

ESTUDO DA ATIVIDADE RIBONUCLEASE ENDÓGENA E DA
EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE RNA DE INTERFERÊNCIA DE
Rhodnius prolixus

MAGDA DELORENCE LUGON

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
ABRIL/2013

ESTUDO DA ATIVIDADE RIBONUCLEASE ENDÓGENA E DA
EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE RNA DE INTERFERÊNCIA DE
Rhodnius prolixus

MAGDA DELORENCE LUGON

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos - LQFPP, no Centro de Biociências e Biotecnologia - CBB.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
ABRIL/2013

ESTUDO DA ATIVIDADE RIBONUCLEASE ENDÓGENA E DA
EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DE RNA DE INTERFERÊNCIA DE
Rhodnius prolixus

MAGDA DELORENCE LUGON

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

Aprovada em 19 de abril de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha – LBCT/CBB/UENF

Prof^a. Dr^a Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso – IQ/UFRJ

Prof. Dr. Claudio Akio Masuda – IBQM/UFRJ

Prof^a. Dr^a Marilvia Dansa de Alencar Petretski – LQFPP/CBB/UENF
(Orientadora)

“Dedico esta dissertação a Deus, aos meus pais Genaro e Mariza, ao meu irmão Rafael e ao meu namorado Diogo.”

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.”

(O Encontro Marcado - Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre comigo e por todas as graças que Ele me concede.

Aos meus pais, Rafael Genaro Lugon e Mariza Delorence Lugon, por todo o amor, pelo apoio, incentivo e pela confiança em mim depositada.

Ao meu irmão Rafael Delorence Lugon, pelo carinho e incentivo.

Aos meus avós, tios e primos que sempre torceram por mim.

Ao meu namorado Diogo Zanon Barroso pelo amor e companheirismo. Obrigada por ser meu ombro amigo nas horas de desespero.

À minha professora e orientadora Dr^a Marilvia Dansa, pelos ensinamentos, pela amizade e confiança. Muito obrigada pelo crescimento profissional e pessoal que me proporciona.

Aos amigos do SEBIN - LQFPP: Lígia Souza, Lívia Ferreira, Raynan Aguilár, Rosana Lelis, Gabriela Galegario, Diana Rangel e Edgar Gutierrez pela amizade, pela ajuda sempre que precisei e por todos os momentos descontraídos na rotina de laboratório nos dois anos de mestrado.

A todos os amigos do LQFPP que me deram suporte, me emprestaram reagentes, me tiraram dúvidas. Agradeço em especial à Elane Ribeiro, Marcelle Viana, Nádia Casarin, Ariane Fabres, Leonardo de Sá, Eloá Lessa, Nathália Bastos, Lucilene Ollivier, Gustavo Lemos e Keysson Fernandes.

Às professoras Dr^a Antônia Elenir Amancio, Dr^a Kátia Valevski e Dr^a Olga Machado, pela utilização de equipamentos em seus respectivos laboratórios.

Aos técnicos do LQFPP: Cristóvão, Izabela Sampaio e Sheila Silva Santos.

Aos amigos da UEA: Mariana Fernandes, Bárbara Pitta, Evenilton Pessoa, Elisabete Salles, Newton Ruiz, Camila Waltero, Leonardo Abreu, ao professor Dr. Carlos Logullo e todos aqueles que me receberam de braços abertos, sempre dispostos a me ajudar, especialmente quando precisei usar o termociclador para PCR quantitativa.

Ao professor Dr. Ricardo Araújo Nascimento pelas sugestões e pela colaboração com o trabalho.

À professora Dr^a Glória Braz e sua aluna Raquel Logullo, pelos ensinamentos sobre Bioinformática e suporte na busca pelos genes no genoma de *Rhodnius prolixus*.

À professora Dr^a Gabriela Oliveira e Silva e sua aluna MSc. Ana Beatriz Nuno, pela valiosa ajuda na construção das duplas fitas.

À MSc. Michele Alves pelas sugestões para a dissertação.

À Dr^a Flávia Mury pela amizade e pelos ensinamentos. Obrigada por estar sempre disposta a me ajudar.

À MSc. Flávia Thiebaut pela amizade, conselhos e dicas.

A todos os amigos, em especial Bruna Pintor, Cynara Pedrosa, Geovanna Zago, Juliana Bernardes e Valéria Romano. Obrigada pela amizade e pelo apoio.

Agradeço à professora Dr^a Marília Amorim Berbert de Molina pela revisão dessa dissertação.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense e ao Programa de Pós-Graduação Biociências e Biotecnologia pela oportunidade.

À CAPES e ao INCT-EM pelo financiamento deste trabalho.

A todos que não foram mencionados, mas que contribuíram para essa conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 – RNA de interferência.....	1
1.2 – Proteínas envolvidas em RNAi.....	5
1.2.1 – Família RNase III	5
1.2.2 – Argonautas	7
1.2.3 – Outras proteínas	8
1.3 – RNAi em insetos	9
1.4 – O inseto <i>Rhodnius prolixus</i>	10
1.5 – <i>Rhodnius prolixus</i> e RNAi	12
2- JUSTIFICATIVA	14
3- OBJETIVOS.....	15
3.1- Objetivo principal	15
3.2- Objetivos específicos	15
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 – Identificação de genes <i>in silico</i> e análise das sequências gênicas e protéicas	16
4.2 – Manutenção da colônia de <i>R. prolixus</i>	16
4.3 – Extração de RNA e remoção da contaminação por DNA genômico	17
4.4 – Síntese da primeira fita de DNA complementar	17
4.5 – Desenho dos Iniciadores.....	17
4.6 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)	18
4.7 – Síntese de dsRNAs.....	18
4.8 – Injeção de dsRNAs	20
4.9 – Expressão relativa dos genes determinada por PCR quantitativa	20

4.10 – Detecção de dsRNAs após ensaio <i>in vitro</i> com proteínas solúveis de corpo gorduroso, intestino médio e ovário	21
4.11 – Detecção de dsRNAs após ensaio <i>ex vivo</i> com hemolinfa	21
5- RESULTADOS	22
5.1- Identificação e análise das sequências gênicas e protéicas da via de RNAi ..	22
5.2- Expressão dos genes em diferentes órgãos de <i>R. prolixus</i>	30
5.3- Expressão dos genes em diferentes órgãos de <i>R. prolixus</i> em resposta à alimentação sanguínea	31
5.4- Expressão dos genes em diferentes órgãos de <i>R. prolixus</i> em resposta à injeção de dsRNA não relacionada (dsMAL)	35
5.4.1- Expressão dos genes em resposta à injeção de diferentes concentrações de dsMAL.....	35
5.4.2- Expressão dos genes em diferentes tempos após a injeção de dsMAL...	39
5.5- Detecção de dsRNAs nos tecidos de <i>R. prolixus</i>	43
5.5.1- Detecção de dsRNAs após ensaio <i>in vitro</i> com proteínas solúveis de corpo gorduroso, intestino médio e ovário	43
5.5.2- Detecção de dsRNAs após ensaio <i>ex vivo</i> com hemolinfa.....	45
6- DISCUSSÃO	47
6.1 - Identificação de genes das vias de RNAi.....	47
6.2 - Resposta à dsRNAs exógenas na expressão gênica	50
6.3 - Resposta à alimentação sanguínea.....	54
6.4 - Resposta tecidual à presença de dsRNAs exógenas	54
7 – CONCLUSÕES	56
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9- ANEXOS	68
Anexo 1	68
Anexo 2.....	71
Anexo 5.....	77
Anexo 6.....	79
Anexo 7.....	81
Anexo 8.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de RNA de interferência.....	3
Figura 2: Descrição da via de RNAi mediada por microRNAs.....	4
Figura 3: O funcionamento de Dicer.....	6
Figura 4: Os domínios presentes em argonautas de eucariontes.	7
Figura 5: Ciclo de vida de <i>R. prolixus</i>	11
Figura 6: Caracterização de Dicer 1 de <i>R. prolixus</i> (RPDcr1).	24
Figura 7: Caracterização de Dicer 2 de <i>R. prolixus</i> (RPDcr2).	25
Figura 8: Caracterização de Drosha de <i>R. prolixus</i> (RPdrosha).....	26
Figura 9: Sequências de 4 argonautas de <i>R. prolixus</i>	27
Figura 10: Perfil dos domínios presentes nas sequências das 4 argonautas de <i>R. prolixus</i>	28
Figura 11: Árvore filogenética de argonauta 1 de <i>R. prolixus</i> (RPago1).	28
Figura 12: Árvore filogenética de argonauta 2A de <i>R. prolixus</i> (RPago2A).....	29
Figura 13: Árvore filogenética de argonauta 2B de <i>R. prolixus</i> (RPago2B).....	29
Figura 14: Árvore filogenética de argonauta 3 de <i>R. prolixus</i> (RPago3).	29
Figura 15: Expressão de <i>dicer 1</i> (<i>dcr1</i>), <i>dicer 2</i> (<i>dcr2</i>) e <i>argonauta 2A</i> (<i>ago2A</i>) em diferentes órgãos.....	30
Figura 16: Expressão relativa de <i>ago2A</i> , <i>dcr1</i> e <i>dcr2</i> em corpo gorduroso de <i>R. prolixus</i> em resposta à alimentação sanguínea.	32
Figura 17: Expressão relativa de <i>ago2A</i> , <i>dcr1</i> e <i>dcr2</i> em intestino médio anterior de <i>R. prolixus</i> em resposta à alimentação sanguínea.....	33
Figura 18: Expressão relativa de <i>ago2A</i> , <i>dcr1</i> e <i>dcr2</i> em intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i> em resposta à alimentação sanguínea.....	34
Figura 19: Expressão relativa de <i>dcr1</i> em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i> em resposta à injeção de diferentes concentrações de dsMAL.....	36
Figura 20: Expressão relativa de <i>dcr2</i> em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i> em resposta à injeção de diferentes concentrações de dsMAL.....	37

Figura 21: Expressão relativa de <i>ago2A</i> em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i> em resposta à injeção de diferentes concentrações de dsMAL.....	38
Figura 22: Expressão relativa de <i>dcr1</i> em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i> dias após a injeção de dsMAL.....	40
Figura 23: Expressão relativa de <i>dcr2</i> em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i> dias após a injeção de dsMAL.....	41
Figura 24: Expressão relativa de <i>ago2A</i> em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i> dias após a injeção de dsMAL.....	42
Figura 25: Detecção de dsRNAs após ensaio <i>in vitro</i> com proteínas solúveis de intestino médio anterior, corpo gorduroso e ovário de <i>R. prolixus</i>	44
Figura 26: Detecção de dsRNAs após ensaio <i>in vitro</i> com proteínas solúveis de intestino médio posterior de <i>R. prolixus</i>	45
Figura 27: Ensaio <i>ex vivo</i> de incubação de dsRNAs com hemolinfa de <i>R. prolixus</i> ..	46
Figura 28: Esquema dos componentes das vias de RNAi em <i>R. prolixus</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de iniciadores utilizados para ampliações por PCR e qPCR.	18
Tabela 2: Sequências de iniciadores utilizados para síntese das dsRHBP, dsMAL e ds α GLU.....	20
Tabela 3: Identificação de componentes das vias de RNAi no genoma de <i>R. prolixus</i>	22

LISTA DE ABREVIações

AGO: Argonauta
CHS: chalcona sintase
C3PO: componente 3 promotor de RISC
Dcr: Dicer
DEPC: dietilpirocarbonato
DFR: diidroflavonol-4-redutase
dNTP: deoxiribonucleotídeo trifosfatados
ds α GLU: dsRNA específica para o gene α -glucosidase
dsMAL: dsRNA específica para o gene Mal de *Escherichia coli*
dsRBD: domínios ligadores de dsRNAs
dsRHBP: dsRNA específica para o gene *rhbp*
dsRNA: dupla-fita de RNA
EDTA : ácido etilenodiaminotetracético
LOQS: Loquacious
Mal: proteína ligadora de maltose de *Escherichia coli*
miRNAs: microRNAs
PB: Pares de bases
PCR : Reação em Cadeia da Polimerase
pré-miRNAs: precursores de miRNAs
pri-miRNAs: microRNAs primários
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RdRP: RNA polimerase dependente de RNA
RHBP: proteína ligadora de heme de *Rhodnius prolixus*
RISC: Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNA: ácido ribonucléico
RNAi: ácido ribonucléico de interferência
RNAm: ácido ribonucléico mensageiro
RNase: ribonuclease
siRNA: pequeno RNA de interferência
TE: elementos de transposição
TRBP: proteína TAR ligadora de RNA

