

RESPOSTAS MOLECULARES DE *Diatraea saccharalis* (FAB. 1794) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) A dsRNAs

por

MANOELY ABREU REIS

(Sob Orientação do Professor José Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE)

RESUMO

A cana de açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das principais culturas agrícolas do País. A broca da cana de açúcar *Diatraea saccharalis*, é considerada a principal praga desta cultura no Brasil. Recentemente, o uso da tecnologia do RNA interferente (RNAi) ou silenciamento gênico tem se mostrado promissora como estratégia de controle de pragas. Para *D. saccharalis* alguns estudos foram realizados, mas poucos possuíram sucesso, com a maioria apresentando silenciamentos discretos sem o fenótipo esperado. Assim, este estudo objetivou a identificação e caracterização de genes componentes das vias do sistema imune JAK-STAT e RNAi por análise *in silico* a partir de um transcrito de intestino. Além disso, foi realizada a avaliação de expressão de alguns genes componentes dessas vias quando induzidas por moléculas de dsRNA por RT-qPCR. Todos os genes componentes das vias JAK-STAT e RNAi foram devidamente identificados em *D. saccharalis*, e para melhor caracterização das vias determinou-se dois genes de cada via, *DsacHopscotch* e *DsacSTAT* (JAK-STAT) e *DsacDicer2* e *DsacAgo2* (RNAi) que apresentaram as suas respectivas proteínas preditas com seus devidos domínios proteicos coincidindo com dados previamente

publicados. Não houve alteração de expressão significativa para os genes *DsacHopscotch*, *DsacSTAT*, *DsacDicer2* e *DsacAgo2* quando induzidos por duas doses diferentes de dsRNA 0,2 e 1 µg. Posteriormente, foi identificado um *contig* com alta identidade para a nuclease *REase* de *Ostrinia furnacalis*, que foi denominado *DsacREase*. Este gene foi induzido após a microinjeção de 1 µg de dsRNA não-específico (dsGFP). Não houve diferença de expressão de *DsacREase* após microinjeção de 1 µg dsRNA específico para *DsacREase*, não resultando em silenciamento desta nuclease. A falta de sucesso do silenciamento em *D. saccharalis* pode ter sido em resposta a dose de dsRNA aplicada ou da ação de nucleases, como a *DsacREase*, que acabam degradando o dsRNA antes de ele entrar na célula. É necessário desenvolver estratégias para melhorar a eficiência do RNAi em *D. saccharalis*, gerando ferramentas que possam ser utilizadas no manejo desta praga.

PALAVRAS-CHAVE: RNA interferente, sistema imune, inseto-praga, cana-de-açúcar.

MOLECULAR RESPONSE OF *Diatraea saccharalis* (FAB. 1794) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) TO dsRNAs

by

MANOELY ABREU REIS

(Under the direction of Professor José Dijair Antonino de Souza Júnior)

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the main crops in Brazil, and the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, is considered its main pest. The use of RNA interference (RNAi) technology as a pest control strategy is promising. For *D. saccharalis*, some studies have been carried out, although resulting in discrete knockdown without the expected phenotype. Thus, trying to understand why RNAi is not efficient in *D. saccharalis*, this study initially aimed to identify and characterize genes that are components of the immune system pathways JAK-STAT and RNAi by *in silico* analysis from a *D. saccharalis* intestinal transcriptome. Also, the expression evaluation of some genes that are components of these pathways was carried out when induced by dsRNA molecules by RT-qPCR. All components of genes from the JAK-STAT and RNAi pathways were properly identified in *D. saccharalis*, and for better characterization of the pathways, two genes from each pathway were selected for further characterization, *DsacHopscotch* and *DsacSTAT* (JAK-STAT) and *DsacDicer2* and *DsacAgo2* (RNAi). There was no significant expression change for *DsacHopscotch*, *DsacSTAT*, *DsacDicer2*, and *DsacAgo2* when 4th instar larvae were treated with two different doses

(0.2 and 1 µg) of dsRNA. Subsequently, a contig containing an ORF with a high identity for a *REase* nuclease from *Ostrinia furnacalis* was identified. This gene, denominated *DsacREase*, was induced after microinjection of 1 µg of non-specific dsRNA (dsGFP). Further, no difference was detected in *DsacREase* expression after microinjection of 1 µg dsRNA specific for *DsacREase*. The lack of success in gene silencing in *D. saccharalis* may be explained by the low dsRNA amount applied, and/or by the action of nucleases, such as *DsacREase*, which end up degrading the dsRNA before entering the cell. Future studies are necessary to identify all the components involved in dsRNA neutralization (nucleases and other proteins), to develop strategies to improve the efficiency of RNAi in *D. saccharalis*, generating tools that can be used in the management of this pest.

KEYWORDS: RNA interference, immune system, insect pest, sugarcane.

RESPOSTAS MOLECULARES DE *Diatraea saccharalis* (FAB. 1794) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) A dsRNAs

por

MANOELY ABREU REIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro - 2020

RESPOSTAS MOLECULARES DE *Diatraea saccharalis* (FAB. 1794) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) A dsRNAs

por

MANOELY ABREU REIS

Comitê de Orientação:

Jose Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE

RESPOSTAS MOLECULARES DE *Diatraea saccharalis* (FAB. 1794) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) A dsRNAs

por

MANOELY ABREU REIS

Orientador:

Jose Dijair Antonino de Souza Junior – UFRPE

Examinadores:

Roberta Ramos Coelho – PNPd-UFRPE

Liliane Marques da Silva – PNPd-UFRPE

DEDICO

Aos meus pais, Cleonice Abreu e Manoel Reis, por todo amor e dedicação na minha formação, por me incentivarem e me apoiarem a buscar pelos meus sonhos. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola – PPGEA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –CNPq, pela bolsa de estudos.

Agradeço ao meu orientador, pela orientação, apoio, incentivo, mais principalmente por toda santa paciência que soube me conduzir em meio aos meus desesperos.

Agradeço a minha coorientadora, pelos ensinamentos oferecidos.

Agradeço ao professor Paschoal, pela solicitude, acolhimento e orientação quando muito precisei, minha eterna gratidão.

Agradeço aos Professores Herbert Siqueira, Rosana Blawid (Fitovirologia – UFRPE) e Marcelo Paiva (UFPE/IAM) pela disponibilidade de uso de seus respectivos laboratórios.

Aos membros do laboratório de Taxonomia e Toxicologia, que me receberam.

A banca examinadora que disponibilizou seu tempo para avaliar o meu trabalho.

As minhas amigas Ádria, Leidiane e Fernanda por tudo que vivemos no início do mestrado.

A Gabriel Araújo, por toda ajuda e todo companheirismo no desenvolvimento deste estudo.

Agradeço a família Belmonte por todo carinho, cuidado e amor.

Agradeço a Hugo Leonardo Belmonte, que se tornou presença indispensável, que tanto me apoia e incentiva, eternamente grata por seu amor.

Agradeço aos meus pais e irmã pela confiança depositada em mim.

E principalmente, ao bom Deus, pela sua doce presença que me conduz todos os dias, me revestindo de força e discernimento, sem sua presença nada seria

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
Broca da Cana-de-Açúcar (<i>Diatraea saccharalis</i>).....	2
Controle da Broca da Cana-de-Açúcar.....	3
RNA Interferente Como Método de Controle de Insetos.....	4
O Sistema Imune dos Insetos.....	6
Vias do Sistema Imune de Insetos.....	7
LITERATURA CITADA	11
2 RESPOSTAS MOLECULARES DE <i>Diatraea saccharalis</i> (FAB. 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)A dsRNAs ¹	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
AGRADECIMENTOS.....	39

	LITERATURA CITADA.....	39
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar *Saccharum officinarum* (Linnaeus) é uma monocotiledônea de origem asiática pertencente à família das Poaceae (Machado & Habib 2009). Essa foi a primeira planta introduzida e cultivada em terras brasileiras com a chegada da coroa portuguesa no século XVI, que proporcionou grande crescimento econômico para regiões nordestinas como, Pernambuco e Bahia (Gallo 1965, Lucchesi 2001, Araújo & Santos 2003). Devido a sua relevância histórica-econômica para o país, desde o período colonial até nos dias atuais, a cana de açúcar é considerada uma das principais culturas nacionais.

O Brasil destaca-se no cenário internacional da produção da cana-de-açúcar, sendo o maior produtor mundial, responsável por 521,2 milhões de toneladas produzidas, o que equivale a 34% da produção universal. (FAOSTAT 2020, CONAB 2020). No cenário interno, o Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, correspondendo a 52% das áreas plantadas, seguido por Goiás (10,6%), Minas Gerais (9,5%), Mato Grosso do Sul (7,2%), Paraná (6,9%) e Pernambuco (2,9%) (CONAB 2020). O setor da cana-de-açúcar além de contribuir economicamente para o agronegócio brasileiro também contribui socialmente atuando na geração de empregos formais no País (Cardozo & Cunha 2018). A relevância desta cultura é atribuída a sua versatilidade, ligada a capacidade da planta de armazenar altas concentrações de sacarose nos seus colmos e raízes, permitindo gerar uma grande quantidade de produtos, para as mais diversas formas de uso como: forragem na alimentação animal, na produção de melaço, rapadura, aguardente, etc. Sendo o álcool e açúcar os mais importantes (Caputo *et al.* 2008, CONAB 2020).

Broca da Cana-de-Açúcar (*Diatraea saccharalis*)

Diversos fatores podem interferir na produtividade e na qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. Entre esses aspectos os insetos-pragas são responsáveis por sérios problemas econômicos afetando negativamente a produção de açúcar e etanol (Long & Hensley 1987). Dentre os insetos-pragas associados à cana-de-açúcar, a espécie *Diatraea saccharalis* (Fabricius 1794) pertencente a ordem Lepidoptera, família Crambidae, popularmente conhecida como a broca da cana-de-açúcar, é considerada a principal praga da cana-de-açúcar no Brasil (Gallo *et al.* 2002, Macedo & Macedo 2004, Guzzo & Negrisoli 2012).

A broca da cana-de-açúcar é uma espécie polífaga, relatada em diversas espécies da família Poaceae, como milho, sorgo, trigo, arroz e outras gramíneas. No entanto, é na cultura da cana-de-açúcar que recebe maior destaque (Bortoli *et al.* 2005, Cruz 2007, Vilela *et al.* 2014). Isto deve-se a ocorrência desta praga em todas as fases de desenvolvimento da planta e as injúrias provocados durante alimentação de sua fase larval, que provocam danos diretos e indiretos. Os danos diretos decorrem da alimentação das lagartas que ao entrarem no interior do colmo, constroem galerias, provocando perda de peso, falha de germinação, facilitação de tombamento da cana pelo vento e em plantas jovens pode levar ao secamento dos ponteiros, sintoma conhecido como coração morto (Macedo & Macedo 2004). Os danos indiretos são decorrentes da entrada de fungos patogênicos como *Colletotrichum falcatum* (Went), e *Fusarium moniliforme* (Sheldon), facilitada pela abertura das galerias. Estes fungos são responsáveis pela doença denominada podridão vermelha, que resulta na inversão da sacarose diminuindo o rendimento durante o refinamento da cana-de-açúcar (Gallo 1965, Gallo *et al.* 2002, Macedo & Macedo 2004, Demetrio 2008).

Controle da Broca da Cana-de-Açúcar

O controle de *D. saccharalis* vem sendo realizado principalmente por meio do manejo integrado de pragas, através de programas de controle biológico e uso de variedades resistentes (Botelho 1992, Silva *et al.* 1999, Demetrio 2008). No Brasil, o uso do parasitoide larval, *Cotesia flavipes* (Cameronn 1891), é a ferramenta de controle mais difundida e utilizada devido a facilidade de criação massal e eficiência no controle (Botelho & Macedo 2002). Outros parasitoides têm se mostrado promissores como agentes reguladores da população da broca da cana-de-açúcar, como o caso do microhimenóptero *Trichogramma galloi* (Zucchi 1988) que parasita ovos de lepidópteros, em associação com *C. flavipes* podem garantir o maior sucesso na redução da população de *D. saccharalis* (Botelho 1992, Nava *et al.* 2009).

Outra opção para o controle de *D. saccharalis* advém dos avanços na biotecnologia, no âmbito da biologia molecular e engenharia genética, que tem revolucionado com modernas tecnologias que permitem identificar, selecionar e inserir genes que codificam características de interesses em plantas. Um dos principais resultados desses avanços é uma variedade de cana resistente à broca da cana-de-açúcar desenvolvida pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) (Aragão 2003, Carrer *et al.* 2010).

Nesse contexto dos avanços na biotecnologia, uma nova ferramenta com grande potencial para o manejo de pragas agrícolas é a técnica do RNA interferente (RNAi), que baseia-se no silenciamento gênico por RNA de dupla fita. Este processo é responsável por inibir a ação de um gene específico de um dado organismo baseado na degradação de RNA mensageiros homólogos, causando a diminuição na síntese de proteínas correspondentes (Zamore *et al.* 2000, Baum *et al.* 2007, Camargo *et al.* 2016).

RNA Interferente Como Método de Controle de Insetos

O RNA interferente é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) que ocorre naturalmente em animais e plantas, funcionando como uma defesa específica contra vírus (Hannon 2002, Terenius *et al.* 2011). Esse mecanismo natural passou a ser porposto como uma nova estratégia de controle de pragas, aplicado a plantas transgênicas que expressam dsRNAs, conferindo-lhe resistência a praga-alvo. Porém, o uso eficiente desta tecnologia ainda apresenta diversos desafios como, forma de administração do dsRNA para o interior das células, concentração adequada, tipo de tecido a qual a molécula de dsRNA deve ser introduzida e os genes alvos (Terenius *et al.* 2011).

Os dsRNAs podem ser administrados ao organismo alvo por meio de microinjeção na hemolinfa ou em ovos, alimentação, imersão, eletroporação, infecção viral e técnicas transgênicas (Burand & Hunter 2013, Xu *et al.* 2016). Nos insetos, as mais utilizadas são por microinjeção e alimentação. Estudos de Quan *et al.* 2002, Price & Gatehouse 2008, Hassanien *et al.* 2014, Li *et al.* 2014, Liu *et al.* 2012, Qian *et al.* 2015, mostraram que a técnica por microinjeção em larvas e/ou ovos é um meio viável de fornecer dsRNA as células. Outra forma eficiente de administrar dsRNA aos organismos, menos invasiva por evitar danos mecânicos de manuseios, é por alimentação. Sendo, ofertada na forma de dieta artificial ou gotas, essa forma de administração posteriormente passa a ser utilizada no desenvolvimento de novos métodos de controle de pragas como as plantas transgênicas (Price & Gatehouse 2008, Yang *et al.* 2009, Terenius *et al.* 2011, Xu *et al.* 2016, Ramaseshadri *et al.* 2013, Galdeano *et al.* 2017).

As diferentes concentrações administradas de dsRNAs é responsável pelo sucesso bastante variado entre os insetos ao RNAi. Em algumas espécies da ordem Coleoptera, o RNAi é altamente eficiente. No entanto, para os lepidópteros os resultados são bastante variados e muitas vezes

ineficazes. Em espécies como *Hyalophora cecropia* (Linnaeu 1758), *Antheraea pernyi* (Guérin-Méneville, 1855) e *Manduca sexta* (Linnaeus 1763) foram registrados altos níveis de silenciamento com aplicações muito baixas de dsRNA (<0,01-0,1µg por mg de tecido) (Terenius *et al.* 2011). Quanto para larvas de *Antheraea mylitta* (Drury 1773), foram verificados elevados níveis de silenciamento em uma dose de 100µg de dsRNA (Terenius *et al.* 2011). Concentrações maiores que 100µg tiveram maiores chances de sucesso em relação a concentrações de dose mais baixas em *Bombyx mori* (Linneau 1758) (Terenius *et al.* 2011).

Outros fatores que podem variar consideravelmente o efeito do RNA interferente é o tipo de tecido a qual a molécula de dsRNA é introduzida e a escolha do gene alvo. Os órgãos como a hemocele, corpos gordurosos e o intestino médio são os principais tecidos direcionados (Terenius *et al.* 2011). Para os genes alvos selecionados, esses devem exercer funções vitais e essenciais, de forma que as modificações de expressão dos genes selecionados impeçam o desenvolvimento normal do inseto, ocasionando alterações fisiológicas e morfológicas que causam a morte do organismo, e que tenha especificidade para a espécie-alvo (Huvenne & Smagghe 2010, Terenius *et al.* 2011, Barros *et al.* 2016).

Nos lepidópteros, a variação da eficiência ao RNAi também pode está relacionada a outros fatores, como a presença de ribonucleases de fita dupla (dsRNase) que digerem dsRNAs no lúmen e na hemolinfa (Arimatsu *et al.* 2007, Terenius *et al.* 2011, Garbutt *et al.* 2012). Adicionalmente, estudos em *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith 1797) mostraram que os dsRNAs que não são degradados pelas nucleases podem ser acumulados em corpúsculos ácidos das células do intestino médio e corpos gordurosos, e logo em seguida são internalizados nos endossomos responsáveis pelo transporte e digestão de partículas capturadas pela célula, o que contribui para a baixa eficiência do RNAi (Yoon *et al.* 2017).

