

CARACTERIZAÇÃO DO CANAL DE CÁLCIO CRAC E SUA
INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO
DE *Tribolium castaneum*

AMANDA TOLEDO MACHADO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES
FEVEREIRO - 2026

CARACTERIZAÇÃO DO CANAL DE CÁLCIO CRAC E SUA
INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO
DE *Tribolium castaneum*

AMANDA TOLEDO MACHADO

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Eliza Zeraik

Campos dos Goytacazes - RJ
Fevereiro de 2026

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M149 Machado, Amanda Toledo.

"Caracterização do canal de cálcio CRAC e sua influência no desenvolvimento de *Tribolium castaneum*". / Amanda Toledo Machado. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

87 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.
Orientadora: Ana Eliza Zeraik.

1. Canal CRAC. 2. STIM. 3. Orai. 4. *Tribolium castaneum*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570


CARACTERIZAÇÃO DO CANAL DE CÁLCIO CRAC E SUA
INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO
DE *Tribolium castaneum*

AMANDA TOLEDO MACHADO


Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título
de Mestre em Biociências e
Biotecnologia.

Aprovada em 10 de Fevereiro de 2026.


Banca Examinadora:

 Documento assinado digitalmente
ANA PAULA ULIAN DE ARAUJO
Data: 11/02/2026 21:41:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.^a Dr.^a Ana Paula Ulian de Araújo (Doutora em Ecologia e Recursos Naturais) - USP

 Documento assinado digitalmente
GABRIEL BONAN TAVEIRA
Data: 12/02/2026 09:52:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Gabriel Bonan Taveira (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - UENF

 Documento assinado digitalmente
GUSTAVO LAZZARO REZENDE
Data: 12/02/2026 23:25:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende (Doutor em Biologia Celular e Molecular) - UENF

 Documento assinado digitalmente
ANA ELIZA ZERAİK
Data: 11/02/2026 09:53:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Ana Eliza Zeraik (Doutora em Física Aplicada - Biomolecular) - UENF
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço às Instituições que apoiaram este trabalho: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (E-26/200.177/2023, E-26/210.094/2022, E-26/211.860/2021 e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código Financeiro 001. Esta pesquisa foi também realizada com o uso de infraestrutura financiada pela Finep, no âmbito do programa FINEP/MCTI/FNDCT/PROINFRA 2021 (Convênio nº 0.1.22.0442.00).

À UENF e ao programa PGBB, pela infraestrutura e suporte acadêmico.

À professora Ana Eliza Zeraik, pela orientação, pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, pela confiança em meu potencial e pelo tempo dedicado ao ensino e à compartilhar conhecimentos que contribuíram para minha formação acadêmica e científica.

Aos amigos que fiz ao longo desse período e que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

E, de forma muito especial, agradeço à minha família, minha base e principal suporte emocional. Em especial, à minha mãe Aldineia e ao meu marido Robson, pelo amor incondicional dos dois, pelo incentivo constante e pelo apoio fundamental, sem os quais nada disso teria sido possível.

Agradeço à Deus pelo dom da vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Insetos: Características gerais e sua relevância evolutiva.....	15
1.1.1 Morfologia dos insetos.....	16
1.1.2 Importância do cálcio intracelular em insetos.....	19
1.2 <i>Tribolium castaneum</i>	20
1.2.1 Modelo para estudos genéticos.....	23
1.3 Canais de cálcio.....	25
1.3.1 Canal CRAC.....	26
1.3.2 A proteína STIM.....	29
1.3.3 A proteína Orai.....	30
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4. METODOLOGIA	34
4.1 Manutenção de colônias do inseto <i>Tribolium castaneum</i> em laboratório...34	
4.2 Extração de RNA de <i>T. castaneum</i>	34
4.3 Análise comparativa e predição das sequências de STIM e Orai de <i>T. castaneum</i>	34
4.4 Clonagem de STIM e Orai de <i>T. castaneum</i>	35
4.5 Expressão e purificação de TcSTIM-EF-SAM em <i>Escherichia coli</i>	37
4.6 Experimentos de Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	39
4.7 Experimentos de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	40
4.8 Experimento de SDS-PAGE após digestão suave com tripsina e eletroforese em gel de poliacrilamida nativa.....	41
4.9 Cultivo de células HEK293.....	41
4.10 Expressão de TcSTIM em células de mamíferos.....	42
4.11 Síntese de dsRNA.....	43
4.12 Silenciamento gênico por RNAi.....	43
5. RESULTADOS	45
5.1 Análises de bioinformática das sequências das proteínas STIM e Orai.....	45
5.2 Clonagem de STIM e Orai de <i>T. castaneum</i>	49
5.3 Expressão e purificação de TcSTIM-EF-SAM em <i>E. coli</i>	51
5.4 TcSTIM-EF-SAM atua como sensor de cálcio.....	54
5.5 Ligação com cálcio aumenta a estabilidade térmica de TcSTIM-EF-SAM.....	56
5.6 TcSTIM-EF-SAM muda sua conformação após ligação com cálcio.....	59
5.7 TcSTIM forma <i>puncta</i> após depleção de cálcio e mudança de pH intracelular.....	
5.8 O canal CRAC interfere no ciclo de vida do <i>T. Castaneum</i>	64
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Filogenia dos insetos mostrando os principais tipos de desenvolvimento.....	17
Figura 2: O ciclo de vida de <i>Tribolium castaneum</i>	21
Figura 3: Dimorfismo sexual durante os estágios de pupa e adulto de <i>Tribolium castaneum</i>	22
Figura 4: A via de ativação do canal CRAC e os processos de sinalização subsequentes.....	23
Figura 5: Modelo de ativação de STIM e acoplamento à Orai.....	30
Figura 6: Arquitetura de Orai.....	31
Figura 7: Alinhamento múltiplo de STIM das espécies <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> e <i>Helicoverpa armigera</i>	46
Figura 8: Alinhamento múltiplo de Orai das espécies <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> e <i>Helicoverpa armigera</i>	47
Figura 9: Estrutura tridimensional da proteína TcSTIM gerada pelo AlphaFold.	48
Figura 10: Estrutura tridimensional da proteína TcOrai gerada pelo AlphaFold.	49
Figura 11: Representação em gel de agarose de teste para confirmação de clones positivos.....	51
Figura 12: Resultado do teste de expressão de TcSTIM-EF-SAM.....	52
Figura 13: Lavagens da etapa de cromatografia de afinidade.....	53
Figura 14: Resultado da Cromatografia de Exclusão Molecular.....	54
Figura 15: Análise de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da titulação de Ca^{2+} a TcSTIM-EF-SAM.....	55
Figura 16: Análise de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da titulação de Mg^{2+} a TcSTIM-EF-SAM.....	56
Figura 17: Espectro de Dicroísmo Circular da proteína TcSTIM-EF-SAM.....	57
Figura 18: Desnaturação térmica da proteína TcSTIM-EF-SAM via espectro de Dicroísmo Circular.....	58
Figura 19: Desnaturação térmica da proteína TcSTIM EF-SAM via espectro de Dicroísmo Circular.....	59
Figura 20: Resultado de reação de digestão suave com tripsina.....	59
Figura 21: Resultado de deslocamento de TcSTIM-EF-SAM em gel nativo...	60
Figura 22: Imagens de microscopia confocal das células HEK293 transfectadas com EGFP-STIM.....	62
Figura 23: Imagens de microscopia confocal das células HEK293 transfectadas com EGFP-STIM.....	63
Figura 24: Imagens de microscopia confocal das células HEK293 transfectadas com EGFP-STIM.....	64
Figura 25: Resultado do silenciamento de TcSTIM, através de RNAi.....	65
Figura 26: Resultado do silenciamento de TcSTIM, através de RNAi.....	65
Figura 27: Resultado do silenciamento de TcSTIM, através de RNAi.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CAD – Domínio ativador de CRAC (*CRAC Activation Domain*)

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CD – Dicroísmo circular (*Circular Dichroism*)

cDNA – DNA complementar

CRAC – Canal de cálcio ativado por depleção de estoques (*Calcium Release-Activated Calcium channel*)

CRISPR – Repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas agrupadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

DAG – Diacilglicerol

DMEM – Meio Dulbecco modificado de Eagle

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dsRNA – RNA de fita dupla (*Double-stranded RNA*)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFP – Proteína verde fluorescente aprimorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)

EGTA – Ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra-acético

FAR-UV – Ultravioleta distante (*Far Ultraviolet*)

FRET – Transferência de energia por ressonância de fluorescência (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

HCl – Ácido clorídrico

HEK293 – Células embrionárias renais humanas (*Human Embryonic Kidney 293*)

IMAC – Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*)

IP3 – Inositol 1,4,5-trifosfato

IP3R – Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato

IPTG – Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

ITC – Calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*)

KCl – Cloreto de potássio

kDa – Quilodalton

LB – Meio Luria-Bertani

LGC – Canal iônico controlado por ligante (*Ligand-Gated Channel*)

MES – Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MP – Membrana plasmática

MUSCLE – Ferramenta de alinhamento múltiplo de sequências (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*)

NaCl – Cloreto de sódio

NCBI – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information*)

NFAT – Fator nuclear de células T ativadas (*Nuclear Factor of Activated T-cells*)

Ni-NTA – Nitrilotriacetato de níquel

PB – Tampão fosfato (*Phosphate Buffer*)

PBD – Domínio de ligação polibásico (*Polybasic Domain*)

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PIP₂ – Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PLDDT – Teste de diferença de distância local predita (*Predicted Local Distance Difference Test*)

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonila (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

RE – Retículo endoplasmático

RNA – Ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

SAM – Motivo alfa estéril (*Sterile Alpha Motif*)

SEC – Cromatografia por exclusão de tamanho (*Size Exclusion Chromatography*)

SERCA – *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SOAR – Região ativadora de Orai dependente de STIM (*STIM-Orai Activating Region*)

SOC – Canal ativado por depleção de estoques (*Store-Operated Channel*)

SOCE – Entrada de cálcio operada por depleção de estoques (*Store-Operated Calcium Entry*)

ssRNA – RNA de fita simples (*Single-stranded RNA*)

STIM – Molécula de interação estromal (*Stromal interaction molecule*)

TG – Tapsigargina

TRP – Canal do potencial receptor transitório (*Transient Receptor Potential*)

VGCC – Canal de cálcio dependente de voltagem (*Voltage-Gated Calcium Channel*)

RESUMO

O cálcio é um elemento de grande importância para a manutenção das atividades celulares, pois participa ativamente em processos como divisão celular, crescimento, contração muscular, transmissão neuronal e secreção. Compreender os mecanismos de sua entrada nas células é fundamental, pois pode revelar alvos relevantes para o controle de espécies que causam danos econômicos e prejudicam a agricultura, como o inseto *Tribolium castaneum*, uma importante praga agrícola de grãos armazenados. A entrada de cálcio mediada pelo canal CRAC é ativada pela depleção de cálcio intracelular. Este canal é composto por duas proteínas: STIM (*stromal interaction molecule*), que atua como um sensor de cálcio localizado na membrana do retículo endoplasmático, e Orai, que forma o poro do canal e está presente na membrana plasmática. Nesse contexto, esta pesquisa realizou um estudo funcional e a caracterização do canal CRAC em *T. castaneum*. Para isso, os genes das proteínas do canal CRAC de *T. castaneum* foram clonados em vetores de expressão de bactérias e de células de mamíferos. O domínio EF-SAM da proteína TcSTIM, foi expresso em *E. coli* e purificado com sucesso, foram realizados experimentos de caracterização biofísica para analisar sua ligação com cálcio e mudança conformacional induzida por essa ligação. Como resultado, os experimentos de ITC demonstraram que TcSTIM-EF-SAM se liga especificamente ao cálcio de maneira exotérmica. Os espectros de dicroísmo circular revelaram uma estrutura secundária rica em α -hélices. A estabilidade térmica de TcSTIM-EF-SAM foi monitorada na presença e ausência de Ca^{2+} e pudemos observar aumento de estabilidade na presença do ligante, um aumento de 10°C no T_m . Adicionalmente, foi realizado um ensaio de digestão suave com tripsina, no qual foi possível determinar que TcSTIM-EF-SAM sofre mudança conformacional após ligação com cálcio. A proteína TcSTIM, transfectada em células HEK293, se localiza na membrana do retículo endoplasmático (RE) e mediante estímulo com taspigargina foi capaz de induzir a formação de *puncta*, evidenciando que o canal CRAC de *T. castaneum* é funcional. Foi realizado o silenciamento do gene TcSTIM através de RNAi em larvas de *T. castaneum*, que resultou na alteração do desenvolvimento de asas e élitros de insetos adultos. Por fim, os resultados obtidos indicam que o canal de cálcio CRAC em *T. castaneum* é funcional e apresenta proteínas sensoras de cálcio ativas. Além disso, a expressão da

proteína STIM interfere diretamente no desenvolvimento do ciclo de vida do inseto, impactando de forma significativa o seu processo de metamorfose. Diante desses resultados, o canal de cálcio CRAC se revela como um mecanismo promissor, com potencial para ser explorado em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de estratégias inovadoras para o controle de pragas agrícolas.

Palavras-chave: Canal CRAC, STIM, Orai, *Tribolium castaneum*.

ABSTRACT

Calcium is an element of great importance for the maintenance of cellular activities, as it actively participates in processes such as cell division, growth, muscle contraction, neuronal transmission, and secretion. Understanding the mechanisms of calcium entry into cells is essential, as it may reveal relevant targets for the control of species that cause economic damage and harm agriculture, such as the insect *Tribolium castaneum*, an important agricultural pest of stored grains. Calcium entry mediated by the CRAC channel is activated by the depletion of intracellular calcium. This channel is composed of two proteins: STIM (stromal interaction molecule), which acts as a calcium sensor located in the endoplasmic reticulum membrane, and Orai, which forms the channel pore and is present in the plasma membrane. In this context, this research carried out a functional study and the characterization of the CRAC channel in *T. castaneum*. For this purpose, the genes for the CRAC channel proteins of *T. castaneum* were cloned into bacterial and mammalian cell expression vectors. The EF-SAM domain of the TcSTIM protein was expressed in *Escherichia coli* and successfully purified, and biophysical characterization experiments were performed to analyze calcium binding and calcium-induced conformational changes. As a result, ITC experiments demonstrated that TcSTIM-EF-SAM specifically binds calcium in an exothermic manner. Circular dichroism spectra revealed a secondary structure rich in α -helices. The thermal stability of TcSTIM-EF-SAM was monitored in the presence and absence of Ca^{2+} , and an increase in stability was observed in the presence of the ligand, with an increase of 10 °C. Additionally, a limited trypsin digestion assay was performed, which allowed the determination that TcSTIM-EF-SAM undergoes conformational changes after calcium binding. The TcSTIM protein, transfected into HEK293 cells, localized to the endoplasmic reticulum membrane and, upon stimulation with thapsigargin, was able to induce puncta formation, demonstrating that the CRAC channel of *T. castaneum* is functional. Silencing of the TcSTIM gene by RNAi in *T. castaneum* larvae resulted in altered wing and elytra development in adult insects. Finally, the results obtained indicate that the CRAC calcium channel in *T. castaneum* is functional and contains active calcium-sensing proteins. Moreover, the expression of the STIM protein directly interferes with the

insect life cycle, significantly impacting its metamorphosis process. In light of these results, the CRAC calcium channel emerges as a promising mechanism with potential to be explored in research aimed at the development of innovative strategies for agricultural pest control.

Keywords: CRAC channel, STIM, Orai, *Tribolium castaneum*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insetos: Características gerais e sua relevância evolutiva

Os insetos, pertencentes ao grupo hexápode do filo Arthropoda, constituem um dos grupos terrestres mais bem-sucedidos, apresentando ampla diversidade de formas de vida, estando atualmente distribuídos em aproximadamente 28 ordens. Os hexápodes, artrópodes caracterizados pela presença de seis patas, divergiram de ancestrais crustáceos aquáticos e participaram do processo de colonização do ambiente terrestre pelos artrópodes, iniciado há mais de 450 milhões de anos. Os primeiros insetos eram morfologicamente semelhantes aos representantes atuais das ordens Archaeognatha (insetos saltadores) e Zygentoma (traças-prateadas) (TRUMAN, 2019).

A classe insecta, com mais de um milhão de espécies, corresponde a mais da metade de todas as espécies descritas, sendo sua importância ecológica difícil de estimar. A sua incomparável diversidade de espécies, torna a análise e reconstrução da evolução dos insetos algo realmente complexo (MYLONAKIS *et al.*, 2016; FRENCH *et al.*, 2023). Em 1969 o influente entomologista alemão Willi Hennig (1913–1976) realizou a publicação de seu livro “*Die Stammesgeschichte der Insekten*” (A História dos Insetos), no qual Hennig enfatizou a distinção entre caracteres ancestrais e derivados (apomórficos), defendeu uma classificação baseada estritamente em grupos monofiléticos definidos pela posse compartilhada de caracteres derivados (ou seja, sinapomorfias) e destacou a importância dos fósseis na inferência filogenética, essas análises formaram a base para os futuros estudos morfológicos da filogenia dos insetos e para o desenvolvimento da filogenética estatística, evidenciando, assim, a importância desse grupo no estudo da filogenia das espécies (TIHELKA *et al.*, 2021).

Um segundo momento importante para a compreensão da evolução dos insetos foi marcado pela introdução da filogenética molecular; a primeira filogenia molecular de insetos foi publicada no final da década de 1980, com base em sequências de rRNA, em estudos pioneiros conduzidos por Wheeler, posteriormente ampliados e consolidados em análises mais abrangentes

(WHITING *et al.*, 1997; KJER, 2004). Em 2021, mais de 600 genomas de insetos, 440 transcriptomas, 1400 genomas mitocondriais e 69000 códigos de barras de DNA haviam sido lançados (HOTALING *et al.*, 2021). Essa disponibilidade de centenas ou milhares de genes para representantes dos principais grupos de hexápodes vivos facilitou estudos filogenômicos em grande escala. Esse vasto conjunto de dados genômicos permite elucidar padrões, escalas temporais e os fatores que impulsionam a diversificação dos insetos, além de consolidá-los como um sistema modelo para o estudo de padrões e processos macroevolutivos (JOHNSON, 2019; TIHELKA *et al.*, 2021).

Os motivos que teriam levado os insetos a esse sucesso e excepcional diversidade na Árvore da Vida, permanecem incertos. Fatores ecológicos em escala local podem influenciar fortemente a diversificação de espécies em escalas temporais (≥ 500 milhões de anos) (FRENCH *et al.*, 2023). Os artrópodes representam o filo animal mais rico em espécies. Weins *et al.* (2015) sugere a existência de características intrínsecas aos artrópodes que contribuíram para sua notável riqueza taxonômica, incluindo exoesqueleto, a segmentação corporal, a diversidade e plasticidade funcional de seus apêndices. No caso dos insetos, a herbivoria, a holometabolia e o surgimento das asas, seriam fatores importantes.

1.1.1 Morfologia dos insetos

O plano corporal dos insetos é caracterizado pela divisão em três porções características: cabeça, tórax e abdômen (ANGELINI *et al.*, 2005).

A cabeça do inseto representa seu centro sensorial e alimentar, contendo estruturas essenciais como cérebro, olhos e ocelos complexos, antenas e abertura bucal. Ela é composta por vários segmentos especializados e unidos entre si e é móvel em relação ao tronco. O tórax é composto por três segmentos, cada um com um par de pernas articuladas, podendo também sustentar as asas, que é sua inovação evolutiva fundamental para dispersão dos ambientes e extraordinária diversidade. O abdômen concentra grande parte do sistema digestório, excretor e reprodutor, a estrutura básica do trato digestivo dos insetos é bem semelhante, possuindo algumas modificações associadas à adaptação e diferentes modos de alimentação. O intestino possui três regiões principais:

intestino anterior e posterior que se originam da ectoderme embrionária e são revestidos por um exoesqueleto composto de quitina e glicoproteínas cuticulares e, o intestino médio (ou ventrículo) que é o principal local de digestão e absorção em muitos insetos, seu desenvolvimento tem origem nas células endodérmicas e não possui revestimento exoesquelético (POSNIEN *et al.*, 2009; ROSS, 2017; ENGEL; MORAN, 2013).

O corpo dos insetos é revestido por um exoesqueleto constituído por uma cutícula quitinosa, que fornece suporte estrutural, proteção mecânica e reduz a perda de água, sendo essencial para a vida terrestre. Seu ciclo de vida é portanto, caracterizado pelo acontecimento de mudas, momento em que uma nova cutícula é formada e a antiga é descartada, um processo denominado ecdise, o intervalo entre uma ecdise e a próxima é chamada de ínstar (TRUMAN, 2019).

Durante sua história evolutiva, os insetos passaram por diferentes estratégias de metamorfose ao longo de seu ciclo de vida. Essas estratégias variam quanto ao grau de metamorfose e incluem a ametabolia, a hemimetabolia e a holometabolia, refletindo distintos níveis de complexidade morfológica, fisiológica e ecológica ao longo do desenvolvimento (Figura 1) (BELLES, 2023; TRUMAN, 2019; TRUMAN; RIDDIFORD, 2019).

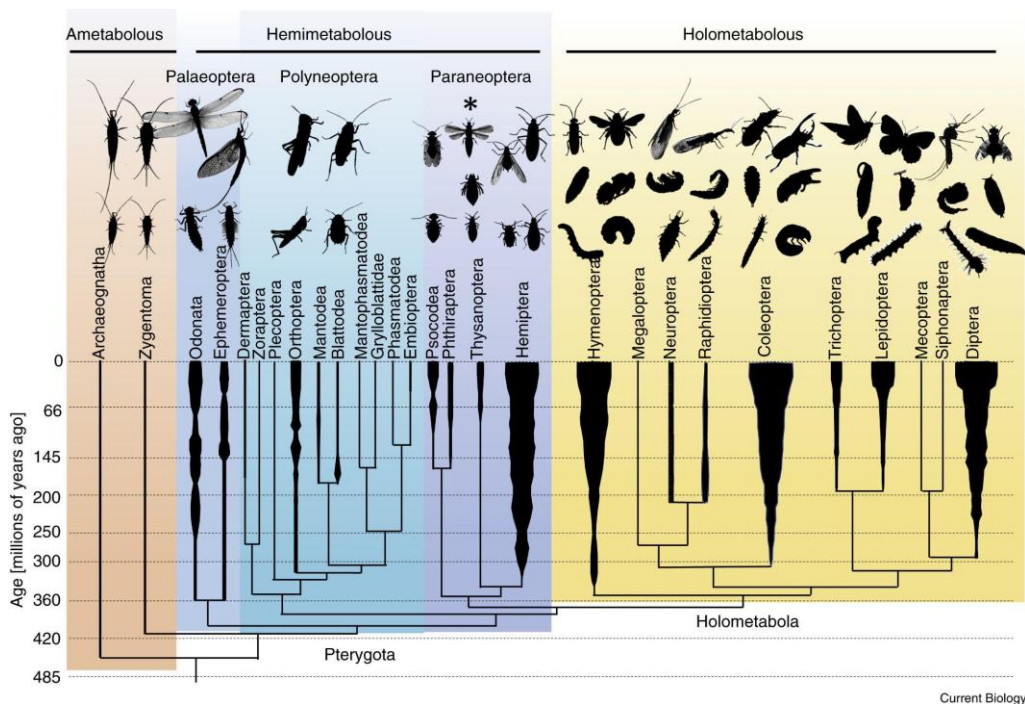


Figura 1. Filogenia dos insetos mostrando os principais tipos de desenvolvimento. A figura mostra como os três principais tipos de desenvolvimento dos insetos (ametabólico, hemimetábólico e holometabólico) se relacionam com a filogenia dos insetos, com exemplos dos estágios imaturos e adultos para cada um (TRUMAN, 2019).

O desenvolvimento direto e simples, denominado ametabólico, é uma estratégia ancestral, e persiste nas ordens primitivamente sem asas, Zygentoma (peixes-prata) e Archaeognatha (criaturas-saltadoras). Nesse desenvolvimento, os estágios juvenis diferem pouco do adulto, e as ecdises continuam ocorrendo mesmo após a maturidade sexual, alternando-se com períodos reprodutivos (BELLES, 2023; TRUMAN; RIDDIFORD, 2019).

Com o surgimento das asas, o adulto se torna o estágio terminal sem o acontecimento de mudas, e seu estágio imaturo é denominado ninfa, que normalmente se assemelha ao adulto, porém não apresenta órgãos reprodutivos desenvolvidos e também não possui asas. Esse padrão de desenvolvimento é caracterizado por metamorfose incompleta ou desenvolvimento hemimetábolo. Ordens que apresentam esse tipo de desenvolvimento são as dos Odonata (libélulas e donzelinhas), Ephemeroptera (efêmeras), Plecoptera (moscas-de-pedra), Orthoptera (gafanhotos e grilos), Blattodea (baratas e cupins), Mantodea (louva-a-deus), Phasmatodea (bichos-pau), Dermaptera (tesourinhas), Hemiptera (percevejos, cigarras, pulgões e cochonilhas), Thysanoptera (tripés), Psocodea (piolhos-de-livro e piolhos parasitas), Embioptera, Zoraptera, Grylloblattodea e Mantophasmatodea (BELLES, 2023; TRUMAN; RIDDIFORD, 2019).

Os ciclos de vida holometabólicos apresentam uma metamorfose completa e é considerado o mais complexo entre os insetos, envolvendo quatro estágios bem distintos, o estágio de ovo, o estágio larval, que não apresenta nenhuma semelhança com o adulto, um estágio pupal, não alimentar e o estágio adulto. Essa estratégia surgiu no início do período Carbonífero, por volta de 350 milhões de anos atrás, e levou a grande parte da incrível diversidade de insetos que é evidente hoje. Os Holometábolos incluem 11 ordens, quatro das quais foram extremamente bem-sucedidas: Coleoptera (besouros), Hymenoptera (formigas, vespas e moscas-serra), Lepidoptera (borboletas e mariposas) e Diptera (moscas e mosquitos) (TRUMAN; RIDDIFORD, 2019).