RESUMO

A interferência por RNA (RNAi) é o processo celular de silenciamento gênico sequência-específico que ocorre em resposta à presença de duplas-fitas de RNA (dsRNA) homólogas, as quais podem ser moléculas endógenas (miRNAs) ou exógenas (siRNAs). Apesar de outras proteínas acessórias estarem envolvidas em vários aspectos do RNAi, proteínas Dicer e Argonautas são suficientes para estabelecer a via funcional. Proteínas Dicer (*dcr*) são caracterizadas por múltiplos domínios: domínio ATPase/helicase, DUF283, PAZ, dois domínios RNase III e um domínio ligador de dsRNA (dsRBD). Alguns membros dessa família perdem um ou mais desses domínios. Proteínas Argonautas (*ago*) são caracterizadas pela presença de quatro domínios: N-terminal, PAZ, MID e PIWI. O triatomíneo *Rhodnius prolixus* tem sido usado como modelo para estudos de genômica funcional baseado no silenciamento gênico, exibindo uma resposta sistêmica ao RNAi. Entretanto, pouco se sabe sobre as vias de RNAi nesse inseto. O objetivo desse trabalho é identificar os componentes centrais da via do RNAi em *Rhodnius prolixus*, investigando a resposta sistêmica a dsRNAs exógenas. A partir dos dados do genoma do inseto e utilizando ferramentas de bioinformática, genes envolvidos com a via de RNAi foram identificados e comparados com genes já descritos para outros organismos. Utilizando técnicas de biologia molecular (RT-PCR e qPCR), foi possível investigar a expressão de alguns desses genes em resposta à alimentação sanguínea e à presença de dsMAL, uma dsRNA exógena não-específica. Além disso, a presença de dsMAL foi investigada após incubação da mesma com hemolinfa e proteínas solúveis obtidas de ovários, corpo gorduroso e intestino médio anterior e posterior. Foram encontrados 2 genes que codificam proteínas Dicer, 6 genes que codificam Argonautas e um gene que codifica Drosha. Os transcritos de três desses genes (*dcr1*, *dcr2* e *ago2A*) foram detectados em ovário, corpo gorduroso, intestino médio anterior e posterior. A alimentação sanguínea induziu o aumento da transcrição dos 3 genes em corpo gorduroso e intestino médio anterior e o aumento de *dcr2* e *ago2A* em intestino médio posterior. Verificou-se também, um aumento de expressão do gene *dcr2* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e posterior em resposta à dsMAL, enquanto a expressão do gene *dcr1* mostrou-se aumentada em corpo gorduroso e *ago2A* em corpo gorduroso e intestino médio posterior. O gene *dcr2* parece estar relacionado à via de siRNA, já que apresenta alto nível de expressão após injeção de dsRNAs em todos os tecidos analisados. Além disso, dsRNAs não foram detectadas quando incubadas com hemolinfa e após 24h incubadas com proteínas solúveis de ovários. Isso não ocorre com dsRNAs incubadas com proteínas solúveis dos outros tecidos, mostrando que a presença de atividade RNase é tecido-específica. Os resultados podem ajudar a elucidar a via de RNAi de *Rhodnius prolixus*.

Palavras-chaves: inseto, RNAi sistêmico, genômica funcional, dicer, argonauta

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is the cellular process of sequence-specific gene silencing in response to the presence of homologous double-stranded RNA (dsRNA), which can be endogenous (miRNAs) or exogenous (siRNAs) molecules. Although other accessory proteins are involved in a lot of aspects of the process of RNAi, Dicer and Argonaute proteins are sufficient to establish the functional pathway. Dicer proteins (Dcr) are characterized by multiple domains: ATPase/helicase domain, DUF283, PAZ, two RNase III domains and binding dsRNA domain (dsRBD). Some members of this family lose one or more these domains. Argonaute proteins (Ago) are characterized by the presence of four domains: N-terminal, PAZ, MID and PIWI. The triatomine *Rhodnius prolixus* has been used as a model for functional genomics researches based in gene silencing, exhibiting a systemic RNAi response. However, little is known about the RNAi pathways in this insect. The aim of this work is identify the core components of the RNAi pathway in *Rhodnius prolixus*, investigating the systemic response to exogenous dsRNAs. From genomic data of the insect and using bioinformatics tools, genes involved in the RNAi pathway were identified and compared with genes already described for other organisms. Using molecular biology techniques (RT-PCR and qPCR), we investigated the expression of some genes in response both to blood feeding and to presence of dsMAL, a nonspecific exogenous dsRNA. In addition presence of dsMAL was investigated after incubation with hemolymph and soluble proteins obtained of ovaries, fat body, anterior and posterior midgut. In the *Rhodnius prolixus* genome were found two genes encoding Dicer proteins, six genes encoding Argonaute proteins and a gene encoding Drosha. Transcripts of three genes (*dcr1*, *dcr2* and *ago2A*) were detected in ovary, fat body, anterior and posterior midgut. Blood feeding induced an increase in transcription of these three genes in the fat body and midgut and an increase in transcription of *dcr2* and *ago2A* in anterior and posterior midgut. The gene *dcr2* exhibited increased expression in fat body, anterior and posterior midgut in response to dsMAL injection while *dcr1* was increased only in fat body and *ago2A* in fat body and posterior midgut. The gene *dcr2* seems to be related with siRNAi pathway since it responded with a high increased expression, after injection of exogenous dsRNAs in all tissues analyzed. Furthermore dsRNAs weren't detected in the presence of hemolymph and after 24 hours of incubation with soluble proteins of ovaries. The same didn't occur with dsRNAs incubated with soluble proteins of the other tissues, showing that the presence of RNase activity is tissue-specific. The results can help to describe the RNAi pathway in *Rhodnius prolixus*.

Keywords: insect, systemic RNAi, functional genomics, dicer, argonaute

1- INTRODUÇÃO

1.1 – RNA de interferência

Um dos mais importantes avanços da Biologia foi a descoberta que moléculas de RNA podem regular a expressão de genes (NOVINA e SHARP, 2004). Biólogos trabalhando com petúnias avaliaram o efeito da diminuição da expressão de genes envolvidos com a pigmentação de flores. Cópias dos genes diidroflavonol-4-redutase (DFR) ou chalcona sintase (CHS) foram introduzidos no genoma da planta *Petunia hybrida*, tendo sido observado um mecanismo natural de silenciamento gênico ao qual foi dado o nome de PTGS (do inglês *post-transcriptional gene silencing*). Isso mostrou que quando transgenes são homólogos aos RNAs codificados por genes endógenos, os dois tipos de RNAs são degradados, um fenômeno que ficou conhecido também como co-supressão (NAPOLI et al., 1990). No fungo *Neurospora crassa*, um fenômeno similar à co-supressão foi descrito e chamado “*quelling*” (ROMANO et al., 1992). Fire et al. (1998) descreveram e explicaram pela primeira vez o fenômeno que foi chamado de RNA de interferência (RNAi) em células de animais. Este estudo mostrou que a injeção de uma longa dupla-fita de RNA no nematódeo *Caenorhabditis elegans* levou à degradação do RNA mensageiro homólogo. O nome RNAi também é traduzido no nosso idioma como RNA interferente ou Interferência mediada por RNA.

Muitas vias relacionadas ao RNAi são conhecidas por regular uma ampla variedade de processos celulares em praticamente todos os eucariontes (CERUTTI e CASAS-MOLLANO, 2006). RNAi pode afetar diversos aspectos da biologia dos eucariotos, incluindo o desenvolvimento embrionário, fertilidade em animais e a defesa antiviral em plantas e invertebrados (BERNSTEIN et al., 2003; SAITO e SIOMI, 2010; VOINET et al., 1998; WANG et al., 2006). Apresenta também papel crucial em processos celulares como: proteção contra elementos de transposição, regulação de genes e modificação da estrutura da cromatina (ALMEIDA e ALLSHIRE, 2005).

A proteção contra a proliferação de vírus e elementos de transposição, bem como a resposta a duplas-fitas de RNA exógenas, originam moléculas efetoras que guiam a degradação do RNA mensageiro alvo. Tais moléculas são conhecidas como pequenos RNAs de interferência (do inglês *small interfering RNA* - siRNA). Os

siRNAs são gerados pela ação de proteínas da família RNase III, conhecidas como Dicer, que ao encontrarem dupla-fitas de RNA longas (dsRNA), clivam-nas em siRNAs (TUSCHL et al., 1999; ZAMORE et al., 2000). Após a clivagem, os siRNAs são separados e a fita anti-sense é preferencialmente carregada em um complexo protéico chamado RISC (do inglês *RNA Induced Silencing Complex*). Este complexo é responsável por buscar no transcriptoma os RNAs mensageiros alvos. Finalmente, a fita simples de RNA carregada, conhecida como fita guia, direciona a endonuclease Argonata (AGO), que faz parte do complexo RISC, para clivar o RNA mensageiro que contenha a sequência homóloga à fita guia, a qual determina a especificidade sequencial da resposta do RNA de interferência (MEISTER e TUSCHL, 2004; TOMARI e ZAMORE, 2005).

A atuação do RNAi na regulação gênica ocorre principalmente por meio dos microRNAs (miRNAs). Estes são RNAs com cerca de 22 nucleotídeos e são gerados a partir de transcritos endógenos em forma de grampo e que usam a complementaridade antisense para inibir a expressão de RNAs mensageiros específicos (AMBROS et al., 2003; BARTEL, 2004). Estudos revelaram o envolvimento de miRNAs em vias genéticas complexas reguladoras da embriogênese, hematopoiese, diferenciação neuronal e desenvolvimento mediado por HOX (PASQUINELLI et al., 2005).

Os miRNAs são formados a partir de longas dsRNAs transcritas pela RNA polimerase II ou III, as quais são denominadas microRNAs primários (pri-miRNAs). Estes são processados no núcleo da célula por um complexo formado pela proteína Drosha, uma endoribonuclease de classe I, juntamente com seu cofator DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome critical region in gene 8*), também conhecido como Pasha em moscas e nematódeos (DENLI et al., 2004; GREGORY et al., 2004; HAN et al., 2004). O processamento por Drosha envolve a remoção da haste dupla-fita e das sequências flangeadoras, originando precursores de miRNAs (pré-miRNAs), também em forma de grampos, os quais são transportados para o citoplasma da célula através do receptor nuclear exportina-5 (LUND et al., 2004; YI et al., 2003). No citoplasma, os pré-miRNAs são processados pela Dicer, a qual através do domínio PAZ, reconhece a saliência 3' terminal de 2 nucleotídeos deixada pela proteína Drosha, clivando o pré-miRNA em duplex de dsRNA maduros (HAMMOND, 2005; OLENA e PATTON, 2010). A proteína TRBP (do inglês *TAR RNA-binding*

protein) atua juntamente com Dicer para formar um complexo que atua não só no processamento de miRNA, mas também dá suporte para a montagem de RISC (CHENDRIMADA et al., 2005).

Uma fita do miRNA maduro é empacotada no RISC e guiada para o RNA mensageiro alvo, enquanto a outra é degradada. Argonautas que compõem RISC intermedeiam tal pareamento da fita com o RNA mensageiro alvo, sendo que o grau de complementaridade entre estes dois define se o RNA mensageiro será clivado e degradado ou se ocorrerá repressão da tradução (OLENA e PATTON, 2010). A Figura 1 resume as etapas comuns das vias de siRNAs e miRNAs e a Figura 2 mostra a via do RNAi (miRNA) e seus principais componentes.

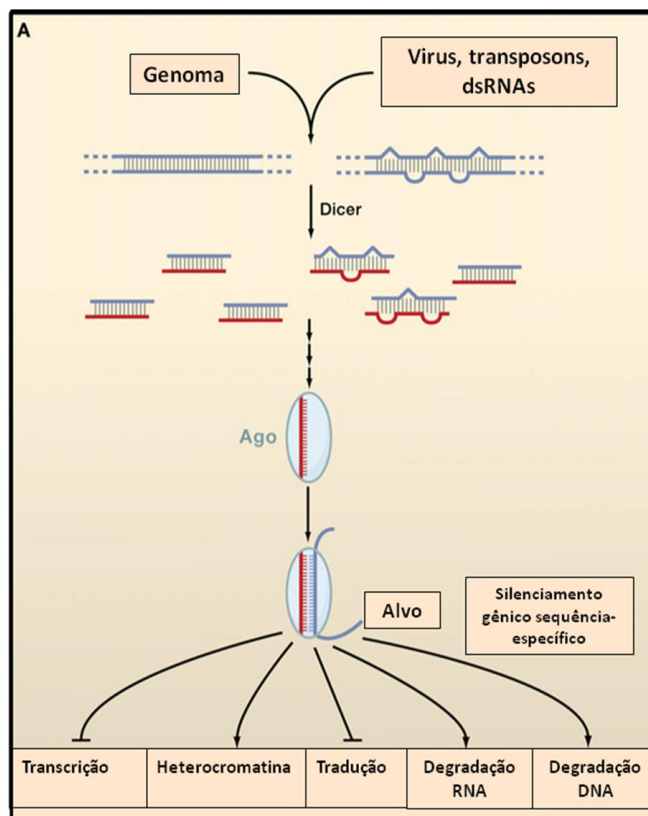


Figura 1: Mecanismo de RNA de interferência. Etapas comuns das vias de siRNAs e miRNAs. Duplas-fitas de RNA de diversas origens são processados por uma proteína RNase III, como Dicer, em curtos fragmentos (~ 20-30 nt). Uma das fitas é carregada por Argonauta, permitindo o reconhecimento do RNA alvo. Uma vez que o alvo é reconhecido, a sua expressão é modulada por um dos vários mecanismos distintos, dependendo do contexto biológico. Adaptado de Carthew e Sontheimer (2009).

