

KAREN IZUMI TAKEDA

**OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS EM TÚBULOS DE
MALPIGHI DE HÍBRIDOS DE BICHO-DA-SEDA INFECTADOS PELO
Bombyx mori NUCLEOPOLIEDROVÍRUS MÚLTIPLO**

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
SETEMBRO - 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

KAREN IZUMI TAKEDA

**OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS EM TÚBULOS DE
MALPIGHI DE HÍBRIDOS DE BICHO-DA-SEDA INFECTADOS PELO
Bombyx mori NUCLEOPOLIEDROVÍRUS MÚLTIPLO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para a obtenção de título de Mestre.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
SETEMBRO - 2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação
(CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Takeda, Karen Izumi

T136o Obtenção de sequências expressas em túbulos de Malpighi de híbridos de bicho-da-seda infectados pelo *Bombyx mori* nucleopoliedrovírus múltiplo / Karen Izumi Takeda. -- Maringá, 2009.

Xi, 46 f. : il. color.

Orientadora : Prof. Dr. Maria Aparecida Fernandez.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, 2009.

1. Bicho-da-seda - Nucleopoliedrovírus. 2. Bicho-da-seda - Transcriptoma. 3. Bicho-da-seda - ORESTES. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 21.ed. 595.78

Dedico este trabalho às pessoas que são a minha estrutura e que me amam incondicionalmente: aos meus pais **Ciro e Ivete**.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

À orientadora professora doutora Maria Aparecida Fernandez, a quem admiro e com quem muito aprendi.

Ao doutor Daniel Guariz Pinheiro e professor doutor Wilson Araújo da Silva Júnior.

Às professoras doutora Maria Albertina de Miranda Soares, doutora Valéria E. Patussi, doutora Ana Sílvia Lapenta e doutora Maria Cláudia C. R. Takasusuki.

À minha família, de forma especial, aos meus pais e irmãos.

Ao meu namorado Henrique, meu bem precioso, pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos.

Às amigas próximas, mas que estão distantes: Fabiana, Janaína, Juliana, Kenya, Letícia e Sara.

Às amigas que muito estimo: Adriana Fiorini, Juliana P. Bravo e Roxelle E. Munhoz.

Ao amigo, irmão de coração, Valério A. Balani.

Aos companheiros de laboratório, que tornam diferente o dia-a-dia: Bruno, Celina, Fabiana, Fabrícia, Jerônimo, José Luís, Lídia, Naiara, Quirino, Simone e Vânia.

A Marli, por sua dedicação em cuidar do laboratório.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização de mais uma etapa em minha vida.

BIOGRAFIA

Karen Izumi Takeda possui graduação em Ciências Biológicas (habilitação em licenciatura e bacharelado) pela Universidade Estadual de Maringá, UEM. Durante a graduação realizou estágio de Iniciação Científica no Laboratório de Organização Funcional do Núcleo (Departamento de Biologia Celular e Genética).

Em 1995, concluiu o Ensino Fundamental na E.E.P.G. Professor Jair Luiz da Silva (Junqueirópolis – SP) e em 1998, concluiu o Ensino Médio na Escola Professor Gumercindo Corrêa de Almeida Moraes (Dracena – SP).

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, na mesma Universidade.

No dia 10 de setembro de 2009, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. <i>Bombyx mori</i> L.....	5
2.1.1. Genômica	8
2.1.2. Transcriptômica.....	8
2.1.3. Proteômica.....	11
2.2. Classificação <i>B. mori</i>	13
2.2.1. Origem.....	16
2.2.2. Voltinismo.....	12
2.2.3. Número de ecdises ou mudas	11
2.3. Patógenos	13
2.3.1. Doenças causadas por protozoários	16
2.3.2. Doenças causadas por fungos	13
2.3.3. Doenças causadas por bactérias	11
2.3.4. Doenças causadas por vírus	13
2.4. Importância econômica	168
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Inoculação pelo BmMNPV	22
3.2. Metodologia ORESTES	22
3.2.1. Extração de RNA total e purificação de RNAm	24
3.2.2. Síntese de cDNA e obtenção de perfis ORESTES	24
3.3. Bibliotecas de cDNA.....	26
3.4. Análise de sequências	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Análise das sequências em BLASTN e BLASTX	30
4.2. Análise de sequências de RNAm em bancos de dados de cDNA.....	31
4.3. Análise de sequências de EST's de <i>B. mori</i>	13
5. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

TAKEDA, KAREN IZUMI; M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, setembro 2009. **Obtenção de sequências expressas em túbulos de Malpighi de híbridos de bicho-da-seda infectados pelo *Bombyx mori* nucleopoliedrovírus múltiplo, BmMNPV.** Orientadora: Dr^a. Maria Aparecida Fernandez. Professoras conselheiras: Dr^a. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki e Dr^a. Ana Sílvia Lapenta.

Bombyx mori, popularmente conhecido como bicho-da-seda, é um lepidóptero de grande importância econômica em razão do valor comercial da seda. O seu genoma foi estimado em 500 Mb e 432 mega bases (Mb) foram sequenciados em 2004 por dois grupos de pesquisadores, um japonês e um chinês. Com o sequenciamento do seu genoma, tornou-se possível explorar também o seu transcriptoma e proteoma, a fim de melhor compreender este lepidóptero, que tem tornado um organismo modelo. O bicho-da-seda é susceptível a várias doenças, sejam elas causadas por fungos, bactérias, protozoários ou vírus. As doenças virais são as de maior ocorrência, causando grandes perdas na produção de casulos e, conseqüentemente, prejudicando a economia sericícola. Um subgrupo múltiplo do nucleopoliedrovírus (BmMNPV) foi isolado no Estado do Paraná e vários trabalhos vêm sendo realizados com relação a sua infecção em lagartas do bicho-da-seda. Sabe-se que o vírus infecta vários órgãos, como a glândula da seda, traqueia, sistema nervoso central, porém, resultados não publicados apontam para a inexistência de infecção no órgão excretor do inseto, o túbulo de Malpighi, embora este apresente alterações morfofisiológicas. Assim sendo, no presente trabalho, o transcriptoma do túbulo de Malpighi de híbridos do bicho-da-seda foi analisado utilizando-se a metodologia ORESTES (*Open Reading Frame Expressed Sequence Tag*), a qual permite a obtenção de fragmentos centrais de genes, por meio de RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*). A obtenção de sequências diferencialmente expressas foi realizada a partir da inoculação do vírus BmMNPV em lagartas no 5º instar larval, e os túbulos de Malpighi foram coletados nos seguintes períodos 24, 48, 72 e 96h, depois. A partir do RNA total foi obtido o mRNA (RNA mensageiro), sendo realizada a síntese de cDNA (DNA complementar), o qual serviu como molde para a realização da PCR *Touchdown*

com *primers* aleatórios. Com os produtos de amplificação obtidos (perfis ORESTES) foi realizada a ligação em vetores de clonagem para a transformação em bactéria termo-competente, obtendo-se assim bibliotecas de cDNA. Foram sequenciados 414 clones, dos quais 168 sequências foram válidas, sendo que 5,36% são similares às sequências já depositadas em banco de EST's de *B. mori*, 65,48% de sequências ORESTES e 21,43% não apresentam similaridade com sequências conhecidas, as quais podem representar novos genes do bicho-da-seda. Estas informações podem contribuir com a anotação genômica, assim como também contribuir com a determinação do transcriptoma do túbulo de Malpighi de *B. morri*, quando da infecção pelo BmMNPV.

Palavras-chave: bicho-da-seda, nucleopoliedrovírus, transcriptoma.

ABSTRACT

TAKEDA, KAREN IZUMI; M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, setembro 2009. **Malpighian tubules expressed sequences from silkworm hybrid strain infected by *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus multiple, BmMNPV**. Advicer: Dr^a. Maria Aparecida Fernandez. Conselors Professors: Dr^a. Ana Sílvia Lapenta e Dr^a. Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

Bombyx mori, widely known as silkworm, is a lepidopteran of great commercial value due to the silk production. Its genome was sequenced in 2004 by two researchers groups, Japanese and Chinese, and 432 mega bases (Mb) was sequenced, of a total estimated in 500 Mb. With the genome sequencing, it became possible to explore also its transcriptome and proteome, in order to better understand this lepidopteran, which has become a model organism. Like all organisms, the silkworm is susceptible at various diseases, whether caused by fungi, bacteria, protozoa or viruses. The viral diseases are the most affecting silkworm, causing great losses in the cocoons production and, consequently, harming the silk economy. A multiple subgroup nucleopolyhedrovirus (BmMNPV) was isolated in the Parana State and many researches have been conducted with regard to its infection in silkworm larvae. It knows that the virus infects the silk gland, trachea, central nervous system, however unpublished results point to the absence of infection in the excretory organ of this insect, the Malpighian tubule, but it demonstrate morpho-physiological modifications. Thus, in this study, the transcriptome of the Malpighian tubule from silkworm strain hybrid was analyzed using the ORESTES (Open Reading Frame Expressed Sequence Tag) methodology, which allows getting central fragments of the genes by RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction). The acquisition of differentially expressed sequences was carried out from BmMNPV virus inoculation in the 5th instar larvae and the Malpighian tubules were collected at 24, 48, 72 and 96 hours post-inoculation (hpi). From the total RNA was obtained mRNA (messenger RNA), and it was used to the synthesis of cDNA (complementary DNA), which served as template for PCR *Touchdown* (PCR-TD) with random primers. With the amplification products obtained (ORESTES profile) was performed the ligation in

cloning vectors for the transformation in chemical competent bacteria, thus obtaining cDNA libraries. It was sequenced 414 clones, of which was obtained 168 valid sequences, and 5.36% are similar to sequences already deposited in the EST's *B. mori* database, 65.48% of ORESTES sequences and 21.43% have no similarity to known sequences, which they can represent new genes of the silkworm. These results can potentially contribute to the genomic annotation, as well as contribute to the transcriptome of the Malpighian tubule of *B. mori* determination when it is infected with BmMNPV.

Key words: silkworm, nucleopolihedrovirus, transcriptome.

1. INTRODUÇÃO

O bicho-da-seda, *Bombyx mori*, é um lepidóptero que apresenta relevante importância econômica em razão de sua exploração para a sericicultura, que compreende desde o cultivo de amoreira, principal alimento deste inseto, até a extração dos fios de seda a partir dos casulos. E, por causa de sua intensa seleção, este inseto foi sendo domesticado ao longo dos anos, não sendo capaz de sobreviver na natureza, ou seja, necessitando do auxílio do ser humano.

O avanço da genética molecular e celular e o desenvolvimento da biotecnologia tornaram possível ao bicho-da-seda também apresentar outras aplicações, podendo ser utilizado como um biorreator para a produção de proteínas recombinantes e a fabricação de biomateriais. Assim, em 2000, dois grupos de pesquisadores franceses (Centro Nacional de Pesquisas Científicas, CNRS, e Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas de Lyon, INRA) em colaboração com grupos de pesquisadores japoneses e americanos obtiveram um transgênico do bicho-da-seda, por meio da transformação com um vetor contendo o transposon *piggyBac*. Este vetor é a inserção de genes exógenos, tornando-se útil tanto para a produção de seda como para a indústria farmacêutica, na síntese de substâncias proteicas (Tamura et al., 2000).

O seu genoma foi seqüenciado, em 2004, independentemente por dois grupos de pesquisadores, um japonês e um chinês (Mita et al., 2004 e Xia et al., 2004, respectivamente) e, atualmente, com os esforços destes dois grupos ao combinar os dados de suas seqüências, chegou-se a um novo agrupamento (432 Mb), o que mostrou uma estabilidade significativa (~3,7 Mb de *scaffold* de tamanho N50) e forneceu 87% da cobertura de nucleotídeos dos 28 cromossomos. De forma interessante, este novo agrupamento revelou que o genoma de *B. mori* apresenta remanescentes cromossômicos do cariótipo ancestral, que existiu antes da divergência de vertebrados e insetos, o que não é fortemente presente nos genomas de outros insetos (The International Silkworm Genome Consortium, 2008).

O seu genoma já vem sendo explorado e, além disso, muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos com seqüências expressas no bicho-da-seda, como forma de

melhor compreender o seu transcriptoma. Isto pode ser observado no trabalho de Bao et al. (2009), em que os pesquisadores obtiveram 62 genes diferencialmente expressos diante à infecção com o nucleopoliedrovírus de *B. mori* (BmNPV) em duas linhagens de *B. mori*, denominadas KN e 306, altamente resistente e susceptível, respectivamente. Dos 62 genes obtidos, oito apresentaram expressões significativamente diferenciais no intestino da linhagem KN, o que pode denotar que os mesmos estejam envolvidos na resposta imune do inseto contra a infecção pelo vírus.

Ainda com relação ao transcriptoma do bicho-da-seda, pode-se mencionar os trabalhos de Oh et al. (2006), em que foram comparados os perfis de expressão gênica entre os estágios embrionário e larval; de Tang et al. (2007), em que o perfil de expressão gênica da glândula da seda foi analisado e de Liu et al. (2009), em que foram analisados genes envolvidos na resposta inicial aos efeitos de injúria e infecção microbiana.

A possibilidade de transformação gênica e do extenso conhecimento fisiológico, bioquímico e recentemente do seu genoma, tornam o bicho-da-seda um inseto modelo dentro dos lepidópteros, em que a genética comparativa e a genômica podem trabalhar juntas a fim de elucidar padrões evolutivos conservados e suas diversificações, identificar novos genes e sistemas gênicos como alvos para a transgênese (Heckel et al., 2003).

O longo tempo de criação do bicho-da-seda há aproximadamente 5.000 anos, com propósitos comerciais, faz com que a sua genética se torne alvo de interesse nas pesquisas, resultando em uma coleção significativa e na manutenção de vários estoques genéticos de interesse científico e econômico (Nagaraju e Goldsmith, 2002). De acordo com Goldsmith (2002), as maiores coleções estão mantidas na China, no Japão e na Coreia

Bombyx mori é susceptível a vários agentes patogênicos, incluindo protozoários, fungos, bactérias e vírus. As doenças virais representam um grande problema mundial para a sericultura, sendo responsável por quase 70% da perda dos casulos (Sengupta et al., 1990). No Paraná, foi descrito por Brancalhão (2002) um isolado geográfico do vírus nucleopoliedrovírus subgrupo múltiplo

(BmMNPV). O nucleopoliedrovírus faz parte do gênero *Nucleopoliedrovirus* (NPV), da família *Baculoviridae*, sendo constituído por uma molécula de DNA dupla fita, a qual se associa com proteínas do capsídeo, formando o nucleocapsídeo (Murphy et al., 1995). NPV pode abrigar partículas virais (vírions), contendo um único nucleocapsídeo por envelope (genótipo SNPV), ou múltiplos nucleocapsídeos por envelope (genótipo MNPV) (Bilimoria, 1991).

Os sintomas causados pela infecção com o BmMNPV foram descritos por Brancalhão (2002) em lagartas de bicho-da-seda no 5º instar e incluem a mudança na coloração do tegumento (branco para branco-amarelado), diminuição na alimentação, inchaço das membranas intersegmentares, parada na alimentação, comportamento alterado, busca de lugares mais altos e deslocamento aleatório, rastro líquido leitoso, morte de lagartas, fragilidade e ruptura do tegumento e produção de casulos defeituosos.

Muitas pesquisas têm sido realizadas com relação à infecção com o BmMNPV, incluindo a citopatologia de diferentes órgãos e tecidos (Torquato et al., 2006; Pereira et al., 2008; Brancalhão et al., 2009; Ribeiro et al., 2009). No entanto, não foi descrito ainda a infecção no órgão excretor do bicho-da-seda, embora resultados não publicados (Brancalhão, R.M.C., informação pessoal) mostram que os túbulos de Malpighi não apresentam infecção pelo BmMNPV, apesar de serem observadas alterações morfo-fisiológicas que podem ser traduzidas como expressão gênica diferencial nesse órgão. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo analisar sequências diferencialmente expressas em túbulos de Malpighi de híbridos de bicho-da-seda, por meio da metodologia ORESTES (*Open Reading Frame Expressed Sequence Tag*), diante à inoculação do BmMNPV.

A metodologia ORESTES foi descrita em 2000, no trabalho “*Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags*”, e desenvolvida por pesquisadores da filial paulista do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, Andrew Simpson e Emmanuel Dias Neto. Esta técnica é capaz de identificar fragmentos centrais de genes expressos, o que a torna uma metodologia alternativa e complementar à convencional de se obter EST’s.

Sabendo-se que a infecção pelo BmMNPV é responsável por significativas perdas na produção de casulos, que não há conhecimento prévio da sua infecção em túbulos de Malpighi e que a metodologia ORESTES apresenta um diferencial na análise do transcriptoma, foi possível, com este trabalho, conhecer alguns dos produtos de expressão gênica diante à infecção pelo vírus, o que pode contribuir com a determinação do transcriptoma de túbulo de Malpighi de *B. mori*, com o direcionamento da criação racional do bicho-da-seda, com a produção de casulos e do fio de seda, e com o desenvolvimento de estudos comparativos entre os genomas de lepidópteros e outros insetos. Há possibilidade, futuramente, destas descobertas na elaboração de inseticidas eficientes e/ou no controle biológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Bombyx mori* L.

Bombyx mori L., popularmente conhecido como bicho-da-seda, foi descrito por Linnaeus em 1758, pertence ao reino Animalia, filo Artropoda, classe Insecta, ordem Lepidoptera, família Bombycidae, gênero *Bombyx*. Este lepidóptero apresenta metamorfose completa, ou seja, passa por quatro estágios no seu ciclo de vida: ovo, larva (cinco ínstaras larvais), pupa e mariposa (Aruga, 1994) mostradas na Figura 1. A metamorfose ocorre por meio de um conjunto integrado de processos para que a larva se desenvolva, transforme-se em pupa e daí em adulto (mariposa). Durante a pupação, a ecdisona ativa a expressão gênica em vários tecidos larvais, como as glândulas sericígenas e pró-torácicas, deflagrando a morte celular programada dos mesmos, assim como estimula a proliferação e diferenciação celular de células progenitoras para a formação dos órgãos dos adultos (Tsuchida e Wells, 1988).

