DANIELA PERES ALMENARA

Estudo das vitelinas VT1 e YP170B dos
nematoides rabditídeos *Oscheius tipulae* e
Caenorhabditis elegans: aspectos
estruturais e funcionais

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter

São Paulo
2009

Resumo

ALMENARA, Daniela Peres. **Estudo das vitelinas VT1 e YP170B dos nematoides rhabditídeos *Oscheius tipulae* e *Caenorhabditis elegans*: aspectos estruturais e funcionais.** 2009. 135 p. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os resultados apresentados neste trabalho elucidam aspectos estruturais e funcionais da proteína OTI-VIT- 1 e do gene *Oti-vit-1*, um dos genes de vitelogenina do nematoide de vida livre *Oscheius tipulae*. A região N-terminal de OTI-VIT-1 foi expressa em *E. coli* e os polipeptídeos recombinantes PVIT1HisN e PVIT1HisC foram purificados das frações correspondentes a corpos de inclusão. Alinhamentos realizados com a sequência parcial de OTI-VIT-1 mostraram que a região N-terminal possui maior similaridade com a sequência da vitelina YP170B de *C. elegans* do que com a região N-terminal de OTI-VIT-6. As sequências obtidas da porção carboxi-terminal também puderam ser alinhadas com YP170B, porém com menor similaridade. Também foi possível a identificação de um íntron na região 5' e dois na região 3' do gene *Oti-vit-1*. Soro monoespecífico produzido contra PVIT1HisC confirmou que o gene *Oti-vit-1* codifica VT1. Também mostramos neste trabalho a interação entre o polipeptídeo recombinante P40-H, correspondente à região N-terminal da proteína OTI-VIT-6, com um polipeptídeo de aproximadamente 100 kDa (P100) presente em extratos proteicos totais de *O. tipulae* através da técnica de *ligand-blotting*. Trabalhos anteriores haviam mostrado que P100 é uma proteína de membrana presente apenas em vermes adultos. Para melhor compreender a fisiologia da vitelogênese em nematoides, estudamos também a interação entre a Proteína Microsômica Transportadora de Triglicérides (MTP) e a biossíntese de Vitelogenina em *C. elegans*, utilizando a metodologia de RNAi. Ensaio de interferência ambiental com bactérias expressando parte da sequência do gene da MTP (*Cel-dsc-4*) foram realizados em vermes das linhagens N2 (selvagem) e DH1033. Análises de microscopia de fluorescência mostraram acúmulo de YP170B::GFP no interior das células do intestino dos vermes da linhagem DH1033 que sofreram *knockdown* dos RNAs mensageiros de *Cel-dsc-4*. Este acúmulo sugere a participação da MTP na secreção de vitelogenina. Soros monoespecíficos contra as regiões N-terminal e C-terminal do precursor CEL-VIT-6 permitiram a análise do processamento da VTG em vermes *knockdown*. Não foram detectadas alterações nesse processamento, sugerindo que o mesmo ocorra não só no pseudoceloma, mas também no interior dos enterócitos.

Palavras-chave: *Caenorhabditis elegans*. *Oscheius tipulae*. Vitelogenina. MTP. RNAi. Ligand-blotting.

Abstract

ALMENARA, Daniela Peres. **Structural and functional analysis of VT1 and YP170B vitellins from the Rhabditid nematodes *Oscheius tipulae* and *Caenorhabditis elegans***. 2009. 135 p. Ph. D. Thesis (Biology of Host-Pathogen Interaction) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The results presented in this work elucidate some structural and functional aspects of OTI-VIT-1, coded by *Oti-vit-1*, one of the vitellogenin genes of the free-living nematode *Oscheius tipulae* (strain CEW1). The N-terminal portion of this protein was expressed in *E.coli* and the resulting recombinant polypeptides (pVIT1HisN and pVIT1HisC) were, as expected, present in inclusion bodies. Alignments of the aminoacid sequences showed that the N-terminal portion of OTI-VIT-1 is more similar to the N-terminal portion of YP170B than the N-terminal portion of OTI-VIT-6. Sequence analysis also allowed the identification of three introns in the *Oti-vit-1* gene. Monospecific polyclonal antibodies against the recombinant polypeptides were raised in mice and used to show that the *Oti-vit-1* gene codes for the yolk polypeptide VT1. We also show here that P100, a 100kDa polypeptide present in *O. tipulae* extracts specifically binds fluorescein labelled P40H, a recombinant polypeptide that corresponds to the N-terminal portion of the yolk polypeptide VT3. Previous work showed that P100 is a vitellin-binding membrane protein present only in adult worms of *O. tipulae*. Using RNA interference (RNAi) we studied the involvement of Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP/DSC-4) in the secretion of VTG in *Caenorhabditis elegans*. Wild type worms (strain N2) and transgenic worms (strain DH1033) expressing the hybrid protein YP170B-GFP were exposed to *dsc-4* dsRNA. Fluorescence analysis shows YP170B::GFP accumulation in the enterocytes cytoplasm in knockdown DH1033 worms. This accumulation suggests that the vitellogenin transport from the gut cells to the pseudocoelom depends on the presence of DSC-4. Monospecific antisera against two recombinant polypeptides corresponding to N- and C-terminal regions (YP88 and YP115, respectively) of the precursor CEL-VIT-6 were raised in mice and used to analyze precursor accumulation and processing in knockdown worms. Western blots using the YP88 and YP115 monospecific antisera on *Cel-dsc-4* knockdown worms did not show the expected accumulation of the precursor, strongly suggesting that the processing of CEL-VIT-6 can also occurs inside the intestinal cells.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*. *Oscheius tipulae*. Vitellogenin. MTP. RNAi. Ligand-blotting.

1 Introdução

1.1 Nematoides

O Filo Nematoda é um grupo numeroso e diversificado de metazoários, cujas espécies apresentam características morfológicas comuns, como o corpo alongado e cilíndrico, além da presença de um pseudoceloma (WOOD, 1988). Essa aparente simplicidade morfológica esconde, no entanto, uma ampla variedade de estruturas especializadas presentes na anatomia desses animais, como por exemplo os aparelhos bucais e as ornamentações da cutícula. Essa diversidade dentro do filo está intimamente relacionada às características biológicas e ecológicas (DE LEY, 2006). Existem espécies de vida livre (terrestres e aquáticos) e parasitas, sendo as últimas encontradas tanto em hospedeiros animais (vertebrados e invertebrados) quanto em plantas. O total de espécies é estimado entre 100.000 e 1.000.000 (LAMBSHEAD, 1993).

Nematoides de vida livre encontram-se distribuídos de forma cosmopolita, adaptados a diferentes condições ambientais, incluindo as mais extremas. Espécies do gênero *Cryonema* habitam fendas no gelo ártico (TCHESUNOV e RIEMANN, 1995), enquanto representantes da subfamília Stilbonematinae são encontrados em sedimentos marinhos altamente redutores, com altíssimos níveis de enxofre (NUSSBAUMER et al., 2004). Essas espécies de vida livre ocupam principalmente o nicho de recicladores de nutrientes, fornecendo uma ligação entre os produtores e saprófitos e as guildas de predadores (BLAXTER, 2003).

O sucesso das espécies parasitas é tão amplo quanto o de seus parentes de vida livre. Estima-se que a grande maioria das espécies de vertebrados terrestres possua ao menos uma espécie de nematoide parasita associada (BUNDY, 1997). Nematoides parasitas de humanos são causadores de doenças que afetam cerca de 2,7 bilhões de pessoas em todo o mundo (HOTEZ et al., 2006; CANNING, 2006), atingindo particularmente crianças em idade escolar (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2004). Também a agricultura e a pecuária sofrem importantes danos com as infestações de nematoides. Parasitas de plantas do gênero *Meloidogyne* são os principais responsáveis por perdas em cultivos agrícolas em todo mundo, levando a uma perda aproximada de 80 bilhões de dólares americanos por ano (BARKER, 1994). Na

pecuária, estima-se que mais de 100 bilhões de dólares sejam perdidos por ano na criação de animais devido às infestações por endo e ectoparasitas (JASMER et al., 2003).

Uma relação ecológica bastante interessante também presente neste filo é a associação entre nematoides (chamados entomopatogênicos) e insetos. Esses vermes distribuem-se amplamente no solo e são capazes de invadir e matar larvas de insetos de diferentes ordens. Estas espécies entomopatogênicas possuem bactérias simbiotes que, ao se reproduzirem na larva infectada, promovem morte por septicemia (FORST et al., 1997).

A classificação dos nematoides tradicionalmente se baseava em características morfológicas e morfométricas, com os dados obtidos majoritariamente em análises de microscopia de luz (DE LEY, 2006). A primeira grande análise filogenética utilizando dados moleculares foi realizada por Blaxter e colaboradores (1998). Nesse estudo, foram avaliados os graus de semelhança entre as sequências da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rDNA) de 53 espécies. Apenas sete anos depois, estão disponíveis em bancos de dados públicos sequências de SSU rDNA de mais de 600 espécies de nematoides. Filogenias mais recentes, incluindo essas novas sequências, classificam os nematoides em três subclasses: Cromadoria, Enoplia e Dorilaíma (Figura 1), porém os dados ainda não são suficientes para a determinação da época de surgimento desses grupos (DE LEY, 2006).

Figura 1. Classes do Filo Nematoda. Análise filogenética baseada nas sequências da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU-RNA) incluindo exemplos de gêneros e nicho ecológico.

Wasmuth e colaboradores (2008) realizaram um estudo detalhado de ESTs (Expression Sequence Tags) de 37 espécies de nematoides, a maioria delas de hábito parasita, e definiram a presença de cerca de 120.000 genes distintos, todos eles traduzidos.

Análises proteômicas dessas proteínas putativas combinadas com os dados dos proteomas das espécies de vida livre *Caenorhabditis elegans* e *Caenorhabditis briggsae* sugerem a existência de genes exclusivos do filo e outros exclusivos de espécies parasitas, provavelmente obtidos por transferência horizontal de seus hospedeiros. Esses genes são, portanto, importantes assinaturas do surgimento do parasitismo dentro do filo.

A subclasse Enoplia compreende espécies aquáticas e de solos úmidos, a maioria predadora, não havendo espécies parasitas. Possuem estruturas envolvidas na predação, como dentes e ganchos na região anterior do corpo, além de um sistema sensorial bastante desenvolvido. Apresentam características comumente classificadas como ancestrais no filo, como formas de desenvolvimento variadas e retenção do envelope nuclear nos espermatozoides maduros (DE LEY, 2006).

Os membros da subclasse Dorilaimia são, provavelmente, os primeiros nematoides a conquistarem habitats de águas-doces e terrestres. É uma subclasse com grande diversidade, incluindo espécies de vida livre (predadores e onívoros) e parasitas, incluindo causadores de parasitoses humanas, como os do gênero *Trichuris*.

Na subclasse Cromadoria são incluídas espécies notavelmente menores que os Enoplia e os Dorilaimia. O tamanho reduzido é provavelmente correlacionado ao hábito bacteriívoro e às altas taxas de reprodução, comuns à grande parte das espécies classificadas nesse grupo. São amplamente distribuídas tanto em sedimentos marinhos quanto terrestres.

A cutícula dos Cromadoria é estruturada de forma mais complexa que nas outras subclasses, muitas vezes apresentando ornamentações. A presença de cutícula quimicamente impermeável na ordem Rhabditida contribuiu significativamente para a conquista de ambientes hostis, e espécies dessa ordem são bem sucedidas como parasitas e colonizadores, incluindo aqueles extremófilos (DE LEY, 2006). As espécies *Caenorhabditis elegans* e *Oscheius tipulae*, utilizadas neste trabalho, pertencem à ordem Rhabditida (**Figura 2**).

1.2 *Caenorhabditis elegans* e *Oscheius tipulae*

Caenorhabditis elegans é um nematoide de vida livre encontrado em diversas regiões do mundo. Alimenta-se de microorganismos, primariamente de bactérias. Ocorre em solos férteis normalmente no estágio de larva *dauer*, uma forma de resistência que não se alimenta ativamente e possui metabolismo desacelerado, permitindo a sobrevivência do verme a condições de estresse (WOOD, 1988).

Extraído e modificado de De Ley, 2006

Figura 2. Ordem Rhabditida. Análise filogenética baseada nas sequências da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU-RNA) incluindo exemplos de gêneros e nicho ecológico. Destaque para os gêneros *Caenorhabditis* e *Oscheius*.

Populações de *C. elegans* em condições ativas de alimentação e reprodução são frequentemente isoladas de frutas em decomposição, mas pouco se sabe sobre as condições de habitat natural desses animais (KIONTKE, 2008). A linhagem referência da espécie é N2, isolada em Bristol, no Reino Unido na década de cinquenta e congelada por John Sulston em 1969 (BRENNER, 1974).

Oscheius tipulae é também uma espécie de vida livre pertencente, como *C. elegans*, à família Rhabditidae, do clado Rhabditina, que inclui tanto representantes de vida livre quanto espécies parasitas de vertebrados e invertebrados (PARKINSON et al., 2004). *O. tipulae* foi encontrado inicialmente associado a larvas do díptero *Tipula paludosa* (BAÏLE et al., 2008), no entanto, a linhagem CEW1, isolada por Winter (1992) do solo da cidade de São Paulo foi considerada por Dichtel-Danjoy e Félix (2004) como sendo a linhagem-referência da espécie. Amostras selvagens deste

nematoide podem ser facilmente isoladas do solo em diferentes regiões do mundo, possibilitando estudos de genética de população e microevolução (FÉLIX, 2006).

A definição da espécie *O. tipulae* é recente (DICTHTEL-DANJOY e FÉLIX, 2004). Sendo assim, esse animal aparece em outros trabalhos com denominações distintas: *Dolichorhabditis* sp. (WINTER, 1992; EVANS et al., 1997), *Oscheius n. sp.* (WINTER et al., 1996; PENHA-SCARABOTTO, 1999; SOMMER, 2000; DICTHTEL et al., 2001; LEE e SOMMER, 2003; LOUVET-VALLÉE et al., 2003) e *Rhabditis (Oscheius) pseudodolichura* (AKAMINE, 2001; FÉLIX, 2001; WINTER, 2002).

A anatomia de *C. elegans* e *O. tipulae* é bastante semelhante. Ambas as espécies possuem um padrão corporal típico de todos os nematoides: cilíndrico e não-segmentado. Internamente, os órgãos podem ser agrupados em dois tubos principais, separados pelo pseudoceloma. O tubo mais externo compreende cutícula, hipoderme, sistema excretor, neurônios e músculos, enquanto o tubo interno inclui faringe, intestino e gônadas (ALTUN e HALL, 2006) (**Figura 3**).

Figura 3. Anatomia e morfologia de *Caenorhabditis elegans* : hermafrodita adulto. Acima, microscopia de contraste de interferência diferencial (Nomarski), vista lateral com dois ovos. Abaixo, esquema da anatomia interna. A seta dupla indica o eixo antero-posterior do animal.

Como diferenças notáveis, *O. tipulae* possui apenas um bulbo na faringe, enquanto *C. elegans* possui dois. Também podem ser notadas diferenças na linha lateral da cutícula desses animais, quando observados por microscopia eletrônica de varredura (**Figura 4**).

Tanto *C. elegans* quanto *O. tipulae* são hermafroditas protândricos que se autofertilizam, pois um único indivíduo é capaz de produzir espermatozóides e ovócitos. Também são encontrados indivíduos machos na natureza, porém a frequência é bastante baixa (cerca de 0,1% da população). O componente haplóide de ambas as espécies apresenta seis cromossomos: cinco autossomos e um cromossomo sexual. A linhagem somática diplóide dos hermafroditas possui dois cromossomos sexuais (XX), enquanto os machos (X0) são resultado de não-disjunção, dos cromossomos sexuais, na

Extraído e modificado de <http://www.icb.usp.br/~cewinter/sem.html>

Figura 4. Eletromicrografia de *Oscheius tipulae* (CEW1) e *Caenorhabditis elegans* (N2). Morfologia externa da região anterior (acima) e da parede do corpo (abaixo). A seta destaca a linha lateral. (Preparado por R. Turner Department of Biology, 1990 - Indiana University).

linhagem germinativa dos hermafroditas. Em condições de estresse, a porcentagem de não-disjunção, durante as meioses, pode ser aumentada, resultando em frequências maiores de machos nas populações.