Segundo Guan *et al.* (2018), essa característica distinta da ordem Lepidoptera está relacionada a pelo menos um gene específico. Estudos em *Ostrinia furnacalis* (Guenée 1854) foi identificado um gene denominado *up56* que é regulado em resposta a presença de dsRNA na hemolinfa, a proteína expressa por esse gene degrada RNA de cadeia simples (ssRNA), RNA de cadeia dupla (dsRNA) e DNA de fita dupla (dsDNA) (Guan *et al.* 2017). Posteriormente, foi realizado o silenciamento do gene *up56* em *O. furnacalis*, e observado o acréscimo na quantidade e na diversidade de pequenos RNAs, levando ao aumento significativo na eficiência de RNAi. Neste, mesmo estudo, o gene *up56* foi introduzido e superexpresso em *Drosophila melanogaster* passando a suprimir a eficiência do RNAi nesta espécie, e, desta forma, pode-se atribuir a este gene a possível causa da insensibilidade ao RNAi em *O. furnacalis* (Guan *et al.* 2018). Essa nuclease vista como um fator limitante a eficiência do RNAi foi renomeada passando chamar-se REase, por ser um dos elementos que explicam a refratariedade do RNAi em lepidópteros (Guan *et al.* 2018). Sequências homólogas desse gene *up56* foram encontradas em sete outras espécies de lepidópteros.

O Sistema Imune dos Insetos

Os insetos, para se protegerem dos inimigos naturais e agentes patogênicos desenvolveram um eficiente sistema de defesa. Constituído de barreiras estruturais “passivas” e resposta ativas, esses elementos integram o sistema imunológico dos invertebrados (Ratcliffe *et al.* 1985, Lavine & Stand 2002, Negreiro *et al.* 2004). As barreiras estruturais são compostas pelo exoesqueleto, sistema respiratório com seus espiráculos e traqueias, e pelo sistema digestivo formado pela membrana peritrófica e tecido epitelial, que juntos compõem a primeira linha de defesa dos insetos (Dunn 1990, Govind 2008). Diferentes dos vertebrados, os insetos não possuem sistema imune adaptativo baseado em células B e T, responsáveis pela memória e especificidade que caracterizam o sistema

adaptativo, no entanto, possuem um sistema de resposta inata bem desenvolvido (Vilmos & Kurucz 1998, Lavine & Strand 2002). As respostas ativas são formadas por barreiras celulares e humorais que compõem um dos principais mecanismos de defesa, chamado de sistema imunológico inato (Vimos & Kurucz 1998, Lavine & Strand 2002). Os mecanismos celulares envolvem ações de fagocitose, nodulação e encapsulamento, que são resultados de atividade de células especializadas, os hemócitos, que atuam juntamente com as defesas de peptídeos antimicrobianos (Vilcinskas & Gotz 1999, Silva 2002).

Vias do Sistema Imune de Insetos

O sistema imune de insetos consiste de vias de sinalização que induzem a expressão de genes responsáveis por controlar vários mecanismos de defesa, permitindo eliminar grande parte das infecções. Em análise de transcrito do lepidóptero *Manduca Sexta* foram identificados 232 genes relacionados a imunidade, sendo 31% desses genes pertencentes as vias de transdução de sinal intracelulares (Gunaratna & Jiang 2013). Nos insetos são identificadas três principais vias de defesa imune: Toll, IMD e Jak/STAT, responsáveis pela produção de peptídeos em resposta a agentes patogênicos (Imler & Hoffmann 2000, Hultmark 2003). Pesquisas com *Drosophila* mostraram que a imunidade inata contra bactérias e fungos é governada principalmente por Toll e IMD, respectivamente, enquanto a resposta antiviral pode ser induzida pela via Jak-Stat, e também pela via do siRNA/RNAi (Govind 2008).

A via Toll é uma das mais importantes, controla não somente as atividades de peptídeos antimicrobianos, como também componentes envolvidos em outras respostas imunes, como a melanização (Tang 2009). Toll é uma glicoproteína integral de membrana, ativada pela proteína chave Spatzle, que para interagir com os receptores Toll requer um processamento por tripsina ou

outra protease para liberar o domínio de cisteína (Sun Y *et al.* 2016). Spatzle quando se liga a Toll desencadeia uma cascata proteolítica, envolvendo três proteínas contendo o complexo de sinalização com domínios "Dead" induzida por Toll (DD): MyD88 (gene de Resposta primária de diferenciação mielóide 88), Tube que está localizado na membrana e Pelle que tem um domínio de serina-treonina quinase (Ferrandon *et al.* 2007, Sun Y *et al.* 2016). A proteína Tube contém duas superfícies opostas ou bipartidas que interagem com DDs de MyD88 e Pelle. Pelle conduz a dissociação do complexo dorsal-Cactus por meio de fosforilação, permitindo a translocação nuclear do fator de transcrição Dorsal (da família NF- κ B), e induzindo a expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos (Engstrom 1998, Imler & Hoffmann 2000, Lavine & Strand 2002, Hoffman 2003, Ferrandon *et al.* 2007).

A via IMD (*immune deficiency*) é induzida principalmente por bactérias gram-negativas, sendo responsável por controlar a produção de um conjunto de peptídeos antimicrobianos (diptericina, drosocina, cecropinas e attacinas) contra essas bactérias (Hoffman 2003). O principal receptor dessa via é uma proteína transmembranar de reconhecimento peptidoglicano PGRP-LC que pertence à família PGRP, a ativação dos genes depende do fator tipo Rel/NF- κ B chamado Relish. Relish é uma proteína da família Rel que contém um domínio de "Dead" semelhante a proteína integrante do receptor (TNF) de mamíferos (Hoffman 2003, Lemaitre *et al.* 1996, Govind 2008). Essa via é composta pelo complexo de IKK, o adaptador FADD, a caspase Dredd, e o fator de transcrição Relish (Govind 2008). A sinalização desta via é ativada quando moléculas específicas dos microrganismos se ligam ao receptor PGRPs-LC transmitindo o sinal a proteína IMD que culmina na fosforilação de Relish, ativando inicialmente FADD e então a clivagem endoproteolítica por caspase de Dredd resultando em duas moléculas: uma contendo a região do tipo NF- κ B que permanece no citoplasma e outra com domínio de homologia Rel livre do domínio inibidor, o que

migra para a região nuclear, chegando ao núcleo para promover ativação dos genes codificadores de peptídeos antibacteriano (Stoven *et al.* 2003, Khush *et al.* 2002, Hoffman 2003, Lemaitre *et al.* 1996).

Uma das principais vias de defesa contra vírus é a via JAK/STAT, que se mantém conservada ao longo da evolução, em muitos organismos estudados, e possui três componentes principais: O receptor de citocina (Domeless), a proteína quinase Janus (JAK) e o fator de transcrição STAT (O'shea *et al.* 2015). Essa via conduz a sinalização intracelular em resposta a citocinas. A ativação da via ocorre pela associação entre JAK e STAT que através de fosforilação mútua tornam-se ativas, criando locais de ancoragem na cauda de seus receptores para a ligação dos fatores de transcrição da família STAT citoplasmáticos, o homodímero de STAT ativado se liga diretamente ao DNA, regulando a expressão de genes em resposta a infecção viral (O' shea 2013, Morin-Paulard *et al.* 2013, O'Shea *et al.* 2015). Além disso, em *Drosophila*, a via JAK/STAT também é responsável por inúmeras funções como a determinação de sexo, segmentação do embrião, formação de olhos e asas no desenvolvimento embrionário, do sistema traqueal, das células do intestino e dos hemócitos (Bina & Zeidler 2009). Ainda, proteínas da família STAT foram identificadas em regiões específicas do DNA e em translocação nuclear nas células dos corpos gordurosos quando infectada por bactérias, sugerindo fortemente o seu envolvimento em resposta imune (Agaisse & Perrimon 2004). Segundo Agaisse *et al.* (2003) atividades bacterianas em *Drosophila* tem como consequência a produção de vários peptídeos antimicrobianos pela expressão de genes Tep e Tot. Desempenhos similares foram observados no mosquito *Anopheles gambiae* (Giles 1926) onde a proteína AgSTAT foi translocada no núcleo das células dos corpos gordurosos em resposta a ação bacteriana (Barillas-Mury *et al.* 1999, Agaisse *et al.* 2003).

O mecanismo de RNAi foi descoberto em 1998 a partir de estudos realizados com nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans* (Maupas), desde então, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados com intuito de elucidar esse mecanismo nos mais diferentes organismos (Fire *et al.* 1998, Meister & Tuschl 2004, Merkling & Van Rij 2013). Em plantas e insetos a interferência por RNA tem sido atribuído as respostas imunes contra vírus. Testes em *Drosophila melanogaster* chegaram à conclusão que o silenciamento por RNA é crucial para a defesa antiviral no adulto de *D. melanogaster*, com o mecanismo de RNAi exercendo um papel central na resposta antiviral (Van Rij & Andino 2006, Van Rij *et al.* 2006).

Esse processo inicia-se com detecção de moléculas de dsRNA no citoplasma pela enzima Dicer 2, uma ribonuclease do tipo III, responsável pela clivagem do dsRNA em pequenos fragmentos de nucleotídeos contendo de 21 a 25 nucleotídeos (siRNAs) (Agrawal *et al.* 2003, Van Rij *et al.* 2006, França *et al.* 2010). Os pequenos fragmentos de RNA (siRNAs) são conduzidos pela proteína R2D2 ao complexo de silenciamento RISC (do inglês RNA-induced silencing complex), esse complexo é formado por um conjunto de proteínas que reconhecem e clivam o RNA mensageiro que é homólogo ao fragmento que está ligado ao complexo RISC (Terenius *et al.* 2011). Este processo decorre do reconhecimento dos siRNAs pela primeira subunidade do complexo RISC que elimina uma das fitas e a outra é mantida para guiar o complexo proteico a região homóloga do RNAm (Hannon 2002, Meister & Tuschl 2004). A endonuclease presente no complexo RISC, chamada de proteína Argonauta (Ago-2) utiliza a fita simples de dsRNA para a clivagem de todos os RNAm complementares a ela, fazendo com que a quantidade de moléculas de RNAm específico para o gene alvo seja reduzida, diminuindo assim a quantidade de proteína expressa (Hannon 2002, Meister & Tuschl 2004, Van Rij *et al.* 2006, Terenius *et al.* 2011, Kim *et al.* 2012).

Compreender as vias de sinalizações de defesa dos insetos pragas a nível molecular é fundamental para criar novas estratégias eficientes de controles. É o primeiro passo, para futuras aplicações em campo. Assim, o estudo das vias JAK-STAT e RNAi em *D. saccharalis* são importantes para entender parte do sistema de defesa desta lagarta, contribuindo posteriormente para inovações nas técnicas de controle deste inseto. Sendo, essas vias ativadas por ações virais, neste estudo foram induzidas por moléculas de dsRNA (siRNA). Outro elemento importante que foi verificado em *D. saccharalis*, é o insucesso da aplicação de RNAi em alguns Lepidoptera e outras ordens de insetos, devido a ação de nucleases intra e extracelulares relatadas na literatura. Deste modo, foram analisada a eficácia da técnica de RNAi e a presença de nucleases na broca da cana-de-açúcar.

Literatura citada

- . **Agaisse, H. & N. Perrimon. 2004.** The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 198: 72–82.
- Agaisse, H., U.M. Petersen, M. Boutros, B. Mathey-Prevot & N. Perrimon. 2003.** Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell* 5: 441–450.
- Agrawal, N., P.V.N. Dasaradhi, A. Mohmmmed, P. Malhotra, R.K. Bhatnagar & S.K. Mvkherjee. 2003.** RNA Interferencie: Biology, mecanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 67: 657-685.
- Aragão, F.J.L. 2003.** Organismos transgênicos. Editora Manole Ltda. p. 17–40.
- Araújo, E. D. S., & Santos, J. A. P. 2013.** O desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar no Brasil e sua relevância na economia nacional. *FACIDER-Revista Científica*, 4(4).
- Arimatsu, Y., E. Kotani, Y. Sugimura & T. Furusawa. 2007.** Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 176–183.
- Barillas-Mury, C., Y.S. Han, D. Seeley & F.C. Kafatos. 1999.** Anopheles gambiae Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* 18: 959–967.

259 **Barros, B.D.A., A. Laura, M. Verdolin, R. Oliveira, R.W. Noda & N.P. Carneiro. n.d. (2016).**
 260 Identificação de genes alvo para controle de *Helicoverpa armigera* em milho via RNA
 261 interferente (RNAi). In Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE). In:
 262 congresso nacional de milho e sorgo, Bento Gonçalves. Milho e sorgo: inovações, mercados e
 263 segurança alimentar: anais. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. 36.

264 **Baum, J.A., T. Bogaert, W. Clinton, G.R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G.**
 265 **Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn & J. Roberts. 2007.** Control of coleopteran
 266 insect pests through RNA interference. Nat. Biotechnol. 25: 1322–1326.

267 **Bina, S. & M. Zeidler. 2009.** Madame Curie Bioscience Database. Austin Landes Biosci. 2000–
 268 2013.

269 **Bortoli, S.A. de, H.O.S. Dória, N.M.M.S. Albergaria & M.V. Botti. 2005.** Aspectos biológicos
 270 e dano de *Diatraea saccharalis* (fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em sorgo cultivado sob
 271 diferentes doses de nitrogênio e potássio. Ciênc. agrotec 29: 267–273.

272 **Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** Cotesia flavipes para o controle de *Diatraea saccharalis*.
 273 Control. Biol. no Bras. Parasitoides e Predadores. 409–426.

274 **Botelho, P.S.M. 1992.** Quinze anos de controle biológico da *Diatraea saccharalis* utilizando
 275 parasitóides. Pesqui. Agropécuaria Bras. 27: 255–262.

276 **Burand, J.P. & W.B. Hunter. 2013.** RNAi: Future in insect management. J. Invertebr. Pathol. 112:
 277 1–7.

278 **Camargo, R.A., G.O. Barbosa, I.P. Possignolo, L.E.P. Peres, E. Lam, J.E. Lima, A. Figueira**
 279 **& H. Marques-Souza. 2016.** RNA interference as a gene silencing tool to control *Tuta*
 280 *absoluta* in tomato (*Solanum lycopersicum*). PeerJ 2016.

281 **Caputo, M.M., E.G.F. De Beauclair, M. De Almeida Silva & S.M. De Stefano Piedade. 2008.**
 282 Resposta de genótipos de cana-de-açúcar à aplicação de indutores de maturação. Bragantia 67:
 283 15–23.

284 **Cardozo, D. P., & M. D. S. Cunha (2018).** Salários e empregos no mercado de trabalho formal
 285 agrícola brasileiro. Revista de Política Agrícola. 27: 17-32.

286 **Carrer, H., A.L. Barbosa & D.A Ramiro. 2010.** Biotecnologia na agricultura. Estud. Ava. 24:
 287 149-164.

288 **CONAB. 2020.** Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. 6:1-62.

289 **Cruz, I. 2007.** A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. Circ.
 290 Técnica 90: 12.

291 **Demetrio, P.A. 2008.** Avaliação de Clones de Cana-de-Açúcar Promissores RBs Quanto à
 292 Resistência à Broca-da-Cana (*Diatraea Saccharalis*) na Região Noroeste do Paraná. Iniciação
 293 Científica - CESUMAR 10: 13–16.

294 **Engstrom, Y. 1998.** Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. Elsevier
 295 23: 345-358.

- Faostat, F. 2020.** agriculture organization of the United Nations. Disponível em <http://faostat.fao.org> acessado: 02 de novembro de 2019.
- França, N.R. de, D. Mesquita Júnior, A.B. Lima, F.V.C. Pucci, L.E.C. Andrade & N.P. Silva. 2010.** Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. Rev. Bras. Reumatol. 50: 695–702.
- Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. 2007.** The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. Nat. Rev. Immunol. 7: 862-874.
- Fire, A., S. XV, M.K. Montgomery, S.A. Kastan, S.E. Driver & C.C. Mello. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-811.
- Galdeano, D.M., M.C. Breton, J.R.S. Lopes, B.W. Falk & M.A. Machado. 2017.** Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. PLoS One 12: 1–15.
- Gallo, D. 1965.** Estudo da broca da cana de açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794). An. da Esc. Super. Agric. Luiz Queiroz 22: 183–194.
- Gallo, D., O. Nakano, S.S. Neto, R.P.L. Carvalho & G.C. d. Baptista. 2002.** Entomologia Agrícola. Piracicaba, FEAQ. 920p.
- Garbutt, J.S. & S.E. Reynolds. 2012.** Induction of RNA interference genes by double-stranded RNA; implications for susceptibility to RNA interference. Insect Biochem. Mol. Biol. 42: 621–628.
- Govind, S. 2008.** Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. Insect Sci. 15: 29–43.
- Guan, R., H. Li & X. Miao. 2017.** RNAi pest control and enhanced BT insecticidal efficiency achieved by dsRNA of chymotrypsin-like genes in *Ostrinia furnacalis*. J. Pest Sci. 90: 745–757.
- Guan, R.B., H.C. Li, Y.J. Fan, S.R. Hu, O. Christiaens, G. Smagghe & X.X. Miao. 2018.** A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. J. Biol. Chem. 293: 6011–6021.
- Gunaratna, R.T. & H. Jiang. 2013.** A comprehensive analysis of the *Manduca sexta* immunotranscriptome. Dev. Comp. Immunol. 39: 388–398.
- Guzzo, E. C., & A.S. Negrisoni. 2012.** Diagnóstico dos processos tecnológicos utilizados no manejo integrado de pragas da cana-de-açúcar em El Salvador. Boletim Técnico Embrapa Tabuleiros Costeiros. 174: 1-33.
- Hannon, G.J. 2002.** RNA interference. Nature. 418: 244–251.
- Hassanien, I.T.E., M. Meyering-Vos & K.H. Hoffmann. 2014.** RNA interference reveals allatotropin functioning in larvae and adults of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). PAGEPress Entomologia 2:169

332 **Hoffmann, J.A. 2003.** The immune response of *Drosophila*. Nature 426: 33-38.

333 **Hultmark, D. 2003.** *Drosophila* immunity: Paths and patterns. Curr. Opin. Immunol. 15: 12–19.

334 **Huvenne, H. & G. Smagghe. 2010.** Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi
335 for pest control: A review. J. Insect Physiol. 56: 227–235.