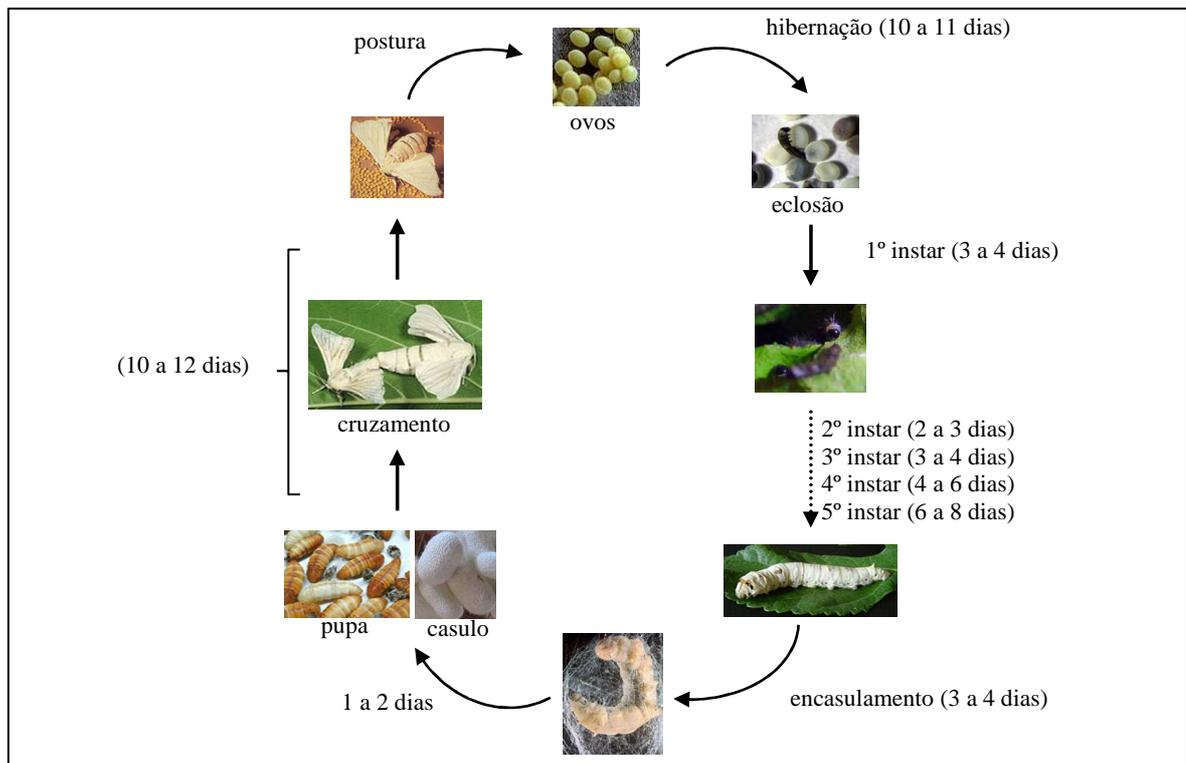


Figura 1 - Ciclo de vida de *Bombyx mori*.

Esta espécie é muito importante economicamente, em virtude da produção de seda e é o único inseto realmente domesticado, que perdeu suas características selvagens, sendo completamente dependente do ser humano para a sua sobrevivência e reprodução.

O bicho-da-seda vem sendo selecionado há milhares de anos para melhorar a produção de seda, havendo mais de 3.000 linhagens conhecidas (Yamamoto, 2000). No entanto, este lepidóptero também tem sido usado para produzir proteínas recombinantes (Tamura et al., 2000; Thomas et al., 2002; Tomita et al., 2003) e como biorreatores (Chen et al., 2006; Hofmann et al., 2006; Zhang et al., 2006). Além disso, a seda é usada como fonte de biomateriais, como mostrado por Altman et al. (2003), Servoli et al. (2005) e Wang et al. (2007), e as crisálidas para a remoção de metais pesados de águas contaminadas (Paulino et al., 2006).

Desde 1968, por meio de estudos filogenéticos, Yoshitake propôs que *B. mori* teve sua origem na China, há aproximadamente 4.600 anos, a partir de *B. mandarina* Chinesa. Recentemente, estudos filogenéticos moleculares baseados nos genes do citocromo *b* mitocondrial (Li et al., 2005) e de sequências de quatro *loci* mitocondriais, 12S rRNA, 16S rRNA, COI e região controle indicam que *B. mandarina* Chinesa é, provavelmente, o progenitor das espécies de *B. mori* (Arunkumar et al., 2006).

A longa história da criação do bicho-da-seda com propósitos comerciais, torna a sua genética alvo de interesse nas pesquisas, o que resulta em uma coleção bastante significativa e na manutenção de vários estoques genéticos de considerável interesse científico e econômico. Os estoques genéticos representam uma variedade de características qualitativas e quantitativas de interesse econômico e da biologia básica, incluindo o tamanho corporal, qualidade da seda, fecundidade, resistência a patógenos e tolerância ao calor (Nagaraju e Goldsmith, 2002). É descrito que há mais de 400 fenótipos mutantes e aproximadamente 200 têm sido atribuídos a grupos de ligação, cobrindo 900,2 cM (Fujii et al., 1992).

De acordo com Goldsmith (2002), as maiores coleções estão mantidas na China, com aproximadamente 600 linhagens na Universidade Agrícola do Sudoeste, em Chongqing (Lu et al., 2001); no Japão, com mais de 400 linhagens na

Universidade de Kyushu (Fujii et al., 1998); no Instituto Nacional de Ciências Agrobiológica, com mais de 450 linhagens (Sorita, 1998); e na Coreia, na Administração de Desenvolvimento Rural, em Suwon, com mais de 300 linhagens (Soh, 2003).

A Cooperativa Agroindustrial de Maringá (COCAMAR) fez a doação de um banco de germoplasma composto de 16 matrizes, chinesas e japonesas, à Universidade Estadual de Maringá (UEM). Com a obtenção deste banco, e sabendo que o conteúdo genético destas raças é completamente desconhecida, várias pesquisas vêm sendo realizadas. Na UEM, o grupo da Profa. Dr^a. Maria A. Fernandez e na UNIOESTE (Universidade Estadual do Oeste do Paraná), o grupo da Profa. Dr^a. Rose M.C. Brancalhão, desenvolvem projetos de genética molecular e de resistência a patógenos com estas 16 matrizes, dada a importância econômica da atividade sericícola no Paraná. Dentre os trabalhos realizados com as matrizes pode-se citar:

- Torquato et al. (2006) verificaram que o sistema traqueal é responsável pela dispersão da infecção causada pelo BmMNPV no sistema nervoso central (SNC) de lagartas de *B. mori*;
- Barbosa et al. (2008) analisaram por meio da técnica de CSGE (*Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis*) a mutação *Nd-s^D* do gene da cadeia leve da fibroína;
- Zanatta et al. (2009) analisaram as 16 matrizes quanto às características biológicas e produtivas, das quais as matrizes chinesas C122-B e C121-A, e as matrizes japonesas HA-A e HA-B, apresentaram o maior peso de casulo, que está associado ao teor de seda.

A facilidade de criação, a disponibilidade de linhagens mutantes e a morfologia, tornam *B. mori* um organismo modelo entre os lepidópteros, podendo ser usado em três principais áreas: pesquisa básica, sericultura e biotecnologia (Goldsmith et al., 2002). Um exemplo disso é que lagartas de *B. mori* foram utilizadas em experimentos para se avaliar a toxicidade e o metabolismo de algumas drogas, como a 4-metil umbeliferona, umbeliferona e 7-etoxicumarina, sendo que os

resultados obtidos por Hamamoto et al.. (2008) foram compatíveis com aqueles obtidos em mamíferos.

2.1.1. Genômica

As pesquisas genômicas do bicho-da-seda iniciaram em decorrência do seu rico repertório de fontes genéticas, das potenciais aplicações na sericultura e dele ter se tornado um organismo modelo. Desta forma, um Consórcio Internacional de Genoma de Lepidópteros foi formado, a fim de promover uma cooperação internacional para o sequenciamento do genoma do bicho-da-seda, o que o tornou o primeiro lepidóptero a ter sequências do seu genoma disponíveis. O sequenciamento foi realizado por dois grupos independentes, um grupo japonês (Mita et al., 2004) e um grupo chinês (Xia et al., 2004). Assim, a partir destes dois projetos de sequenciamento, foi determinado o tamanho do genoma de *B. mori* como sendo de 514 Mb e contivesse aproximadamente 18.510 genes.

Recentemente, com a colaboração destes dois grupos, os dados obtidos foram agrupados e, com o auxílio de bibliotecas BAC e de fosmídeos foi possível (The International Silkworm Genome Consortium, 2008):

- obter alto conteúdo de sequências repetitivas (43,6%), representando, principalmente, elementos transponíveis;
- obter mais de 3000 genes sem homologia com o genoma de outros insetos ou vertebrados;
- obter 14.623 modelos gênicos baseados no algoritmo GLEAN;
- conhecer a cascata de genes envolvidos na rota da biossíntese do hormônio juvenil;
- obter um grande número de genes codificando proteínas da cutícula;
- conhecimentos sobre a evolução gênica e processos biológicos característicos.

2.1.2. Transcriptômica

O grande interesse em melhor compreender a genética do bicho-da-seda gera inúmeros projetos relacionados ao seu transcriptoma, como uma forma de se comparar a expressão gênica, descobrir novos genes, analisar a estrutura e função gênica, além de apresentar aplicações práticas para a sericicultura, por meio do melhoramento de linhagens resistentes a patógenos, a condições climáticas e outras adversidades. Mita et al. (2003) construíram um banco de dados com 35.000 EST's (*Expressed Sequence Tag*), como uma das etapas para a análise completa do genoma de *B. mori*, pesquisando sucessivos estágios de desenvolvimento de diferentes tecidos e padrões de expressão a partir de 36 bibliotecas de cDNA. Cheng et al. (2006) analisaram, pela primeira vez, 18.480 EST's do corpo gorduroso da larva e pupa, uma vez que este tecido representa um modelo para se estudar o desenvolvimento e a metamorfose, por ser o local do metabolismo de lipídios (Arrese et al., 2001), carboidratos (Baud et al., 1977), aminoácidos (Kishimoto et al., 1999) e nitrogênio (Shinbo et al., 1997) e síntese de proteínas (Kanost et al., 1990). Seguindo esta mesma linha foram descritos 35 genes de peptídeos antimicrobianos por Cheng et al. (2006).

O banco de dados de EST's pode apresentar algumas aplicações, como por exemplo, a técnica de DNA *microarray*, a qual permite a análise simultânea de milhares de genes (Brown e Botstein, 1999; Schena et al., 1995) e foi usada para definir perfis de expressão gênica nos discos da asa de *B. mori* durante a ecdise pupal (Ote et al., 2004). Niwa et al. (2004) identificaram genes P450 específicos da glândula pró-torácica, enquanto Hong et al. (2006) analisaram o perfil de expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário.

Outra técnica baseada em EST's é a metodologia ORESTES, desenvolvida por Andrew Simpson e Emmanuel Dias Neto (2000). Esta metodologia é capaz de identificar fragmentos centrais de genes expressos, ao contrário das técnicas tradicionais que reconhecem as extremidades, o que a torna uma ferramenta muito útil e permite ainda a identificação de genes raros. Brentani et al. (2003) usando a metodologia ORESTES descobriam 219 sequências transcritas no cromossomo 22 humano. E, muitos outros trabalhos em diferentes organismos têm sido realizados por meio desta técnica, auxiliando na descoberta de novos genes, tais como em

Schistosoma mansoni (Verjovski-Almeida et al., 2003), *Bos indicus* e *B. taurus* (Mota et al., 2004), *Apis mellifera* (Nunes et al., 2004), *Biomphalaria glabrata* (Lockyer et al., 2006) e *Taenia solium* (Almeida et al., 2009).

Uma técnica versátil de análise de expressão gênica é a análise serial de expressão gênica, SAGE (Velculescu et al., 1995), a qual foi utilizada para analisar o perfil de expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário de *B. mori* após irradiação por Co^{60} (Huang et al., 2005), revelando 673 genes diferencialmente expressos, dos quais 381 foram altamente expressos em embriões irradiados. A análise em SAGE também foi utilizada em vários outros organismos, como levedura (Velculescu et al., 1997), *Arabidopsis thaliana* (Lee e Lee, 2003), arroz (Matsumura et al., 1999), camundongo (Divina e Forejt, 2004) e humano (Saha et al., 2002).

2.1.3. Proteômica

A proteômica é o estudo em larga escala da expressão gênica em nível proteico, fornecendo diretamente os níveis de proteínas sintetizadas, possibilitando a compreensão da atividade das. Zhou et al. (2008) analisaram as diferenças proteômicas do intestino médio, corpo gorduroso, hemolinfa e glândula da seda posterior de bichos-da-seda diante de diferentes dietas (folhas frescas de amoreira e dieta artificial). Os resultados obtidos sugerem que diferentes dietas alteram a expressão de proteínas relacionadas ao sistema imune, à digestão, à absorção de nutrientes, ao metabolismo energético e à síntese de seda.

Li et al. (2008) analisaram três órgãos do sistema endócrino larval de bicho-da-seda (cérebro, gânglio subesofágico e glândulas protorácicas) utilizando a metodologia *shotgun* LC-MS/MS e ferramentas da Bioinformática, a fim de melhor compreender suas funções e relações. Foi possível obter mais de 9.000 proteínas, incluindo 1.885 proteínas em comum e 652, 253 e 790 proteínas órgão-específicas: cérebro, gânglio subesofágico e glândulas protorácicas, respectivamente. As proteínas em comum indicaram a existência de interações entre estes órgãos do sistema endócrino. Os resultados obtidos revelam um mecanismo cooperativo entre

os três órgãos endócrinos na regulação de vários eventos fisiológicos e desenvolvimentais e também sugerem que as proteínas órgão-específicas poderiam ser fatores fundamentais responsáveis pela diferenciação funcional destes órgãos.

A espectrometria de massa foi utilizada para definir no genoma do bicho-da-seda genes codificantes de proteínas (ZHANG et al., 2009), encontrando-se um total de 81.000 sequências peptídicas, fornecendo uma compreensão fundamental da expressão e função das proteínas nessa espécie.

2.2. Classificação – *B. mori*

Bombyx mori pode ser classificado por diversas maneiras, podendo ser de acordo com a região nativa, o voltinismo, pelo número de ecdises ou até mesmo pela cor do casulo (Aruga, 1994).

2.2.1. Origem

Japonesa: apresenta ovos de cor cinza-arroxeados; casulo branco, alongado e de tamanho médio; ciclo uni e bivoltino com quatro ecdises.

Chinesa: ovos esverdeados; lagartas jovens e pouco resistentes ao calor, corpo branco; casulo elíptico ou esférico, de cor branca, amarelo-ouro, ou verde; fibra de seda fina e comprida; ciclo menor que a japonesa; ciclo uni, bi e polivoltino com até três ecdises.

Europeia: ovos maiores do que de outras origens da espécie; lagartas maiores com manchas no corpo e pouco resistentes ao calor, ciclo maior, grupo mais susceptível às doenças pebrina e poliedrose; casulo oval ou alongado, branco ou rosado; ciclo monovoltino.

Indiana ou Equatorial: ovos brilhantes; lagartas menores e mais resistentes ao calor, ciclo curto; casulo cônico, pequeno, branco ou esverdeado com pouco teor de seda; fibra de seda fina; ciclo polivoltino.

Coreana: ciclo curto da lagarta; casulo alongado, branco ou amarelo; ciclo univoltino com três ecdises.

2.2.2. Voltinismo

Monovoltino (um ciclo anual): ocorre nas regiões frias; ciclo larval mais longo e maior crescimento do corpo; boa qualidade dos casulos; menor resistência a doenças, a altas temperaturas e umidade.

Bivoltino (dois ciclos anuais): ocorre nas regiões subtropicais; ciclo da lagarta menor; maior resistência ao calor; qualidade inferior dos casulos; mais utilizadas pelos sericultores.

Polivoltinismo (vários ciclos anuais): ocorre nas regiões tropicais; ciclo curto de lagarta; maior resistência ao calor e doenças; casulos pequenos e com baixo teor de seda.

2.2.3. Número de ecdises ou de mudas

Três ecdises: ciclo larval mais curto; resistente a doenças; lagartas e casulos pequenos; fibra de seda mais fina; espécie de origem coreana e chinesa.

Quatro ecdises: mais utilizada pelos criadores; lagartas e casulos médios.

Cinco ecdises: lagarta de ciclo longo; casulos maiores; fibra de seda mais grossa.

2.3. Patógenos

Bombyx mori está susceptível a muitas doenças, incluindo protozoários, fungos, bactérias e vírus. As doenças causadas por patógenos ocorrem em quase toda a área de criação do mundo, sendo que as virais são responsáveis por quase 70% da perda da produção, representando mundialmente um sério problema para a sericultura (Sengupta et al., 1990). De acordo com Sengupta et al. (1990), as doenças podem ser assim classificadas:

2.3.1. Doenças causadas por protozoários

Os protozoários que acometem o bicho-da-seda compreendem a classe Microsporidia e os seguintes gêneros: *Nosema*, *Pleistophora*, *Thelohania*, *Trypanosoma* e *Leptomonas*. A principal doença é a pebrina, denominada assim por Quatrefages (1860) pela aparência de manchas pretas sobre o corpo, semelhantes ao grão de pimenta.

a. Pebrina: doença crônica e desastrosa, sendo responsável pela crise repentina na indústria sericícola da França e da Itália, em 1965. É causada por *Nosema bombycis* Nageli e as fontes de infecção podem ser variadas: folhas de amoreira contaminadas, ovos infectados (infecção transovariana), superfície contaminada, lagartas mortas, fezes das lagartas ou a exúvia das lagartas. Os sintomas desta doença podem ser observados em todos os estágios de vida do bicho-da-seda: no ovo percebe-se pouca aderência, falta de uniformidade, morto ou não fertilizado; na lagarta, há pouco apetite, crescimento e desenvolvimento retardados, apresentando manchas escuras sobre o tegumento, a pele apresenta-se pálida e translúcida; a pupa apresenta a área abdominal mole, inchada e mais escura; na mariposa aparecem manchas escuras maiores, abrangendo os segmentos das asas e a parte final do abdômen. Esta doença ainda não foi completamente eliminada, mas está sob controle, uma vez que as mariposas-mãe e os ovos produzidos são microscopicamente examinados.