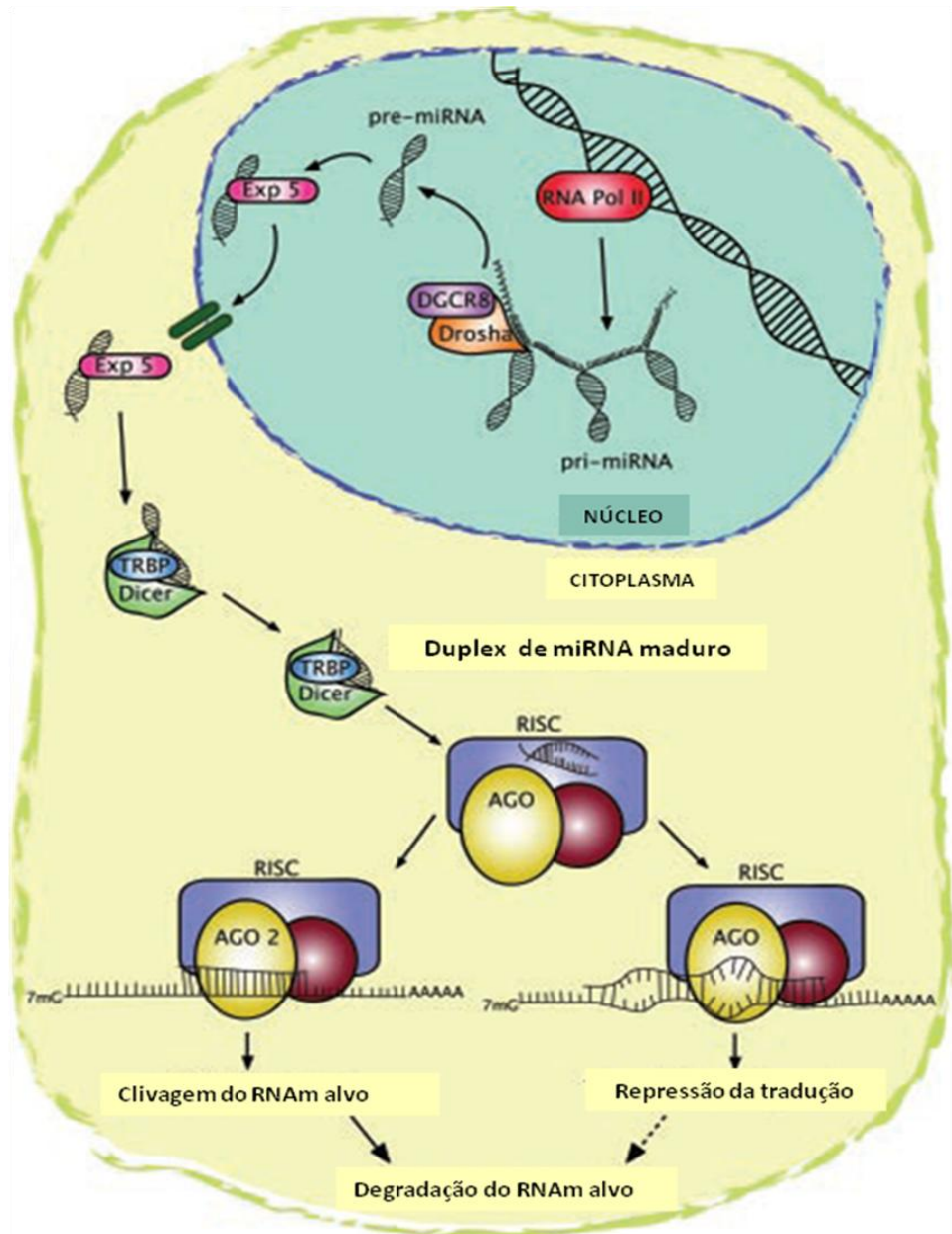


Figura 2: Descrição da via de RNAi mediada por microRNAs. Inicialmente pri-miRNAs são processados pelo complexo Drosha/DGCR8 no núcleo, originando os pré-miRNAs. Logo após, estes são enviados para o citoplasma onde são processados em duplex de miRNAs maduros pelo complexo Dicer/TRBP. Os miRNAs maduros direcionam RISC ao RNA mensageiro, que de acordo com a complementaridade pode ser clivado e degradado ou ter sua tradução impedida. Adaptado de Olena e Patton (2010).

Uma classe diferente de pequenos RNAs compostos por 24 a 30 nucleotídeos são produzidos por um mecanismo independente de proteínas Dicer. Essa classe de pequenos RNAs são chamados piRNAs, por se associarem a proteínas PIWI. Proteínas PIWI, juntamente com as helicases Armitage e Spindle E, estão envolvidas com o processamento dos piRNAs e são restritas às células germinativas (ARAVIN et al., 2004; GIRARD et al., 2006; KLATTENHOFF e THEURKAUF, 2008; VAGIN et al., 2006).

Os mecanismos de RNAi desencadeados em nível celular foram chamados de “cell autonomous RNAi”, onde apenas as células que entram em contato com as dsRNAs, ou as geram, são afetadas pelo silenciamento (WHANGBO e HUNTER 2008). Entretanto, em plantas e alguns animais, o silenciamento gênico iniciado localmente pode se espalhar para partes distantes do organismo, o que é chamado de “non-cell autonomous RNAi” (TERENIUS et al., 2011; WHANGBO e HUNTER 2008). Isso pode ocorrer quando dsRNAs são captadas do ambiente e internalizadas para dentro da célula (RNAi ambiental) ou quando o sinal de silenciamento é transportado de uma célula para outra ou de um tecido para outro (RNAi sistêmico). Em organismos multicelulares, o RNAi ambiental pode ser seguido pelo RNAi sistêmico e ambos sempre serão seguidos do RNAi celular autônomo (HUVENNE e SMAGGHE, 2010).

1.2 – Proteínas envolvidas em RNAi

1.2.1 – Família RNase III

Enzimas pertencentes à família RNase III podem ser classificadas em três classes, de acordo com a disposição dos domínios (MACRAE e DOUDNA, 2007). A classe I apresenta apenas um domínio RNase III e um domínio ligador de dsRNA (dsRBD). Já a classe II, além de apresentar um domínio RNase III e um dsRBD, apresenta uma região de poli-prolina, próxima a extremidade amino-terminal. Nesta classe estão as proteínas chamadas Drosha (MACRAE e DOUDNA, 2007).

Na classe III das RNases III estão presentes as enzimas Dicer, que apresentam vários domínios em uma ordem específica. Da extremidade amino para a carboxi-terminal: um domínio ATPase/helicase (também chamado ATPase DEXD-H), um domínio DUF283, um domínio PAZ, dois domínios RNase III e um dsRBD

(Figura 3a). Vale ressaltar que membros da classe III podem diferir ligeiramente nesse arranjo, apresentado a falta de um ou mais domínios (CARTHEW e SONTHEIMER, 2009).

A função dos domínios ATPase/helicase e DUF283 no processamento da dsRNA ainda não foi esclarecido (HAMMOND, 2005; MACRAE e DOUDNA, 2007). O domínio PAZ reconhece a extremidade dsRNA, enquanto os dois domínios RNase III formam um centro catalítico e clivam as fitas opostas da dsRNA, de maneira a formar uma saliência de 2 nucleotídeos na extremidade 3' (Figura 3b). A distância entre PAZ e os resíduos catalíticos determina o tamanho dos pequenos RNAs (LIU e PAROO, 2010).

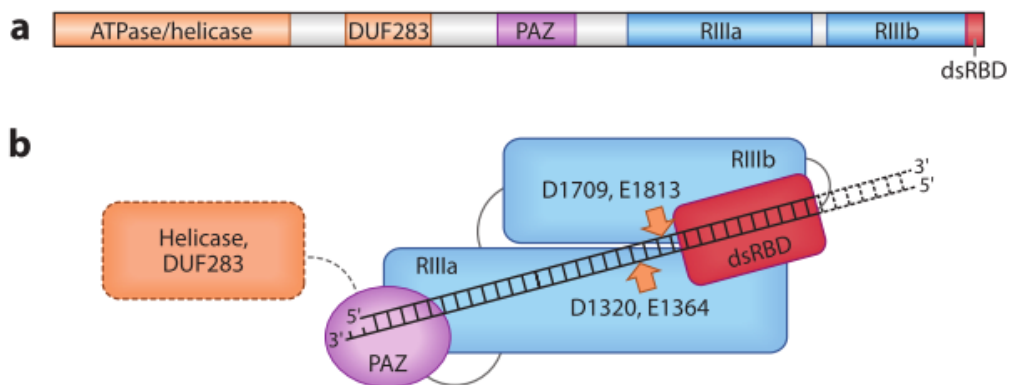


Figura 3: O funcionamento de Dicer. (a) Os domínios presentes em Dicer da extremidade amino para a carboxi-terminal: um domínio ATPase/helicase, um DUF283 (do inglês 'Domain of Unknown Function'), um domínio PAZ, dois domínios RNase III (RIIIa e RIIIb) e um dsRBD. (b) O domínio PAZ reconhece a extremidade dsRNA, dsRBD liga a dsRNA, enquanto os dois domínios RNase III clivam as fitas opostas da dsRNA. A função dos domínios helicase e DUF283 no processamento da dsRNA é desconhecida. Adaptado de Liu e Paroo (2010).

Alguns organismos, incluindo mamíferos e o nematódeo *C. elegans*, possuem uma única Dicer que participa da biogênese de ambos, miRNAs e siRNAs, enquanto outros organismos apresentam múltiplas, as quais atuam separadamente nas duas vias (BATISTA e MARQUES, 2011). Um exemplo é *D. melanogaster*, que apresenta dois parálogos de Dicer: Dicer-1, envolvida na biogênese de miRNA e Dicer 2, envolvida na geração de siRNAs (LEE et al., 2004). Além disso, Dicer-1 não possui o domínio helicase, enquanto Dicer-2 apresenta este domínio completo (LEE et al., 2004).

1.2.2 – Argonautas

As proteínas argonautas estão presentes em procariontes e eucariontes e acredita-se que o aumento de cópias dos genes *ago* está relacionado à adaptabilidade ao ambiente e à resistência a doenças (WEI et al, 2012). Em eucariontes, as proteínas AGO são compostas por: um domínio N-terminal, um domínio PAZ, um domínio MID (do inglês *middle*) e um domínio PIWI (Figura 4), enquanto proteínas AGO de procariontes não apresentam o domínio PAZ, sendo a arquitetura dessa proteína variável (WEI et al., 2012). O domínio PAZ interage com a extremidade 3' de siRNA ou miRNA, orientando seu posicionamento dentro de PIWI, o qual executa a clivagem dos RNA mensageiros alvos (SONG et al., 2004; PARKER et al., 2005; LIU e PAROO, 2010).

Em eucariontes, as proteínas AGO podem ser classificadas, filogeneticamente, em 3 sub-famílias: AGO, PIWI e WAGO (TOLIA e JOSHUA-TOR, 2007; CZECH e HANNON, 2011). As proteínas da sub-família AGO se associam com siRNAs e miRNAs, direcionando RISC ao RNA alvo apropriado (CZECH e HANNON, 2011), enquanto proteínas da sub-família PIWI, se associam aos piRNAs (JINEK e DOUDNA, 2009). Membros da sub-família WAGO, particularidade dos nematódeos, ligam-se a siRNAs secundários (YIGIT et al., 2006).

Apesar de algumas espécies, como *Schizosaccharomyces pombe*, apresentarem apenas uma Argonauta, a maioria das espécies contêm múltiplas. Em *D. melanogaster*, humanos e *C. elegans*, por exemplo, existem 5, 8 e 27 parálogos de Argonauta, respectivamente, o que pode significar uma especialização funcional entre as vias do siRNA e miRNA (BATISTA e MARQUES, 2011).