O ciclo de vida das duas espécies é bastante curto, durando cerca de três dias em condições ótimas de temperatura (22 °C – 25 °C). Temperaturas mais baixas permitem que o ciclo ocorra de forma mais lenta. O ciclo é composto de uma fase embrionária seguida de quatro estádios larvais (L1-L4) e da fase adulta (**Figura 5**). O final de cada estágio larval é marcado por uma muda de cutícula, que apresenta características estruturais e de composição protéica estágio-específicas (WHITE, 1988). O adulto coloca ovos por cerca de quatro dias e vive aproximadamente 15 dias (WOOD, 1988).

As sequências-líder de “trans-splicing” SL1 e SL2 diferem entre as duas

espécies, mostrando que *O. tipulae* está mais distante de *C. elegans* do que *Caenorhabditis briggsae*, uma outra espécie-modelo pertencente à ordem Rhabditida. Os genes de SL1-RNA em *O. tipulae* não se encontram agrupados em um único conjunto (*cluster*), como em *C. elegans*. Tanto *C. elegans* como *O. tipulae* possuem *operons*, sendo os dois primeiros metazoários em que esse arranjo gênico foi descrito (EVANS et al., 1997).

Figura 5. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. Os tempos informados são relativos ao momento da fertilização. O tamanho de cada um dos estádios larvais está indicado ao lado dos esquemas em micrômetros. Notar a via de entrada no estágio de resistência “dauer”.

O uso de nematoides de vida livre como modelos animais teve seu mais importante impulso por volta de 1963, quando Sydney Brenner propôs a utilização de *C. elegans* para estudos de neurobiologia. Algumas características dessa espécie, tais como simplicidade anatômica (o adulto apresenta 959 células), corpo e ovos transparentes, autofertilização e facilidade de cultivo o tornavam especialmente adequado para este tipo de investigação (WOOD, 1988). No ano de 2002, Brenner recebeu o prêmio Nobel pela criação da pesquisa moderna com *C. elegans* (BRENNER, 1974), juntamente com Robert Horvitz, que descobriu o mecanismo molecular da morte celular programada e John Sulston, que definiu as linhagens celulares e construiu um mapa físico do genoma desse organismo (SULSTON e HORVITZ, 1977). Hoje, o uso de modelos em substituição ao estudo direto de espécies parasitas é uma ferramenta

poderosa, e resolve questões tanto práticas quanto éticas dessa área do conhecimento (BRITTON e MURRAY, 2006).

A sequência genômica completa de *C. elegans* foi publicada no final da década de 90 (THE *C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM, 1998), o que motivou e impulsionou ainda mais os estudos com este nematoide. *C. elegans* possui um genoma bastante compacto (aproximadamente 100 Mpb), equivalente a apenas vinte vezes o genoma da bactéria *Escherichia coli* (4,6 Mpb). A publicação do genoma de um segundo rhabditídeo – *Caenorhabditis briggsae* - confirma a tendência de estudar outras espécies de nematoides de vida livre para o estabelecimento de novas espécies-modelos (GUPTA e STERNBERG, 2003). Comparações entre os dados dos genomas de *C. elegans* e *C. briggsae* consistem uma importante ferramenta para a compreensão das bases genéticas que determinam as características compartilhadas por esses dois nematoides, que possuem anatomia, ecologia e modo de reprodução muito semelhantes. Estudos desse tipo são responsáveis por apontar as taxas de evolução e a função de genes e vias metabólicas nessas espécies, além de sugerir padrões evolutivos comuns dentro do filo (COGHLAN et al., 2006). Mapeamentos genéticos feitos com base em polimorfismo de um único nucleotídeo revelaram um alto grau de conservação entre as sequências de *C. elegans* e *C. briggsae*, bem como uma organização cromossômica semelhante (HILLIER et al., 2007). Esses resultados apontam para a necessidade de estudar nematoides menos relacionados a *C. elegans*, permitindo comparações mais informativas.

Além dos dados de sequência gerados no projeto genoma, *C. elegans* tem sido utilizado em estudos de padrão de expressão gênica com genes repórteres, como o gene da β -galactosidase (LacZ) e da proteína verde fluorescente (GFP – Green Fluorescent Protein) (FIRE et al., 1990; CHALFIE et al., 1994). Essa técnica é facilitada pela transparência do corpo e dos ovos e pela pequena espessura dos vermes (aproximadamente 75 μ m de diâmetro numa secção transversal), que permite a observação das proteínas repórteres nos organismos, sem necessidade de dissecação. Também por esses motivos é possível o uso de microscopia por contraste de interferência diferencial para os estudos com esses animais. *C. elegans* é também um importante instrumento para o estudo de promotores (DUPUY et al., 2004; REECE-HOYES et al., 2007; MARTINEZ et al., 2008), triagem de novas drogas e compostos bioativos (JONES et al., 2005), obtenção de linhagens transgênicas (ZHANG et al.,

2008a) e identificação de mutações em genes relacionados a doenças, envelhecimento e obesidade (SILVERMAN et al., 2009; COLLINS et al., 2008; ASHRAFI, 2007).

O. tipulae, pertencente a uma subfamília diferente de *C. elegans*, tem sido utilizado como modelo complementar, embora seu genoma ainda não tenha sido sequenciado.

Recentemente, foram mostradas diferenças no desenvolvimento da vulva de *O. tipulae* em comparação com *C. elegans* (DICHTEL-DANJOY e FÉLIX, 2004). No nível molecular, nosso grupo vem mostrando diferenças entre *C. elegans* e *O. tipulae* quanto ao número de genes e introns (WINTER et al., 1996; AKAMINE et al., 2008), no conteúdo de GC no DNA genômico e no tamanho do genoma (AHN e WINTER, 2005, 2006). Através da comparação de sequências obtidas de diferentes isolados de *C. elegans* e *C. briggsae* com aquelas de isolados de *O. tipulae*, pode se observar uma diversidade cerca de 5 vezes maior em polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) do que quando as duas primeiras espécies são comparadas entre si. Além disso, *O. tipulae* apresenta diferenças importantes entre as sequências de isolados de diferentes regiões geográficas, diferentemente de *C. elegans* (BAÏLLE et al., 2008).

1.3 Interferência de RNA (RNAi) em Nematoides

O fenômeno de interferência mediada por dsRNA (RNAi) foi observado inicialmente em plantas, sendo chamado na época de cossupressão, devido ao fato de ocorrer silenciamento tanto dos transgenes estudados quanto dos genes endógenos correspondentes (NAPOLI et al., 1990; van der KROL et al., 1990). A revisão desses resultados, anos depois, confirmou tratar-se realmente de um silenciamento gênico produzido por moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) (KOOTER et al., 1999; CHUANG e MEYEROWITZ, 2000). Hoje, é sabido que a RNAi ocorre em diversos grupos, de fungos a mamíferos (PLASTERK e KETTING, 2000).

Em 1998, o trabalho de Fire e colaboradores. demonstrou que *C. elegans* é um importante modelo para estudos de função gênica através de RNAi. Nesse trabalho, a introdução de dsRNA no verme resulta na inativação específica do gene correspondente através da degradação do RNA mensageiro endógeno. A interferência pode ser alcançada tanto por injeção de uma solução contendo dsRNA quanto pela alimentação

dos vermes com bactérias que expressam o dsRNA do gene em questão (TIMMONS e FIRE, 1998). Sabe-se, também, que *C. elegans* pode captar moléculas de RNA dupla-fita do ambiente, as quais desencadeiam o processo de interferência (TABARA et al., 1998), sendo assim, pode-se utilizar um terceiro método de entrega das moléculas de dsRNA, a imersão (**Figura 6**). Acredita-se que, *in vivo*, a degradação de moléculas de RNA mensageiro específicas através da ativação de uma via dependente de dsRNA tenha um papel na proteção do organismo contra infecções virais e inserção de elementos transponíveis na linhagem germinativa (WILKINS et al., 2005).

Em *C. elegans*, o silenciamento gênico induzido por dsRNA é sistêmico, atingindo todas as células do corpo do animal e sua progênie. Atualmente, sabe-se que esses efeitos não são obtidos da mesma maneira nas diferentes espécies do gênero *Caenorhabditis*, sendo algumas dessas espécies refratárias aos efeitos sistêmicos da interferência como um todo (*C. brenneri*) e outras somente aos efeitos desencadeados pela ingestão ou captação do ambiente das moléculas dupla-fita (*C. briggsae*, *C. remanei*) (WINSTON et al., 2007). Espécies de vida livre do gênero *Panagrolaimus* também respondem à RNAi, como mostrado por Shannon et al., 2008, demonstrando assim a existência do fenômeno em nematoides pertencentes a uma subordem diferente da de *C. elegans*.

Figura 6. Diferentes métodos para RNAi em *C. elegans*: após seleção do gene de interesse, as moléculas de dsRNA podem ser transcritas *in vitro*, sendo entregues ao animal por injeção ou imersão ou por células bacterianas transformadas, sendo entregues por alimentação.

A resposta à interferência por dsRNA em espécies parasitas ainda é pouco estudada e não foi encontrada nos organismos testados até o momento (FÉLIX, 2008). Ainda não é conhecida a maneira como o sinal de silenciamento é transportado para as diferentes células e tecidos, mas há indícios que sejam pequenas moléculas de dsRNA, provavelmente siRNAs (small interference RNAs), obtidos a partir da clivagem de dsRNAs maiores pelo complexo enzimático DICER. Essas pequenas moléculas seriam transportadas entre as células do intestino (através da proteína receptora SID-2) e levadas ao líquido pseudocelomático através de transporte passivo por um canal de dsRNA, SID-1, de onde podem ser endocitadas por células da linhagem germinativa ou da musculatura (FEINBERG e HUNTER, 2003; WINSTON et al., 2002).

Tecidos que não expressam SID-1 são incapazes de receber o sinal da RNAi iniciado em outros tecidos. No entanto, se a interferência tem início em um tecido sem SID-1, é possível observar a exportação desse sinal de interferência para outras células, apontando para a existência de outros mecanismos, independentes de SID-1, envolvidos na disseminação da RNAi por todo o indivíduo (JOSE et al., 2009).

Células nervosas e de musculatura lisa são mais refratárias à interferência, porém é possível obter resultados de silenciamento (FIRE et al., 1998; TAVERNARAKIS et al., 2000; ESPOSITO et al., 2005).

A via de RNAi em *C. elegans* (**Figura 7**) inicia-se com a clivagem de uma molécula longa de dsRNA em moléculas menores, com aproximadamente 21 nucleotídeos, os chamados siRNAs. As moléculas longas de dsRNA podem ter origem exógena ou podem originar-se dentro da célula, como é o caso de transcritos bidirecionais ou transcritos com estrutura secundária complexa (OTHA et al., 2008). *C. elegans* possui diversos micro-RNAs endógenos, sugerindo que a regulação de expressão gênica via maquinaria de RNAi ocorre naturalmente, em escala genômica (AMBROS et al., 2003).

A clivagem é realizada por um complexo denominado DICER, que contém uma RNase III específica para dsRNA, uma proteína ligadora de RNA (RDE-4), uma helicase (DRH-1) e RDE-1 (STEINER et al., 2009). Os siRNAs gerados são transferidos para o complexo ribonucleoprotéico RISC (RNA-Induced Silencing Complex), provavelmente através da proteína RDE-1. O complexo RISC ativado (RISC+siRNA) reconhece e degrada a molécula de mRNA alvo.

Figura 7. Via de RNAi em *C. elegans*: clivagem do dsRNA pela DICER e ativação do complexo RISC, que leva à clivagem do mRNA da sequência-alvo.

Tentativas realizadas pelo grupo da Dra Marie-Anne Félix (2008) indicam que *Oscheius tipulae* não apresenta silenciamento de genes em decorrência da injeção de dsRNA, exceto para o gene *Oti-lin-39*, silenciado na presença de morfolinós injetados diretamente no sincício da gônada (LOUVET-VALLÉE et al., 2003; FÉLIX, 2008).

1.4 Vitelogenina: biossíntese, genes e polipeptídeos

Para os nematoides, assim como para outros grupos animais, o sucesso na ocupação de um ambiente depende estreitamente da eficiência reprodutiva da espécie. Assim, o conhecimento dos mecanismos envolvidos nas diferentes etapas do processo reprodutivo é importante para o estabelecimento de novas técnicas para o estudo e o controle de espécies desse filo (BOWES e PATHIRANA, 2002). Uma etapa reprodutiva bastante importante é o acúmulo de reservas (proteínas, lipídios, carboidratos, etc.) nos ovos, num processo denominado vitelogênese. O conjunto de recursos energéticos contidos no ovo é denominado vitelo e seu principal componente é uma proteína denominada vitelina (VT). Na maioria dos animais ovíparos, as vitelinas derivam de

uma lipofosfoglicoproteína precursora denominada vitelogenina (VTG), que pode ter de 200 a 700kDa (LIM et al., 2001). A VTG participa também do transporte de íons metálicos e serve de reserva de aminoácidos e fosfato (em insetos e mamíferos), carboidratos, sulfato, hormônios e vitaminas em outros grupos animais (BYRNE et al., 1989; DHADIALLA e RAIKHEL, 1990; BASNASAK et al., 1991; MONTORZI et al., 1994; SAPPINGTON et al., 2002). Sintetizada em órgãos derivados da endoderme, tais como fígado (vertebrados), corpo gorduroso (insetos) e intestino (nematóides) (WALLACE, 1985; WAHLI, 1988; BYRNE et al., 1989; TELFER e WOODRUFF, 2002; GRANT e HIRSH, 1999), a VTG é internalizada pelos ovócitos via endocitose mediada por receptores (SCHNEIDER, 1996), e é estocada na forma de grânulos de vitelo, podendo ou não sofrer algum tipo de processamento nesse momento. As VTGs já foram amplamente estudadas em diversas espécies animais, incluindo vertebrados e invertebrados. Sua síntese, nos vertebrados, é controlada por estrógeno (WALLACE, 1985; WAHLI, 1988) e, nos insetos, pelo hormônio juvenil e pela ecdisona (DHADIALLA e RAIKEL, 1990). Nos nematóides rhabditídeos, ainda não foi elucidado o controle da vitelogênese. A expressão dos genes de VTG nos protostômios já estudados é controlada por hormônios (WINTER, 2002), mas os trabalhos de Shibata et al. (2003) e Kurzchalia e Ward (2003) sugerem que o colesterol pode estar envolvido no controle dos níveis de expressão de lipoproteínas em vermes.

Em geral, a síntese de VTG ocorre exclusivamente em fêmeas ou hermafroditas adultos, mas machos de algumas ordens de inseto e de equinodermos também são capazes de sintetizar essa proteína em pequenas quantidades (MASUDA e OLIVEIRA, 1995; YOKOTA e SAPPINGTON, 2002; TUFAIL e TAKEDA, 2008a). Além disso, a exposição a compostos que mimetizam o efeito do estrógeno (xenoestrógenos) resulta na síntese de VTG por machos de algumas espécies de peixes (CHRISTIANSEN et al., 1998; ROUTLEDGE et al., 1998; LATONNELLE et al., 2002; ARAVINDAKSHAN et al., 2004; ZHANG et al., 2009) e répteis (JANEIRO-CINQUINI, 1999).

Os genes de VTG pertencem a uma ampla família multigênica (2-6 genes) conservada em vertebrados e invertebrados (BYRNE et al., 1989; CHEN et al., 1997; WANG et al., 2000). Estes genes atuam de maneira dose-dependente, ou seja, há uma correlação direta entre o número de cópias de genes de VTG e a produção de vitelo. Em vertebrados, por exemplo, peixes tendem a possuir múltiplas cópias de genes *vit* e isso acarreta na produção de muitos ovos em pouco tempo, diferentemente do que ocorre em

aves e répteis, que possuem poucas cópias de genes que codificam para VTGs (BUISINE et al., 2002). A perda dos genes *vit* em mamíferos está associada ao desenvolvimento da placenta e da lactação, mas a ordem dos Monotremos, que ainda realiza a postura de ovos, possui um único gene *vit* ativo. (BRAWAND et al., 2008).

Vários motivos de sequências conservados já foram identificados em ortólogos dos genes de VTG e também em genes de lipoproteínas não-vitelogênicas (LIM et al., 2001). Embora a similaridade completa entre as vitelogeninas de invertebrados e vertebrados seja baixa, cinco subdomínios amino-terminais (**Figura 8**) são notados entre as sequências analisadas até o momento (SAPPINGTON, 2002). A posição dos resíduos de cisteínas é altamente conservada nessas regiões (NARDELI et al., 1987), provavelmente devido à participação desses aminoácidos na manutenção da estrutura tridimensional da molécula, através de pontes dissulfeto (SHARROCK et al., 1990).