2.3.2. Doenças causadas por fungos

As duas principais doenças fúngicas são a muscardina e a aspergilose.

a. Muscardina: aparece em várias formas e, dependendo da cor dos esporos que cobrem o corpo do bicho-da-seda, o animal assume uma coloração característica, podendo ser nomeada de muscardina branca, muscardina verde, muscardina amarela, muscardina vermelha, muscardina preta, etc. Entretanto, as mais comuns são a muscardina branca e verde:

Muscardina branca: é a doença fúngica mais comum e amplamente prevalente em todos os países sericícolas, ocorrendo geralmente em estações chuvosas e frias, com temperaturas moderadas a baixas e condições de alta umidade. Esta doença é causada por diversas espécies do gênero *Beauveria*, sendo a mais virulenta a *Beauveria bassiana*, ocorrendo em qualquer idade larval. A infecção geralmente se dá através da pele, de modo que o fungo penetra no tegumento e propaga-se na hemolinfa e na cavidade corporal. Os sintomas incluem diarreia, vômito, manchas irregulares na pele, corpo fraco e sem elasticidade, inapetência e inatividade. Após a morte do inseto, os fungos se espalham por todos os tecidos e a superfície do corpo fica recoberta por micélios do fungo.

Muscardina verde: surge nas estações frias, outono e inverno, sendo causada por *Nomuraea rileyi* Farlow. A infecção também ocorre através da pele, porém, de forma mais lenta. Na epiderme, aparecem manchas de contornos bem definidos, que podem ser negras, parda-escuras, apresentar a parte central acinzentada ou serem incolor. A lagarta mostra-se inativa, com diarreia, vômito e sem apetite; quando morre, o corpo é recoberto de hifas brancas e, posteriormente, de esporos verdes.

b. Aspergilose: é causada por diferentes espécies do gênero *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. ochraceus*) e *Sterigmatocystis* (*S. fulva* e *S. japonica*), sendo que a umidade elevada é a preferida por estes fungos. A lagarta apresenta inapetência, diarreia e, quando morre, fica com coloração marrom-escura, ou alaranjada.

2.3.3. Doenças causadas por bactérias

As doenças bacterianas que afetam o bicho-da-seda são coletivamente denominadas flacidez, devido à natureza flácida da lagarta infectada. A incidência de flacidez é alta durante as estações quentes e úmidas.

a. Septicemia: doença em que as bactérias se propagam na hemolinfa da lagarta, pupa e mariposa, após penetrarem através de ferimentos na pele, podendo ser bacilos, estreptococos e estafilococos. Os sintomas variam de acordo com o patógeno, mas de maneira geral as lagartas infectadas apresentam inapetência, inatividade e, às vezes, vomitam o suco intestinal. Ao progredir da doença, as lagartas não conseguem mais se agarrar com as patas torácicas e morrem.

b. Doenças bacterianas dos órgãos digestivos (também conhecida como flacidez): há proliferação exacerbada de bactérias no canal alimentar do bicho-da-seda, levando a sintomas de flacidez. Esta doença não apresenta um agente específico, porém, normalmente as bactérias encontradas nesta doença são *Streptococcus sp* e *Proteus*, sendo que as condições desfavoráveis do barracão de criação e a alimentação de má qualidade podem ser pré-disposições a estes patógenos. Entre os sintomas apresentados pelas lagartas infectadas citam-se: perda de apetite, elasticidade da pele, diarreia e vômitos.

c. Doença de Sotto: também conhecida como toxicose bacteriana ou epilepsia, ocorre quando há intoxicação causada pelas toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. A bactéria penetra no intestino, multiplica-se e produz as toxinas, que são solubilizadas no fluido digestivo alcalino das lagartas e, posteriormente, são absorvidas pela parede do canal alimentar. Estas toxinas afetam o nervo central e provocam espasmos e paralisia. As lagartas infectadas apresentam inapetência, inatividade, tegumento frouxo, macilência, diarreia e morrem.

2.3.4. Doenças causadas por vírus

As doenças virais representam um grande problema para a sericicultura, sendo responsáveis por quase 70% da perda de casulos. Estas doenças podem ser causadas por vírus que formam corpos de inclusão (poliedrose nuclear e poliedrose citoplasmática) ou por vírus que não formam corpos de inclusão (flacidez infecciosa e densonucleose):

a. Flacidez infecciosa: é altamente contagiosa e encontrada em todos os locais do mundo de criação do bicho-da-seda. O agente causador é o vírus *Morator*, o qual é altamente patogênico e resistente às condições ambientais, podendo permanecer no solo por vários anos. A infecção ocorre via oral e o vírus se multiplica no intestino médio. O corpo da lagarta torna-se transparente por estiramento dos anéis segmentares, apresentando inapetência, inatividade, vômitos e diarreia

b. Densonucleose: é uma doença causada por um vírus do gênero *Densovirus* e a infecção ocorre geralmente via oral, multiplicando-se no núcleo das células colunares do intestino. Os sintomas apresentados são o retardo no crescimento, flacidez e o canal alimentar apresenta-se amarelado e sem conteúdo.

c. Poliedrose citoplasmática: principal doença viral que ocorre durante o outono, sendo causada pelo vírus *Smithia*, que forma cristais poliédricos hexagonais ou tetragonais, como meio de proteção. A infecção ocorre via oral e as lagartas infectadas eliminam cristais contendo os vírus. Quando a lagarta ingere os cristais poliédricos, juntamente com as folhas de amoreira, o suco digestivo alcalino os solubiliza, liberando o material genético dos vírus, que se multiplicam nas células do intestino médio e formam novos cristais poliédricos. Os sintomas se assemelham à flacidez, apresentando inapetência, menor desenvolvimento; além de diarreia e vômito o intestino médio torna-se esbranquiçado.

d. Poliedrose nuclear: é uma das doenças virais mais sérias nos países tropicais e ocorrem durante todo o ano. É causada por vírus da família *Baculoviridae*, os quais se multiplicam e formam poliedros hexagonais no núcleo das células epiteliais da traqueia, nas células do tecido adiposo e nas células dérmicas. A infecção pode ser através da pele ou via oral, onde o vírus atravessa a parede intestinal e chega à cavidade do corpo do inseto, invadindo as células dos tecidos susceptíveis. Os sintomas causados por esta doença incluem inapetência, perda da tensão da pele e intumescimento da membrana inter-segmental; a pele

mostra-se bastante frágil e de cor branca-marelada. As lagartas caminham soltando um líquido leitoso semelhante ao pus, não mudam de pele e não encasulam e normalmente morrem entre quatro a sete dias.

Os baculovírus são taxonomicamente divididos em dois gêneros, os *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e os *Granulovirus* (GV). Os NPV são constituídos de uma molécula fita dupla circular de DNA que se associa a proteínas do capsídeo, formando os nucleocapsídeos, que podem ser únicos dentro de um envelope viral, determinando o grupo *single* (SNPV), ou múltiplos, estabelecendo o grupo *multiple* (MNPV). Estes vírus são espécie-específicas, e o baculovírus conhecido que infecta o bicho-da-seda é denominado BmNPV cujo genoma tem a capacidade de codificação de mais de 100 diferentes genes, totalmente sequenciados (Gomi et al., 1999).

No Brasil, a primeira observação notificada da presença de NPV em culturas no campo de híbridos do bicho-da-seda foi em São Paulo (Gatti et al., 1976). No Paraná, a primeira descrição foi realizada por Brancalhão (2002). Entretanto, estudos de bioensaio e de análises em microscopia eletrônica determinaram que o baculovírus encontrado em criações no campo de nosso Estado é extremamente virulento e morfologicamente pode ser considerado pertencente ao grupo *multiple*, pois apresenta envelopes com um ou mais nucleocapsídeos, sendo então denominado de BmMNPV. Em todo o mundo são conhecidas dezenas de linhagens do NPV, entretanto a característica *multiple* nunca foi relatada (Kamita et al., 2005), o que torna o isolado geográfico paranaense desse baculovírus um organismo único. No Estado que representa quase 90% da produção do Brasil de casulos verdes, o conhecimento do produto de expressão de genes que permitam a resistência de híbridos de *B. mori* ao BmMNPV é um objetivo a ser alcançado pelas empresas sericícolas. Um híbrido com essas características e que apresente casulos com alto teor de seda líquida será de alto valor comercial.

Este grupo de pesquisa iniciou projeto nesta área realizando o bioensaio de infecção das 16 matrizes do acervo UEM, análise essa acompanhada de detecção de marcadores moleculares associados ao caráter de resistência e/ou sensibilidade ao BmMNPV. Os resultados apontaram a matriz chinesa C24-A como a mais

resistente, com somente 20% de lagartas mortas no quinto dia após infecção e a japonesa M-11A como a mais sensível, com mais de 90% de lagartas mortas no mesmo período, sendo que polimorfismo genético associado à resistência e/ou sensibilidade à infecção pelo BmMNPV foi detectado (Ribeiro et al., 2009).

2.4. Importância econômica

A atividade da sericicultura é muito antiga e abrange desde o cultivo da amoreira até a criação do bicho-da-seda, sendo a seda extraída a partir dos casulos.

De acordo com vários relatos, a China foi a primeira civilização a utilizar a seda e os primeiros dados encontram-se nas escritas de Confúcio, que falam sobre a criação doméstica do bicho-da-seda nos palácios da imperatriz Siling-Chi, esposa do imperador Hoang-Ti, no século XVIII a.C. (Álvarez e López, 2003). Estes relatos mostram que os chineses já controlavam o ciclo do bicho-da-seda, alimentavam-os com folhas de amoreira e matavam os adultos antes dos ovos eclodirem, além de se conhecerem as técnicas do bobinamento dos filamentos, tecendo-os em fios resistentes que, posteriormente, eram usados para a confecção de tecidos. No entanto, por meio de análises de microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de fibras arqueológicas encontradas em ornamentos de ligas de cobre em Harappa e em esferas de esteatite em Chanhu-daro, dois locais hindus importantes, encontraram fios de seda datando de 2450-2000 a.C. (Good et al., 2009), o que coloca em questão a noção histórica tradicional da sericicultura como sendo uma invenção exclusivamente chinesa.

Desde a antiguidade, a sericicultura tem sido um meio de subsistência para muitos trabalhadores, seja no campo ou na cidade, tornando-se um importante fator para a globalização, por aproximadamente 2000 anos, durante a chamada “Era da Rota da Seda” (Kurin, 2002). A Rota da Seda (Figura 2) era uma série de rotas interconectadas através da Ásia do Sul, usadas no comércio da seda entre o Oriente e a Europa. As rotas eram transpostas por caravanas e embarcações oceânicas que ligavam comercialmente o Extremo Oriente e a Europa e, provavelmente, foram estabelecidas a partir do VIII milênio a.C. Os antigos povos do Saara possuíam

animais domésticos provenientes da Ásia e foram fundamentais para as trocas comerciais entre estes continentes até à descoberta do caminho marítimo para a Índia. Essas conectavam Chang'an (atual Xi'an), na China, até Antioquia, na Ásia Menor, assim como a outros locais. A influência dessas rotas expandiu-se até a Coreia e o Japão. A maior rede comercial do Mundo Antigo foi assim formada. Estas rotas não só foram significativas para o desenvolvimento e florescimento de grandes civilizações, como o Egito Antigo, a Mesopotâmia, a China, a Pérsia, a Índia e até Roma, mas também ajudaram a fundamentar o início do mundo moderno. “Rota da seda” é uma tradução do alemão *Seidenstraße*, sendo a primeira denominação do caminho feita pelo geógrafo alemão Ferdinand von Richthofen, no século XIX (Eliseeff, 1998).



Figura 2 - Rota da seda.
Fonte: <http://em.wikipedia.org>

Atualmente, a sericicultura é a principal fonte econômica para mais de 30 milhões de famílias em países como a China, Índia, Vietnã e Tailândia, e não é diferente para Brasil, uma vez que esta atividade contribui para o desenvolvimento sustentável do país, por meio da inclusão social, ao proporcionar trabalho no campo, com a criação do bicho-da-seda e o cultivo da amoreira, e na cidade, com a indústria de fiação e o comércio. Portanto, a atividade da sericicultura proporciona importantes aspectos sócio-econômicos: é uma cultura alternativa, gera produto de

exportação, fixa o homem no campo, apresenta pouca dependência climática, tem pequeno custo de produção, além da racionalização da mão-de-obra.

Há oito espécies criadas para a produção do fio de seda, sendo a mais importante a *B. mori*, que responde por mais de 95% da seda produzida em todo o mundo. As outras sete espécies pertencem à família Saturniidae: *Antheraea pernyi* Guerin, *A. millita* Drury, *A. yamamai* Guerin, *A. assama* Helfer, *Atacus ricini* Boisduval, *Philosamia ricini* Drury e *Eryogima pyretorum* Wood (Goldsmith et al., 2002).

No Brasil, a seda foi introduzida no século XIX, durante o reinado de D. Pedro I, no Estado do Rio de Janeiro, no município de Itaguaí, onde foi instalada a primeira indústria de seda nacional, a Companhia Imperial Seropédica Fluminense. Posteriormente, a atividade se desenvolveu em Minas Gerais, com a instalação da primeira Estação Experimental de Sericicultura, no município de Barbacena, em 1912. Em 1921, a atividade recebeu estímulo para se instalar em São Paulo, com a criação da S/A Indústria de Seda Nacional, em Campinas. Em 1940, foi fundada em Bastos (SP), por imigrantes japoneses, a Sociedade Colonizadora do Brasil, *Brajiru Takushoku Kumiai*, da qual se originou a Fiação de Seda BRATAC S.A., hoje a maior indústria de fiação de seda que atua no Brasil.

Especificamente no Paraná, o bicho-da-seda aparece pela primeira vez em Cambará, em 1932. Na mesma cidade, em 1946, surgiu a primeira fábrica paranaense. No final da década de 60, com o incentivo de algumas indústrias paulistas, iniciou-se na região do Norte Pioneiro, no município de Ibaiti e em outros municípios vizinhos, a criação do bicho-da-seda em escala comercial. Em 1972, instalava-se no Paraná, no município de Cornélio Procópio, a KANEBO SILK DO BRASIL – INDÚSTRIA DE SEDA. Em 1973 e em 1984, o sistema cooperativista do Paraná passou a participar da cadeia produtiva da seda, com a implantação de um Projeto da Cooperativa dos Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá Ltda (COCAMAR). A partir de 1970, a atividade começou a crescer no Estado. Na safra 1985/86, o Paraná tornou-se o maior produtor nacional de casulos verdes. Na safra 2003/2004, o Estado conta com 217 municípios produtores, 7.037 criadores, 8.135 barracões, em torno de 17.897 empregos no campo, 20.561 ha com amoreiras,

7.171.000 kg de casulos verdes e V.B.P. R\$ 39.586.348,00. Segundo a EMATER, na safra 2004/2005 foram produzidos no Paraná 6.405 toneladas de casulos verdes, gerando um valor bruto de R\$ 39.122.270,00.

A região de Maringá é composta por 21 municípios produtores, com 1.223 criadores, 1.674 barracões, 3.614 empregos no campo, 5.204,83 ha com amoreiras, 1.948.809,9 kg de casulos verdes e um V.B.P. de R\$ 10.757.429,00/ano, representando 27% da produção do Estado. O município de Nova Esperança é o maior produtor de casulos verdes do Brasil e do Estado do Paraná, com 654 criadores, 899 barracões, 1.977 empregos no campo, 3.172 ha de amoreira, 1.211.420 kg de casulos verdes com V.B.P. R\$ 6.687.040,60.

Na sericicultura, é de grande valor comercial a obtenção de híbridos que apresentem um alto rendimento de casulos por grama de ovo, resistência ao cultivo no campo, qualidade do fio de seda e tamanho e formato adequado do casulo. As raças japonesas apresentam alto teor de seda no casulo, e as raças chinesas apresentam uma maior resistência ao cultivo no campo. Desta forma, para obtenção do híbrido procura-se misturar as características genéticas das raças japonesas e chinesas puras. As raças puras são resultantes do cruzamento de raças de mesma origem entre si, de modo a obter uma raça pura japonesa e outra raça pura chinesa. O cruzamento entre elas resulta no bicho-da-seda híbrido (Fernandez et al., 2002).

“A seda é a Rainha das Fibras, ao mesmo tempo em que brilha nos mais requintados salões do mundo, está garantindo a sobrevivência de pequenos produtores nos países em desenvolvimento” (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Seda>).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Inoculação pelo BmMNPV

As lagartas no 3º instar foram gentilmente cedidas pela empresa Bratac e alimentadas três vezes por dia com folhas frescas de amoreira, sob condições ambientais controladas (temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de $75\pm 2\%$ e luz branca com fotoperíodo de 16h claro : 8h escuro). Quando as lagartas atingiram o 5º instar, 20 espécimes foram deixadas em jejum por 24h para serem inoculadas com o vírus BmMNPV.

Para o tratamento, discos foliares de amoreira de 2 cm² de diâmetro foram utilizados para colocar 2×10^6 COPs (corpos de oclusão poliédricos)/mL e cada uma das 20 lagartas recebeu um disco. Durante a alimentação, as lagartas foram confinadas individualmente, sob copos descartáveis, até consumirem todo o disco foliar, assegurando assim, a ingestão de toda a suspensão viral. Terminada a alimentação dos discos foliares, as lagartas foram colocadas em caixas de papelão e transferidas para sala climatizada, onde permaneceram até o momento do experimento e receberam folhas de amoreira isentas do vírus.

As lagartas após 24, 48, 72 e 96h da inoculação foram anestesiadas sob refrigeração e os túbulos de Malpighi (TM) foram rapidamente dissecados e armazenados em RNAlater[®] (Qiagen), que estabiliza o RNA, a -80° C.

3.2. Metodologia ORESTES

A metodologia ORESTES utilizada para se obter sequências diferencialmente expressas, conforme descrita por Dias Neto (1999), foi realizada por meio de RT-PCR, com *primers* escolhidos aleatoriamente, que resultam na amplificação preferencial da porção central do transcrito. O processo para se obter as sequências pode ser resumido nas seguintes etapas ilustradas na figura 3.