Embora a maioria dos insetos apresente uma metamorfose completa, ou seja, holometabólica, esse padrão de desenvolvimento não poderia ter evoluído sem o surgimento prévio da hemimetabolía como um estágio intermediário. No entanto, ainda não compreendemos completamente quais os mecanismos evolutivos que promoveram a transição dos insetos ametabólicos para formas hemimetabólicas, ressaltando assim, que existem lacunas no entendimento da origem e da diversificação dos ciclos de vida dos insetos (BELLES, 2023).

1.1.2 Importância do cálcio intracelular em insetos

A modulação dos níveis de Ca^{2+} e das vias de sinalização dependentes de cálcio desencadeiam cascatas intracelulares que determinam uma variedade de funções em insetos, principalmente relacionadas ao sistema nervoso, como o controle de neurônios marca-passo circadianos (BAZ *et al.*, 2013), a regulação da expressão gênica (OHNISHI *et al.*, 2011), danos mitocondriais (YE *et al.*, 2023) e o controle das propriedades elétricas das células (GROLLEAU *et al.*, 1996). Esse importante papel das vias de cálcio em insetos, promoveu estudos relacionando o modo de ação de inseticidas aos níveis intracelulares de cálcio (THANY, 2025).

Pitti Caballero *et al.* 2019 descreveram a ação do inseticida deltametrina, classificado como um piretróide, que é uma classe de inseticidas sintéticos que atuam no sistema nervoso de insetos levando a paralisia e morte. Descobriu-se que a deltametrina, potencializou o efeito do indoxacarbe e aumentou a concentração intracelular de cálcio através do trocador reverso $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Outra ligação entre inseticidas e o nível de cálcio intracelular foi observada com a ação de inseticidas à base de rianodina e diamida, caracterizados por terem como alvo receptores rianodina (RyRs) (THANY, 2025). A rianodina é um inseticida natural, que afeta a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, estabilizando esses canais em um estado parcialmente aberto (LAHM *et al.*, 2005).

1.2 *Tribolium castaneum*

O inseto *Tribolium castaneum* pertencente à família Tenebrionidae, da ordem Coleoptera, se destaca pela sua importância econômica na indústria de grãos. Descrito por Willi H. Herbst em 1797, inicialmente a espécie foi nomeada como *Colidium castaneum*, um nome que posteriormente foi revisado para *Tribolium castaneum* à medida que a sistemática dos coleópteros foi aprimorada ao longo do século XIX e XX (ABDEL, 2007).

Este inseto é considerado uma das maiores pragas secundárias atuais, que infesta principalmente cereais (milho, soja, trigo etc.) já triturados e armazenados, gerando perdas financeiras significativas para o processo final de colheita de grãos (WALSKI *et al.*, 2016). Ele possui uma ampla distribuição geográfica, tendo sido reportado em 156 países, além de possuir uma grande diversidade de produtos que infesta, este inseto possui uma das maiores taxas de crescimento populacional devido a sua alta reprodução e longa vida reprodutiva (LEE *et al.*, 2013). Além de sua capacidade de encontrar e infestar commodities dispersas, resultando na rápida disseminação da infestação ao longo e entre as instalações (CAMPBELL *et al.*, 2022).

Pouco se sabe sobre os hábitos e nicho ecológico do *T. castaneum* antes de sua introdução em ambientes de armazenamento de alimentos para o consumo humano. No entanto, a espécie apresenta características evolutivas que podem indicar evidências do seu modo de vida original. Entre elas, a alta tolerância para habitar ambientes quentes e secos, marcada pelo desenvolvimento de um órgão criptonefridial altamente evoluído, semelhante a um rim, essa adaptação fisiológica especializada está associada à economia de água, fundamental para a sobrevivência em ambientes secos (ENGSONTIA *et al.*, 2008; BROWN *et al.*, 2009; ABDEL, 2007).

Além disso, a presença de um grande número de receptores olfativos em *T. castaneum* também é um dilema sobre sua história evolutiva, parecendo provável que, antes do desenvolvimento da agricultura, seu habitat original fosse mais variado e fragmentado do que seu nicho atual, restrito a depósitos de grãos. Possíveis fontes de alimento originais, e talvez atuais, podem incluir inflorescências de plantas e reservas de alimentos de roedores (ENGSONTIA *et al.*, 2008; BROWN *et al.*, 2009; ABDEL, 2007). Brown *et al.* (2009) propõe que, essa tolerância a ambientes quentes e secos, a notável expansão de genes receptores de odor e paladar e, sistema visual reduzido sugerem um estilo de

vida subterrâneo em regiões subtropicais áridas, possivelmente infestando armazéns de alimentos para animais.

O inseto *T. castaneum* é classificado como holometábolo, pois passa por metamorfose completa ao longo do seu ciclo de vida. Estes insetos produzem morfologias larvais e adultas distintas que são capazes de se adaptar livremente a diferentes habitats ecológicos. Acredita-se que a evolução de dois estágios morfologicamente distintos seja uma inovação fundamental que auxiliou muito na diversificação dos insetos (LEE *et al.*, 2013).

A primeira etapa do ciclo de vida de *T. castaneum* é a deposição dos ovos que medem 0,3 a 0,6 mm, são claros e cobertos por uma substância viscosa, seu tempo de eclosão é de 5-7 dias. As larvas são cilíndricas, amareladas e medem 7 mm, sendo um inseto holometábolo típico, o *T. castaneum* se desenvolve por meio de vários estágios larvais, geralmente 7, mas podendo ser 5 ou 6 quando em jejum. O estágio de pupa leva cerca de 7 dias, até a eclosão dos insetos adultos (KLINGLER; BUCHER, 2022). A Figura 2 descreve o ciclo de vida de *T. castaneum*.

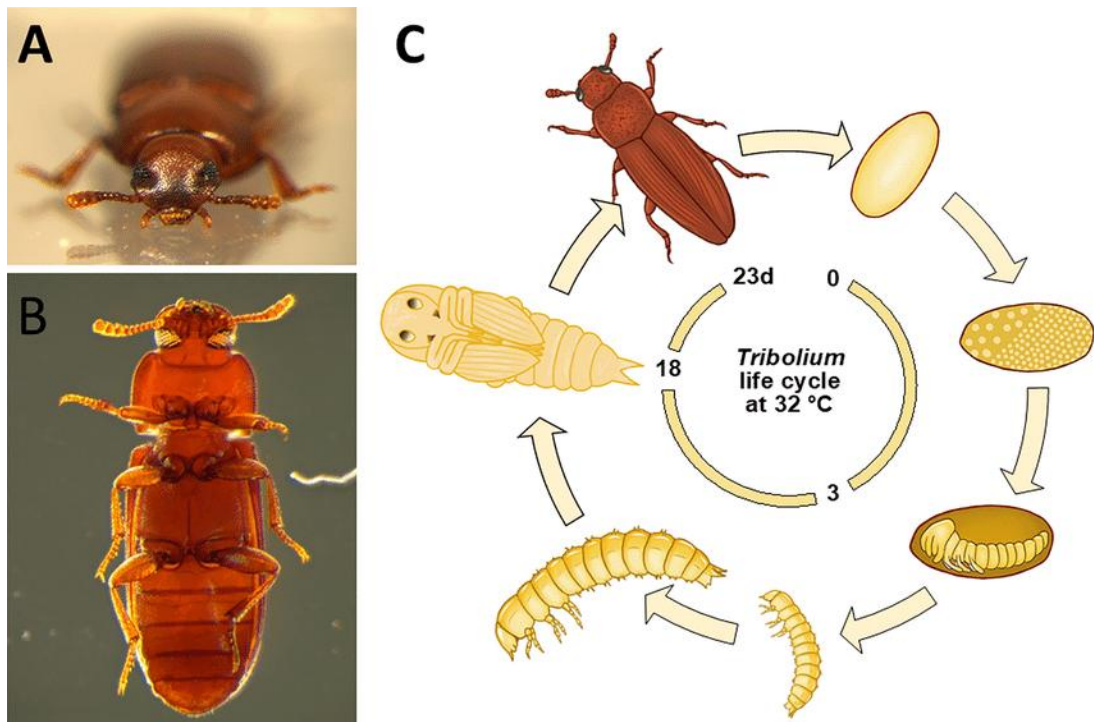


Figura 2: O ciclo de vida de *Tribolium castaneum*. A: Visão frontal de *Tribolium castaneum* selvagem. B: Visão ventral de um macho sob iluminação de campo escuro. C: Ciclo de vida de *Tribolium castaneum*: os ovos são colocados no substrato (farinha) e o desenvolvimento embrionário leva 3 dias a 32 °C. Apenas dois de um número variável de estágios larvais (aproximadamente 7) são retratados. A pupa permite a inspeção visual de estruturas externas, facilitando estudos fenotípicos de metamorfose. Os besouros fêmeas precisam de alguns dias após a eclosão até começarem a pôr ovos, o que continuam por 3–4 meses (desenhos não estão em escala) (KLINGLER; BUCHER, 2022).

Os adultos medem de 3 a 4 mm, e apresentam sutis diferenças morfológicas entre machos e fêmeas. É possível identificar machos e fêmeas por meio de características específicas no estágio de pupa e em adultos (SHUKLA; PALLI, 2012). Na Figura 3 é possível observar essas diferenças.

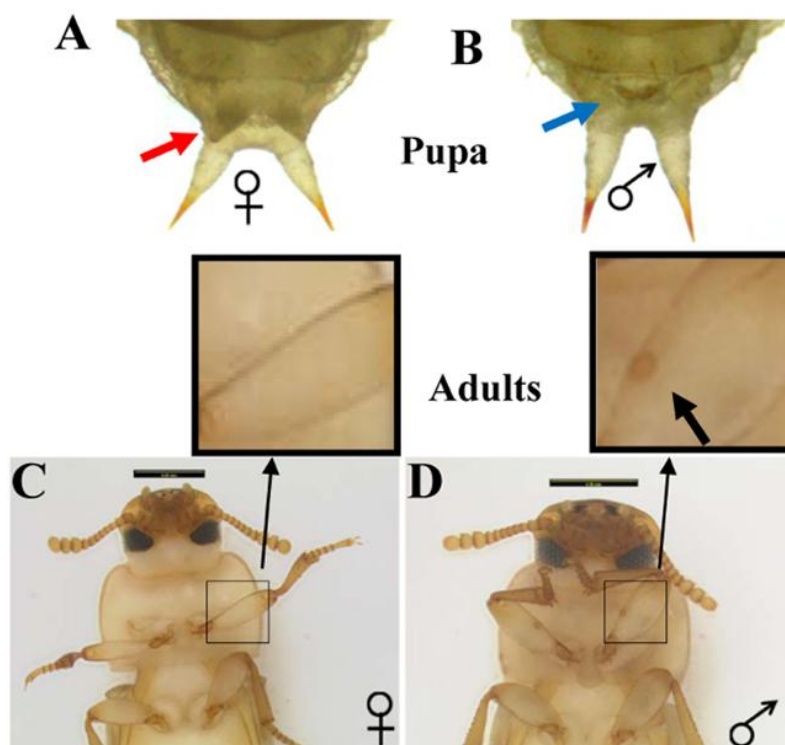


Figura 3: Dimorfismo sexual durante os estágios de pupa e adulto de *Tribolium castaneum*. A e B: Pupas femininas (seta vermelha) e masculinas (seta azul) mostram papilas características. C e D: Fêmeas (C) não mostram as manchas sexuais específicas que são vistas no lado ventral do primeiro par de pernas em machos (D) (SHUKLA; PALLI, 2012).

As pupas apresentam estruturas denominadas papilas na sua região posterior, que se diferenciam em machos e fêmeas. Já quando adultos os machos exibem uma mancha específica localizada em seu primeiro par de pernas (SHUKLA; PALLI, 2012). As fêmeas produzem cerca de 10 a 20 ovos por dia e a partir de uma única cópula são capazes de ovipor por 150 dias

seguidos. Os ovos são depositados em fendas de paredes ou na sacaria sobre os grãos (LORINI *et al.*, 2015).

Os insetos adultos também se caracterizam pelo desenvolvimento de suas asas. Como todos os besouros, *T. castaneum* possui élitros que se coordenam precisamente com o dobramento das asas, permitindo o voo e, ao mesmo tempo, fornecendo proteção. Os élitros são estruturas derivadas do exoesqueleto, são asas anteriores altamente modificadas, esclerotizadas e curvadas, que constituem um tecido simultaneamente rígido e leve, desempenhando papel fundamental na proteção do corpo e das asas posteriores. O exoesqueleto ou podendo ser chamado de cutícula, também recobre o animal, é formado principalmente por proteínas estruturais da cutícula e o polissacarídeo linear quitina, formando um resistente material que protege o organismo contra estresses ambientais e danos mecânicos (NOH *et al.*, 2016; ZOHRY; EL-SAYED, 2019).

Como síntese, a morfologia e ciclo de vida de *T. castaneum* representa um conjunto de adaptações estruturais relacionadas ao seu modo de vida em ambientes secos e confinados, como depósitos de grãos. Características como o exoesqueleto bem esclerosado, o pequeno tamanho corporal, a organização típica dos coleópteros e as especializações sensoriais e fisiológicas contribuem para sua resistência à dessecação, eficiência locomotora e capacidade de explorar recursos alimentares específicos, em conjunto, esses atributos morfológicos sustentam o sucesso ecológico da espécie (ZOHRY; EL-SAYED, 2019).

1.2.1 Modelo para estudos genéticos

Além de sua importância na agricultura, o *T. castaneum* também vem se destacando como um modelo para estudos genéticos (PERKIN; OPPERT, 2019). Suas vantagens incluem criação e manuseio fáceis, tempo de geração relativamente curto, vida adulta longa, alta fecundidade, eficácia de manipulação genética e por possuir baixo custo de manutenção (LEE *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, um número crescente de espécies de insetos tem sido sugerido como organismos modelo devido à sua distribuição mundial e importância ambiental, a exemplo a *Drosophila melanogaster*, que há mais de

100 anos tem sido uma ferramenta essencial, para avanços de diferentes estudos genéticos, comportamentais e de biologia molecular (BELLEN *et al.*, 2010).

Os besouros representam a maior ordem de insetos, com seu representante o *T. castaneum*, sendo a primeira espécie com um genoma completamente sequenciado, e assim se tornou um modelo animal cada vez mais usado para uma variedade de estudos biomédicos, incluindo de doenças neurodegenerativas (como doença de Parkinson), a via de sinalização diurética (peptídeo semelhante à vasopressina e sua função de receptor), interações hospedeiro-patógeno (interações antagonistas e coevolução) e farmacologia e toxicologia (efeitos das drogas psicoativas) (ADAMSKI *et al.*, 2019).

T. castaneum emergiu como organismo modelo para estudos comparativos de biologia evolutiva do desenvolvimento, fornecendo informações para compreensão da metamorfose e da diversidade de insetos adultos, além de ser referência para pesquisas sobre fisiologia básica e estratégias de controle de pragas (BROWN *et al.*, 2009). Essa consolidação de *T. castaneum* como um inseto modelo acontece pela identificação dessa espécie como mais representativa para o grupo do que a mosca *D. melanogaster*, por ser um animal com elevado grau de especialização, como em relação ao seu padrão de desenvolvimento embrionário inicial e à morfologia larval. (BROWN *et al.*, 2009; HERNDON *et al.*, 2020).

Embora, *T. castaneum* também apresenta características individuais especializadas, a espécie possui muitas características ancestrais de desenvolvimento conservadas, como, seu modo de segmentação, a presença de apêndices larvais externos e uma morfologia de cabeça larval não involuta (BROWN *et al.*, 2009).

Pertencendo à ordem Coleoptera, táxon mais rico em espécies, *T. castaneum*, se apresenta como relevante para estudos de comparações evolutivas da função gênica entre insetos. Uma de suas principais vantagens como organismo modelo é a alta competência para RNAi sistêmico. Sua resposta de RNAi é muito eficaz, onde um grande número de genes pode ser analisado para fenótipos específicos de *knockdown*, pela introdução do RNA de dupla fita (dsRNA) correspondente, e diferente de *D. melanogaster* essa estratégia não está restrita ao desenvolvimento inicial. Além disso, o RNAi é

ambiental, ou seja, as células absorvem dsRNA da hemolinfa de forma muito eficiente e o efeito do RNAi é transmitido das mães injetadas para seus descendentes (BROWN *et al.*, 2009; TOMOYASU *et al.*, 2008; HORN *et al.*, 2022).

É importante destacar, que além da técnica de RNAi, *T. castaneum* também estabeleceu-se como modelo na utilização do sistema CRISPR/Cas9. Esta ferramenta de edição genética permite a introdução de quebras específicas no DNA, possibilitando a inativação de genes ou a inserção de sequências de maneira precisa, através de mecanismos celulares de reparo (RYLEE *et al.*, 2022). Gilles e seus colaboradores (2015), demonstraram a aplicação eficiente dessa técnica em *T. castaneum*, alcançando altas taxas de mutações herdadas por *non-homologous end joining* e inserções direcionadas por reparo homólogo. Esse estudo validou o uso do CRISPR/Cas9 tanto para *knockout* funcional quanto para substituição de transgenes, consolidando *T. castaneum* como um modelo genético poderoso e ampliando significativamente o potencial da ferramenta para estudos de genética do desenvolvimento, evolução e aplicações futuras no controle de insetos-praga.

Esse seu conjunto de características, genoma sequenciado, suscetibilidade ao RNAi, disponibilidade de ferramentas de edição gênica como o CRISPR/Cas9 e, os sofisticados métodos genéticos e transgênicos que podem ser usados em *T. castaneum*, fazem deste besouro uma excelente escolha para estudos comparativos (BROWN *et al.*, 2009; HERNDON *et al.*, 2020; RYLEE *et al.*, 2022).

1.3 Canais de cálcio

Os íons de cálcio (Ca^{2+}) são mensageiros secundários universais e extremamente adaptáveis que controlam uma variedade de funções e processos celulares, incluindo transcrição genética, proliferação, migração celular, divisão celular, crescimento, contração muscular, transmissão neuronal, secreção, entre outros (TIFFNER; DERLER, 2020). Sendo assim, um elemento fundamental para a manutenção da vida, com uma regulação complexa, as células possuem diferentes tipos de canais e proteínas que ligam e sinalizam o cálcio para que

sua presença seja precisa nos locais subcelulares requeridos (SOBOLOFF, 2012).

As células possuem duas principais fontes de Ca^{2+} : os compartimentos intracelulares, como o retículo endoplasmático (RE) e as mitocôndrias, que armazenam e liberam Ca^{2+} para o citosol, e o meio extracelular, de onde os íons podem entrar na célula em resposta a sinais específicos. As alterações nos níveis celulares de Ca^{2+} são controladas por um conjunto de proteínas de sinalização, incluindo transportadores, canais iônicos, proteínas de ligação, proteínas de armazenamento e efetores dependentes de Ca^{2+} . Essas proteínas agem de forma dinâmica para controlar a concentração adequada de cálcio dentro da célula (TIFFNER; DERLER, 2020).

Canais iônicos formam poros hidrofílicos na membrana celular e permitem a permeação seletiva de íons de tamanho e carga apropriados através da membrana, seguindo seu gradiente eletroquímico. Esse processo é realizado por meio de diversos mecanismos intrínsecos de ativação dos canais iônicos em resposta a um estímulo específico, como uma mudança no potencial de membrana ou a ligação de um neurotransmissor. Portanto, a estimulação elétrica ou química dos canais iônicos leva à sua abertura transitória (TIFFNER; DERLER, 2020; LEE *et al.*, 2014).

Os canais de cálcio conduzem íons através do gradiente eletroquímico sem o uso de energia. Geralmente, o Ca^{2+} percorre de áreas com maiores concentrações, como o espaço extracelular ou os estoques intracelulares, para aquelas com menor concentração, como o citoplasma. Os canais de cálcio estão localizados na membrana plasmática (MP) ou na membrana de organelas intracelulares, como o RE, mitocôndrias e lisossomos (TIFFNER; DERLER, 2020). Os canais de íons Ca^{2+} mais proeminentes representam canais dependentes de voltagem (VGCC - voltage-gated channels), canais dependentes de ligante (LGC - ligand-gated channels), canais operados por estoque (SOC - store-operated channels), canais de potencial receptor transitório (TRP - transient receptor potential channels) e canais mecanossensíveis (CATTERAL *et al.*, 2005).

1.3.1 Canal CRAC

A via de cálcio SOCE (Store operated calcium entry) é mediada pelo canal CRAC, o canal de cálcio ativado pela liberação de cálcio (CRAC - calcium release-activated calcium channel). Este canal é formado pelas proteínas STIM (stromal interaction molecules), que consiste em um sensor de cálcio localizado na membrana do retículo endoplasmático e Orai, que forma o poro do canal, presente na MP e, é ativado em resposta à depleção de cálcio do RE. (PARK, 2009; TIFFNER; DERLER, 2020; BARANIAK *et al.*, 2020).

O canal CRAC gera sinais intracelulares mediante a alteração na concentração de Ca^{2+} intracelular, cujo papel é bem conhecido em células do sistema imunológico. Embora, o processo de entrada de Ca^{2+} mediado pela depleção de estoques seja conhecido há décadas, as proteínas componentes do canal, STIM e Orai, foram identificadas apenas mais recentemente (HOU *et al.*, 2012).

Em células não excitáveis, os canais operados por depleção de estoques SOC, estabelecem a entrada de cálcio através de mecanismos dependentes do esvaziamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Esses canais se configuram como uma via primária para a entrada de Ca^{2+} (SOCE) na célula. O canal CRAC representa o mais relevante canal SOC (PARK,2009).

Em células do sistema imune, como linfócitos e mastócitos, as etapas de ativação dos canais CRAC, ocorrem como uma cascata molecular de interações. Em condições de repouso, os dímeros da proteína STIM, encontram-se distribuídos de maneira homogênea na membrana do RE, apresentando alta mobilidade. O momento inicial para a ativação de STIM ocorre mediante ligação de um ligante a um receptor de antígeno de células imunes. Este evento coordena uma série de eventos de sinalização envolvendo proteínas G heterotriméricas ($G\alpha$, $G\beta\gamma$) ou uma cascata de tirosina quinase para ativar a fosfolipase C- β (PLC β). Esta última cliva o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) na MP, o que medeia a produção de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O IP3 atua como um segundo mensageiro e se liga aos receptores de IP3 (IP3R) localizados na membrana do RE (Figura 4) (PARK,2009; TIFFNER; DERLER, 2020; BARANIAK *et al.*, 2020).

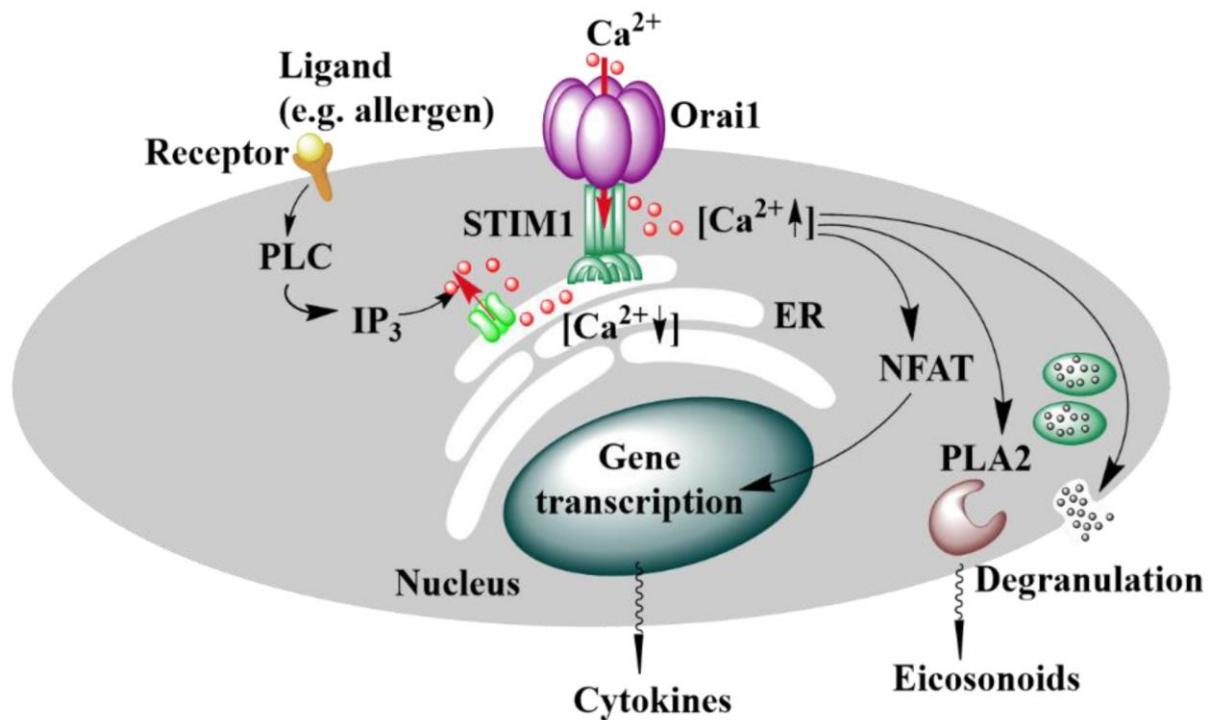


Figura 4: A via de ativação do canal CRAC e os processos de sinalização subsequentes. O esquema representa as vias de ativação no mastócito após a ligação de um ligante a um receptor no lado extracelular. A ativação da fosfolipase C e a geração de IP₃ levam à depleção dos estoques intracelulares, à ativação do STIM e ao subsequente acoplamento STIM/Orai. O influxo de Ca²⁺ que ocorre após a abertura do Orai medeia cascatas de sinalização subsequentes que podem levar à transcrição gênica ou à liberação de mediadores inflamatórios, como histaminas, eicosanóides e citocinas (TIFFNER; DERLER, 2020).