Figura 8. Representação esquemática da estrutura primária de algumas vitelogeninas de invertebrados e vertebrados. As regiões de maior similaridade estão indicadas nos blocos numerados de I a V. Os domínios ricos em serinas estão indicados pela letra S. Os sítios de clivagem estão indicados através da sua sequência de aminoácidos abaixo das barras esquemáticas. O número final de cada representação indica o número de aminoácidos de cada sequência.

Em *C. elegans*, a família dos genes codificadores de VTG é composta por seis genes (*Cel-vit-1*, *Cel-vit-2*, *Cel-vit-3*, *Cel-vit-4*, *Cel-vit-5* e *Cel-vit-6*) numerados por ordem de caracterização (BLUMENTHAL et al., 1984). Com exceção de *Cel-vit-6*, localizado no cromossomo IV, os demais genes encontram-se localizados no cromossomo X (HEINE e BLUMENTHAL, 1986). Cada gene possui aproximadamente

5,0 Kb e contém um número pequeno de introns (quatro a cinco por gene), cada um dos introns com cerca de 60 pares de bases (BLUMENTHAL e STEWARD, 1997). Os genes de *C. elegans* que codificam um mesmo polipeptídeo de vitelo possuem o mesmo número de introns, e a localização dentro da sequência do gene é bastante similar (WINTER, 2002). São codificados quatro polipeptídeos: YP170A (170kDa), YP170B (170kDa), YP115 (115kDa) e YP88 (88kDa). Os genes *Cel-vit-1* e *Cel-vit-2* codificam o polipeptídeo YP170B, os genes *Cel-vit-3*, *Cel-vit-4* e *Cel-vit-5* codificam polipeptídeo YP170A e *Cel-vit-6* codifica o polipeptídeo precursor de YP115 e YP88. Todos os genes são expressos, porém em diferentes quantidades. Os níveis de expressão foram estimados através do número de clones de cDNAs obtidos durante o projeto genoma (WORMBASE, 2001) (**Figura 9**). Resultados obtidos por Spieth e colaboradores, (1995) indicaram a presença de um códon de terminação dentro da fase de leitura de *Cel-vit-1*, sugerindo tratar-se de um pseudogene. No entanto, a sequência anotada no banco de dados WormBase (2001) é transcrita como um mRNA com fase completamente aberta.

Figura 9. Esquema dos genes e polipeptídeos da VTG de *C. elegans*: a espessura dos retângulos pretos indica a proporção de cDNAs listados nos bancos de dados correspondentes ao gene indicado na frente. As setas indicam quais transcritos originam os produtos iniciais da tradução e as respectivas proteínas de vitelo geradas após processamento (modificado de Spieth et al., 1985)

A expressão de *Cel-vit-2* está sob controle direto do gene *Cel-mab-3* (*male abnormal*). Este gene é um dos membros a jusante (*downstream*) da cascata de genes envolvidos na determinação de sexo em *C. elegans*. Análises genéticas mostraram que *mab-3* está envolvido em reprimir a expressão de genes de VTG em machos.

Hermafroditas adultos, mutantes para o gene *mab-3*, possuem fenótipo selvagem, mas adultos machos com o mesmo tipo de mutação produzem vitelogenina, que se acumula na cavidade pseudocelomática (SHEN e HODGKIN, 1988). Experimentos utilizando linhagens transgênicas de *C. elegans* contendo o gene repórter *Cel-vit-2 :: GFP* mostraram que a proteína MAB-3 liga-se à região promotora de *Cel-vit-2*, impedindo sua transcrição (YI e ZARKOWER, 1999). Além do controle sexo-específico, os genes de VTG são regulados quanto ao tecido e ao estágio do desenvolvimento em que são expressos. Em *C. elegans*, duas sequências heptaméricas altamente conservadas (VPE1 e VPE2 – Vitellogenin Promoter Element) foram identificadas na região 5' não codificante dos genes de VTG (ZUCKER-APRISON e BLUMENTHAL, 1989; SPIETH et al., 1988). Experimentos com genes híbridos sob controle da região promotora dos genes *vit*, (incluindo os motivos VPE) mostraram que esta região dirige a expressão protéica de forma sexo, tecido e estágio-específica, seguindo o padrão dos genes *vit* nativos. Mutações nas regiões promotoras selecionadas afetaram as taxas de transcrição e a quantidade de YP115 sintetizada nos enterócitos. (SPIETH et al., 1988; MCMORRIS et al., 1992). VPE1 apresenta a sequência consenso TGTCAAT, similar ao “CCAAT box” de mamíferos e VPE2 possui a sequência consenso GTGATAA, similar ao sítio de ligação do fator de transcrição GATA, ativador de genes eritrócito-específicos em mamíferos (ORKIN, 1992). Até o momento, foram encontrados quatro fatores de transcrição do tipo GATA em *C. elegans*. ELT-1 (SPIETH et al., 1991), ELT-2 (HAWKINS e McGHEE, 1995), ELT-3 (GILLEARD et al., 1999) e END-1 (ZHU et al., 1997). Os genes *Cel-elt-1*, *Cel-elt-3* e *Cel-end-1* são transcritos em tecidos embrionários, enquanto *Cel-elt-2* é o fator de transcrição predominante nas células intestinais e está envolvido na diferenciação e função dessas células desde a embriogênese até a vida adulta (McGHEE et al., 2008).

Os polipeptídeos do vitelo de *C. elegans* foram inicialmente demonstrados por eletroforese tipo SDS-PAGE por Klass e colaboradores (1979) e encontram-se organizados em dois complexos: um heterotrímero composto por YP170A, YP115 e YP88 e um dímero formado por duas cadeias de YP170B (**Figura 10**). Esses complexos podem ser visualizados *in situ* por imunofluorescência indireta (SHARROCK, 1983), mostrando sua localização em grânulos citoplasmáticos, que se acumulam durante a maturação do ovócito. As cadeias YP115 e YP88 são originadas de um precursor único, clivado proteoliticamente. Na região do processamento desse precursor está presente o

par de aminoácidos básicos K-R, o que indica que processamento ocorra através de uma enzima do tipo pró-hormônio convertases (WINTER, 1996). Dados obtidos até o momento sugerem que esta clivagem ocorra no pseudoceloma (KIMBLE e SHARROCK, 1983). No entanto, a presença de mais de um tipo de convertase em *C. elegans* sugere a possibilidade de clivagem também nas células intestinais (ANDREONI-NICO, 2009).

O genoma de *C. elegans* apresenta quatro genes de pró-hormônio convertases. Esses genes (*Cel-kpc-1*, *Cel-kpc-2*, *Cel-kpc-3*, *Cel-kpc-4*) podem codificar até quatorze enzimas que estão compreendidas na família das KPCs (Kex2/subtilisin-like proprotein convertases). O maior número de enzimas pode ser explicado devido ao "splicing" alternativo dos mRNA desses genes (THACKER e ROSE, 2000). Todos os polipeptídeos da VTG de *C. elegans* são glicosilados (SHARROCK, 1983) e cerca de 15% do peso molecular as proteínas nativas corresponde a lipídeos. Na composição lipídica da VTG de *C. elegans* predominam fosfolipídeos e triacilgliceróis (SHARROCK et al., 1990).

Figura 10. Vitelogênese em *C. elegans*: dentro dos enterócitos estão indicados os genes, seus respectivos produtos proteicos e as VTGs nativas formadas. Após secreção para o pseudoceloma, CEL-VIT-6, precursor das vitelogeninas YP115 e YP88, é clivado. As vitelogeninas formadas por duas subunidades YP170B e pelas subunidades YP170A, YP115 e YP88 são, então, endocitadas pelos ovócitos em desenvolvimento, num processo mediado por receptores.

Em *Oscheius tipulae* (CEW1) até o momento foram mostrados dois genes de vitelogenina: *Oti-vit-6* e *Oti-vit-1*, sendo o último estudado no presente trabalho. *Oti-vit-6* já foi caracterizado e possui cinco pequenos introns, que variam em tamanho de 38 a 41 nucleotídeos. Apenas um desses introns possui localização na sequência do gene

semelhante à de *Cel-vit-6*. Os demais introns de *Oti-vit-6* encontram-se em posições diferentes do seu homólogo (WINTER et al., 1996; MOURA, 2004). A comparação entre *Oti-vit-6* e *Cel-vit-6* mostrou diferenças moleculares evidentes entre essas duas espécies: a utilização de codons é bastante diferente, existindo uma grande preferência em *Oti-vit-6* para o uso de nucleotídeos G ou C na terceira posição (72% dos codons) quando comparado a *Cel-vit-6* (59% dos codons) (WINTER et al., 1996). Esta parece ser uma característica geral do genoma de *O. tipulae*, pois os genes de eEF1A também apresentam uma preferência por C ou G na terceira posição de seus codons (AKAMINE e WINTER, 2008). Os codons utilizados nos genes de VTG de *C. elegans* (*Cel-vit-2*, *Cel-vit-5* e *Cel-vit-6*) exibem uma importante assimetria, por exemplo: no gene *Cel-vit-6*, o resíduo de prolina é codificado pelo codon CCA em 99% das sequências, enquanto o codon CCC é utilizado apenas 1% das vezes e os codons CCT e CCG não são utilizados. Tomando como exemplo também o resíduo de prolina no gene *Oti-vit-6*, temos 64% de uso do codon CCC comparados a 17% de CCT e 9% de CCA e CCG (WINTER et al., 1996).

No gene *Oti-vit-6*, existem cinco sequências VPE1 e não há nenhuma sequência VPE2. A localização das sequências VPEs encontradas difere daquelas observadas em *C. elegans*. No entanto, como em *C. elegans*, as VPEs de *O. tipulae* formam agrupamentos (*clusters*) de aproximadamente 150 pb a montante (*downstream*) do sítio inicial de transcrição do gene (WINTER et al., 1996).

Os genes de VTG de *O. tipulae* codificam três polipeptídeos: VT1 (175,2kDa), VT2 (107kDa) e VT3 (82kDa). Os polipeptídeos são ativamente sintetizados e secretados no meio de incubação pelo intestino do verme adulto (WINTER, 1992; WINTER, 2002). O gene *Oti-vit-6* codifica os polipeptídeos VT2 e VT3 na forma de precursor único, sendo os polipeptídeos individualizados posteriormente através da ação de uma convertase. VT3 corresponde à região amino-terminal do precursor e VT2 à região carboxi-terminal (MOURA, 2004). Também foi caracterizado o sítio de clivagem desse precursor, localizado entre o resíduo de arginina 754 e o resíduo de serina 755 (PENHA-SCARABOTTO, 1999; MOURA, 2004). O resíduo de alanina que precede o sítio de clivagem na VTG de *O. tipulae* é conservado em todas as vitelogeninas de nematoides rabditídeos já estudados, sugerindo que todas essas proteínas são clivadas nessa região (WINTER, 2002) (**Figura 11**). Até o presente momento não foram identificados genes que codificam pró-hormônio convertases em *O. tipulae*.

A sequência de aminoácidos do precursor OTI-VIT-6 apresenta um sítio potencial de O-glicosilação, localizado no polipeptídeo VT3 (**Figura 11**), segundo predição realizada com o programa NetOGlyc (JULENIUS et al., 2005).

Figura 11. Polipeptídeo OTI-VIT-6: no esquema está mostrado o sítio do processamento por pró-hormônio convertase que origina VT2 e VT3, entre os aminoácidos 754 e 755 (Penha-Scarabotto, 1999; Moura, 2004). Também está indicado um sítio de O-glicosilação (segundo Julenius et al, 2005) e cisteínas altamente conservadas entre as diferentes vitelogeninas (barras verticais). A barra superior indica as posições relativas e o tamanho do precursor em aminoácidos.

1.5 Vitelogenina e MTP

Vitelogeninas são membros ancestrais da superfamília das LLTPs (**L**arge **L**ipid **T**ransfer **P**roteins), que inclui também a apolipoproteína humana (Apo B), as proteínas microssômicas transportadoras de triglicerídeos (MTPs – **M**icrosomal **T**riglyceride **T**ransfer **P**rotein) e as lipoforinas de insetos (BABIN et al., 1999). Embora estas proteínas desempenhem diferentes funções, elas apresentam relações estruturais (**Figura 12**) e evolutivas. Análises filogenéticas baseadas no alinhamento dos 650 primeiros aminoácidos da região amino-terminal de diversas lipoproteínas mostraram que a apoB, as MTPs e as lipoforinas de insetos compartilham um ancestral comum com a VTG dos nematoides (MANN et al., 1999) (**Figura 13**). Representantes das LLTPs diferem significativamente quanto à quantidade e aos grupos de lipídeos capazes de se ligarem à estrutura dessas proteínas. MTPs e VTGs ligam-se principalmente a fosfolipídeos, enquanto apoB e lipoforinas ligam-se adicionalmente a diversos lipídeos neutros, na sua maioria triacilgliceróis (SMOLENAARS et al., 2007).

Estudos realizados com invertebrados, mostraram um panorama bastante

heterogêneo quanto à presença ou ausência dos membros das família das LLTPs nas diferentes espécies. No genoma de *Drosophila melanogaster*, não foi encontrado nenhum gene de VTG, corroborando resultados anteriores que apontavam uma lipase modificada como o principal componente do vitelo das espécies da ordem Diptera (SAPPINGTON, 2002), porém, estão caracterizados genes codificadores de MTPs e apolipoporinas I e II. Em crustáceos da ordem Decapoda, foi identificado um único tipo de VTG (RAVIV et al., 2006). Em contraste com as espécies destes grupos *C. elegans* apresenta em seu genoma genes codificadores de VTG e de MTP e não possui genes de apolipoporinas (SPIETH et al., 1985).

Figura 12. Estrutura da Lipovitellina de Lampréia (*Ichthyomyzon unicuspis*) e da subunidade maior da MTP humana. A estrutura da lipovitellina foi obtida através de cristalografia por raio-X. A estrutura da MTP foi deduzida por predição baseada em comparação de seqüências homólogas e análises funcionais. Abaixo, localização dos domínios na seqüência da lipovitellina de lampréia. Os números da barra indicam as posições dos aminoácidos na lipovitellina de lampréia.

A maioria das espécies (vertebrados e invertebrados) que possuem genoma totalmente sequenciado possui ao menos um gene que codifica uma MTP, sugerindo um papel importante dessa proteína em etapas conservadas do transporte intracelular de lipídeos. Além disso, a comparação do número de genes de LLTPs revela que, enquanto MTPs, apoB e apolipoporinas são codificadas por apenas um gene, VTGs apresentam uma família multigênica (SMOLENAARS et al., 2007).

Extraído e modificado de Babin et al, 1999.

Figura 13. Análise filogenética da superfamília das LLTPs baseada nas sequências dos motivos relacionados ao transporte de lipídeos, obtidas dos bancos de dados GenBank/EMBL e SwissProt. Os alinhamentos foram feitos com o programa Clustal W. (HIGGINS e SHARP, 1988, 1989).

MTPs fazem parte de um grupo bastante diverso de proteínas que, *in vitro*, possuem a propriedade de acelerar o transporte de moléculas lipídicas através de membranas. No entanto, o papel destas proteínas *in vivo* nem sempre é conhecido entre os diferentes organismos. Em humanos, sabe-se que a MTP atua no transporte de triacilgliceróis, colesterol e fosfolipídeos e que a deficiência desta proteína (mutação da subunidade maior) está ligada a quadros de abetalipoproteinemia, uma doença genética na qual os afetados praticamente não possuem lipoproteínas contendo apoB (BERRIOT-VAROQUEAUX et al., 2000). A MTP é ativa no retículo endoplasmático, onde atua em conjunto com uma isomerase de dissulfeto protéico: PDI (**P**rotein **D**issulfide **I**somerase), uma enzima/chaperonina da família das tioredoxinas, responsável pela montagem das pontes dissulfeto entre cisteínas adjacentes na estrutura terciária de proteínas (FINK, 1999).

Trabalhos com a MTP de *Drosophila melanogaster* revelaram que a MTP desta mosca possui a propriedade de promover a tomada e a secreção de apoB humana *in vitro* e em células transfectadas (SELLERS et al., 2003).

Em 2005, o trabalho de Sellers et al., mostrou que a MTP do anfíbio *Xenopus laevis* promove a secreção da VTG A1 deste animal, sugerindo que, além de possuírem semelhanças estruturais, pode haver correlação funcional entre estas proteínas.