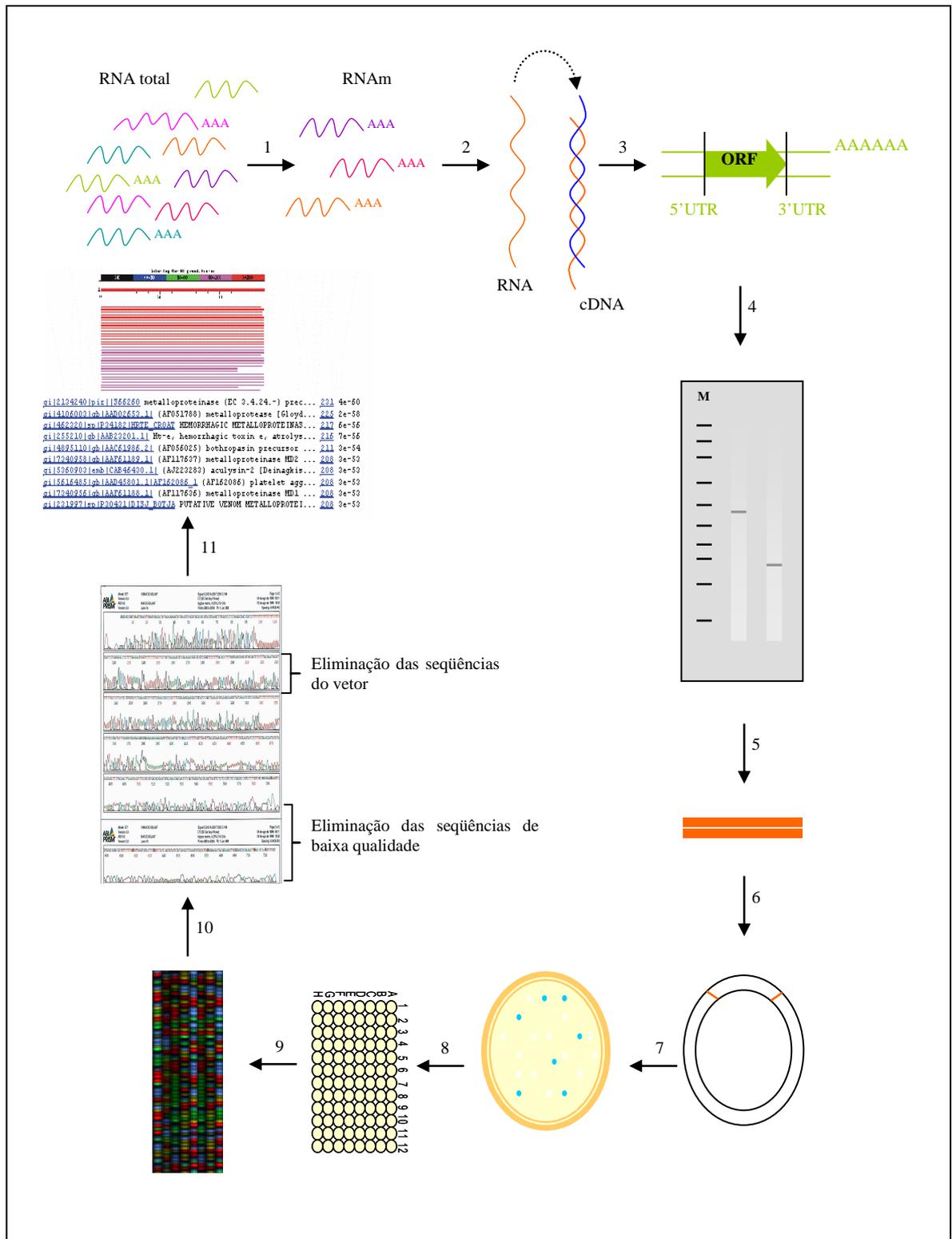


Figura 3 - Metodologia ORESTES. 1: purificação de RNAm; 2: síntese de cDNA; 3: amplificação com *primers* aleatórios (PCR *Touchdown*); 4: validação do perfil ORESTES; 5: isolamento dos perfis válidos; 6: ligação em vetor de clonagem; 7: transformação por choque térmico; 8: crescimento em meio de cultura; 9: sequenciamento; 10: análises de seqüências; 11: comparação das seqüências em bancos de dados.

3.2.1. Extração de RNA total e purificação de RNAm

Todas as amostras de túbulos de Malpighi inoculadas com o vírus BmMNPV (TM/I) foram descongeladas em gelo e centrifugadas a 10.540 rpm, por cinco minutos, a 4° C, para que fosse retirado o RNAlater[®]. Após esta etapa, as amostras de TM/I de lagartas sacrificadas 24 e 48 após inoculação (24+48 hpi), foram misturadas para a extração de RNAm, utilizando-se o kit Oligotex[®] (Qiagen), conforme instruções do fabricante. As amostras de TM/I 72 e 96 após inoculação (72+96 hpi) também foram misturadas e o RNA total foi extraído com o reagente TRIZol (Invitrogen), para posterior purificação do RNAm.

A amostra de RNA total extraída com o reagente TRIZOL foi ressuspensa em água ultrapura tratada com DEPEC (dietil pirocarbonato), a fim de evitar a degradação do RNA. Posteriormente à extração, a amostra foi verificada em gel de agarose desnaturante com formaldeído a 1%, quantificada em espectrofotômetro e tratada com DNase I RNase *free* (Biolabs).

Para certificar-se a descontaminação de DNA, as amostras tratadas com DNase I [2U/10µg] (TM/I 72+96 hpi) foram submetidas a PCR, utilizando-se *primers* para o gene constitutivo da actina (E1F: 5' AAGGTGTGCTCGAACAGTG3' e E2R: 5' ACTACCAACGCGGCAACTTC3'). Após a certificação de que a amostra de RNA total estava livre de DNA contaminante, os RNAm's foram purificados utilizando-se o kit Oligotex II (Qiagen) e mantidos a -80° C.

3.2.2. Síntese de cDNA e obtenção de perfis ORESTES

Os mRNAs purificados foram submetidos à transcrição reversa, utilizando-se a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e um conjunto de *primers* selecionados aleatoriamente (Quadro 1). A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a 37° C, por 50 minutos, em um volume total de 20 µL.

Quadro 1 - *Primers* utilizados para a síntese de cDNA

RNA _m	Primers [2 µm]	Seqüência
TM/I 24+48 hpi	HAMPD2F	5' TGCCCAGCGTTTCTCAGTGC 3'
	Primer 2	5' CCCCATCTAAGTACTAACCCGC 3'
TM/I 72+96 hpi	Arg1F	5' CTCAGCTGCAGGAACCCTGG 3'

Os cDNA's foram diluídos 1:5 em água ultrapura e amplificados por PCR *Touchdown*, PCR-TD, (Don et al., 1991). Cada 15 µL de reação consistiu em 1 µL de cDNA, 333 µM de cada dNTP, 1,66 mM de MgCl₂, tampão 1x, 83,33 nM do *primer* e 0,2 U de *Taq* polimerase (Invitrogen).

Um único *primer* aleatório foi utilizado (Quadro 2), como previamente descrito por Nunes et al. (2004). O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de 75° C, por cinco minutos, seguida por 45 ciclos em séries *touchdown* (95° C, por 30 segundos, decréscimo gradual de temperatura de anelamento de 66 a 44° C, permanecendo dez segundos por etapa, e um decréscimo de 2° C por etapa, 72° C, por um minuto), e uma extensão final de 72° C, por 30 minutos.

Quadro 2 - *Primers* utilizados para a PCR-TD

cDNA	Primers	Seqüência
TM/I 24+48	BA3F1	5' AGATGACCCAGATCATGTTTCG 3'
hpi	GOFGF	5' TCACTGAGTACGCGATCGTCGAAGCCACACTAGG 3'
TM/I 72+96	BrI	5' AGCCGCAGGACGAATCCA 3'
hpi		

Os produtos de PCR (perfis) foram verificados em gel de agarose a 1% (Figura 4A e 4B) corado com brometo de etídeo [1 mg/mL]. Com a validação dos perfis (aqueles que apresentaram um rastro), foram realizadas mais dez reações de PCR-TD dos cDNA's com os *primers* para obter mais quantidade de DNA de cada perfil e, posteriormente, estas foram precipitadas com PEG (polietilenoglicol 8000) e concentradas em 10 µL de água ultrapura.

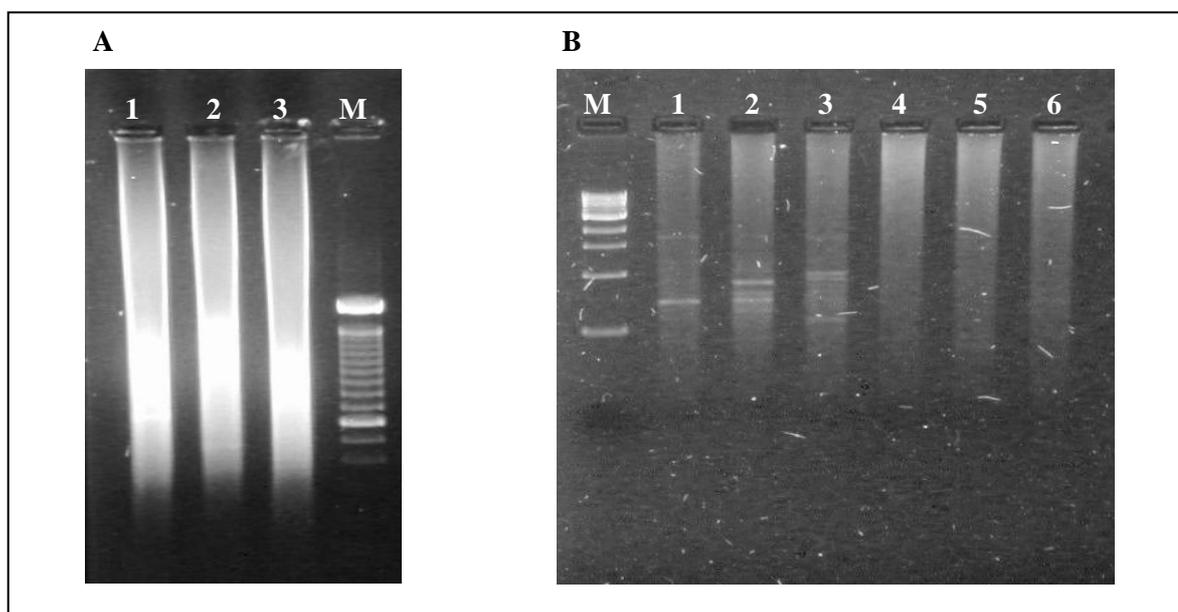


Figura 4 - A: 1 e 2: perfil 24+48 hpi; 3: perfil 72+96 hpi; M: marcador de tamanho molecular 2-log (Biolabs). B: M: marcador de tamanho molecular 1 kb (Biolabs); 1-3: perfis inválidos; 4-6: perfis válidos.

3.3. Bibliotecas de cDNA

Os perfis ORESTES concentrados foram clonados em vetor pDrive (Qiagen) ou pMosBlue (GE), a 4° C, por 16h, para transformação por choque térmico em 100 µL de células termo-competentes de *Escherichia coli* cepa DH5α. As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido, contendo ampicilina [100 µg/mL], Xgal [40 µg/mL] e IPTG [7 µg/mL]. As colônias positivas foram selecionadas e incubadas a 37°C em 150 µL de meio LB líquido com ampicilina [100 µg/mL], em placas de 96 poços, por 24h, sem agitação.

O meio de cultura foi diluído 1:5 em água ultrapura e serviu como controle da reação de PCR, sendo que cerca de 25% dos clones de cada placa foram verificados quanto à presença de inserto. Cada 15 µL de reação consistiu em 1 µL de meio de cultura, 125 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão 1x, 134,4 nM de cada *primer* (M13 *forward* e M13 *reverse*) e 0,2 U de *Taq* polimerase (Invitrogen). O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de 95° C

por três minutos, 35 ciclos de 95° C por 40 segundos, 55° C por 40 segundos e 72° C por 55 segundos, e uma extensão final de 72° C, por dez minutos. Uma alíquota de cada produto de amplificação foi analisada em gel de agarose a 1% (Figuras 5 e 6) corado com brometo de etídeo [1 mg/mL].

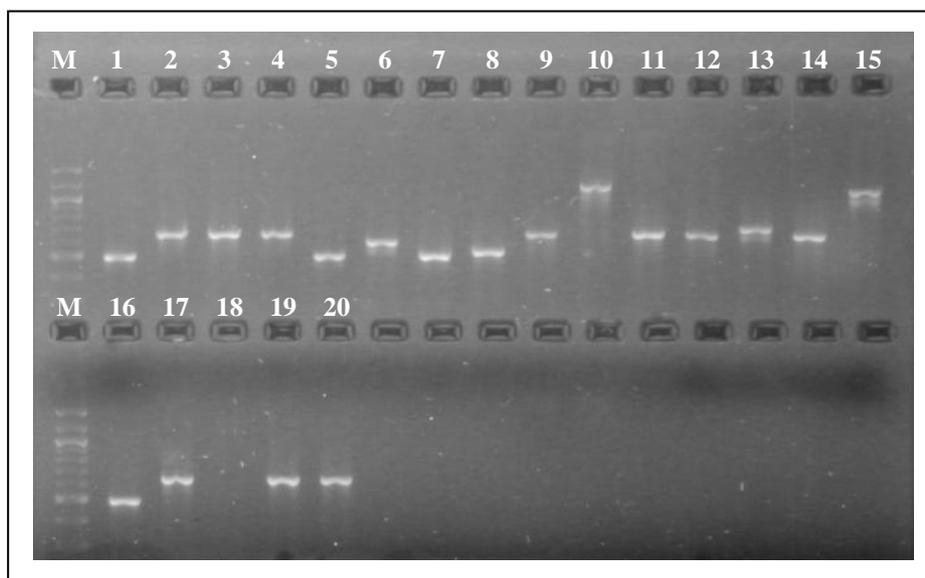


Figura 5 - M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Biolabs); 1-19: clones da Biblioteca TM/I 24+48 hpi.

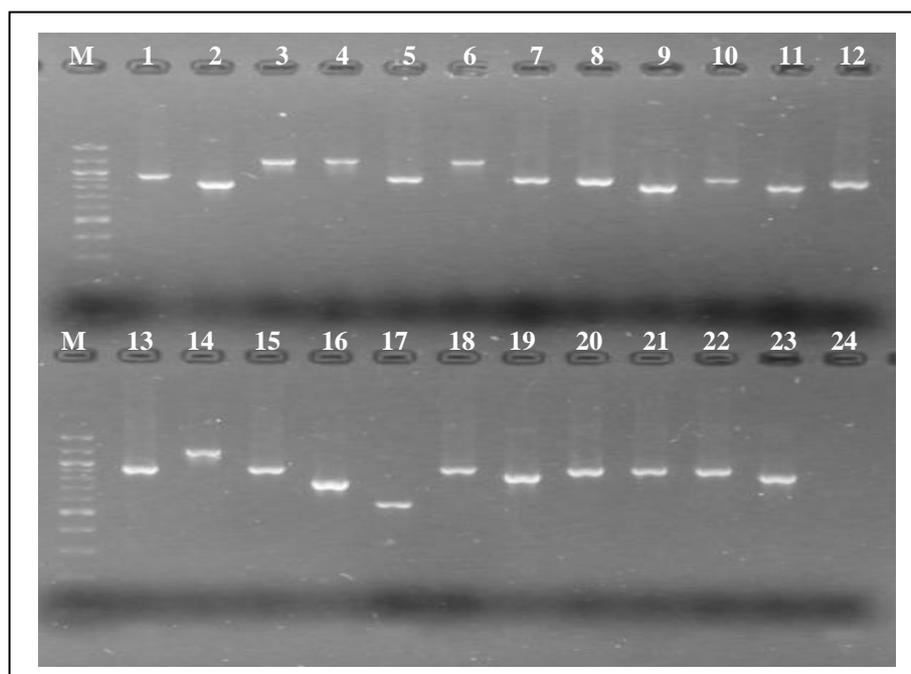


Figura 6 - M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Biolabs); 1-24: clones da Biblioteca TM/I 72+96 hpi.

Com a confirmação dos insertos, foi realizada o PCR para clones de cada biblioteca (em placas de 96 poços), que foram precipitados com PEG e ressuspendidos em 5 µL de água ultrapura. A partir destas amostras foram realizadas as reações de sequenciamento utilizando-se o kit DYEnamic™ ET Terminator (Amersham Biosciences) e *primer* dos vetores de clonagem (M13 *forward*), de acordo com Silva et al., 2001. Cada 10 µL de reação de sequenciamento consistiu em 5 µL do clone, 125 nM de *primer* e 4 µL de *premix* ET. E, o protocolo de amplificação foi realizado com uma etapa inicial de 95° C por 2 segundos, seguidos de 35 ciclos de 95° C por 10 segundos, 50° C por 15 segundos, e uma extensão final de 60° C por 1 minuto.

Feito as reações de sequenciamento, estas foram precipitadas de acordo com o seguinte protocolo: 2 µL de acetato de amônio gelado (7,5 M + EDTA 60 mM), 50 µL de etanol absoluto, agitar e deixar em gelo por 20 minutos, Cce centrifugar a 3100 g por 30 minutos, desprezar o sobrenadante e centrifugar rapidamente (\pm 30 seg), acrescentar 200 µL de etanol 70%, centrifugar a 3100g por 30 minutos, desprezar o sobrenadante e centrifugar rapidamente (\pm 30 seg), ressuspender em 10 µL de formamida.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador MegaBace 1000 e na análise foram consideradas sequências com mais de 100 bases com qualidade Phred maior ou igual a 15.

