaterials*, 31, 8, 1182 - 1195, 2017.
- Ramalho, F. S.; Medeiros, R. S.; Lemos, W. P.; Wanderley, P. A.; Dias, J. M.; Zanuncio, J. C. Evaluation of *Catolaccus grandis* (Burks) (Hym., Pteromalidae) as a biological control agent against cotton boll weevil. *Journal of Applied Entomology*, 124, 359 - 364, 2000.
- Rangarajan, E.S.; Shankar, V. Sugar non-specific endonucleases. *FEMS microbiology reviews*, 25, 5, 583 - 613, 2001.
- Rasente, R. Y.; Imperiale, J. C.; Lázaro-Martínez, J. M.; Gualco, L.; Oberkersch, R.; Sosnik, A.; Calabrese, G. C. Dermatan sulfate/chitosan polyelectrolyte complex with potential application in the treatment and diagnosis of vascular disease. *Carbohydrate Polymers*, 144, 362 - 370, 2016.
- Ribeiro, P. A.; Sujii, E. R.; Diniz, I. R.; Medeiros, M. A.; Salgado-Labouriau, M. L.; Branco, M. C.; Pires, C. S. S.; Fontes, E. M. G. Alternative food sources and overwintering feeding behavior of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) under the tropical conditions of Central Brazil. *Neotropical Entomology*, 39, 1, 28 - 34, 2010.
- Ribeiro, T. P.; Arraes, F. B. M.; Lourenço-Tessuti, I. T.; Silva, M. S.; Lisei-de-Sá, M. E.; Lucena, W. A.; Macedo, L. L. P.; Lima, J. N.; Amorim, R. M. S.; Artico, S.; Alves-Ferreira, M.; Silva, M. C. M.; Grossi-de-Sá, M. F. Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. *Journal of Plant Biotechnology*, 1 - 13, 2017.
- Rubio, G.J.; Bustillo, P.A.; Vallejo, E.L.; Acuna, Z.J.; Benavides, M.P. Alimentary canal and reproductive tract of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Neotropical entomology*, 37, 2, 143 - 151, 2008.
- Rudzinski, W.E.; Palacios, A.; Ahmed, A.; Lane, M.A.; Aminabhavi, T.M. Targeted delivery of small interfering RNA to colon cancer cells using chitosan and PEGylated chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 147, 323 - 332, 2016.
- Sacco, P.; Paoletti, S.; Cok, M.; Asaro, F.; Abrami, M.; Grassi, M.; Dnoati, I. Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 476 - 483, 2016.

Sadreddini, S.; Safaralizadeh, R.; Baradaran, B.; Aghebati-Maleki, L.; Hosseinpour-Feizi, M. A.; Shanehbandi, D.; Jadidi-Niaragh, F.; Sadreddini, S.; Kafil, H. S.; Younesi, V.; Yousefi, M. Chitosan nanoparticles as a dual drug/siRNA delivery system for treatment of colorectal cancer. *Immunology Letters*, 191, 79 - 86, 2016.

Salamanca, AE, Diebold, Y, Calonge, M, García-Vazquez, C, Callejo, S, Vila, A, Alonso, MJ. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47, 4, 1416 - 1425, 2006.

Salvador, R.; Príncipi, D.; Berretta, M.; Fernández, P.; Paniego, N.; Sciocco-Cap, A.; Hopp, E. Transcriptomic survey of the midgut of *Anthonomus grandis* (Coleoptera; Curculionidae). *Journal of Insect Science*, 14, 219, 1 - 9, 2014.

Santos-Amaya, O. F.; Rodrigues, J. V. C.; Souza, T. C.; Tavares, C. S.; Campos, S. O.; Guedes, R. N. C.; Pereira, E. J. G. Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Science Reports*, 5, 18243, 1 - 10, 2015.

Seo, J. K.; Kwon, S. J.; Rao, A. L. N. Molecular dissection of Flock house virus protein B2 reveals that electrostatic interactions between N-terminal domains of B2 monomers are critical for dimerization. *Virology*, 432, 296 - 305, 2012.

Senra, T. D. A.; Khoukh, A.; Desbrières, J. Interactions between quaternized chitosan and surfactant studied by diffusion NMR and conductivity. *Carbohydrate Polymers*, 156, 182 - 192, 2017.