Em nematoides rhabditídeos como *C. elegans* e *O. tipulae* não foram caracterizadas, até o momento, proteínas do grupo das MTPs. No entanto, no genoma de *C. elegans* há a anotação de um gene ortólogo, denominado *Cel-dsc-4* (*defecation suppressor of clk-1*) como sendo o possível codificador de uma MTP.

Estudos realizados por Shibata et al. (2003) mostraram que o silenciamento de *Cel-dsc-4* em *C. elegans* parcialmente suprime o fenótipo causado pela mutação no gene da biossíntese de ubiquinona (*Cel-clk-1*). Este mesmo efeito pode ser observado quando são silenciados alguns genes de vitelogenina, sugerindo a possibilidade de que a supressão do fenótipo *clk-1* por *dsc-4* está relacionada ao transporte de lipídeos e montagem de lipoproteínas como a VTG.

1.6 Receptores de Vitelogenina

A internalização de VTG pelos ovócitos ocorre por endocitose mediada por receptores clatrina-dependentes (CONNER e SCHMID, 2003). Nesse processo, após a interação ligante-receptor, o ligante é internalizado e uma vesícula revestida de clatrina é formada. Essas unidades endocíticas se fundem e podem apresentar diversos polipeptídeos associados, tais como epsina, dinamina, entre outros (MOUSAVI et al., 2004). Durante essa fusão, pode ocorrer dissociação do complexo ligante-receptor, normalmente devido à mudanças no pH. Os ligantes dissociados sofrem agregação e passam a ser alvos de endossomos tardios (GRANT e HIRSH, 1999). No caso da vitelogenina, esses endossomos modificados servirão como estruturas de armazenamento dessas moléculas dentro do ovócito: os grânulos de vitelo. Alguns receptores dissociados sofrem um processo de reciclagem citoplasmática, retornando à membrana da célula. Dados de Fares e Grant (2002) sugerem que esse processo de reciclagem ocorra com o receptor de VTG de *C. elegans*, pois esses receptores foram localizados, livres de vitelogenina, não apenas na membrana plasmática mas também na membrana interna de vesículas citoplasmáticas de ovócitos vitelogênicos.

Os receptores de VTG (VTGRs) são membros da família dos receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR – Low Density Lipoproteins Receptors) (BUJO et al., 1994). Os membros dessa família de receptores encontram-se na membrana plasmática das células, possuem ligantes variados e estão envolvidos no metabolismo de lipídeos em vertebrados e invertebrados (LI et al., 2003). No entanto,

outras funções diferentes da endocitose estão associadas a receptores de LDL, entre elas a participação em cascatas de transdução de sinal (SHANKARAN et al., 2007). Além de compartilharem características funcionais, os receptores de LDL, incluindo o VTGR, possuem características estruturais em comum, incluindo domínios com repetições ricas em cisteínas (associadas às interações com o ligante), repetições de domínios semelhantes ao precursor do fator de crescimento epidérmico (EGFP – **E**pidermal **G**rowth **F**actor **P**recursor), uma região caracterizada pela presença de açúcares O-ligados, um único domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática carboxi-terminal curta. (WILLNOW et al., 1999) (**Figura 14**). O número de repetições associadas à interação com o ligante varia de acordo com o receptor. O receptor de VTG de vertebrados, por exemplo, possui oito repetições (LI et al., 2003), enquanto o receptor de lipoforina de insetos apresenta duas formas: uma com sete repetições e outra com oito repetições (SEO et al., 2003). Receptores maiores, como o receptor do tipo megalina, possuem cerca de 30 repetições, agrupadas em alguns *clusters* (ORLANDO et al., 1997).

Extraído de Masuda e Winter, em preparação.

Figura 14. Esquema da estrutura primária de alguns membros da superfamília dos receptores de lipoproteínas. Notar a variação no número de domínios que ocorrem nos diferentes membros.

O domínio similar ao EGFP é o maior dos domínios presentes no VTGR, possuindo cerca de 400 aminoácidos. Experimentos de deleção desse domínio sugerem um envolvimento dessa região com a dissociação do ligante, dependente de pH. (SCHNEIDER, 1996).

O domínio de açúcar O-ligado é frequentemente enriquecido em resíduos de serina e treonina. Esta região serve de ponte de interação entre a porção extracelular e a intracelular do receptor (SCHNEIDER, 1996).

A porção transmembrânica é o menor domínio dos receptores de LDL e o mais conservado entre as espécies. Sua função é ancorar o receptor na membrana plasmática, além de sinalizar para o espaço intracelular a presença do ligante associado. Este domínio é responsável também pela localização do receptor em depressões da membrana plasmática revestidas por clatrina (SCHNEIDER, 1996).

Os receptores de VTG já foram identificados e caracterizados em vertebrados, incluindo aves (YUSKO et al., 1981; STIFANI et al., 1988; ELKIN et al., 1995), anfíbios (OPRESKO e WILEY, 1987; STIFANI et al., 1990; OKABAYASHI et al., 1996) e peixes (STIFANI et al., 1990; CHAN et al., 1991; TYLER e LANCASTER, 1993; NÚÑEZ RODRIGUES et al., 1996; TAO et al., 1996; MAÑAHÓS et al., 1997; LI et al., 2003; HIRAMATSU et al., 2004) e diferentes filos de invertebrados, incluindo artrópodes (SCHONBAUM et al., 1995; SAPPINGTON et al., 1995; CHO e RAIKEL, 2001; MITCHELL et al., 2007; TUFAIL e TAKEDA, 2007; GUIDUGLI-LAZZARINI et al., 2008; TIU et al., 2008), anelídeos (HAFFER et al., 1992) e nematoides (GRANT e HIRSH, 1999).

Em *Gallus gallus* (galinha doméstica), os receptores de VTG são multifuncionais, estando envolvidos no transporte de vitelogenina, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL – Very Low Density Lipoproteins), α -2-macroglobulina e lactoferrina para dentro dos ovócitos (BUJO et al., 1994, 1995). Outros estudos também apontam para o transporte de outras lipoproteínas e de lipases pelos receptores de VTG (SCHNEIDER, 1996). No entanto, em insetos a especificidade dos receptores pela VTG é a condição mais frequente (DHADIALLA et al., 1992; SAPPINGTON et al., 1996; TUFAIL e TAKEDA, 2009).

Grant e Hirsh (1999) demonstraram que a VTG de *C. elegans* entra nos ovócitos através de endocitose mediada por receptor. A utilização de linhagens expressando o polipeptídeo YP170B ligado à proteína fluorescente GFP, permitiu o isolamento de vermes mutantes com problemas na tomada de VTG e a identificação do gene codificador do VTGR desses vermes, que foi denominado *Cel-rme-2* (receptor mediated endocytosis – 2) (GRANT e SATO, 2006). A proteína CEL-RME-2 apresenta 925 aminoácidos e a massa molecular desse receptor é 106 kDa, semelhante à massa

molecular dos receptores de VTG de vertebrados, que possuem massa molecular entre 95 kDa e 115 kDa e menor que a massa dos receptores de VTG de insetos, com massa molecular entre 180kDa e 214kDa (SAPPINGTON e RAIKEL, 1995). Nos mutantes de *C. elegans* que não expressam o receptor de VTG é possível verificar o acúmulo de proteína na superfície dos ovócitos. Experimentos de RNAi mostraram que a progênie de vermes que não expressam RME-2 fica totalmente comprometida, havendo 100% de letalidade dos embriões, sugerindo que exista apenas um receptor e apenas um modo de entrada de VTG nos ovócitos (GRANT e HIRSH, 1999).

C. elegans apresenta um total de oito genes *rme* descritos (*Cel-rme-1 a Cel-rme-8*) A proteína CEL-RME-8 está envolvida em processos de endocitose de fase fluída e é expressa em diversos tipos celulares (ZHANG et al., 2001). CEL-RME-4 teve seu papel associado também a processos de endocitose de fase fluída e de reciclagem de receptores (SATO et al., 2003). CEL-REM-6 atua como regulador da atividade da GTPase RAB-5 em vesículas endocíticas revestidas por clatrina (SATO et al., 2005). CEL-RME-1 é expressa no citoplasma e na superfície de organelas endocíticas e provavelmente atua na reciclagem de componentes endocíticos (FARES e GRANT, 2002).

Em *Osccheius tipulae*, mostramos através da técnica de *Ligand-Blotting*, a presença de um polipeptídeo com aproximadamente 100kDa (P100) que interage com a VTG nativa desse verme. Essa interação ocorre somente em vermes adultos, estando ausente em ovos e larvas L1 (outros estádios do ciclo de vida onde a VTG está presente). A natureza hidrofóbica de P100 foi demonstrada através do fracionamento de extratos proteico totais de vermes adultos, sugerindo tratar-se de uma proteína de membrana. A interação só ocorre em preparações contendo β -mercaptoetanol, indicando que P100 pode ser parte de uma proteína maior, incapaz de migrar inteira em gel de poliacrilamida (T=10%) (SERINO-JR et al., 2008). Experimentos com polipeptídeos recombinantes, incluindo os apresentados neste trabalho, mostraram que a interação ocorre mais entre VT3 e P100 do que entre VT2 e P100. No entanto a natureza de P100 e sua confirmação como o receptor de VTG não foram concluídas (MOURA, 2004; SERINO-JR et al., 2008). Tentativas de isolar o gene do receptor de VTG de *O. tipulae* com base nas sequências dos receptores já caracterizados, incluindo *Cel-rme-2*, foram infrutíferas até o momento (MOURA, 2004).

5 Discussão

5.1 Vitelogenina de *Oscheius tipulae* (CEW1)

Em organismos ovíparos, a produção de ovos é um processo fundamentalmente importante para o sucesso reprodutivo. Ovos são sistemas fechados e, portanto, devem conter todos os nutrientes necessários para o completo desenvolvimento do embrião. O principal componente proteico dos ovos são as vitelinas (VTs) ou *yolk proteins* (YPs), originadas de precursores glicoproteicos chamados vitelogeninas (VTGs). Esses precursores são sintetizados fora do ovócito e precisam ser transportados seletivamente para seu interior, sendo armazenados nos grânulos de vitelo. As VTGs foram extensivamente estudadas em um amplo grupo de espécies animais, vertebrados e invertebrados, incluindo o nematoide rabditídeo *Caenorhabditis elegans* (WINTER, 2002).

Tentativas de isolar genes de VTGs do nematoide *O. tipulae* utilizando sondas e oligonucleotídeos desenhados com bases nos genes de *C. elegans* foram infrutíferas (WINTER et al., 1996), contrariando a hipótese de que os genes de VTG dentro dos rabditídeos teriam sequências muito conservadas. O isolamento do gene *Oti-vit-6* deu-se através da triagem de uma biblioteca genômica utilizando sonda de mRNA total (WINTER et al., 1996). Essa estratégia baseou-se no fato de que os mRNAs de vitelogeninas são os mais abundantes no organismo, permitindo que os clones contendo fragmentos desses genes fossem identificados pela intensidade de reação com a sonda. Nessa triagem, nenhum outro gene de VTG foi identificado. No entanto, a presença de três polipeptídeos no vitelo de *O. tipulae* (WINTER, 1992) e o fato de que na maioria dos animais já estudados os genes *vit* pertencem a uma família multigênica sugeriam a existência de mais de um gene de VTG em *O. tipulae*.

O gene *Oti-vit-6* recebeu essa denominação por ser homólogo ao gene *Cel-vit-6*, ambos codificadores de uma proteína precursora que sofre clivagem pós-traducional durante a vitelogênese. *Oti-vit-6* foi o primeiro gene *vit* de *O. tipulae* a ser sequenciado e caracterizado (WINTER et al., 1996).

A caracterização de *Oti-vit-1* iniciou-se a partir de um clone de cDNA (pMA28) isolado pela Dra. Marie-Anne Félix (Inst. Jacques-Monod, Universidade de Paris). Esse clone, quando digerido com a enzima *Xho* I, apresentava uma série de fragmentos de pequeno tamanho, uma característica já observada para o gene *Oti-vit-6* (WINTER et

al., 1996). Uma característica das vitelogeninas de nematoides é a presença do par de aminoácidos LE devido a abundância dos resíduos Leucina e Glutâmico nas moléculas de vitelogenina (WINTER et al., 1996). O códon que mais freqüentemente codifica Leu em *O. tipulae* é CUC (55%), enquanto que em *C. elegans* o mais freqüente é CUU (51%). Tanto em *C. elegans* como em *O. tipulae* o códon mais utilizado para Glu é GAG (>75%). Portanto em *O. tipulae* a sequência que corresponde ao hexâmero reconhecido por *Xho* I (CUCGAG) ocorre, em genes de vitelogenina, com freqüência maior do que o esperado para sequências aleatórias de nucleotídeos (1 sítio para cada 4096pb). Adicionalmente, o sequenciamento da extremidade 5' de pMA28, quando comparado aos dados de microsequenciamento do polipeptídeo VT1, mostrou que o clone continha pelo menos parte da sequência do mensageiro codificador de VT1.

Os íntrons encontrados no gene *Oti-vit-6* (cinco no total) são muito pequenos e uniformes, tendo entre 38 e 41 nucleotídeos. São íntrons menores que a média dos encontrados nos genes *vit* de *C. elegans*, que possuem 50 nucleotídeos de tamanho (WINTER et al., 1996). Em *Oti-vit-1* foram encontrados, até o momento, três íntrons, mas apenas um deles foi sequenciado, possuindo 43 pares de bases e é um íntron 0 (entre dois códons); ver discussão em Akamine e Winter, 2008 (**Figura 37**).

As fronteiras do íntron sequenciado seguem os consensos previamente determinados para genes de *O. tipulae* (WINTER et al., 1996; AKAMINE e WINTER, 2008).

Figura 37. Íntron do gene *Oti-vit-1*. Os gráficos representam a sequência de cinco clones diferentes do fragmento de DNA genômico correspondente ao íntron e suas fronteiras. Em destaque, o íntron de 43 pares de bases e sua posição no cDNA do clone Bam_2.0.

As sequências traduzidas da porção amino-terminal de VT1 apresentaram maior identidade com YP170B de *C. elegans* (45%) do que com a proteína OTI-VIT-6 (32%), sugerindo que a proteína de *O. tipulae* é órtologa da de *C. elegans* (**Anexos A e B**).

Anderson e colaboradores (1998) e Thompson e Banaszak (2002) propuseram, baseados em dados de NMR e difração de raios-X, uma estrutura tridimensional para a lipovitelina da lampreia *Ichthyomyzon unicuspis*. Penha-Scarabotto (1999) analisou os dados até então obtidos com a proteína OTI-VIT-6 com o auxílio do programa PHD (“Profile network prediction Heidelberg”) que utilizava um algoritmo baseado no conceito de redes neurais (ROST, 1996). Este programa permitia obter predições com probabilidades de certeza em torno de 70%, o que levou essa autora a identificar em OTI-VIT-6 domínios semelhantes aos da VTG de lampreia. Utilizando o programa PHYRE (Protein Homology/analogY Recognition Engine), Kelley e Sternberg (2009) foram construídos modelos estruturais teóricos a partir da sequência amino-terminal de OTI-VIT-1 e de porções do precursor OTI-VIT-6 (**Figura 38**). Nestes modelos vemos que a estrutura dessas duas vitelogeninas são semelhantes aquelas obtidas para outros membros das LLTPs (MANN et al., 1999).

Figura 38. Modelo da estrutura da proteínas OTI-VIT-6 e região N-terminal de OTI-VIT-1, obtidos no programa Phyre (KELLEY e STERNBERG, 2009) e editados no programa PGM – Protein Movie Generator (AUTIN e TUFFÉRY, 2007).

Quando a sequência da proteína OTI-VIT-6 foi alinhada às sequências das VTGs de *C. elegans* e de vertebrados, algumas características comuns a todas as proteínas puderam ser identificadas (WINTER et al., 1996). O motivo de aminoácidos CXXC são

bastante conservados, e estão presentes pelo menos duas vezes nas sequências, uma na região amino-terminal e outra na carboxi-terminal. Estes resíduos puderam ser observados também nas sequências de VT1 obtidas neste trabalho (Anexos A e B). A função desse par de cisteínas conservado em nematoides e vertebrados é desconhecido até o momento. Sabe-se que o mesmo motivo também está presente em proteínas relacionadas à VTG como o fator de von Willebrand e a apo B (BAKER, 1988; BABIN, 1999). Na bactéria *E. coli*, estes motivos aparecem na tiorredoxina, uma isomerase de dissulfetos de proteínas (PDI) (BONIFACE e REICHERT, 1990; BANASZAK et al., 1991). PDI é uma das subunidades da MTP humana, sugerindo que a presença desses resíduos em VTGs podem representar uma atividade ancestral de isomerase dessas moléculas.