336 **Imler, J.L. & J.A. Hoffmann. 2000.** Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of
337 *Drosophila*. Curr. Opin. Microbiol. 3: 16–22.

338 **Khush, R.S., W.D. Cornwell, J. N. Uram & B. Lemaitre. 2002.** A ubiquitin-proteasome
339 pathway represses the drosophila immune deficiency signaling cascade. Cell Press 12: 1728-
340 1737.

341

342 **Kim, J. Y., J.Y. Shin, M.R. Kim, S.K. Hann & S.H. Oh . 2012.** siRNA-mediated knock-down of
343 COX-2 in melanocytes suppresses melanogenesis. Exp. Dermatol 21: 420-425.

344

345 **Machado, L. A., & Habib, M. 2009.** Perspectivas e impactos da cultura de cana-de-açúcar no
346 Brasil. Revista Infobios. Disponível em: <http://www.infobios.com/Artigos>.

347

348 **Lavine, M.O & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. Elsevier 32:
349 1295-1309.

350

351 **Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J-M. Reichhart & J.A. Hoffmann. 1996.** The dorso ventral
352 regulatory gene cassette spatzle/Toll/ cactus controls the potent antifungal response in
353 *Drosophila* adults. Cell 86: 973-983p.

354

355 **Li, C., J.F. Yu, Q. Lu, J. Xu, J.H. Liu & H. Ye. 2014.** Molecular characterization and functional
356 analysis of a putative sex-peptide receptor in the tobacco cutworm *Spodoptera litura* (Fabricius,
357 1775) (Lepidoptera: Noctuidae). Austral Entomol. 53: 424–431.

358 **Liu, X., D.Y. Jin, M.T. McManus & Z. Mourelatos. 2012.** Precursor MicroRNA-Programmed
359 Silencing Complex Assembly Pathways in Mammals. Mol. Cell 46: 507–517.

360 **Long, W.H. & S.D. Hensley. 1987.** Insect pests of sugar beet. Annu. Rev. Entomol. Vol. 32 341–
361 360.

362 **Lucchesi, A.A., 2001.** Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), p. 13-45. In P.R.C. Castro, R. A, Kluge
363 (eds.), Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar; seringueira; dedenheiro e oliveira.
364 Cosmópolis, Stoller do Brasil, 138p.

365 **Macedo, N & D. Macedo. 2004.** As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles.
366 Piracicaba. Esalq. (Visão agrícola 1). 9p.

367 **Meister, G. & T. Tuschl. 2004.** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature
368 431: 343–349.

369 **Merkling, S. H., & van Rij, R. P. 2013.** Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila*
370 and mosquito. J Insect Physiol. 59: 159-170.

371 **Morin-Poulard, I., A. Vincent & M. Crozatier. 2013.** The *Drosophila* JAK-STAT pathway in

blood cell formation and immunity . Jak-Stat 2: e25700.

Nava, D.E.N., A.d.S. PINTO, & S.d.A. SILVA. 2009. Controle biológico da broca da cana-de-açúcar. Pelotas, Embrapa Clima Temperado. 287: 28.

O'Shea, J.J., D.M. Schwartz, A. V. Villarino, M. Gadina, I.B. McInnes & A. Laurence. 2015. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. Annu. Rev. Med. 66: 311–328.

O'Shea, J.J., S.M. Holland & L.M. Staudt. 2013. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. N. Engl. J. Med. 368: 161–170.

Price, D.R.G. & J.A. Gatehouse. 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. Trends Biotechnol. 26: 393–400.

Qian, C., W.W. Fu, G.Q. Wei, L. Wang, Q.N. Liu, L.S. Dai, Y. Sun, B.J. Zhu & C.L. Liu. 2015. Identification and expression analysis of vitellogenin receptor from the wild silkworm, bombyx mandarina. Arch. Insect Biochem. Physiol. 89: 181–192.

Quan, G.X., T. Kanda & T. Tamura. 2002. Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. Insect Mol. Biol. 11: 217–222.

Ramaseshadri, P., G. Segers, R. Flannagan, E. Wiggins, W. Clinton, O. Ilagan, B. McNulty, T. Clark & R. Bolognesi. 2013. Physiological and Cellular Responses Caused by RNAi-Mediated Suppression of Snf7 Orthologue in Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) Larvae. PLoS One 8: 1–10.

Silva, M., M.P. Campana, & M. Guimaraes. 1999. Avaliação de clones de híbridos iac de cana-de-açúcar, série 1985, na região de jaú (sp). Bragantia 58: 335-340.

Stöven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engström, Y & Hultmark, D. 2003. Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-κB factor Relish. PNAS. 100: 5991-5996.

Sun, Y., Jiang, Y., Wang, Y., Li, X., Yang, R., Yu, Z., & Qin, L. 2016. The toll signaling pathway in the chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*: Innate immune responses to different microorganisms. PloS one. 11: e0160200.

Tang, H. 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. Fly 3: 105-111p.

Terenius, O., A. Papanicolaou, J.S. Garbutt, I. Eleftherianos, H. Huvenne, S. Kanginakudru, M. Albrechtsen, C. An, J.L. Aymeric, A. Barthel, P. Bebas, K. Bitra, A. Bravo, F. Chevalier, D.P. Collinge, C.M. Crava, R.A. de Maagd, B. Duvic, M. Erlandson, I. Faye, G. Felföldi, H. Fujiwara, R. Futahashi, A.S. Gandhe, H.S. Gatehouse, L.N. Gatehouse, J.M. Giebultowicz, I. Gómez, C.J.P. Grimmelikhuijzen, A.T. Groot, F. Hauser, D.G. Heckel, D.D. Hegedus, S. Hrycaj, L. Huang, J.J. Hull, K. Iatrou, M. Iga, M.R. Kanost, J. Kotwica, C. Li, J. Li, J. Liu, M. Lundmark, S. Matsumoto, M. Meyering-Vos, P.J. Millichap, A. Monteiro, N. Mrinal, T. Niimi, D. Nowara, A. Ohnishi, V. Oostra, K. Ozaki,

413 **M. Papakonstantinou, A. Popadic, M. V. Rajam, S. Saenko, R.M. Simpson, M. Soberón,**
414 **M.R. Strand, S. Tomita, U. Toprak, P. Wang, C.W. Wee, S. Whyard, W. Zhang, J.**
415 **Nagaraju, R.H. ffrench-Constant, S. Herrero, K. Gordon, L. Swevers & G. Smagghe.**
416 **2011.** RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies
417 and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.* 57: 231–245.

418 **Van Rij, R. P., & Andino, R. 2006.** The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection
419 in mammals. *Trends in biotechnology*, 24: 186-193.

420 **Van Rij, R.P., M.C. Saleh, B. Berry, C. Foo, A. Houk, C. Antoniewski & R. Andino. 2006.** The
421 RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila*
422 *melanogaster*. *Genes Dev.* 20: 2985–2995.

423 **Vilela, M., J.C. Moraes, M. Coelho, J. Franoso, T.M. dos Santos-Cividanes & R. Sakomura.**
424 **2014.** Response of Moderate Pest Resistant and Susceptible Cultivar of Sugarcane to Silicon
425 Application. *Am. J. Plant Sci.* 05: 3823–3828.

426 **Xu, J., X.F. Wang, P. Chen, F.T. Liu, S.C. Zheng, H. Ye & M.H. Mo. 2016.** RNA interference
427 in moths: Mechanisms, applications, and progress. *Genes (Basel).* 7:88.

428 **Yang, Z.X., L.Z. Wen, Q.J. Wu, S.L. Wang, B.Y. Xu, X.L. Chang, G.R. Zhu & Y.J. Zhang.**
429 **2009.** Effects of injecting cadherin gene dsRNA on growth and development in diamondback
430 moth *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae). *J. Appl. Entomol.* 133: 75–81.

431 **Yoon, J.S., D. Gurusamy & S.R. Palli. 2017.** Accumulation of dsRNA in endosomes contributes
432 to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem.*
433 *Mol. Biol.* 90: 53–60.

434 **Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp & D.P. Bartel. 2000.** RNAi: Double-stranded RNA directs
435 the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25–33.

437

438

439

CAPÍTULO 2

440 RESPOSTAS MOLECULARES DE *Diatraea saccharalis* (FAB. 1794) (LEPIDOPTERA:

441 CRAMBIDAE) A dsRNAs¹

442

443

444 MANOELY A. REIS²

445

446 ²Departamento de Agronomia – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom

447 Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-900 –PE, Brasil.

448

449

450

451

452

453 ¹Reis, M.A. Respostas Moleculares de *Diatraea saccharalis* (FAB. 1794) (Lepidoptera:
454 Crambidae) a dsRNAs. A ser submetido

455

456

457 RESUMO - *Diatraea saccharalis* é a principal praga da cana-de-açúcar no Brasil. Porém, ainda
458 existem poucas informações sobre o sistema imune desta lagarta. Assim, esta pesquisa teve como
459 objetivo os estudos das vias antivirais JAK-STAT e RNAi quando administradas por dsRNA. Para
460 isso, os componentes das vias foram identificados e caracterizados em *D. saccharalis* por análise
461 *in silico*, e de expressão, que foram feitas por RT-qPCR com validação de genes referência. Os
462 resultados *in silico* identificaram 11 *contigs* dos diferentes componentes da via JAK-STAT e quatro
463 *contigs* da via RNAi no transcrito de *D. saccharalis*. Dois genes de cada via foram escolhidos
464 para a melhor caracterização. Foram escolhidos os genes *DsacHop* e *DsacSTAT* para a via JAK-
465 STAT e *DsacDicer 2* e *DsacAgo2* para a via do RNAi. Todos esses apresentaram uma proteína predita
466 com seus respectivos domínios proteicos coincidindo com outras proteínas homólogas destas vias.
467 Os melhores genes referência de *D. saccharalis* na condição experimental estudada foram B-TUB
468 e GAPDH. Na avaliação da expressão dos genes escolhidos na presença de dsRNA não obteve-se
469 diferença significativa nas diferentes dosagens (0,2 µg e 1 µg) utilizadas para nenhum dos genes
470 estudados. Assim, buscou-se identificar alguma molécula que pudesse estar impedindo que o
471 dsRNA entrasse dentro das células e ativasse os mecanismos de resposta Imunológica. Em análise
472 preliminar, identificou-se em *D. saccharalis* um *contig* com alta identidade a proteína REase, uma
473 nuclease que causa refratariedade do RNAi em Lepidoptera. O gene *DsacREase* apresentou
474 expressão positiva a dosagem de 1 µg de dsGFP, porém a tentativa de silenciamento não foi bem
475 sucedida com dsRNA específico (dsREase) na dose utilizada. Isso indica um importante papel das
476 nucleases no sistema de defesa dos Lepidoptera, e possivelmente existe a atuação de outras
477 nucleases além da REase. Provavelmente, para uma possível resposta ao RNAi em *D. saccharalis*
478 serão necessários novos estudos utilizando dosagens maiores de dsRNAs.

479 PALAVRAS-CHAVE: Broca-da-cana, imune system, JAK-STAT, RNAi, Nucleases

MOLECULAR RESPONSE OF *Diatraea saccharalis* (FAB. 1794) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) TO dsRNA

ABSTRACT – *Diatraea saccharalis* is the main sugarcane pest in Brazil. However, there is still little information about this insect immune system. Thus, this research aimed to study the JAK-STAT and RNAi antiviral pathways when induced by dsRNA. The component genes of these pathways were identified and characterized by *in silico* analysis, and gene expression by RT-qPCR, with validation of the best reference genes. The *in silico* analysis identified 11 contigs of the different components of the JAK-STAT pathway and four contigs of the RNAi pathway in a *D. saccharalis* midgut transcriptome. Two genes from each pathway were chosen for further characterization. *DsacHop* and *DsacSTAT* were chosen for the JAK-STAT pathway and *DsacDicer2* and *DsacAgo2* for the RNAi pathway. Analysis of predicted protein domains and phylogenetic analysis confirmed that these genes are homologous of their respective gene at both pathways. The best reference genes for *D. saccharalis* at applied experimental conditions were B-TUB and GAPDH. Chosen gene expression in insects treated with dsRNA presented no difference at different dsRNA amounts (0.2 µg and 1 µg). Thus, we sought to identify any molecule that could be preventing the dsRNA from entering the cells and activating the immune response mechanisms. In a preliminary analysis, it was identified a contig with high identity with the REase protein, a nuclease that causes RNAi refractoriness in Lepidoptera. *DsacREase* was upregulated at the dosage of 1 µg of dsGFP, but gene silencing was not achieved with specific dsRNA (dsREase). This indicates an important role of nucleases in the defense system of Lepidoptera, and possibly there are other nucleases besides REase involved in dsRNA degradation. Therefore, for a possible improvement of dsRNA-induced RNAi in *D.saccharalis*, further studies will be necessary

503 using higher dosages of dsRNAs and investigating other possible nucleases present in the
504 insect genome.

505 KEY WORDS: Sugarcane borer, immune system, JAK-STAT, RNAi, Nucleases

506

Introdução

Os insetos estão presentes em quase todos os nichos ecológicos, expostos ao ataque de inúmeros inimigos naturais, muitos dos quais são potencialmente nocivos como os microrganismos entomopatogênicos (Silva 2002, Negreiro *et al.* 2004). Para se proteger desses ataques, os insetos desenvolveram um eficiente sistema de defesa composto pelo reconhecimento do agente infeccioso com subsequente ativação das vias de sinalização e genes que controlam o mecanismo de defesa celular e humoral que são responsáveis pela resposta de fagocitose, nodulação, encapsulação, melanização e a produção de peptídeos antimicrobianos (Lemaitre *et al.* 1996, Hoffmann 2003, Liu *et al.* 2013).

Nos insetos são identificadas três principais vias de defesa antimicrobiana: Toll, IMD e JAK/STAT. Essas vias atuam na transdução de sinais, regulando a síntese de diferentes peptídeos antimicrobianos (Hoffmann & Reichhart 2002, Hultmark 2003), e além da via do RNAi que pode atuar na defesa contra vírus (Gammon & Mello, 2015). Geralmente, a via Toll é ativada pela ação de fungos e bactérias gram-positivas, IMD por bactérias gram-negativas e JAK/ STAT atua juntamente com outras vias de sinalização nas respostas às infecções virais (Imler & Hoffmann 2000, Hultmark 2003, Govind 2008).

Embora, já tenham se passado duas décadas após a descoberta do mecanismo do RNA interferente (RNAi), só recentemente foi relatada a sua importância no sistema imune dos insetos, como a resposta antiviral mais robusta e de ampla ação. A via do RNAi é mediada por pequenos RNAs interferentes (siRNA) que permite o reconhecimento e inibição da replicação de vírus (Gammon & Mello 2015). Esses siRNAs ao associarem-se as proteínas Argonautes (Ago), conduzem os mecanismos de defesa, isso porque são capazes de identificar e degradar RNAs de cadeia simples (ss) virais de maneira específica (Gammon & Mello 2015, Kingsolver *et al.* 2013).

Além disto, a via do RNAi está sendo explorada como uma nova estratégia de controle para diversas pragas em diferentes ordens de insetos. Uma vez que o RNAi permite o silenciamento de genes pela inserção de uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA- double stranded RNA) que culmina na degradação de sequências específicas de RNA mensageiros (mRNA), impedindo a síntese de proteína na célula (Fire *et al.* 1998, Agrawal *et al.* 2003).

O mecanismo do RNAi é eficaz em diversas ordens de insetos, porém, na ordem Lepidoptera o sucesso é bastante variado chegando a ser ineficaz. (Terenius *et al.* 2011). Esta refratariedade atribui-se a diversos fatores, que podem ser desde uma resposta mais intensa das vias de defesa, a apoptose de células infectadas, proteção mediada por simbionte, como também a participação de nucleases intra e extracelulares que destroem os dsRNAs de fita dupla antes de entrarem em contato com as proteínas das outras vias (Guan *et al.* 2018).

Diatraea saccharalis (Fabricius 1794) (Lepidoptera) é popularmente conhecida como a broca da cana-de-açúcar, e é considerada a principal praga desta cultura no Brasil. Na sua fase larval é responsável por severos danos a planta, provocando perdas significativas a produção. Chega a causar danos diretos e indiretos decorrentes da abertura de galerias no interior dos colmos, afetando a qualidade e o rendimento de processamento da cana (Gallo *et al.* 2002, Macedo & Macedo 2004). Assim, os estudos do sistema imune de *D. saccharalis* e das vias de sinalização são extremamente importantes para o desenvolvimento de novos métodos eficazes de controle. Desta forma, este trabalho buscou a identificação, caracterização dos genes codificantes de proteínas componentes das vias de resposta imune a vírus (JAK/STAT e RNAi), além de uma ribonuclease (*DsacREase*), e caracterização de suas respostas moleculares à presença RNA dupla-fita na hemolinfa de *D. saccharalis* por RT-qPCR. Também foi determinado o melhor conjunto de genes referência para análise de expressão gênica por qPCR em experimentos com lagartas de *D. saccharalis* injetadas

com dsRNA. Futuramente os resultados aqui gerados poderão auxiliar na elaboração de novas estratégias de controle a broca da cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Criação de *Diatraea saccharalis*. No Laboratório de Patologia de Insetos/UFRPE foi mantida a criação de *D. saccharalis*, onde as lagartas foram alimentadas em dieta artificial de Hensley & Hammond (1968) modificada por PLANALSUCAR (Araújo *et al.* 1985). Lagartas a partir do terceiro instar, pupas e adultos foram mantidos em condições específicas para cada estágio de desenvolvimento. Os ovos, coletados diariamente, foram esterilizados com formol (3%) e sulfato de cobre (1%), e posteriormente armazenados em placas de Petri na presença de umidade. Após eclosão, as lagartas neonatas foram distribuídas em tubos de fundo chato contendo 20 mL de dieta artificial. Os adultos foram mantidos a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de UR, lagartas, pupas e ovos a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de UR e fotoperíodo de 12h L: 12h E.