Posteriormente, o Ca²⁺ é liberado dos estoques e a STIM detecta essa depleção de Ca²⁺. Após a diminuição de íons de cálcio, STIM modifica sua conformação de um estado de repouso para o estado ativo, para isso, ela sofre uma mudança conformacional, oligomeriza e se move para locais de junções RE-MP (TIFFNER; DERLER, 2020). Esses locais de junções representam microdomínios bem definidos e dinâmicos, onde o RE está em estreita proximidade com a MP, proporcionando um suporte estrutural para a formação estável do complexo STIM/Orai e formação do canal CRAC. A associação de STIM e Orai é ainda facilitada pela ligação do terminal C de STIM ao PIP₂ localizado na MP, essa ligação é realizada pelo domínio caudal polibásico (PBD – Polybasic Domain) rico em resíduos de lisina e arginina (PARK *et al.*, 2009).

Com o acoplamento de STIM e Orai, o influxo de Ca²⁺ através do poro de Orai ativado, ocorre na faixa micromolar. Esse influxo de Ca²⁺ é crítico para os

eventos de sinalização subsequentes que afetam os fatores de transcrição, proteínas de fusão vesicular, outros canais iônicos e enzimas específicas. Em células imunes, a SOCE desencadeia a produção de citocinas via fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e a liberação de mediadores inflamatórios (histamina e eicosanoides) (PARK,2009).

Em resumo, a ativação do canal CRAC é iniciada após a depleção de Ca^{2+} das reservas intracelulares, o que pode ocorrer via IP3R. A redução na concentração de Ca^{2+} é detectada por STIM, através da dissociação de Ca^{2+} do seu domínio estrutural EF-hand. Em seguida, STIM sofre uma mudança conformacional, oligomeriza e então, se realoca para locais de junções da MP com o RE, formando uma estrutura chamada puncta. Orai também se realoca para essas regiões de sítios de ligação e, o canal é aberto, reabastecendo as células com Ca^{2+} (PARK,2009).

1.3.2 A proteína STIM

A proteína STIM é composta por diferentes domínios, responsáveis pela detecção de Ca^{2+} e estabelecimento de seu estado de repouso ou ativo (em que se liga à Orai). STIM possui um peptídeo sinal no início do N-terminal que garante sua translocação para o RE. A região EF-hand, se liga ao cálcio, detectando a variação nas concentrações de Ca^{2+} intracelular, essa ligação é promovida pela presença de aspartatos e glutamatos carregados negativamente nesta região. A região EF-hand é conectada ao domínio SAM que forma uma estrutura de feixe de cinco hélices α , em condições de repouso. As interações hidrofóbicas entre a região EF-hand e o domínio SAM estabelecem o complexo EF-SAM. Na Figura 5 é possível observar com detalhes os domínios de STIM e sua mudança de conformação após depleção de cálcio (TIFFNER; DERLER, 2020).

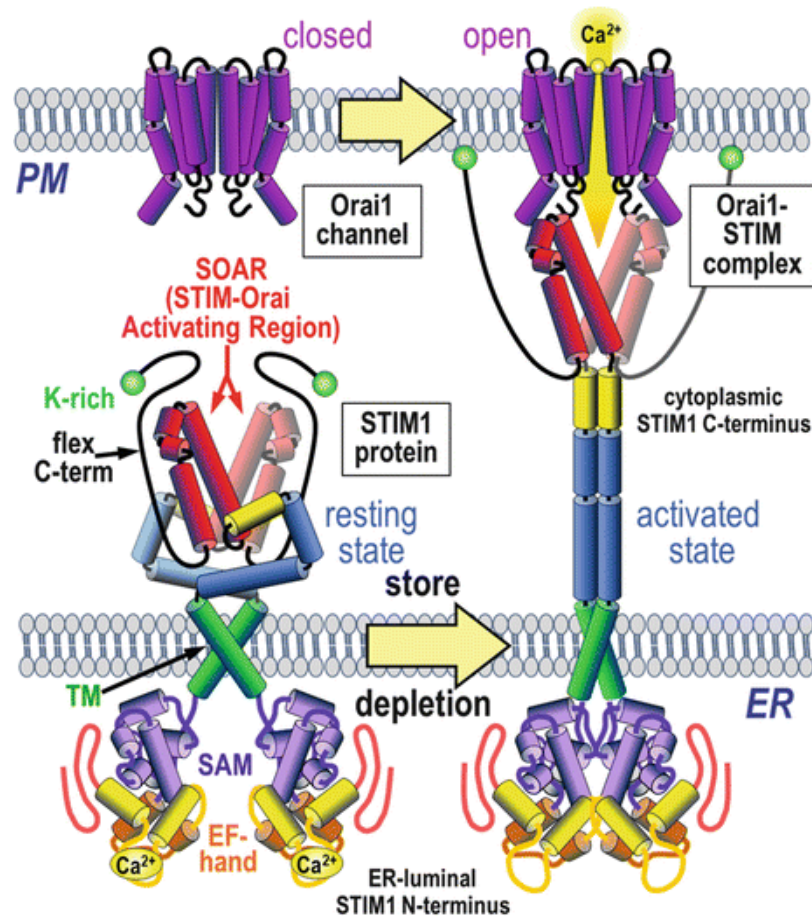


Figura 5: Modelo de ativação de STIM e acoplamento à Orai. A redução na concentração de Ca^{2+} é detectada via STIM, que sofre uma mudança conformacional, oligomeriza, forma junções em direção à membrana plasmática e ativa o canal iônico altamente seletivo para Ca^{2+} , Orai (NWOKONKO, 2016).

Após a região N-terminal, que está voltada para o lúmen do RE, STIM apresenta um único domínio transmembrana (TM), que possui resíduos de glicina que promovem flexibilidade que permite as mudanças conformacionais de STIM (NWOKONKO, 2016).

Na região C-terminal de STIM (voltada para a região do citosol), estão presentes os domínios responsáveis pela ativação e acoplamento à Orai. Os domínios responsáveis por essa interação são os CAD ou SOAR (STIM-Orai Activation Região) que apresentam os sítios de interação direta com as regiões N e C-terminais de Orai, e induzem sua ativação (Figura 5) (PALTY; ISACOFF, 2015; ZHENG *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2017).

1.3.3 A proteína Orai

A proteína de membrana, Orai forma poros iônicos altamente seletivos a Ca^{2+} . A estrutura cristalina de Orai de *Drosophila melanogaster*, revela que o canal de cálcio é composto por um conjunto hexamérico de seis subunidades Orai dispostas ao redor de um poro iônico central. O poro atravessa a membrana e se estende para o citosol. Um anel de resíduos de glutamato em seu lado extracelular forma o filtro de seletividade (HOU *et al.*, 2012; NWOKONKO, 2016).

Cada subunidade do complexo contém quatro hélices α transmembranares (M1 a M4) e uma hélice após M4 que se estende para o citosol (denominada hélice de extensão M4) (Figura 6). Os domínios transmembranares são conectados por meio de dois loops extracelulares e um loop intracelular, ambos, N e C-terminais estão localizados no citosol (TIFFNER; DERLER, 2020; BARANIAK *et al.*, 2020; HOU *et al.*, 2012).

O poro iônico está localizado no centro do canal ao longo do eixo de simetria sêxtupla, e as hélices transmembranares estão dispostas em três anéis concêntricos.

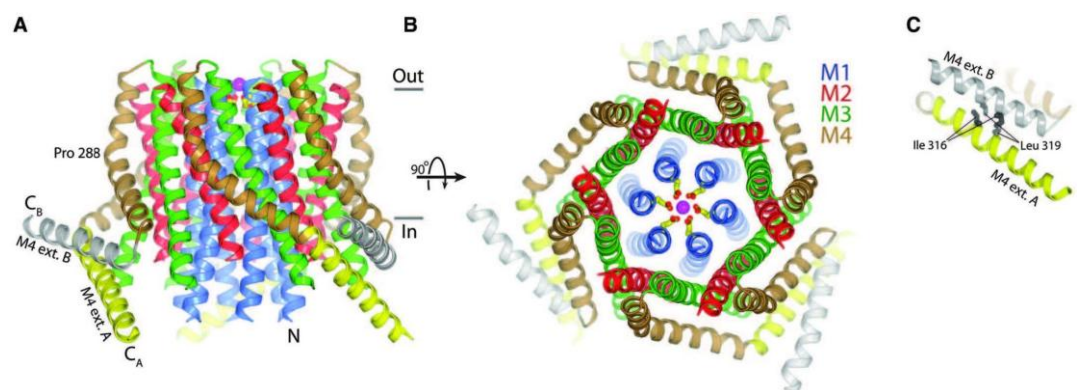


Figura 6: Arquitetura de Orai: A - Representação em fita mostrando a estrutura terciária do canal vista de lado. As hélices estão coloridas: M1 (azul), M2 (vermelho), M3 (verde), M4 (marrom), extensão M4 (amarelo na subunidade A e cinza na subunidade). Também são mostrados um íon Ca^{2+} (esfera magenta) e os resíduos Glu178 próximos (bastões amarelos). B - Vista ortogonal do canal a partir do lado extracelular. C - Vista ampliada mostrando a interação entre as hélices da extensão M4 (HOU *et al.*, 2012).

Os dados estruturais de Orai disponíveis indicam que o canal apresenta uma arquitetura altamente organizada, na qual interações específicas entre resíduos transmembranares mantêm o canal em estado de repouso e controlam de forma precisa sua ativação (TIFFNER; DERLER, 2020; HOU *et al.*, 2012).

1. JUSTIFICATIVA

O cálcio é um elemento de grande importância, compreender os mecanismos de sua entrada nas células é um desafio, pois existem diferentes tipos de canais e proteínas que se ligam ao cálcio para promover sua entrada e para que sua presença seja devidamente direcionada aos locais requeridos (CLAPHAM, 2007; PARK *et al.*, 2020).

A entrada de cálcio por meio de canais iônicos para o meio intracelular, promove processos de sinalização que controlam várias funções celulares como proliferação, crescimento e migração, expressão gênica, transmissão neuronal, secreção, entre outros (CLAPHAM, 2007; PARK, 2009). Desta maneira, canais de cálcio podem representar alvos atrativos para controle de organismos que geram prejuízos à sociedade como as pragas agrícolas.

Em células não excitáveis, os canais operados por estoque (SOC) representam uma rota primária de entrada de cálcio nas células também conhecida como SOCE. Dentre os canais SOC o canal CRAC é o mais proeminente (TIFFNER; DERLER, 2020).

O canal CRAC desempenha um papel vital no controle de funções celulares em praticamente todos os tipos de células, os sinais de entrada são mediados pelas ações combinadas das proteínas STIM na membrana do RE e dos canais Orai na MP. As duas proteínas sofrem um processo de acoplamento dinâmico em regiões que formam junções entre o retículo endoplasmático e a MP. Esse processo de acoplamento é iniciado em resposta à depleção de Ca^{2+} armazenado no RE, o que desencadeia a ativação e formação do canal CRAC (ZHOU *et al.*, 2017).

A entrada de cálcio operada por depleção de estoques (SOCE) constitui uma via de sinalização evolutivamente conservada entre os eucariotos (COLLINS *et al.*, 2022; CAI, 2007). No entanto, o conhecimento acerca do funcionamento desse canal em insetos ainda é limitado, estando majoritariamente restrito aos estudos realizados em *D. melanogaster* (BELLEN *et al.*, 2010). Assim, o estudo do canal CRAC em *T. castaneum* não apenas contribui para a ampliação do conhecimento sobre a fisiologia celular e a sinalização por cálcio em insetos, como também destaca esse sistema como um mecanismo promissor para o controle de pragas agrícolas.

Em síntese, este projeto visa realizar um estudo sobre as proteínas formadoras do canal CRAC do inseto *T. castaneum* e seu mecanismo de funcionamento, ainda não descritos para esse inseto, através da utilização de técnicas como RNAi, clonagem, expressão, purificação e caracterização biofísica de proteínas recombinantes. Este canal se revela promissor para estudos em espécies que causam prejuízos à população e danos econômicos, podendo revelar potenciais alvos para controles de insetos como o *T. castaneum*. Além de se caracterizar proteínas ainda pouco estudadas.

2. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar o primeiro estudo funcional e a caracterização do canal de cálcio CRAC do *Tribolium castaneum*, visando identificar sua importância para a viabilidade e desenvolvimento deste inseto.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Clonar as proteínas STIM e Orai para expressá-las em células de mamíferos, com a finalidade de avaliar sua localização subcelular, a ativação do canal e avaliar o papel de STIM como sensor de cálcio e pH intracelular, através de microscopia confocal.

3.2.2 Clonar o domínio luminal de STIM (STIM-EF-SAM) para expressão em bactérias e purificação da proteína.

3.2.3 Avaliar mudanças na conformação e estabilidade da proteína STIM-EF-SAM após ligação com cálcio, através de diferentes técnicas biofísicas, como Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC - Isothermal Titration Calorimetry) e Dicroísmo Circular.

3.2.4 Realizar experimentos de RNA de interferência (RNAi) para suprimir a expressão de STIM e Orai, com o objetivo de identificar possíveis mudanças fenotípicas.

3. METODOLOGIA

4.1 Manutenção de criação do inseto *Tribolium castaneum* em laboratório

Foi utilizado nessa pesquisa *T. castaneum*, da cepa Geórgia (GA-1), obtido de colônia mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em colaboração com o Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende. As colônias foram mantidas em estufa seca, segundo o protocolo de Ribeiro *et al.*, 2017, a temperatura de 30°C e 70% de umidade relativa. As fases imaturas e os adultos foram mantidos separados em potes de plásticos medindo 20 x 14,5 cm, com farinha de trigo obtida em mercados locais (marca Dona Benta ou Rosa Branca), que serviram como fonte de alimento e abrigo, eventualmente foi adicionado extrato de levedura (5%) à farinha, com o objetivo de aumentar seu valor nutricional. Para sua utilização, a farinha passou pelo protocolo de armazenamento à - 70 °C por 12 horas, seguido por um período de 12 horas em estufa a 60 °C. Após esse período, a farinha foi peneirada com peneiras de solo de malha metálica com diâmetro de 300 ou 250 µm. Foram utilizados cerca de 300 gramas de farinha de trigo para até 6 g de besouros adultos ou 10 g de besouros imaturos. A cada quatro semanas, a farinha de trigo era trocada e os adultos separados dos estágios imaturos (ovos, larvas e pupas) com uso das peneiras com malha de 710 µm e 300 µm. Todas as peneiras utilizadas eram da marca Bertel ISSO 3310/1. Não foi necessária aprovação ética para trabalhar com *T. castaneum*, pois eles são pragas domésticas comuns.

4.2 Extração de RNA de *T. castaneum*

Foi realizada a extração de RNA de diferentes estágios do ciclo de vida dos insetos. Para o isolamento de RNA totais de ovos, larvas e insetos adultos, foram recolhidos da colônia 50 a 100 mg de cada material. Larvas e insetos adultos foram submetidos a congelamento rápido em nitrogênio líquido, para interrupção das atividades metabólicas e preservação do RNA. Os ovos recolhidos foram lavados por três vezes com água sanitária (2%) e posteriormente água corrente, para retirar os grãos de farinha a qual ficam aderidos. Após a primeira etapa de preparação, as amostras foram trituradas

utilizando um pistilo. Para isolamento do RNA foi utilizado TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) seguindo o protocolo do fabricante. A confirmação da integridade do RNA foi por meio de eletroforese em gel de agarose (1%).

4.3 Análise comparativa e predição das sequências de STIM e Orai de *T. castaneum*

Inicialmente, foram realizadas buscas pelas sequências das proteínas STIM e Orai de *T. castaneum*, *H. sapiens*, *D. melanogaster* e *H. armigera* no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (BENSON *et al.*, 2009). A inclusão de *H. sapiens* deve-se ao fato de suas proteínas serem amplamente caracterizadas na literatura, servindo como referência para análises funcionais; *D. melanogaster* foi selecionada por ser um inseto modelo clássico em estudos moleculares; e *H. armigera* por se tratar de uma praga agrícola de relevância econômica, para a qual existem estudos documentados envolvendo o canal CRAC. Após a identificação das sequências, procedeu-se ao alinhamento múltiplo com o objetivo de avaliar a presença de regiões conservadas entre as espécies. Para isso, foi utilizado o programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (EDGAR, 2004), e os alinhamentos obtidos foram analisados e editados com o auxílio do software Jalview (WATERHOUSE *et al.*, 2009). A predição de domínios proteicos foi realizada por meio da plataforma InterPro (BLUM *et al.*, 2021). Adicionalmente, a identificação de regiões transmembranares foi conduzida utilizando dois métodos independentes, TMHMM 2.0 (KROGH *et al.*, 2001) e DeepTMHMM (HALLGREN *et al.*, 2022), com o objetivo de aumentar a confiabilidade das predições obtidas. A predição da estrutura tridimensional das proteínas STIM e Orai de *T. castaneum* foi realizada por meio do algoritmo AlphaFold (JUMPER *et al.*, 2021).

4.4 Clonagem de STIM e Orai de *T. castaneum*

Inicialmente os genes TcSTIM, TcSTIM-EF-SAM e TcOrai foram amplificados através de PCR, utilizando cDNA de ovos, larvas e insetos adultos e, primers específicos para cada sequência (Tabela 1). Para a síntese do cDNA

foi utilizado o kit cDNA Synthesis Kit with RNase Inhibitor (Cellco), seguindo as recomendações do fabricante. A amplificação dos fragmentos foi realizada utilizando o kit CloneAmp™ HiFi PCR Premix (Takara Bio), seguindo o protocolo do fabricante. A amplificação dos fragmentos foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose (1%), posteriormente o isolamento e a purificação dos fragmentos de DNA foram realizados utilizando o kit Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

Após a purificação dos fragmentos amplificados, estes foram clonados em vetores para expressão em células de mamíferos e bactérias. Para expressão em células de mamíferos foi utilizado o vetor pCMV6-XL5 (gentilmente cedido pelo grupo do Prof. Patrick Hogan, do La Jolla Institute for Immunology) fusionado à proteína EGFP no N-terminal e o vetor MO91 (também cedido pelo grupo do Prof. Hogan), fusionado à proteína mCherry no N terminal, para inserção dos genes TcSTIM e TcORAI, respectivamente. Para a clonagem do gene TcSTIM, foi realizado o método de clonagem Gibson assembly, utilizando o kit Gibson Assembly Master Mix (NEBuilder), seguindo o protocolo do fabricante. O gene TcORAI foi clonado utilizando as enzimas de restrição BamHI e XhoI. De forma semelhante, o gene TcSTIM-EF-SAM foi clonado no vetor pET28a+ (Novagen) empregando as enzimas XhoI e NdeI.

Os fragmentos de DNA e o vetor foram digeridos pelas enzimas de restrição a 37 °C por 16 horas. Em seguida, inserto e vetor foram unidos por meio de uma reação de ligação a 4 °C por 16 horas, catalisada pela enzima T4 DNA ligase, resultando na formação de um plasmídeo recombinante, contendo o gene de interesse.

Linhagens competentes de bactéria *Escherichia coli* (DH5α) foram utilizadas para propagação dos plasmídeos. Para isso, as bactérias foram transformadas a fim de incorporarem o plasmídeo recombinante. A transformação foi realizada por meio de choque térmico. Após a incubação com os plasmídeos por 30 minutos, as bactérias foram submetidas a um choque térmico em banho-maria a 42 °C durante 50 segundos, seguido imediatamente por resfriamento em gelo por 2 minutos e acrescentado 200 µL de meio de cultura LB (Luria-Bertani). Na sequência, as bactérias foram incubadas sob agitação a 37 °C por 1h e plaqueadas em meio LB ágar contendo o antibiótico

de seleção (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 h. As colônias selecionadas foram inoculadas em meio líquido LB contendo o antibiótico para cultivo e, após crescimento por cerca de 16 h a 37 °C, o DNA plasmidial dessas células foi extraído utilizando-se o kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systems (Promega) de acordo com as orientações do fabricante.

Após a obtenção dos plasmídeos, a confirmação da presença do inserto da proteína TcSTIM-EF-SAM em pET28a+ foi realizada através de uma reação de PCR utilizando os primers da sequência. A confirmação da presença do inserto de STIM e Orail foi realizada por análise de restrição, utilizando-se as enzimas BamHI e XhoI para TcOrail em M091 e HindIII e XhoI para a digestão de TcSTIM em pCMV6-XL5. A reação de digestão foi preparada e incubada em estufa a 37 °C por 3h. Após as reações, a presença do inserto foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1%). Posteriormente os clones positivos foram enviados para Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ para realização de sequenciamento.

4.5 Expressão e purificação de TcSTIM-EF-SAM em *Escherichia coli*

Para a expressão da proteína TcSTIM-EF-SAM foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3). As células foram transformadas por meio de choque térmico, e posteriormente plaqueadas em meio LB ágar. As colônias selecionadas para a expressão foram inoculadas em 5 mL de meio líquido LB com o antibiótico de seleção canamicina (50 µg/mL). Após 16 horas a 37 °C, sob agitação a 150 rpm, o pré-inóculo resultante foi diluído em 1 L de meio de cultura LB e incubado sob agitação de 150 rpm à 37 °C até que atingisse a densidade óptica (0,6 - 0,8 a 600 nm), verificada através de espectrofotômetro. Atingida a densidade óptica, a expressão da proteína foi induzida pela adição de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (0,3 mM), e as células incubadas overnight a 18 °C sob agitação. A expressão da proteína de interesse foi confirmada através de eletroforese em condições desnaturantes com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%), conforme descrito por Schägger e von Jagow (1987). Após a eletroforese, o gel foi corado com solução contendo 0,8 g de Azul Brillante de Coomassie R, 320 mL de metanol e 80 mL de ácido acético, sendo posteriormente descorado

com solução contendo 7% de ácido acético, procedimento este adotado para todos os géis apresentados neste trabalho.

Após o período de expressão, as culturas bacterianas foram centrifugadas por 30 minutos a 4500 rpm e 4 °C, para sedimentar as células e posteriormente ressuspendidas em 30-50 mL de tampão de lise. A solução tampão para a lise dessa purificação foi composta por Tris-HCl (25 mM) pH 8,0, NaCl (150 mM), PMSF (0,5 mM) e 5% de glicerol (tampão A), para as etapas seguintes da purificação o tampão foi composto de Tris-HCl (25 mM) pH 8,0, NaCl (150 mM) e 5% de glicerol (tampão B). Em seguida, a ruptura das células foi realizada através de sonificador pelo período de 10 minutos, com ciclos de 30 segundos ON e 40 segundos OFF e amplitude de 25%. A separação das proteínas solúveis do pellet de células foi realizada por centrifugação a 9000 rpm por 30 minutos a 4 °C, e o sobrenadante coletado.

Para a purificação da proteína recombinante foram realizados dois protocolos de cromatografia, inicialmente por afinidade, conforme descrito por Hochuli *et al.*, (1987), utilizando coluna de resina de Ni-NTA (Qiagen) e logo após por cromatografia de exclusão molecular (SEC), esta etapa visa separar as proteínas com base em seus tamanhos moleculares, permitindo a obtenção de frações mais puras e homogêneas da proteína de interesse (PORATH; FLODIN, 1959).

Para a cromatografia de afinidade o sobrenadante (30-50 mL) foi incubado com uma coluna contendo 2 mL de resina, previamente equilibrada com o tampão B, por 1h a 4°C, ressuspendendo a resina em intervalos de 20 minutos. A coluna contendo resina de Ni-NTA, se baseia em um método amplamente utilizado na purificação de proteínas, a técnica de IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Essa técnica se baseia na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. Esta afinidade resulta de ligações reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado e certos resíduos de aminoácidos, tais como o anel imidazol da histidina (BRESOLIN *et al.*, 2009).

A proteína recombinante expressa possui uma tag de afinidade de hexahistidina (His-tag), composta por seis resíduos de histidina na região N-terminal, codificada pelo vetor de expressão bacteriano pET28a+, dessa forma,

foi possível sua imobilização na coluna Ni-NTA, que apresenta íons de níquel (Ni^{2+}).

Após a passagem do sobrenadante pela coluna Ni-NTA, foram iniciadas as etapas de lavagens. A lavagem 1 foi efetuada com 50 mL do tampão B, a lavagem 2 foi realizada com 50 mL do tampão B com 10 mM de imidazol e, para a eluição da proteína foram utilizados 15 mL de tampão B contendo 0,5 M de imidazol. Durante a eluição, a concentração da proteína foi monitorada por espectrofotometria (NanoDrop) UV/Vis a 280 nm. Ao término da cromatografia de afinidade, foi adicionado EGTA (1 mM) à proteína eluída com o objetivo de quelar íons Ca^{2+} e evitar interações dependentes de cálcio que pudessem interferir nos experimentos realizados posteriormente com a proteína.

Posteriormente foi realizada a SEC, utilizando-se uma coluna Superdex 75 (HR 10/30 Cytiva) acoplada ao sistema AKTA go (Cytiva). Alíquotas de 1 mL foram aplicadas neste sistema e alíquotas também de 1 mL foram coletadas. O fluxo do tampão (tampão B) foi de 0,5 mL/min e a eluição das frações de interesse foi acompanhada por absorbância em 280 nm. Durante todo o protocolo de purificação o sobrenadante e a proteína eluída foram mantidos em banho de gelo. Alíquotas foram retiradas em cada etapa do processo para avaliação por eletroforese (SDS-PAGE 15%). Após a purificação, a proteína TcSTIM-EF-SAM teve sua estrutura secundária e estabilidade avaliadas por dicroísmo circular. A determinação da concentração protéica resultante da purificação foi realizada através de medidas de absorbância a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção calculado a partir da sequência de aminoácidos das proteínas, com auxílio do programa ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005).

4.6 Experimentos de Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815, foram medidos espectros de dicroísmo circular na região far-UV (200-260 nm). Foram realizados experimentos para a determinação da estrutura secundária da proteína TcSTIM-EF-SAM (10 μM em tampão B) na ausência (forma apo) e na presença de 5 mM de Cloreto de Cálcio (CaCl_2).