3.4. Análise de sequências

Os dados brutos obtidos do sequenciamento foram analisados por pesquisadores do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

As sequências foram submetidas ao mesmo protocolo automático de análise de dados (*Pipeline* de Anotação Gênica) utilizado para *Apis mellifera* (Nunes et al., 2004). Este protocolo consistiu em detectar as sequências de vetores e *primers* e mascarar repetições. As sequências validadas foram submetidas em pesquisa

BLASTN (Altschul et al., 1997) no banco de dados do GenBank para sequências mitocondriais e do vírus NPV, a fim de eliminar sequências contaminantes. Outras pesquisas em BLASTN foram realizadas no banco de dados de EST's de *B. mori* depositados no dbEST GenBank, bem como no banco de dados de cDNA de *B. mori* (Silk Base). As sequências também foram comparadas com o banco de dados de proteínas não redundantes, utilizando-se a opção BLASTX.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise das sequências em BLASTN e BLASTX

Cinco bibliotecas de cDNA de túbulos de Malpighi de lagartas inoculadas com o vírus BmMNPV foram geradas da amostra TM/I 24+48 hpi e da amostra TM/I 72+96 hpi, sendo 414 clones sequenciados, dos quais foram possíveis obter 168 sequências válidas (sequências > 100 bases e Phred 15), e com um tamanho médio de 553,9 pb, para RNAm, para proteínas não redundantes (NRP), para EST's de *B. mori* (Bmo EST's) e de *no match* (Figura 7). Sequências para o genoma mitocondrial ou para o genoma do vírus NPV não foram encontradas, o que mostra que o material utilizado para a obtenção das bibliotecas estava isento de contaminação de DNA genômico e mitocondrial e RNA viral.

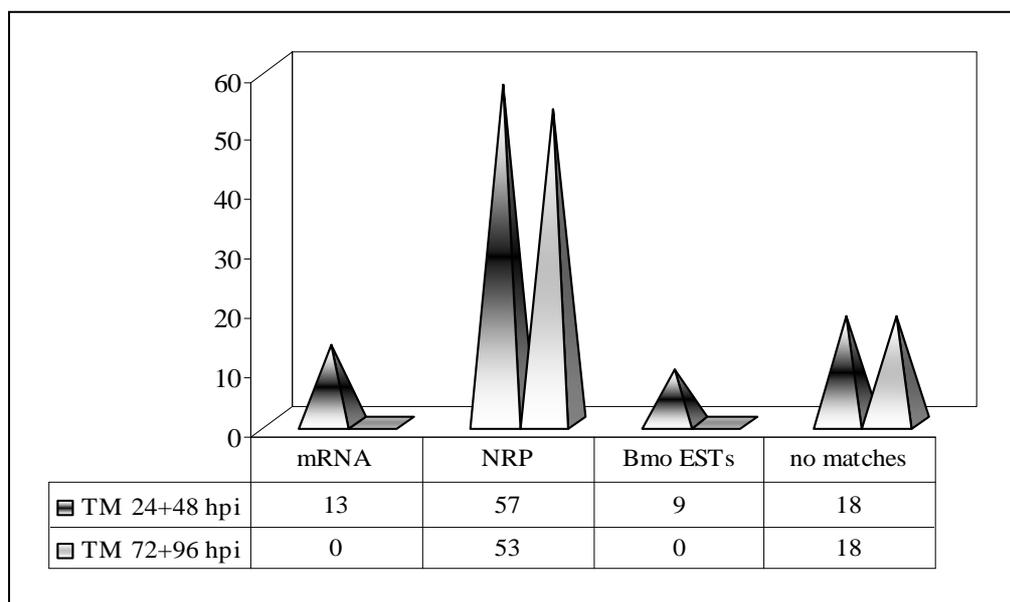


Figura 7 - Anotações válidas obtidas a partir das bibliotecas de cDNA de TM/I 24+48 hpi e TM/I 72+96 hpi.

As sequências foram primeiramente submetidas em pesquisas BLASTN, por meio do *pipeline* de bioinformática, comparando-as com sequências de *B. mori* depositadas no banco de dados do NCBI-EST (dbEST), encontrando-se 5,36% (9) delas em EST's de *B. mori*. Em uma etapa posterior, uma comparação em BLASTX

das sequências ORESTES com o banco de dados de proteínas, nr-NCBI, permitiu a anotação de 65,48% (110) delas. No entanto, serão necessárias mais sequências para que se possa realizar uma análise de melhor qualidade. Outras 21,43% (36) das sequências não apresentaram similaridade com outras conhecidas, as quais podem ser candidatas a novos genes expressos em túbulo de Malpighi no bicho-da-seda.

4.2. Análise de sequências de RNAm em banco de dados de cDNA

Treze (7,74%) sequências para RNAm's foram obtidas apenas em TM/I 24+48 hpi (Quadro 3) quando foram comparadas com o banco de dados de cDNA de *B. mori* (Silk Base).

Quadro 3 - Sequências obtidas no banco de dados de RNAm de *B. mori*

Sequências da biblioteca de cDNA	Descrição	valor E	Score	Identidade
LORF-TM2448-010709-003-G03	Óxido nítrico sintetase	4e ⁻³⁰	65	93%
LORF-TM2448-010709-003-A10	Inibidor de quimotripsina CI-b1	e ⁻¹¹³	204	97%
LORF-TM2448-010709-003-A03	Isoforma 1 de nucleoplasmina	e ⁻¹⁰⁹	197	99%
LORF-TM2448-010709-003-A09	Isoforma 1 de nucleoplasmina	e ⁻¹⁰⁶	193	99%
LORF-TM2448-010709-003-F08	Proteína quinase, PKG-Ia	e ⁻¹⁰⁶	193	92%
LORF-TM2448-010709-003-C06	Subunidade e de ATP sintase	3e ⁻⁶⁷	127	100%
LORF-TM2448-010709-003-C04	Isoforma 1 de nucleoplasmina	e ⁻¹⁰⁶	193	99%
LORF-TM2448-010709-003-G04	Subunidade e de ATP sintase	4e ⁻⁶⁷	127	100%
LORF-TM2448-010709-003-D09	Óxido nítrico sintetase	4e ⁻³⁰	65	93%
LORF-TM2448-010709-003-A06	Isoforma 1 de nucleoplasmina	e ⁻¹⁰⁹	197	99%
LORF-TM2448-010709-003-E07	Isoforma 1 de nucleoplasmina	e ⁻¹⁰⁴	189	98%
LORF-TM2448-010709-003-E09	Isoforma 1 de nucleoplasmina	e ⁻¹⁰⁶	193	99%
LORF-TM2448-010709-003-E10	Inibidor de quimotripsina CI-b1	e ⁻¹²⁷	228	99%

Dentre as sequências de RNAm's encontradas, destaca-se a codificante de óxido nítrico sintetase (NOS), enzima responsável pela síntese de óxido nítrico, que está envolvido na resposta humoral em mamíferos, e de L-citrulina, a partir do aminoácido L-arginina. Esta enzima foi detectada no corpo gorduroso e em túbulos de Malpighi de *B. mori* (Choi et al., 1995). Dois tipos de NOS (uma independente de Ca⁺² e constitutiva de calmodulina, e a outra, dependente e constitutiva de Ca⁺²) foram identificadas e suas atividades no túbulo de Malpighi aumentam drasticamente durante o último instar larval. Também é descrita em lagartas de *B. mori* a expressão em baixo nível do gene NOS no corpo gorduroso, hemócitos, túbulos de Malpighi, intestino médio e antena de adulto; sendo altamente expresso

no corpo gorduroso sob estimulação por lipo-polissacarídeo (LPS), o que sugere que o gene NOS apresenta distintas funções fisiológicas em diferentes tecidos (Imamura et al., 2002).

Com relação à resposta imune em insetos, ainda não está elucidada a relação entre os mecanismos de imunidade e a produção de óxido nítrico nos tecidos. Alguns genes NOS de *Drosophila melanogaster* (Regulski, et al., 1995), *Anopheles stephensis* (Luckhart, et al., 1998), *Rodnius prolixus* (Yuda, et al., 1996) e *Manduca sexta* (Nighorn, et al., 1998) foram clonados. Também é descrita a atividade de NOS no corpo gorduroso, túbulo de Malpighi, intestino e cérebro em *Chrysomia megacephala* (Faraldo et al., 2007).

Uma análise comparativa das sequências obtidas de RNAm também foi realizada no banco de dados UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o qual permite a comparação da sequência transcrita com outras que parecem ter o mesmo local de transcrição (gene ou pseudogene expresso), assim como informações de similaridades com proteínas, expressão gênica, clones de cDNA e localização genômica (Wheeler et al., 2003). No Quadro 4, é apresentada a comparação da sequência de óxido nítrico sintetase obtida das bibliotecas de cDNA's TM/I 24+48 hpi com outras espécies.

Quadro 4 - Similaridades de sequências de óxido nítrico sintetase obtida das bibliotecas de cDNA das amostras TM/I 24+48 hpi com o banco de dados UniGene

Sequência da biblioteca de cDNA	Proteína de referência	Espécie	Identidade
	Óxido nítrico sintetase	<i>Bombyx mori</i>	100%
LORF-TM2448-010709-003-G03	Óxido nítrico sintetase, Isoforma A	<i>D. melanogaster</i>	59,9%
	Óxido nítrico sintetase neuronal 1	<i>Xenopus laevis</i>	49,1%
	Óxido nítrico sintetase, Isoforma 1	<i>Homo sapiens</i>	48,8%
	Óxido nítrico sintetase 3	<i>Mus musculus</i>	47,7%

Outra proteína em destaque que foi encontrada em maior número de clones é a nucleoplasmina, conhecida como uma proteína remodeladora da cromatina. Gillespie e Blow (2000) descreveram-na como sendo uma proteína necessária para a reativação de origens de replicação em espermatozóide de *Xenopus*. A nucleoplasmina remove as protaminas presente na cromatina, descondensando-a, e

permite que o complexo de origem de replicação de *Xenopus* (XORC) se ligue à origem e inicie a replicação.

Também foi realizada uma análise comparativa da sequência obtida das bibliotecas de cDNA das amostras TM/I 24+48 hpi desta proteína no banco de dados UniGene (Quadro 5).

Quadro 5: Similaridades de sequências de nucleoplasmina obtidas das bibliotecas de cDNA das amostras TM/I 24+48 hpi com o banco de dados UniGene

Sequência da biblioteca de cDNA	Proteína de referência	Espécie	Identidade
LORF-TM2448-010709-003-A09	Nucleoplasmina	<i>Bombyx mori</i> <i>D. melanogaster</i>	100% 47,4%

4.3. Análise de sequências de EST's de *Bombyx mori*

Nove (5,36%) sequências para EST's de *B. mori* foram obtidas apenas em TM/I 24+48 hpi (Quadro 6), quando comparadas no banco de dados de EST de *B.mori* do NCBI-EST (dbEST).

Quadro 6 - Sequências obtidas no banco de dados de EST's de *B. mori*

Sequência da biblioteca de cDNA	Tecido	Estágio de desenvolvimento	valor E	Score	Identidade
LORF-TM2448-010709-003-D05	Embrião	100 h pós fertilização	$4e^{-75}$	142	95%
LORF-TM2448-010709-003-E11	Células foliculares	Estágio pupal – 8º dia	0	426	98%
LORF-TM2448-010709-003-D07	Glândula da seda	3º dia do 5º instar larval	$1e^{-18}$	48	98%
LORF-TM2448-010709-003-F05	Corpo gorduroso	3º dia do 5º instar larval	0	425	98%
LORF-TM2448-010709-003-E03	Glândula da seda	3º dia do 5º instar larval	$1e^{-18}$	48	98%
LORF-TM2448-010709-003-B06	Células foliculares	Estágio pupal – 8º dia	0	415	99%
LORF-TM2448-010709-003-A01	Glândula da seda	3º dia do 5º instar larval	$1e^{-18}$	48	98%
LORF-TM2448-010709-003-B05	Glândula da seda	3º dia do 5º instar larval	$1e^{-18}$	48	98%
LORF-TM2448-010709-003-A12	Embrião	100 h pós fertilização	$3e^{-73}$	139	95%

Também foram realizadas análises comparativas das sequências obtidas das bibliotecas de cDNA das amostras TM/I 24+48 hpi no UniGene com sequências de outros organismos (Quadro 7).

Quadro 7 - Similaridades de sequências obtidas das bibliotecas de cDNA das amostras TM/I 24+48 hpi no UniGene

Biblioteca	Proteína de referência	Espécie	Identidade
LORF-TM2448-010709-003-D05	Glutamil-tRNA sintetase	<i>Aedes aegypti</i>	70,1%
	Glutamil-tRNA sintetase	<i>D. melanogaster</i>	67,8%
	Proteína hipotética LOC379670	<i>Xenopus laevis</i>	62,7%
	Glutamil-tRNA sintetase	<i>Homo sapiens</i>	61,5%
	Glutamil-tRNA sintetase	<i>Mus musculus</i>	59,8%
LORF-TM2448-010709-003-E11	Similar a CG1598-PA predita	<i>Apis mellifera</i>	88,5%
	Transportador arsenite arsA	<i>Xenopus laevis</i>	76,7%
	Proteína hipotética	<i>Neurospora crassa</i>	60,6%
	Transportador de ânion ATPase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	60,3%
LORF-TM2448-010709-003-F05	Proteína predita	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	57,8%
	Precursor de lipo-proteína CG1240	<i>Bombyx mori</i>	80,3%
		<i>D. melanogaster</i>	62,2%

5. CONCLUSÕES

Por meio da metodologia ORESTES, foi possível produzir bibliotecas de cDNA para análise do transcriptoma de túbulo de Malpighi de *Bombyx mori* diante à inoculação do vírus BmMNPV. O número de sequências diferencialmente expressas foi relativamente pequeno, porém, demonstra que a metodologia utilizada é eficiente em relação às outras metodologias de se obter EST's a partir de bibliotecas de cDNA normalizadas.

As informações obtidas permitirão contribuir para a anotação genômica deste lepidóptero, compreensão do perfil de expressão no órgão excretor diante à infecção, bem como efetuar comparações entre transcriptomas de outros lepidópteros e desenvolver estudos comparativos entre os genomas de lepidópteros e outros insetos. Há possibilidade da aplicação econômica, futuramente, destas descobertas na elaboração de inseticidas eficientes e/ou no controle biológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C.R.; STOCO, P.H.; WAGNER, G.; SINCERO, T.C.M.; ROTAVA, G.; BAYER-SANTOS, E.; RODRIGUES, J.B.; SPERANDIO, M.M.; MAIA, A.A.M.; OJOPI, E.P.B.; ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; TYLER, K.M.; DAVILA, A.M.R.; GRISARD, E.C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of *Taenia solium* cysticerci using Open Reading Frame ESTs (ORESTES). **Parasites & Vectors**, 2:35, 2009.

ALTMAN, G.H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R.L.; CHEN, J.; LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, 24:401-416, 2003.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25:3389-33402, 1997.

ÁLVAREZ, F.A.; LÓPEZ, A.E.C. Sericultura. In: **Zoologia aplicada**. Madri: Ediciones Díaz de Santos S.A., 2003. p. 231.

ARRESE, E.L.; CANOVOSO, L.E.; JOUNI, Z.E.; PENNINGTON, J.E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M.A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 31:7-17, 2001.

ARUGA, H. Silkworm and its Strains. In: **Principles of Sericulture**. CRC Press, 1994. p. 97-111.

ARUNKUMAR, K.P.; METTA, M.; NAGARAJU, J. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 40:419-427, 2006.

BAO, Y-Y.; TANG, X-D.; LV, Z-Y.; WANG, X-Y.; TIAN, C-H.; XU, Y.P.; ZHANG, C-X. Gene expression profiling of resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals nucleopolyhedrovirus-associated variations in host gene transcript levels. **Genomics**, 94:138-145, 2009.

BARBOSA, J.F.; BRAVO, J.P.; TAKEDA, K.I.; ZANATTA, D.B.; SILVA, J.L.C.; BALANI, V.A.; FIORINI, A.; FERNANDEZ, M.A. Intrinsic bent DNA colocalizes with the sequence involved in the *Nd-s^D* mutation in the *Bombyx mori* fibroin light chain gene. **BMB Rep.**, 41:394-399, 2008.

BAUD, L.; PASCAL, M. Comparative study of the formation of glycogen and trehalose during starvation in the Lepidoptera *Bombyx mori* L. **Ann. Nutr. Aliment.**, 31:323-329, 1977.

BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.1.

BRANCALHÃO, R.M.C.; TORQUATO, E.F.B.; DE CASTRO, M.E.B. Identificação de um isolado de *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus (BmMNPV) no Estado do Paraná, Brasil. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. 33, 2002.

BRANCALHÃO, R.M.C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 24:54-58, 2002.

BRANCALHÃO, R.M.C.; TORQUATO, E.F.; FERNANDEZ, M.A. Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple nucleopolyhedrovirus. **Genet. Mol. Res.**, 8:162-172, 2009.

BRENTANI, H. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100:13418-13423, 2003.

BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Nat. Genet.**, 21:33-37, 1999.

CHEN, J.; WU, X.F.; ZHANG, Y.Z. Expression, purification and characterization of human GM-SSF using silkworm pupae (*Bombyx mori*) as a bioreactor. **J. Biotechnol.**, 123:236-247, 2006.

CHENG, D-J.; XIA, Q-Y.; ZHAO, P.; WANG, Z-L.; XU, H-F.; LI, G-R.; LU, C.; XIANG, Z-H. EST-based profiling and comparison of gene expression in the silkworm fat body during metamorphosis. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 61:10-23, 2006.

CHENG, T.; XIA, Q.; QIAN, J.F.; LIU, C.; LIN, Y.; ZHA, X.; XIANG, Z. Mining single nucleotide polymorphisms from EST data of silkworm, *Bombyx mori*, inbred strain *Dazao*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 34:523-30, 2004.

CHENG, T.; ZHAO, P.; LIU, C.; XU, P.; GAO, Z.; XIA, Q.; XIANG, Z. Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. **Genomics**, 87:356-365, 2006.

CHOI, S.K.; CHOI, H.K.; KADONO-OKUDA, K.; TANJAI, K.; KATO, Y.; YAMAMOTO, M.; CHOWDHURY, S.; XU, J.; MIYANOSHITA, A.; DEBNATH, N.C.; ASAOKA, A.; YAMAKAWA, M. Occurrence of novel types of nitric oxide synthase in the silkworm, *Bombyx mori*. **Bioch. Biophys. Res. Comm.**, 207:452-459, 1995.

DIAS NETO, E.; CORREA, R.G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BRIONES, M.R.; NAGAI, M.A.; da SILVA, W.A. Jr.; ZAGO, M.A.; BORDIN, S.; COSTA, F.F.; GOLDMAN, G.H.; CARVALHO, A.F.; MATSUKUMA, A.; BAIA, G.S.; SIMPSON, D.H.; BRUNSTEIN, A.; OLIVEIRA, P.S.; BUCHER, P.; JONGENEEL, C.V.; O'HARE, M.J.; SOARES, F.; BRENTANI, R.R.; REIS, L.F.; de SOUZA, S.J.; SIMPSON, A.J. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97:3491-3496, 2000.