Identificação e Caracterização das Vias do Sistema Imune que Respondem a Vírus em *Diatraea saccharalis*. As sequências componentes das vias JAK/STAT e RNAi foram inicialmente identificadas na espécie modelo *Drosophila melanogaster* no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), procurando nominalmente no campo “Protein” pelos nomes de todas as proteínas componentes das vias JAK-STAT (Domeless, Hopscotch (JAK), STAT, PTP61F, SOC536E, dPIAS, e Ken e Barbie) e RNAi (Dicer 2, Argonaute 2, R2D2 e C3PO). A partir das sequências obtidas identificou-se através de BlastP as proteínas homólogas de *Bombyx mori*, espécie modelo para Lepidoptera, através do silkbase (<http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>). Em seguida identificou-se, utilizando as sequências de *B. mori* como “iscas”, as sequências de *Diatraea saccharalis* a partir de um transcrito de intestino de lagartas de 4º instar (Noriega *et al.* 2020). Os contigs encontrados no transcrito de *D. saccharalis* foram analisados

576 para saber se possuíam os genes completos, através da predição das janelas de leitura (ORFs)
577 (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/). Para melhor caracterizar as vias estudadas, foram escolhidos
578 dois genes de cada, em JAK-STAT (Hopscotch e STAT) e em RNAi (Dicer 2 e Argonaute 2) para
579 se mapear os principais domínios proteicos de cada proteína predita a partir dos contigs utilizando
580 o algoritmo HMMER (v3.1). (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>). As imagens dos domínios
581 foram feitas com auxílio da ferramenta “PROSITE My Domains” ([prosite.expasy.org/cgi-](http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/mydomains/)
582 [bin/prosite/mydomains/](http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/mydomains/)).

583 **Análises Filogenéticas.** Inicialmente, foram selecionadas para cada gene estudado
584 aproximadamente dez sequências de espécies diferentes, para sete ordens de insetos (Lepidoptera,
585 Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera e Blattodea), para sequências de outras
586 ordens em conjunto (excluindo as outras sete ordens) e para os Arthropoda não-insetos no banco nr
587 do NCBI. As sequências foram recuperadas utilizando as sequências preditas de *D. saccharalis* com
588 a ferramenta BlastP. O alinhamento de múltiplas sequências foi conduzido no MEGA 7 (Molecular
589 Evolutionary Genetics Analysis) usando o algoritmo MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by
590 Log- Expectation). As análises filogenéticas, baseadas em sequências de aminoácidos, foram
591 realizadas por Maximum likelihood (ML) usando PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>)
592 (Guidon *et al.* 2010) e o Smart Model Selection (SMS) foi utilizado para a escolha do modelo de
593 substituição (Lefort *et al.* 2017). As árvores foram representadas graficamente a partir do programa
594 Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

595 **Extração de RNA Total e Síntese de cDNA.** O RNA total dos insetos utilizados em todos os
596 experimentos foi isolado usando o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific, EUA), de acordo com
597 as orientações do fabricante. O RNA total extraído de cada amostra foi analisado através de
598 eletroforese em gel de agarose 1% para observar a integridade do RNA. As amostras foram

quantificadas em um espectrofotômetro do tipo gota (Biodrop Biowave, Biochrom, EUA). A síntese de cDNA foi realizada com 1 µg de RNA utilizando o iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram posteriormente utilizados nas reações de PCR e de RT-qPCR.

Síntese de dsRNA. Para síntese de dsRNA inicialmente foi feita uma primeira etapa de amplificação de fragmento dos genes *AgraCE8.1* e *DsacREase*, *primers* descritos na Tabela 1. Inicialmente, o gene *AgraCE8.1* foi utilizado para sintetizar um dsRNA não-específico para *D. saccharalis*, uma vez que lepidópteros não possuem homólogos para este gene. A partir do produto de PCR da primeira etapa, foi feita uma diluição na razão de 1:20 e esta utilizada para realização de uma segunda PCR com um segundo par de *primers* específicos para cada gene, que continha a sequência do promotor da T7 RNA polimerase (Tabela 1), necessária para a síntese de dsRNA. O produto dessa segunda PCR (500 ng) foi utilizado para a síntese de dsRNA *in vitro*, conforme protocolo do kit MEGAscript® T7 Transcription (Thermo-Fisher, EUA). A reação foi incubada por 8 h a 37°C, seguida por tratamento com DNase I por 15 minutos. Para o pareamento correto das duas fitas de RNA complementares, os produtos da reação foram incubados a 70°C por 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente. Para purificação dos produtos da transcrição seguiu-se uma extração com fenol/clorofórmio e subsequente precipitação com álcool isopropílico. O dsRNA foi dissolvido em H₂O bidestilada e a quantificação foi obtida por espectrofotometria. A integridade do dsRNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. Adicionalmente, o dsRNA da proteína verde fluorescente (GFP), dsGFP foi adquirido da empresa agroRNA (Coreia do Sul). Este dsRNA também foi purificado pelo método de extração fenol/clorofórmio e utilizado como dsRNA não-específico para *D. saccharalis*.

621 **Bioensaios de Microinjeção de dsRNA.** Para os bioensaios foram utilizadas lagartas de 4^o instar.
622 Os insetos foram injetados com quantidades de dsRNA de 0,2 e 1µg de dsRNA, com volume
623 variando de 1 a 4 µL. O RNA total dos insetos foi extraído imediatamente após a injeção, ou quatro
624 horas após a injeção do dsRNA. A extração de RNA e síntese de cDNA foi realizada conforme
625 descrito anteriormente.

626 **Determinação dos Melhores Genes Referência Para a Análise da Expressão Gênica em *D.***
627 ***saccharalis* Após Microinjeção de dsRNA.** Para determinar os melhores genes referência para
628 análise da expressão gênica por RT-qPCR em lagartas de *D. saccharalis* injetadas com dsRNA,
629 foram escolhidos cinco genes candidatos. Estes genes foram selecionados por participarem de
630 processos celulares constitutivos, ou seja, processos de manutenção da célula que estão em
631 constante execução. Os genes escolhidos foram β-Actina (β-Act) e β-Tubulina (β-Tub), que são
632 proteínas estruturais do citoesqueleto; gliceraldeído-3-desidrogenase (GAPDH), que é uma enzima
633 envolvida no processo de respiração celular; RPS10, uma proteína ribossomal; e o fator de
634 alongação alfa (eEF2) que participa do processo de tradução de proteínas. Os *primers* para cada
635 gene estão listados na Tabela 1. A estabilidade de expressão de cada gene candidato foi determinada
636 utilizando o algoritmo geNorm (<https://genorm.cmgg.be/>), seguindo os parâmetros padrão do
637 programa. Este algoritmo utiliza os dados de Cq para calcular quantidades relativas (QR) aplicando
638 a fórmula $QR = 2^{(ddCq)}$. O geNorm avalia a estabilidade de expressão calculando um valor M médio,
639 que é definido como a variação emparelhada de um gene contra todos os outros. Aqueles genes que
640 apresentam valores de M mais baixos, até 0,5 são considerados os mais estáveis. Este programa
641 também calcula o valor V, que é a variação emparelhada (V_n/V_{n+1}) entre cada gene referência,
642 para determinar o número ideal de genes necessários para a normalização. A eficiência de cada
643 primer foi calculada a partir do programa online Real Time PCR miner (<http://ewindup.info/miner/>).

644 Os dados de Cq utilizados foram os de lagartas microinjetadas com dsRNA ou H₂O nos tempos 0 e
645 4 horas após a injeção. Cada tratamento contou com três réplicas biológicas, contendo duas réplicas
646 técnicas. Cada reação de RT-qPCR foi realizada com um volume final de 10 µL, dos quais 5,0 µL
647 de GoTaq[®] (Promega, EUA), 2,6 µL de água livre de nucleases, 0,2 µL (0,2 µM) de primers direto
648 e reverso e 2,0 µl de cDNA (diluído 1:20). O RT-qPCR foi realizado usando o termociclador
649 QuantStudio 5 (Thermo Fisher, EUA) com as seguintes condições sequenciais: incubação a 95 °C
650 por 20 s, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 3 s e 60 °C por 30 s. Após 40 ciclos, uma curva de
651 “melting” para cada amplificação foi criada para verificar a possível formação de dímeros de
652 primers ou contaminação da amostra. A análise pelo geNorm foi feita utilizando o software qBase+
653 (Biogazelle, Bélgica).

654 **Análise da Expressão dos Genes das Vias do Sistema Imune e Nuclease em *D. saccharalis*.** Para
655 determinar a expressão relativa dos genes das vias JAK-STAT e RNAi foram utilizados dois
656 tratamentos, um com injeção de 0,2 µg de dsRNA e outro com injeção de 1 µg de dsRNA não
657 específico (dsAgraCE8.1 ou dsGFP), além do tratamento testemunha, que foi injetado com água
658 bidestilada. Foi testada a expressão dos genes *DsacHop* e *DsacSTAT* pertencentes a via Jak/STAT,
659 *DsacDicer2* e *DsacAgo2*, pertencentes a via do RNAi/siRNA. Além, disso o gene *DsacREase*
660 também foi avaliado. Em seguida, um segundo experimento foi realizado, utilizando um dsRNA
661 específico para *DsacREase*, dsREase, para verificar a expressão dos genes supracitados com um
662 dsRNA específico para um gene de *D. saccharalis*. A eficiência de cada primer (Tabela 3) foi
663 determinada utilizando Real Time PCR miner (<http://ewindup.info/miner/>). As reações de RT-
664 qPCR foram realizadas conforme descritas anteriormente.

Análise estatística. A análise da expressão gênica foi feita utilizando o software online de análise de expressão gênica SATqPCR (<http://satqpcr.sophia.inra.fr/cgi/tool.cgi>), que utiliza análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para avaliar estatisticamente os dados de expressão gênica.

Resultados e Discussão

Identificação dos Genes das Vias JAK-STAT e RNAi Induzido Por siRNA. Na análise *in silico* foram encontrados no transcrito de *Diatraea saccharalis* *contigs* com identidade a todos os genes componentes da via JAK-STAT e RNAi induzido por siRNA com identidade as sequências de *Bombyx mori*. Na via JAK-STAT foram identificados *contigs* para os genes *Domeless*, *Hopscotch* (*JAK*), *STAT*, *PTP61F*, *SOC536E*, *dPIAS*, e “*Ken e Barbie*”, totalizando 11 *contigs* diferentes (Tabela 3). JAK-STAT é uma via que se manteve conservada durante a evolução dos organismos, isso faz que compartilhe semelhanças entre as espécies, como *Homo sapiens* e a mosca *Drosophila melanogaster* (Shuai & Liu 2003, Agaisse & Perrimon 2004, Arbouzova & Zeidler 2006). Em *D. melanogaster* foram verificadas a presença de diferentes moléculas de citocinas que se ligam ao receptor *Domeless*, formando homodímeros ou heterodímeros que conduz a associação e ativação da proteína *JAK* (*Hopscotch*) (Agaisse & Perrimon 2004). As proteínas *JAK* ativadas se transfosforilam e fosforilam a região citoplasmática do receptor liberando resíduos específicos de tirosina, criando locais de ancoragem para os domínios homólogos das proteínas *STAT* (Murray 2007, Myllymäki & Rämetsä 2014). As proteínas *STAT* estando ligada ao receptor é fosforilada e ativada pela proteína *JAK*, criando um único resíduo de tirosina (Xu & Qu 2008, Myllymäki & Rämetsä 2014). O complexo *STAT* dimerizado se desprende do receptor passando a ser translocado para o núcleo, onde se liga ao DNA e regula a expressão gênica de moléculas antimicrobianas (Xu & Qu 2008, Myllymäki & Rämetsä 2014).

A via JAK-STAT está envolvida em vários processos celulares como, processo de desenvolvimento, regulação homeostática e resposta imune. Qualquer alteração nos elementos de sinalização pode comprometer toda a via. Assim, numerosos reguladores da via já foram identificados. As proteínas *SOCS36E*, *PTP61F*, *dPIAS* e “*Ken e Barbie*”, foram localizadas na regulação negativa quando fortemente induzidos pela ativação da via JAK-STAT, tanto em mamíferos como em insetos (Myllymäki & Rämet 2014).

Para a via do RNAi induzida por siRNA foram identificados em *D. saccharalis*, 4 contigs diferentes com identidade aos genes, *Dicer2*, *Argonauta-2*, *R2D2* e *C3PO* (Tabela 3). Estudos em lagartas de *B. mori* identificaram genes relacionados ao RNAi durante a infecção pelo vírus de poliedrose, bem como os genes *Argonaute -2* e *Dicer-2* (Kolliopoulou *et al.* 2015). Em outro estudo, Liu *et al.* 2013 após a injeção de dsRNA em *B. mori*, verificou a regulação positiva dos genes *Argonaute -2* e *Dicer- 2*, sendo esses genes chaves do mecanismo do RNA interferente. Em *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) foram identificados homólogos de *Argonaute 2* e *Dicer 2* e outros membros de vias putativas, porém o gene *R2D2* não foi encontrado em *M. sexta* (Gunaratina & Jiang 2013, Cao *et al.* 2015). Resultados similares de genes envolvidos no mecanismo do RNAi foram encontrados em *Tribolium castaneum* (Herbst 1797) e *Anthonomus grandis* (Boh 1843), do mesmo modo em *D. melanogaster*, sugerindo que esse mecanismo do RNAi é bem conservado nos insetos (Zambon *et al.* 2006, Tomoyasu *et al.* 2008, Firmino *et al.* 2013).

Caracterização dos Domínios Proteicos e Análise Filogenética. Para a caracterização da via JAK-STAT foram selecionados os genes *Hopscotch* e *STAT*. As sequências homólogas em *D. saccharalis* foram renomeados para *DsacHop* (JAK) e *DsacSTAT*. O gene *DsacHop* apresentou uma ORF (open reading frame) de 3363 bp, com proteína predita de 1121 aminoácidos. Após análise dos domínios proteicos pelo algoritmo HMMER verificou-se a presença de um domínio de

711 ligação ao DNA, homólogo a tirosina quinase com uma cópia em sequência (Figura 1A). Em
712 mamíferos, a família das proteínas tirosina-quinase Janus (JAK) são formadas por 4 membros:
713 JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2. Essas proteínas possuem cerca de 1150 aminoácidos, e tem como
714 principal característica a presença de domínios de quinase e pseudo-quinase (Rawlings *et al.* 2004,
715 Imada & Leonard 2000, Freitas 2010). Em contraste com os mamíferos, *Drosophila* apresenta uma
716 via JAK/STAT relativamente simples e bem conservada a nível estrutural e funcional, contendo
717 apenas um gene JAK denominado de *Hopscotch* e um STAT (*stat92E*). A proteína *Hopscotch*
718 possui todas as características da tirosina quinase que contem na família JAK em mamíferos, sendo
719 com níveis de homologia mais elevado ao JAK2 (Zeidler *et al.* 2000). No lepidóptero *B. mori* os
720 domínios funcionais de JAK são estruturalmente semelhantes aos encontrados em *Drosophila*
721 (Gunaratna & Jiang 2013).

722 Para *DsacSTAT* obteve-se uma ORF 2280 bp, que codifica uma proteína predita de 760
723 aminoácidos. A análise de HMMER identificou o domínio STAT_alpha (*all-alpha domain*),
724 STAT_bind (*DNA binding domain*), STAT_int (*protein interaction domain*) e o domínio SH2 (*Src*
725 *homology 2*) (Figura 1C). A família STATs são proteínas com 750-850 aminoácidos que tem como
726 marca o domínio funcional SH2, este domínio é responsável pelo importante papel entre a
727 associação das STATs e os seus receptores (Imada & Leonard 2000). Algumas diferenças
728 encontradas nos domínios SH2 determinam seletividade aos receptores de citocinas (Imada &
729 Leonard 2000). O domínio funcional SH2 interage com um resíduo de tirosina fosforilada por JA
730 que aproxima as STAT dos receptores da membrana, o que permite a dimerização de STAT pela
731 interação dos domínios SH2 (Rawlings *et al.* 2004). O gene *Stat92* de *Drosophila*, semelhante aos
732 genes STATs de mamíferos codifica proteína com um domínio SH2, um domínio de ligação ao

DNA e com um único resíduo de tirosina (Zeidler *et al.* 2000). Em *B. mori*, o gene STAT também foi identificado, exercendo uma importante resposta na defesa antiviral (Zhang *et al.* 2016).

As sequências das proteínas preditas de *DsacHop* e *DsacSTAT* foram usadas na elaboração de árvores filogenéticas utilizando o modelo de máxima verossimilhança (ML) com escolha automática do modelo evolutivo. As sequências de *D. saccharalis* agruparam-se devidamente ao grupo de sequências de Lepidoptera (Figura 1B e D), e estando mais proximamente relacionadas ao grupo dos dípteros. Também foi possível observar que as sequências de *D. saccharalis* não se agrupam com outras famílias de Lepidoptera, uma vez que nestas árvores as espécies se agruparam conforme as famílias, sendo as proteínas *DsacHop* e *DsacSTAT* mais basais que as proteínas das famílias (Bombycidae: *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* (Moore 1872), *Manduca sexta*; Noctuidae: *Helicoverpa armigera* (Hubner 1809), *Spodoptera litura* (Fabricius 1775) e *Trichoplusia ni* (Hubner 1803); e Papilionoidae: *Papilio xuthus* (Linnaeus 1767), *Papilio polytes* (Linnaeus 1758), *Danaus plexippus* (Linnaeus 1758) e *Vanessa tameamea* (Eschscholtz 1821).