5.2 Interação entre P100 e VT3 em *Oscheius tipulae*

Através de um protocolo de *ligand-blotting* desenhado especificamente para *O. tipulae* foi demonstrada a interação entre um polipeptídeo de aproximadamente 100 kDa (P100) presente em extratos totais de proteínas nativas e a vitelogenina VT3 deste nematoide. Pela natureza da técnica empregada, acreditamos tratar-se de uma interação proteína-proteína, pois carboidratos negativamente carregados e glicolipídeos não seriam resolvidos eficientemente em SDS-PAGE. P100 possui propriedades lipofílicas e está presente apenas em hermafroditas adultos (SERINO JR et al., 2008), no entanto, não foi possível realizar sua caracterização completa.

Como hipóteses sobre a identidade de P100, podemos pensar em duas proteínas que interagem diretamente com a VTG. Uma delas é o receptor de VTG (VTGR), presente na superfície dos ovócitos. A outra possibilidade é a Proteína Microsômica Transportadora de Triglicerídeos (MTP). Em *C. elegans*, o VTGR possui massa molecular de 106 kDa (GRANT e SATO, 2006) e a subunidade maior da MTP possui massa molecular aproximada de 100 kDa (SHIBATA et al., 2003) o que as coloca, teoricamente, na mesma posição que P100 nas condições que utilizamos.

VTGRs de diferentes espécies já foram caracterizados através de técnicas como *ligand-blotting* e *pull-down*, utilizando a VTG purificada ou recombinante como isca. FRIESEN e KAUFMAN (2004) identificaram, através de *ligand-blotting*, uma proteína presente em extratos de ovários, candidata a ser o VTGR do carrapato *Amblyoma hebraeum*. O VTGR do lepidóptero *Helicoverpa zea* (larva do milho) também foi

identificado através dessa técnica (PERSAULD e HAUNERLAND, 2004). A interação direta entre VTG e seu receptor foi demonstrada no peixe *Oreochromis aureus* através de um GST-pull-down (LI et al., 2003).

O fato de P100 estar presente exclusivamente em hermafroditas adultos também corrobora a hipótese de que esse polipeptídeo seja o VTGR de *O. tipulae*. RME-2, o VTGR de *C. elegans*, também é uma proteína restrita a hermafroditas adultos (FARES e GRANT, 2002).

A interação da VTG com seu receptor é um processo fundamental para que ocorra a tomada e a estocagem dessa proteína nos ovócitos. Desse modo, acredita-se que os sítios de reconhecimento sejam conservados entre as VTGs de diferentes espécies. Alinhamentos realizados entre as sequências de VTGs de diferentes espécies mostraram que as regiões amino-terminais são altamente conservadas e, portanto, devem conter os motivos relacionados às suas funções que são compartilhadas entre as diferentes espécies (SMOLENAARS et al., 2007). A proteína VT3 de *O. tipulae* corresponde à extremidade amino-terminal do precursor OTI-VIT-6 (MOURA, 2004). A demonstração de que a interação entre VTG e P100 ocorre através de VT3 (P40H) corrobora o fato de tratar-se de uma ligação importante e que se repete em diferentes grupos de animais vitelogênicos. Li e colaboradores (2003) mostraram “*in vitro*” a interação da VTG do peixe ósseo *Oreochromis aureus* (tilápia) com seu receptor, destacando a participação da porção amino-terminal da vitelogenina onde existe um motivo conservado, cuja sequência também pode ser encontrada em OT-VIT-6. Ensaio de *ligand-blotting* utilizando um polipeptídeo recombinante (P26-H) correspondente à região carboxi-terminal de OTI-VIT-6 mostraram que a interação com P100 também ocorre, porém o número de moles de P26-H utilizados foi maior, além de serem observadas muitas bandas correspondentes a interações inespecíficas quando comparado ao resultado obtido com P40-H (MOURA, 2004).

Ensaio realizado na presença de suramina, uma naftil-uréia polissulfonada utilizada no tratamento de tripanossomíase africana (SEED, 1998) e oncocercose (WITHWORTH, 1998) também apontam para a natureza de P100 como sendo um candidato ao receptor de VTG (MOURA, 2004). Em vertebrados, a suramina se liga ao receptor de rianodina, competindo com calmodulina, no retículo sarcoplasmático de músculos, alterando o fluxo de Ca^{2+} durante a contração (KLINGER et al., 1999). Gondim e Wells (2000) utilizaram a suramina na concentração de 200 mM para inibir

completamente a interação da lipoforina com receptores presentes na membrana plasmática de enterócitos do lepidóptero *Manduca sexta*.

Em *O. tipulae* foi possível verificar que uma concentração de 100 μM de suramina é suficiente para impedir a interação da VTG com P100 nos ensaios de *ligand-blotting*. Os experimentos realizados utilizando menos que 100 μM mostraram que a interferência não ocorre, já experimentos utilizando quantidades muito maiores, na faixa de 1mM, mostraram que a interferência se torna inespecífica (MOURA, 2004).

Em nosso laboratório, foram realizadas diversas tentativas de isolamento do gene codificador do VTGR de *O. tipulae*, utilizando oligonucleotídeos degenerados desenhados com base na sequência do gene *rme-2* de *C. elegans*. Esse insucesso pode ser explicado pelo fato de que essas espécies apresentam grande divergência molecular. Embora filogenias recentes posicionem *O. tipulae* e *C. elegans* no mesmo clado (Eurhabditis) (KIONTKE e FITCH, 2005), nosso grupo mostrou diferenças entre a quantidade de GC do genoma dos dois organismos (AHN e WINTER, 2005) e também na utilização preferencial de diferentes códons (AKAMINE e WINTER, 2008). Também já foi demonstrado que populações distintas de *O. tipulae* possuem níveis de diversidade genética maiores que *C. elegans*, apesar de ambos apresentarem o mesmo modo de reprodução, com predomínio do hermafroditismo (BAÏLLE et al., 2008).

A interação de P100 com VTG purificada só pode ser verificada na presença de β -mercaptoetanol, um agente redutor que quebra as pontes dissulfeto entre diferentes moléculas (SERINO JR et al., 2008). Esse dado sugere que P100 é parte de um complexo proteico maior, cujo tamanho impediria a migração em um gel de poliacrilamida T=10%. Essa natureza polimérica vai contra a hipótese de que P100 é o VTGR, já que esses receptores existem como proteínas únicas na membrana. Além disso, a presença de agentes redutores é responsável por desestabilizar proteínas de membrana, impedindo ou dificultando o reconhecimento do ligante (HIESBERGER et al., 1995). A presença de β -mercaptoetanol nos extratos proteicos do carrapato *A. hebraeum* não impediu a interação entre a VTG e uma proteína de 86 kDa em *ligand-blottings* (FRIESEN e KAUFMAN, 2004). Essa característica da interação não foi considerada, pelos autores, como suficiente para descartar a hipótese de que a proteína de 86 kDa seja o VTGR dessa espécie. No entanto, acreditamos que somente o sequenciamento de P100 e de seu gene codificador podem assegurar sua identidade

como sendo o VTGR de *O. tipulae*, o que nos levou a discutir uma outra hipótese sobre a natureza de P100.

C. elegans possui, anotado em seu genoma, um gene ortólogo ao gene da subunidade maior da MTP humana. Essa proteína já foi relacionada ao aumento da biossíntese e do transporte de outras LLTPs: apolipoproteínas (SELLERS et al., 2003) e vitelogeninas (SHELNESS et al., 2005). No anfíbio *Xenopus laevis*, além da interação MTP-VTG ter sido demonstrada em níveis funcionais, também uma interação estrutural foi verificada (SHELNESS et al., 2005). Caso essa interação se repita em outros grupos animais, é possível que P100 seja o homólogo de CEL-DSC-4, ou seja, P100 é um candidato a ser a MTP de *Osccheius tipulae*. Estudos de RNAi realizados com *Cel-dsc-4* sugerem haver relação entre MTP e VTG dentro dos enterócitos de *C. elegans* (ver Resultados), apoiando a hipótese de que essas proteínas interagem em nematoides.

CEL-DSC-4 está presente em todos os estágios do ciclo de vida de *C. elegans*, mas mutações no gene *Cel-dsc-4* afetam especialmente a linhagem germinativa e a vulva dos hermafroditas (SHIBATA et al., 2003). Não existem, até o momento, dados sobre os níveis de expressão nos diferentes estágios, o que nos permite levantar a hipótese de que os níveis de MTP devem ser maiores na fase adulta, reprodutivamente ativa. A menor quantidade de proteína poderia explicar a ausência da interação entre P100 e VTG em ovos e larvas (SERINO JR et al., 2008), uma vez que a técnica de *ligand-blotting* é limitada pela quantidade de proteína reconhecida no extrato total.

O tamanho diminuto dos vermes dificulta a realização dos ensaios utilizando proteínas extraídas de um tecido específico, de modo que não foi possível determinar se a localização de P100 é restrita ou se ocorre em todo o verme.

Os ensaios realizados neste trabalho permitiram a otimização do protocolo de *ligand-blotting*, de forma a diminuir as interações inespecíficas observadas por Moura (2004) e Serino Jr et al. (2008). Foi utilizado um novo antissoro secundário (ver Material e Métodos). Esta única modificação mostrou-se suficiente para resolver parcialmente o problema. Antissoros obtidos em coelhos podem reconhecer inúmeras proteínas de nematoides, uma vez que não é rara a infestação desses mamíferos com vermes parasitas, a não ser que sejam criados em condições livres de infecções, o que é mais difícil para animais maiores.

Não foi verificada interação de P100 com o polipeptídeo recombinante PVIT1HisC. O trabalho de Mann et al. (1999) mapeou a região da apoB humana que interage com a subunidade maior da MTP. Mutações promovidas em diferentes regiões

da apoB mostraram que a porção correspondente aos aminoácidos 1 a 152 dessa proteína é reconhecida pelos aminoácidos 22 a 297 do barril β da MTP. Os polipeptídeos recombinantes PVT1HisN e PVT1HisC possuíam em sua sequência o fragmento contido entre os aminoácidos 107 e 315 de VT1 (**Figura 39**). A ausência dos primeiros 100 resíduos da extremidade amino-terminal pode explicar o fato dessas proteínas não interagirem no *ligand-blotting*. Esse resultado é mais um indício de que P100 é a MTP de *O. tipulae*.

Os dados obtidos com P40-H indicam que os resíduos de histidina adicionados

Figura 39. Modelo estrutural de parte do polipeptídeo recombinante PVIT1HisN obtido no programa Phyre (KELLEY e STERNBERG, 2009) e editado no programa PGM – Protein Movie Generator (AUTIN e TUFFÉRY, 2007). O modelo mostra que apenas o domínio barril- β está presente no recombinante gerado.

durante a expressão não interferem no reconhecimento de P100. Resultados de ensaios de RNAi mostram que a MTP de *C. elegans* interfere na secreção de YP170B, o ortólogo de VT1. Esses dados, discutidos no item abaixo, corroboram a hipótese de que há interação MTP-VTG em nematoides rabditídeos.

Caso P100 seja o VTGR de *O. tipulae* também é provável que ocorra a interação com VT1, já que VT1 é facilmente isolada de ovos e a internalização depende de endocitose mediada por receptor (FARES e GRANT, 2002). Desse modo, acreditamos que a expressão da região amino-terminal completa de VT1 deve permitir a detecção da interação com P100.

A técnica de *ligand-blotting* não permite o isolamento da proteína ligante em quantidades suficientes para estudos subsequentes com essa molécula. Na tentativa de

isolar P100 ou outros ligantes de VTG em condições solúveis e em maiores concentrações, empregamos a técnica de *pull-down*, utilizando uma resina metálica capaz de ancorar os polipeptídeos recombinantes P40H e PVIT1HisC através de seus resíduos de histidina. Esses peptídeos serviram como isca para a busca de ligantes em extratos totais de proteínas de *O. tipulae*. Nenhuma proteína ligante pode ser isolada através dessa técnica. Sabe-se que a ligação VTG-VTGR é bastante efêmera e que proteínas de membrana podem perder a conformação ativa facilmente durante processos de extração. Essas duas características, em conjunto, diminuem a eficiência de protocolos de *pull-down*. Apesar das limitações, a técnica de *pull-down* já foi empregada na identificação de alguns ligantes e receptores. O trabalho de Kodera et al. (2000) caracterizou a interação do receptor de proliferação γ ativado por peroxissomos (PPAR γ) humanos utilizando como isca proteínas recombinantes produzidas em *E. coli*, porém as proteínas expressas continham toda a sequência e não apenas fragmentos como no caso de P40H e PVIT1HisC. A ligação de proteínas GGA, do complexo de Golgi de eucariotos com o receptor de manose-6-fosfato cátion-independente (CI-MPR) também foi demonstrada através de ensaios de *pull-down* (ZHU et al., 2001). Neste caso a interação ocorre com a porção citoplasmática do receptor. Receptores de lipoproteínas, incluindo o VTGR do anfíbio *Xenopus laevis* tiveram seu perfil de ligação estudado através de ensaios de *pull-down* (ZHOU et al., 2003) e o VTGR de tilápia (*Oreochromis aureus*) foi identificado também através dessa técnica (LI et al., 2003). Neste último caso, apenas a região de interação com o ligante (identificada através da técnica de duplo-híbrido em leveduras) foi expressa em *E. coli*, fusionada à GST. Tomados em conjunto, esses dados sugerem ser possível o isolamento do receptor de *O. tipulae* através de *pull-down*, porém são necessárias maiores informações sobre seus motivos de ligação e melhores técnicas de extração de proteínas totais visando a manutenção da integridade de proteínas de membrana.

5.3 Interação entre MTP e VTG em *Caenorhabditis elegans*

A montagem e a secreção de lipoproteínas do tipo apoB em mamíferos dependem da formação, no retículo endoplasmático, de um complexo apoB-MTP-PDI (MANN et al., 1999). Tanto a apoB como a MTP de vertebrados são relacionadas estruturalmente às VTGs, diferindo de forma importante apenas em sua porção carboxi-terminal. Acredita-se que as VTGs representem os ancestrais das LLTPs e conservem,

em sua estrutura, características comuns àquelas conhecidas para outras lipoproteínas. No anfíbio *Xenopus laevis*, a interação entre MTP e VTG já foi demonstrada, e a função da MTP nesses animais também está relacionada à secreção de VTG (SELLERS et al., 2005).

Em *C. elegans*, o gene ortólogo ao gene da MTP de vertebrados foi denominado *Cel-dsc-4*, por ter sido caracterizado como um gene supressor dos fenótipos causados por mutações no gene *Cel-clk-1*, relacionado à biossíntese de ubiquinona. Mutantes *clk-1* possuem alterações em vários processos fisiológicos como a digestão e a defecação, que ficam mais lentos e ineficazes, resultando numa condição geral de retardo do desenvolvimento. A superexpressão de *dsc-4* suprime os fenótipos apresentados por *clk-1*, o mesmo ocorrendo quando o gene *Cel-vit-2* é superexpresso nesses mutantes (SHIBATA et al., 2003). O fato de *dsc-4* e *vit-2* recuperarem os mesmos processos fisiológicos, alterados nos mutantes *clk-1*, sugere haver relação entre os dois genes ou entre as redes de interação das quais esses genes fazem parte.

Diante desses dados, decidimos testar se a ausência de *dsc-4* afetaria a biossíntese e a secreção da VTG em *C. elegans*. Para esses estudos, escolhemos a metodologia de RNAi, para assim reduzir os transcritos de *dsc-4*. O *knockdown* dos transcritos de *dsc-4* já havia sido reportado como causador de retardo na postura de ovos e no desenvolvimento, mas essas alterações de fenótipos eram pouco marcantes, de forma que também havia relatos de fenótipos inalterados (WORMBASE, 2009). No entanto, alterações na secreção da VTG não podem ser observadas em vermes selvagens, pois parte da proteína deve ser montada corretamente. Isso ocorre devido ao fato da RNAi diminuir a quantidade de transcritos (*knockdown*) e não eliminar esses transcritos completamente (*knockout*). Como a VTG é uma proteína muito abundante, uma baixa quantidade de MTP funcional deve ser suficiente para garantir que a VTG seja secretada e tomada pelos ovócitos sem grandes prejuízos à reprodução dos vermes. Para resolver essa limitação, utilizamos em nossos ensaios de RNAi a linhagem DH1033, que possui YP170B::GFP. Com esse recurso foi possível acompanhar a VTG dentro do corpo dos vermes, ao longo de toda sua biossíntese. Assim, os efeitos da diminuição da MTP puderam ser observados com maiores pormenores, permitindo notar as alterações ocorridas independentemente da quantidade de moléculas afetadas.