DIVINA, P.; FOREJT, J. The Mouse SAGE Site: database of public mouse SAGE libraries. **Nucleic Acids Res.**, 32:482-483, 2004.

DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Res.**, 19:4008, 1991.

FARALDO, A.C.; SÁ-NUNES, A.; FACCIOLI, L.H.; DEL BEL, E.A.; LELLO, E. Nitric oxide synthase activity in tissues of the blowfly *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). **Biocell**, 31:205-211, 2007.

FERNANDEZ, M.A.; CIFERRI, R.R.; PATUSSI, E.V.; PEREIRA, M.F.; FELIPES, J.; BRAVO, J.P.; ZANATTA, D.B.; GOUVEIA, F.S.; BALANI, V.A. A utilização da biotecnologia na sericultura brasileira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 35:52-57, 2002.

FUJII, H.; BANNO, Y.; DOIRA, H.; KIHARA, H.; KAWAGUCHI, Y. **Genetical stocks and mutations of *Bombyx mori*: important genetic resources**. 2^a ed. Fukuoka: Institute of Genetic Resources, 1998. 54 p.

GATTI, I.M.; SILVA, D. M.; MATYS, J. C.; NOGUEIRA, N. L.; OLIVEIRA, A. R. Constatação ao microscópio eletrônico de poliedroses em bicho da seda (*Bombyx mori* L.). In: **V Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica**. Piracicaba, 1976. p. 88-89.

GILLESPIE, P.J.; BLOW, J.J. Nucleoplasmin-mediated chromatin remodelling is required for *Xenopus* sperm nuclei to become licensed for DNA replication. **Nucleic Acids Res.**, 28:472-480, 2000.

GOLDSMITH, M.R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. **Annu. Rev. Entomol.**, 50:71-100, 2002.

GOMI, S.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, 80:1323-1337, 1999.

GOOD, I.L.; KENOYER, J.M.; MEADOW, R.H. New evidence for early silk in the indus civilization. **Archeometry**, 51:457-4666, 2009.

- HAMAMOTO, H.; TONOIKE, A.; NARUSHIMA, K.; HORIE, R.; SEKIMIZU, K. Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism. **Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.**, 149:334-339, 2008.
- HECKEL, D.G. Genomics in pure and applied entomology. **Annu. Rev. Entomol.**, 48:235-260, 2003.
- HOFMANN, S.; FOO, C.T.; ROSSETTI, F.; TEXTOR, M.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L.; MERKLE, H.P.; MEINEL, L. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. **J. Control. Release**, 111:219-227, 2006.
- HONG, S-M.; NHO, S-K.; KIM, N-S.; LEE, J-S.; KANG, S-W. Gene expression profiling in the silkworm, *Bombyx mori*, during early embryonic development. **Zoolog. Sci.**, 23:517-528, 2006.
- HUANG, J.; MIAO, X.; JIN, W.; COUBLE, P.; ZHANG, Y.; LIU, W.; SHEN, Y.; ZHAO, G.; HUANG, Y. Radiation-induced changes in gene expression in the silkworm revealed by serial analysis of gene expression (SAGE). **Insect Mol. Biol.**, 14:665-674, 2005.
- IMAMURA, M.; YANG, J.; YAMAKAWA, M. cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Mol. Biol.**, 11:257-265, 2002.
- KAMITA, S. G.; NAGASAKA, K.; CHUA, J. W.; SHIMADA, T.; MITA, K.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, S.; HAMMOCK, B. D. A baculovirus-encoded protein tyrosine phosphatase gene induces enhanced locomotory activity in a lepidopteran host. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102:2584-2589, 2005.
- KANOST, M.R.; KAWOOYA, J.K.; LAW, J.H.; RYAN, R.O.; VAN HEUSDEN, M.C.; ZIEGLER, R. Insect haemolymph proteins. **Adv. Insect Physiol.**, 22:299-396, 1990.
- KISHIMOTO A, NAKATO H, IZUMI S, TOMINO S. Biosynthesis of major plasma proteins in the primary culture of fat body cells from the silkworm, *Bombyx mori*. **Cell Tissue Res.**, 297:329-335, 1999.
- KURIN, R. The Silk Road: Connecting Cultures, Creating Trust. **Smithsonian Institution**, 21:1-24, 2002.
- LEE, J.Y.; LEE, D.H. Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress. **Plant Physiol.**, 132:517-529, 2003.

LI, A.; ZHAO, Q.; TANG, S.; ZHANG, Z.; PAN, S.; SHEN, G. Molecular phylogeny of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on the sequences of mitochondrial cytochrome b genes. **J. Genet.**, 84:137-142, 2005.

LI, J-Y.; CHEN, X.; FAN, W.; MOGHADDAM, S.H.H.; CHEN, M.; ZHOU, Z-H.; YANG, H-J.; CHEN, J-E.; ZHONG, B-X. Proteomic and bioinformatic analysis on endocrine organs of domesticated silkworm, *Bombyx mori* L. for a comprehensive understanding of their roles and relations. **J. Proteome Res.**, 8:2620-2632, 2009.

LIU, F.; LING, E.; WU, S. Gene expression profiling during early response to injury and microbial challenges in the silkworm, *Bombyx mori*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 72:16-33, 2009.

LOCKYER, A.E.; SPINKS, J.N.; WALKER, A.J.; KANE, R.A.; NOBLE, L.R.; ROLLINSON, D.; DIAS-NETO, E.; JONES, C.S. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: identification of cell-signalling, transcriptional control and immune-related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES). **Dev. Comp. Immunol.**, 31:763-782, 2006.

LU, D.; DAI, F.; XIANG, Z-H. Studies on the mutant strains of the *Bombyx mori* gene bank. **Agricultural Sciences in China**, 116b:43-48, 2001.

LUCKHART, S.; VODOVOTZ, Y.; CUI, L.; ROSENBERG, R. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95:5700-5705, 1998.

MATSUMURA, H.; NIRASAWA, S.; TERAUCHI, R. Technical advance: transcript profiling in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE). **Plant J.**, 20:719-726, 1999.

MITA, K.; MORIMYO, M.; OKANO, K.; KOIKE, Y.; NOHATA, J.; KAWASAKI, H.; KADONO-OKUDA, K.; YAMAMOTO, K.; SUZUKI, M.G.; SHIMADA, T.; GOLDSMITH, M.R.; MAEDA, S. The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100:14121-14126, 2003.

MITA, K.; KASAHARA, M.; SASAKI, S.; NAGAYASU, Y.; YAMADA, T.; KANAMORI, H.; NAMIKI, N.; KITAGAWA, M.; YAMASHITA, H.; YASUKOSHI, Y.; KADONO-OKUDA, K.; YAMAMOTO, K.; AJIMURA, M.; RAVIKUMAR, G.; SHIMOMURA, M.; NAGAMURA, Y.; SHIN-I, T.; ABE, H.; SHIMADA, T.; MORISHITA, S.; SASAKI, T. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. **DNA Res.**, 11:24-35, 2004.

MOTA, A.F.; SONSTEGARD, T.S.; TASSEL, C.P.V.; SHADE, L.L.; MATUKUMALLI, L.K.; WOOD, D.L.; CAPUCO, A.V.; BRITO, M.A.P.; CONNOR, E.E.; MARTINEZ, M.L.; COUTINHO, L.L. Characterization of open

reading frame-expressed sequence tags generated from *Bos indicus* and *B. taurus* mammary gland cDNA libraries. **Animal Genetics**, 35:213-219, 2004.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. **Arch. Virol.**, 140, 1995.

NAGARAJU, J.; GOLDSMITH, M.R. Silkworm genomics - progress and prospects. **Current Science**, 83:411-425, 2002.

NIGHORN, A.; GIBSON, N.J.; RIVERS, D.M.; HILDEBRAND, J.G.; MORTON, D.B. The nitric oxide-cGMP pathway may mediate communication between sensory afferents and projection neurons in the antennal lobe of *Manduca sexta*. **J. Neurosci.**, 18:7244-7255, 1998.

NIWA, R.; MATSUDA, T.; YOSHIYAMA, T.; NAMIKI, T.; MITA, K.; FUJIMOTO, Y.; KATAOKA, H. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. **J. Biol. Chem.**, 279:35942-35949, 2004.

NUNES, F.M.F.; VALENTE, V.; SOUSA, J.F.; CUNHA, M.A.V.; PINHEIRO, D.G.; MAIA, R.M.; ARAUJO, D.D.; COSTA, M.R.; MARTINS, W.K.; CARVALHO, A.F.; MONESI, N.; NASCIMENTO, A.M.; PEIXOTO, P.M.V.; SILVA, M.F.R.; RAMOS, R.G.P.; REIS, L.F.L.; DIAS-NETO, E.; SOUZA, S.J.; SIMPSON, A.J.G.; ZAGO, M.A.; SOARES, A.E.E.; BITONDI, M.M.G.; ESPREAFICO, E.M.; ESPINDOLA, F.S.; PAÇO-LARSON, M.L.; SIMÕES, Z.L.P.; HARTFELDER, K.; da SILVA, W.A. Jr. The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. **BMC Genomics**, 5:1-12, 2004.

OH, J-H.; JEON, Y-J.; JEONG, S-Y.; HONG, S.M.; LEE, J.S.; NHO, S.K.; KANG, S.W.; KIM, N-S. Gene expression profiling between embryonic and larval stages of the silkworm, *Bombyx mori*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 343:864-872, 2006.

OTE, M.; MITA, K.; KAWASAKI, H.; SEIKI, M.; NOHATA, J.; KOBAYASHI, M.; SHIMADA, T. Microarray analysis of gene expression profiles in wing discs of *Bombyx mori* during pupal ecdysis. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 34:775-784, 2004.

PAULINO, A.T.; MINASSE, F.A.; GUILHERME, M.R.; REIS, A.V.; MUNIZ, E.C.; NAZAKI, J. Novel adsorbent based on silkworm chrysalides for removal of heavy metals from wastewaters. **J. Colloid Interface Sci.**, 301:479-487, 2006.

PEREIRA, E.P.; CONTE, H.; RIBEIRO, L.F.C.; ZANATTA, D.B.; BRAVO, J.P.; FERNANDEZ, M.A.; BRANCALHÃO, R.M.C. Cytopathological process by multiple Nucleopolyhedrovirus in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **J. Invertebr. Pathol.**, 99:1-7, 2008.

- REDDY, K.D.; NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E.G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR) - anchored PCR. **Heredity**, 38:681–687, 1999.
- REGULSKI M.; TULLY, T. Molecular and biochemical characterization of dNOS: A *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 92:90722-90726, 1995.
- RIBEIRO, L.F.C.; BRANCALHÃO, R.M.C.; TORQUATO, E.F.B.; FERNANDEZ, M.A. Susceptibility of the *Bombyx mori* cardia cells to *Nucleopolyhedrovirus*, multiple subgroup, BmMNPV. **J. Invertebr. Pathol.**, 100:195-198, 2009.
- SAHA, S.; SPARKS, A.B.; RAGO, C.; AKMAEV, V.; WANG, C.J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W.; VELCULESCU, V.E. Using the transcriptome to annotate the genome. **Nat. Biotechnol.**, 20:508-512, 2002.
- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, 270:467-470, 1995.
- SENGUPTA, K.; KUMAR, P.; BAIG, M.; GOVINDAIAH. **Handbook on Pest and Disease Control of Mulberry and Silkworm**. Bangkok: UNESCAP - United Nations Economic and Social Commission for Asia and the Pacific, 1990. 88p.
- SERVOLI, E.; MANIGLIO, D.; MOTTA, A.; PREDAZZER, R.; MIGLIARESI, C. Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts. **Macromol. Biosci.**, 5:1175-1183, 2005.
- SHINBO, H.; KONNO, K.; HIRAYAMA, C. The pathway of ammonia assimilation in the silkworm, *Bombyx mori*. **J. Insect Physiol.**, 43:959-964, 1997.
- SILVA, W.A. Jr.; COSTA, M.C.; VALENTE, V.; SOUSA, J.F.; SIMPSON, A.J.; PAÇÓ-LARSON, M.L.; ESPREAFICO, E.M.; CAMARGO, S.S.; MONTEIRO, E.; HOLANDA, A.J.; ZAGO, M.A.; NETO, E.D. PCR template preparation for capillary DNA sequencing. **Biotechniques**, 30:537-542, 2001.
- SOHN, B.H. Conservation Status of Silkworm Genetic Resources in Korea. In: **Conservation Status of Sericulture Germplasm Resources in the World**. Rome: FAO Corporate Document Repository, 2003. 168 p.
- SORITA, S. **Preservation and utilization of the silkworm genetic resources**. Japan: National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1991. 68p.
- TAMURA, T.; THIBERT, C.; ROYER, C.; KANDA, T.; ABRAHAM, E.; KAMBA, M.; KOMOTO, N.; THOMAS, J.L.; MAUCHAMP, B.; CHAVANCY, G.; SHIRK, P.; FRASER, M.; PRUDHOMME, J.C.; COUBLE, P.; TOSHIKI, T.;

CHANTAL, T.; CORINNE, R.; TOSHIO, K.; EAPPEN, A.; MARI, K.; NATUO, K.; JEAN-LUC, T.; BERNARD, M.; GERARD, C.; PAUL, S.; MALCOLM, F.; JEAN-CLAUDE, P.; PIERRE, C. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. **Nat. Biotechnol.**, 18:81-84, 2000.

TAN, YD.; WAN, C.; ZHU, Y.; LU, C.; XIANG, Z.; DENG, H.W. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. **Genetics**, 157:1277-1284, 2001.

TANG, J.; LI, W.F.; ZHANG, X.; ZHOU, C.Z. The gene expression profile of *Bombyx mori* silk gland. **Gene**, 396:369-372, 2007.

THE INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 38:1036-1045, 2008.

THOMAS, J.L.; DA ROCHA, M.; BESSE, A.; MAUCHAMP, B.; CHAVANCY, G. 3 x P3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 32:247-253, 2002.

TOMITA, M.; MUNETSUNA, H.; SATO, T.; ADACHI, T.; HINO, R.; HAYASHI, M.; SHIMIZU, K.; NAKAMURA, N.; TAMURA, T.; YOSHIKATO, K. Transgenic silkworm produce recombinant human type III procollagen in cocoons. **Nat. Biotechnol.**, 21:52-56, 2003.

TORQUARTO, E. F.B.; MIRANDA NETO, M.H.; BRANCALHÃO, R.M.C. *Nucleopolyhedrovirus* infected central nervous system cells of *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotrop. Entomol.**, 35:70-74, 2006.

TSUCHIDA, K.; WELLS, M.A.; Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval instar of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. **Insect Biochem.**, 18:263-268, 1988.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, 270:484-487, 1995.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; ZHOU, W.; VOGELSTEIN, J.; BASRAI, M.A.; BASSET, D.E. Jr.; HIETER, P.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Characterization of the yeast transcriptome. **Cell**, 88:243-251, 1997.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E.A.; GUIMARÃES, P.E.; OJOPI, E.P.; PAQUOLA, A.C.; PIAZZA, J.P.; NISHIYAMA, M.Y. Jr.; KITAJIMA, J.P.; ADAMSON, R.E.; ASHTON, P.D.; BONALDO, M.F.; COULSON, P.S.; DILLON, G.P.; FARIAS, L.P.; GREGORIO, S.P.; HO, P.L.;

LEITE, R.A.; MALAQUIAS, L.C.; MARQUES, R.C.; MIYASATO, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; OHLWEILER, F.P.; REIS, E.M.; RIBEIRO, M.A.; SÁ, R.G.; STUKART, G.C.; SOARES, M.B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A.M.; WILSON, R.A.; MENCK, C.F.; SETUBAL, J.C.; LEITE, L.C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat. Genet.**, 35:148-157, 2003.

WANG, X.; HU, X.; DALEY, A.; RABOTYAGOVA, O.; CEBE, P.; KAPLAN, D.L. Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release. **J. Control. Release**, 121:190-199, 2007.

WHEELER, D.L.; CHURCH, D.M.; FEDERHEN, S.; LASH, A.E.; MADDEN, T.L.; PONTIUS, J.U.; SCHULER, G.D.; SCHRIMI, L.M.; SEQUEIRA, E.; TATUSOVA, T.A.; WAGNER, L. Database resources of the National Center for Biotechnology. **Nucleic Acids Res.**, 31:28-33, 2003.

XIA, Q. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). **Science**, 306:1937-1940, 2004.

YAMAMOTO, T. Silkworm strains. In: **Strains maintenance and databanks for life science**. Tokyo: N. NAKATSUJI, 2000. p. 45-49.

YASUKOCHI, Y. A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. **Genetics**, 150:1513-1525, 1998.

YOSHITAKE, N. Phylogenetic aspects on the origin of Japanese race of the silkworm, *Bombyx mori* L. **J. Seric. Sci. Jpn.**, 37:83-87, 1968.

YUDA, M.; HIRAI, M.; HIRAI, K.; MATSUMURA, H.; ANDO, K.; CHINZEI, Y. cDNA cloning, expression and characterization of nitric oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Eur. J. Biochem.**, 242:807-812, 1996.

ZANATTA, D.; BRAVO, J.P.; BARBOSA, J.F.; MUNHOZ, R.E.F.; FERNZNADES, M.A. Evaluation of economically important traits from sixteen parental strains of the silkworm *Bombyx mori* L (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotrop. Entomol.**, 38:327-331, 2009.

ZHANG, Y.; CHEN, J.; LV, Z.; NIE, Z.; ZHANG, X.; WU, X. Can 29 kDa rhGM-CSF expressed by silkworm pupae bioreactor bring into effect as active cytokine through orally administration. **Eur. J. Pharm. Sci.**, 28:212-223, 2006.

ZHANG, Y.; XIA, Q.; XU, J.; CHEN, J.; NIE, Z.; WANG, D.; ZHANG, W.; CHEN, J.; ZHENG, Q.; CHEN, Q.; KONG, L.; REN, X.; WANG, J.; LV, Z.; YU, W.; JIANG, C.; LIU, L.; SHENG, Q.; JIN, Y.; WU, X. Aligning the proteome and genome of the silkworm, *Bombyx mori*. **Funct. Integ. Genomics**, in press, 2009.