Para a melhor caracterização da via do RNAi induzido por siRNA em *D. saccharalis*, foram selecionados os genes *Dicer2* e *Argonaute2*, as sequências homólogas em *D. saccharalis* foram denominados de *DsacDicer2* e *DsacAgo2*. *DsacDicer2* apresentou uma ORF com 5082 pb, com uma proteína predita de 1694 aminoácidos. Também apresentou domínios homólogos a ResIII (Enzima de restrição tipo III), um domínio Helicase, um domínio Dicer_dimer (domínio de dimerização), um domínio PAZ e dois domínios de Ribonuclease III (Figura 2 A). A maioria dos ortólogos da família Dicer apresentam um domínio Helicase, um domínio PAZ, dois domínios RNase III e um domínio de ligação ao dsRNA (Lee *et al.* 2004). Em *Drosophila* foram identificados dois genes da família Dicer, *Dicer-1* e *Dicer-2*, que diferem entre si. Em *Dicer-1* está ausente um domínio helicase funcional e para *Dicer-2* está ausente um domínio PAZ, mas ambas apresentam os dois domínios

756 RNase III (Lee *et al.* 2004). Segundo Ponnuvel *et al.* 2007, sequências do gene Dicer foram
757 identificadas no genoma de *Bombyx mori*, sendo observado homologia máxima com *Drosophila*.

758 *DsacAgo2* apresentou uma ORF de 3261 pb, com uma proteína prevista de 1087
759 aminoácidos. Esta proteína predita possui regiões com identidade ao domínio ArgoN (domínio N-
760 terminal de argonauta), ArgoL1 (domínio de ligação a argonauta1), domínio PAZ, ArgoL2
761 (domínio de ligação a argonauta 2) e domínio Piwi (Figura 2 C). As proteínas *Argonaute 2* são
762 altamente conservadas em plantas e animais, contêm dois domínios característicos, o domínio PAZ
763 e o domínio PIWI (Song *et al.* 2003, Wang *et al.* 2013). Com base em homologia de sequências de
764 *Drosophila* foram identificados quatro genes da família de Argonautas em *B. mori*, *BmAgo1*,
765 *BmAgo2*, *BmAgo3* e *BmPiwi* (Wang *et al.* 2013). Segundo Tanbaz *et al.* (2004), Dicer e Argonauta
766 são as principais proteínas responsáveis por desencadear o processador de RNAi. A ribonuclease Dicer
767 2, é a responsável por degradar o dsRNA em pequenos fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos
768 (siRNAs) (Agrawal *et al.* 2003, Van Rij *et al.* 2006, França *et al.* 2010). Esses fragmentos de
769 nucleotídeos são conduzidos a um complexo de silenciamento RISC (do inglês RNA-induced
770 silencing complex) onde a endonuclease Argonauta (Ago-2) está presente. Neste complexo, a
771 argonauta realiza a clivagem de todos os RNAm complementares a fita simples de dsRNA,
772 reduzindo a expressão do gene alvo (Hannon 2002, Meister & Tuschl 2004, Van Rij *et al.* 2006,
773 Terenius *et al.* 2011, Kim *et al.* 2012). Desta forma, os domínios proteicos encontrados para ambas
774 as proteínas preditas em *D. saccharalis* são correspondentes ao previsto na literatura.

775 *DsacDicer2* e *DsacAgo2* foram utilizadas para construção de árvores filogenéticas. As
776 sequências foram comparadas e agrupadas a possíveis homólogos de outras ordens de insetos, uma
777 vez que as proteínas Argonauta 2 e Dicer 2 encontram-se presentes em diversas ordens de insetos
778 (Figura 2B e 2D). As sequências de *DsacDicer2* e *DsacAgo2* se agruparam dentro do grupo de

Lepidoptera. Interessante notar que para Dicer2, o grupo de Lepidoptera está mais próximo do grupo de Coleoptera. Entretanto, para Ago2, Lepidoptera está estreitamente relacionada com Diptera. Assim, DsacDicer2 e DsacAgo2 formam diferentes grupos de monofília.

Seleção dos Genes Mais Estáveis Para Análise de Expressão Gênica Por qPCR em *D. saccharalis*. Para se avaliar uma expressão gênica com precisão é necessário utilizar genes referência estáveis. Os genes referência são diferentes dos genes alvo e se apresentam como uma forma de controle interno da reação, são importantes para a normalização dos dados da RT-qPCR, pois permitem controlar as diversas variações que possam mascarar os resultados tais como: concentração inicial do material, qualidade e quantidade do RNA, variações intrínsecas ao equipamento e na qualidade de síntese do cDNA, possibilitando identificar as variações estritamente relacionadas aos tratamentos estabelecidos (Bustin *et al.* 2009). Para que um gene candidato seja considerado um gene referência é necessário que atenda vários parâmetros (Chervoneva *et al.* 2010). Entre esses parâmetros destacam-se o nível de expressão de maior estabilidade, ou seja, que não variem a sua expressão nas condições experimentais, e que apresentem expressão constante entre os tecidos e estados fisiológicos (Kozera & Rapacz 2013). Dessa forma, foram escolhidos cinco genes candidatos, a saber *β -Actina*, *β -Tubulina*, *GAPDH*, *RPS10* e *eEF2*. Os genes escolhidos são constitutivos, expressos em todos os tecidos e estádios de desenvolvimento independente da condição que estejam, exercem funções básicas na célula.

Os resultados para a especificidade de cada par de *primers* utilizado foi confirmada pela curva de dissociação (melting), onde todos apresentaram um único pico (Figura 3 A). A presença de um único pico na curva de dissociação, indica que não ocorreram amplificações de fragmentos inespecíficos e formação de estruturas secundárias (Borowski *et al.* 2014), dando confiabilidade aos valores de Cq/Ct gerados.

802 Para análises dos níveis de expressão de cada candidato a gene referência, obteve-se dados
803 dos ciclos de amplificação (Cq) que variaram de 14 até 35 (Figura 3B). O gene eEF2 foi o que
804 mostrou maior variação de valores de Cq, possuindo também os valores mais altos, enquanto o gene
805 RPS10 obteve os menores valores (Figura 3B). Quanto menor o valor de Cq maior é a abundância
806 de moléculas de cDNA específica para um dado gene. Assim, a amplitude elevada é um indicativo
807 que o gene não possui expressão estável entre os diferentes tratamentos (Borowski *et al.* 2014). Para
808 a estabilidade dos genes candidatos a partir dos resultados do algoritmo geNorm, os 5 pares de
809 primer obtiveram eficiências semelhantes (Tabela 2). A análise da estabilidade pelo geNorm permite
810 calcular quais genes menos variam a expressão nas condições experimentais. Este valor pelo geNorm
811 é dado pela média de estabilidade M, valor resultado do cálculo da variação pareada de um único
812 gene com todos os demais genes candidatos. (Vandesompele *et al.* 2002, Kozera & Rapacz 2013).
813 Os genes B-TUB, GAPDH, B-ACT e RPS10 apresentaram valores, em ordem crescente de
814 estabilidade, abaixo de 0,5, indicando estabilidades aceitáveis (Figura 3C). Assim, o gene eEF2 teve
815 o maior valor M (maior que 0,5), e foi considerado um gene não estável. Finalmente, determinou-se
816 os valores de geNorm V, que determina o número mínimo de genes referência requeridos para uma
817 normalização mais precisa testando dois a dois, por exemplo 2 ou 3 (V2/3) genes, 3 ou 4 genes
818 (V3/4), etc. Sendo recomendado valores abaixo de 0,15. Nos dados avaliados os valores para V2/3
819 e V3/4, ficaram abaixo de 0,15 (Figura 4D), o que determinou a escolha apenas de dois genes
820 referência. Segundo Nicot *et al.* 2005 é recomendado o uso de pelo menos dois genes referência para
821 diminuir as possibilidades de erros exagerados a partir de anomalias de expressão do gene
822 referência em uma dada condição. Assim, pelos parâmetros avaliados, decidiu-se escolher dois genes
823 para serem normalizadores da expressão gênica nos experimentos a seguir, B-TUB e GAPDH.

É imprescindível a validação dos genes referência antes de utilizá-los como controle interno em experimentos de RT-qPCR, para evitar erros, como mascarando possíveis resultados. Segundo Teng *et al.* 2012 não existe um único gene referência que seja universal, usado a todas situações. Essa conclusão partiu do seu estudo ao avaliar seis genes (actina A3, actina A1, GAPDH, G3PDH, E2F, RP49) em quatro lepidópteros *B. mori*, *Plutella xylostella* (Linnaeus 1758), *Chilo suppressalis* (Walker 1863) e *Spodoptera exíqua* (Hubner 1808) provando a partir de seus resultados que as estabilidades de expressão dos 6 genes utilizados eram diferentes entre espécies evolutivamente próximas. Os genes RP49 e GAPDH foram os mais estáveis em *B. mori* e *S. exíqua* avaliados em diferentes estágios de desenvolvimento e em diferentes tecidos, pelos algoritmos como geNorm, Normfinder e DDcT (Teng *et al.* 2012). Apesar de existir diversos trabalhos de escolhas de genes referência em insetos, é importante sempre avaliar novamente, caso as condições de experimento mudem, pois não existe gene referência universal.

Avaliação da Expressão de Transcritos de Genes das Vias Jak-STAT e RNAi/siRNA em Resposta a dsRNA Não-Específico em *Diatraea saccharalis*. Para determinar a participação das vias Jak-STAT e/ou RNAi/siRNA em lagartas de *D. saccharalis*, foi analisada a expressão de alguns genes destas vias por RT-qPCR. Após determinação dos melhores genes referência para as condições de bioensaio utilizadas, prosseguiu-se com a análise da expressão dos genes escolhidos. Na via Jak-STAT, não houve diferença entre os tratamentos controle e com dsRNA para o gene *DsacHop* (Figura 4 A e C), tanto utilizando a dose de 0,2 µg de dsRNA ($F_{1,4} = 0,341$; $P = 0,591$), como utilizando 1 µg de dsRNA ($F_{1,4} = 1,715$; $P = 0,26$). Para o gene *DsacSTAT*, que atua a jusante ao gene *DsacHop*, também não houve diferença significativa (Figura 4 A e C) para ambas doses (0,2 µg - $F_{1,4} = 0,194$, $P = 0,682$; 1 µg - $F_{1,4} = 1,863$; $P = 0,244$). Todavia, de forma mais surpreendente, nos genes escolhidos para via do RNAi/siRNA, também não houve diferença utilizando ambas as

847 doses (Figura 4 B e D) tanto para *DsacDicer2* (0,2 µg - $F_{1,4} = 3,691$; $P = 0,127$; 1 µg - $F_{1,4} = 0,725$;
848 $P = 0,442$), como para *DsacAgo2* (0,2 µg - $F_{1,4} = 3,691$; $P = 0,127$; 1 µg - $F_{1,4} = 0,725$; $P = 0,442$).

849 A variação na eficiência do silenciamento gênico por dsRNAs em diferentes espécies de
850 Lepidoptera foi revisado em Terenius *et al.* (2011), que constatou uma grande variabilidade no
851 sucesso da técnica de RNAi em diversos estudos. Ainda nessa revisão, são reportados diversos
852 fatores que podem interferir no resultado desejado do RNAi. Essas variações podem ocorrer pelas
853 diferenças do tipo de organismo, o tamanho do organismo, o tecido de injeção e a concentração
854 administrada. Entre esses fatores, a concentração administrada pode ser uma das causas do insucesso
855 da técnica. Segundo Terenius *et al.* (2011) concentrações mais baixas de dsRNA (<10-100ng por mg
856 de tecido) injetadas em *Hyalophora cecropa* (Linnaeu 1758), *Antheroea pernyx* (Guérin-Méneville,
857 1855) e *M. sexta* tiveram altos níveis de silenciamento. Porém, para *B. mori* são recomendadas
858 concentrações maiores que 1µg/mg. Um estudo comparativo entre *Blattella germanica* (Linnaeus
859 1767) e *M. sexta* mostrou uma maior persistência des dsRNA no plasma da hemolinfa de *B.*
860 *germanica*, em relação a *M. sexta*. (Garbutt *et al.* 2013).

861 Entretanto, esperava-se que a presença de dsRNA ativasse as vias que respondem a vírus
862 como JAK-STAT e principalmente RNAi, o que não aconteceu no caso de *D. saccharalis*. A falta
863 de resposta das vias estudadas pode estar relacionada com a evolução do mecanismo de defesa de
864 Lepidoptera a vírs, visto que as moléculas de dsRNA tem estrutura similar a um vírus de fita dupla.
865 Um dos fatores que poderiam estar atuando na prevenção da atuação das vias estudadas seriam a
866 presença de ribonucleases na hemolinfa, tanto extra como intra-celularmente, que digeririam as
867 moléculas de dsRNAs, dificultando a absorção pelas células e a ativação das vias de resposta.
868 (Arimatsu *et al.* 2007, Terenius *et al.* 2011, Garbutt *et al.* 2013, Guan *et al.* 2018).

Segundo estudo recente, essa característica dos lepidópteros é atribuída a presença de um gene específico, denominado *up56* identificado em *Ostrinia furnacalis* (Guenée 1854). Esse gene é expresso na presença de dsRNA na hemolinfa, que produz uma nuclease que digere as moléculas de dsRNA (Guan *et al.* 2018). Dessa forma, as moléculas de dsRNA não conseguem ativar as vias de sinalização do sistema imune, pois sofrem degradação antes que possam ser percebidas. Esta nuclease, por ser um elemento de refratariedade do RNAi em lepidópteros, foi denominada REase, e sequências homólogas já foram encontradas em sete espécies de lepidópteros (Guan *et al.* 2018). Assim, sugere-se que ausência de resposta das vias estudadas JAK-STAT e RNAi em *D. saccharalis* poderia ser causada pela presença de uma proteína homóloga a REase na hemolinfa deste inseto.

Identificação e Caracterização de *DsacREase*. Inicialmente, identificou-se um *contig* com alta identidade para REase, sendo denominado *DsacREase*. Utilizou-se como “isca” a sequência da proteína predita *DsacREase* para recuperar sequências homólogas nas sete ordens de insetos (Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Diptera, Blattodea, Orthoptera e Hemiptera) mais representadas no GenBank (NCBI). As buscas por similaridade no banco de dados indicaram que o *DsacREase* é uma proteína altamente semelhante a proteína asteroid, que é conservada entre todos os insetos. Porém, de acordo a análise filogenética as proteínas similares a REase formam um clado separado do grupo de proteínas asteroid (Figura 5), indicando uma divergência que pode ter sido originada a partir de uma duplicação gênica com aquisição de nova função por uma das cópias. Esta possibilidade já tinha sido levantada por Guan *et al.* (2018).

Indução de *DsacREase* por dsRNA Não Específico. Ao avaliar a expressão de *DsacREase* na presença de dsRNA não-específico, verificou-se para a dose de 0,2 µg não se obteve diferença significativa (Figura 6 A; $F_{1,4} = 1,239$, $P = 0,328$). Entretanto, a resposta foi positiva quando se utilizou a dose de 1 µg (Figura 6 B; $F_{1,4} = 239,6$, $P = 0,0001$), sendo em média 8 vezes mais expressa

que no tratamento controle, após 4 h de exposição. Estudos em *O. furnacalis* e *H. armigera* também demonstraram que a REase é regulada positivamente na presença de dsEGFP (Guan *et al.* 2018).

Avaliação de Expressão da *DsacREase* na Presença de dsRNA Específico. Resultados da avaliação de expressão da *DsacREase* não mostrou diferença significativa quando os insetos foram tratados com dsGFP ou dsRNA específico *DsacREase* (dsREase. No entanto, ambos os tratamentos foram 20 vezes mais induzidos em relação ao controle ($F_{2,6} = 13,01$; $P = 0,006$), (Figura 7 A).

Os níveis de expressão dos genes *DsacHop* e *DsacSTAT* pertencentes a via Jak/STAT também foram avaliados 4h após a microinjeção de dsREase ou dsGFP. Porém, os mesmos permaneceram com o nível de expressão inalterado (Figura 7 B; *DsacHop* - $F_{2,6} = 0,548$, $P = 0,605$; *DsacSTAT* - $F_{2,6} = 0,548$, $P = 0,605$). Na via RNAi também não foi verificada alteração da expressão dos genes *DsacDicer 2* ($F_{2,6} = 0,449$; $P = 0,658$) e *DsaAgo 2* ($F_{2,6} = 0,486$; $P = 0,637$), mesmo com microinjeção de dsREase para o silenciamento da *DsacREase* (Figura 7 C). A partir dos dados obtidos infere-se que não houve resposta das Via JAK-STAT e RNAi a molécula de dsRNA em *D. saccharalis*, nas condições de bioensaio deste trabalho.

O silenciamento parcial do gene *Up56* que codifica a REase em *O. furnacalis* resultou em uma melhora na eficiência do silenciamento de outros genes, atribuindo a essa nuclease uma possível razão da ineficiência do RNAi em lepidópteros (Guan *et al.* 2018). Ainda, estes mesmos autores compararam a regulação positiva do gene *REase* e *Ago 2* e *Dicer 2* e verificou-se que a expressão da *REase* foi anterior e superior a *Ago 2* e *Dicer 2*, concluindo que a ribonuclease afeta o processo de RNAi, possivelmente pela competição do dsRNA alvo com a *Dicer 2*.

Com base nesses resultados, pode-se afirmar que o fato de não se ter uma atenuação na expressão de *DsacREase* pode ter sido devido a dose de dsRNA aplicada, que foi de 1 µg. Em

trabalhos semelhantes Guan *et al.* (2018) utilizaram doses que variavam de 5 a 10 µg. Consequentemente, a ausência de resposta das vias de JAK-STAT e RNAi/siRNA, também pode estar relacionada a concentração de dsRNA utilizada. Existe uma grande variação da concentração ideal a ser utilizada entre diferentes espécies para o silenciamento gênico. Segundo Terenius *et al.* (2011) são necessários estudos que estabeleçam a melhor relação de dose e resposta na concentração dos dsRNAs Para se obter resultados conclusivos.