Foram realizados dois ensaios de desnaturação térmica. No primeiro, foi adquirida a leitura apenas a 222 nm, de 20 °C a 90 °C, a uma taxa de 1°C/min,

com o objetivo de monitorar possíveis alterações na estabilidade térmica da proteína nas formas amostras apo e com CaCl_2 . No segundo ensaio, a desnaturação térmica foi monitorada por meio da aquisição de espectros de dicroísmo circular (200-260 nm) em intervalos de temperatura. As medidas foram realizadas a cada 10 °C, na faixa de 20 °C a 90 °C, permitindo a visualização detalhada do espectro da proteína em cada temperatura. Esse procedimento possibilitou a análise comparativa das alterações estruturais ao longo do aquecimento, das amostras apo e com CaCl_2 .

As amostras foram colocadas em uma cubeta com caminho óptico de 1 mm, e os espectros obtidos com uma média de seis varreduras na faixa de comprimento de onda entre 200 nm e 260 nm, a uma velocidade de 100 nm/min. Foram realizadas três réplicas independentes do experimento.

Os espectros foram convertidos em elipticidade molar média por resíduo utilizando o software CDtoolX (MILES; WALLACE, 2018). Os dados obtidos foram posteriormente analisados e os gráficos gerados com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Software), permitindo a visualização e comparação das alterações na estrutura secundária da proteína.

4.7 Experimentos de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A afinidade de STIM EF-SAM pelo cálcio foi avaliada por calorimetria de titulação isotérmica (ITC - Isothermal Titration Calorimetry) usando um microcalorímetro nano-ITC (TA Instruments). Esse experimento revela os parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) do processo de ligação entre a proteína e o ligante. Para esse ensaio foi adicionado à célula de amostra 200 μL de TcSTIM-EF-SAM em tampão B a 60 μM . Foram realizados ensaios independentes utilizando os ligantes CaCl_2 e Cloreto de Magnésio (MgCl_2). Em cada experimento, a seringa foi preenchida com 50 μL de ligante a 5 mM, preparado no mesmo tampão da proteína. Foram realizadas vinte injeções consecutivas de 2 μL do respectivo ligante, à temperatura de 25 °C. Foram realizadas três réplicas independentes do experimento.

Um experimento controle, no qual o ligante foi titulado em tampão, também foi conduzido sob as mesmas condições, e o calor de diluição foi

subtraído no tratamento dos dados usando um software específico para análise de dados de ITC ([NanoAnalyze – TA Instruments](#)).

4.8 Experimento de SDS-PAGE após digestão suave com tripsina e eletroforese em gel de poliacrilamida nativa

Ensaio de deslocamento em gel, após digestão branda com tripsina, foram realizados para investigar possíveis alterações conformacionais da proteína TcSTIM-EF-SAM induzidas pela ligação ao cálcio. Para a reação de digestão, foi preparada uma solução estoque de tripsina 25 mg/mL, utilizada em uma diluição 1:400.

Foram realizados três ensaios independentes, a proteína na forma apo, incubada por 30 min com 5 mM de CaCl₂ e com 5 mM MgCl₂. A proteína TcSTIM-EF-SAM (50 µM), em tampão B, tanto na forma apo quanto incubada com CaCl₂ e MgCl₂, foi tratada com 0,06 mg/mL de tripsina a temperatura ambiente por 30 min, conforme Figueiredo *et al.* (2025). Os fragmentos resultantes foram avaliados por SDS-PAGE (15%).

Para o experimento de deslocamento em gel de poliacrilamida nativo, foram preparados géis sem SDS e β-mercaptoetanol no tampão de amostra ou no gel, conforme descrito por Arndt *et al.*, (2012). Para preservar a conformação nativa da proteína, o gel foi mantido no gelo durante a eletroforese. TcSTIM-EF-SAM a 60 µM, em tampão B, foi aplicado ao gel na forma apo e também após incubação por 30 min com 5 mM de CaCl₂ e de MgCl₂, de maneira independente. Foram realizadas três réplicas independentes do experimento.

4.9 Cultivo de células HEK293

As células HEK293 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos e antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina B; Sigma-Aldrich), de acordo com as recomendações do fabricante.

As células foram cultivadas em frascos para cultura celular. Para a realização dos subcultivos, o meio de cultura foi aspirado, seguido de lavagem com PBS e adição de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) para o desprendimento celular. A tripsina foi posteriormente neutralizada com meio de cultura, e as

células foram contadas e semeadas em novos frascos, de acordo com a densidade celular desejada. O cultivo e a manutenção das células foram realizados em incubadora a 37 °C, sob atmosfera controlada contendo 5% de CO₂.

Durante o cultivo, o meio de cultura foi substituído regularmente, geralmente a cada 2–3 dias, e o crescimento celular foi monitorado por microscopia óptica. Os subcultivos foram realizados quando as células atingiram confluência de aproximadamente 70–80%, seguindo as etapas de aspiração do meio, lavagem com PBS, tratamento com tripsina-EDTA, neutralização, contagem celular e nova semeadura. Todas as manipulações celulares foram conduzidas sob condições assépticas. Para fins de preservação, as células HEK293 foram criopreservadas em meio contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas em freezer a –70 °C.

4.10 Expressão de TcSTIM em células de mamíferos

Foram utilizadas células HEK293 para expressão da proteína, identificação da localização subcelular de STIM e análise da formação de *puncta* pelo canal CRAC após depleção de cálcio e mudança de pH intracelular. Para a transfecção, as células foram adicionadas em placa de seis poços, a uma densidade de 0.3×10^6 células por poço e transfectadas com 350-500 ng de EGFP-TcSTIM, usando 10 µl de lipoafectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Após 24 horas, as células foram transferidas para placas de petri com fundo de vidro para observação em microscópio confocal (Zeiss 710), as imagens foram geradas após 48 horas da transfecção. Para verificação da ativação do canal CRAC, mediante depleção de cálcio, as células transfectadas foram incubadas com 1 µM de Tapsigargina (TG) (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) por 15 minutos. Foi realizado também análise do canal mediante alteração de pH intracelular, para isso as células transfectadas foram incubadas com solução tampão, composta por 140 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA e 20 mM MES (pH 6,0), suplementada com 10 µM de nigericina, conforme descrito por Chen *et al.* (2024), as imagens foram geradas após 15 minutos. Para a análise dos experimentos, foram realizadas

três réplicas independentes para os ensaios com lipofectamina e duas réplicas independentes para a análise de alteração de pH.

4.11 Síntese de dsRNA

Foram desenhados primers para amplificação de regiões de 500 pb das proteínas TcSTIM e TcOrai (Tabela 2), com a presença da sequência do promotor T7 (5'- TAATACGACTCACTATAG - 3'). A reação de PCR foi catalisada utilizando a DNA Polimerase *Pfu* (Promega) e plasmídeos contendo as sequências das proteínas. Após a reação foi realizada a purificação do DNA com o kit Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A síntese de dsRNA foi realizada utilizando o kit HighYield T7 RNAi (Jena Bioscience, distribuído pela Cellco), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Em um microtubo livre de nucleases foi adicionado o DNA molde e os componentes do kit, e incubados a 37 °C por 30 min. Posteriormente, a amostra de ssRNA foi incubada a 70 °C por 10 min e resfriado passivamente até a temperatura ambiente, para que ocorresse o anelamento. Por meio da adição de RNase e DNase foram removidos o molde de DNA e de ssRNA. Para precipitação da dsRNA foi utilizado acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e isopropanol, incubado por 5 min no gelo, e centrifugado por 10 min. O pellet de dsRNA foi ressuscitado em 40 µL de água. A concentração de RNA foi determinada pela medição da absorbância a 260 nm no NanoDrop.

4.12 Silenciamento gênico por RNAi

A técnica de RNA de interferência foi utilizada para silenciar os genes de STIM e Orai de *T. castaneum*, no estágio larval do seu ciclo de vida, conforme descrito por Linz *et al.*, (2014). Larvas de aproximadamente 20 dias foram selecionadas. O experimento de injeção foi realizado em dois grupos, o primeiro grupo injetado com dsRNA TcSTIM e o segundo grupo (grupo controle) injetado com água. Para cada grupo, foram injetadas 60 larvas com o auxílio do nanoinjetor Nanoject II, utilizando microagulhas confeccionadas a partir de microcapilares de vidro borossilicato (Drummond Scientific Company, #3-000-203-G/X), preparados no PC-10 Micropipette Puller, com o

equipamento ajustado para 59,8 V no heater 2. Em cada larva, previamente anestesiada em gelo, foi injetado o volume de 207 nL, na região dorsal do abdome, entre o quarto e quinto segmento. As larvas foram mantidas em placas de petri com farinha de trigo (passada pelo processo de armazenamento descrito na seção 4.1), que foi trocada a cada 5 dias e, mantidas a 30 °C. Nas primeiras 48h após a injeção foram retiradas as larvas que morreram em decorrência da não cicatrização do ferimento, as larvas restantes foram acompanhadas diariamente durante seu processo de desenvolvimento até a fase adulta e as alterações fenotípicas identificadas por microscopia e lupa.

4. RESULTADOS

5.1 Análises de bioinformática de estruturas preditas das proteínas STIM e Orai

Iniciamos o estudo do canal CRAC de *T. castaneum* pela análise da sequência das proteínas que o compõem. Foi realizado um alinhamento múltiplo para determinar regiões conservadas da proteína em comparação a ortólogos de *H. sapiens*, e dos insetos *D. melanogaster* e *H. armigera*.

As análises comparativas revelaram que as proteínas STIM apresentam elevada conservação dos domínios EF-hand e SAM entre as espécies avaliadas, indicando a manutenção estrutural de regiões essenciais para a detecção de Ca^{2+} luminal e para a oligomerização da proteína. Além disso, a predição de regiões transmembranares confirmou a presença do segmento transmembranar característico de STIM (Figura 7).

HsSTIM1/1-685	1	--MDV	CVRLALWLLWGPL	-----	16
DmSTIM1/1-570	1	MRKNTIWNYS	LIFFCCVYLKSI	STLDHGPHTVSVDSNRHNTQHQYKQNPVNASQRHSSHESG	61
TcSTIM1/1-645	1	-----M	HTRGLIFWLL	-----	12
HaSTIM1/1-570	1	-----M	RIGFVLYWCVF	-----	12
EF-SAM					
HsSTIM1/1-685	17	--LHQG	QSLSHSHSEKATG	TSSGANSEESTAAE	47
DmSTIM1/1-570	62	QSLHNSQS	-EHV--THIAASHAGSGGEHSTHLAQNLHRS	SYNLLSEAMSQAVSNEFSMGS	119
TcSTIM1/1-645	13	-SFYRSAA	-EDAATKLRSDNFK	-----STYSANDLLSDSSIN	50
HaSTIM1/1-570	13	-AFHLCKA	-DDV--ERTETRD	SRRQQWGPVVRSGSFMSSDAVAASNEQILFE	61
EF-SAM					
HsSTIM1/1-685	48	-----F	CRIDKPLCH--SEDEKL	SFAVRNIHKLMDD	DANGD
DmSTIM1/1-570	120	GSADGAC	AAADDFDCYSGSVQDRFGMEAIASL	HRQLDDD	DNGNIDLSESDDFLREELKYDSG
TcSTIM1/1-645	51	-----T	SIDDFACL	TMAANDRLGLEAIKTLHQKL	DDDANGNVDLSESDDFLREELQYDSG
HaSTIM1/1-570	62	-----A	CH-NEPACL	-----QDRAGLEAITQLHRQL	DDDANGNVDLSESDDFLREELQYDSG
EF-SAM					
HsSTIM1/1-685	102	-TVKHSTF	HGEDKL-ISVEDL	LWKAWKSSSEVYN	NWTVDEVVQWLITYVELPQYEETFRKLQLS
DmSTIM1/1-570	181	YEKRQKAF	HFNDDMHISVKEL	WEAWLRSEVHNWT	IEQTTDWLAQSVQLPQYVDLFLHKVT
TcSTIM1/1-645	107	YERRQKAF	HRNDDMHISVKEL	WEAWLRSEVHNWT	VEQTTDWLVSSVDLPQYVPSFISHKVT
HaSTIM1/1-570	113	YEKRQKAF	HFNDDMHISVKEL	WEAWLRSEVHNWT	VEQTTDWLVSSVDLPQYKTLFLQHKVT
EF-SAM					
HsSTIM1/1-685	161	GHAMPRL	AVTNTTMTG	TVLKMTDRSHRQKL	LKALDTVLF
DmSTIM1/1-570	242	GAALPRL	AVNNLQYVGNVI	GIKDPIHKQKISL	KAMDVVLFGPP-RE
TcSTIM1/1-645	168	GANLPRL	AANNVNYL-NHLG	IKDPIHKQKIVL	KAMDVVLFGPP-KDG
HaSTIM1/1-570	174	GATLPRL	AVNNMQYLSNVL	GIKDPIHKQKLA	LKAMDVVLFGPP-KEG-SRWKDWLASLL
EF-SAM					
HsSTIM1/1-685	222	IGVGGCWF	AYIQNRYSK	EHMKMMKML	EGLHRAEQSLHDLQERLHKQAEFHRTVEVEKVL
DmSTIM1/1-570	302	SAIIGCWY	AYQQNKNAKRHL	RRMAQDMEGL	QRAEQSLQEMQKELERARMEQENVATEKLDL
TcSTIM1/1-645	227	GGGIGVWY	AFQQNKKFKNHL	NRMRDMSL	QNAEKALENLQKELEEAKQAQEDVITEKQNL
HaSTIM1/1-570	233	LAVVGCWA	ALRAGRASRHQV	QRMLRDMEL	RKAEMALNDMQKELEKARLEQENVTTTEKKNL
EF-SAM					
HsSTIM1/1-685	283	EKKLRDE	-----INLAK	QEAQRLKEIREG	TENERSRQKYAEELEEQVREALRKAELKELSH
DmSTIM1/1-570	363	ERRLKEA	-----PTLSS	NSDLE-VQQLK	-----KEIEMLRNELSRAEFELVDN
TcSTIM1/1-645	288	EKKIQDS	-KTDLDSL	PYSDLE-VNQLK	-----AEIEMLRTELQIAEGELKDR
HaSTIM1/1-570	294	EKKLRE	AGDTPLLSNAS	SDLE-VTQLK	-----AEIEMLRRAELRAEGELED
SOAR					
HsSTIM1/1-685	339	SSWYAF	EALQKWLQLTHE	VEVQYYNKKQNA	EKQLLVAKEGA
DmSTIM1/1-570	406	C-WSP	PPQLQSWLQYTYEL	ESKNHKKRTSA	EKQLQSAREACEKL
TcSTIM1/1-645	333	C-WSP	PPGLQQLTHEI	ENKA-MKKK	ASAQKQLQQAAREACEKL
HaSTIM1/1-570	340	C-WAP	PPGLQQLTHE	VENRSYL	RKKQAADLQLQQAAREACEKL
SOAR					
HsSTIM1/1-685	400	SSLDDV	DHKILTAKQAL	SEVTAA	RERLHRWQQIEILCGEQIVNNP
DmSTIM1/1-570	466	KSIDDV	DRSIVEARNAL	GDVTNELQERL	HRWQIEITCLGLNIVNNNGLPYLENVL
TcSTIM1/1-645	392	KSIDEV	DRSIVEARTAL	NEVTQELQERV	HRWQIEIEMLCGFSIINNNGLQFLENTLYRNT
HaSTIM1/1-570	400	KSIDDV	DRSIVEARTAL	NEVTQELQERM	HRWQIEIRLCGFNIINNNGLQYLETALYRNA
SOAR					
HsSTIM1/1-685	461	MGSTR	PNPAHFIMTDDV	DDMD-EEIV	SPLSMQSPSLQSSVRQRLTEPQHGLGSQRDLTHSD
DmSTIM1/1-570	525	-----N	GRALPVRGRIS	-SODDL	-DDTASLYGHQGHSEGTALHSWKEGDSGSETSRQEEDSH
TcSTIM1/1-645	451	--NGR	ALPVRGRIS	-SODDL	-DDTASLYGHQGHSEGTALHSWKEGDSGSETSRQEEDSH
HaSTIM1/1-570	459	--NGR	PTG-RGR	ISSQDDL	SIGDDASICGSVADN-----FMWRE-DSSGSEA
SOAR					
HsSTIM1/1-685	521	SESSLH	MSDRQRVAPKPP	QMSRAADEAL	NAMTSNGSHRLIEGVHPGSLVEKLPDSPALAKK
DmSTIM1/1-570	538	-----G	SRARITNSTED	LDDES	IQGLNFENF
TcSTIM1/1-645	508	SESKPT	PGVHFVVGGEI	STWPEDSSSYTK	ISKLSNPRSI
HaSTIM1/1-570	503	-----D	APHYPLDL	-----RLA	EARLQLFEERLAQEAREERRQD
SOAR					
HsSTIM1/1-685	582	ALLAL	NHGLDKAHS	LMELSPS	APPGGSPHL
DmSTIM1/1-570	565	SLL	ATE-----	-----	-----
TcSTIM1/1-645	569	TNVG	ILD	SVKPKSS	LSDSL
HaSTIM1/1-570	535	DRRGA	-----R	ASYSD	-----LR
SOAR					
HsSTIM1/1-685	643	RIPH	L	AGKKA	VAEEDNGSIG
DmSTIM1/1-570	-----	-----	-----	-----	-----
TcSTIM1/1-645	630	KKKL	F	AFTK	KSKGKND
HaSTIM1/1-570	556	EQVHF	IL	-----G	CDNFVVA

Figura 7: Alinhamento múltiplo de STIM das espécies *Tribolium castaneum*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* e *Helicoverpa armigera*. As regiões com a coloração azul mais intensa, são mais conservadas.

Para a proteína Orai, as análises evidenciaram a presença de quatro hélices transmembranares, compatível com o descrito para Orai de *D. melanogaster*. É possível identificar que as regiões transmembranares possuem resíduos altamente conservados (Figura 8).

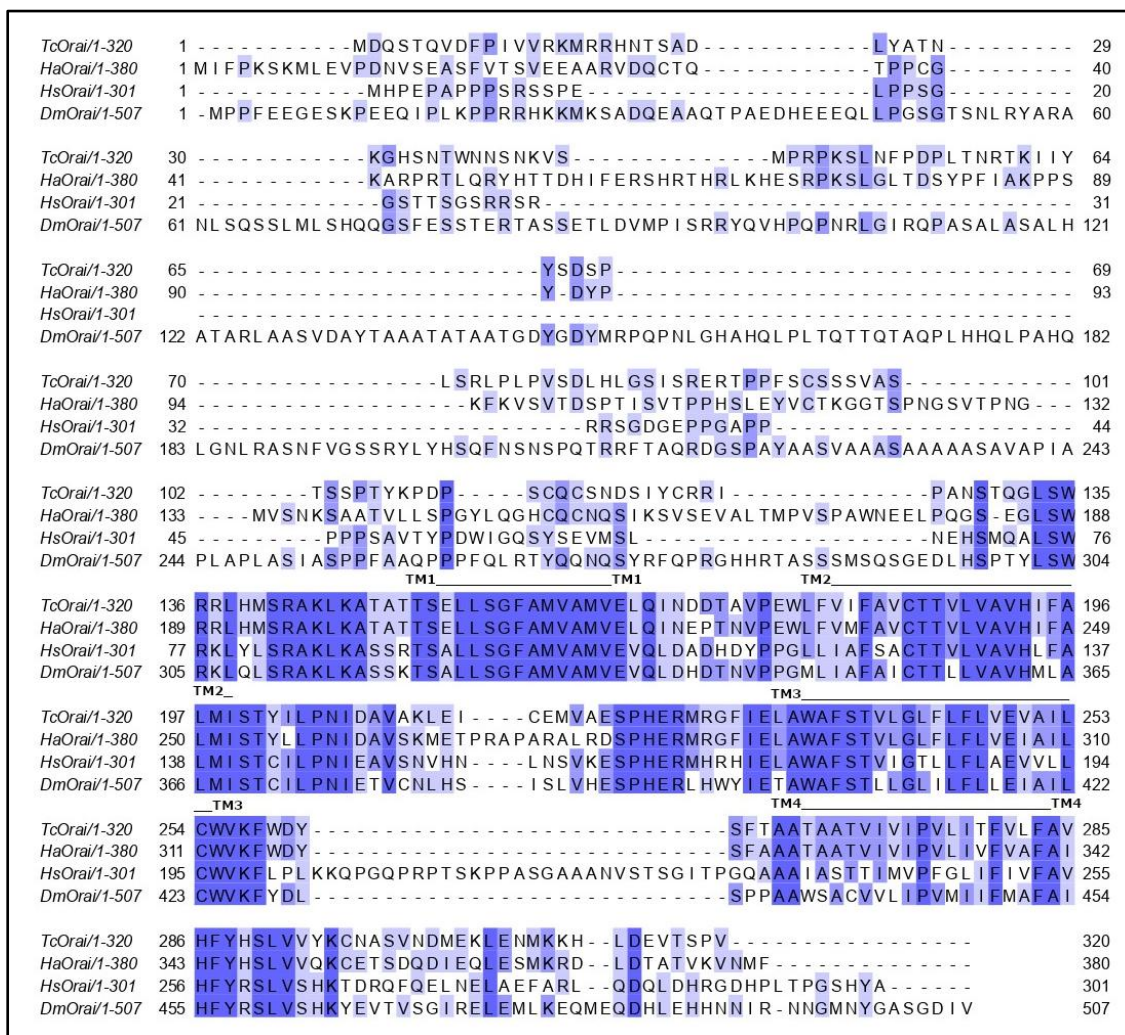


Figura 8: Alinhamento múltiplo de Orai das espécies *Tribolium castaneum*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* e *Helicoverpa armigera*. As regiões com a coloração azul mais intensa, são mais conservadas.

As estruturas tridimensionais das proteínas STIM e Orai foram preditas utilizando a plataforma AlphaFold, permitindo a visualização da organização estrutural e da distribuição dos domínios funcionais ao longo das sequências. Para STIM, o modelo predito evidenciou a organização dos domínios EF-hand e SAM em uma conformação compatível com a função de sensor de cálcio luminal, além da presença da região transmembranar característica que conecta os compartimentos do retículo endoplasmático e do citosol (Figura 9).

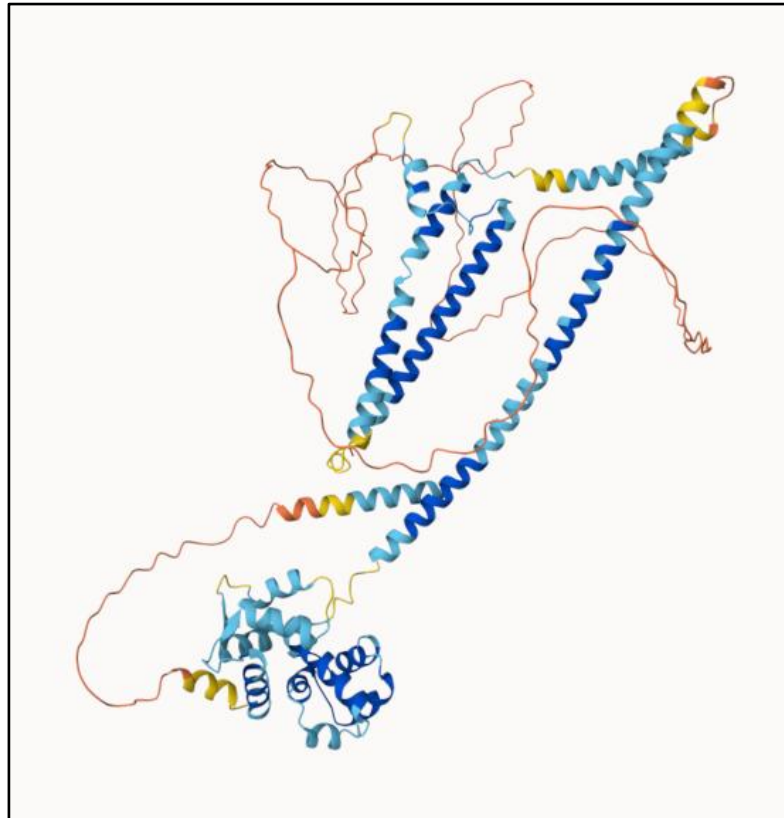


Figura 9: Estrutura tridimensional da proteína TcSTIM gerada pelo AlphaFold. A estrutura está colorida de acordo com o índice de confiabilidade pLDDT, variando de azul escuro (pLDDT > 90, alta confiabilidade) a azul claro/verde (70 < pLDDT < 90, confiabilidade moderada), amarelo (50 < pLDDT < 70, baixa confiabilidade) e laranja/vermelho (pLDDT < 50, regiões altamente flexíveis ou desordenadas).

No caso de Orai, a estrutura predita revelou claramente a disposição das quatro hélices transmembranares, organizadas de forma consistente com a arquitetura típica de canais CRAC, reforçando a confiabilidade das predições obtidas e sua concordância com dados estruturais adquiridos (Figura 10).

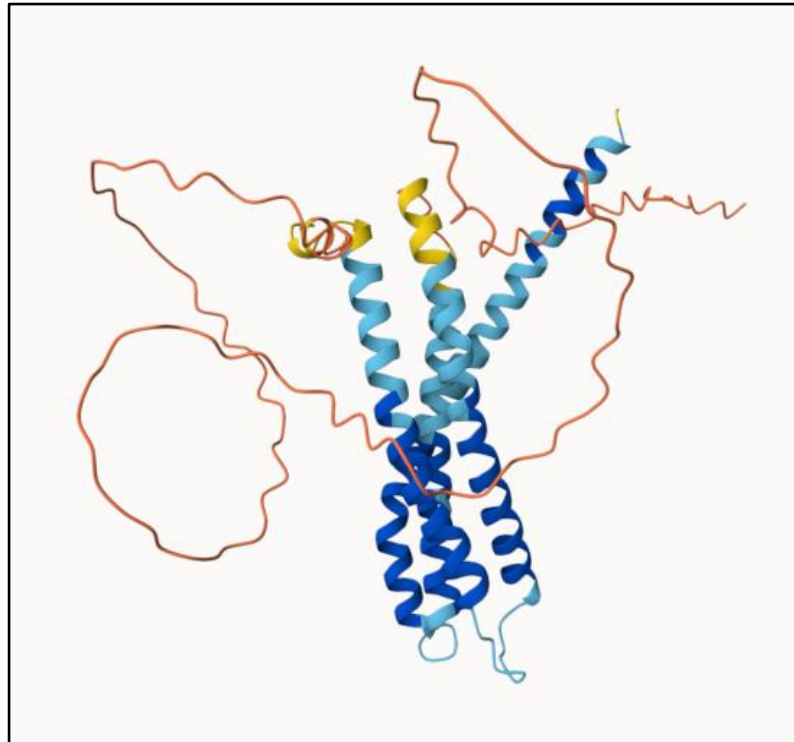


Figura 10: Estrutura tridimensional da proteína TcOrai gerada pelo AlphaFold. A estrutura está colorida de acordo com o índice de confiabilidade pLDDT, variando de azul escuro (pLDDT > 90, alta confiabilidade) a azul claro/verde (70 < pLDDT < 90, confiabilidade moderada), amarelo (50 < pLDDT < 70, baixa confiabilidade) e laranja/vermelho (pLDDT < 50, regiões altamente flexíveis ou desordenadas).