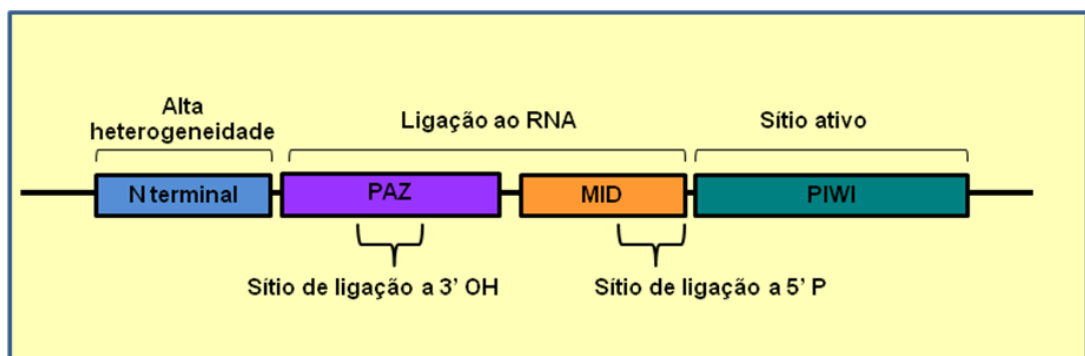


Figura 4: Os domínios presentes em argonautas de eucariontes. Adaptado de Ender e Meister (2010).

1.2.3 – Outras proteínas

Proteínas RNase III e argonautas são suficientes para estabelecer a via funcional. Apesar disso, outras proteínas acessórias estão envolvidas em diferentes aspectos das vias de RNAi (DRINNENBERG et al., 2009).

Um grupo de proteínas que contém domínios ligadores de dsRNAs (dsRBD) atuam como ‘pares’ de Dicer, auxiliando na passagem das moléculas de pequenos RNAs para RISC. Em *D. melanogaster*, Loquacious (LOQS) atua juntamente com Dicer 1, R2D2 com Dicer 2 e Pasha com Droscha (DENLI et al., 2004; FORSTEMANN et al., 2005; LEUSCHNER et al., 2005; LIU et al., 2003; PELLINO e SONTHEIMER, 2003; SAITO et al., 2005). LOQS apresenta 3 domínios dsRBD e é um homólogo da proteína TRBP humana (FORSTEMANN et al., 2005). R2D2 é um homólogo da proteína RDE-4 de *C. elegans* e em complexo com Dicer 2, em *D. melanogaster*, facilita a passagem de siRNA da Dicer 2 para RISC. O complexo, mas não Dicer 2 sozinha, liga-se ao siRNA e aumenta a degradação do RNA mensageiro mediada por RISC (LIU et al., 2003). Pasha, como mencionado anteriormente, é o cofator de Droscha. Apresenta 2 domínios dsRBD e atua ligando-se ao RNA, de forma a reconhecer a junção dsRNA–ssRNA e posicionar Droscha (DENLI et al., 2004; HAN et al., 2006). Essas proteínas parecem determinar a especificidade das enzimas Dicer, o que sugere que diferenças nessas proteínas podem afetar a eficiência de RNAi em diferentes organismos (TOMOYASU et al., 2008).

Também em *D. melanogaster*, uma endoribonuclease dependente de Mg^{2+} , a C3PO (do inglês *component 3 promoter of RISC*), foi identificada como um complexo multimérico composto de Translina e Trax. C3PO atua na ativação de RISC através da remoção dos produtos de clivagem de siRNA (LIU et al., 2009).

Em *C. elegans* foi identificada uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) que usa siRNAs primários processados por Dicer como iniciadores para a produção de mais siRNAs, gerando com isso mais substratos para Dicer e uma “onda” secundária de siRNAs. Essa amplificação parece ser essencial para o efeito de RNAi nesse nematódeo (SIJEN et al., 2001; SIJEN et al., 2007).

Ainda em *C. elegans*, a proteína Sid-1 está envolvida na resposta sistêmica ao RNAi. Sid apresenta um domínio extracelular amino-terminal seguido de vários domínios transmembrana, os quais formam um canal que permite a passagem de moléculas de dsRNA (FEINBERG e HUNTER, 2003; MAY e PLASTERK, 2005;

WINSTON et al., 2002). Algumas espécies de invertebrados, como *Tribolium castaneum*, apresentam homólogos de Sid-1 (DUXBURY et al., 2005; WINSTON et al., 2002; TOMOYASU et al., 2008), enquanto outros, como *D. melanogaster*, que não apresenta uma resposta sistêmica ao RNAi, não apresenta genes homólogos a Sid-1 (ROIGNANT et al., 2003).

1.3 – RNAi em insetos

Além de ser usado como ferramenta para o silenciamento, RNAi atua na defesa do genoma contra vírus e elementos de transposição (TE) (OBBARD et al., 2009). Em *D. melanogaster*, RNAi é a primeira e mais importante resposta imune antiviral, mas pouco se sabe sobre a sua função na resposta imune inata de vertebrados (BLAIR, 2011). Ao ser infectada com vírus de RNA, como Flock House e Vírus C, a mosca-da-fruta aciona a via de RNAi, de forma que dsRNAs geradas durante a replicação do vírus sejam degradadas (MEISTER e TUSCHL, 2004). Além disso, foi visto que mutantes de *D. melanogaster* para Dicer 2 e Argonauta 2 são altamente susceptíveis à infecção com vírus de RNA (GALIANA-ARNOUX et al., 2006).

Homólogos dos componentes das vias de RNAi de *D. melanogaster* foram encontrados no genoma do mosquito *Anopheles gambiae*, enquanto Argonauta 2 e Dicer 2 foram identificadas no mosquito *Aedes aegypti* (CAMPBELL et al., 2008). Em *Anopheles gambiae* infectados com vírus O'nyong-nyong foi detectada a presença de dsRNA formada durante a replicação do RNA viral (KEENE et al., 2004). O mesmo ocorre em *Ae. aegypti* infectados com vírus dengue (FRANZ et al., 2006) ou com vírus Sindbis (CAMPBELL et al., 2008). Já que dsRNA não é produzida normalmente por células eucarióticas, sua presença dispara uma série de eventos que culminam na destruição do RNA viral (OLSON et al., 2002; SANCHEZ-VARGAS et al., 2004). Entretanto, vírus parasitas de insetos desenvolveram mecanismos para superar a ação da via de RNAi, o que possibilita a infecção do inseto por esses vírus (BLAIR, 2011).

O silenciamento gênico mediado por RNAi foi mostrado em várias ordens de insetos, incluindo Diptera (KENNERDELL e CARTHEW, 1998; ST. JOHNSTON, 2002; BLANDIN et al., 2002; KEENE et al., 2004), Coleoptera (BUCHER et al., 2002), Hymenoptera (AMDAM et al., 2003; MAORI et al., 2009), Lepidoptera

(TURNER et al., 2006; SWEVERS et al., 2011), Blattodea (CIUDAD et al., 2006; CRUZ et al., 2006) e Hemiptera (HUGHES e KAUFMAN, 2000; ARAUJO et al., 2006; MURY et al., 2009; WALTER-NUNO, 2011; LAVORE et al., 2012). Assim, em muitos desses estudos foi investigada, por meio de RNAi, a função de genes relacionados com o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, diapausa, resistência a agente químicos, além dos genes que codificam as proteínas chaves da fisiologia do inseto.

Nos insetos, a resposta sistêmica ao RNAi varia de espécie para espécie. *Blatella germanica*, *Oncopeltus fasciatus*, *Gryllus bimaculatus* e *T. castaneum* são completamente sensíveis ao RNAi, enquanto que espécies pertencentes às ordens Lepidoptera e Diptera são parcial ou totalmente insensíveis ao RNAi (BÉLLES, 2010). Dependendo do gene que se quer silenciar, insetos pertencentes à ordem Lepidoptera, como *Manduca sexta*, apresentam eficiência variável ao RNAi (BELLÉS, 2010; TERENIUS et al., 2011). *D. melanogaster* apresenta variação de sensibilidade, de acordo com o estágio de vida. As dsRNAs penetram em alguns tecidos de adultos e embriões (TOMOYASU et al., 2008), enquanto em larvas as mesmas são incorporados apenas em hemócitos (MILLER et al., 2008).

O coleóptero *Tribolium castaneum* é caracterizado como um inseto modelo para o estudo da resposta sistêmica ao RNAi. Injeções de dsRNA na hemocele de fêmeas causou o silenciamento de genes zigóticos nos embriões (RNAi parental) (BUCHER et al., 2002). Apesar disso, uma recente comparação genômica entre *T. castaneum* e *C. elegans* mostrou a ausência de genes similares à RdRP (TOMOYASU et al., 2008). Assim, a amplificação de sinal observada nesse inseto deve ser baseada em um gene com atividade similar à RdRP ou por um mecanismo ainda não identificado (TOMOYASU et al., 2008). O gene RdRP também não está presente em *Drosophila melanogaster* (OBBARD et al., 2009).

1.4 – O inseto *Rhodnius prolixus*

Os insetos da espécie *R. prolixus*, conhecidos popularmente como barbeiros, pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. A ordem Hemiptera inclui os insetos conhecidos como percevejos verdadeiros. Na família Reduviidae encontram-se várias espécies vetores de *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da Doença de Chagas. A maioria destes percevejos é encontrada em

locais em que estão presentes os hospedeiros, ou seja, nos sítios de repouso habitual do homem ou em ninhos de aves, mamíferos e outros animais (LEHANE, 2005).

R. prolixus é um inseto hematófago e hemimetábolo, passando por um processo de metamorfose incompleta, na qual o indivíduo jovem é muito semelhante, morfologicamente, ao indivíduo adulto e ambos ocupam o mesmo nicho. Assim, após passar por cinco estádios de ninfa, o inseto alcança a fase adulta, em que apresentam asas e são sexualmente maduros (BUXTON, 1930) (Figura 5).

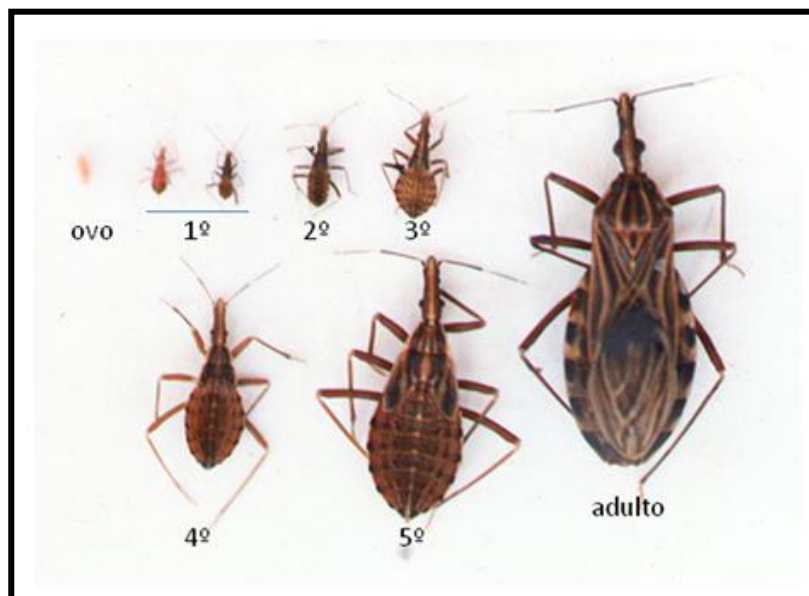


Figura 5: Ciclo de vida de *R. prolixus*. O ovo eclode em ninfa de primeiro estágio. Este passa por mais 5 estádios de ninfa até atingir a fase adulta alada e com dimorfismo sexual. Foto criada pela equipe do Laboratório de Bioquímica de Vetores de Doenças (LBVD) da UFRJ-RJ (LBVD, 2012).

A alimentação sincroniza eventos fisiológicos distintos, provocando nas ninfas a mudança de um estágio para outro e nas fêmeas adultas a indução da ovogênese. Em torno do terceiro dia após a alimentação da fêmea, os ovários já apresentam ovócitos. A postura dos ovos se dá por volta do sexto dia e a eclosão das ninfas no período de dez a vinte dias. Após a alimentação, o animal segue um período de jejum, que pode chegar a alguns meses. Por possuírem o mesmo hábito alimentar

em todos os estágios de vida, também as formas imaturas podem transmitir a doença (BUXTON, 1930).

O inseto pode ingerir uma quantidade de sangue equivalente a até dez vezes seu próprio peso (FRIEND et al., 1965). Para tal desempenho, o inseto conta com um aparelho bucal do tipo picador-sugador e um conjunto de biomoléculas que evita reações hemostáticas por parte do hospedeiro, como agregação plaquetária, coagulação sanguínea e vaso constricção (CHAMPAGNE, 2004). Alguns desses fatores anti-hemostáticos estão presentes nas glândulas salivares e a saliva injetada no momento da picada garante a fluidez do sangue durante a alimentação. Dentre os componentes da saliva estão as nitroforinas, hemeproteínas que, de maneira geral, são capazes de estocar e transportar óxido nítrico que, quando liberado no tecido do hospedeiro, induz a vasodilatação e reduz a agregação plaquetária (CHAMPAGNE et al., 1995). *R. prolixus* tem sido usado como modelo experimental por muitas décadas e muito do que se sabe hoje sobre a fisiologia de insetos tem origem em trabalhos com esta espécie. Estes trabalhos foram, em grande parte, realizados por Vincent Wigglesworth, um cientista inglês, que deixou na década de 30 e anos posteriores, uma vasta contribuição acerca de quase tudo que hoje se sabe sobre os diversos aspectos da bioquímica e fisiologia de insetos (EDWARDS, 1998).