Baseados nos dados apresentados aqui e da literatura, podemos afirmar que as nucleases, e especificamente aquelas homólogas a REase, são responsáveis, pelo menos em parte, pela variabilidade de efeitos e efetividade do RNAi, principalmente em lepidópteros. Estas proteínas atuam provavelmente competindo pelo dsRNA com a maquinaria do RNAi/siRNA, impedindo que o silenciamento ocorra. Trabalhos futuros serão necessários para entender melhor estes mecanismos e tentar superar os problemas da técnica de RNAi para espécies mais refratárias.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

Literatura Citada

- Agaisse, H. & N. Perrimon. 2004.** The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 198: 72–82.
- Arbouzova, NI e Zeidler, MP (2006).** Sinalização JAK / STAT em *Drosophila*: insights sobre funções regulatórias e celulares conservadas. *Development*, 133: 2605-2616.

- 936 **Agrawal, N., P.V.N. Dasaradhi, A. Mohmmmed, P. Malhotra, R.K. Bhatnagar & S.K.**
 937 **Mvkherjee. 2003.** RNA Interferencie: Biology, mecanism, and applications. Microbiol. Mol.
 938 Biol. Rev 67: 657-685.
- 939 **Arbouzova, N.I. & M.P. Zeidler. 2006.** JAK/STAT signalling in *Drosophila*: Insights into
 940 conserved regulatory and cellular functions. Development 133: 2605–2616.
- 941 **Araújo, J. R., Botelho, P. S. M., Araújo, S. M. S. S., Almeida, L. C., & Degaspari, N. 1985.**
 942 Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). *Saccharum APC*. 36: 45-48.
- 943 **Arimatsu Y., E. Kotani, Y. Sugimura & T. Furusawa. 2007.** Molecular characterization of a
 944 cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect
 945 Biochem. Mol. Biol. 37: 176-183
- 946 **Borowski, J.M., V. Galli, R. S. Messias, E.C. Perin, J.H. Buss, S.D. dos Anjos e Silva & C.V.**
 947 **Rombaldi. 2014.** Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce
 948 under abiotic stresses. Planta, 239: 2187-2200.
- 949 **Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hallemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T.**
 950 **Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele & C.T. Wittwer. 2009.** The MIQE
 951 guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.
 952 Clin. Chem. 55: 611-622.
- 953 **Cao, X., He, Y., Hu, Y., Wang, Y., Chen, Y. R., Bryant, B., ... & Jiang, H. 2015.** The immune
 954 signaling pathways of *Manduca sexta*. Insect Biochem Molec. 62: 64-74.
- 955 **Chervoneva, I., Li, Y., Schulz, S., Croker, S., Wilson, C., Waldman, S. A., & Hyslop, T. 2010.**
 956 Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. BMC
 957 bioinformatics. 11: 253.
- 958 **Fire, A., S. XV, M.K. Montgomery, S.A. Kastas, S.E. Driver & C.C. Mello. 1998.** Potent and
 959 specifie genetic interference by double-stranded RNA in *Caenarhabditis elegans*. Nature. 391:
 960 806-811.
- 961 **Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho & G.C.d. Baptista. 2002.** Entomologia
 962 agrícola, 2, FEALQ, Piracicaba. 920p.
- 963 **Gammon, D. B., & Mello, C. C. 2015.** RNA interference-mediated antiviral defense in insects.
 964 Curr. Opin. Insect Sci. 8: 111-120.
- 965 **Garbutt, J.S., X. Bellés, E.H. Richards & S.E. Reynolds. 2013.** Persistence of double-stranded
 966 RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: Evidence
 967 from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. J. Insect Physiol. 59: 171–178.
- 968 **Govind, S. 2008.** Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. Insect Sci 15: 29-43.
- 969 **Guan, R.B., H.C. Li, Y.J. Fan, S.R. Hu, O. Christiaens, G. Smagghe & X.X. Miao. 2018.** A
 970 nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. J. Biol. Chem. 293: 6011–6021.
- 971 **Guindon, S., J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk & O. Gascuel. 2010.** New
 972 algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the

973 performance of PhyML 3.0. Syst Biol. 59: 307-321.

974 **Gunaratna, R. T., & Jiang, H. 2013.** A comprehensive analysis of the *Manduca sexta*
975 immunotranscriptome. Dev Comp Immunol 39: 388-398.

976 **Hannon, GJ. 2002.** Interferência de RNA. Nature. 418: 244-251.

977 **Hensley, S. D., & Hammond Jr, A. M. 1968.** Laboratory techniques for rearing the sugarcane
978 borer on an artificial diet. J. Econ. Entomol. 61: 1742-1743.

979 **Hoffmann, J.A. 2003.** The immune response of *Drosophila*. Nature 426: 33-38.

980 **Hoffmann, J.A., & J.M. Reichhart. 2002.** *Drosophila* innate immunity: an evolutionary
981 perspective. Nat. Immunol. 3: 121-126.

982 **Hultmark, D. 2013.** *Drosophila* immunity: paths and patterns. Curr Opin immunol 15: 12-19.

983 **Imada, K. & W.J. Leonard. 2000.** The Jak-STAT pathway. Mol. Immunol. 37: 1–11.

984 **Imler, J-L & J.A. Hoffmann. 2000.** Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of
985 *Drosophila*. Curr opin Microbiol 3: 16-22.

986 **Kozera, B., & Rapacz, M. 2013.** Reference genes in real-time PCR. J. Appl. Genet. 54: 391-406.

987 **Kim, J. Y., J.Y. Shin, M.R.Kim, M, S.K.Hann & S.H.Oh. 2012.** siRNA-mediated knock-down
988 of COX-2 in melanocytes suppresses melanogenesis..Exp. Dermatol, 21: 420-425.

989 **Kingsolver, M. B., Huang, Z., & Hardy, R. W. 2013.** Insect antiviral innate immunity: pathways,
990 effectors, and connections. J. Mol. Biol. 425: 4921-4936.

991 **Kolliopoulou, A., Van Nieuwerburgh, F., Stravopodis, D. J., Deforce, D., Swevers, L., &
992 Smaghe, G. 2015.** Transcriptome analysis of *Bombyx mori* larval midgut during persistent
993 and pathogenic cytoplasmic polyhedrosis virus infection. PloS one, 10: e0121447.

994 **Lee, Y.S., K. Nakahara, J.W. Pham, K. Kim, Z. He, E.J. Sontheimer & R.W. Carthew. 2004.**
995 Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways.
996 Cell. 117: 69–81.

997 **Lefort, V., J.E. Longueville & O. Gascuel. 2017.** SMS: Smart Model Selection in PhyML. Mol.
998 Biol. Evol. 34: 2422-2424

999 **Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J-M. Reichhart & J.A. Hoffmann. 1996.** The dorso ventral
1000 regulatory gene cassette spatzle/Toll/ cactus controls the potent antifungal response in
1001 *Drosophila* adults. Cell 86: 973-983p.

1002 **Liu, J., G. Smaghe & L. Swevers. 2013.** Transcriptional response of Bm Toll 9-1 and RNAi
1003 machinery genes to exogenous dsRNA in the midgut of *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 59:
1004 646-654.

1005 **Macedo, N & D. Macedo. 2004.** As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles.
1006 Visão agrícola. 1: 38-46.

1007 **Murray, P. J. 2007.** The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.*
1008 *Res.* 178. 2623-2629.

1009 **Myllymäki, H., & Rämet, M. 2014.** JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity.
1010 *Scand. J. Immunol.* 79, 377-385.

1011 **Negreiro, M. C. C., F. G. Andrade & A. M. F. Falleiros. 2004.** Sistema imunológico de defesa
1012 em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera:
1013 Noctuide), resistente ao AgMNPV. *Ciênc Agrár* 25: 293-308p.

1014 **Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., & Evers, D. 2005.** Housekeeping gene selection for
1015 real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 56:
1016 2907-2914.

1017 **Ponnuvel, K. M., Sundari, B. M., Kumar, R. S., Sinha, R. K., & Kamble, C. K. 2007.**
1018 Identification of a putative RNase III (dicer homolog) gene in silkworm *Bombyx mori*. *Invert*
1019 *Surviv J.* 4: 18-23.

1020 **Rawlings, J. S., Rosler, K. M., & Harrison, D. A. 2004.** The JAK/STAT signaling pathway. *J*
1021 *Cell Sci.* 117: 1281-1283.

1022 **Silva, C.C.A. 2002.** Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotecnol Ciên desenv* 24: 68-
1023 72p.

1024 **Song, J. J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., & Joshua-
1025 Tor, L. 2003.** The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding
1026 motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10: 1026-1032.

1027 **Shuai, K., & Liu, B. (2003).** Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nat. Rev.*
1028 *Immunol.* 3: 900-911.

1029 **Teng, X., Z. Zhang, G. He, L. Yang & F. Li. 2012.** Validation of reference genes for quantitative
1030 expression analysis by real-time rt-PCR in four lepidopteran insects. *J. Insect Sci.* 12: 60.

1031 **Terenius, O., A. Papanicolaou, J.S. Garbutt, I. Eleftherianos, H. Huvenne, S. Kanginakudru,
1032 M. Albrechtsen, C. An, J.L. Aymeric, A. Barthel, P. Bebas, K. Bitra, A. Bravo, F.
1033 Chevalier, D.P. Collinge, C.M. Crava, R.A. de Maagd, B. Duvic, M. Erlandson, I. Faye,
1034 G. Felföldi, H. Fujiwara, R. Futahashi, A.S. Gandhe, H.S. Gatehouse, L.N. Gatehouse,
1035 J.M. Giebultowicz, I. Gómez, C.J.P. Grimmelikhuijzen, A.T. Groot, F. Hauser, D.G.
1036 Heckel, D.D. Hegedus, S. Hrycaj, L. Huang, J.J. Hull, K. Iatrou, M. Iga, M.R. Kanost, J.
1037 Kotwica, C. Li, J. Li, J. Liu, M. Lundmark, S. Matsumoto, M. Meyering-Vos, P.J.
1038 Millichap, A. Monteiro, N. Mrinal, T. Niimi, D. Nowara, A. Ohnishi, V. Oostra, K. Ozaki,
1039 M. Papakonstantinou, A. Popadic, M. V. Rajam, S. Saenko, R.M. Simpson, M. Soberón,
1040 M.R. Strand, S. Tomita, U. Toprak, P. Wang, C.W. Wee, S. Whyard, W. Zhang, J.
1041 Nagaraju, R.H. French-Constant, S. Herrero, K. Gordon, L. Swevers & G. Smagghe.
1042 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies
1043 and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.* 57: 231–245.**

1044 **Tomoyasu, Y., Miller, S. C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D., & Bucher, G. 2008.**
1045 Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in

1046 Tribolium. Genome Biol. 9, R10.

1047 **Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe & F. Speleman.**
 1048 **2002.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging
 1049 of multiple internal control genes. Genome Biol. 3: research0034.1

1050 **Van Rij, R.P., M.C. Saleh, B. Berry, C. Foo, A. Houk, C. Antoniewski & R. Andino. 2006.** The
 1051 RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila*
 1052 *melanogaster*. Genes Dev. 20: 2985–2995.

1053 **Xu, D., & Qu, C. K. 2008.** Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. Front Biosci-
 1054 Landmrk. 13: 4925.

1055 **Wang, G.H., L. Jiang, L. Zhu, T.C. Cheng, W.H. Niu, Y.F. Yan & Q.Y. Xia. 2013.**
 1056 Characterization of Argonaute family members in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Sci. 20:
 1057 78–91.

1058 **Firmino, A. A. P., de Assis Fonseca, F. C., de Macedo, L. L. P., Coelho, R. R., de Souza Jr, J.**
 1059 **D. A., Togawa, R. C. & Grossi-de-Sa, M. F. 2013.** Transcriptome analysis in cotton boll
 1060 weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. PloS one. 8:12.

1061 **Zambon, R. A., Vakharia, V. N., & Wu, L. P. 2006.** RNAi is an antiviral immune response against
 1062 a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. Cell. Microbiol.8: 880-889.

1063 **Zhang, X., Guo, R., Kumar, D., Ma, H., Liu, J., Hu, X., & Gong, C. 2016.** Identification, gene
 1064 expression and immune function of the novel Bm-STAT gene in virus-infected *Bombyx*
 1065 *mori*. Gene. 577: 82-88.

1066 **Zeidler, M.P., E.A. Bach & N. Perrimon. 2000.** The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway.
 1067 Oncogene 19: 2598–2606.

1068

1069 Tabela 1. Lista de *primers* dos genes utilizados.

Gene	Nome do primer	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Objetivo
<i>DsacHop</i>	Dsac_Hopscotch_Fw	GTCAACCGAGACGAATGCAAC	60	RT-qPCR
	Dsac_Hopscotch_Rv	CCATTCCATCCAACCACGGTA	60	RT-qPCR
<i>DsacSTAT</i>	Dsac_Stat_Fw	GTATCACTATCGCCTGGGTCG	60	RT-qPCR
	Dsac_Stat_Rv	AGCTGAGGGAGATCCAAGACT	60	RT-qPCR
<i>DsacDicer2</i>	Dsac_Dicer2_Fw	ACAGGCTAACTCGCTCGTATG	60	RT-qPCR
	Dsac_Dicer2_Rv	GCTGGTCACTGTTCTCGAAGA	60	RT-qPCR
<i>DsacAgo2</i>	Dsac_Ago2_Fw	GCGTTGGATGGTCGTTGTATG	60	RT-qPCR
	Dsac_Ago2_Rv	CGCGATGCTCGGTATAGAAGT	60	RT-qPCR
<i>DsacREase</i>	Dsac_REASE_Fw	ATTCTGAACCACGTGCCTGAT	60	RT-qPCR
	Dsac_REASE_Rv	TGCACACTTCAACGGTCGTAT	60	RT-qPCR
<i>DsacB-Actin</i>	Dsac_B-actin_Fw	ATGCAGAAAGAGATCACTGC	60	RT-qPCR
	Dsac_B-actin_Rv	GATCCACATCTGTTGGAAGG	60	RT-qPCR
<i>DsacGAPDH</i>	Dsac_GAPDH_Fw	CATCAAGCAGAAGGTCAAGG	60	RT-qPCR
	Dsac_GAPDH_Rv	GTTGTCATTGAGTGAGATACCG	60	RT-qPCR
<i>DsacRPS10</i>	Dsac_RPS10_Fw	TGATCGCTTCAGTGTTGCTG	60	RT-qPCR
	Dsac_RPS10_Rv	TCTCAAATCCAGGGGTTACG	60	RT-qPCR
<i>DsacBTubulin</i>	Dsac_B-tub_Fw	CAAGAACTCGTCCTACTTCGTC	60	RT-qPCR
	Dsac_B-tub_Rv	CGGTGAACTGTTCCGAGATG	60	RT-qPCR
<i>DsaceEF2</i>	Dsac_eEF2_Fw	CGACTTCAGGAATCAAACGG	60	RT-qPCR
	Dsac_eEF2_Rv	AGAGGAACACTTCTATCTCACC	60	RT-qPCR
<i>DsacREase</i>	DsacREASE_1st round_Fw	TGCCCTCTGATTAGCTTTGACGT	58	molde para dsRNA
	DsacREASE_1st round_Rv	ACCCAAAGAGAGGAACATAGCGT	58	molde para dsRNA
<i>DsacREase</i>	Dsac_T7-dsREASE_Fw	T7-CCCATCAACCATAATGATA	62	molde para dsRNA
	Dsac_T7-dsREASE_Rv	T7-CAATAGGTATGCCAGGAGT	64	molde para dsRNA
<i>AgraCE8.1</i>	AgraCE8.1_1stR_Fw	GAACGGATGGTCTCCTGGTAA	56	molde para dsRNA
	AgraCE8.1_1stR_Rv	AACGTAGATTCTGCCAGAACC	55	molde para dsRNA
<i>AgraCE8.1</i>	Agra_T7-dsCE8.1_Fw	T7-GTACCATTCAAGAAGCTGT	63	molde para dsRNA
	Agra_T7-dsCE8.1_Rv	T7-AGGCTACTTCCAAGAGATC	63	molde para dsRNA

T7 = TAATACGACTCACTATAGGGAGA

1070

1071

1072 Tabela 2. Eficiência média dos *primers* utilizados para genes candidatos a referência
 1073 utilizando o algoritmo qPCR miner.

Genes	Eficiência média	Desvio padrão
<i>DsaceEF2</i>	0,855	0,004
<i>DsacGAPDH</i>	0,833	0,003
<i>DsacRPS10</i>	0,750	0,007
<i>DsacBActin</i>	0,796	0,005
<i>DsacBTubulin</i>	0,819	0,005
<i>DsacHop</i>	0,843	0,004
<i>DsacSTAT</i>	0,827	0,004
<i>DsacDicer2</i>	0,840	0,003
<i>DsacAgo2</i>	0,832	0,006
<i>DsacREase</i>	0,821	0,005

1074

1075

1076

1077

1078

1079

1080

1081

1082

1083

1084

1085

1086 Tabela 3. Números de *contigs* dos genes envolvidos nas vias do sistema imune JAK-STAT e RNAi
 1087 no transcrito de *Diatraea saccharalis* comparada a *Bombyx mori*.