As predições estruturais obtidas por meio do AlphaFold apresentaram altos níveis de confiança para as regiões que caracterizam funções das proteínas, como os domínios EF-hand, SAM e região transmembrana de STIM e as hélices transmembranares de Orai.

5.2 Clonagem de STIM e Orai de *T. castaneum*

Foi realizada a busca de sequências das proteínas STIM e Orai de *T. castaneum* no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (WHEELER *et al.*, 2003) e no iBeetle-Base (SCHMITT-ENGEL *et al.*, 2015). A sequência de TcSTIM possui 1921 pb e TcOrai 975 pb. Diante da dificuldade de purificação de proteínas contendo regiões transmembrana, como TcSTIM, foi realizada uma construção parcial, compreendendo apenas o domínio EF-SAM (localizado no lúmen do RE), para expressão e purificação em bactérias, sendo possível analisar a funcionalidade desse domínio como sensor de cálcio. Para a realização dessa construção parcial a região transmembrana de TcSTIM foi

identificada através do software TMHMM - 2.0 (KROGH *et al.*, 2001), e o domínio EF-SAM identificado na sequência para realização do desenho dos primers.

Os primers foram desenhados através da ferramenta OligoPerfect Primer Designer (Thermo Scientific), e estão listados na Tabela 1.

Gene	Primer Foward	Primer Reverse
TcSTIM	ATGGACGAGCTGTACAAGGCCGAAGATGCCGCCACG	CCTTTACTGCCACCCCATCTGCTCAGTCATTTTACCCTTGC
TcOrai	ATAGGATCCATGGACCAATCAACCCAA	CGAAGTTACCAGTCCTGTGTGACTCGAGATA
TcSTIM-EF-SAM	CATAGGCCGAAGATGCCGCCACG	CTCGAGTCAGTCCTCCAATGCCGC

Tabela 1: Sequências de primers para clonagem das proteínas TcSTIM e TcOrai.

Para a clonagem da sequência completa da proteína STIM no vetor pCMV, foi utilizado o método de montagem Gibson, sem o emprego de enzimas de restrição. Essa abordagem foi adotada porque a sequência codificante da proteína contém sítios internos de restrição para as enzimas disponíveis, o que poderia resultar em clivagem indesejada e consequente perda da integridade e da função da proteína. Para a clonagem de Gibson é preciso realizar uma montagem com uma região de sobreposição de no mínimo 15 pb entre a sequência a ser clonada e o vetor. Os primers utilizados para o vetor pCMV foram: primer foward (5'-3'): GCAAGGGTAAAAATGACTGAGCAGGATGGGGTGGCAGTAAAGG e primer reverse (5'-3'): CGTGGCGGCATCTTCGGCCTTGTACAGCTCGTCCAT. Como molde da reação de PCR do vetor foi utilizado um plasmídeo contendo a sequência do pCMV com a sequência da STIM de *H. sapiens*, já presente no laboratório (LQFPP/UENF).

As sequências de TcSTIM-EF-SAM e TcOrai, também foram clonadas diretamente ao vetor, utilizando enzimas de restrição. A seleção de clones positivos para TcSTIM em pCMV e TcOrai em M091 foi realizada através de análise se restrição, já TcSTIM-EF-SAM em pET28a+, através de reação de PCR utilizando os primers da sequência da proteína, devido ao baixo rendimento do plasmídeo.

A análise das reações foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A Figura 11 apresenta o resultado das reações para seleção de clones positivos (destacados nos quadrados vermelhos). Cabe destacar que o vetor M091 utilizado na clonagem de Orai corresponde a um plasmídeo recombinante

previamente construído, o qual já continha inserida uma sequência do gene *Orai* de *Schistosoma mansoni* (SmOrai), sendo utilizado como base para as etapas subsequentes de clonagem. Os clones selecionados positivamente foram sequenciados a fim de confirmar a correta inserção e integridade das sequências clonadas nos vetores.

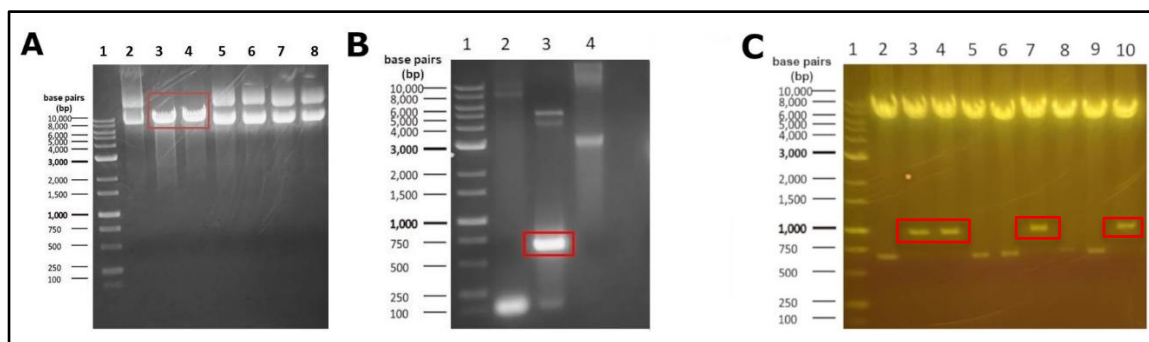


Figura 11: Representação em gel de agarose de teste para confirmação de clones positivos: **A** - Gel para análise de reação de restrição. As amostras foram distribuídas em poços com 30 µl. 1 - Marcador; 2 - HsSTIM+pCMV; 3 - Colônia 1 (TcSTIM+pCMV); 4 - Colônia 2 (TcSTIM+pCMV); 5 - Colônia 3 (HsSTIM+pCMV); 6 - Colônia 4 (HsSTIM+pCMV); 7 - Colônia 5 (HsSTIM+pCMV); 8 - Colônia 6 (HsSTIM+pCMV). **B** - Gel para análise da reação de PCR. As amostras foram distribuídas em poços com 30µl. 1 - Marcador; 2 - Colônia 1 (Clone negativo); 3 - Colônia 2 (Clone positivo TcSTIM-EF-SAM+pET28); 4 - Colônia 3 (Clone negativo). O número de pares de bases da sequência de TcSTIM-EF-SAM corresponde a 603 pb. **C** - Gel para análise de reação de restrição. 1 - Marcador; 2 - Colônia 1 (SmOrai+M091); 3 - Colônia 2 (clone positivo TcOrai+M091); 4 - Colônia 3 (clone positivo TcOrai+M091); 5 - Colônia 4 (SmOrai+M091); 6 - Colônia 5 (SmOrai+M091); 7 - Colônia 6 (clone positivo TcOrai+M091); 8 - Colônia 7 (SmOrai+M091); 9 - Colônia 8 (SmOrai+M091); 10 - Colônia 9 (clone positivo TcOrai+M091). O número de pares de bases que corresponde a sequência de TcOrai é 975 pb.

Esses resultados confirmam o sucesso do processo de clonagem na introdução dos genes de interesse nos vetores plasmidiais e na obtenção de populações de células contendo os genes de STIM, Orai e STIM-EF-SAM de *T. castaneum* para estudos subsequentes sobre sua função e regulação.

5.3 Expressão e purificação de TcSTIM-EF-SAM em *E. coli*

A expressão da proteína recombinante foi realizada na linhagem comercial *E. coli* BL21 (DE3), amplamente utilizada para expressão heteróloga de proteínas sob controle do promotor T7. As células foram transformadas por

choque térmico, plaqueadas e três colônias foram selecionadas para realização de teste de expressão. O teste expressão confirmou sua superexpressão, pela presença da banda expressiva de 22 kDa (correspondente ao tamanho da proteína de interesse) no gel de poliacrilamida SDS-PAGE (15%), conforme observado na Figura 12.

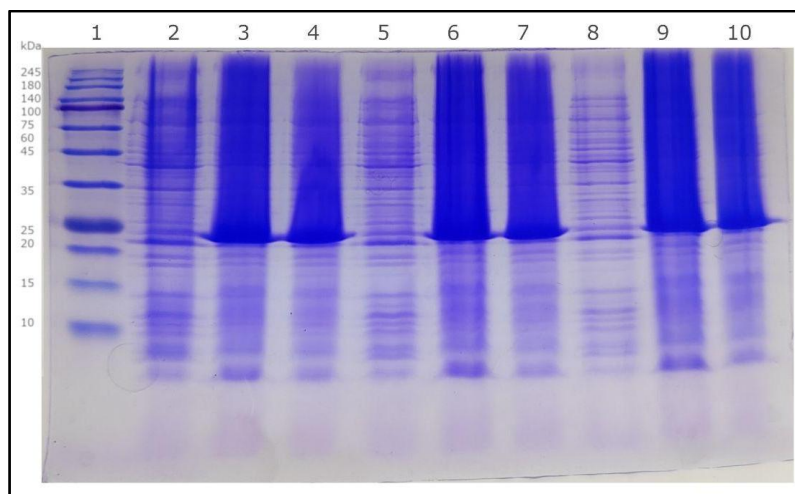


Figura 12: Resultado do teste de expressão de TcSTIM-EF-SAM - 15% SDS-PAGE: 1 - Marcador; 2 - Colônia 1: não induzida; 3 - 4 Colônia 1: induzida; 5 - Colônia 2: não induzida; 6 - 7 Colônia 2: induzida; 8 - Colônia 3: não induzida; e 9 - 10 Colônia 3: induzida.

Após a confirmação da expressão bem-sucedida da proteína TcSTIM-EF-SAM, foi iniciado o protocolo de expressão e purificação em maior escala. A proteína foi expressa em 2 L de cultura, e, em seguida, procedeu-se à etapa de purificação. A etapa de purificação inicia-se com a centrifugação do meio de cultura e posterior lise das células. A adição do inibidor de proteases PMSF ao tampão de lise (tampão A), foi essencial para prevenir a degradação proteica durante a purificação, problema observado na primeira tentativa de purificação de TcSTIM-EF-SAM. Após a lise das células, a proteína de interesse foi detectada na fração solúvel, conforme evidenciado pela análise do sobrenadante obtido após a centrifugação (Figura 13, coluna 4). Essa fração solúvel, foi então submetida às etapas subsequentes de purificação.

Inicialmente foi realizada a cromatografia de afinidade, esse processo permitiu a retenção seletiva de TcSTIM-EF-SAM na coluna, enquanto a maioria das outras proteínas não ligadas foram eluídas. Essa observação foi evidenciada

pela presença mínima de TcSTIM-EF-SAM na fração não retida (conforme ilustrado na Figura 13, coluna 5).

A lavagem 1 foi conduzida exclusivamente com a passagem do tampão B pela coluna. A seguinte lavagem (lavagem 2) foi composta pelo tampão B adicionado a 10 mM de imidazol. Pode-se observar que as lavagens causaram uma perda mínima de proteína, porém, foram essenciais para a obtenção de uma amostra com alto grau de pureza.

A última etapa da cromatografia de afinidade foi a eluição da proteína, que ocorreu com o tampão B adicionado a 0,5 M de imidazol, o volume de eluição foi dividido em três (5 mL para cada eluição) e a cada eluição a resina foi homogeneizada por 5 min em um agitador orbital. Todas as etapas da cromatografia de afinidade ocorreram a baixa temperatura, visando manter a integridade da proteína.

A cromatografia de afinidade demonstrou alta eficiência na ligação da proteína TcSTIM-EF-SAM, o que foi evidenciado pela presença da proteína em alta concentração nas frações de eluição, conforme visualizado na Figura 13, colunas 8-10.

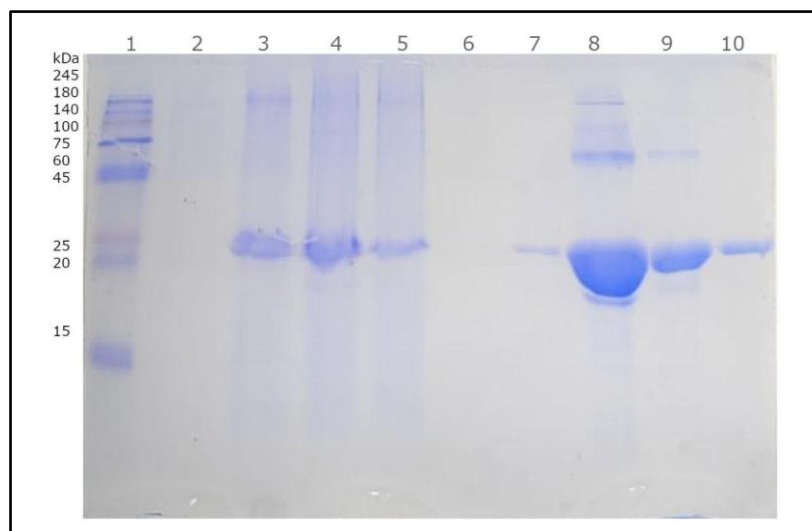


Figura 13: Lavagens da etapa de cromatografia de afinidade - 15% SDS-PAGE: 1 - Marcador; 2 - Não induzido; 3 - Induzido; 4 - Sobrenadante; 5 - Não retido; 6 - Lavagem 1; 7 - Lavagem 2; 8 - Eluição 1; 9 - Eluição 2; 10 - Eluição 3.

Posteriormente, foi realizada cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 75 acoplada ao sistema ÄKTA go (Cytiva). A Figura 14 - A mostra o resultado final da purificação, sendo representado pelas frações do ÄKTA. Esses resultados indicam que a purificação foi bem-sucedida, resultando

na obtenção de uma proteína livre de contaminantes. Além disso, observa-se a presença de uma banda entre 45 e 60 kDa nas frações com maior concentração proteica, possivelmente correspondente à formação de dímeros (Figura 14 - A).

A análise do perfil de eluição de TcSTIM-EF-SAM na cromatografia de exclusão molecular revela um único pico principal com maior intensidade, que corresponde às frações 11 e 12, indicando uma proteína homogênea. Conforme observado na Figura 14 - B.

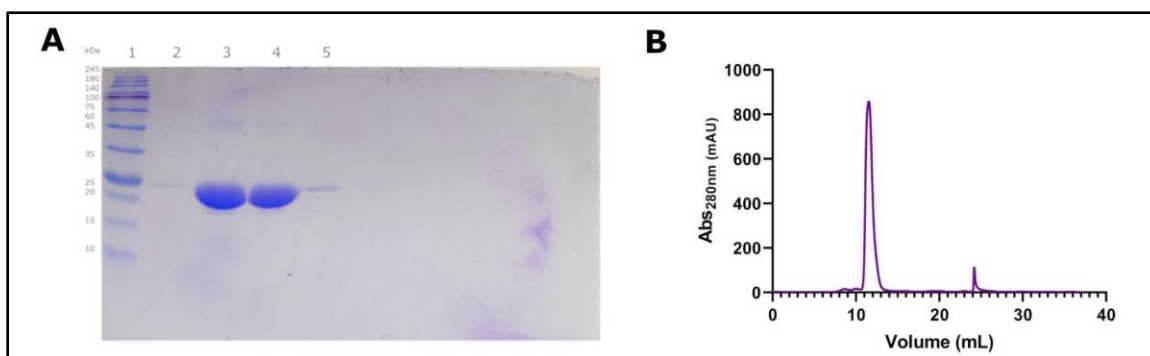


Figura 14: Resultado da Cromatografia de Exclusão Molecular - 15% SDS-PAGE: A - 1 - Marcador; 2 - Fração 10; 3 - Fração 11; 4 - Fração 12; 5 - Fração 13; **B** - Gráfico do perfil de eluição de TcSTIM-EF-SAM.

Os resultados obtidos na purificação da proteína TcSTIM-EF-SAM, indicam que o protocolo foi bem sucedido, obtendo-se uma proteína com elevado grau de pureza, adequada para as análises subsequentes de caracterização biofísica e mudança conformacional na presença de cálcio.

5.4 TcSTIM-EF-SAM atua como sensor de cálcio

Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados para avaliar a ligação do cálcio à TcSTIM-EF-SAM. A análise por ITC foi realizada utilizando o modelo de sítios independentes, a Figura 15 mostra a curva de ligação obtida.

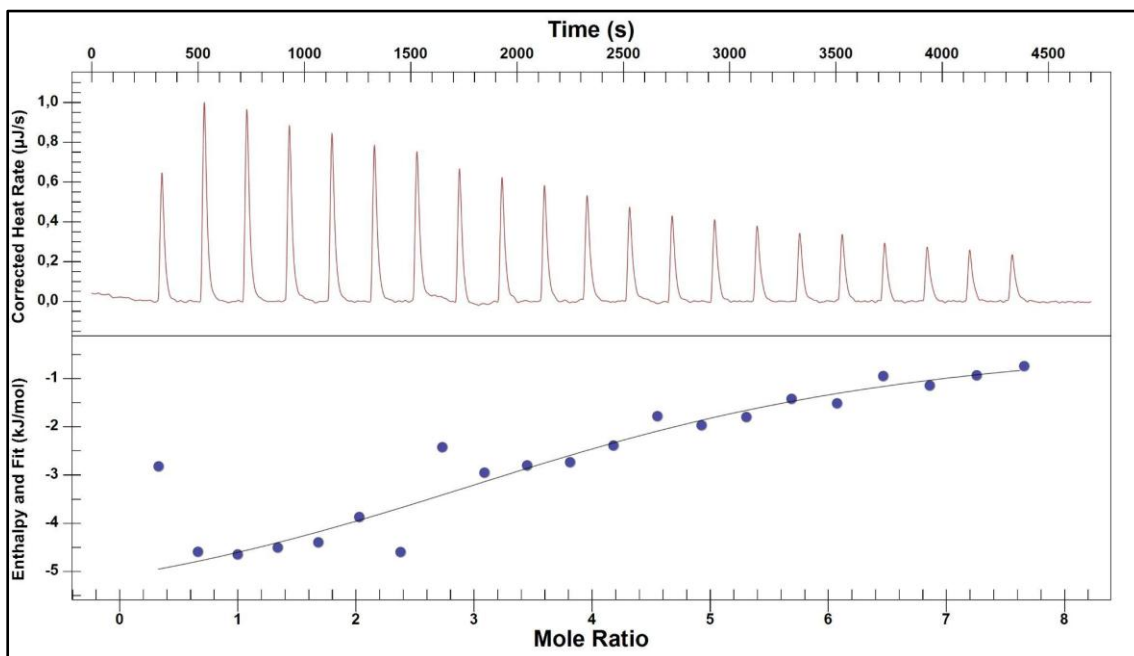


Figura 15: Análise de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da titulação de Ca^{2+} a TcSTIM-EF-SAM. (Acima) Dados brutos de ITC mostrando a taxa de calor ($\mu\text{J/s}$) registrada após injeções sequenciais de 2 mM de CaCl_2 em uma solução de 60 μM de TcSTIM-EF-SAM, em tampão B, a 25 °C. (Abaixo) Isotherma de ligação integrada representando a variação de entalpia por injeção em função da razão molar, ajustada a um modelo de ligação de sítios independentes.

O ajuste dos dados de ITC a um modelo de sítios independentes resultou em uma constante de dissociação na faixa de micromolar ($K_d = 61,5 \mu\text{M} \pm 2,6$), indicando uma interação de afinidade moderada entre Ca^{2+} e a TcSTIM-EF-SAM. A estequiometria de ligação obtida ($n = 4,15 \pm 0,35$) sugere a presença de aproximadamente quatro sítios de ligação. A interação apresentou caráter exotérmico, com variação de entalpia de $-6,27 \pm 0,95 \text{ kJ/mol}$, e foi acompanhada por um ganho entrópico favorável ($\Delta S = 59,58 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$). Apesar da consistência global do ajuste, os erros associados aos parâmetros indicam que os valores devem ser interpretados com cautela.

A ligação ao cálcio se mostrou específica, pois não foi observada curva de ligação ao titular MgCl_2 , indicando a ausência de interação com este íon, conforme observado na Figura 16.

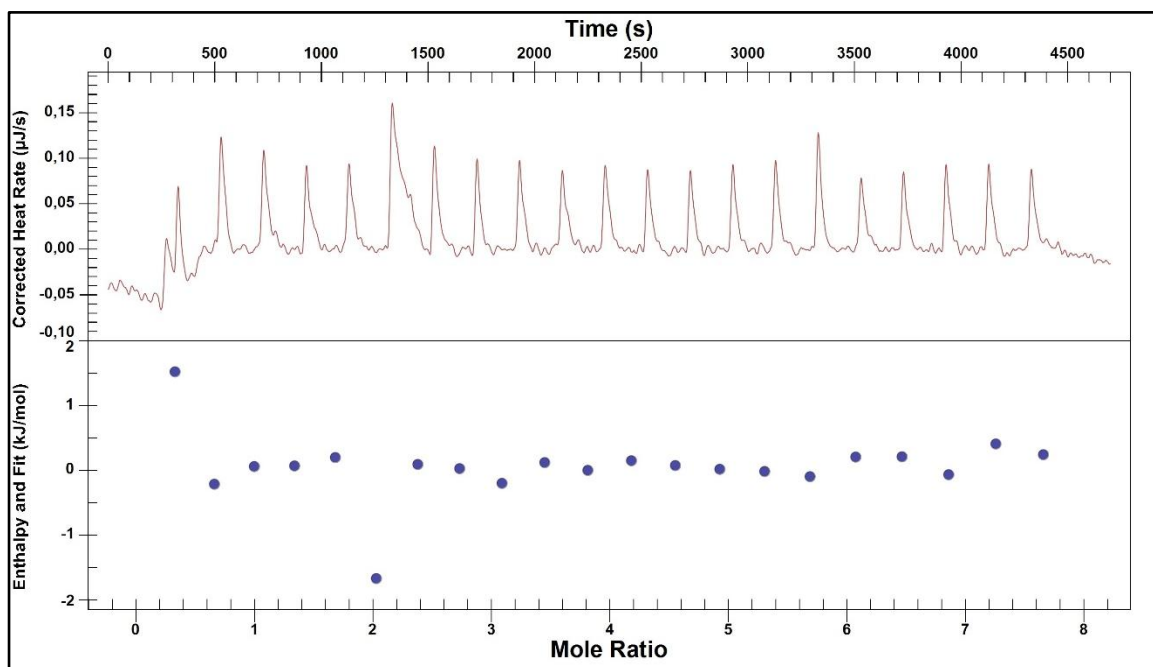


Figura 16: Análise de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) da titulação de Mg^{2+} a TcSTIM-EF-SAM. (Acima) Dados brutos de ITC mostrando a taxa de calor ($\mu J/s$) registrada após injeções sequenciais de 2 mM de $MgCl_2$ em uma solução de 60 μM de TcSTIM-EF-SAM, em tampão B, a 25 °C. (Abaixo) Isotherma de ligação integrada representando a variação de entalpia por injeção em função da razão molar, ajustada a um modelo de ligação de sítios independentes.

Os resultados obtidos nos experimentos de ITC demonstram que TcSTIM-EF-SAM é capaz de se ligar de forma específica ao cálcio. Essa interação ocorre de maneira exotérmica, com liberação de calor, até que a saturação do sistema seja atingida. Esses dados são consistentes com a função do domínio EF-SAM de STIM de *T. castaneum*, como sensor de cálcio associado à ativação do canal CRAC.

5.5 Ligação com cálcio aumenta a estabilidade térmica de TcSTIM-EF-SAM

Foi realizado o ensaio de espectroscopia de dicroísmo circular para analisar a estrutura secundária da proteína TcSTIM-EF-SAM. Esta proteína integra a família EF-hand, descrita por Kretsinger e Nockolds (1973), que é caracterizada pela presença de motivos estruturais do tipo hélice–loop–hélice, com predominância de estrutura secundária α -helicoidal, responsáveis pela ligação a íons cálcio (Ca^{2+}). A Figura 17-A, mostra o espectro de TcSTIM-EF-SAM (10 μM), em sua forma apo, que revela dois mínimos intensos em torno de 208 e 225 nm, indicativos de um alto teor de α -hélice, em B é apresentado outro

experimento, comparando o espectro de TcSTIM-EF-SAM na forma apo e incubada com 5 mM de CaCl_2 (forma holo). É possível constatar que a ligação com o cálcio não afeta a estrutura secundária de forma significativa, sendo observadas mínimas alterações no espectro e a manutenção de sua estrutura rica em hélice.