1.5 – *Rhodnius prolixus* e RNAi

Os estudos realizados até o momento no hemíptero *R. prolixus* revelam que existe uma resposta de silenciamento, tanto por injeção quanto por alimentação com dsRNAs exógenas (PAIM et al., 2012). Araujo et al. (2006) mostraram, pela primeira vez, o silenciamento mediado por RNAi em *R. prolixus*, concluindo que dsRNAs injetadas na hemocele provocam o silenciamento de um gene presente nas glândulas salivares. Este gene codifica a nitroforina 2, uma proteína que auxilia na prevenção da coagulação do sangue ingerido no repasto sanguíneo. O silenciamento provocou o encurtamento do tempo de coagulação do sangue ingerido pelos insetos silenciados. Outro estudo mostrou que dsRNAs injetadas na hemocele deste mesmo hemíptero são capazes de diminuir a expressão do gene que codifica uma α -glucosidase presente no epitélio intestinal. Esta enzima está presente nas membranas perimicrovilares intestinais e promove a formação do cristal de

hemozoína (Hz) nesse hemíptero (MURY et al., 2009), um importante mecanismo antioxidante, que protege o inseto dos danos oxidativos induzidos pelo heme gerado durante a digestão do sangue do hospedeiro vertebrado (OLIVEIRA et al., 1999).

Walter-Nuno (2011) investigaram também em *R. prolixus*, os efeitos do silenciamento de RHBP (do inglês *Rhodnius Heme Binding Protein*), proteína sintetizada pelo corpo gorduroso e encontrada tanto na hemolinfa como nos ovócitos de *R. prolixus* (OLIVEIRA et al., 1995). Os resultados mostraram que insetos injetados com dsRNA para o silenciamento de RHBP tiveram cerca de 90% de redução nos níveis de RNA mensageiro da RHBP, entre os dias 2 e 12 após a alimentação. Entretanto, a postura de ovos não foi afetada nas fêmeas em que RHBP foi silenciada, mas a coloração dos ovos variou do rosa ao branco, o que mostrou que o silenciamento afetou a transmissão de RHBP para o embrião.

Ao investigar a embriogênese de *R. prolixus*, Lavore et al. (2012) silenciaram o gene *giant*, que é expresso nos ovários e fornecido ao embrião. A diminuição da expressão desse gene através de RNAi mostrou a importância de *giant* para a formação adequada da cabeça e do abdômen do embrião. Os embriões originados das fêmeas silenciadas não apresentaram apêndices mandibulares e maxilares na cabeça e nem segmentos anteriores no abdômen.

2- JUSTIFICATIVA

Insetos são uma das principais causas de mortalidade e morbidade humanas, principalmente como resultado da transmissão de patógenos por espécies sugadoras de sangue. A transmissão de doenças vetoriadas por insetos é governada por interações complexas entre o parasita, o vetor e o hospedeiro vertebrado. O controle efetivo dessas doenças requer o conhecimento dos fatores biológicos envolvidos nessas interações. *R. prolixus* é um importante vetor da Doença de Chagas, responsável por altos índices de mortalidade nas Américas, além de ser um inseto modelo para o estudo da fisiologia, bioquímica e biologia molecular.

O hemíptero *R. prolixus* tem sido usado como modelo para estudos de genômica funcional baseados em silenciamento gênico, apresentando uma resposta sistêmica ao RNAi. Tal resposta tem permitido a descoberta da função de genes que codificam proteínas importantes para a fisiologia e desenvolvimento do inseto (ARAUJO et al., 2006; LAVORE et al., 2012; MURY et al., 2009; WALTER-NUNO, 2011). Além disso, a disponibilidade dos dados do sequenciamento do genoma de *R. prolixus* tem ampliado o número de estudos de genômica funcional realizados nesse inseto. Entretanto, os componentes da via de RNAi e vários aspectos fisiológicos deste mecanismo que atua no processamento de dsRNAs, permitindo a resposta sistêmica ao RNAi, são desconhecidos no *R. prolixus*.

No presente trabalho pretende-se explorar a via de RNAi do *R. prolixus*, através da identificação de seus componentes no genoma e, analisando a função desses genes por comparação com genes já identificados em outros sistemas, buscar compreender como esse hemíptero lida com a presença de dsRNAs.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo principal

Identificar os componentes centrais da via do RNAi em *R. prolixus*, investigando a resposta sistêmica a dsRNAs exógenas.

3.2- Objetivos específicos

- Identificar genes envolvidos na via de RNAi de *R. prolixus* a partir dos dados gerados pelo sequenciamento do genoma do inseto;
- Comparar genes identificados no genoma de *R. prolixus* com outros genes conhecidos da via de RNAi quanto a sua estrutura e função na via;
- Analisar o perfil de expressão dos genes *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* em corpo gorduroso, ovário, intestino médio anterior e intestino médio posterior de *R. prolixus*;
- Acompanhar o perfil de transcrição dos genes *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior após a alimentação de *R. prolixus* com sangue;
- Acompanhar o perfil de transcrição dos genes *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior após a injeção de dsRNAs em *R. prolixus*;
- Monitorar a presença de dsRNAs após incubação com hemolinfa e proteínas extraídas de diferentes tecidos do inseto.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Identificação de genes *in silico* e análise das sequências gênicas e protéicas

O genoma de *R. prolixus* foi sequenciado pelo Centro de Sequenciamento de Genomas da Escola de Medicina da Universidade de Washington (TGI, 2012). A partir dos dados do genoma disponíveis, duas previsões das regiões de *splicing* foram criadas: a previsão realizada pela equipe do Laboratório de Bioquímica de Vetores de Doenças (LBVD) da UFRJ-RJ, chamada de “previsão Lagerblad” (LAGERBLAD, 2012) e a previsão realizada pelo grupo do VectorBase (VECTORBASE-RHODNIUS PROLIXUS, 2012). A busca de sequências envolvidas com via de RNAi de *R. prolixus* foi feita usando sequências de outros organismos, disponíveis no banco de dados de proteínas (*non-redundant database*) disponibilizado pelo NCBI (NCBI, 2012), as quais foram submetidas ao BLAST do portal VectorBase (VECTORBASE-BLAST-RHODNIUS PROLIXUS, 2012) e procurada também na previsão Lagerblad. Além disso, as sequências obtidas foram aferidas em bancos de dados do resultado de sequenciamento do transcriptoma de *R. prolixus* (Glória Braz, dados não publicados).

As sequências montadas a partir dos dados do genoma de *R. prolixus* foram alinhadas com sequências protéicas de outros organismos utilizando o algoritmo ClustalW2. Árvores filogenéticas foram construídas utilizando o mesmo algoritmo (CLUSTALW2, 2012). Além disso, as sequências de *R. prolixus* foram analisadas no portal de pesquisa em bioinformática ExpASy (EXPASY, 2012) para análises dos domínios presentes em cada sequência.

4.2 – Manutenção da colônia de *R. prolixus*

A colônia de *R. prolixus* é mantida em uma estufa incubadora digital modelo FT 1020, Fluxo Tecnologia, no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) a uma temperatura de 28 °C e umidade relativa de aproximadamente 80%. A colônia de *R. prolixus* teve sua origem a partir de uma colônia mantida pelo Dr. Hatisaburo Masuda, no Laboratório de Bioquímica de Insetos, do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ. Os insetos são alimentados com uma periodicidade de 21 dias com sangue de coelho, diretamente na orelha dos animais imobilizados em caixas de contenção.

4.3 – Extração de RNA e remoção da contaminação por DNA genômico

Após a dissecação dos tecidos, os mesmos foram submetidos à extração de RNA total usando Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por determinação da absorbância a 260 e 280 nm no aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific®), conforme instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Fermentas). Em um tubo de 0,2 mL mantido em gelo foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µL do tampão de DNase I (10X), 1 µl de DNase I (1 U/µL) e água-DEPC 0,1% suficiente para completar o volume para 10 µL. As reações foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C. Após adição de 1 µL de EDTA 25 mM, as reações foram incubadas a 65 °C por 10 minutos.

4.4 – Síntese da primeira fita de DNA complementar

Para a síntese de cDNA utilizou-se o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Aos 11 µL obtidos na etapa anterior foram adicionados 2,2 µL do tampão de reação (10X), 0,88 µL de dNTP (100 mM), 2,2 µL de iniciadores aleatórios (10X), 1,1 µL da enzima Transcriptase Reversa (50 U/µL) e água-DEPC 0,1% para completar 22 µL. As reações foram incubadas por 10 minutos a 25 °C, seguido por uma incubação a 37 °C durante 2 horas e, finalmente, a 85 °C por 5 minutos. As amostras de cDNA foram estocadas a -20 °C até o uso.

4.5 – Desenho dos Iniciadores

Para testar a expressão gênica de *dicer 1*, *dicer 2* e *argonauta 2A* de *R. prolixus*, iniciadores foram desenhados a partir dessas sequências utilizando o programa Primer 3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000). As sequências destes iniciadores e dos iniciadores dos genes de referência (MAJEROWICZ et al., 2011) são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências de iniciadores utilizados para ampliações por PCR e qPCR.

Gene	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador anti-senso (5'-3')	Fragmento (bp)	Eficiência PCR (%)
<i>RPDcr1</i>	TTT GAA TCT GTT GCT GGT GC	GCT GTT TCC GGT TCT AGT TCA	161	168,7
<i>RPDcr2</i>	CGT TTA GAT TGC AGT GAG CG	CCC AGT GTG AAT GCT TGA GA	218	115,9
<i>RPago2A</i>	GGA GGT CGC ACG AAT AAT GT	TCT GGC TTG CTC ATT TGT TG	186	99,9
<i>RP18S*</i>	TCG GCC AAC AAA AGT ACA CA	TGT CGG TGT AAC TGG CAT GT	104	100
<i>RPEF*</i>	GAT TCC ACT GAA CCG CCT TA	GCC GGG TTA TAT CCG ATT TT	92	93

RPDcr1, Dicer 1; *RPDcr2*, Dicer 2; *RPago2A*, Argonata 2A; *RPEF*, Fator de Alongamento; *RP18S*, RNA ribossomal. * Iniciadores descritos por Majerowicz et al. (2011).

4.6 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para as reações em cadeia da polimerase foi utilizada a enzima Taq DNA Polimerase (Fermentas). As misturas de reação para PCR continham 1 µL de cDNA, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de dNTP, 0,3 µM de cada iniciador, 2 µL de tampão para Taq DNA Polimerase, 0,16 µL da enzima Taq DNA Polimerase 5 U/µL e água ultra pura autoclavada para completar um volume final de 20 µL. As amostras foram levadas ao termociclador sob o seguinte programa: 95 °C por 5 min; 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s; e 72 °C por 5 min. Para a amplificação do cDNA alvo, foram utilizados iniciadores senso e anti-senso específicos, desenhados para o gene de interesse. O cDNA de RNA ribossomal 18S de *R. prolixus* (MAJEROWICZ et al., 2011) foi amplificado como controle positivo. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 0,2 µg/mL em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA; pH 8). Após a eletroforese, seguiu-se a visualização sob luz ultravioleta em transiluminador UV e os géis foram fotografados.

4.7 – Síntese de dsRNAs

As dsRNAs específicas para RHBP (dsRHBP) de *R. prolixus* e para o gene Mal de *Escherichia coli* (dsMAL) foram construídas de acordo com Walter-Nuno (2011), como descrito a seguir. Para a produção do molde para a síntese da dsRHBP, as misturas de reação para PCR continham 5 µL de tampão para Taq DNA Polimerase, 3 µL de cloreto de magnésio (25Mm), 1µL de dNTP (10Mm), 0,4 µL do iniciador senso RNAiRHBP (15 µM), 0,4 µL do iniciador anti-senso RNAiRHBP (Tabela 2), 0,2 µL da enzima Taq DNA Polimerase (5U/µl) (Fermentas), 1µL de

cDNA produzido a partir de RNA de corpo gorduroso de *R. prolixus* e água ultra pura autoclavada para completar um volume final de 50 µL. As amostras foram levadas ao termociclador sob o seguinte programa: 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 63 °C por 30s e 72 °C por 1 min; e 72 °C por 10 min. Essa reação de PCR gerou um fragmento de 300pb.