Via	Proteína	nº de Genes em <i>Bombyx mori</i>	nº de contigs em <i>Diatraea saccharalis</i>
JAK-STAT	Domeless	1	1
	Hopscotch (JAK)	1	5
	STAT	1	1
	PTP61F	1	1
	SOC536E	1	1
	dPIAS	1	1
	Ken e Barbie	1	1
RNAi/siRNA	Dicer 2	1	1
	Argonaute 2	1	1
	R2D2	1	1
	C3PO (Trax)	1	1

1088

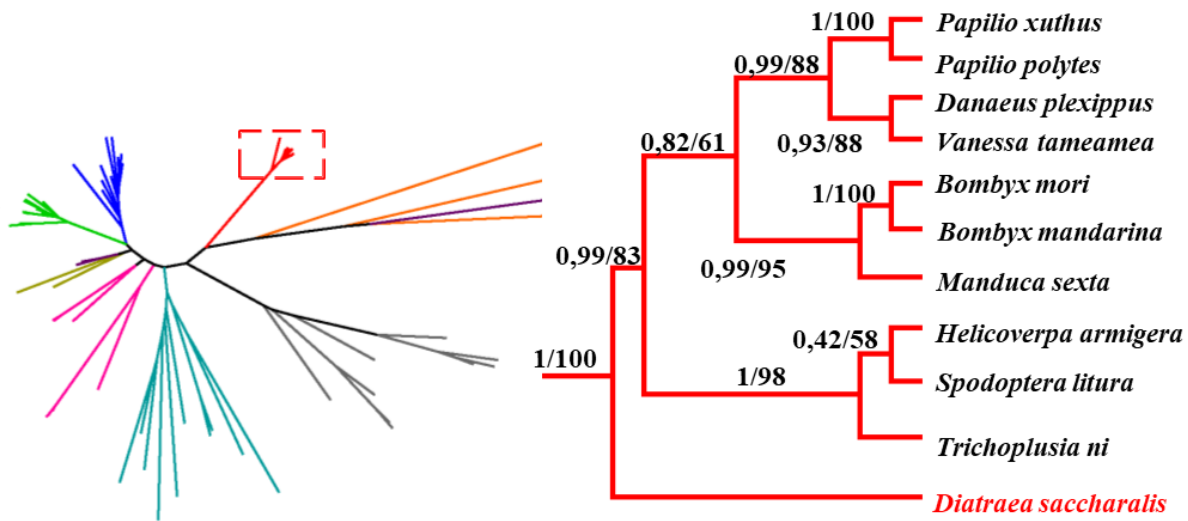
1089

A

DsacHopscotch



B

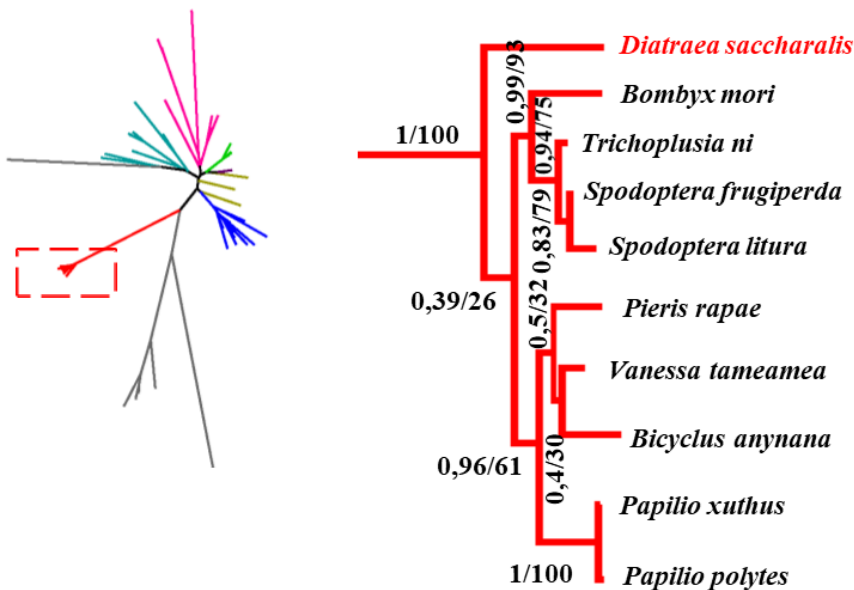


C

DsacSTAT



D



Coleoptera

Hymenoptera

Lepidoptera

Diptera

Blattodea

Orthoptera

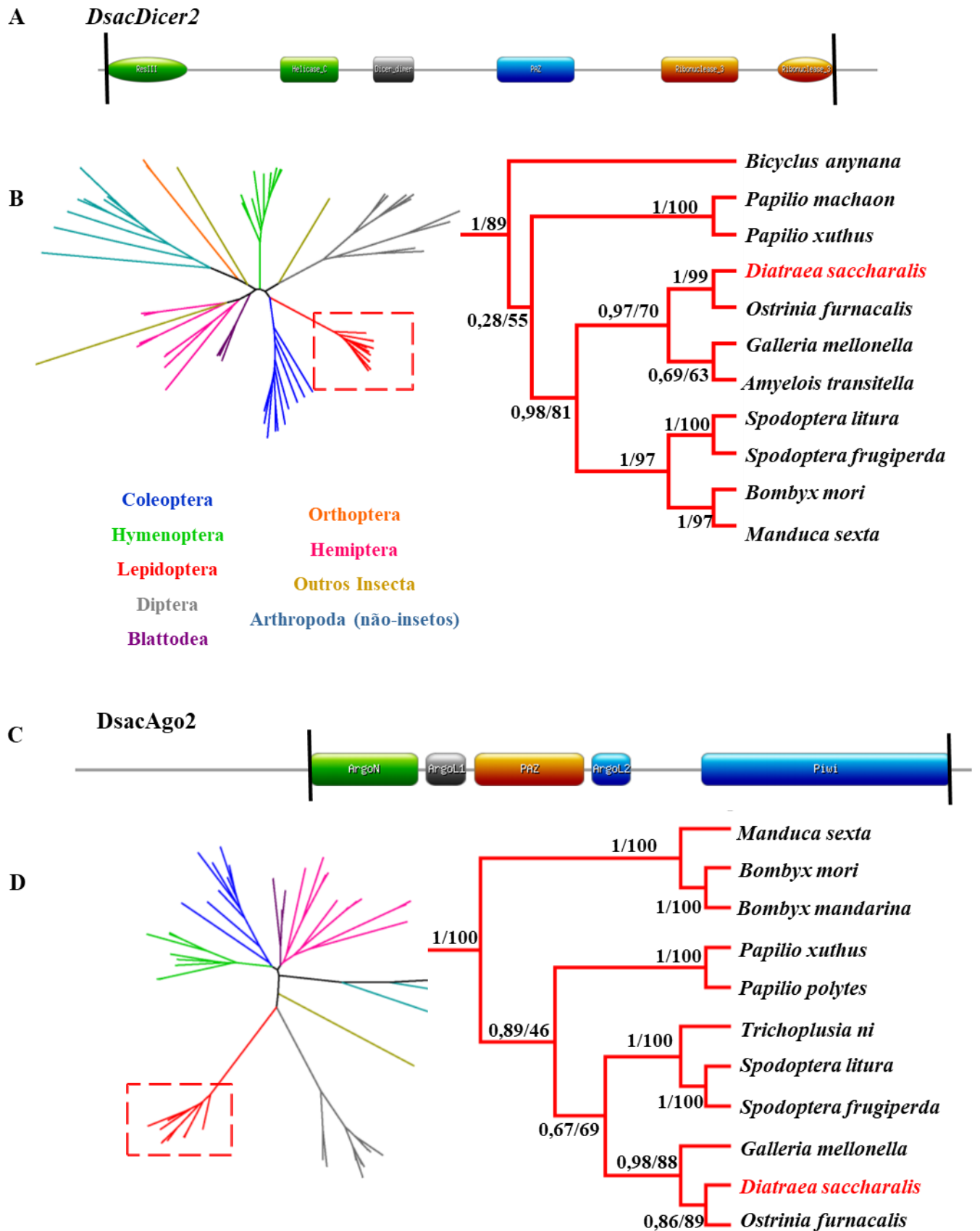
Hemiptera

Outros Insecta

Arthropoda (não-insetos)

1091 Figura 1. Análise de domínios conservados e análise filogenética dos genes *DsacHop* e *DsacSTAT*.
1092 Domínios proteicos preditos para *DsacHop* (**A**) e *DsacSTAT* (**C**). *DsacHop* apresentou identidade
1093 para os dois domínios de Tirosina kinase (bloco azul). *DsacSTAT* apresentou domínios com
1094 identidade para STAT_int (bloco laranja), STAT_alpha (bloco verde), STAT_blind (bloco azul) e
1095 SH2 (bloco cinza). As porções entre as barras em A e C foram utilizados para o alinhamento e
1096 construção das árvores em B e D. Árvores construídas pelo método de máxima verossimilhança para
1097 *DsacHop* (**B**) e *DsacSTAT* (**D**), com ênfase para ordem Lepidoptera. Os alinhamentos foram
1098 realizados no programa MEGA 7.0 e as árvores foram construídas segundo análises de máxima
1099 verossimilhança do programa PhyML 3.0. Com o foco no clado de Lepidoptera, nas ramificações
1100 são mostrados os valores de aLRT SH-like (de 0 a 1) e bootstrap (1 a 100).

1101



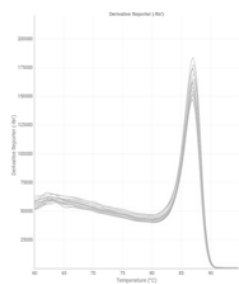
1103 Figura 2. Análise de domínios conservados e análise filogenética dos genes *DsacDicer2* e *DsacAgo2*.
1104 Domínios proteicos preditos para *DsacDicer2* (**A**) e *DsacAgo2* (**C**). *DsacDicer2* apresentou
1105 identidade para ResIII (bloco verde), Helicase_C (segundo bloco verde), Dicer_dimer (bloco cinza),
1106 PAZ (terceiro bloco azul) e dois Ribonuclease_3 (últimos blocos laranjas). *DsacAgo2* apresentou
1107 domínios com identidade para ArgoN (bloco verde), um domínio ArgoL1(bloco cinza), um domínio
1108 PAZ (bloco laranja), um domínio ArgoL2 (bloco azul), e um domínio Piwi (último bloco azul). As
1109 porções entre as barras em A e C foram utilizados para o alinhamento e construção das árvores em
1110 B e D. Árvores construídas pelo método de máxima verossimilhança para *DsacDicer2* (**B**) e
1111 *DsacAgo2* (**D**), com ênfase para ordem Lepidoptera. Os alinhamentos foram realizados no programa
1112 MEGA 7.0 e as árvores foram construídas segundo análises de máxima verossimilhança do programa
1113 PhyML 3.0. Com o foco no clado de Lepidoptera, nas ramificações são mostrados os valores de
1114 aLRT SH-like (de 0 a 1) e bootstrap (1 a 100).

1115

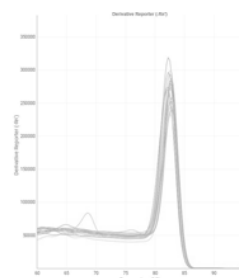
1116 .

1117

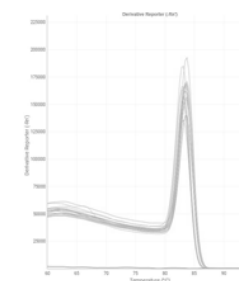
A



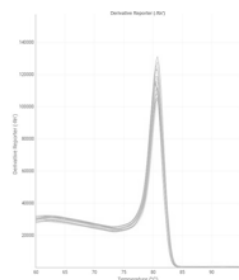
B-TUB



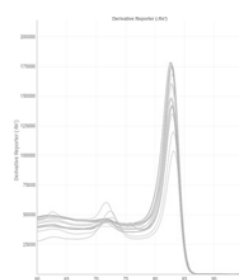
GAPDH



B-ACT

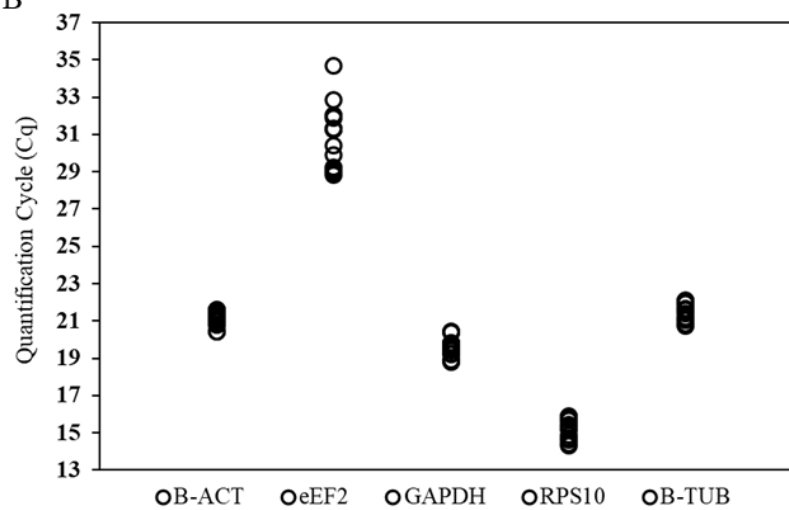


RPS10

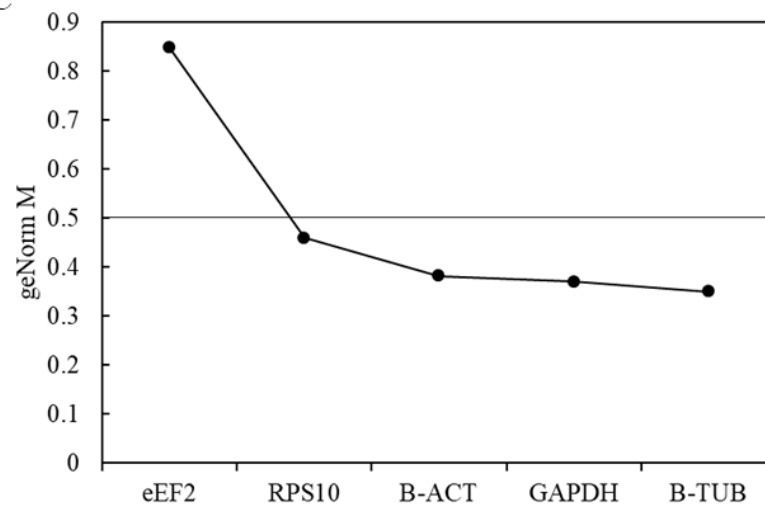


eEF2

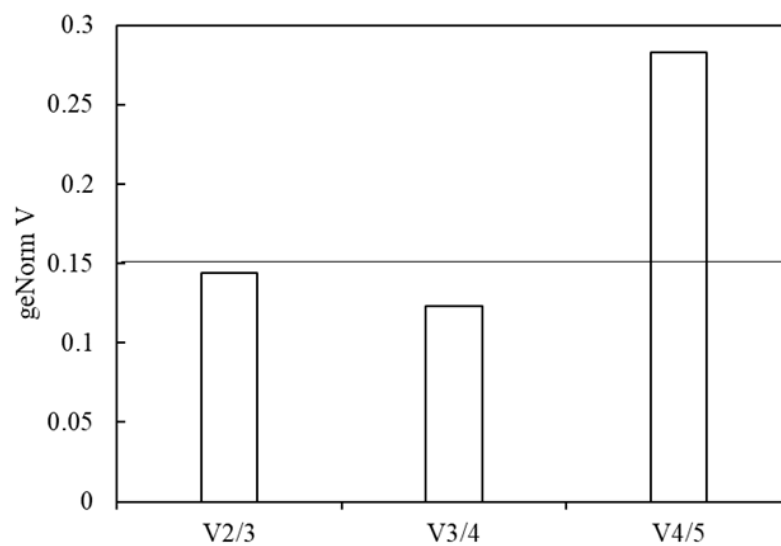
B



C

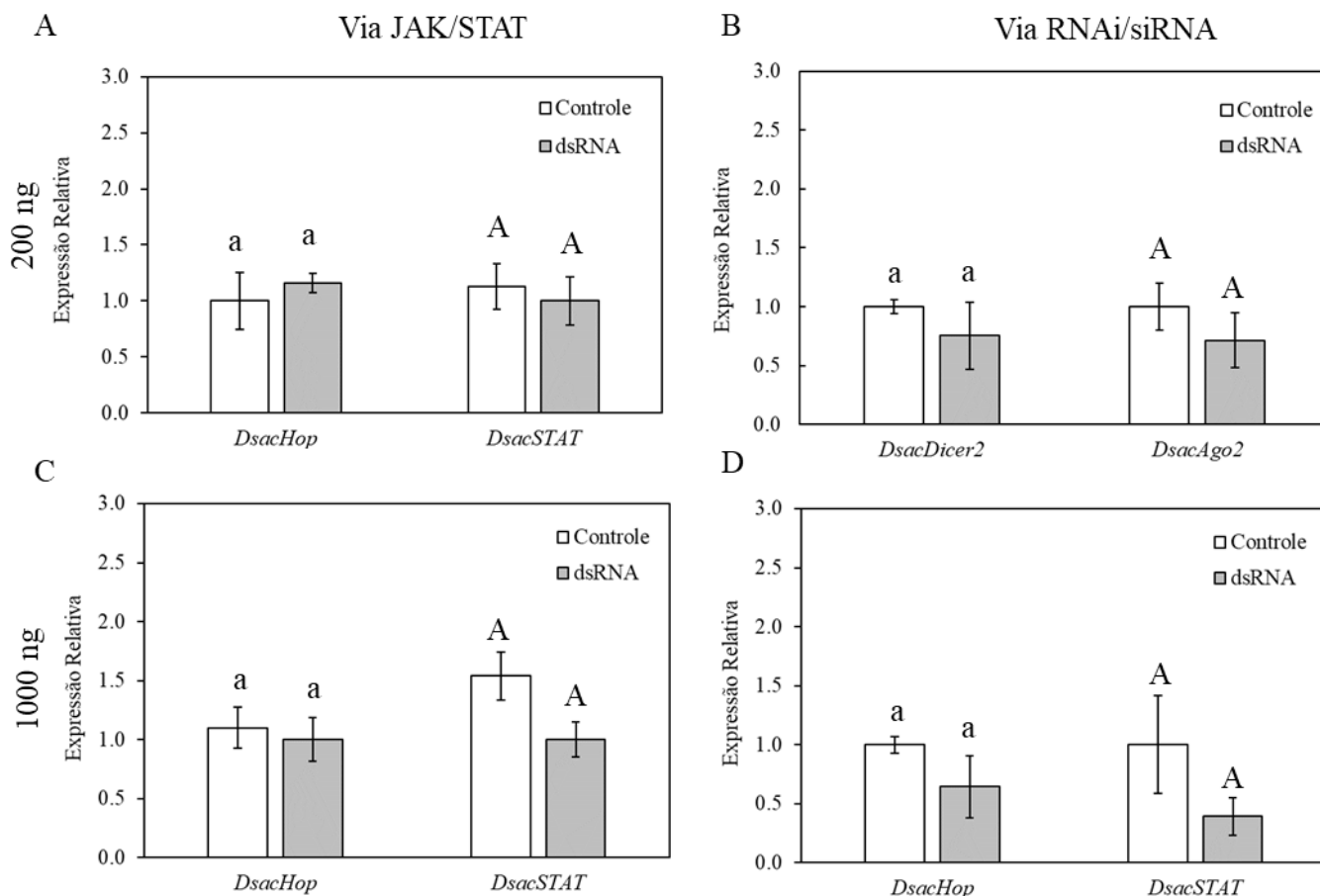


D



1119 Figura 3. Identificação dos genes candidatos a referência mais estáveis. (A). As curvas de
1120 dissociação dos genes candidatos, B-TUB, GAPDH, B-ACT, RPS10 e eEF2, mostrando picos
1121 individuais, sendo cada um obtido de duas réplicas técnicas e três biológicas. Não foram observadas
1122 amplificações para os controles negativos. (B) Valores de Ciclo de quantificação (Cq) para cada
1123 gene candidato testado a partir de cDNAs de lagartas de *Diatraea saccharalis* tratados ou não com
1124 dsRNA. (C) Estabilidade de expressão dos genes candidatos pela análise de geNorm (qBase+); os
1125 valores de M abaixo de 0,5 indicam maior estabilidade. (D) Determinação do número de genes
1126 necessários para normalizar a expressão do gene-alvo analisado pelo geNormV. Valores abaixo de
1127 0,15 são considerados ideais.