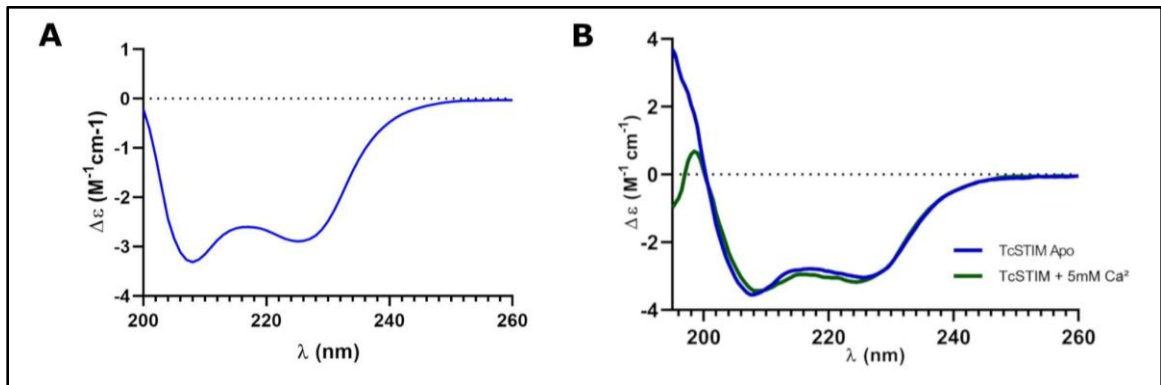


Figura 17: Espectro de Dicroísmo Circular da proteína TcSTIM-EF-SAM: A - Solução de 10 μM TcSTIM-EF-SAM em tampão B (forma apo); B - Comparação de TcSTIM-EF-SAM nas formas apo e com cálcio 5 mM de CaCl_2 .

Com a finalidade de analisar a estabilidade térmica da proteína, foi realizado o experimento de desnaturação térmica. A desnaturação térmica é um processo no qual a estrutura de uma proteína é desfeita devido ao aumento da temperatura. Isso pode resultar na perda da estrutura secundária, como as α -hélices e folhas- β , e eventualmente, na desnaturação completa da proteína, em que ela perde sua estrutura tridimensional nativa (KOMIYAMA *et al.*, 1984).

Para essa técnica foram realizados dois tipos de ensaio, um monitoramento em comprimento de onda único (222 nm) para monitorar perda de estrutura em α -hélice com o aumento da temperatura (20-90°C) e o monitoramento de espectros completos (200-260 nm) a cada 10 °C, na mesma faixa de temperatura. Na Figura 18 podemos observar o resultado do experimento de desnaturação térmica ao acompanhar a elipticidade em 222 nm.

É possível observar um perfil sigmoidal, característico de uma transição cooperativa entre os estados nativo e desnaturado da proteína. Na amostra com cálcio ocorre um aumento na estabilidade de aproximadamente 10 °C para que ocorra um colapso na estrutura representado pela transição abrupta que ocorre em 70 °C. A região de transição corresponde à perda progressiva da estrutura

secundária, sendo o ponto médio da curva associado à temperatura de melting (T_m).

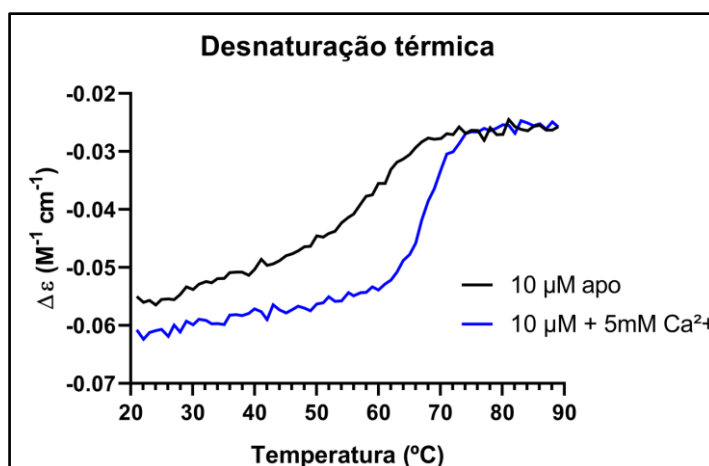


Figura 18: Desnaturação térmica da proteína TcSTIM-EF-SAM via espectro de Dicroísmo Circular. A amostra na forma apo (10 μM em tampão B) está representada pela linha preta, enquanto a proteína incubada com 5 mM de CaCl_2 (10 μM) está representada pela linha azul.

A Figura 19 (A e B) ilustra o resultado do experimento de desnaturação térmica, sendo medido o espectro mediante ao aumento de cada 10 $^{\circ}\text{C}$, sendo possível observar alterações nos espectros com o aumento da temperatura. Os experimentos foram realizados com a proteína TcSTIM-EF-SAM (10 μM), em tampão B, e incubada com 5 mM de CaCl_2 , foi possível observar que ocorre aumento na estabilidade da proteína após sua ligação com cálcio. No painel A podemos observar que a 70 $^{\circ}\text{C}$ a proteína na sua forma apo perde grande parte de sua estrutura nativa, tornando-se predominantemente desenovelada. No painel B vemos que após a ligação com cálcio ocorre o aumento da estabilidade térmica da proteína, evidenciado pela presença de estrutura em α -hélice em 70 $^{\circ}\text{C}$.

Os resultados revelam que a proteína TcSTIM-EF-SAM, na ausência de cálcio, mantém sua estrutura secundária até 60 $^{\circ}\text{C}$, enquanto na presença de cálcio, essa estabilidade é estendida até cerca de 70 $^{\circ}\text{C}$, demonstrando um grande aumento na estabilidade com a adição do ligante.

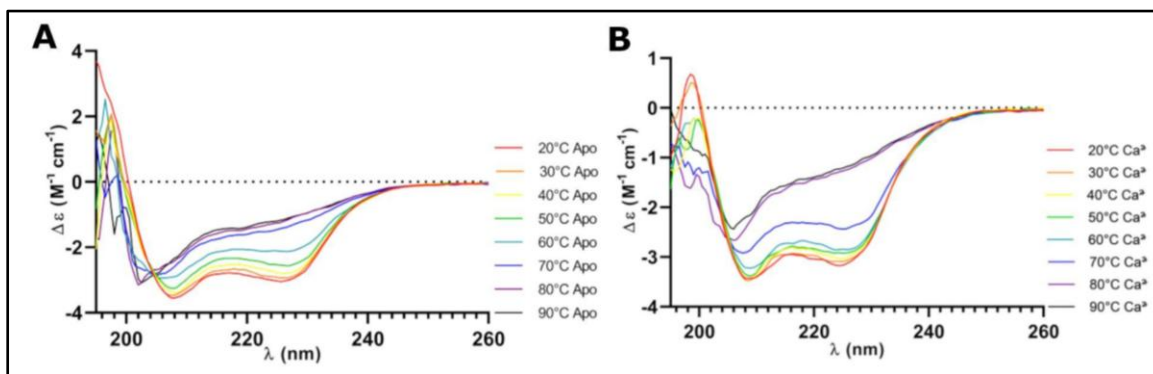


Figura 19: Desnaturação térmica da proteína TcSTIM EF-SAM via espectro de Dicroísmo Circular: A - TcSTIM-EF-SAM na forma apo (10 μM em tampão B); B - TcSTIM-EF-SAM (10 μM em tampão B) com 5 mM de CaCl_2 .

5.6 TcSTIM-EF-SAM muda sua conformação após ligação com cálcio

Para analisar se ocorreu mudança conformacional de TcSTIM-EF-SAM após ligação com cálcio, foi realizado o experimento de digestão suave com tripsina e de deslocamento da proteína em gel nativo.

Os ensaios de digestão suave com tripsina mostraram diferenças no padrão de digestão de TcSTIM-EF-SAM na forma apo e na presença de CaCl_2 (5 μM), em comparação com MgCl_2 (5 μM). A análise por SDS-PAGE 15% após 30 min de incubação à temperatura ambiente é apresentada na Figura 20.

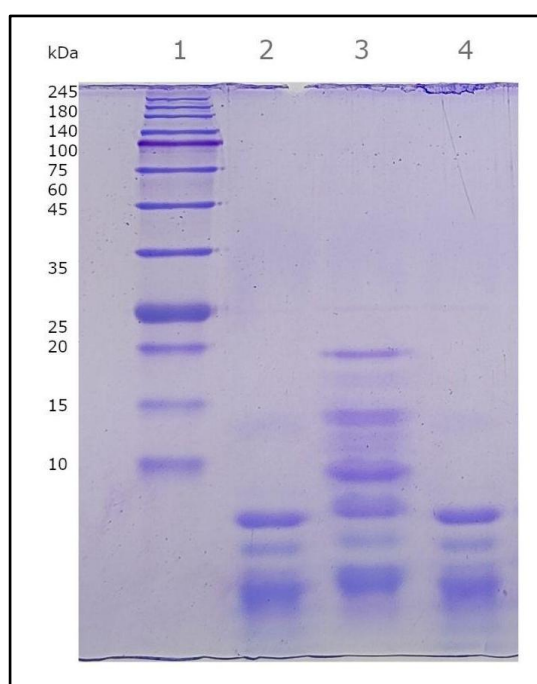


Figura 20: Resultado de reação de digestão suave com tripsina - SDS-PAGE 15%: 1 - Marcador; 2 - TcSTIM-EF-SAM na forma apo (10 μM em tampão B); 3 - TcSTIM-EF-SAM (10 μM em tampão B) com 5 mM de Ca^{2+} ; 4 - TcSTIM-EF-SAM (10 μM em tampão B) com 5 mM de Mg^{2+} . Após 30 minutos de reação.

A digestão de TcSTIM-EF-SAM em suas formas apo e ligada à Ca^{2+} resultou em padrões de bandas distintos em SDS-PAGE. É possível observar a presença de cinco bandas adicionais e com peso molecular maior na amostra incubada com CaCl_2 (Figura 20, coluna 3), enquanto na amostra apo e incubada com MgCl_2 exibiram padrões semelhantes (Figura 20, colunas 2 e 4), caracterizados por menos fragmentos visíveis.

Os padrões proteolíticos diferentes observados nesse experimento sugerem que ocorreu uma mudança conformacional em TcSTIM-EF-SAM induzida pela ligação com cálcio, que modifica a exposição dos sítios de clivagem da tripsina.

No gel nativo a migração da proteína no gel se deu de forma semelhante, tanto na forma apo, como incubada com CaCl_2 e MgCl_2 , exibindo duas bandas, uma mais evidente e outra mais sutil acima (Figura 21).

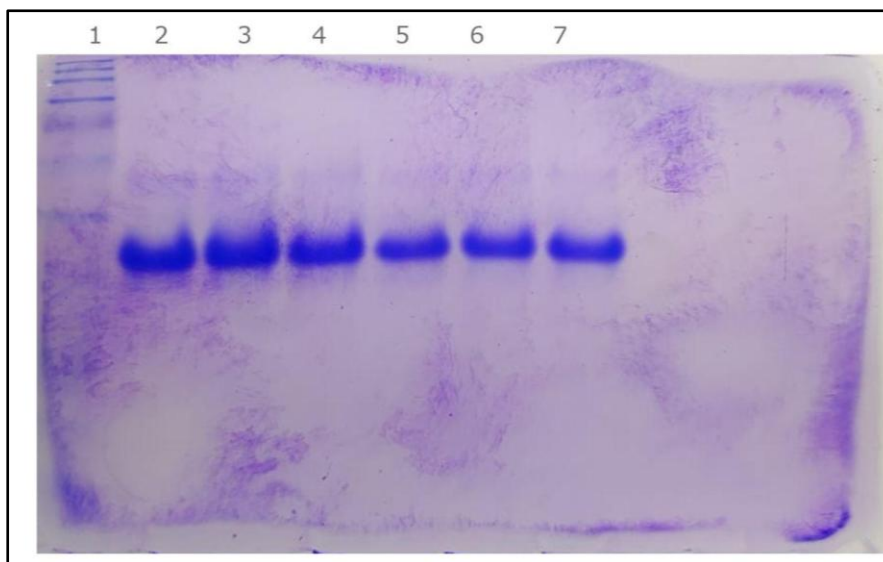


Figura 21: Resultado de deslocamento de TcSTIM-EF-SAM em gel nativo - SDS-PAGE 15%: 1 - Marcador; 2 - TcSTIM-EF-SAM na forma apo (60 μM em tampão B); 3 - TcSTIM-EF-SAM (60 μM em tampão B) com 5 mM de CaCl_2 ; 4 - TcSTIM-EF-SAM (60 μM em tampão B) com 5 mM de MgCl_2 ; 5 - TcSTIM-EF-SAM na forma apo (40 μM em tampão B); 6 - TcSTIM-EF-SAM (40 μM em tampão B) com 5 mM de CaCl_2 ; 7 - TcSTIM-EF-SAM (40 μM em tampão B) com 5 mM de MgCl_2 .

A migração da proteína, avaliada por eletroforese em gel nativo, não apresentou diferenças detectáveis entre as condições analisadas, indicando que a mudança conformacional provavelmente é sutil e não altera de forma significativa o padrão de migração.

Os resultados obtidos indicam que a ligação ao cálcio induz mudanças conformacionais na proteína TcSTIM-EF-SAM, porém sem comprometer sua organização global, preservando sua estrutura globular. Embora o CD no UV distante (Figura 17-B) não indiquem alteração significativa na estrutura secundária nas formas apo e holo, a maior estabilidade térmica (Figura 18 e 19) e a maior resistência à proteólise (Figura 20) sustentam que a ligação com Ca^{2+} promove um rearranjo estrutural em TcSTIM-EF-SAM.

5.7 TcSTIM forma *puncta* após depleção de cálcio e mudança de pH intracelular

Para análise da localização subcelular das proteínas componentes do canal CRAC de *T. castaneum*, TcSTIM foi expressa em células HEK 293. As células foram transfectadas com 350 ng do DNA plasmidial, EGFP-PCMV + TcSTIM. As imagens de microscopia foram geradas através de microscópio confocal. Após a transfecção, as células apresentaram a localização esperada da STIM no retículo endoplasmático, identificada pela fluorescência verde decorrente de sua fusão à EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Na Figura 22, observa-se o padrão de marcação característico de proteínas localizadas no retículo endoplasmático.

Os dados obtidos evidenciam uma boa expressão da proteína, sendo possível observar a expressão de forma evidente. Nesse experimento, as células não foram transfectadas com Orai, uma vez que o laser vermelho do microscópio, necessário para a detecção do fluoróforo fusionado à proteína Orai, não estava operacional.

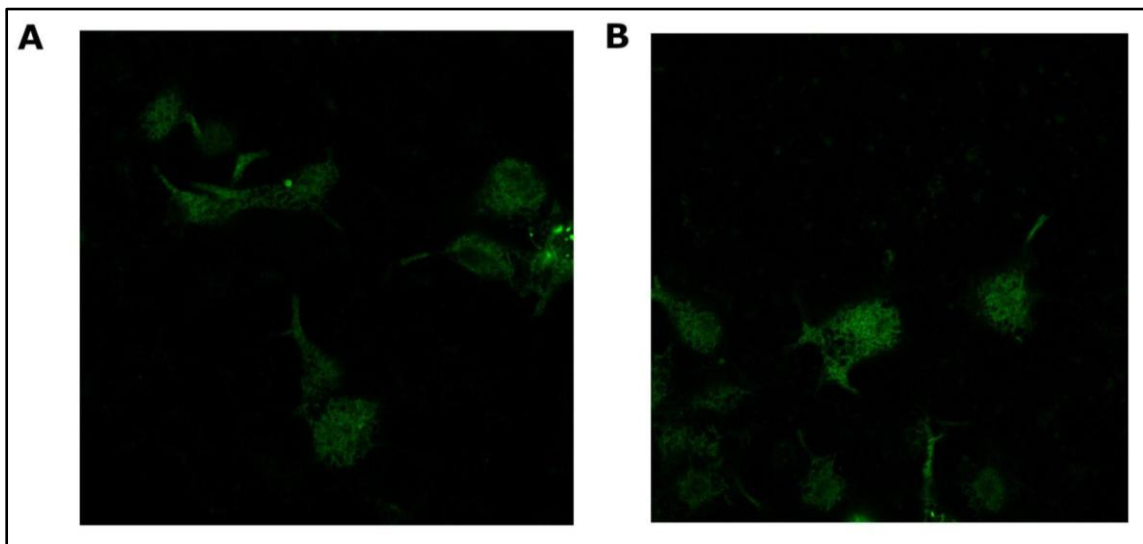


Figura 22 A - B: Imagens de microscopia confocal das células HEK293 transfectadas com EGFP-STIM.

Para identificar se o canal CRAC de *T. castaneum*, pode ser ativado em células de mamíferos mediante depleção de cálcio, as células foram incubadas com solução de 1 μM de Tapsigargina (TG). TG é um composto amplamente utilizado para induzir a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, por meio da inibição da bomba SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase), ativando mecanismos como a entrada de cálcio dependente de estoques (SOCE). Após 15 min de incubação, as células apresentaram a formação de *puncta* (Figura 23 A e B) um fenômeno característico da ativação da proteína STIM, que reflete a aproximação e o acoplamento funcional entre as membranas do retículo endoplasmático (RE) e da membrana plasmática (MP).

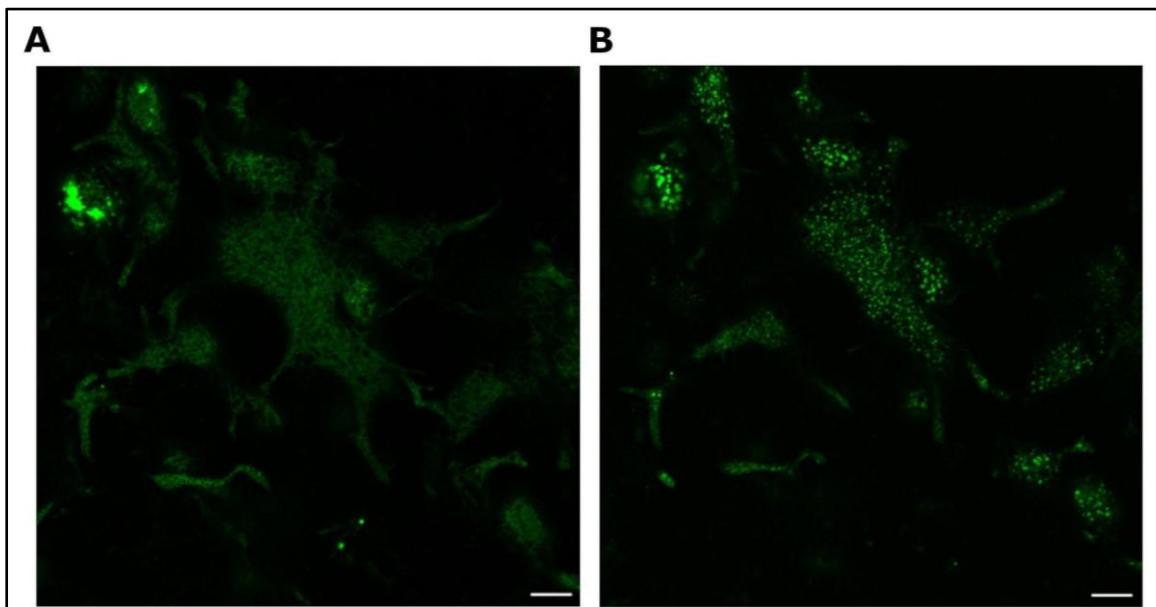


Figura 23: Imagens de microscopia confocal das células HEK293 transfetadas com EGFP-STIM: A - Antes de adicionar Tapsigargina; B - Após 15 min de 1 μ M Tapsigargina. Barra de escala: 10 μ m.

Os pontos concentrados apresentados após o estímulo das células com TG, representam a formação de puncta nessas células, desencadeada pela depleção de cálcio sinalizada por STIM. Observou-se que a STIM de *T. castaneum* é capaz de ser ativada após a detecção da depleção de cálcio no RE, e formar puncta independente de Orai, como observado para STIM humana (GUDLUR et al., 2018). Esses resultados revelam que a proteína é funcional e permite a ativação do canal CRAC de *T. castaneum* em células de mamíferos.

De forma independente foi realizado um experimento para verificar se a proteína STIM de *T. castaneum*, é capaz de atuar como um sensor de pH intracelular, do mesmo modo que a STIM humana, conforme descrito por Chen et al. (2024). Células transfetadas com TcSTIM foram incubadas com solução tampão de pH intracelular (pH 6), e foi possível observar a formação de *puncta* após 15 minutos (Figura 24).

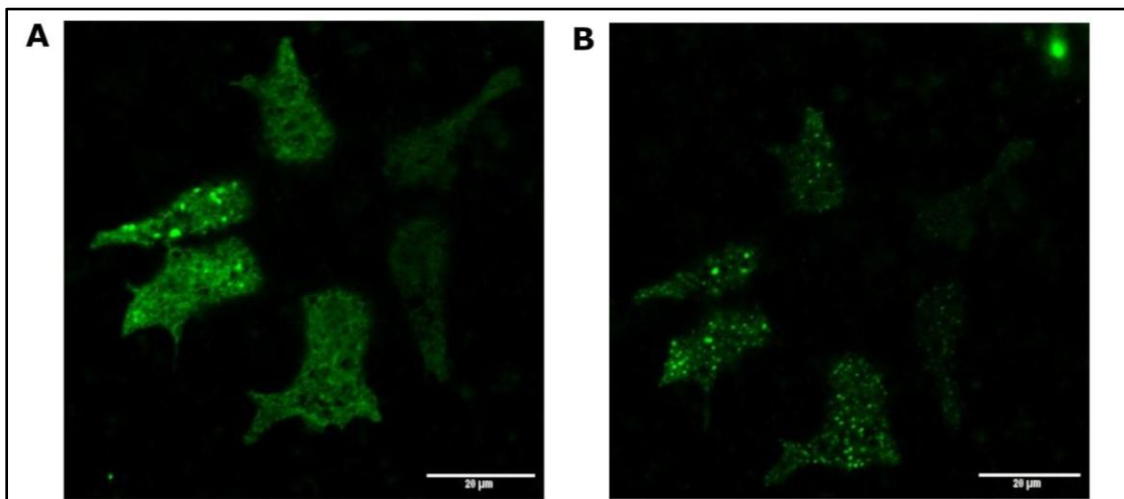


Figura 24: Imagens de microscopia confocal das células HEK293 transfectadas com EGFP-STIM: A - Antes de adicionar solução tampão (os pontos intensos observados são artefatos associados à superexpressão da proteína recombinante); B - Após 15 min incubadas com solução tampão pH 6.

5.8 O canal CRAC interfere no ciclo de vida do *T. Castaneum*

Foi realizado um silenciamento das proteínas componentes do canal CRAC, através de RNAi. TcSTIM foi especificamente alvo de um RNA de dupla fita (dsRNA) sintetizado por meio do kit HighYield T7 RNAi da Cellco. Para a síntese de ds-TcSTIM e ds-TcOrai, um molde de DNA foi gerado por meio de reação de PCR utilizando primers específico para os genes conforme listados na Tabela 2.

Nome	Primer Forward	Primer Reverse
ds-TcSTIM	TAATACGACTCACTATAGCGCACAAAGTCACCGGGC	CTTCAGCTCCCCCTCAGCGCTATAGTGAGTCGTATTA
ds-TcOrai	TAATACGACTCACTATAGCGAAGACACAACACTTCGGC	GCGAAAATCACAAATAACCATTCGCTATAGTGAGTCGTATTA

Tabela 2: Sequências de primers para síntese de ds-TcSTIM e ds-TcOrai.

Neste estudo serão apresentados os resultados obtidos no silenciamento somente da proteína TcSTIM, pois não houve tempo hábil para as repetições necessárias dos resultados de silenciamento de TcOrai.

As larvas foram injetadas com 207 nL de ds-TcSTIM (3,4 µg/µL) no lado dorsal do abdome entre o quarto e quinto segmento. O grupo controle foi injetado no mesmo local e com o mesmo volume.

As larvas injetadas foram mantidas em farinha de trigo e acompanhadas diariamente. Até o período de pupação não foram identificadas variações entre as larvas injetadas com ds-TcSTIM e o controle injetadas com água. Na Figura 25, observamos o resultado do silenciamento.

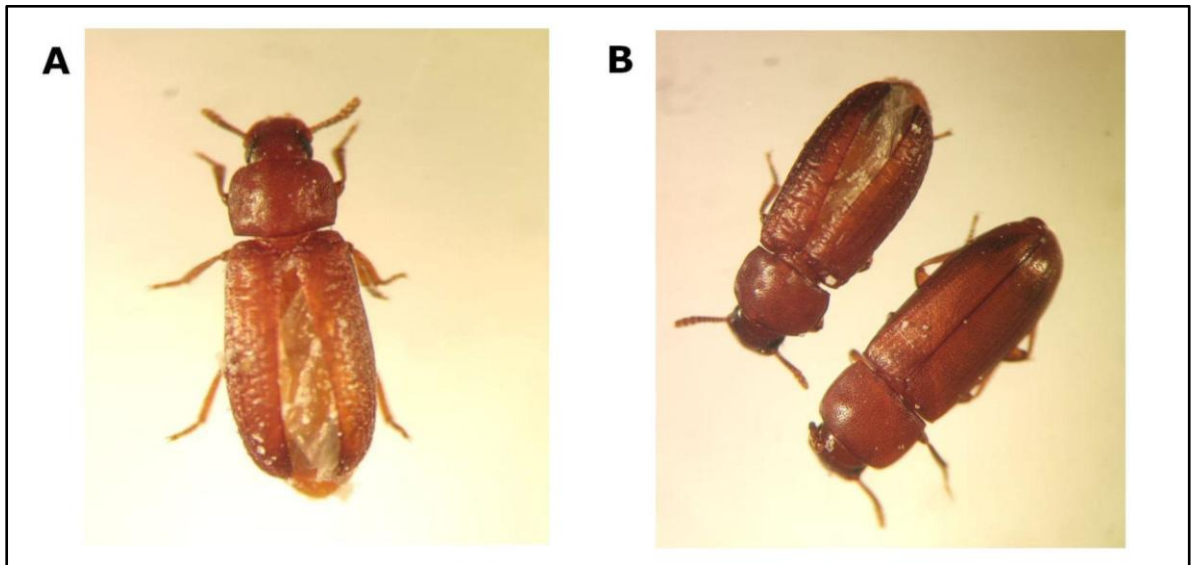


Figura 25: Resultado do silenciamento de TcSTIM, através de RNAi - Fotografia através de lupa microscópica. A - *Tribolium castaneum* apresentando fenótipo resultante do silenciamento de TcSTIM; B - A esquerda *Tribolium castaneum* silenciado, a direita inseto controle.