Alguns trabalhos já mostraram que diferentes protocolos de RNAi podem provocar resposta mais ou menos eficaz nos nematoides submetidos ao tratamento

(KAMATH et al., 2000; FRASER, et al., 2000; LAMBIE, E.J. (comunicação pessoal¹). O tratamento escolhido neste trabalho (interferência por alimentação em meio NGM “lite”) teve sua eficácia demonstrada por Kamath e colaboradores (2000) e Timmons e colaboradores (2001), que testaram diferentes alterações do original desenvolvido por Timmons e Fire (1998). Nossos níveis de eficiência também foram bastante satisfatórios e puderam ser monitorados através da penetrância dos fenótipos *unc* (ver resultados). Esses resultados são semelhantes aos obtidos recentemente em nosso laboratório por Andreoni-Nico (2009) utilizando o mesmo protocolo.

Como as MTPs e as VTGs possuem sequências primárias muito semelhantes, foram realizados ensaios de Real Time PCR quantitativo para medir o número de transcritos do gene *Cel-vit-2*. Assim foi possível checar se os transcritos de *Cel-vit-2* não sofriam interferência cruzada seja por serem também reconhecidos pela sequência de *Cel-dsc-4* selecionada para a interferência, seja porque os níveis de transcrição sejam interdependentes. Os resultados mostraram que os transcritos de *vit-2* não sofreram alteração em nenhum dos ensaios de RNAi utilizados, incluindo os controles (**Anexo C**). A determinação da porcentagem de redução dos transcritos de *dsc-4* também por Real-Time PCR está em andamento, mas não foi concluída a tempo de ser incluída neste trabalho. Acreditamos que não sejam eliminados todos os transcritos, uma vez que quando um tratamento mais radical de RNAi é utilizado (em meio Mínimo M9/lactose – ver resultados), os fenótipos observados são mais severos, sugerindo que mais transcritos foram afetados.

A confirmação da identidade de CEL-DSC-4 como sendo a MTP de *C. elegans* foi corroborada pelo modelo estrutural obtido em nosso trabalho, que se baseou na sequência de *Cel-dsc-4* depositada no WORMBASE (2009). O modelo mostrou-se bastante semelhante ao modelo deduzido para a subunidade maior da MTP humana. (MANN et al., 1999; HUSSAIN et al., 2003). Modelos baseados na homologia de lipoproteínas têm sido obtidos com sucesso e suas predições já se mostraram verdadeiras em ensaios funcionais. O trabalho de Mann e colaboradores (1999) mostrou que as estruturas obtidas para a MTP e a apoB, com base na sequência e na estrutura da lipovitelina de lampreia, interagem através dos motivos preditos em ensaios de duplo-híbrido. A lipovitelina é a forma intraovocítica e processada da VTG de lampreia, e possui em sua estrutura o barril β amino-terminal, uma estrutura estendida em α -hélice

---

¹ Método sugerido em um Fórum de Discussão.

e uma cavidade carbóxi-terminal encerrada por duas folhas β da VTG precursora. Essa cavidade está associada à ligação dos lipídeos à molécula (TIMMINS et al., 1992; ANDERSON et al., 1998; MANN et al., 1999). Tanto o domínio barril β quanto o domínio α -hélice são conservados na MTP e na apoB (MANN et al., 1999), e também podem ser identificados em nosso modelo de CEL-DSC-4 (ver **Figura 29** em Resultados).

Em *C. elegans*, as análises de microscopia mostraram acúmulo de VTG dentro dos enterócitos. Esse acúmulo correspondia a pontos densos de fluorescência, ausentes nos controles. Além disso, foi possível observar que alguns ovócitos não recebiam VTG ou recebiam menos proteína. Embora apenas YP170B estivesse sendo observado, não há razões para duvidar que o mesmo estivesse acontecendo com os demais polipeptídeos. A resposta ao *knockdown* não foi uniforme, em alguns vermes o acúmulo de VTG foi mais evidente que em outros. Também a quantidade de ovos postos por adultos alimentados com dsRNA desde o estágio L4 variou bastante. Alguns animais tiveram a postura reduzida ou retardada, mas os resultados em conjunto não foram significativos quando comparados aos controles. Nos ensaios de RNAi por alimentação não há controle do número de moléculas de dsRNA ingeridas inicialmente por cada um dos vermes. Embora estudos comparando a técnica de injeção de dsRNAs com a alimentação afirmem haver igual eficiência entre os métodos (KAMATH et al., 2000; TIMMONS et al., 2001), não existem dados comparando a resposta em diferentes indivíduos submetidos à alimentação. Desse modo, é possível que o fenótipo pouco uniforme encontrado em nossos experimentos deva-se à quantidade inicial de moléculas ingeridas. Sabe-se que, em *C. elegans*, as moléculas de dsRNA servem como iniciadoras da síntese de novos dsRNAs através da atividade de uma RNA-Polimerase dependente de RNA (HANNON, 2002) e que o sinal é transmitido através das diferentes células do corpo (WINSTON et al., 2007). No entanto, não são conhecidos os padrões de funcionamento dessa maquinaria do que diz respeito à velocidade de amplificação e saturação do sistema. É possível que a ingestão de moléculas de dsRNA em pequena quantidade ou em excesso tenham algum efeito sobre a regulação do fenômeno de amplificação e espalhamento da RNAi, refletindo nos fenótipos individuais.

Também foi avaliado o processamento do precursor CEL-VIT-6 em vermes submetidos ao *knockdown* de *dsc-4* e demais controles de RNAi. O trabalho de Kimble

e Sharrock (1983) em *C. elegans*, mostrou que a clivagem de VIT-6 em YP88 e YP115 ocorria na cavidade pseudocelomática dos vermes, sendo necessário, portanto, que houvesse secreção desse peptídeo dos enterócitos para o pseudoceloma. Essa secreção ocorre a medida que o polipeptídeo vai sendo sintetizado, não havendo armazenamento de VTG nos enterócitos (KIMBLE e SHARROCK, 1983; SHARROCK et al., 1990). Em todos os nossos ensaios de RNAi (*dsc-4* e controles), o processamento de VIT-6 ocorreu com sucesso e foi verificado através do antissoro específico anti-YP88. Esses resultados podem significar que parte da VTG está sendo secretada corretamente, apesar da observação dos precipitados nas análises de microscopia. Outra explicação possível é a ocorrência do processamento por pró-hormônio convertases também dentro dos enterócitos. Nos experimentos de *Western-blot* realizados com vermes *knockdown* não foi possível detectar o precursor não-processado, indicando que a VTG não-secretada é, de algum modo, processada ou destruída nessas células. O trabalho de Andreoni-Nico (2009) mostrou, através da construção de genes repórteres, que há expressão do gene de pró-hormônio convertase *Cel-kpc-1* em células do intestino e células musculares de vermes adultos. A presença de quatro motivos GATA (associados a fatores de transcrição para genes expressos no intestino) na região intergênica a montante de *Cel-kpc-1* indicam uma alta probabilidade de que esses genes sejam realmente expressos nas células do intestino (ANDREONI-NICO, 2009). Análises realizadas com as linhagens mutantes *glp-4* (que não possuem células germinativas) e *rme-6* (defectivas na tomada de VTG pelos ovócitos) mostraram que a VIT-6 é processada corretamente em ambos os casos, mostrando que há atividade de pró-hormônio convertases na ausência de gônadas e anteriormente à tomada pelos ovócitos (ANDREONI-NICO, 2009).

Ensaio de RNAi combinado mostraram haver participação de pelo menos duas pró-hormônio convertases (CEL-KPC-1 e CEL-KPC-2) no processamento de VIT-6 (ANDREONI-NICO, 2009). Dados de localização de CEL-KPC-2 também mostram sua presença no intestino de vermes adultos (HUNT-NEWBURY et al., 2007). No caso de haver *knockdown* simultâneo tanto dos transcritos de *kpc-1* quanto de *kpc-2*, o precursor VIT-6 pode ser detectado em *Western-blot* (ANDREONI-NICO, 2009), sugerindo que a ausência desse precursor em nossos ensaios não é devido à degradação da proteína retida nos enterócitos e sim resultado de processamento por pró-hormônio convertases intracelulares. A detecção, por soro anti-GFP, da proteína YP170B::GFP também é um indício de que a VTG não-secretada não sofre degradação.

Referências bibliográficas⁴

AHN, I-Y.; WINTER, C.E. Determination of DNA base composition by small scale acrylamide-CsCl gradient centrifugation. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 63, p. 155-160, 2005.

AHN, I-Y.; WINTER, C.E. The genome of *Oscheius tipulae*: determination of size, complexity, and structure by DNA reassociation using fluorescent dye. **Genome**, v. 49, p. 1007-1015, 2006.

AKAMINE, R.N.; WINTER, C.E. *Oscheius tipulae* as an example of eEF1A gene diversity in nematodes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 67, p. 278-290, 2008.

AMBROS, V.; LEE, R.C.; LAVANWAY, A. ; WILLIAMS, P. T.; JEWELL, D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. **Current Biology**, v. 13, p. 807-818, 2003.

ANDERSON, T.A.; LEVITT, D.G.; BANASZAK, L.J. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. **Structure**, v. 6, p. 895-909, 1998.

ANDREONI-NICO, J. **Evidências de redundância funcional entre as pró-hormônio convertases no processamento pós-traducional do precursor da vitelogenina VIT-6 do nematóide *Caenorhabditis elegans***. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ARAVINDAKSHAN, J.; PEQUET, V. GREGORY, M.; DUFRESNE, J.; FOURNIER, M.; MARCOGLIESE, D.J.; CYR, D.G. Consequences of xenoestrogens treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in trantic salmon (*Salmo salar*). **Aquatic Toxicolgy**, v. 49, p. 159-170, 2004.

ASHRAFI, K. Obesity and the regulation of fat metabolism. In: THE *C. elegans* RESEARCH COMMUNITY (Ed.). **Wormbook**. [S.l.: s.n.], 2007. p. 1- 20. doi/10.1895/wormbook.1.130.1

BAÏLLE, D.; BARRIÈRE, A.; FÉLIX, M-A. *Oscheius tipulae*, a widespread hermaphroditic soil nematode, displays a higher genetic diversity and geographical structure than *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 1523-1534, 2008.

BARKER, K.R.; HUSSEY, R.S.; KRUSBERG, L.R. Plant and Soil nematodes: societal impacts and focus on the future. **Journal of Nematology**, v. 26, p. 127-137, 1994.

BANASZAK, L.; SHARROCK, W.; TIMMINS, P. Structure and function of a lipoprotein: lipovitellin. **Annual Review Biophysical Chemistry**, v. 20, p. 221-246, 1991.

---

⁴ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BENIAN, G.M.; L'HERNAULT, S.W.; MORRIS, M.E. Additional sequence complexity in the muscle gene, *unc-22*, and its encoded protein, twitchi, of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 134, p. 1097-1104, 1993.

BERRIOT-VAROQUEAUX, N.; AGGERBECK, L.P.; SAMSON-BOUMA, M-E.; WETTERAU, J.R. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. **Annual Reviews Nutrition**, v. 20, p. 663-697, 2000.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513-1523, 1977.

BLAXTER, M.L. Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism. **Advances in Parasitology**, v. 54, p. 101-195, 2003.

BLUMENTHAL, T.; STEWARD, K. RNA processing and gene structure. In: RIDDLE, D.L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B.J.; PRIESS, J.R. (Ed.). **C. elegans II**. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1997. p. 117-145.

BLUMENTHAL, T.; SQUIRE, M.; KIRTLAND, S.; CANE, J.; DONEGAN, M.; SAPIETH, J. SHARROCK, W. Cloning of a yolk protein gene family from *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, v. 174, p. 1-18, 1984.

BOWES, M.; PATHIRANA, S. The yolk proteins of higher In: RAIKHEL, A.S.; SAPPINGTON, T.W. (Ed.). **Reproductive Biology of Invertebrates: Progress in vitellogenesis**. Enfield: Science Publishers, 2002. p. 103-130.

BRAWAND, D.; WAHLI, W.; KAESMANN, H. Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. **Plos Biology**, v. 6, p. 507-517, 2008.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, p. 71-94, 1974.

BRITTON, C.; MURRAY, L. Using *Caenorhabditis elegans* for functional analysis of genes of parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 36 p. 651-659, 2006.

BU, G.; GEUZE, H.J.; STROUS, G.J.; SCHWARTZ, A.L. 39kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for a LDL receptor-related protein. **EMBO Journal**, v. 14, p. 2269-2280, 1995.

BUISINE, N.; TRICHET, V.; WOLFF, J. Complex evolution of vitellogenin genes in salmonid fishes. **Molecular Genetic and Genomics**, v. 268, p. 535-542.

BUJO, H.; HERMAN, M.; KARDELI, M.O.; JACOBSEN, L.; SUGAWARA, S.; NIMPF, J.; YAMAMOTO, T.; SCHNEIDER, W.J. Chicken oocyte growth is mediated by an eight ligand binding repeat member of the LDL receptor family. **EMBO Journal**, v. 13, p. 5165-5175, 1994.

BUJO, H.; YAMAMOTO, T.; HAYASHI, T.; HERMANN, M.; NIMPF, J.; SCHNEIDER, W.J. Mutant oocytic LDL receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 9905-9909, 1995.

BUNDY, D.A.P. This wormy world – then and now. **Parasitology Today**, v. 13, p. 407-408, 1997.

BYRNE, B.M.; GRUBER, M.; AB, G. The evolution of egg yolk proteins. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 53, p. 33-69, 1989.

CANNING, D. Priority setting and the ‘neglected’ tropical diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 499-504, 2006.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.

CHAN, S.L.; TAN, C.H.; PANG, M.K.; LAM, T.J. Vitellogenin purification and development of an assay for the vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1766). **Journal of Experimental Zoology**, v. 255, p. 96-109, 1991.

CHEN, J.S.; SAPPINGTON, T.W.; RAIKEL, A.S. Extensive sequence conservation among insect, nematode and vertebrate vitellogenin reveals ancient common ancestry. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44, p. 440-451, 1997.

CHITWOOD, D.J.; DUTKY, W.R. Metabolism of plant sterols by nematodes. **Lipids** v. 26, p. 619–627, 1991.

CHO, K.H.; RAIKEL, A.S. Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. **Insect Molecular Biology**, v. 10, n. 5, p. 465-474, 2001.

CHRISTIANSEN, T.; KORSGAARD, B.; JESPERSEN, A. Induction of vitellogenin synthesis by nolyphenol and 17 β -estradiol and effects on the testicular structure in the eelpout *Zoarces viviparus*. **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 141-144, 1998.

CHUANG, C.F.; MEYEROWITZ, E.M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 4985–4990, 2000.

COGHLAN, A.; STAJICH, J.E.; HARRIS, T.W. Comparative genomics in *C. elegans*, *C. briggsae*, and other *Caenorhabditis* species. **Methods in Molecular Biology**, v. 351, p. 13-29, 2006.

COLE, R.J.; DUTKY, S.R. A sterol requirement in *Turbatrix aceti* and *Panagrellus redivivus*. **Journal of Nematology**, v. 1, p. 72-75, 1969.

COLLINS, J.J.; HUANG, C.; HUGHES, S.; KORNFELD, K. The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. In: THE *C. elegans* RESEARCH COMMUNITY (Ed). **Wormbook**. [S.l.; s.n.], 2008. p. 1-21. doi/10.1895/wormbook.1.137.1.

CONNER, S.D.; SCHMID, S.L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, p. 37-44, 2003.

DHADIALLA, T.S.; RAIKHEL, A.S. Biosynthesis of mosquito vitellogenin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 9924-9933, 1990.

DE LEY, P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. In: THE *C. elegans* RESEARCH COMMUNITY (Ed.). **Wormbook**. [S.l.; s.n.], 2006. p. 1-8. doi/10.1895/wormbook.1.41.1.