Schaffer, P.; Scholz, S. R.; Gimadudinow, O.; Cymerman, I. A.; Bujnicki, J. M.; Ruiz-Carrillo, A.; Pingoud, A.; Meiss, G. Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *Journal of Molecular Biology*, 338, 217 - 228, 2004.

Scherman, D.; Rousseau, A.; Bigey, P.; Escriou, V. Genetic pharmacology: progresses in siRNA delivery and therapeutic applications. *Gene Therapy*, 2017.

Schott, J. W.; Morgan, M.; Galla, M.; Schambach, A. Viral and synthetic RNA vector technologies and applications. *Molecular Therapy*, 24, 9, 1513 - 1527, 2016.

Shin, C.; Nam, J. W.; Farh, K. K. H.; Chiang, H. R.; Shkumatava, A.; Bartel, D. P. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular Cell*, 38, 789 - 802, 2010.

Showler, A.T. Roles of host plants in boll weevil range expansion beyond tropical Mesoamerica. *American Entomologist*, 55, 4, 234 - 243, 2009.

Shukla, J.N.; Kalsi, M.; Sethi, A.; Narva, K.E.; Fishilevich, E.; Singh, S. et al. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biology*, 13, 7, 656 - 669, 2016.

Siegfried, B.D.; Rangasamy, M.; Wang, H.; Spencer, T.; Haridas, C.V.; Tenhumberg, B.; Sumerford, D.V.; Storer, N. P. Estimating the frequency of Cry1F resistance in field populations of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Pest Management Science*, 70, 725 - 733, 2014.

- Siegfried, B.; Jurat-Fuentes, J. L. Editorial overview: pest and resistance: resistance to Bt toxins in transgenic crops. *Insect Science*, 15, 1 – 3, 2016.
- Silva, C. A. D.; Ramalho, F. S. Kaolin spraying protects cotton plants against damages by boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Pest Science*, 85, 563 - 569, 2013.
- Silva, C. R. C.; Monnerat, R.; Lima, L. M.; Martins, E. S.; Melo Filho, P. A.; Pinheiro, M. P. N.; Santos, R. C. Stable integration and expression of cry11a gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. *Pest Management Science*, 72, 1549 - 1557, 2015.
- Singh, A.D.; Wong, S.; Ryan, C.P.; Whyard, S. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellowfever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. *J Insect Sci*, 13 – 69, 2013.
- Sousa, G.; Scudeler, E.L.; Abrahão, J.; Conte, H. Functional Morphology of the Crop and Proventriculus of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 106, 6, 846 – 852, 2013.
- Spit, J.; Philips, A.; Wynant, N.; Santos, D.; Plaetinck, G.; Broeck, J. V. Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 81, 103 – 116, 2017.
- Spurgeon, D.W. Captures of boll weevils (Coleoptera: Curculionidae) in relation to trap orientation and distance from brush lines. *Journal of Economic Entomology*, 109, 6, 2405 – 2410, 2016.
- Sujji, E. R.; Ribeiro, P. A.; Bernardes, T. A.; Milane, P. V. G. N.; Paula, D. P.; Pires, C. S. S.; Fontes, E. M. G. Field evaluation of Bt cotton crop impact on nontarget pests: cotton aphid and boll weevil. *Neotropical Entomology*, 42, 102 - 111, 2013.
- Sun, P.; Huang, W.; Jin, M.; Wang, Q.; Fan, B.; Kang, L.; Gao, Z. Chitosan-based nanoparticles for survivin targeted siRNA delivery in breast tumor therapy and preventing in metastasis. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4931 - 4945, 2016.
- Swevers, L.; Liu, J.; Huvenne, H.; Smagghe, G. Search for limiting factors in the RNAi pathway in silkworm tissues and the Bm5 cell line: the RNA-binding proteins R2D2 and translin. *Plos One*, 6, 5, 1 - 12, 2011.
- Swevers, L.; Huvenne, H.; Menschaert, G.; Kontogiannatos, D.; Kourti, A.; Pauchet, Y.; French-Constant, R.; Smagghe, G. Colorado potato beetle (Coleoptera) gut transcriptome analysis: expression of RNA interference-related genes. *Insect Molecular Biology*, 4, 319, 1 – 15, 2013.
- Tabashnik, B. E.; Wu, K.; Wu, Y. Early detection of field-evolved resistance to Bt cotton in China: cotton bollworm and pink bollworm. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 301 - 306, 2012.
- Tatiparti, K.; Sau, S.; Kashaw, S. K.; Iyer, A. K. siRNA delivery strategies: a comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials*, 7, 77, 1 - 17, 2017.