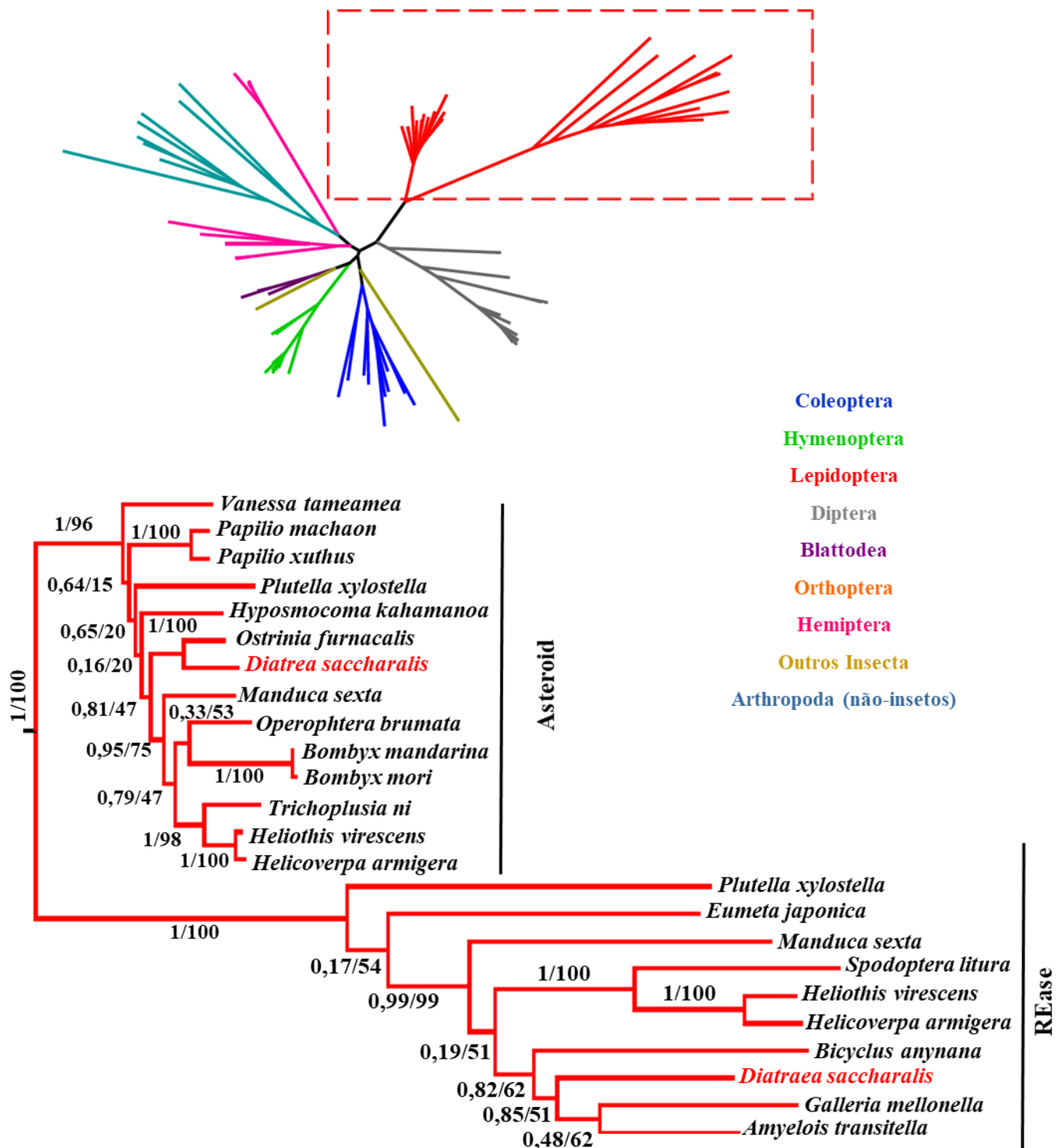
1128



1129

1130 Figura 4. Análise da expressão relativa por RT-qPCR dos genes componentes das vias JAK-STAT
 1131 e RNAi em lagartas induzidas por dsRNA. (A e C). Expressão relativa dos genes *DsacHop* e
 1132 *DsacSTAT* da via JAK-STAT em lagartas de 4º instar injetadas com 0,2 µg e 1 µg de dsRNA não-
 1133 específico, respectivamente. (B e D) Expressão relativa dos genes *DsacDicer2* e *DsacAgo2* da via
 1134 JAK-STAT em lagartas de 4º instar injetadas com 0,2 µg e 1 µg de dsRNA não-específico,
 1135 respectivamente. Colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de
 1136 probabilidade

1137



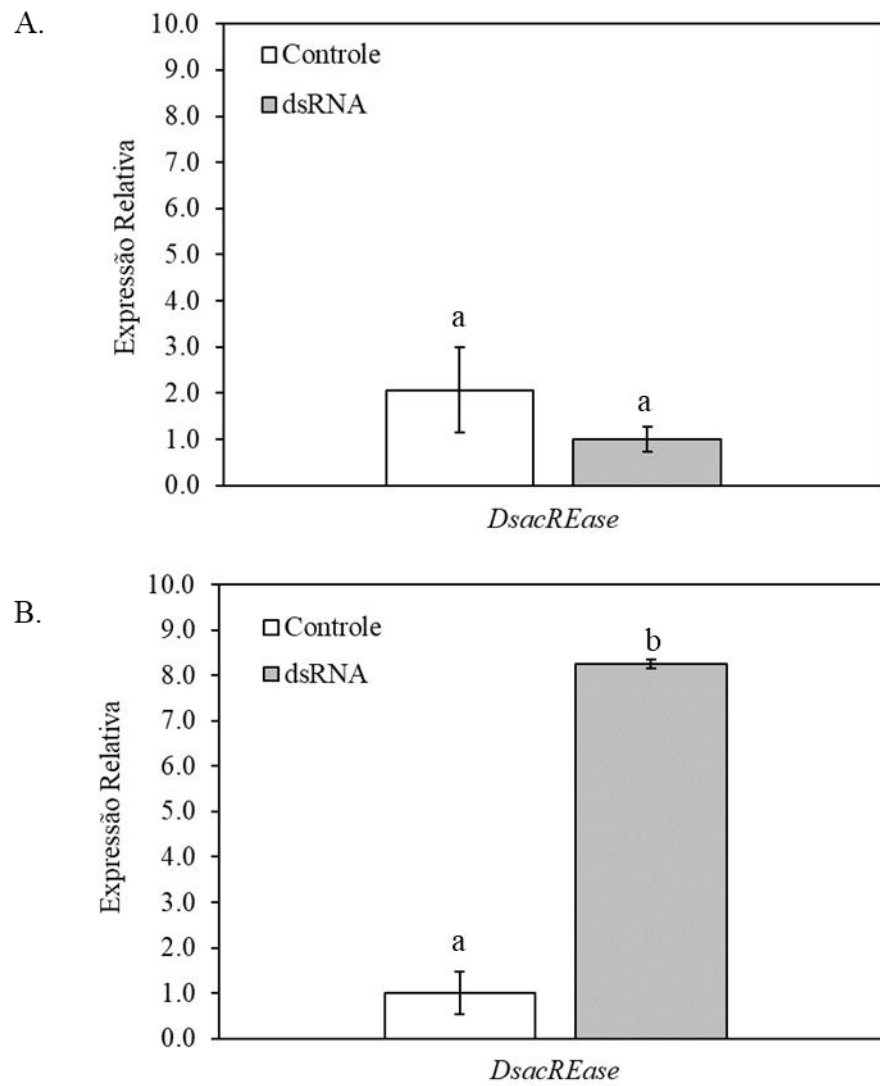
1138

1139 Figura 5. Análise filogenética dos genes *DsacREase* e *DsacAsteroid*. O alinhamento foi realizado

1140 no programa MEGA 7.0, utilizando o algoritmo MUSCL, e as árvores foram construídas segundo

1141 análise de máxima verossimilhança do algoritmo PhyML 3.0. O clado da ordem Lepidoptera
1142 demonstrado em destaque. Os valores nas ramificações são de aLRT SH-like (de 0 a 1) e bootstrap
1143 (1 a 100). A proteínas REase está presente apenas na ordem Lepidoptera formando um clado
1144 separado do grupo de proteínas asteroid que são conservadas em todos os insetos.

1145



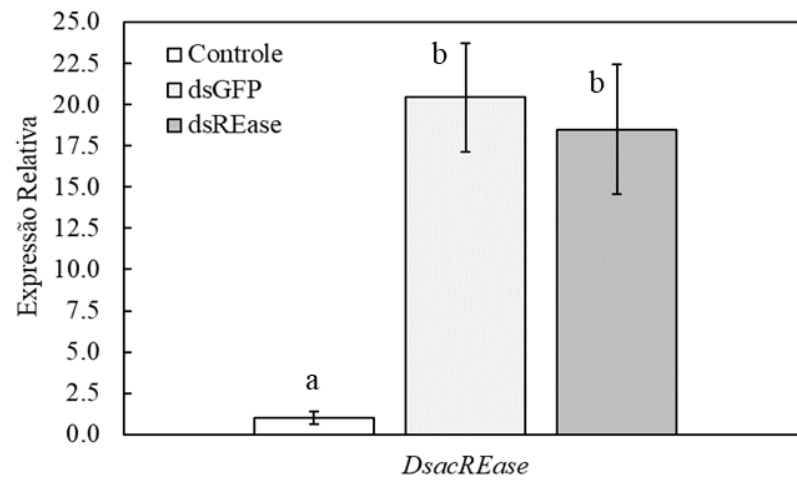
1146

1147 Figura 6. Análise da expressão relativa *DsacREase* induzida por dsRNA não-específico. (A) Dose

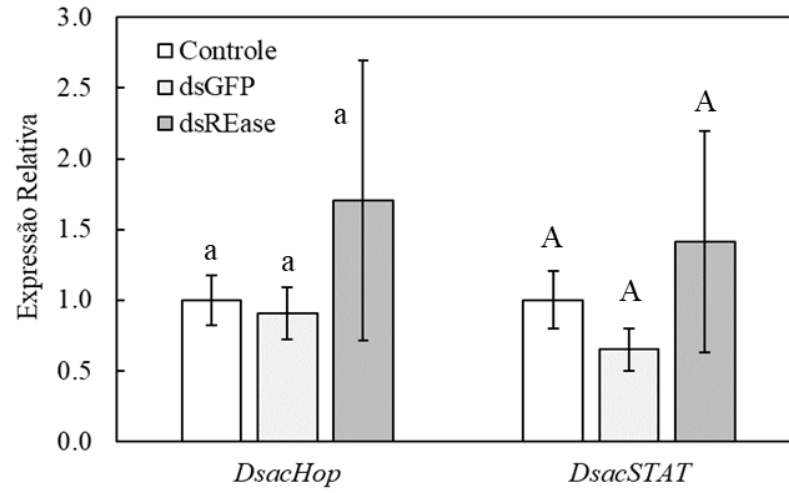
1148 0,2 µg e (B) 1 µg. Colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

1149

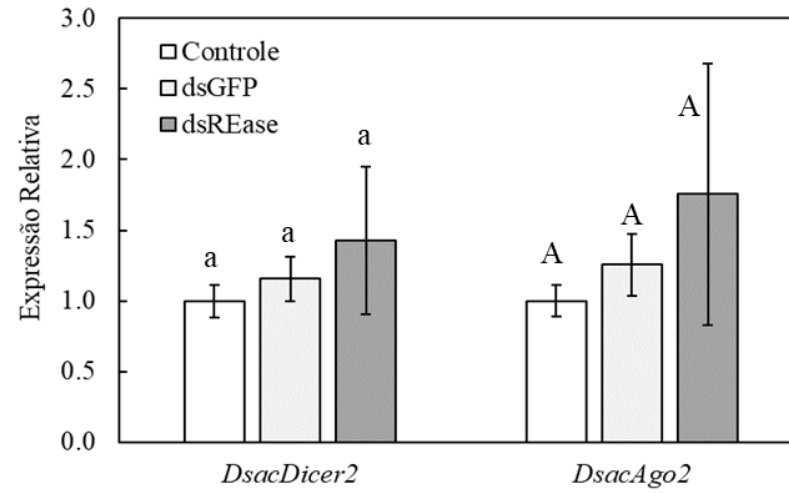
A.



B.



C.



1151 Figura 7. Análise da expressão da *DscaREase* induzido por um dsRNA não-específico e específico.
1152 (A) O gene *DsacREase* é significativa mais expressa nos tratamentos com dsGFP e dsREase, em
1153 relação ao controle. (B) Expressão dos genes *DsacHop* e *DsacTAT* da via JAK/STAT após 4h sob
1154 o tratamento de dsREase e dsGFP. (C) Análise da expressão dos genes *DsacDicer2* e *DsaAgo2* da
1155 via RNAi/siRNA após 4h sob o tratamento de dsREase e dsGFP. Colunas com a mesma letra não
1156 diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

1157

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou a resposta molecular de lagartas de 4º instar de *Diatraea saccharalis* microinjetadas com dsRNA não-específico. As vias do sistema imune de insetos que respondem a infecções virais avaliadas neste trabalho foram JAK-STAT e RNAi devido o dsRNA se assemelhar a estruturas nucleicas virais. Os componentes dessas vias foram devidamente encontrados e identificados no transcrito de intestino de *D. saccharalis*. Decidiu-se validar *in vivo* por meio da escolha de dois genes de cada via, aqui denominados *DsacHop* e *DsacSTAT* na via JAK-STAT e *DsacDicer 2* e *DsacAgo 2* na via RNAi/siRNA. Entretanto, foi observado que essas vias não foram ativadas na presença do dsRNA.

Alguns estudos sugerem que a ação de nucleases podem degradar as moléculas de dsRNA. Assim, identificou-se a ribonuclease denominada REase em *D. saccharalis* chamada *DsacREase*, já relatada na literatura como exclusiva de Lepidoptera. Verificou-se que a *DsacREase* foi fortemente expressa na concentração de 1 µg de dsRNA não-específico. Pode-se hipotetizar que, provavelmente, as vias JAK-STAT e, principalmente, RNAi/sirNA não foram ativadas pela presença do dsRNA, devido a ação da *DsacREase*. Partindo deste princípio, tentou-se silenciar *DsacREase* pela ação de dsRNA específico (dsREase), porém, observou-se que a *DsacREase* continuou sendo fortemente expressa e sem resposta das vias JAK-STAT ou RNAi/siRNA.

1178 Desta forma, como perspectiva, sugere-se que aumentar a dose de dsRNA específico para se
1179 tentar uma resposta de silenciamento. Além disso, pode-se investigar a presença de ação de outras
1180 nucleases presentes tanto no intestino como na hemolinfa, que também possam estar agindo na
1181 degradação do dsRNA, não permitindo que as possíveis respostas das vias Jak/STAT ou
1182 RNAi/siRNA sejam ativadas.

1183 Pesquisas como esta possibilitam entender como agem molecularmente as vias do sistema de
1184 defesa dos insetos, principalmente em *Diatrea saccharalis*, uma praga tão importante
1185 economicamente para a cana-de-açúcar. Além disto, compreender porque o silenciamento gênico
1186 (RNAi) é ineficiente em *D. saccharalis* podem dar subsídios para melhorar esta eficiência. Assim, a
1187 elaboração de possíveis soluções que sejam eficazes no controle desta praga, reduzindo perdas na
1188 produção, e aumentando a produtividade no campo, podem contribuir para uma cultura canavieira
1189 do Brasil mais sustentável.