DICHTEL-DANJOY, M.; FÉLIX, M.A. The two steps of vulval induction in *Oscheius tipulae* (CEW1) recruit common regulators including a MEK kinase. **Developmental Biology**, v. 265, p. 113-226, 2004.

DUPUY, D.; LI, Q.R.; DEPLANCKE, B.; BOXEM, M.; HAO, T. LAMESCH, P.; SEQUERRA, R.; BOSAK, S.; DOUCETTE-STAMM, L.; HOPE, I.A.; HILL, D.E.; WALHOUT, A.J.; VIDAL, M. A first version of the *Caenorhabditis elegans* Promoterome. **Genome Research**, v. 14, n. 10B, p. 2169-2175, 2004.

ELKIN, R.G.; MacLACHLAN, I.; HERMANN, M.; SCHNIDER, W.J. Characterization of the Japanese quail oocyte receptor for very low density lipoprotein and vitellogenin. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 5, p. 1258-1266, 1995.

ESPOSITO, G.; DI SCHIAVI, E.; BERGAMASCO, C.; BAZZICALUPO, P. Efficient and cell specific knock-down of gene function in targeted *C. elegans* neurons. **Gene**, v. 395, p. 170-176, 2005.

EVANS, D.; ZORIO, D.; MACMORRIS, M.; WINTER, C.E.; LEA, K.; BLUMENTHAL, T. Operons and SL2 trans-splicing exist in nematodes outside the genus *Caenorhabditis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 9751-9756, 1997.

FARES, H.; GRANT, B. Deciphering endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. **Traffic**, v. 3, p. 11-19, 2002.

FEINBERG, E.H.; HUNTER, C.P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. **Science**, v. 301, p. 1545-1547, 2003.

FÉLIX, M.A. RNA interference in nematodes and the chance that favored Sydney Brenner. **Journal of Biology**, v. 7, p. 34.1-34.5, 2008.

FINK, A.L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 425-449, 1999.

FIRE, A., HARRISON, S.W.; DIXON D. A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 93, p. 189-198, 1990.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FISHER, C.; BEGLOVA, N.; BLACKLOW, C. Structure of an LDLR-RAP complex reveals a general mode for ligand recognition by lipoprotein receptors. **Molecular Cell**, v. 22, p. 277-283, 2006.

FORST, S.; DOWDS, B.; BOEMARE, N.; STACKEBRANDT, E. *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* spp: Bugs that kill bugs. **Annual Reviews Microbiology**, v. 51, p. 47-72, 1997.

FRASER, A.G.; KAMATH, R.S.; ZIPPERLEN, P. ; MARTINEZ-CAMPOS, M.; SOHRMANN, M; AHRINGER, J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. **Nature**, v. 408, p. 325-330, 2000.

FRIESEN, K.J.; KAUFMAN, W.R. Effects of 20-hydroxyecdysone and other hormones on egg development, and identification of a vitellin-binding protein in the ovary of the tick *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 519-529, 2004.

GILLEARD, J.S.; SHAFI, Y. BARRY, J.D.; MCGHEE, J.D. ELT-3: A *Caenorhabditis elegans* GATA factor expressed in the embryonic epidermis during morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 208, p. 265-280, 1999.

GONDIM, K.C.; WELLS, M.A. Characterization of lipophorin binding to the midgut of larval *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 405-413, 2000.

GRANT, B. D.; HIRSH, D. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. **Molecular Cellular Biology**, v. 10, p. 4311-4326, 1999.

GRANT, B.D.; SATO, M. Intracellular trafficking. In: THE *C. elegans* RESEARCH COMMUNITY (Ed.). **Wormbook**. [S.l.; s.n.], 2006. p. 1-9. doi/10.1895/wormbook.1.77.1.

GUIDUGLI-LAZZARINI, K.R.; do NASCIMENTO, A.M.; TANAKA, E.D.; PIULACHS, M.D.; HARTFELDER, K.; BITONDI, M.G.; SIMÕES, Z.L. Expression analysis of putative vitellogenin and lipophorin receptors in honey bee (*Apis mellifera* L.) queens and workers. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 7, p. 1138-1147, 2008.

HAFER, J.; FISHER, A.; FERENZ, H.J. Identification of the yolk receptor in oocytes of *Nereis virens* (Annelida, *Polychaeta*). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 162, p. 148-152, 1992.

HANNON, G.J. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244-251, 2002.

HAWKINS, M.G.; MCGHEE, J.D. *elt-2*, a second GATA factor from the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 14666-14671, 1995.

HEINE, U.; BLUMENTHAL, T. Characterization of regions of the *Caenorhabditis elegans* X chromossome containing vitellogenin genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 188, p. 301-312, 1986.

HIEB, W.F.; ROTHSTEIN, M. Sterol requirement for reproduction of a free-living nematode. **Science**, v. 160, p. 778-779, 1968.

HIESBERGER, T.; HERMANN, M.; JACOBSEN, L.; NOVACK, S.; HODITS, R.A.; BUJO, H.; MEILINGER, M.; HÜTTINGER, M.; SCHNEIDER, W.J.; NIMPF, J. The chicken oocyte receptor for yolk precursors as a model for studying the action of receptor-associated protein and lactoferrin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 18219-18226, 1995.

HILLIER, L.W.; MILLER, R.D.; BAIRD, S.E.; CHINWALLA, A.; FULTON, L.A.; KOBOLDT, D.C.; WATERSON, R.H. Comparison of *C. elegans* and *C. briggsae* genome sequences reveals extensive conservation of chromosome organization and synteny. **Plos Biology**, v. 5, 1603-1616, 2007.

HIRAMATSU, N.; CHAPMAN, R.W.; LINDZEY, J.K.; HAYNES, M.R.; SULLIVAN, C.V. Molecular characterization and expression of vitellogenin receptor from white perch (*Morone americana*). **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1720-1730, 2004.

HOTEZ, P.; OTTESEN, E.; FENWICK, A.; MOLYNEUX, D. The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 582, p. 23-33, 2006.

HUSSAIN, M.M.; SHI, J.; DREIZEN, P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 22-32.

HUNT-NEWBURY, R.; VIVEIROS, R.; JOHNSEN, R.; MAH, A.; ANASTAS, D.; FANG, L.; HALFNIGHT, E.; LEE, D.; LIN, J.; LORCH, A.; McKAY, S.; OKADA, H.M.; PAN, J.; SCHULTZ, A.K.; TU, D.; WONG, K.; ZHAO, Z.; ALEXEYENKO, A.; BURGLIN, T.; SONNHAMMER, E.; SCHNABEL, R.; JACOB, T.C.; KAPLAN, J.M. High-throughput in vivo analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. **PloS Biology**, v. 5, n. 9, p. e237, 2007.

JANEIRO-CINQUINI, T.R.F.; RIBOLLA, P. E.M.; CAPURRO, M.L.; WINTER, C.E. Vitellogenin and yolk protein processing in *Bothrops jararaca* (Wied), a tropical venomous snake. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 122, p. 189-198, 1999.

JASMER, D.P.; GOVERSE, A.; SMANT, G. Parasitic nematode interactions with mammals and plants. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 41, p. 245-270, 2003.

JONES, A. K.; BUCKINGHAM, S.D.; SATTELLE, D.B. Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 321- 330, 2005.

JOSE, A.M.; SMITH, J.J.; HUNTER, C.P. Export of RNA silencing from *C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, n. 7, p. 2283-2288.

JULENIUS, K.; MOLGAARD, R.; GUPTA, R.; BRUNAK, S. Prediction, conservation, analysis and structural characterizations of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. **Glycobiology**, v. 15, p. 153-164, 2005.

KAMATH, R.S.; MARTINEZ-CAMPOS, M.; ZIPPERLEN, P.; FRASER, A.G.; AHRINGER, J. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Genome Biology**, v. 2, n. 1, p. 0002.1–0002.10, 2001.

KELLEY, L.A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, 363-371, 2009.

KLASS, M.R.; WOLF, N.; HIRSH, D. Further characterization of a temperature-sensitive transformation mutant in *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 69, p. 329-335, 1979.

KINGLER, M.; FREISSMUTH, M.; NICKEL, P.; STÄBLER, SCHWARZBART, M.; KASSACK, M.; SUKO, J.; HOHENENEGGER, M. Suramin and Suramin analogs activate skeletal muscle Ryanodine Receptor via a Calmodulin Binding Site. **Molecular Pharmacology**, v. 55, p. 462-472, 1999.

KIONTKE, K. Evolutionary Biology: patchy food may maintain a foraging polymorphism. **Current Biology**, v. 18, p. 1017-1019, 2008.

- KIONTKE, K.; FITCH, D.H.A. The phylogenetic relationships of *Caenorhabditis elegans* and other rhabditids. In: THE *C. elegans* RESEARCH COMMUNITY (Ed). **Wormbook**. [S.l.; s.n.], 2005. p. 1-11. doi/10.1895/wormbook.1.11.1.
- KODERA, Y.; TAKEYAMA, K.; MURAYAMA, A.; SUZAWA, M.; MASUHIRO, Y.; KATO, S. Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated Receptor γ with transcriptional coactivators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.33201-33204, 2000.
- KODURI, V.; BLACKLOW, S.C. Folding Determinants of LDL Receptor Type-A Modules. **Biochemistry**, v. 40, p. 12801-12807, 2001.
- KOOTER, J.M.; MATZKE, M.A.; MEYER, P. Listening to the silent genes: Transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 340-347, 1999.
- KURZCHALIA, T.V.; WARD, S. Why do worms need cholesterol? **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 8, p. 684-688, 2003.
- LAMBSHEAD, P. J.D. Recent developments in marine benthic biodiversity research. **Oceanis**, v. 19, p. 5-24, 1993.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P.A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948.
- LATONNELLE, K.; LE MENN, F.; KAUSHIK, S.J.; BENNEETAU-PELISSERO, C. Effects of dietary phtoestrogens *in vivo* and *in vitro* in raiwbow trout and Siberian sturgeon: interests and limitis of the *in vitro* studies of interspecies differences. **General and Comparative Endocrinology**, v. 126, p. 39, 2002.
- LEE, K.Z.; SOMMER, R.J. Operon structure and *trans-splicing* in the nematode *Pristionchus pacificus*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 12, p. 2097-2103, 2003.
- LI, A.; SADASIVAM, M.; DING, J.L. Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (VTGr) and vitellogenin (VTG), implications on low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E. The first three ligand –binding repeats of VTGr interact with the amino-terminal region of VTG. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 2799-2806, 2003.
- LIM, E.H.; TEO, E.Y.; LAM, T. J.; DING, J.L. Sequence analysis of a fish vitellogenin cDNA with a large phosvitin domain. **Gene**, v. 277, p. 175-186, 2001.

LOUVET-VALLÉE, S.; KOLOTUEV, I.; PODBILEWICZ, B.; FÉLIX, M.A., Control of vulval competence and centering in the nematode *Oscheius* sp. 1 CEW1. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 133-146, 2003.

MACMORRIS, M.; BROVERMAN, S. GREENSPOON, S.; LEA, K.; MADEJ, C.; BLUMENTHAL, T.; SPIETH, J. Regulation of vitellogenin gene expression in transgenic *Caenorhabditis elegans*: short sequences required for activation of the *vit-2* promoter. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, p. 1652-1662, 1992.

MAÑANÓS, E.L.; NÚÑEZ RODRIGUES, J.; LEMENN, F.; ZANUY, S.; CARRILLO, M. Identification of vitellogenin receptors in the ovary of a teleost fish the Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Reproduction Nutritional Development**, v. 37, p. 51-61, 1997.

MANN, C.J.; ANDERSON, T.A.; READ, J.; CHESTER, S.A.; HARRISON, G.B.; KOCHL, S.; RITCHIE, P. J.; BRADBURY, P.; HUSSAIN, F.S.; AMEY, J.; VALOO, B.; ROSSENEU, M.; INFANTE, R.; HANCOCK, J.M., LEVITT, D.G.; BANASZAK, L.J.; SCOTT, J.; SHOULDERS, C.C. The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoprotein. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, p. 391-408, 1999.

MARAKOVA, O.V.; MARAKOV, E.M.; SOUSA, R.; DREYFUS, M. Transcribing of *Escherichia coli* genes with mutant T7 RNA polymerases: stability of lacZ mRNA inversely correlates with polymerase speed. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 12250-12254, 1995.

MARTINEZ, N.J.; OW, M.C.; REECE-HOYES, J.S.; BARRASA, M.I.; AMBROS, V. R.; WALHOUT, A.J. Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity. **Genome Research**, v. 15, n. 12, p. 2005-29915, 2008.

MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L. Characterization of vitellin and vitellogenin from *Rhodnius prolixus*. Identification of phosphorylated compounds in the molecule. **Insect Biochemistry**, v. 15, p. 543-550, 1985.

MCGHEE, J. D.; FUKUSHIGE, T; KRAUSE, M. W.; MINNEMA, S.E.; GOSZCZYNSKI, B.; GAUDET, J.; KOHARA, Y.; BOSSINGER, O.; ZHAO, Y.; KHATTRA, J.; HIRST, M.; JONES, S. J.; MARRA, M. A.; RUZANOV, P.; WARNER, A.; ZAPF, R.; MOERMAN, D.G.; KALB, J. M. ELT-2 is the predominant transcription factor controlling differentiation and function of the *C. elegans* intestine, from embryo to adult. **Developmental Biology**, v. 327, n. 2, p. 551-565.

MITCHELL, R.D. 3rd.; ROSS, E.; OSGOOD, C.; SONENSHINE, D.E.; DONOHUE, K.V.; KHALIL, S.M.; THOMPSON, D.M.; MICHAEL ROE, R. Molecular characterization , tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, p. 375-88, 2007.

- MONTORZI, M.; FALCHUCK, K.H.; VALLEE, B.L. *Xenopus laevis* vitellogenin is a zinc protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 200, p. 1407-1413, 1995.
- MOURA, J. P. **Análise da região N-terminal da proteína codificada no gene *Ot-vit-6* do nematóide *Oscheius tipulae* e sua interação com um polipeptídeo de 106 kDa**. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- MOUSAVI, S.A.; MALEROD, L.; BERG, T.; KJEKEN, R. Clathrin-dependent endocytosis. **Biochemical Journal**, v. 377, p. 1-16, 2004.
- NAPOLI, C; LEMIEUX, C; JORGENSEN, RA. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. **Plant Cell**, v. 2, p. 279-289, 1990.
- NARDELLI, D.; GERBER-HUBER, S; van het SCHIP, F.D.; GRUBER, M.; AB, G.; WHALI, W. Vertebrate and nematode genes coding for yolk protein are derived from a common ancestor. **Biochemistry**, v. 26, p. 6397-6402, 1987.
- NÚÑEZ RODRIGUES , J.; BOM, E.; LE MENN, E. Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 274, p. 163-170, 1996.
- NUSSBAUMER, A.D.; BRIGHT, M.; BARANYI, C.; BEISSER, C.J.; OTT, J.A. Attachment mechanism in a highly specific association between ectosymbiotic bacteria and marine nematodes. **Aquatic Microbiology Ecology**, v. 34, p. 239-246, 2004.
- OKABAYASHI, K.; SHOJI, H. H.; NAKAMURA, T.; HASHIMOTO, O.; ASASHIMA, M.; SUGINO, H. cDNA cloning and expression of the *Xenopus laevis* vitellogenin receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 406-413, 1996.
- OPRESKO, L.K.; WILEY, H.S. Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes. I. Characterization of the vitellogenin receptor system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 9, p. 4116-4123, 1987.
- ORKIN, S.H. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. **Blood**, v. 80, p. 575-581, 1992.
- ORLANDO, R.A.; EXNER, M.; CZEKAY, R-P; YAMAZAKI, H.; SAITO, A.; ULLRICH, R.; KERJASCHKI, D.; FARQUHAR, M.G. Identification of the second cluster of ligand-binding repeats in megalin as site for receptor-ligand interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 2368-2373, 1997.

OTHA, H.; FUJIWARA, M.; OHSHIMA, Y.; TAKESHI, I. ADBP-1 regulates an ADAR RNA-Editing Enzyme to antagonize RNA-interference-mediated gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 180, p. 785-796, 2008.

PENHA-SCARABOTTO, C. **Análise molecular dos polipeptídeos codificados no gene CEW1-vit-6 do nematóide *Oscheius n.sp.*** Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

PERAZZOLO, L.M.; COWARD, K.; DAVAIL, B. ; NORMAND, E., ; TYLER, C. R.; PAKDEL, F.; SCHNEIDER, W.J.; LE MENN, F. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss*. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1057-1068, 1999.