ZHOU, Z-H.; YANG, H-J.; CHEN, M.; LOU, C-F.; ZHANG, Y-Z.; CHEN, K-P.; WANG, Y.; YU, M-L.; YU, F.; LI, J-Y.; ZHONG, B-X. Comparative proteomic analysis between domesticated silkworm (*Bombyx mori*) reared on fresh mulberry leaves and on artificial diet. **J. Proteome Res.**, 7:5103-5111, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Quadro 1 A: Protocolo de precipitação com PEG

Soluções estoque:

- ✓ PEG (polietileno glycol 8000) 20%
- ✓ NaCl 2,5 M

Protocolo:

- 1.) Adicionar o mesmo volume da amostra a ser precipitada da solução de PEG e misturar por pipetagem;
- 2.) Incubar a 37° C por 15 minutos;
- 3.) Centrifugar a amostra a 15.000 g, por 15 minutos, em temperature ambiente;
- 4.) Descartar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta;
- 5.) Adicionar 2,5 volumes de etanol 80% gelado do volume inicial da amostra;
- 6.) Centrifugar a amostra a 15.000 g, por 2 minutos, em temperatura ambiente. Descartar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta.
- 7.) Repetir as etapas 5 e 6;
- 8.) Deixar secar a amostra e ressuspender em volume adequado com água ultra-pura.

APÊNDICE B

Quadro 1 B: Análise das seqüências – Biblioteca 1 TM 24+48 hpi

Silkworm Gene Discovery

----- Submission Id: 1 -----
 File.....: LORF-TM2448-130509-001.zip
 Date.....: 2009-07-07
 Time.....: 15:08:38
 User.....: Daniel Guariz Pinheiro

Legend :

 Column 1 - Name
 Column 2 - Sequence length
 Column 3 - High quality start
 Column 4 - High quality end
 Column 5 - High quality length

No matches.....: 12

LORF-TM2448-130509-001-C06.esd	492	31	484	454
LORF-TM2448-130509-001-A01.esd	432	4	425	422
LORF-TM2448-130509-001-D09.esd	498	10	492	483
LORF-TM2448-130509-001-A02.esd	521	15	513	499
LORF-TM2448-130509-001-C10.esd	273	37	267	231
LORF-TM2448-130509-001-G02.esd	510	20	501	482
LORF-TM2448-130509-001-H06.esd	484	30	480	451
LORF-TM2448-130509-001-F10.esd	493	41	483	443
LORF-TM2448-130509-001-G07.esd	305	7	269	263
LORF-TM2448-130509-001-D10.esd	502	9	493	485
LORF-TM2448-130509-001-G10.esd	1028	31	788	758
LORF-TM2448-130509-001-A09.esd	496	42	486	445

Refused due to Low Quality.....: 37

LORF-TM2448-130509-001-E01.esd	268	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-H09.esd	777	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-E05.esd	397	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-A07.esd	506	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-B02.esd	371	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-F08.esd	307	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-B08.esd	754	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-C08.esd	538	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-H01.esd	153	48	129	82
LORF-TM2448-130509-001-D03.esd	413	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-E09.esd	515	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-F02.esd	289	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-A12.esd	384	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-C05.esd	402	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-E12.esd	185	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-G11.esd	392	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-B12.esd	181	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-G08.esd	400	43	111	69
LORF-TM2448-130509-001-E07.esd	493	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-D12.esd	428	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-D08.esd	240	182	232	51
LORF-TM2448-130509-001-G01.esd	630	29	51	23
LORF-TM2448-130509-001-C07.esd	638	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-B11.esd	491	-1	-1	1

LORF-TM2448-130509-001-G09.esd	465	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-C12.esd	476	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-A05.esd	147	29	124	96
LORF-TM2448-130509-001-F09.esd	604	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-H11.esd	574	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-C04.esd	238	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-E03.esd	182	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-D05.esd	312	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-E10.esd	937	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-H04.esd	715	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-B06.esd	167	65	153	89
LORF-TM2448-130509-001-E02.esd	321	-1	-1	1
LORF-TM2448-130509-001-E11.esd	870	-1	-1	1

Refused due to Vector Presence.....: 36

LORF-TM2448-130509-001-C11.esd	259	39	180	142
LORF-TM2448-130509-001-B04.esd	219	40	203	164
LORF-TM2448-130509-001-D02.esd	302	98	297	200
LORF-TM2448-130509-001-F04.esd	287	71	254	184
LORF-TM2448-130509-001-B05.esd	167	54	161	108
LORF-TM2448-130509-001-G06.esd	245	45	239	195
LORF-TM2448-130509-001-F11.esd	148	33	139	107
LORF-TM2448-130509-001-A11.esd	158	30	153	124
LORF-TM2448-130509-001-H07.esd	189	42	184	143
LORF-TM2448-130509-001-C01.esd	160	24	129	106
LORF-TM2448-130509-001-B10.esd	175	40	170	131
LORF-TM2448-130509-001-A04.esd	165	29	139	111
LORF-TM2448-130509-001-B09.esd	182	48	153	106
LORF-TM2448-130509-001-D04.esd	311	59	238	180
LORF-TM2448-130509-001-H03.esd	238	60	233	174
LORF-TM2448-130509-001-F01.esd	228	58	223	166
LORF-TM2448-130509-001-A03.esd	167	30	161	132
LORF-TM2448-130509-001-F05.esd	254	39	233	195
LORF-TM2448-130509-001-F07.esd	233	112	227	116
LORF-TM2448-130509-001-H02.esd	159	14	152	139
LORF-TM2448-130509-001-F03.esd	167	29	162	134
LORF-TM2448-130509-001-G03.esd	206	32	169	138
LORF-TM2448-130509-001-E04.esd	202	41	173	133
LORF-TM2448-130509-001-C03.esd	226	116	221	106
LORF-TM2448-130509-001-D01.esd	212	7	207	201
LORF-TM2448-130509-001-C09.esd	585	11	564	554
LORF-TM2448-130509-001-A06.esd	158	27	152	126
LORF-TM2448-130509-001-F12.esd	224	83	217	135
LORF-TM2448-130509-001-D06.esd	234	43	225	183
LORF-TM2448-130509-001-F06.esd	206	22	140	119
LORF-TM2448-130509-001-B03.esd	211	9	205	197
LORF-TM2448-130509-001-G05.esd	148	21	130	110
LORF-TM2448-130509-001-G12.esd	165	34	159	126
LORF-TM2448-130509-001-D11.esd	156	33	136	104
LORF-TM2448-130509-001-H12.esd	241	61	236	176
LORF-TM2448-130509-001-A10.esd	491	43	486	444

Non Redundant Proteins.....: 11

LORF-TM2448-130509-001-G04.esd	392	29	388	360
LORF-TM2448-130509-001-E08.esd	469	31	460	430
LORF-TM2448-130509-001-B07.esd	392	16	385	370
LORF-TM2448-130509-001-A08.esd	492	12	484	473
LORF-TM2448-130509-001-C02.esd	458	29	451	423

LORF-TM2448-130509-001-H08.esd	408	32	399	368
LORF-TM2448-130509-001-E06.esd	394	30	389	360
LORF-TM2448-130509-001-H10.esd	396	36	391	356
LORF-TM2448-130509-001-D07.esd	417	27	413	387
LORF-TM2448-130509-001-H05.esd	422	30	391	362
LORF-TM2448-130509-001-B01.esd	431	25	425	401

Quadro 2 B: Análise das seqüências – Biblioteca 2 TM 24+48 hpi

Silkworm Gene Discovery

----- Submission Id: 3 -----

File.....: LORF-TM2448-150509-002.zip

Date.....: 2009-07-08

Time.....: 15:05:01

User.....: Daniel Guariz Pinheiro

Legend :

Column 1 - Name

Column 2 - Sequence length

Column 3 - High quality start

Column 4 - High quality end

Column 5 - High quality length

No matches.....: 5

LORF-TM2448-150509-002-H09.esd	899	214	672	459
LORF-TM2448-150509-002-E01.esd	247	10	242	233
LORF-TM2448-150509-002-B01.esd	241	32	236	205
LORF-TM2448-150509-002-C01.esd	237	30	232	203
LORF-TM2448-150509-002-G12.esd	850	39	641	603

Refused due to Low Quality.....: 36

LORF-TM2448-150509-002-A07.esd	357	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-G11.esd	417	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-F02.esd	601	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-B04.esd	324	11	77	67
LORF-TM2448-150509-002-E04.esd	427	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-E08.esd	309	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-A12.esd	319	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-G05.esd	217	131	170	40
LORF-TM2448-150509-002-C11.esd	163	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-H01.esd	164	59	139	81
LORF-TM2448-150509-002-H02.esd	293	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-D10.esd	153	48	144	97
LORF-TM2448-150509-002-H03.esd	203	128	193	66
LORF-TM2448-150509-002-C04.esd	336	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-H10.esd	405	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-D06.esd	422	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-D04.esd	479	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-D05.esd	195	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-B02.esd	379	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-C09.esd	484	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-F01.esd	422	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-C08.esd	302	-1	-1	1

LORF-TM2448-150509-002-H06.esd	304	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-C06.esd	495	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-G01.esd	456	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-B10.esd	381	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-F09.esd	769	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-E10.esd	335	39	79	41
LORF-TM2448-150509-002-F04.esd	191	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-B03.esd	408	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-H08.esd	525	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-A11.esd	187	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-A03.esd	230	48	115	68
LORF-TM2448-150509-002-C05.esd	308	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-H05.esd	318	-1	-1	1
LORF-TM2448-150509-002-G02.esd	362	-1	-1	1

Refused due to Vector Presence.....: 48

LORF-TM2448-150509-002-D03.esd	241	52	236	185
LORF-TM2448-150509-002-B07.esd	238	58	232	175
LORF-TM2448-150509-002-G03.esd	158	23	151	129
LORF-TM2448-150509-002-A05.esd	191	12	187	176
LORF-TM2448-150509-002-E05.esd	152	28	147	120
LORF-TM2448-150509-002-E03.esd	750	25	615	591
LORF-TM2448-150509-002-B11.esd	155	35	148	114
LORF-TM2448-150509-002-C03.esd	236	63	231	169
LORF-TM2448-150509-002-D09.esd	231	57	225	169
LORF-TM2448-150509-002-B06.esd	209	37	160	124
LORF-TM2448-150509-002-G04.esd	164	51	156	106
LORF-TM2448-150509-002-H11.esd	274	88	269	182
LORF-TM2448-150509-002-A08.esd	640	34	623	590
LORF-TM2448-150509-002-D01.esd	248	37	242	206
LORF-TM2448-150509-002-E09.esd	366	53	242	190
LORF-TM2448-150509-002-B05.esd	214	42	209	168
LORF-TM2448-150509-002-C10.esd	425	272	372	101
LORF-TM2448-150509-002-A06.esd	167	26	161	136
LORF-TM2448-150509-002-G08.esd	236	23	231	209
LORF-TM2448-150509-002-H04.esd	332	22	122	101
LORF-TM2448-150509-002-D07.esd	931	29	662	634
LORF-TM2448-150509-002-B09.esd	234	55	229	175
LORF-TM2448-150509-002-F03.esd	229	57	224	168
LORF-TM2448-150509-002-F08.esd	237	58	226	169
LORF-TM2448-150509-002-G07.esd	231	48	224	177
LORF-TM2448-150509-002-F06.esd	232	46	227	182
LORF-TM2448-150509-002-A04.esd	229	40	224	185
LORF-TM2448-150509-002-E07.esd	162	25	157	133
LORF-TM2448-150509-002-D12.esd	204	12	193	182
LORF-TM2448-150509-002-C12.esd	237	59	228	170
LORF-TM2448-150509-002-A02.esd	235	55	228	174
LORF-TM2448-150509-002-E02.esd	240	54	227	174
LORF-TM2448-150509-002-A10.esd	234	82	226	145
LORF-TM2448-150509-002-D11.esd	237	62	230	169
LORF-TM2448-150509-002-D02.esd	165	37	160	124
LORF-TM2448-150509-002-A01.esd	238	37	233	197
LORF-TM2448-150509-002-F05.esd	223	54	219	166
LORF-TM2448-150509-002-G10.esd	158	4	116	113
LORF-TM2448-150509-002-F12.esd	303	7	120	114
LORF-TM2448-150509-002-H07.esd	236	48	230	183
LORF-TM2448-150509-002-G09.esd	180	46	147	102
LORF-TM2448-150509-002-B12.esd	167	38	162	125
LORF-TM2448-150509-002-E12.esd	243	56	238	183

LORF-TM2448-150509-002-F07.esd	170	23	165	143
LORF-TM2448-150509-002-A09.esd	158	21	152	132
LORF-TM2448-150509-002-E11.esd	172	10	144	135
LORF-TM2448-150509-002-D08.esd	161	28	139	112
LORF-TM2448-150509-002-C02.esd	239	121	231	111

Refused due to Repeat Presence.....: 1

LORF-TM2448-150509-002-C07.esd	227	7	222	216
--------------------------------	-----	---	-----	-----

Non Redundant Proteins.....: 4

LORF-TM2448-150509-002-F10.esd	389	17	382	366
LORF-TM2448-150509-002-F11.esd	392	17	386	370
LORF-TM2448-150509-002-B08.esd	400	25	390	366
LORF-TM2448-150509-002-E06.esd	394	9	385	377

Quadro 3 B: Análise das seqüências – Biblioteca 3 TM 24+48 hpi

Silkworm Gene Discovery

----- Submission Id: 5 -----

File.....: LORF-TM2448-010709-003.zip

Date.....: 2009-07-08

Time.....: 15:07:17

User.....: Daniel Guariz Pinheiro

Legend :

Column 1 - Name

Column 2 - Sequence length

Column 3 - High quality start

Column 4 - High quality end

Column 5 - High quality length

No matches.....: 1

LORF-TM2448-010709-003-E08.esd	1210	51	263	213
--------------------------------	------	----	-----	-----

Refused due to Low Quality.....: 20

LORF-TM2448-010709-003-G10.esd	403	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-H06.esd	576	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-G06.esd	429	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-H04.esd	1398	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-G07.esd	314	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-G05.esd	728	147	189	43
LORF-TM2448-010709-003-H05.esd	543	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-F12.esd	485	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-F07.esd	223	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-B08.esd	1725	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-B10.esd	836	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-H09.esd	444	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-G01.esd	413	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-H03.esd	389	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-H10.esd	456	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-G08.esd	414	-1	-1	1

LORF-TM2448-010709-003-F09.esd	355	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-F11.esd	453	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-H07.esd	392	-1	-1	1
LORF-TM2448-010709-003-B12.esd	2184	36	118	83

Refused due to Vector Presence.....: 3

LORF-TM2448-010709-003-F02.esd	482	34	204	171
LORF-TM2448-010709-003-B11.esd	264	37	259	223
LORF-TM2448-010709-003-B07.esd	543	21	148	128

mRNA.....: 13

LORF-TM2448-010709-003-G03.esd	605	38	596	559
LORF-TM2448-010709-003-A10.esd	649	28	500	473
LORF-TM2448-010709-003-A03.esd	477	42	466	425
LORF-TM2448-010709-003-A09.esd	479	33	462	430
LORF-TM2448-010709-003-F08.esd	549	40	545	506
LORF-TM2448-010709-003-C06.esd	601	49	576	528
LORF-TM2448-010709-003-C04.esd	469	53	462	410
LORF-TM2448-010709-003-G04.esd	1008	65	709	645
LORF-TM2448-010709-003-D09.esd	615	40	594	555
LORF-TM2448-010709-003-A06.esd	474	18	457	440
LORF-TM2448-010709-003-E07.esd	458	43	452	410
LORF-TM2448-010709-003-E09.esd	463	42	459	418
LORF-TM2448-010709-003-E10.esd	508	32	490	459

Bmo ESTs.....: 9

LORF-TM2448-010709-003-D05.esd	372	38	303	266
LORF-TM2448-010709-003-E11.esd	693	32	689	658
LORF-TM2448-010709-003-D07.esd	671	28	650	623
LORF-TM2448-010709-003-F05.esd	623	82	569	488
LORF-TM2448-010709-003-E03.esd	702	58	690	633
LORF-TM2448-010709-003-B06.esd	672	42	571	530
LORF-TM2448-010709-003-A01.esd	648	28	643	616
LORF-TM2448-010709-003-B05.esd	553	35	548	514
LORF-TM2448-010709-003-A12.esd	368	32	362	331

Non Redundant Proteins.....: 42

LORF-TM2448-010709-003-F06.esd	523	25	491	467
LORF-TM2448-010709-003-D12.esd	587	68	581	514
LORF-TM2448-010709-003-F10.esd	702	61	683	623
LORF-TM2448-010709-003-F01.esd	623	43	609	567
LORF-TM2448-010709-003-E12.esd	597	52	591	540
LORF-TM2448-010709-003-E01.esd	608	36	604	569
LORF-TM2448-010709-003-D02.esd	614	48	607	560
LORF-TM2448-010709-003-A07.esd	616	39	591	553
LORF-TM2448-010709-003-D03.esd	710	46	667	622
LORF-TM2448-010709-003-C09.esd	609	42	582	541
LORF-TM2448-010709-003-B01.esd	615	26	590	565
LORF-TM2448-010709-003-C03.esd	1116	50	756	707
LORF-TM2448-010709-003-B02.esd	919	36	735	700
LORF-TM2448-010709-003-D10.esd	606	29	600	572
LORF-TM2448-010709-003-B04.esd	615	46	606	561
LORF-TM2448-010709-003-F04.esd	624	47	617	571
LORF-TM2448-010709-003-B09.esd	624	54	610	557
LORF-TM2448-010709-003-A05.esd	599	61	559	499
LORF-TM2448-010709-003-C10.esd	824	38	666	629