Uma dsRNA homóloga ao gene que codifica uma proteína ligadora de maltose de *Escherichia coli* (Mal) (Gene ID: 7129408) foi construída e utilizada como dsRNA não-relacionada a *R. prolixus* (dsMAL). Na produção de molde para a síntese de dsMAL as misturas de reação para PCR continham 5 µL de tampão para Taq DNA Polimerase, 1,5 µL de cloreto de magnésio (25 Mm), 1 µL de dNTP (10mM), 2 µL do iniciador T7minimal (15 µM) (Tabela 2) que funciona como senso e anti-senso, 0,2 µL da enzima Taq DNA Polimerase (5U/µL), 0,2 µL do plasmídeo Litmus28iMal (0,5 µg/µL) (New England Biolabs, Ipswich, EUA) e água ultra pura autoclavada para completar um volume final de 50 µL. As amostras foram levadas ao termociclador sob o programa: 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 44 °C por 30 s e 72 °C por 45 s min; e 72 °C por 10 min. Essa reação de PCR gerou um fragmento de 1Kb.

Os produtos obtidos na amplificação foram purificados em 500 µl da resina Sephacryl S-400 High Solution (Ge - Health Care Bio-Sciences). O produto de PCR foi adicionado à resina e centrifugado a 500 rpm durante 5 minutos a 4 °C para remoção de iniciadores livres. As duas dsRNAs (dsRHBP e dsMAL) foram construídas utilizando o kit *MEGAScript® RNAi* (Ambion) de acordo com o protocolo do fabricante. As dsRNAs foram quantificadas por determinação da absorbância a 260 e 280 nm no aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific®), conforme instruções do fabricante e conservadas a -20 °C até o uso.

Na síntese da dsRNA para o gene de uma α -glucosidase de *R. prolixus* (ds α GLU), as reações de amplificação foram realizadas em tampão para enzima Taq DNA Polimerase (1x concentrado) (Fermentas) com 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de dNTP, 10 µM do iniciadore senso RNAi α glu, 10 µM do iniciador anti-senso RNAi α glu (Tabela 2), 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 1 µL de cDNA de intestino médio posterior de *R. prolixus* e água ultra pura para completar 20 µL. As amostras foram levadas ao termociclador sob o seguinte programa: 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; e 72 °C por 10

min. Essa reação de PCR gerou um fragmento de 400pb. Após a amplificação dos fragmentos gênicos, a síntese da ds α GLU foi feita utilizando o kit *T7 RiboMAX™ Express RNAi System* (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. As dsRNAs foram quantificadas por determinação da absorbância a 260 e 280 nm no aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific®), conforme instruções do fabricante e conservadas a -20°C até o uso (Lígia Ferreira, comunicação pessoal).

Tabela 2: Sequências de iniciadores utilizados para síntese das dsRHBP, dsMAL e ds α GLU.

Iniciador	Sequência
RNAiRHBP senso	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CCT TCA CAG TCT CCG GAA C 3'
RNAiRHBP anti-senso	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GGT CTG GTG AAA GCA CAA C 3'
T7minimal	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG G 3'
RNAiαglu senso	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG ATT ACC AGC GGC AAA GAT TG 3'
RNAiαglu anti-senso	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG AAA GTA TCT GGC CAC CAA CG 3'

4.8 – Injeção de dsRNAs

Vinte e cinco dias após alimentação sanguínea, a hemocele de fêmeas adultas de *R. prolixus* foram injetadas com 1 μ g, 2 μ g ou 4 μ g de dsMAL. Como controle, foram usadas fêmeas não injetadas (N). No momento da injeção (0), ½, 1 e 4 dias após as injeções, os tecidos (corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior) foram coletados, armazenados em Trizol a -80°C até a extração de RNA.

4.9 – Expressão relativa dos genes determinada por PCR quantitativa

Para a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), foram utilizados 7,5 μ L de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) misturados com 0,75 μ L de cada iniciador (Tabela 1) a 5 μ M, 1 μ L de água ultrapura e 5 μ L de cDNA a 10ng, em um volume final de 15 μ L. As reações foram realizadas no sistema *StepOnePlus Real-Time PCR* (Applied Biosystems) nas condições seguintes: 95 °C por 10 min seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. A expressão dos genes foi normalizada usando um fator de alongamento de *R. prolixus* (*RpEF*), envolvido com a síntese de proteínas (MAJEROWICZ et al., 2011) (Tabela 1).

Os valores de $\Delta\Delta C_t$ e de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) foram calculados a partir dos valores de C_t (*threshold cycle*) obtidos através da qPCR, segundo LIVAK e SCHMITTGEN (2001). As médias dos valores de $\Delta\Delta C_t$ obtidos nos experimentos

foram comparadas através de teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, sendo consideradas significativamente diferentes quando $P < 0,05$. Os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram utilizados apenas para montagem dos gráficos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism 4.0 (GraphPad Software).

4.10 – Detecção de dsRNAs após ensaio *in vitro* com proteínas solúveis de corpo gorduroso, intestino médio e ovário

Corpo gorduroso, ovários, intestino médio anterior e intestino médio posterior de 10 fêmeas de *R. prolixus* foram coletados e armazenados em água ultrapura a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização do ensaio. Os tecidos foram homogeneizados com auxílio de um homogeneizador do tipo *Potter Elvehjem*, seguido por três sessões de congelamento e descongelamento das amostras em nitrogênio líquido, com centrifugações por 15 minutos a $20.000\times g$ e a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o término da coleta dos sobrenadantes, as amostras foram liofilizadas e ressuspensas em $100\text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura. Após essa etapa, realizou-se a dosagem de proteínas utilizando ácido bicinconínico (BCA) (SMITH et al., 1985). Em seguida, $20\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas solúveis dos respectivos tecidos foram incubadas, na presença de água ultrapura, com 200 ng de dsMAL ou de ds α GLU (apenas para intestino médio posterior), dupla-fita construída para o silenciamento do gene *α -glucosidase* de *R. prolixus*. As reações foram incubadas por 2h e por 24h em uma estufa incubadora digital modelo FT 1020, Fluxo Tecnologia a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Transcorridos os tempos (2h e 24h), os tubos foram estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a corrida do gel de agarose 2% para verificação da presença das dsRNAs.

4.11 – Detecção de dsRNAs após ensaio *ex vivo* com hemolinfa

Hemolinfa de 10 fêmeas de *R. prolixus* foi coletada na presença de cristais de feniltiouréia. Após a dosagem de proteínas por BCA, $1,6\text{ }\mu\text{L}$ de hemolinfa (correspondente a $40\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas) foram incubados com $8,4\text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura e 200 ng de dsMAL ou de dsRHBP, dupla-fita construída para o silenciamento da proteína ligadora de heme de *R. prolixus* (RHBP). As reações foram incubadas por 2h e por 24h em uma estufa incubadora digital modelo FT 1020, Fluxo Tecnologia a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Transcorridos os tempos (2h e 24h), os tubos foram estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a corrida do gel de agarose 2% para verificação da presença das dsRNAs.

5- RESULTADOS

5.1- Identificação e análise das sequências gênicas e protéicas da via de RNAi

Com o objetivo de identificar os principais componentes envolvidos com o mecanismo central de RNAi em *R. prolixus*, genes envolvidos com a via de RNAi foram buscados nas duas predições genômicas do inseto (LAGERBLAD, 2012; VECTORBASE-RHODNIUS PROLIXUS, 2012). Foram encontradas duas sequências gênicas e protéicas de Dicer (*dcr1* e *dcr2*), uma de Drosha e seis de Argonautas (*ago1*, *ago2A*, *ago2B* e *ago3*) (Tabela 3), sendo que duas destas sequências estão ainda em processo de análise. Todas as sequências encontradas neste inseto parecem estar completas, codificando proteínas previstas que apresentam a metionina inicial e códon de parada, além de apresentarem tamanhos similares aos descritos para outros organismos. Com exceção de *ago2B*, os genes montados tiveram parte de suas sequências encontradas em bancos de dados do resultado de sequenciamento do transcriptoma de *R. prolixus* (Glória Braz, dados não publicados). Isso foi possível através de busca por Blastn no banco de dados. Até o momento, não foram encontrados no genoma de *R. prolixus* homólogos de RdRP, Sid-1, C3PO, Loquacious e Wago (Tabela 3).

Tabela 3: Identificação de componentes das vias de RNAi no genoma de *R. prolixus*.

Genes	Encontrado no genoma	Tamanho do gene (pb)	Tamanho predito para a proteína*	Sequência de aminoácidos completa*	Confirmado em transcriptoma
<i>Dicer 1</i>	Sim	5697	1899	Sim	Sim
<i>Dicer 2</i>	Sim	4722	1574	Sim	Sim
<i>Drosha</i>	Sim	4476	1492	Sim	Sim
<i>Argonauta 1</i>	Sim	2607	869	Sim	Sim
<i>Argonauta2A</i>	Sim	2790	930	Sim	Sim
<i>Argonauta2B</i>	Sim	2541	847	Sim	Não
<i>Argonauta 3</i>	Sim	4122	1374	Sim	Sim
<i>Wago</i>	Não	-	-	-	-
<i>Loquacious</i>	Não	-	-	-	-
<i>RdRP</i>	Não	-	-	-	-
<i>Sid-1</i>	Não	-	-	-	-
<i>C3PO</i>	Não	-	-	-	-

*Da metionina inicial até a posição do códon de parada

A Figura 6 mostra a sequência completa de Dicer-1 de *R. prolixus* (RPdcr1), bem como a arquitetura dos domínios existentes nessa proteína (Figuras 6A e 6B). Essa sequência apresenta todos os domínios característicos de proteínas que pertencem à família RNase III, classe III: dois domínios pertencentes à família das helicases (PS51192 e PS51194), sendo o primeiro com atividade ATP/helicase; um domínio característico de Dicer (PS51327), provavelmente análogo a DUF283; um domínio PAZ (PS50821); dois domínios RNases III (PS50142) e um domínio dsRBD (PS50137). A árvore filogenética desenhada a partir das sequências de aminoácidos de RPdcr1 e ortólogas de Dicer 1 de outros organismos mostra que RPdcr1 apresenta maior similaridade à Dicer 1 de *D. melanogaster* (Figura 6C). Além disso, o alinhamento dos domínios dessas sequências mostra alta conservação de aminoácidos entre elas (Anexo 1). Assim, RPdcr1 pode estar envolvida com a resposta aos miRNAs, já que em *D. melanogaster* Dicer1 tem essa função (LEE et al., 2004).

A Figura 7 mostra a sequência completa de Dicer-2 de *R. prolixus* (RPdcr2) e a arquitetura dos domínios existentes nessa proteína (Figuras 7A e 7B). Essa sequência apresenta a maioria dos domínios característicos de proteínas que pertencem à família RNase III, classe III: dois domínios que pertencentes à família das helicases (PS51192 e PS51194), sendo o primeiro com atividade ATP/helicase; um domínio característico de Dicer (PS51327), provavelmente análogo a DUF283; um domínio PAZ (PS50821), dois domínios RNases III (PS50142), faltando o domínio dsRBD carboxi-terminal (Figura 7A). A árvore filogenética desenhada a partir das sequências de aminoácidos de RPdcr2 e ortólogas de Dicer 1 e 2 de outros organismos mostra que RPdcr2 apresenta maior similaridade à Dicer 2 de *B. germanica* (Figura 7C), apesar desta apresentar todos os domínios característicos de Dicer (LOZANO et al., 2012). Além disso, o alinhamento dos domínios das sequências de aminoácidos de RPdcr2 e ortólogas de Dicer 1 e 2 de outros organismos, mostrou alta conservação de aminoácidos entre elas (Anexo 2).