Logo após a eclosão dos insetos adultos, foram identificadas alterações na morfologia das asas e élitros do besouro *T. castaneum*. Alguns insetos apresentam a exposição de suas asas que não estavam compactadas e protegidas no interior dos élitros (Figura 26 A e B).

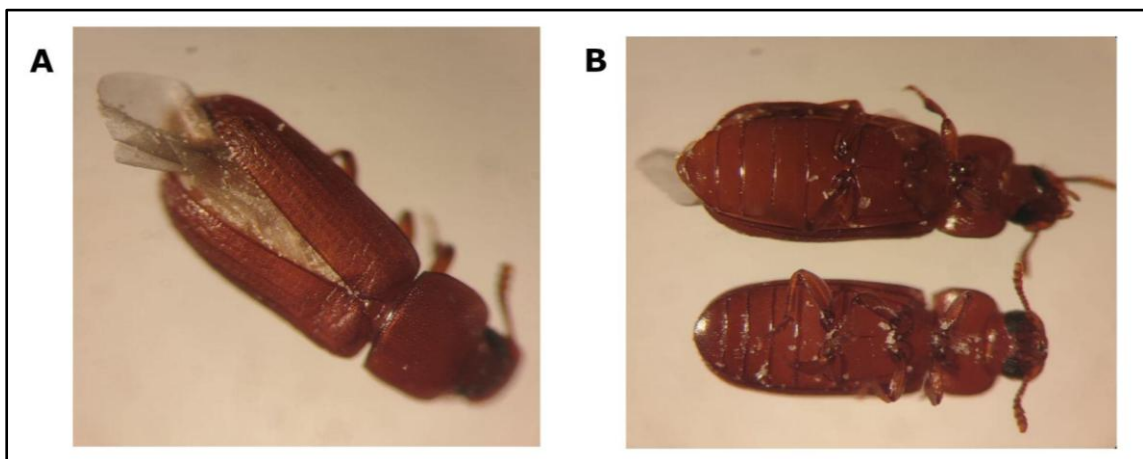


Figura 26: Resultado do silenciamento de TcSTIM, através de RNAi - Fotografia através de lupa microscópica. A - *Tribolium castaneum* apresentando fenótipo resultante do silenciamento de TcSTIM; B - Acima: inseto silenciado. Abaixo: inseto controle.

A Figura 27 (A e B) apresenta o resultado da dissecação dos élitros dos besouros, sendo possível observar variações na superfície da estrutura. Onde os

élitros dos animais silenciados exibem uma aparência rugosa, tamanho modificado e curvatura mais acentuada em comparação aos do inseto controle.

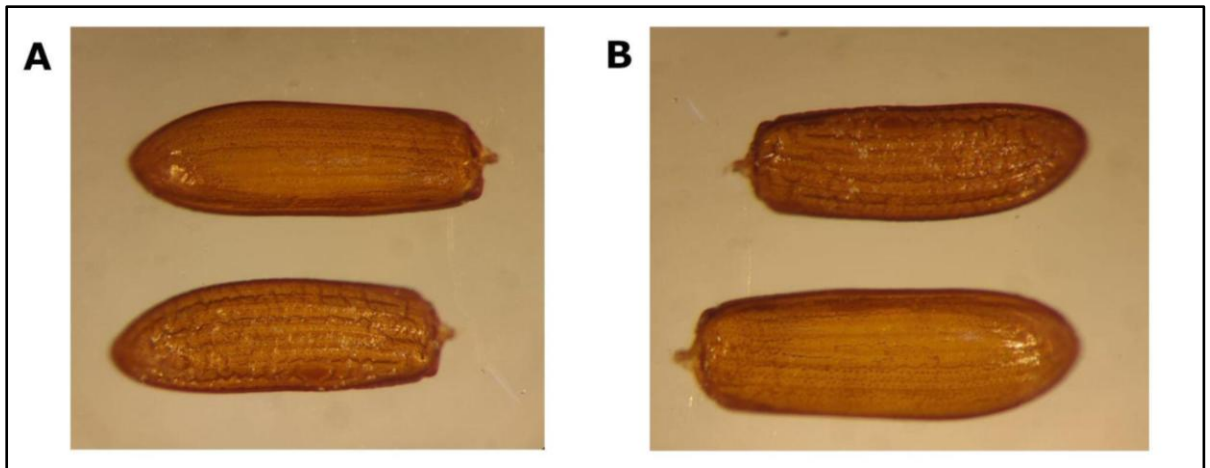


Figura 27: Resultado do silenciamento de TcSTIM, através de RNAi - Fotografia através de lupa microscópica. A - Acima: élitro de inseto controle. Abaixo: élitro de inseto silenciado; B - Acima: élitro de inseto silenciado. Abaixo: élitro de inseto controle.

Os resultados apresentados evidenciam que o silenciamento da proteína STIM de *T. castaneum*, gera alterações no desenvolvimento de asas e élitros de insetos adultos. Dessa forma, o silenciamento de TcSTIM sugere que o canal CRAC e suas proteínas associadas desempenham um papel fundamental na metamorfose desses insetos.

Os experimentos de silenciamento por RNAi foram realizados em parceria com a aluna de Iniciação Científica da UENF Nadine Lobo Siqueira.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo realizamos uma análise do canal de cálcio CRAC com foco na proteína STIM do inseto *T. castaneum*, ainda não caracterizado. Para compor essa análise foi feita uma caracterização biofísica de sua proteína STIM, identificação de sua localização subcelular e identificação de sua resposta mediante a depleção de cálcio e, por fim, verificamos se o canal CRAC contribui para o desenvolvimento desse inseto.

TcSTIM-EF-SAM atua como sensor de cálcio do canal CRAC

A função do canal de cálcio CRAC foi inicialmente caracterizada a partir da resposta celular à depleção dos estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (RE), antes mesmo da identificação de suas proteínas constituintes. Zweifach e Lewis (1993), com base em experimentos realizados em linfócitos T, demonstraram que o influxo de Ca^{2+} induzido pela diminuição dos estoques intracelulares era mediado por um canal iônico específico. Os autores propuseram que a ativação desse canal dependia de um sinal gerado no RE, capaz de se comunicar com a membrana plasmática; contudo, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo de sinalização e ativação ainda permaneciam desconhecidos.

Ross *et al.* (2005) identificaram STIM de *D. melanogaster* e o homólogo de mamíferos STIM1 como componentes essenciais da ativação do canal CRAC em células S2 de *Drosophila* e linfócitos T humanos. Indicando que STIM, apresenta um papel conservado na regulação do influxo de cálcio e na função do canal CRAC. Posteriormente, Zhang *et al.* (2005) descreveu a função da proteína STIM, ao atuar como o sensor de Ca^{2+} responsável pela ativação do canal CRAC. Com base em experimentos realizados, os autores demonstraram que STIM se localiza predominantemente na membrana do retículo endoplasmático, onde seu domínio EF-hand interage com íons Ca^{2+} . Após a depleção dos estoques de cálcio do RE, a STIM sofre redistribuição subcelular, acumulando-se em regiões próximas à membrana plasmática, o que promove a ativação do canal CRAC.

Esses, importantes achados contribuíram para a caracterização do papel funcional de STIM. Nossos resultados corroboram com esse cenário, ao

identificar que o domínio EF-SAM da proteína STIM do coleóptero modelo *T. castaneum*, interage com íons de cálcio com alta especificidade. Os experimentos de ITC, realizados, demonstraram que STIM possui sítios de ligação Ca^{2+} , que possuem alta especificidade a este íon, uma vez que não foi observado interação detectável com Mg^{2+} (Figuras 15 e 16). Foi possível detectar que a interação de TcSTIM-EF-SAM ocorre de maneira exotérmica, promovendo a liberação de calor, semelhante ao observado por Gudlur *et al.* (2018), para o domínio EF-SAM da STIM humana.

Em conjunto, os resultados obtidos demonstram que a proteína STIM de *T. castaneum* desempenha o papel de sensor de Ca^{2+} intracelular, de forma funcionalmente conservada em relação ao seu homólogo humano. A elevada especificidade do domínio EF-SAM pelo cálcio, aliada à ausência de interação detectável com Mg^{2+} e ao perfil exotérmico da ligação, sustenta a conservação do mecanismo de detecção de Ca^{2+} , reforçando a relevância de *T. castaneum* como modelo para o estudo da sinalização mediada por STIM.

O domínio EF-SAM de TcSTIM é solúvel e apresenta aumento de estabilidade e mudança conformacional na presença de Ca^{2+}

As duas principais proteínas que compõem o canal CRAC (STIM e Orai), são proteínas de membrana (ZHOU *et al.*, 2017), proteínas com essa característica se apresentam como peças fundamentais em muitos processos biológicos, incluindo adesão celular, transporte de RNA através da membrana nuclear e transporte de proteínas e íons através de membranas. Por possuírem uma alta relevância em diversas funções celulares, muitos fármacos são desenvolvidos de maneira que tenham como alvo proteínas de membrana (LIN; GUIDOTTI, 2009).

O primeiro passo a se realizar para o desenvolvimento de um fármaco que atinja uma proteína específica é a sua purificação, obtendo-se uma proteína com alto grau de pureza é possível realizar sua caracterização completa (LIN; GUIDOTTI, 2009). Estudos biofísicos e moleculares contribuem para a compreensão de propriedades detalhadas das proteínas, como a organização estrutural em níveis secundário e terciário, interações com ligantes, mudanças conformacionais e sua estabilidade (NEET; LEE, 2002).

Nesse contexto, iniciamos nossos estudos para caracterizar o canal CRAC de *T. castaneum*, com a expressão e purificação da sua proteína STIM, previamente clonada. Como se trata de uma proteína que apresenta uma região transmembrana, sua purificação apresentaria muitos desafios, pois como esse tipo de proteína fica inserida em uma bicamada lipídica, necessita-se então a adição de detergentes para se tornarem solúveis em sistemas aquosos (LIN; GUIDOTTI, 2009). Desta forma, optamos por trabalhar apenas com o domínio EF-SAM, da proteína, de forma similar a estudos anteriores que também utilizaram apenas esse domínio da STIM humana, conforme descrito por Stathopoulos *et al.* (2006).

Foi obtida uma proteína com elevado grau de pureza (Figura 14), permitindo a condução dos experimentos de caracterização biofísica. A proteína TcSTIM-EF-SAM é, segundo predições de sua sequência, uma proteína que possui predominantemente estrutura em α -hélice. Portanto, a estrutura secundária da proteína recombinante foi avaliada usando dicroísmo circular no ultravioleta distante. O espectro de TcSTIM-EF-SAM foi medido na presença e ausência de cálcio (Figura 12-B), nos dois ensaios os espectros resultantes foram típicos de proteínas com estrutura secundária rica em α -hélice, conforme esperado para proteínas com domínios EF-hand, com mínimos em 208 e 225 nm (WEI *et al.*, 2014).

Não foram observadas diferenças significativas no espectro de dicroísmo circular com a adição de Ca^{2+} . Esse resultado diverge do descrito por Stathopoulos *et al.* (2006), para o domínio EF-SAM da STIM de *H. sapiens*, no qual foi identificada uma variação expressiva entre os espectros apo e com Ca^{2+} , no qual a estrutura de STIM-EF-SAM na forma apo apresenta mínimos menos intensos e um deslocamento do pico de 208 nm para 204 nm, indicando perda de estrutura secundária. De modo semelhante, Furukawa *et al.* (2014) relataram uma diminuição do conteúdo helicoidal do domínio EF-SAM de STIM associada à redução da concentração de Ca^{2+} , analisando uma faixa de 0 a 1 mM, na qual o sinal de dicroísmo circular diminuía gradativamente em concentrações mais baixas do íon.

Entretanto, estudos mais recentes de Gudlur *et al.* (2018) sugerem que a purificação de somente o domínio EF-SAM de HsSTIM, poderia formar agregados decorrentes de uma proteína instável. Dessa forma, realizaram a

purificação da proteína, fusionada a uma proteína que promovesse estabilidade, uma chaperona de *Thermus thermophilus* (GrpE), essa proteína de fusão forma uma estrutura coiled-coil, semelhante a apresentada em STIM. Com essa construção, utilizada por Gudlur e seus colaboradores (2018), não foram identificadas grandes alterações no espectro de dicroísmo circular na ausência de cálcio, mantendo os mínimos característicos de α -hélice, semelhante aos resultados encontrados com STIM de *T. castaneum*. Esse comportamento é consistente com os resultados obtidos para a STIM de *T. castaneum*, que também não apresentou evidências de desorganização estrutural ou formação de agregados nessas condições. Além disso, outro fator importante é que as construções parciais de STIM-EF-SAM, descritas por Stathopoulos *et al.* (2006) e Furukawa *et al.* (2014), se apresentavam insolúveis quando expressas em bactérias e foram purificadas em condições desnaturantes. Diferente da construção solúvel EFSAM-GrpE de Gudlur *et al.* (2018) e nossa construção de TcSTIM-EF-SAM, ambas solúveis quando expressas em *E. coli*.

Também foi analisado se ocorrem alterações na estrutura secundária de TcSTIM-EF-SAM em decorrência do aumento de temperatura, com o objetivo de determinar sua estabilidade térmica. Através de espectro de dicroísmo circular, foi identificado que a proteína TcSTIM-EF-SAM começa a desnaturar a partir de 70 °C (Figura 19-A), onde ocorre a perda dos mínimos característicos da estrutura em hélice. Porém com a adição de cálcio, sua estabilidade térmica aumenta em 10 °C passando para 80 °C (Figura 19-B), evidenciando assim, que há um aumento da estabilidade térmica na presença do ligante. Além disso, a curva sigmóide observada no gráfico da Figura 18 sugere uma transição cooperativa entre as conformações enovelada e desenovelada, com um T_m de cerca de 58°C para a forma apo e 68 °C para a forma holo.

O aumento na estabilidade térmica de STIM-EF-SAM, também foi identificado na proteína de *H. sapiens*, por Stathopoulos *et al.* (2006), porém para a STIM de humano esse aumento de estabilidade é mais expressivo, sendo reportado o T_m de 19 °C para proteína na forma apo e 45 °C com cálcio.

O dicroísmo circular é uma estratégia amplamente utilizada para determinação da estrutura secundária e da estabilidade de proteínas (GREENFIELD, 2006). Por meio desta técnica, podem ser identificadas alterações estruturais induzidas por ligantes, e a perda do sinal de dicroísmo

circular em função do aumento de temperatura pode ser usada para fornecer estimativas quantitativas da estabilidade do estado enovelado da proteína nativa (KELLY *et al.*, 2005). Segundo Gifford *et al.* (2007), proteínas com domínios EF-hand adquirem maior compactação estrutural após a interação com cálcio, com estabilização de α -hélices e redução da flexibilidade.

Portanto, o aumento da estabilidade térmica de TcSTIM-EF-SAM na presença de Ca^{2+} pode ser atribuído à coordenação do íon pelo motivo EF-hand, que promove a estabilização das hélices α e o fortalecimento das interações intramoleculares, resultando em uma conformação mais compacta e termicamente estável. Conforme descrito para o domínio EF-SAM da STIM humana (GIFFORD *et al.*, 2007; STATHOPULOS *et al.*, 2006; GUDLUR *et al.*, 2018). Isso corrobora com o papel do domínio EF-SAM de STIM como um sensor funcional de cálcio do canal CRAC, cuja estabilidade conformacional depende diretamente da presença do íon.

Realizamos estudos direcionados para identificar se ocorre, além do aumento de estabilidade, mudança conformacional de TcSTIM-EF-SAM mediante a ligação com Ca^{2+} . De acordo com Gudlur e seus colaboradores (2018), o domínio EF-SAM e a proteína STIM humana de comprimento total, sofrem mudanças conformacionais em decorrência da interação com Ca^{2+} . Nossa análise demonstrou que o domínio EF-SAM de STIM de *T. castaneum* também sofre mudança conformacional mediante ligação com Ca^{2+} , semelhante ao reportado para a proteína humana (Figura 15). Essa característica foi identificada por meio de um experimento de digestão suave com tripsina, no qual através de eletroforese, podemos observar que a interação com Ca^{2+} promove uma alteração nos sítios expostos de clivagem da enzima, promovida pela mudança conformacional sofrida por TcSTIM-EF-SAM. Esses resultados são compatíveis aos apresentados por Stathopoulos *et al.* (2008), no qual é identificado duas conformações estruturais para o domínio EF-SAM da STIM humana, em que ao estar carregado com Ca^{2+} assume uma conformação “aberta” que se apresenta também ser mais estável, e sem Ca^{2+} assume uma conformação “fechada” mais instável e desestabilizada devido à exposição de grupos hidrofóbicos, apesar de não termos observado a estrutura desenovelada reportada para a forma apo.

Essas considerações são altamente relevantes, uma vez que a estabilidade estrutural das proteínas é fundamental para sua função biológica e, alterações estruturais em proteínas causadas pela ligação de ligantes são uma parte essencial do mecanismo de ação e da regulação da atividade biológica. (KELLY *et al.*, 2005).

TcSTIM é funcional e capaz de formar *puncta* mediante depleção de cálcio e mudança de pH

Para análise da localização subcelular da proteína STIM de *T. castaneum*, realizamos sua expressão em células de mamíferos da linhagem HEK293. A utilização dessa linhagem têm sido uma estratégia facilitadora em pesquisas biológicas, oferecendo diversas aplicações devido à sua capacidade de serem manipuladas geneticamente com certa facilidade e sua versatilidade como sistema modelo. Assim como em nosso trabalho, as células HEK293 já vem sendo amplamente utilizadas para expressão de proteínas formadoras de canais iônicos (sódio, potássio, cálcio) em pesquisas farmacológicas. Por ser uma linhagem útil como ferramenta de transfecção transitória, sendo altamente capazes de expressar receptores exógenos (THOMAS; SMART, 2005).

Após a transfecção das células com DNA plasmidial contendo a sequência de TcSTIM, imagens foram geradas por meio de microscopia confocal, no qual pudemos observar o sucesso na expressão de STIM de *T. castaneum*. A nossa proteína apresentou distribuição uniforme por toda a membrana do RE (Figura 17), assim como descrito por Sthatopulos *et al.* (2006).

Para avaliar a capacidade de TcSTIM em detectar a depleção de cálcio intracelular, os estoques de Ca^{2+} foram esvaziados mediante tratamento com (TG). Esse tratamento induz a ativação do canal CRAC, pois TG é um inibidor específico e irreversível da bomba SERCA, responsável pelo transporte de Ca^{2+} do citosol para o retículo endoplasmático. Dessa forma, com a inibição da SERCA, não ocorre o recarregamento dos estoques intracelulares de cálcio, levando à sua depleção progressiva no RE (FESKE *et al.*, 2006; PRAKRIYA; LEWIS, 2015).

Logo após a adição de TG as células permaneceram incubadas, e com 15 minutos já foi possível observar as formações de *puncta* na MP das células (Figura 18). Nosso resultado se apresenta semelhante a estudos anteriores com

a STIM humana, como os de Luik *et al.* (2006), Wang *et al.* (2010) e Gudlur *et al.* (2018), em que também foi observada a formação de *puncta* minutos após a indução ao esvaziamento de cálcio dos estoques. Diante desses resultados, podemos concluir que a proteína STIM de *T. castaneum* é funcional, sendo capaz de detectar a depleção de cálcio no RE, por meio de seu domínio EF-hand, e promover um rearranjo molecular na membrana do RE para se localizar em regiões de junções RE-MP, promovendo a formação de *puncta*, essa é uma das etapas iniciais para promover a ativação do canal CRAC e entrada de cálcio para dentro da célula. É importante ressaltar que, embora os experimentos tenham sido realizados na linhagem celular modelo HEK293, e não em células de insetos, que forneceriam um ambiente mais próximo ao contexto fisiológico das proteínas de insetos, a TcSTIM apresentou o comportamento esperado. Esse resultado indica que a proteína foi corretamente expressa e funcional nesse sistema heterólogo, evidenciando o sucesso da abordagem experimental adotada.

Descobertas recentes, apresentadas por Chen *et al.* (2024), propõem outro importante papel da proteína STIM, no mecanismo intracelular. Segundo os autores, a proteína STIM atua como um sensor de pH, sendo capaz de detectar variações na concentração de íons H⁺ que resultam em mudanças no pH intracelular. Desta maneira, mediante a alterações no pH STIM pode ser ativada e formar *puncta*, independente de alterações na concentração de cálcio. Utilizando diferentes abordagens experimentais, como microscopia confocal, FRET e mutagênese, foi demonstrado que alterações no pH intracelular induzem mudanças conformacionais na proteína STIM de *H. sapiens*, levando à ativação do canal CRAC (CHEN *et al.*, 2024).

Diante disso, testamos se TcSTIM também poderia atuar como sensor de pH intracelular, para isso as células transfectadas, foram incubadas com solução tampão pH 6,0 e após 15 minutos foi possível observar a formação de *puncta* induzida por STIM, em resposta ao pH mais ácido, conforme visualizado na Figura 24. Esse resultado apresenta a funcionalidade de STIM de *T. castaneum*, como sensor de pH intracelular.

Os resultados de Chen *et al.* (2024) sugerem que a capacidade de STIM atuar como sensor de prótons, decorre da presença de duas histidinas conservadas em sua estrutura (H355 e H407). Mutantes contendo a substituição

desses resíduos demonstraram que tais histidinas são fundamentais para a resposta de STIM às variações de pH intracelular. Observou-se que a mutação da histidina H355 produziu um efeito mais pronunciado quando comparada à mutação da H407.

Através do alinhamento das sequências de STIM, foi possível identificar que a histidina H355 encontra-se conservada, em *T. castaneum*, porém a H407 não apresenta conservação. Diante disso, pode-se sugerir que a resposta de TcSTIM às variações de pH intracelular seja mediada pela histidina conservada H355, conforme proposto por Chen *et al.* (2024). No entanto, não se pode excluir a participação de outras histidinas conservadas presentes em ortólogos de STIM, as quais também podem atuar no processo de sinalização de pH. A confirmação do papel funcional dessas histidinas exige a realização de estudos adicionais, como análises de mutagênese sítio-dirigida.

Outra constatação interessante é referente à capacidade dos resíduos de histidina em desempenhar um papel essencial em sensores de pH, devido ao seu valor de pKa ser próximo ao pH fisiológico. Dessa forma, em soluções dentro da faixa fisiológica de pH (6,8 - 7,4), a histidina pode alternar facilmente seus estados protonados e desprotonados (SHEN *et al.*, 2024). A STIM humana, altera sua conformação para ativa, mediante a alcalinização intracelular (pH 8 e 9), e em pH mais ácido que o fisiológico, permanece inativa, sem a formação de *puncta*. Dessa forma, as histidinas em seus estados desprotonados, promovem rearranjos conformacionais que favorecem a ativação da proteína (CHEN *et al.*, 2024). Curiosamente, a situação inversa foi observada para a proteína de *T. castaneum*, que assume sua conformação ativa mediante pH mais ácido que o fisiológico. Sendo assim, nossos dados sugerem que a protonação de resíduos de histidina, promove alterações nas interações eletrostáticas intramoleculares, desencadeando a ativação de TcSTIM.

O funcionamento do canal CRAC influencia na metamorfose de *T. castaneum*

Rastreamentos genéticos são poderosas ferramentas para identificar genes que participam de determinados processos biológicos, ou que sejam um elemento central no ciclo de vida de um organismo. A utilização da ferramenta

de RNAi possibilitou investigações mais específicas e para uma variedade de fenômenos biológicos (SCHMITT-ENGEL *et al.*, 2015).

A utilização do RNAi tem permitido a identificação eficiente e sensível de novas funções gênicas em diferentes processos biológicos e ao longo dos quatro estágios de desenvolvimento de *T. castaneum*. Esse inseto destaca-se como um modelo adequado para o uso dessa ferramenta, por apresentar uma resposta sistêmica robusta ao RNAi, característica que contribui significativamente para o sucesso da técnica na espécie. Os fenótipos de *knockdown* podem ser induzidos em todos os estágios do ciclo de vida por meio da injeção de dsRNA na cavidade corporal, com efeito disseminado por todo o organismo e, passível de transmissão à prole (SCHMITT-ENGEL *et al.*, 2015).

Nos nossos estudos realizamos o silenciamento da expressão gênica da proteína STIM de *T. castaneum*, com o objetivo de identificar possíveis mudanças fenotípicas nesse inseto após o interrompimento das funções exercidas por STIM e o canal CRAC em seu organismo. Foi selecionado o estágio larval tardio para a injeção de dsRNA, dessa forma poderíamos identificar qualquer alteração em seu desenvolvimento. Além disso, resultados de hibridização *in situ*, realizados em nosso grupo de pesquisa pela aluna Nadine Lobo Siqueira, mostraram expressão localizada de TcSTIM e Orai no abdome de larvas.

As larvas injetadas foram acompanhadas diariamente durante todo seu período larval, e não foram detectadas alterações significativas nos parâmetros fisiológicos, comportamentais ou na rotina do animal, em comparação ao grupo controle. Após o período de pupação e conclusão de seu processo de metamorfose, as pupas eclodiram em adultos e foi identificada a constituição de um fenótipo resultante de nossa intervenção (Figuras 19 e 20). O fenótipo apresentado se manifestou nas asas e élitros dos besouros adultos, no qual foi possível observar alteração na estrutura de superfície desses élitros (Figura 20), que demonstraram uma aparência enrugada. Observou-se que não era possível o acoplamento correto dos élitros junto às asas inferiores do inseto, de maneira que essa porção de seu exoesqueleto promovesse a proteção adequada às regiões internas que ficaram expostas (Figura 19). Sabe-se que a presença dos élitros, que são asas anteriores altamente modificadas e endurecidas, representa uma característica importante e que impulsionou a diversidade e

sucesso evolutivo dos besouros. Essa modificação a partir de seu exoesqueleto é uma combinação de muitos processos bioquímicos e regulação transcricional (como a regulação positiva da expressão de genes da cutícula), para tornar essa estrutura mais espessa, dura e pigmentada. A exoesqueletização dos élitros parece ter ocorrido por meio do reaproveitamento repetido de vias moleculares responsáveis pela formação do exoesqueleto, ativadas a partir de componentes conservados da rede gênica das asas (TOMOYASU *et al.*, 2008).