PERSAUD, D.R.; HAUNERLAND, N.H. Cloning and expression of the VHDL receptor from the fat body of the corn ear worm, *Helicoverpa zea*. **Journal of Insect Science**, v. 4, n. 6. p. 1-10, 2004.

PLASTERK, R.H. Single nucleotide polymorphisms in wild isolates of *Caenorhabditis elegans*. **Genome Research**, v. 10, p. 1690-1696, 2000.

PLASTERK, R.H.; KETTING, R.F. The silence of the genes. **Current Opinion in Genetic Development**, v. 10, p. 562–567, 2000.

PLASTERK, R.H. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes Development**, v. 15, p. 2654–2659, 2001.

RAMOS, C. R. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

RAVIV, S.; PARNES, C.; SEGALL, C., DAVIS, C. SAGI, A. Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. **General and Comparative Endocrinology**, v. 145, p. 39-50, 2006.

REECE-HOYES, J.S.; SHINGLES, J.; DUPUY, D.; GROVE, C.A.; WALHOUT, A.J.; VIDAL, M.; HOPE, I.A. Insight into transcription factor gene duplication from *Caenorhabditis elegans* Promoterome-driven expression patterns. **BMC Genomics**, v. 23, p. 8-27, 2007.

ROST, B. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. **Methods in Enzymology**, v. 266, p. 525-539, 1996.

ROUTLEDGE, E.J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G.C.; WALDOCK, M.;

SUMPTER, J.P. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent II: *In vivo* responses in trout and roach. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 1559-1565, 1998.

ROTHSTEIN, M. Nematode biochemistry. IX. Lack of sterol biosynthesis in free-living nematodes. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, v. 27, p. 309-317, 1968.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SAPPINGTON, T.W.; RAIKHEL, A.S. Receptor-mediated endocytosis of yolk proteins by insect oocytes. In: OHNISHI E.; SONOBE, H.; TAKAHASHI, S. Y. (Ed.) **Recent Advances in Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Nagoya, Japan: Nagoya University Press, 1995. p. 235-257.

SAPPINGTON, T.W.; HAYS, A.R.; RAIKHEL, A.S. Mosquito vitellogenin receptor: purification, developmental and biochemical characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 7, p. 807-817, 1995.

SAPPINGTON, T. W.; OISHI, K.; RAIKHEL, A. S. Structural characteristics of insect vitellogenins. In: RAIKHEL, A.S.; SAPPINGTON, T.W. (Ed.). **Reproductive Biology of Invertebrates: Progress in vitellogenesis**. Enfield: Science Publishers, 2002. p. 103-130.

SATO, M.; SATO, K.; FONAREV, P.; HUANG, C.J.; LIOU, W.; GRANT, B. D. *Caenorhabditis elegans* RME-6 is a novel regulator of RAB-5 at the clathrin-coated pit. **Nature Cell Biology**, v. 7, p. 559-569, 2005.

SCHNEIDER, W.J. Vitellogenin receptor: oocyte-specific members of the low density lipoprotein receptor supergene family. **International Review of Cytology**, v. 166, p. 103-135, 1996.

SCHONBAUM, C.P.; LEE, S.; MAHOWALD, A.P. The *Drosophila* *yolkless* genes encodes a vitellogenin receptor belonging to the low density lipoprotein receptor superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.92, n. 5, p. 1485-1489, 1995.

SEED, J.R. African trypanosomiasis. In: COX, E.G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. (Ed.). **Microbiology and Microbial Infections: Parasitology**. London: Topley & Wilson, 1998. v. 5, p. 267-282.

SELLERS, J.A.; HOU, L.; ATHAR, H.; HUSSAIN, M.M.; SHELNESS, G.S. A *Drosophila* microsomal triglyceride transfer protein homolog promotes the assembly and secretion of human apolipoprotein B. Implications for human and insect lipid transport and metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 20367-20373, 2003.

SELLERS, J.A.; HOU, L.; SCHOENBERG, D.R.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.R.;

WAHLI, W.; SHELNESS, G.S. Microsomal triglyceride transfer protein promotes the secretion of *Xenopus laevis* vitellogenin A1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 13902-13905, 2005.

SEO, S.J.; CHEON, H.M.; SUN, J.; SAPPINGTON, T.W.; RAIKEL, A.S. Tissue-and stage-specific expression of two lipophorin receptors variantes with seven and eight ligand-binding repeats in the adult mosquito. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41954-41962, 2003.

SERINO JR, J.C.; ALMENARA, D.P.; PENHA-SCARABOTTO, C.; MOURA, J.P.; WINTER, C.E. Vitellin-binding proteins in the nematode *Osccheius tipulae* (Nematoda, Rhabditida). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, v. 151, p. 330-335, 2008.

SHANKARAN, H.; RESAT, H.; WILEY, H.S. Cell surface receptors for signal transduction and ligand transport: a design principles study . **PloS Computational Biology**, v. 3, p. 986-999, 2007.

SHANNON, A.J.; TYSON, T.; DIX, I.; BOYD, J.; BURNELL, A.M. Systemic RNAi mediated gene silencing in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus*. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 58, 2008.

SHARROCK, W.J.; SUTHERLIN, M.E.; LESKE, K.; CHENG, T.K.; KIM, T.Y. Two distinct yolk lipoprotein complexes from *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 14422-14431, 1990.

SHARROCK, W.J. Yolk proteins of *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 96, p. 182-188, 1983.

SHELNESS, G.S.; LEDFORD, A.S. Evolution and mechanism of apolipoprotein B-containing lipoprotein assembly. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, p. 325-332, 2005.

SHEN, M.M.; HODGKIN, J. *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. **Cell**, v. 54, p. 1019-1031, 1988.

SHIBATA, Y.; BRANICKY, R. LANDAVERDE, I.O.; HEKIMIM, S. Rodox regulation of germline and vulval development in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 302, p. 1779-1782, 2003.

SHUMAN, S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using *Vaccinia* DNA Topoisomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 32678-32684, 1994.

SILVERMAN, G.A.; LUKE, C.J.; BHATIA, S.R.; LONG, O.S., VETICA, A.C.; PERLMUTTER, D.H.; PAK, S.C. Modeling molecular and cellular aspects of human disease

using the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Pediatric Research**, v. 65, n. 1, p. 10-18, 2009.

SMOLENAARS, M.M.W.; MADSEN, O.; RODENBURG, K.W.; VAN DER HORST, D.J. Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 489-502, 2007.

SOMMER, R.J. Comparative genetics: a third model nematode species. **Current Biology**, v. 10, n. 23, p. 879-881, 2000.

SPIETH, J.; SHIM, Y.H.; LEA, K.; CONRAD, R.; BLUMENTHAL, T. *elt-1*, an embryonically expressed *Caenorhabditis elegans* gene homologous to the GATA transcription factor family. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, p. 4651-4659, 1991.

SPIETH, J.; MACMORRIS, M.; BROVERMAN, S.; GREENSPOON, S.; BLUMENTHAL, T. Regulated expression of a vitellogenin fusion gene in transgenic Nematodes. **Developmental Biology**, v. 130, p. 285-293, 1988.

SPIETH, J.; DENISON, K.; ZUCKER, E.; BLUMENTHAL, T. The nucleotide sequence of a nematode vitellogenin gene. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 7129-7138., 1985.

STEINER, F.A.; OKIHARA, K.L.; HOOGSTRATE, S.W.; SIJEN, T.; KETTING, R.F. RDE-1 slicer activity is required only for passenger-strand cleavage during RNAi in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 16, n. 2, p. 207-211.

STIFANI, S.; GOGGE, R.; SCHNEIDER, W.J. Solubilization and characterization of the chicken oocyte vitellogenin receptor. **Biochemical Journal**, v. 250, p. 467-475, 1988.

STIFANI, S.; LE MENN, F.; NÚÑEZ RODRIGUES, J.; SCHNEIDER, W.J. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1045, p. 271-279, 1990.

SULSTON, J.E.; HORVITZ, H.R. Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 56, p. 110-156, 1977.

SULSTON, J.E.; BRENNER, S. The DNA of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, p. 95-104, 1974.

SWITZER, R.C.; MERRIL, C.R.; SHIFRIN, S. A Highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 98, p. 231-237, 1979.

SZEWCZYK, N.J.; KOZAK, E.; CONLEY, C.A. Chemically defined medium and *Caenorhabditis elegans*. **BMC Biotechnology**, v. 3, p. 19, 2003.

TABARA, H.; GRISHOK, A.; MELLO, C.C. RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome Sequence. **Science**, v. 282, p. 430-431, 1998.

TAO, Y.; BERLINSKY, D.L.; SULLIVAN, C.V. Characterization of a vitellogenin receptor in white perch (*Morone americana*). **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 3, p. 646-656, 1996.

TAVERNARAKIS, S.L.; WANG, M.; DOROVKOV, A.; RYAZANOV, A.; DRISCOLL, M. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. **Nature Genetics**, v. 24, p. 180-183, 2000.

TCHESUNOV, A.V.; RIEMANN, F. Artic sea ice nematodes (Monhysteroidea), with descriptions of *Cryonema crassum* gen. n. and *C. tenue* sp. n. **Nematologica**, v. 41, p. 35-50, 1995.

THACKER, C.; SRAYKO, M. A.; ROSE, A. M. Mutational analysis of *bli-4/kpc-4* reveals critical residues required for proprotein convertase function in *C. elegans*. **Gene**, v. 252, p. 15-25, 2000.

THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, p. 2012-2018, 1998.

THOMPSON, J.R.; BANASZAK, L.J. Lipid-Protein interactions in Lipovitellin. **Biochemistry**, v. 41, n.30, p. 9398-9409, 2002.

TIMMINS, P.A.; POLIKS, B.; BANASZAK, L. The location of bound lipid in the lipovitellin complex. **Science**, v. 257, p. 652-655, 1992.

TIMMONS, L.; COURT, D.L.; FIRE, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, p. 103-112, 2001.

TIU, S.H.; BENZIE, J.; CHAN, S.M. From hepatopancreas to ovary: molecular characterization of a shrimp vitellogenin receptor involved in processing of vitellogenin. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 1, p. 66-74, 2008.

TUFAIL, M.; TAKEDA, M. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: Molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms, **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 88-104, 2009.

TUFAIL, M.; TAKEDA, M. Molecular characteristics of insect vitellogenins. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 12, p. 1447-1458, 2008.

TUFAIL, M.; TAKEDA, M. Molecular cloning and developmental expression pattern of the

vitellogenin receptor from the cockroach, *Leucophaea maderae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 3, p. 235-245, 2007.

TYLER, C.R.; LANCASTER, P. Isolation and characterization of the receptor for vitellogenin from follicles of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 163, p. 219-224, 1993.

van der KROL, A.R.; MUR, L.A.; BELD, M; MOL, J.N.; STUITJE, A.R. Flavonoid genes in *Petunia*: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **Plant Cell**, v. 2, p. 291-299, 1990.

WAHLI, W. Evolution and expression of vitellogenin genes. **Trends in Genetics**, v. 4, p. 227-232, 1988.

WALLACE, R.A. Vitellogenesis and oocyte growth in non mamallian vertebrates. In: BROWDER, L.W. (Ed). **Developmental Biology: a Comprehensive Synthesis (Oogenesis)**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1985. p. 127-177.

WANG, H.; YAN, T.; TAN, J.T.; GONG, Z. A zebrafish vitellogenin gene (*vg3*) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. **Gene**, v. 256, n. 1-2, p. 303-310, 2000.

WASMUTH, J.; SCHMID, R.; HEDLEY, A.; BLAXTER, M. On the extent and origins of genic novelty in the Phylum Nematoda. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, p. 1-14, 2008.

WHITE, J. The anatomy. In: WOOD, W.B. (Ed). **The Nematode *Caenorhabditis elegans***. New York: Cold Spring Harbor, 1988. p. 81-122.

WILKINS, C.; DISHONGH, R.; MOORE, S.C.; WHITT, M.A.; CHOW, M.; MACHACA, K. RNA interference is an antiviral defense mechanism in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 436, p. 1044-1047, 2005.

WILLNOW, T.E.; ARMSTRONG, S.A.; HAMMER, R.E.; HERZ, J. Functional expression of low density lipoprotein receptor-related proteins is controlled by receptor-associated protein in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 4537-4541, 1995.

WILLNOW, T.E.; NYKJAER, A.; HERZ, J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. **Nature Cell Biology**, v. 1, n. 6, p. 157-162, 1999.

WINSTON, W.M.; SUTHERLIN, M.; WRIGHT, A.M.; FEINBERG, E.H.; HUNTER, C.P. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, p. 10565-10570, 2007.

WINTER, C. E. The yolk polypeptides of a free living Rhabditid nematode. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 103, p. 189-196, 1992.

WINTER, C.E.; PENHA, C.; BLUMENTHAL, T. Comparison of a vitellogenin gene between two distantly related Rhabditid nematode species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 5, p. 674-684, 1996.

WINTER, C.E. Yolk proteins and their precursors in non-arthropod protostomes, with emphasis on nematodes. In: RAIKHEL, A.S.; SAPPINGTON, T.W. (Ed.). **Reproductive Biology of Invertebrates: Progress in vitellogenesis**. Enfield: Science Publishers, 2002. p. 1-28.

WITHWORTH, J. Onchocerciasis. In: COX, E.G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. (Ed.). **Microbiology and Microbial Infections: Parasitology**. London: Topley & Wilson, 1998. v. 5, p. 621-633.

WOOD, W.B. Introduction to *C. elegans* biology. In: WOOD, W.B. (Ed.) **The Nematode *Caenorhabditis elegans***. New York: Cold Spring Harbor, 1988. p. 243-335.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Report: Changing History**. Geneva: WHO, 2004. p. 1-96.

WORMATLAS: **Introduction to *C. elegans* anatomy**. Banco de dados de comportamento e anatomia de *C. elegans*. [página na internet]. Nova Iorque: Albert Einstein College of Medicine. Disponível em: <<http://www.wormatlas.org/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>>. Acesso em: 2009 jan. 20.

WORMBASE. Banco de dados sobre Biologia e Genômica de *C. elegans* [página na internet]. EUA: Califórnia Institute of Technology, Cold Spring Harbor Laboratory, Washington University em St. Louis e The Wellcome Trust Sanger Institute. Disponível em: <<http://www.wormbase.org>>. Acesso em: 2009 fev. 19.

YI, W.; ZARKOWER, D. Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms. **Development**, v.126, p. 873-881, 1999.

YOKOTA, Y.; SAPPINGTON, T.W. Vitellogen and Vitellogenin in Echinoderms. In: RAIKHEL, A.S.; SAPPINGTON, T.W. (Ed.). **Reproductive Biology of Invertebrates: Progress in vitellogenesis**. Enfield: Science Publishers, 2002. p. 201-221.

YOUNG, R.A.; DAVIS, R.W. Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. **Science**, v. 222, p. 778-782, 1983.

YUSKO, S.; ROTH, T.F.; SMITH, T. Receptor-mediated vitellogenin binding to chicken oocytes. **Biochemical Journal**, v. 200, n. 1, p. 43-50, 1981.

ZHANG, Y.; GRANT, B.; HIRSH, D. RME-8, a conserved J-domain, is required for endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p. 2011-2021, 2001.

ZHANG, Y.; NASH, L.; FISHER, A.L. A simplified, robust, and streamlined procedure for the production of *C. elegans* transgenes via recombineering. **Developmental Biology**, v. 8, p. 1-15, 2008.

ZHOU, Y.; ZHANG, J.; KING, M.L. *Xenopus* autosomal recessive hypercholesterolemia protein couples lipoproteins receptors with the AP-2 complex in oocytes and embryos and is required for vitellogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.45, p. 44584-44592, 2003.

ZHU, Y.; DORAY, B.; POUSSU, A.; LEHTO, V-P; KORNFELD, S. Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the Mannose 3-phosphate Receptor. **Science**, v. 292, n. 5522, p. 1716-1718, 2001.

ZHU, J.; HILL, R.; HEID, P.; FUKUYAMA, M.; SUGIMOTO, A.; PRIESS, J.; ROTHMAN, J. *end-1* encodes an apparent GATA factor that specifies the endoderm precursor in *Caenorhabditis elegans* embryos. **Genes Development**, v. 11, p. 2883-2896, 1997.