- Terra, W.R.; Ferreira, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 109, 1, 1 – 62, 1994.
- Terra, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47, 2, 47 – 61, 2001.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 22, 4673 – 4680, 1994.
- Torres, J. B.; Ruberson, J. R.; Whitehouse, M. Transgenic cotton for sustainable pest management: a review. *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants*, vol 1, 15 - 53, 2009.
- Tseng, Y. C.; Mozumdar, S.; Huang, L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 9, 721 – 731, 2009.
- Ulvila, J.; Parikka, M.; Kleino, A.; Sormunen, R.; Ezekowitz, R.A.; Kocks, C., et al. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 20, 14370 – 14375, 2006.
- Valencia, A.; Bustillo, A.E.; Ossa, G.E.; Chrispeels, M.J. Alpha-amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 3, 207 – 213, 2000.
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J.; Hannon, G. J.; Parker, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Development*, 1, 20, 5, 515 - 524, 2006.
- Van Woensel, M.; Wauthoz, N.; Rosière, R.; Mathieu, V.; Kiss, F.; Steelant, B.; Dilissen, E.; van Gool, S. W.; Mathivet, T.; Gerhardt, H.; Amighi, K.; de Vleeschouwer, S. Development of siRNA-loaded chitosan nanoparticles targeting galectin-1 for the treatment of glioblastoma multiforme via intranasal administration. *Journal of Controlled Release*, 227, 71 - 81, 2016.
- Vila, A, Sánchez, A, Janes, K, Behrens, I, Kissel, T, Jato, JLV, Alonso, MJ. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 1, 123 - 131, 2004.
- Vyas, M.; Raza, A.; Ali, M. Y.; Ashraf, M. A.; Mansoor, S.; Shashid, A. A.; Brown, J. K. Knock down of whitefly gut gene expression and mortality by orally delivered gut gene-specific dsRNAs. *Plos One*, 12,1, 1 - 19, 2017.
- Wang, M.; Jin, H. Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. *Trends in Microbiology*, 25, 1, 4 - 6, 2017.
- Wang, R. H.; Bai, J.; Deng, J.; Fang, C. J.; Chen, X. TAT-modified gold nanoparticle carrier with enhanced anticancer activity and size effect on overcoming multidrug resistance. *Appl Materials and Interfaces*, 9, 7, 5825 - 5837, 2017.
- Wang, Y.; Zhang, H.; Li, H.; Miao, X. Second -generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *Plos One*, 6, 4, 1 - 10, 2011.