Estudos sugerem que a homeostase e sinalização de Ca^{2+} são componentes centrais nos mecanismos fisiológicos que regem a metamorfose em insetos holometabólicos, integrando processos hormonais (ecdysteroides e hormônio juvenil) com a remodelação tecidual durante a transição larva-pupa-adulto (DE LOOF; SCHOOF, 2019; DE LOOF *et al.*, 2014). Além de, relacionarem diretamente a sinalização de cálcio ao desenvolvimento de asas de *D. melanogaster* (BRODSKIY *et al.*, 2019) e de *Junonia orithya* (OHNO; OTAKI, 2025).

Dessa forma, podemos inferir que o funcionamento do canal de cálcio CRAC e de suas proteínas, em algum momento dos processos bioquímicos necessários para a metamorfose completa de besouros, se apresenta de forma imprescindível e indispensável.

Trabalhos anteriores dos autores Li *et al.* (2017) e Pathak *et al.* (2017) também descreveram a importância do canal CRAC, durante a metamorfose e desenvolvimento larval de insetos.

Os resultados obtidos por Li *et al.* (2017) demonstraram que a modulação da entrada de cálcio mediada pelo canal CRAC, por meio de interferência na expressão de Orai, exerce um papel crucial durante a metamorfose de *H. armigera*. Utilizando RNAi, os autores realizaram o silenciamento de Orai tanto em células HaEpi (linhagem epidérmica de *H. armigera*), quanto em larvas. Nos experimentos *in vivo*, a supressão da expressão de Orai resultou em atraso na pupação, redução da apoptose no intestino médio e manutenção desse tecido em um estado predominantemente autofágico, evidenciando a importância da sinalização de cálcio dependente do canal CRAC para a remodelação tecidual durante a metamorfose.

Outro estudo relevante abordando proteínas constituintes do canal CRAC foi o de Pathak e seus colaboradores (2017), que realizaram estudos de

silenciamento da proteína STIM em *D. melanogaster*, através da técnica de CRISPR-Cas. Foi demonstrado que a sinalização de cálcio mediada por STIM é essencial para a sobrevivência e função de neurônios dopaminérgicos durante o desenvolvimento larval de *D. melanogaster*. A ausência de dSTIM resultou em letalidade durante os estágios larvais e pupais, esses resultados evidenciam que a entrada de cálcio mediada pelo canal CRAC é um requisito crítico para o desenvolvimento larval e manutenção de circuitos neuronais dopaminérgicos em insetos.

Em conjunto, os dados apresentados neste trabalho fornecem evidências robustas de que o canal CRAC, particularmente a proteína STIM, desempenha um papel central no desenvolvimento da metamorfose de *T. castaneum*. Esses resultados ampliam o conhecimento existente e corroboram com achados anteriores que apontam a participação das proteínas desse canal no desenvolvimento metamórfico de insetos. Diante das evidências obtidas, o canal CRAC pode ser estabelecido como um potencial alvo molecular para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de controle de pragas agrícolas.

6. CONCLUSÕES

Esse estudo demonstrou que o canal de cálcio CRAC do *T. castaneum* é um canal funcional e um mecanismo de alta relevância para o desenvolvimento do seu ciclo de vida. Apresentando-se como um potencial alvo para o controle desses organismos.

Esse canal não tinha sido caracterizado antes, o que mantém inéditas as descobertas aqui apresentadas. Com base nos resultados, podemos constatar que as proteínas STIM e Orai, componentes do canal CRAC, apresentam alto grau de conservação de suas estruturas com proteínas homólogas.

Foi possível comprovar que a proteína STIM associada a esse canal exerce o papel de sensor intracelular tanto de cálcio quanto de pH, configurando-se como um elemento central na homeostase celular. O domínio EF-SAM é responsável pela afinidade da proteína por íons Ca^{2+} , e sua ligação ao cálcio estabelece um aumento na estabilidade térmica da proteína, além de desencadear um rearranjo estrutural que promove mudança conformacional, conduzindo a STIM de seu estado de repouso para o estado ativo, etapa inicial essencial para a ativação do canal CRAC.

Com base nos achados provenientes do silenciamento gênico realizado, comprovamos que o canal CRAC é indispensável para a conclusão do processo de metamorfose do besouro *T. castaneum*, exercendo um papel crucial no desenvolvimento de suas asas internas e élitros, essenciais para proteção mecânica de sua estrutura corporal. Esses achados ampliam o conhecimento sobre a regulação do canal CRAC em insetos e fornecem bases para investigações futuras acerca de sua conservação e relevância em diferentes organismos.

Estudos complementares ainda se fazem necessários para a consolidação da caracterização funcional do canal CRAC, como análises da presença do fluxo de cálcio estabelecido e, de maneira complementar, experimentos direcionados à proteína Orai e sua identificação subcelular.

Dessa forma, este trabalho contribui para o avanço do conhecimento na área e abre perspectivas para estudos futuros voltados à regulação fina da sinalização de cálcio e suas implicações fisiológicas em insetos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-LATIEF, Mohamed. A family of chemoreceptors in *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae: Coleoptera). *Arthropod Molecular Biology*, v. 16, n. 2, p. 197–209, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2007.00347.x.
- ADAMSKI, Zbigniew *et al.* Beetles as model organisms in physiological, biomedical and environmental studies – a review. *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 319, 2019.
- ANGELINI, David R.; KAUFMAN, Thomas C. Comparative developmental genetics and the evolution of arthropod body plans. *Annual Review of Genetics*, v. 39, p. 95–119, 2005. DOI: 10.1146/annurev.genet.39.073003.112310.
- ARNDT, C.; KORISTKA, S.; BARTSCH, H.; BACHMANN, M. Native polyacrylamide gels. *Methods in Molecular Biology*, v. 869, p. 49–53, 2012. DOI: 10.1007/978-1-61779-821-4_5.
- BARANIAK JR., James H. *et al.* The intricate coupling between STIM proteins and Orai channels. *Current Opinion in Physiology*, v. 17, p. 106–114, 2020.
- BAZ, El-Sayed; WEI, Hongying; GROSSHANS, Johannes; STENGL, Monika. Calcium responses of circadian pacemaker neurons of the cockroach *Rhyarobia maderae* to acetylcholine and histamine. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 196, n. 8, p. 623–634, 2013.
- BELLEN, Hugo J.; TONG, Chao; TSUDA, Hiroshi. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 11, n. 7, p. 514–522, 2010.
- BELLES, Xavier. *Development: Investigating the origin of insect metamorphosis*. *eLife*, v. 12, e94410, 21 dez. 2023. DOI: 10.7554/eLife.94410.
- BENSON, D. A. *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Research*, v. 37, supl. 1, p. D26–D31, 2009.
- BLUM, M. *et al.* InterPro in 2021: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D344–D354, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkaa977.
- BRESOLIN, Igor Tadeu Lazzarotto; MIRANDA, Everson Alves; BUENO, Sônia Maria Alves. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas. *Química Nova*, v. 32, n. 5, p. 1288–1296, 2009.

- BRODSKIY, Pavel A. *et al.* Decoding calcium signaling dynamics during *Drosophila* wing disc development. *Biophysical Journal*, [S. l.], v. 116, n. 4, p. 725–740, 19 fev. 2019. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.01.007
- BROWN, Susan J. *et al.* Studies of development and pest biology (*Coleoptera*): a model for *Tribolium castaneum*. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2009, art. emo126, 2009.
- CAI, Xinjiang. Molecular evolution and structural analysis of the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel subunit, Orai. *Journal of Molecular Biology*, v. 368, n. 5, p. 1284–1291, 2007. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.03.022.
- CAMPBELL, James F. *et al.* *Tribolium castaneum*: um inseto modelo para pesquisa fundamental e aplicada. *Annual Review of Entomology*, v. 67, n. 1, p. 347–365, 2022.
- CATTERALL, W. A. *et al.* Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, v. 57, p. 411–425, 2005.
- CHEN, Yilan *et al.* STIM1 functions as a proton sensor to coordinate cytosolic pH with store-operated calcium entry. *Journal of Biological Chemistry*, 2024. DOI: 10.1016/j.jbc.2024.107924.
- CLAPHAM, David E. Calcium signaling. *Cell*, v. 131, n. 6, p. 1047–1058, 2007.
- COLLINS, Helen E.; ZHANG, Dingguo; CHATHAM, John C. STIM and Orai mediated regulation of calcium signaling in age-related diseases. *Frontiers in Aging*, v. 3, p. 1–16, 2022. DOI: 10.3389/fragi.2022.876785.
- DE LOOF, Arnold; DE HAES, Wouter; JANSSEN, Tom; SCHOOF, Liliane. The essence of insect metamorphosis and aging: electrical rewiring of cells driven by the principles of juvenile hormone-dependent Ca²⁺-homeostasis. *General and Comparative Endocrinology*, Amsterdam, v. 199, p. 70–85, 2014.
- DE LOOF, Arnold; SCHOOF, Liliane. Calcitox-Metamorphosis in insects: The Calcium (Ca²⁺)-homeostasis system as the integrated primordial receptor system for both juvenile hormone and ecdysteroids. *Life: The Excitement of Biology*, v. 7, n. 2, p. 41, 2019. DOI: 10.9784/LEB7(2)DeLoof.01.
- EDGAR, Robert C. *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh340.

ENGEL, Philipp; MORAN, Nancy A. The gut microbiota of insects. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 5, p. 699–735, 2013. DOI: 10.1111/1574-6976.12025.

ENGSONTIA, Patamarek; SANDERSON, Alan P.; COBB, Matthew; WALDEN, Kimberly K. O.; ROBERTSON, Hugh M.; BROWN, Stephen. *The red flour beetle's large nose: an expanded odorant receptor gene family in Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n. 4, p. 387–397, 2008. DOI: 10.1016/j.ibmb.2007.10.005.

FESKE, S. *et al.* A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, v. 441, p. 179–185, 2006. DOI: 10.1038/nature04702.

FURUKAWA, Yukio; TERAGUCHI, Shunsuke; IKEGAMI, Takahisa; DAGLIYAN, Onur; JIN, Lin; HALL, Damien; DOKHOLYAN, Nikolay V.; NAMBA, Keiichi; AKIRA, Shizuo; KUROSAKI, Tomohiro; BABA, Yoshihiro; STANDLEY, Daron M. *Intrinsic disorder mediates cooperative signal transduction in STIM1*. *Journal of Molecular Biology*, Amsterdam, v. 426, n. 10, p. 2082–2097, 2014. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.03.006.

FIGUEIREDO, T. R.; AURICH, M. E. S.; MACHADO, A. T.; BASSO, L. G. M.; ZERAÍK, A. E.; *et al.* *Revisiting SmE16, a calcium-binding protein from Schistosoma mansoni with unknown functions*. *Biochimie*, [S. l.], 2025. DOI: 10.1016/j.biochi.2025.10.005.

FRENCH, C. M. *et al.* Global determinants of insect mitochondrial genetic diversity. *Nature Communications*, v. 14, art. 5276, 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-40936-0.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (org.). *The proteomics protocols handbook*. New York: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GIFFORD, Jessica L.; WALSH, Michael P.; VOGEL, Hans J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal*, v. 405, n. 2, p. 199–221, 2007. DOI: 10.1042/BJ20070255.

GILLES, A. F.; SCHINKO, J. B.; AVEROF, M. Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum*. *Development*, v. 142, n. 16, p. 2832–2839, 2015. DOI: 10.1242/dev.125054.

GREENFIELD, Norma J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006. DOI: 10.1038/nprot.2006.202.

GROLLEAU, Françoise *et al.* Nicotine increases intracellular Ca²⁺ and regulates electrical activity in insect neurosecretory cells. *Neuroscience Letters*, v. 220, n. 2, p. 142–146, 1996. DOI: 10.1016/S0304-3940(96)13243-2.

GUDLUR, A. *et al.* Calcium sensing by the STIM1 ER-luminal domain. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 4536, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-06816-8.

HALLGREN, Jeppe *et al.* DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *bioRxiv*, 2022. DOI: 10.1101/2022.04.08.487609.

HENNIG, Willi. Die Stammesgeschichte der Insekten. Frankfurt am Main: Waldemar Kramer, 1969.

HERNDON, Nicolae *et al.* Enhanced genome assembly and a new official gene set for *Tribolium castaneum*. *iScience*, v. 23, n. 1, art. 100840, 2020. DOI: 10.1016/j.isci.2019.100840.

HOCHULI, E.; DÖBELI, H.; SCHACHER, A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography A*, v. 411, p. 177–184, 1987.

HORN, Thorsten; NAROV, Kalin D.; PANFILIO, Kristen A. Persistent parental RNAi in the beetle *Tribolium castaneum*. *Advanced Genetics*, v. 3, art. 2100064, 2022. DOI: 10.1002/ggn2.202100064.

HOTALING, Scott; SPROUL, John S.; HECKENHAUER, Jacqueline; POWELL, Ashlyn; LARRACUENTE, Amanda M.; PAULS, Steffen U.; KELLEY, Joanna L.; FRANDSEN, Paul B. Long reads are revolutionizing 20 years of insect genome sequencing. *Genome Biology and Evolution*, v. 13, n. 8, p. evab138, 2021. DOI: 10.1093/gbe/evab138

HOU, Xiaowei *et al.* Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science*, v. 338, n. 6112, p. 1308–1313, 2012. DOI: 10.1126/science.1228757.

JOHNSON, Kevin P. Putting the genome in insect phylogenomics. *Current Opinion in Insect Science*, v. 36, p. 111–117, 2019. DOI: 10.1016/j.cois.2019.08.002.

JUMPER, John *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, v. 596, p. 583–589, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.

KELLY, Sharon M.; JESS, Thomas J.; PRICE, Nicholas C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.

KJER, K. M. Aligned 18S and insect phylogeny. *Systematic Biology*, v. 53, n. 3, p. 506–514, 2004. DOI: 10.1080/10635150490445922.

KLINGLER, Martin; BUCHER, Gregor. The red flour beetle *Tribolium castaneum*. *EvoDevo*, v. 13, n. 1, p. 14, 2022.

KOMIYAMA, Tomoko *et al.* Circular dichroism study on thermal denaturation of a dimeric globular protein. *Journal of Biochemistry*, v. 95, n. 6, p. 1569–1575, 1984.

KRETSINGER, R. H.; NOCKOLDS, C. E. Carp muscle calcium-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 248, p. 3313–3326, 1973.

KROGH, A. *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model. *Journal of Molecular Biology*, v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315.

LAHM, George P. *et al.* Insecticidal anthranilic diamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 22, p. 4898–4906, 2005. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.08.034.

LEE, A.; FAKLER, B.; KACZMAREK, L. K.; ISOM, L. L. More than a pore: ion channel signaling complexes. *Journal of Neuroscience*, v. 34, n. 46, p. 15159–15169, 2014.

LEE, Alison K. *et al.* Developmental coupling of larval and adult stages in *Tribolium castaneum*. *EvoDevo*, v. 4, p. 1–17, 2013.

LI, Yong-Bo; PEI, Xu-Yang; WANG, Di; CHEN, Cai-Hua; CAI, Mei-Juan; WANG, Jin-Xing; ZHAO, Xiao-Fan. *The steroid hormone 20-hydroxyecdysone upregulates calcium release-activated calcium channel modulator 1 expression to induce apoptosis in the midgut of Helicoverpa armigera*. *Cell Calcium*, v. 68, p. 24-33, 2017. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.10.004.

LIN, Sue-Hwa; GUIDOTTI, Guido. Purification of membrane proteins. In: *Methods in Enzymology*. San Diego: Elsevier, 2009. v. 463, p. 619–629. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63035-4.

LINZ, David M. *et al.* Larval RNA interference in *Tribolium castaneum*. *Journal of Visualized Experiments*, n. 93, e52059, 2014. DOI: 10.3791/52059.

LORINI, I. *et al.* Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas. Brasília: Embrapa, 2015.

LUIK, R. M. *et al.* Local activation of CRAC channels by STIM1. *The Journal of Cell Biology*, v. 174, n. 6, p. 815–825, 2006. DOI: 10.1083/jcb.200604015.

MILES, Andrew J.; WALLACE, B. A. *CDtoolX, a downloadable software package for processing and analyses of circular dichroism spectroscopic data*. *Protein Science*, v. 27, n. 9, p. 1717–1722, 2018. DOI: 10.1002/pro.3474

MYLONAKIS, Eleftherios; PODSIADLOWSKI, Lars; MUHAMMED, Maged; VILCINSKAS, Andreas. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 371, n. 1695, p. 20150290, 26 maio 2016. DOI: 10.1098/rstb.2015.0290

NEET, Kenneth E.; LEE, J. Ching. Biophysical characterization of proteins in the post-genomic era of proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 1, n. 7, p. 401–409, 2002. DOI: 10.1074/mcp.r200003-mcp200.

NOH, Mi Young; MUTHUKRISHNAN, Subbaratnam; KRAMER, Karl J.; ARAKANE, Yasuyuki. Cuticle formation and pigmentation in beetles. *Current Opinion in Insect Science*, v. 17, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1016/j.cois.2016.05.004.

NWOKONKO, Robert M. The STIM–Orai pathway: conformational coupling between STIM and Orai in the activation of store-operated Ca^{2+} entry. *Journal of Cell Science*, v. 129, p. 4081–4090, 2016.

OHNISHI, Atsushi *et al.* Hormone signaling linked to silkworm sex pheromone biosynthesis involves Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 27, p. 24101–24112, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M111.250555.

OHNO, Yoshikazu; OTAKI, Joji M. *Spontaneous long-range calcium waves in developing butterfly wings*. *BMC Developmental Biology*, v. 15, art. 17, 2015. DOI: 10.1186/s12861-015-0067-8.

PALTY, Raz; ISACOFF, Ehud Y. Cooperative binding of stromal interaction molecule 1 (STIM1) to the N and C termini of calcium release-activated calcium modulator 1 (Orai1). *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 290, n. 51, p. 30888–30896, 2015. PMID: 26546674. PMCID: PMC4697168.

PARK, Chan Young *et al.* STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Science*, v. 325, n. 5948, p. 176–179, 2009.

PARK, Yune-Jung; YOO, Seung-Ah; KIM, Mingyo; KIM, Wan-Uk. *The role of calcium–calcineurin–NFAT signaling pathway in health and autoimmune diseases*. *Frontiers in Immunology*, v. 11, art. 195, 10 mar. 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00195

PATHAK, Trayambak; TRIVEDI, Deepti; HASAN, Gaiti. CRISPR-Cas-induced mutants identify a requirement for dSTIM in larval dopaminergic cells of *Drosophila melanogaster*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 7, n. 3, p. 923–933, 2017. DOI: 10.1534/g3.116.038539.

PERKIN, Lindsey C.; OPPERT, Brenda. Gene expression in life stages of *Tribolium castaneum*. *PeerJ*, v. 7, e6946, 2019.

PITTI CABALLERO, Javier; MURILLO, Laurence; LIST, Olivier; BASTIAT, Guillaume; FLOCHLAY-SIGOGNAULT, Annie; GUERINO, Frank; LEFRANÇOIS, Corinne; LOUTRAM, Nolwenn; LAPIED, Bruno; APAIRE-MARCHAIS, Véronique. *Nanoencapsulated deltamethrin as synergistic agent potentiates insecticide effect of indoxacarb through an unusual neuronal calcium-dependent mechanism*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 158, p. 1-10, 2019. DOI: 10.1016/j.pestbp.2019.03.014.

PORATH, J.; FLODIN, P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, v. 183, p. 1657–1659, 1959.

POSNIEN, Nico *et al.* RNAi in the red flour beetle (*Tribolium*). *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2009, n. 8, p. pdb.prot5256, 2009.

PRAKRIYA, Murali; LEWIS, Richard S. Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, v. 95, n. 4, p. 1383–1436, 2015. DOI: 10.1152/physrev.00020.2014.

ROOS, Jack *et al.* STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *The Journal of Cell Biology*, v. 169, n. 3, p. 435–445, 2005. DOI: 10.1083/jcb.200502019.

ROSS, Andrew. Insect evolution: the origin of wings. *Current Biology*, v. 27, n. 3, p. R113–R115, 2017. DOI: 10.1016/j.cub.2016.12.014.

RYLEE, J. C. *et al.* Generating and testing the efficacy of transgenic Cas9 in *Tribolium castaneum*. *Insect Molecular Biology*, v. 31, n. 4, e12778, 2022. DOI: 10.1111/imb.12778.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine–SDS–PAGE for the separation of proteins. *Analytical Biochemistry*, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.

SCHMITT-ENGEL, Christian *et al.* The iBeetle large-scale RNAi screen reveals gene functions for insect development and physiology. *Nature Communications*, v. 6, art. 7822, 2015. DOI: 10.1038/ncomms8822.

SHEN, Mingzhe *et al.* Interior pH-sensing residue of human voltage-gated proton channel Hv1. *Biophysical Journal*, v. 123, n. 24, p. 4211–4220, 2024. DOI: 10.1016/j.bpj.2024.07.027.

SHUKLA, Jayendra Nath; PALLI, Subba Reddy. Sex determination in beetles via parental RNAi. *Scientific Reports*, v. 2, art. 602, 2012.

SOBOLOFF, Jonathan *et al.* STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 9, p. 549–565, 2012.

STATHOPULOS, Peter B. *et al.* Stored Ca^{2+} depletion-induced oligomerization of STIM1 via the EF-SAM region. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 47, p. 35855–35862, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M608247200.

STATHOPULOS, Peter B. *et al.* Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of SOCE. *Cell*, v. 135, n. 1, p. 110–122, 2008. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.006.

THANY, Steeve H. Neonicotinoids and intracellular calcium mechanisms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 213, art. 106532, 2025. DOI: 10.1016/j.pestbp.2025.106532.

THOMAS, P.; SMART, T. G. HEK293 cell line: a vehicle for expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 51, n. 3, p. 187–200, 2005.

TIHELKA, E. *et al.* The evolution of insect biodiversity. *Current Biology*, v. 31, n. 19, p. R1299–R1311, 2021. DOI: 10.1016/j.cub.2021.08.057.

TIFFNER, Adéla; DERLER, Isabella. *Molecular choreography and structure of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) and $KCa2^{+}$ channels and their relevance in disease with special focus on cancer. Membranes*, Basel, v. 10, n. 12, art. 425, p. 1–?, 15 dez. 2020. DOI: 10.3390/membranes10120425.

TOMOYASU, Yoshinori *et al.* Exploring systemic RNA interference in insects. *Genome Biology*, v. 9, art. R10, 2008. DOI: 10.1186/gb-2008-9-1-r10.

TRUMAN, James W. The evolution of insect metamorphosis. *Current Biology*, v. 29, n. 23, p. R1252–R1268, 2019. DOI: 10.1016/j.cub.2019.10.009.

TRUMAN, J. W.; RIDDIFORD, L. M. The evolution of insect metamorphosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 374, n. 1783, p. 20190070, 2019. DOI: 10.1098/rstb.2019.0070.

WANG, Youjun; DENG, Xue; GILL, Donald L. *Calcium signaling by STIM and Orai: intimate coupling details revealed. Science Signaling*, v. 3, n. 130, p. pe42, 2010. DOI: 10.1126/scisignal.1191086.

WATERHOUSE, A. M. *et al.* Jalview version 2. *Bioinformatics*, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp033.

WIENS, John J.; LAPOINT, Richard T.; WHITEMAN, Noah K. *Herbivory increases diversification across insect clades. Nature Communications*, v. 6, art. 8370, 24 set. 2015. DOI: 10.1038/ncomms9370.

WALSKI, Tomasz; *et al.* *Protein N-glycosylation and N-glycan trimming are required for postembryonic development of the pest beetle Tribolium castaneum. Scientific Reports*, v. 6, art. 35151, 2016. DOI: 10.1038/srep35151

WEI, Yang; THYPARAMBIL, Aby A.; LATOUR, Robert A. *Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm. Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, v. 1844, n. 12, p. 2331–2337, 2014. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.10.001.

WHEELER, David L.; CHURCH, Deanna M.; FEDERHEN, Scott; LASH, Alex E.; MADDEN, Thomas L.; PONTIUS, Joan U.; SCHULER, Gregory D.; SCHRIML, Lynn M.; SEQUEIRA, Edwin; TATUSOVA, Tatiana A.; WAGNER, Lukas. *Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 1, p. 28–33, 2003. DOI: 10.1093/nar/gkg033

WHITING, M. F. *et al.* The Strepsiptera problem. *Systematic Biology*, v. 46, p. 1–68, 1997.

YE, WenTao *et al.* Chlorantraniliprole induces autophagy via calcium disruption. *Insect Molecular Biology*, v. 32, n. 1, p. 36–45, 2023. DOI: 10.1111/imb.12811.

ZHANG, Shenyuan L. *et al.* STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels. *Nature*, v. 437, n. 7060, p. 902–905, 2005. DOI: 10.1038/nature04147.

ZHENG, Hongying; ZHOU, Meng-Hua; HU, Changlong; KUO, Enoch; PENG, Xu; HU, Junjie; KUO, Lih; ZHANG, Shenyuan L. Differential roles of the C and N termini of Orai1 protein in interacting with stromal interaction molecule 1 (STIM1) for Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channel activation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 16, p. 11263–11272, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.450254.

ZHOU, Yandong *et al.* The STIM–Orai coupling interface. *Cell Calcium*, v. 63, p. 8–13, 2017. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.01.001.

ZOHRY, Noha M.; EL-SAYED, Wafaa A. *Morphology, histology, and chemistry of the wings of Tribolium castaneum and Tribolium confusum. The Journal of Basic and Applied Zoology*, v. 80, art. 16, 2019. DOI: 10.1186/s41936-019-0082-6

ZWEIFACH, Adam; LEWIS, Richard S. Mitogen-regulated Ca²⁺ current activated by store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 14, p. 6295–6299, 1993.