LORF-TM2448-010709-003-C02.esd	610	40	606	567
LORF-TM2448-010709-003-C11.esd	980	166	778	613
LORF-TM2448-010709-003-D04.esd	1006	43	731	689
LORF-TM2448-010709-003-D06.esd	568	30	538	509
LORF-TM2448-010709-003-E02.esd	614	38	608	571
LORF-TM2448-010709-003-A11.esd	621	50	612	563
LORF-TM2448-010709-003-C07.esd	1014	34	661	628
LORF-TM2448-010709-003-E05.esd	595	18	558	541
LORF-TM2448-010709-003-A02.esd	883	33	722	690
LORF-TM2448-010709-003-D01.esd	763	46	616	571
LORF-TM2448-010709-003-C12.esd	596	39	589	551
LORF-TM2448-010709-003-A08.esd	620	47	614	568
LORF-TM2448-010709-003-F03.esd	1047	58	763	706
LORF-TM2448-010709-003-C01.esd	602	28	597	570
LORF-TM2448-010709-003-G02.esd	397	35	359	325
LORF-TM2448-010709-003-C05.esd	612	30	608	579
LORF-TM2448-010709-003-B03.esd	623	38	608	571
LORF-TM2448-010709-003-E04.esd	619	52	615	564
LORF-TM2448-010709-003-D08.esd	624	51	606	556
LORF-TM2448-010709-003-C08.esd	977	42	656	615
LORF-TM2448-010709-003-D11.esd	614	48	602	555
LORF-TM2448-010709-003-E06.esd	567	43	553	511
LORF-TM2448-010709-003-A04.esd	627	34	613	580

Quadro 4 B: Análise das seqüências – Biblioteca 1 TM 72+96 hpi

Silkworm Gene Discovery

----- Submission Id: 2 -----

File.....: LORF-TM7296-150409-001.zip

Date.....: 2009-07-08

Time.....: 09:21:45

User.....: Daniel Guariz Pinheiro

Legend :

Column 1 - Name

Column 2 - Sequence length

Column 3 - High quality start

Column 4 - High quality end

Column 5 - High quality length

No matches.....: 16

LORF-TM7296-150409-001-B06.esd	745	22	598	577
LORF-TM7296-150409-001-E01.esd	873	16	650	635
LORF-TM7296-150409-001-A07.esd	863	41	620	580
LORF-TM7296-150409-001-G08.esd	852	12	657	646
LORF-TM7296-150409-001-D01.esd	892	16	756	741
LORF-TM7296-150409-001-B05.esd	735	18	605	588
LORF-TM7296-150409-001-A01.esd	928	69	743	675
LORF-TM7296-150409-001-C06.esd	732	26	648	623
LORF-TM7296-150409-001-B09.esd	872	19	609	591
LORF-TM7296-150409-001-E12.esd	860	20	672	653
LORF-TM7296-150409-001-B10.esd	914	21	731	711
LORF-TM7296-150409-001-G05.esd	726	20	600	581
LORF-TM7296-150409-001-G10.esd	851	29	657	629

LORF-TM7296-150409-001-D11.esd	914	11	701	691
LORF-TM7296-150409-001-E04.esd	888	11	706	696
LORF-TM7296-150409-001-C08.esd	859	16	645	630
Refused due to Low Quality.....: 2				
LORF-TM7296-150409-001-H12.esd	474	-1	-1	1
LORF-TM7296-150409-001-F10.esd	545	-1	-1	1
Refused due to Vector Presence.....: 1				
LORF-TM7296-150409-001-C10.esd	767	37	173	137
Refused due to Repeat Presence.....: 26				
LORF-TM7296-150409-001-H09.esd	799	40	650	611
LORF-TM7296-150409-001-G12.esd	901	18	732	715
LORF-TM7296-150409-001-A02.esd	873	26	673	648
LORF-TM7296-150409-001-D08.esd	862	23	656	634
LORF-TM7296-150409-001-A12.esd	500	43	395	353
LORF-TM7296-150409-001-E11.esd	896	16	696	681
LORF-TM7296-150409-001-F07.esd	882	15	631	617
LORF-TM7296-150409-001-E06.esd	788	4	672	669
LORF-TM7296-150409-001-E03.esd	898	41	686	646
LORF-TM7296-150409-001-E02.esd	858	14	694	681
LORF-TM7296-150409-001-H02.esd	883	17	727	711
LORF-TM7296-150409-001-E05.esd	838	16	664	649
LORF-TM7296-150409-001-H01.esd	860	65	672	608
LORF-TM7296-150409-001-H08.esd	881	29	685	657
LORF-TM7296-150409-001-H07.esd	880	36	658	623
LORF-TM7296-150409-001-D12.esd	873	11	722	712
LORF-TM7296-150409-001-E08.esd	673	12	430	419
LORF-TM7296-150409-001-B11.esd	865	15	669	655
LORF-TM7296-150409-001-A11.esd	879	17	698	682
LORF-TM7296-150409-001-E09.esd	883	20	693	674
LORF-TM7296-150409-001-B07.esd	856	23	663	641
LORF-TM7296-150409-001-F11.esd	872	26	671	646
LORF-TM7296-150409-001-G07.esd	880	15	630	616
LORF-TM7296-150409-001-G03.esd	890	29	738	710
LORF-TM7296-150409-001-H11.esd	907	31	557	527
LORF-TM7296-150409-001-F12.esd	873	21	676	656
Non Redundant Proteins.....: 51				
LORF-TM7296-150409-001-A04.esd	805	27	650	624
LORF-TM7296-150409-001-F03.esd	694	8	684	677
LORF-TM7296-150409-001-D07.esd	982	28	753	726
LORF-TM7296-150409-001-A10.esd	805	31	648	618
LORF-TM7296-150409-001-A08.esd	711	3	671	669
LORF-TM7296-150409-001-F05.esd	785	14	662	649
LORF-TM7296-150409-001-H06.esd	666	21	603	583
LORF-TM7296-150409-001-H04.esd	737	28	715	688
LORF-TM7296-150409-001-G06.esd	692	16	648	633
LORF-TM7296-150409-001-F02.esd	1030	26	746	721
LORF-TM7296-150409-001-H05.esd	598	17	582	566
LORF-TM7296-150409-001-C02.esd	748	19	683	665
LORF-TM7296-150409-001-D02.esd	811	26	745	720
LORF-TM7296-150409-001-A05.esd	547	26	524	499
LORF-TM7296-150409-001-B03.esd	811	18	719	702
LORF-TM7296-150409-001-D04.esd	1024	26	682	657

LORF-TM7296-150409-001-H10.esd	676	56	669	614
LORF-TM7296-150409-001-D06.esd	745	19	599	581
LORF-TM7296-150409-001-C11.esd	803	18	704	687
LORF-TM7296-150409-001-C04.esd	837	5	740	736
LORF-TM7296-150409-001-B12.esd	811	30	700	671
LORF-TM7296-150409-001-A09.esd	783	34	634	601
LORF-TM7296-150409-001-D09.esd	665	19	651	633
LORF-TM7296-150409-001-D03.esd	737	10	702	693
LORF-TM7296-150409-001-G11.esd	790	23	698	676
LORF-TM7296-150409-001-B02.esd	815	21	706	686
LORF-TM7296-150409-001-D10.esd	802	26	739	714
LORF-TM7296-150409-001-C09.esd	721	21	705	685
LORF-TM7296-150409-001-G02.esd	838	35	745	711
LORF-TM7296-150409-001-E07.esd	792	15	647	633
LORF-TM7296-150409-001-C01.esd	743	31	697	667
LORF-TM7296-150409-001-G09.esd	800	3	656	654
LORF-TM7296-150409-001-F04.esd	721	12	710	699
LORF-TM7296-150409-001-C07.esd	833	19	694	676
LORF-TM7296-150409-001-B08.esd	595	12	581	570
LORF-TM7296-150409-001-B04.esd	730	0	675	676
LORF-TM7296-150409-001-C12.esd	808	28	692	665
LORF-TM7296-150409-001-C05.esd	771	0	661	662
LORF-TM7296-150409-001-B01.esd	984	33	730	698
LORF-TM7296-150409-001-A03.esd	732	17	710	694
LORF-TM7296-150409-001-E10.esd	786	23	629	607
LORF-TM7296-150409-001-F09.esd	732	30	704	675
LORF-TM7296-150409-001-A06.esd	789	31	660	630
LORF-TM7296-150409-001-G01.esd	742	19	705	687
LORF-TM7296-150409-001-F08.esd	739	22	710	689
LORF-TM7296-150409-001-C03.esd	1121	11	788	778
LORF-TM7296-150409-001-G04.esd	733	17	718	702
LORF-TM7296-150409-001-H03.esd	680	32	650	619
LORF-TM7296-150409-001-F06.esd	644	22	567	546
LORF-TM7296-150409-001-F01.esd	740	16	721	706
LORF-TM7296-150409-001-D05.esd	601	24	582	559

Quadro 5 B: Análise das seqüências – Biblioteca 2 TM 72+96 hpi

Silkworm Gene Discovery

----- Submission Id: 4 -----

File.....: LORF-TM7296-210409-002.zip

Date.....: 2009-07-08

Time.....: 15:06:57

User.....: Daniel Guariz Pinheiro

Legend :

Column 1 - Name

Column 2 - Sequence length

Column 3 - High quality start

Column 4 - High quality end

Column 5 - High quality length

No matches.....: 2

LORF-TM7296-210409-002-G09.esd	406	43	401	359
--------------------------------	-----	----	-----	-----

LORF-TM7296-210409-002-B07.esd	369	16	352	337
Refused due to Low Quality.....: 35				
LORF-TM7296-210409-002-G06.esd	454	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-A10.esd	314	99	162	64
LORF-TM7296-210409-002-F05.esd	444	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-B06.esd	765	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-D06.esd	330	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-C04.esd	449	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-D04.esd	442	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-B02.esd	663	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-E04.esd	394	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-G10.esd	456	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-D11.esd	396	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-A11.esd	276	35	111	77
LORF-TM7296-210409-002-H12.esd	672	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-A09.esd	419	140	172	33
LORF-TM7296-210409-002-H05.esd	1571	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-H07.esd	396	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-A04.esd	233	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-F09.esd	410	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-A07.esd	387	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-F04.esd	406	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-E03.esd	395	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-C09.esd	334	51	118	68
LORF-TM7296-210409-002-C08.esd	414	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-H09.esd	504	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-F11.esd	324	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-B03.esd	415	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-E08.esd	410	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-H03.esd	418	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-C11.esd	483	13	61	49
LORF-TM7296-210409-002-B10.esd	597	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-A06.esd	276	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-C07.esd	410	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-F01.esd	388	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-H08.esd	408	-1	-1	1
LORF-TM7296-210409-002-D10.esd	467	-1	-1	1
Refused due to Repeat Presence.....: 1				
LORF-TM7296-210409-002-G07.esd	375	55	316	262
Non Redundant Proteins.....: 2				
LORF-TM7296-210409-002-C12.esd	280	14	273	260
LORF-TM7296-210409-002-B11.esd	348	30	316	287

APÊNDICE C

Quadro 1 C: Comparação das seqüências entre as Bibliotecas

Silkworm Gene Discovery

mRNA			TM2448	TM7296
			0	0
<input type="checkbox"/>	AB360590	Bombyx mori NSL mRNA for nitric-oxide synthase like protein, complete cds	2	
<input type="checkbox"/>	DQ443246	Bombyx mori H ⁺ transporting ATP synthase subunit e mRNA, complete cds	2	
<input type="checkbox"/>	NM_001126245	Bombyx mori chymotrypsin inhibitor CI-b1 (Ci-b1), mRNA	2	
<input type="checkbox"/>	DQ311383	Bombyx mori nucleoplasmin isoform 1 mRNA, complete cds	6	
<input type="checkbox"/>	AF465601	Bombyx mori PKG-Ia mRNA, complete cds	1	
			13	0
Non Redundant Proteins			TM2448	TM7296
			0	0
<input type="checkbox"/>	ABZ08800	putative metallo-beta-lactamase superfamily protein [uncultured marine crenarchaeote HF4000_APKG5C13]	19	
<input type="checkbox"/>	ZP_04658023	ribosome-associated GTP-binding protein [Selenomonas flueggei ATCC 43531] ribosome-associated GTP-binding protein [Selenomonas flueggei ATCC 43531]		22
<input type="checkbox"/>	YP_001231833	beta-ketoacyl synthase [Geobacter uraniireducens Rf4] beta-ketoacyl synthase [Geobacter uraniireducens Rf4]		1
<input type="checkbox"/>	ZP_03823389	IS4 family transposase ORF 1 [Acinetobacter sp. ATCC 27244] IS4 family transposase ORF 1 [Acinetobacter sp. ATCC 27244]	11	
<input type="checkbox"/>	ABE73458	endonuclease/reverse transcriptase [Pan troglodytes]		2
<input type="checkbox"/>	YP_055109	sugar ABC transporter [Propionibacterium acnes KPA171202] sugar ABC transporter [Propionibacterium acnes KPA171202]	1	
<input type="checkbox"/>	YP_055878	acetyltransferase [Propionibacterium acnes KPA171202] acetyltransferase [Propionibacterium acnes KPA171202]		1
<input type="checkbox"/>	ZP_02184891	Putative DNA helicase, superfamily I [Carnobacterium sp. AT7] Putative DNA helicase, superfamily I [Carnobacterium sp. AT7]		1
<input type="checkbox"/>	YP_957209	transposase IS66 [Marinobacter aquaeolei VT8] transposase IS66 [Marinobacter aquaeolei VT8]		2
<input type="checkbox"/>	AAS47562	mixed type I polyketide synthase - peptide synthetase [symbiont bacterium of Paederus fuscipes]		3
<input type="checkbox"/>	XP_001731354	hypothetical protein MGL_1537 [Malassezia globosa CBS 7966] hypothetical protein MGL_1537 [Malassezia globosa CBS 7966]		1
<input type="checkbox"/>	BAG57883	unnamed protein product [Homo sapiens]	2	
<input type="checkbox"/>	YP_001581655	beta-lactamase domain-containing protein [Nitrosopumilus maritimus SCM1] beta-lactamase domain protein [Nitrosopumilus maritimus SCM1]	1	
<input type="checkbox"/>	AAB18100	SbmA protein [Escherichia coli]	3	
<input type="checkbox"/>	ZP_03064860	protein SbmA [Shigella dysenteriae 1012] protein SbmA [Shigella dysenteriae 1012]	9	
<input type="checkbox"/>	YP_001452511	hypothetical protein CKO_00925 [Citrobacter koseri ATCC BAA-895] hypothetical protein CKO_00925 [Citrobacter koseri ATCC BAA-895] putative cobalamin synthesis protein/P47K [Escherichia coli]		1
<input type="checkbox"/>	YP_002327891	transport protein [Escherichia coli O127:H6 str. E2348/69] transport protein [Escherichia coli S88] transport protein [Escherichia coli ED1a] transport protein [Escherichia coli IAI39] transport protein [Escherichia coli UMN026] PUP family peptide uptake or activated fatty acid export permease [Escherichia coli 83972] predicted transporter [Escherichia coli O127:H6 str. E2348/69] transporter involved in cell envelope modification [Escherichia coli S88] transporter involved in cell envelope modification [Escherichia coli IAI39] transporter involved in cell envelope modification [Escherichia coli ED1a] transporter involved in cell envelope modification [Escherichia coli UMN026] PUP family	1	

		peptide uptake or activated fatty acid export permease [Escherichia coli 83972]		
<input type="checkbox"/>	ZP_04490826	ribonucleoside-diphosphate reductase, alpha subunit [Spirosoma linguale DSM 74] ribonucleoside-diphosphate reductase, alpha subunit [Spirosoma linguale DSM 74]		3
<input type="checkbox"/>	NP_040640	NinH protein [Enterobacteria phage lambda] gene 57 protein [Enterobacteria phage Sf6] conserved domain protein [Escherichia coli B7A] conserved hypothetical protein, Protein ninH from phage origin [Escherichia fergusonii ATCC 35469] Protein ninH [Escherichia coli BW2952] RecName: Full=Protein ninH Nin 68 (pept unknown;68) [Enterobacteria phage lambda] gene 57 protein [Enterobacteria phage Sf6] conserved domain protein [Escherichia coli B7A] conserved hypothetical protein, Protein ninH from phage origin [Escherichia fergusonii ATCC 35469] Protein ninH [Escherichia coli BW2952]		1
<input type="checkbox"/>	XP_002271934	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]		1
<input type="checkbox"/>	ZP_04372568	polyketide synthase family protein [Catenulispora acidiphila DSM 44928] polyketide synthase family protein [Catenulispora acidiphila DSM 44928]		1
<input type="checkbox"/>	YP_551616	beta-lactamase-like [Polaromonas sp. JS666] beta-lactamase-like [Polaromonas sp. JS666]	2	
<input type="checkbox"/>	YP_824099	Sec-independent protein translocase TatC [Solibacter usitatus Ellin6076] Sec-independent protein translocase TatC [Solibacter usitatus Ellin6076]	1	
<input type="checkbox"/>	YP_001890197	transposase IS66 [Burkholderia phytofirmans PsJN] transposase IS66 [Burkholderia phytofirmans PsJN]		1
<input type="checkbox"/>	YP_876526	Zn-dependent hydrolase [Cenarchaeum symbiosum A] Zn-dependent hydrolase [Cenarchaeum symbiosum A]	6	
<input type="checkbox"/>	AAD48372	unknown protein U5/1 [multiple sclerosis associated retrovirus element]		1
<input type="checkbox"/>	NP_943440	CobW [Klebsiella pneumoniae] hypothetical protein pK2044_00325 [Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044] CobW [Klebsiella pneumoniae] cobalamin synthesis related protein [Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044]		10
<input type="checkbox"/>	CAA63219	pva1 [Plasmodium vivax]		1
<input type="checkbox"/>	ZP_04058247	conserved hypothetical protein [Capnocytophaga gingivalis JCVIHMP016] conserved hypothetical protein [Capnocytophaga gingivalis JCVIHMP016]	1	
			57	53
Bmo ESTs			TM2448	TM7296
			0	0
<input type="checkbox"/>	BY944709	BY944709 e100 Bombyx mori cDNA clone E_FL_e100_14C04_R_0 3', mRNA sequence	2	
<input type="checkbox"/>	BY919715	BY919715 fcP8 Bombyx mori cDNA clone E_EL_fcP8_13G07_F_0 5', mRNA sequence	2	
<input type="checkbox"/>	CK502497	rswcc0_002296.y1 swc Bombyx mori cDNA, mRNA sequence	1	
<input type="checkbox"/>	CK493358	rswab0_012447.y1 swa Bombyx mori cDNA, mRNA sequence	4	
			9	0
			79	53

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)