- Wang M, Jin H. Spray-Induced Gene Silencing: A Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends in microbiology*, 25, 1, 4 – 6, 2017.
- Whyard, S.; Singh, A. D.; Wong, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 824 - 832, 2009.
- Wu, S.L.; Li, C.C.; Chen, J.C.; Chen, Y.J.; Lin, C.T.; Ho, T.Y. et al. Mutagenesis identifies the critical amino acid residues of human endonuclease G involved in catalysis, magnesium coordination, and substratespecificity. *Journal of Biomedical Science*. 16, 6, 2009.
- Wu, N.; Zhang, X.; Li, F.; Gan, Y.; Li, J. Spray-dried powders enhance vaginal siRNA delivery by potentially modulating the mucus molecular sieve structure. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 5383 - 5396, 2015.
- Wynant, N.; Santos, D.; Verdonck, R.; Spit, J.; van Wielendale, P.; Broeck, J. V. Identification, functional characterization and phylogenetic analysis of a double stranded RNA degrading enzyme present in the gut of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 46, 1 - 8, 2014.
- Xiao, B.; Laroui, H.; Ayyadurai, S.; Viennois, E.; Charania, M. A.; Zhang, Y.; Merlin, D. Mannosylated bioreducible nanoparticle-mediated macrophage-specific TNF-alpha RNA interference for IBD therapy. *Biomaterials*, 34, 30, 7471 – 7482, 2013.
- Xiao, D.; Gao, X.; Xu, J.; Liang, X.; Li, Q.; Yao, J. et al. Clathrin-dependent endocytosis plays a predominant role in cellular uptake of double-stranded RNA in the red flour beetle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60, 68 – 77, 2015.
- Xiao, B.; Ma, P.; Viennois, E.; Merlin, D. Urocanic acid-modified chitosan nanoparticles can confer anti-inflammatory effect by delivering CD98 siRNA to macrophages. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 186 – 193, 2016.
- Xiao, B.; Ma, P.; Ma, L.; Chen, Q.; Si, X.; Walter, L.; Merlin, D. Effects of tripolyphosphate on cellular uptake and RNA interference efficiency of chitosan-based nanoparticles in Raw 264.7 macrophages. *Journal of Colloid and Interface Science*, 490, 520 – 528, 2017.
- Xie, F.; Jones, D. C.; Wang, Q.; Sun, R.; Zhang, B. Small RNA sequencing identifies miRNA roles in ovule and fibre development. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 355 - 369, 2015.
- Yang W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Quarterly reviews of biophysics*, 44, 1, 1 – 93, 2011.
- Yang, Y.; Wang, S.; Wang, Y.; Wang, X.; Wang, Q.; Chen, M. Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery. *Biotechnology Advances*, 32, 7, 1301 - 1316, 2014.
- Yang, F.; Kerns, D. L.; Brown, S.; Kurtz, R.; Dennehy, T.; Braxton, B.; Head, G.; Huang, F. Performance and cross-crop resistance of Cry1F-maize selected *Spodoptera frugiperda* on transgenic Bt cotton: implications for resistance management. *Scientific Reports*, 6, 28059, 1 - 7, 2016.
- Yin, C., Shen, G., Guo, D., Wang, S., Ma, X., Xiao, H., Liu, J., Zhang, Z., Liu, Y., Zhang, Y., Yu, K., Huang, S., Li, F. InsectBase: a resource for insect genomes and transcriptomes. *Nucleic Acids Research*, 44, D801-D807, 2016.

- Young, S. W. S.; Stenzel, M.; Yang, J. L. Nanoparticle-siRNA: a potential cancer therapy? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 98, 159 - 169, 2016.
- Zamore, P. D.; Tuschl, T.; Sharp, P. A.; Bartel, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101, 25 - 33, 2000.
- Zhang, X.; Zhang, J.; Zhu, K. Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the african malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, 19, 5, 683 - 693, 2010.
- Zhang, H.; Yin, W.; Zhao, J.; Jin, L.; Yang, Y.; Wu, S.; Tabashnik, B. E.; Wu, Y. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. *Plos One*, 6, 8, 1 - 8, 2011.
- Zhang, X.; Zhang, X.; Wang, F. Intracellular transduction and potential of Tat PTD and its analogs: from basic drug delivery mechanism to application. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9, 4, 457 - 472, 2012.
- Zhang, J.; Khan, S. A.; Hasse, C.; Ruf, S.; Heckel, D. G.; Bock, R. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 347, 6225, 991 - 994, 2015 a.
- Zhang, X.; Mysore, K.; Flannery, E; Michel, K.; Severson, D. W.; Zhu, K. Y.; Duman-Scheel, M. Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. *Journal of Visualized Experiments*, 97, 2015 b.
- Zhang, X.; Li, Y.; Cheng, Y.; Tan, H.; Li, Z.; Qu, Y.; Mu, G.; Wang, F. Tat PTD-endostatin: a novel anti-angiogenesis protein with ocular barrier permeability via eye-drops. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850, 1140 - 1149, 2015 c.
- Zhang, S.; Liu, Y.; Yu, B. New insights into pri-miRNA processing and accumulation in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 6, 5, 533 - 545, 2015 d.
- Zhao, X.; Shang, T.; Zhang, X.; Ye, T.; Wang, D.; Rei, L. Passage of magnetic Tat-conjugated Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles across in vitro blood-brain barrier. *Nanoscale Research Letters*, 11, 451, 1 - 12, 2016.
- Zhou, Z.; Li, Y.; Yuan, C.; Doucet, D.; Zhang, Y.; Qu, L. Overexpression of TAT-PTD-diapause hormone fusion protein in tobacco and its effect on the larval development of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 1 - 7, 2016.
- Zou, L.; Peng, Q.; Wang, P.; Zhou, B. Progress in research and application of HIV-1 TAT-derived cell-penetrating peptide. *Journal of Membrane Biology*, 1 - 8, 2016.