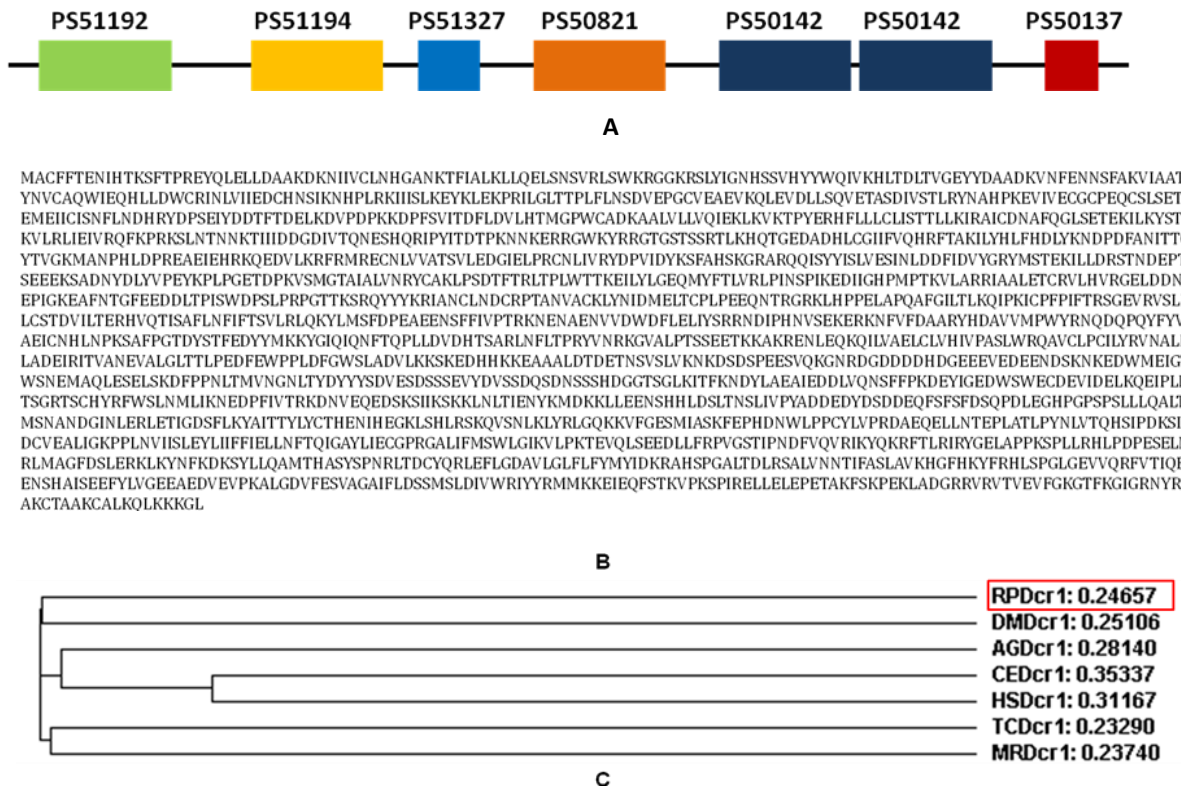


Figura 6: Caracterização de Dicer 1 de *R. prolixus* (RPDcr1). (A) RPDcr1 apresenta todos os domínios característicos de Dicer: domínios com atividades ATP/helicase (PS51192) e helicase (PS51194), um domínio análogo a DUF 283 (PS51327), um domínio PAZ (PS50821), dois domínios RNAses III (PS50142) e um domínio dsRBD (PS50137). (B) A sequência de aminoácidos completa apresenta 1899 aminoácidos. (C) Árvore filogenética comparando RPDcr1 à Dicer 1 de *Anopheles gambiae* (AGDCR1; ENSANGG00000014308), *Caenorhabditis elegans* (CEDCR1; K12H4.8), *Drosophila melanogaster* (DMDCR1; CG4792), *Homo sapiens* (HSDCR1; NM_177438), *Megachile rotundata* (MRDCR1; XP_003706496.1) e *Tribolium castaneum* (TCDCR1; EFA11550.1).

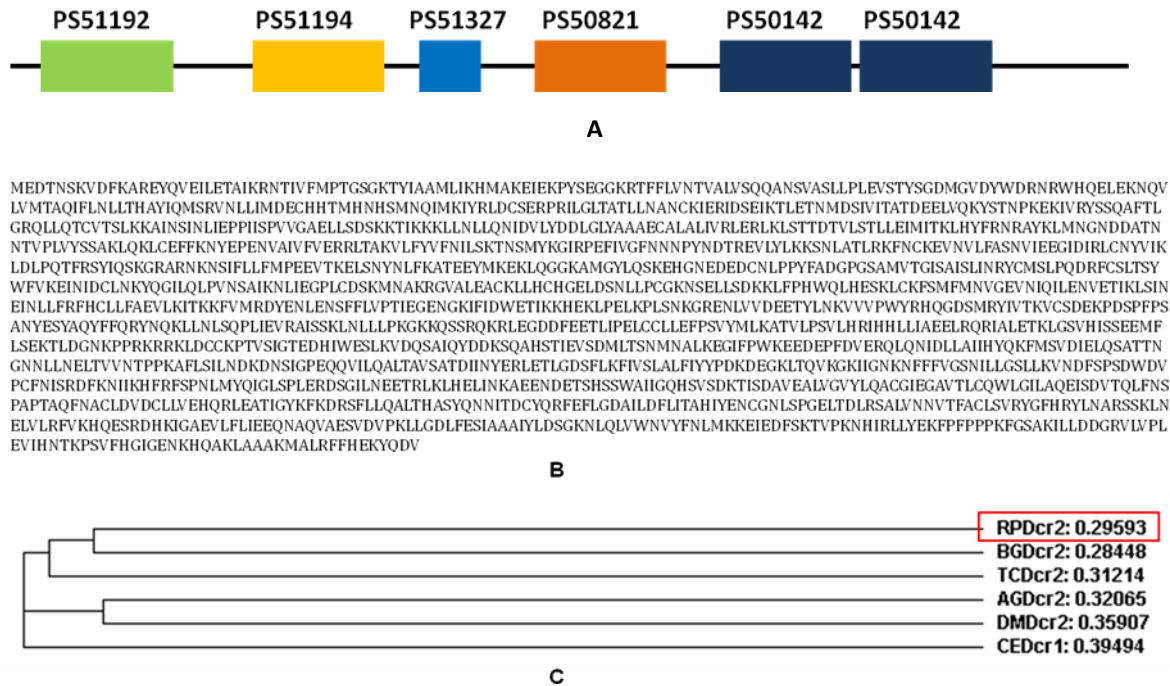


Figura 7: Caracterização de Dicer 2 de *R. prolixus* (RPDcr2). (A) RPDcr2 apresenta a maioria dos domínios característicos de Dicer: domínios com atividades ATP/helicase (PS51192) e helicase (PS51194), um domínio análogo a DUF 283 (PS51327), um domínio PAZ (PS50821) e dois domínios RNAses III (PS50142), faltando apenas o domínio C-terminal dsRBD. (B) A sequência completa apresenta 1573 aminoácidos. (C) Árvore filogenética comparando RPDcr2 à Dicer 2 de *Blattella germanica* (BGDCR2; CCF23094.1), *Drosophila melanogaster* (DMDCR2; CG6493), *Tribolium castaneum* (TCDCR2; NP_001107840.1), *Anopheles gambiae* (AGDCR2; XP_320248.4) e à Dicer-1 de *Caenorhabditis elegans* (CEDCR1; K12H4.8).

A Figura 8 mostra a sequência completa de Drosha de *R. prolixus* (RPDrosha) e a arquitetura dos domínios existentes nessa proteína (Figuras 8A e 8B). Essa sequência apresenta os domínios característicos de proteínas que pertencem à família RNase III, classe II: dois domínios RNAses III (PS50142) e um domínio dsRBD (PS50137). O alinhamento dos domínios das sequências de RPDrosha e suas ortólogas mostra alta conservação de aminoácidos entre elas (Anexo 3). Além disso, a árvore filogenética desenhada a partir de sequências de Droshas de outros organismos, mostrou que RPDrosha apresenta maior similaridade à Drosha de *Apis mellifera* (Figura 8C).

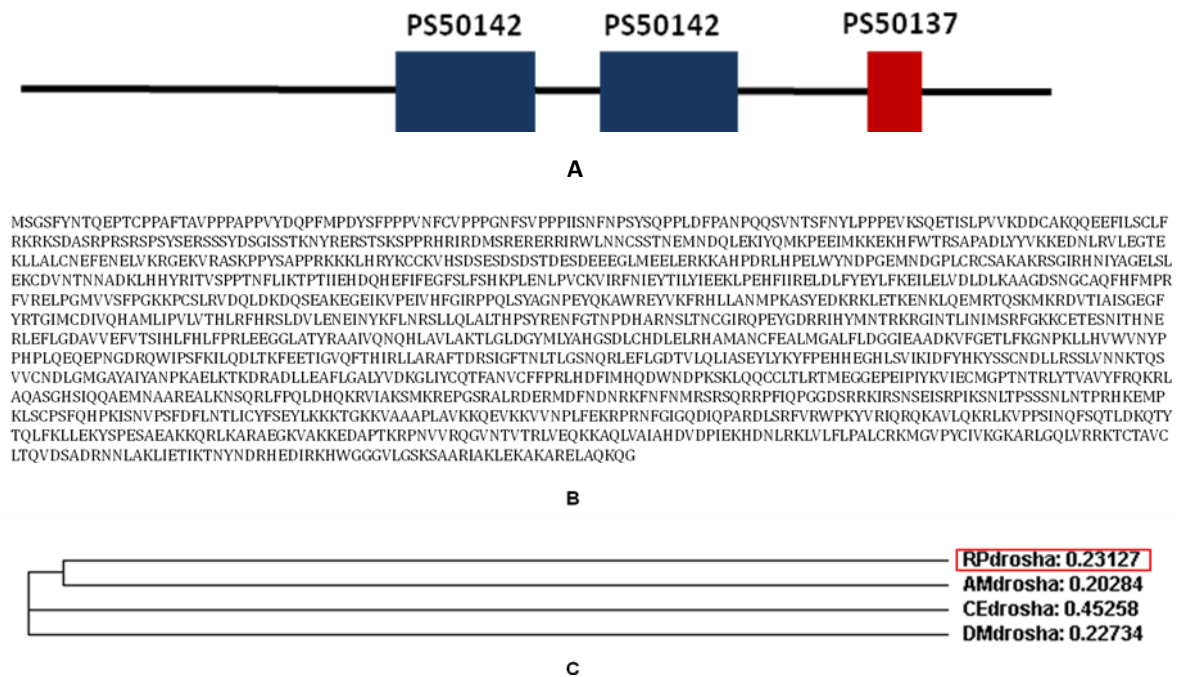


Figura 8: Caracterização de Drosha de *R. prolixus* (RPdrosha). (A) RPdrosha apresenta os domínios característicos de classe I da família RNase III: dois domínios RNases III (PS50142) e um domínio dsRBD (PS50137). (B) A sequência de aminoácidos completa apresenta 1492 aminoácidos. (C) Árvore filogenética comparando RPdrosha à Drosha de *Apis mellifera* (AMdrosha; XP_394444.3), *Caenorhabditis elegans* (CEDrosha; NP_001122460.2) e *Drosophila melanogaster* (DMdrosha; AAF59169.1).

A Figura 9 apresenta as sequências de aminoácidos de 4 argonautas de *R. prolixus*, que foram chamadas de RPago1, RPago2A, RPago2B e RPago3, apresentando respectivamente, 868, 929, 882 e 1373 aminoácidos. Todas contêm a metionina inicial, sendo que o asterisco final (*) representa o códon de parada. Os domínios dessas sequências estão esquematizados na Figura 10. Todas as RPagos apresentam domínios PIWI (PS50821) e PAZ (PS50822), domínios característicos de proteínas que pertencentes à família argonauta (Figura 4).

Ago1

MPHVLSDDSLVAEELHRSISKSNWQQKSLFGLIGCEKSKSYRRVLTMMERMDTPGEGRARGRARARARARQTEAALAAATATLTPSPLSQSKNEDRRPQPQAVARNVIRD
 LQEMKIRGASASARGNYRGGKPMLENIYTRPKELSKQEKIPLYFSLHLEKNFNAGAGTAGIPVTLSANVFKLVNHTDWALYQYRVDFSPEDERTVKRALLRIHKDVLGGYI
 FDGTVLFSVSHRNLPEPELSEYKRDSDDEEKIRITVKKAGDVLVMDGHHYIQLFNILMRKCLSNLQLQMVGRNYFDASARVEVKEYKMLWPGYLTSIRQHETSILMCAEITHK
 VMRRDALTDLIHDMSRHRNADWRNAFVNAIVGTIVLTHEHNNRTYRIDVDFVDRPNSRFLRNNNEELTYVEYLRKYLRIKNDLQPMIVSRAKPREIRAGMTENIFLVP
 ELCRLTGLTDDMRNSFQMLRALAEHTRVPIQSRIEKLNKFSQRLRSSPTVKEDLTMWNNMELSTNLVEFTGRILPQEKVSYGNKYYEAGPEADWTKSLRSNCLMIMGKL
 KVVAVIYINKKADVTFGLTNRSAAQSMFSIPQPHMKEIFDERCGTYVEALDEVISHMSPQLIMCIVPNNRSDRYAAIKKCCVDRAVPTQVVLAKNLNSKGMISATKI
 AVQJNCKIGGTPWTVAVPLSVILKTKAAMKYRYNDNALPSCIVYRDGVGEGQIPFVYVNHVERLIKDKLADLYNGKPKLAFIVTKRLNTRIFHLNKNPPPGTVADDCIT
 SPDKYDFFLVQSVVRQGTVSPYSYNIIDSSGLDPDKMQLRQTYKMTLHYFNWSGTVRVPACQYAHKLAFLVGGSLHKSPTDSEELLYFL*

Ago2a

MSLHKEVIFQEILKRRITRSARMFRDRKLLNLGFKIDFIPGRLIAEMSEELVGRARGRARGSRMQPASGPQPRRPGESISQRQLEQQQQQQQQQQQQQQQQQQPM
 PQQQELISRPPELIGRARGTRPVEQVRQMQMGALSAAQGEAASVPSRGGVRRARYDEPQVPTRPSSLESKRGTSGAHIVLKSNYFKLQHTDWTLYQYRVDFSPEDERT
 AYRKGLLRVHKDILGPMYFDGTVLFTVKRLDPPLELYSARISDDVKIRITIKKTTDLVMDGDPHYVQFFNIVLRKCIAGLNQLVGRDFDAASKIVVEKYNLELWPGFVTSIR
 QHENDILLGIDLANKIMRKTALHLLNDVSRQSDSWKDLFVQAIIVGTTVITPYNNKTYRVDDVDFDSSPLSTFEKGTERTVYMDYRNRYSIKITNKSQPLISRPKRRDILG
 GRTNVNVLIPELCCLTGLSDDMRNNFHLMRDLEQHTRHLPTARIDKIIINFMKRLTTNEQAREELSILWNLKFAFDLVEFTGRLLVPEKIIHGGGVISEGTQDADWTRNLRG
 HPMYHSEKFSWSIVYLRKSHRDESVFVRLTNASASLQFRIPPPNYEDIPDDRAGTYVQAIKIIKSNPQLIMCIVPNNRSDRYAAIKKCCVDRAVPSQVVLAKNLTKN
 VMSIATKIGIQVNCIKIGGSPWVSVVFPKPPVMVIGFDVCHDSTIKARSFGAMVASLDGYSYKYSAVSAHTSGEELNSDLSINNVKSVVIFRKNDFLPPKLIYRDGVGEG
 TEHYVNLHEVEKIRASLQEIYQSEPLQMAFIIVTKRINTRLFLKGNPPPGTVADDVITNPIKYDFFLVQSVVRQGTVPTSYNVIYDTHLSPDIMQKLSYKMCCHLYFNWS
 GTVRVPAPVQYAHKLAFLCGQYLHRAPNERLNEMLYFL*

Ago2b

MSEELVGRARGRARGSRMQPASGPQPRRPGESISQRQLEQQQQQQQQQQQQQQQQQQPMPOQELISRPPELIGRARGTRPVEQVRQMGALSAAQGEA
 SVPSRGGVRRARYDEPQVPTRPSSLESKRGTSGAHIVLKSNYFKLQHTDWTLYQYRVDFSPEDERTAYRKGLLRVHKDILGPMYFDGTVLFTVKRLDPPLELYSARISDD
 VKIRITIKKTTDLVMDGDPHYVQFFNIVLRKCIAGLNQLVGRDFDAASKIVVEKYNLELWPGFVTSIRQHENDILLGIDLANKIMRKTALHLLNDVSRQSDSWKDLFVQAI
 VGTTVITPYNNKTYRVDDVDFDSSPLSTFEKGTERTVYMDYRNRYSIKITNKSQPLISRPKRRDILGGRTNVNVLIPELCCLTGLSDDMRNNFHLMRDLEQHTRHLPTARI
 DKIIINFMKRLTTNEQAREELSILWNLKFAFDLVEFTGRLLVPEKIIHGGGVISEGTQDADWTRNLRGHPMYHSEKFSWSIVYLRKSHRDESVFVRLTNASASLQFRIPPPNY
 YEDIPDDRAGTYVQAIKIIKSNPQLIMCIVPNNRSDRYAAIKKCCVDRAVPSQVVLAKNLTKNMSIATKIGIQVNCIKIGGSPWVSVVFPKPPVMVIGFDVCHDSTIKA
 RSFGAMVASLDGYSYKYSAVSAHTSGEELNSDLSINNVKSVVIFRKNDFLPPKLIYRDGVGEGTEHYVNLHEVEKIRASLQEIYQSEPLQMAFIIVTKRINTRLFLKGNPP
 PPGTVADDVITNPIKYDFFLVQSVVRQGTVPTSYNVIYDTHLSPDIMQKLSYKMCCHLYFNWSGTVRVPAPVQYAHKLAFLCGQYLHRAPNERLNEMLYFL*

Ago3

MSEIVQFFKGTIFLTGATGTIGKLLIDQLLRKCDPKKLYLLIRNKNINPKKRAEKLFEEVLFERLRNEKPYMCETIKIVDGDLCENLLGIKEELFKELTENVEIIVHGAATVRFD
 EPLRIATNINVKGTMSVIKLCQQIKNLKAFSISTAFSINYPIYDIKEELYDIHINCDQLMDLMTILNDNELNSLQSRILDKWCNTYVTFKAVAENAIKMYAKNLPVAVRPSIV
 FGTREPPFGWGSYCAASRTVAALGLFLRIAKMDPNCTAEMVPGDKVANCILAATYKTHLGAKKILVYNNMVTNRNNKSVNSEFTKIMCNASQTIPLERIMWPPNII
 MQPNAVVFELISLFRYLPFAFILTFALHURDDLPSIFWLYKNFRKLNNTISYFTTKTWNFTYNNVTVELWNLGDEDRVLFNFDMISINWSNCITNFYKAFRKYRVKMMAYR
 GSRGSSRGGRGEALMKLLQKSAVSPPEEEFFPKDIGVQGGSSQAAPMGRSAALMKLLESASGRGAASSSKEPSHVQKRESFTGRGTARSSFSETSVSGPSRESSYAHGIP
 SYVSETSIREPEQHAPPGRMRYNPSISEKESPEPSSRRQPSDESLERFSELTVSEYDRPAVVIKGTYGQEVKVAANYIRLNVKGGKGVFQYDVKFNPDVDSTNIRCOL
 MKNVTHIIGETKSFDSGLLYLPVCLPEIITAHKMPDGSNVTMKITYYKLCMGRDRTVHLYNVLFRKIMQVGLTLQGRHFFDPKASKQIPAHNLEVWPYITAIQEYE
 DGIMLCCDSSHRVLRQTQVLELMEQIISVDSRTWKDEFIKLVIGQTVLTRYNNKMYRVDDVDFDESPKDKFEKDKGKMSYIDYFQHYNIKISNTSQPLLSRVGRMKG
 MKMELVNLVPELCHSSGLTETIRADMAMKDIATQTRISPSQRQFALNEFININSNSDVQKILSSWGLSLAKNIIRLPGRVIPPENIYFGNDMVHSGSFLADWGAASS
 SVLSPIDLRRWAVICTNRDEKTVFAFVDMYRRLPQLGKIMSPQILPMQNDISIQTIYKALQSTLARNLQVIVVFPTRCIDKYSAVKWKCCDHPIPSQVIQTRTRIKPEKLR
 SVTQKIALQJNCKLGGALWTVDIPKHAMVIGLDTFHDSRQKSGVAVVSSLNKGLTRWYSKIYSQAPGIELIEGLEVSILACLQKFKAINGVYPEQJLIYRDGVGDGQLDA
 VEKELPQIITACRRISPNYDPKFLFVIERGDFVNPLGTVLDHSITRKNYWDFFLVQSVVRQGTVSPHYVILHNTTKMTPDQQRFTYKLTLYNWCCTVVRVPACQYA
 HKLASLVGESIHKAESESLAENLFFL*

Figura 9: Sequências de 4 argonautas de *R. prolixus*. As sequências foram montadas a partir das predições genômicas de *R. prolixus* (VectorBase e Lagerblad). Ago1, Ago2A, Ago2B e Ago3 são compostas de, respectivamente, 868, 929, 882 e 1373 aminoácidos.



Figura 10: Perfil dos domínios presentes nas sequências das 4 argonautas de *R. prolixus*. Os domínios protéicos das argonautas foram investigados usando a ferramenta “ScanProsite” disponível no portal de recursos bioinformáticos ExPASy. Todas as RPagos apresentam domínios PIWI (PS50821) e PAZ (PS50822).

Após análise pelo algoritmo Blastp, as sequências ortólogas com melhores “hits” foram selecionadas e submetidas juntamente com as de *R. prolixus* ao algoritmo ClustalW para a construção das árvores filogenéticas e dos alinhamentos. Os alinhamentos dos domínios das sequências de AGO de *R. prolixus* (Anexo 8) e o alinhamento de cada uma com proteínas AGO selecionadas de outros organismos (Anexos 4-7), mostraram alta conservação de aminoácidos. RPago1 apresenta maior similaridade com as proteínas aubergine e piwi do besouro *T. castaneum* (Figura 11); RPago2A maior similaridade com proteína piwi do mosquito *A. aegypti* (Figura 12); RPago2B maior similaridade com aubergine do gafanhoto *Nilaparvata lugens* (Figura 13) e RPago3 maior similaridade com argonauta da abelha *Apis mellifera* (Figura 14).



Figura 11: Árvore filogenética de argonauta 1 de *R. prolixus* (RPago1). Árvore filogenética comparando RPago1 à proteína similar à de aubergine de *Tribolium castaneum* (aubTC; XP_001811159.1), piwi de *Tribolium castaneum* (piwiTC; GenBank: EFA07425.1); piwi de *Aedes aegypti* (piwiAA; XP_001653082.1), piwi de *Drosophila melanogaster* (piwiDM; GenBank: AAD08705.1), piwi de *Acromyrmex echinator* (piwiAE; GenBank: EGI64222.1) e aubergine de *Apis mellifera* (aubAM; NP_001159378.1).



Figura 12: Árvore filogenética de argonauta 2A de *R. prolixus* (RPago2A). Árvore filogenética comparando RPago2A à proteína similar à aubergine de *Tribolium castaneum* (aubTC; XP_001811159.1), piwi de *Tribolium castaneum* (piwiTC; GenBank: EFA07425.1), piwi de *Harpegnathos saltator* (piwiHS; GenBank: EFN77932.1), proteína “piwi-like” de *Megachile rotundata* (piwilikeMR; XP_003708345.1), piwi de *Aedes aegypti* (piwiAA; XP_001663870.1), aubergine de *Drosophila melanogaster* (aubDM; GenBank: AGA18946.1), piwi de *Acromyrmex echinator* (piwiAE; GenBank: EGI61307.1) e aubergine de *Apis mellifera* (aubAM; NP_001159378.1).

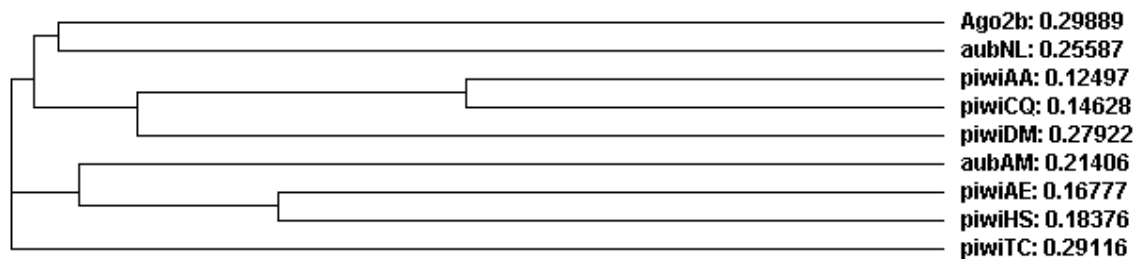


Figura 13: Árvore filogenética de argonauta 2B de *R. prolixus* (RPago2B). Árvore filogenética comparando RPago2b à aubergine de *Nilaparvata lugens* (aubNL; GenBank: AEI25513.1), piwi de *Tribolium castaneum* (piwiTC; GenBank: EFA07425.1), piwi de *Harpegnathos saltator* (piwiHS; GenBank: EFN83189.1), piwi de *Aedes aegypti* (piwiAA; XP_001663870.1), piwi de *Drosophila melanogaster* (piwiDM; GenBank: AGA18882.1), piwi de *Acromyrmex echinator* (piwiAE; GenBank: EGI61307.1), aubergine de *Apis mellifera* (aubAM; GenBank: ACV84378.1) e piwi de *Culex quinquefasciatus* (piwiCQ; XP_001844068.1).

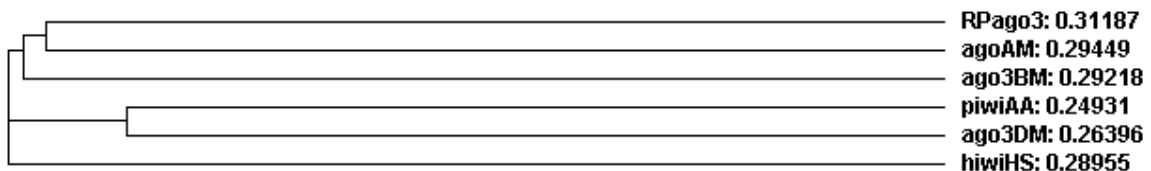


Figura 14: Árvore filogenética de argonauta 3 de *R. prolixus* (RPago3). Árvore filogenética comparando RPago3 à argonauta de *Apis mellifera* (agoAM; GenBank: ACV84372.1), argonauta 3 de *Bombyx mori* (ago3BM; dbj:BAF98575.1), piwi de *Aedes aegypti* (piwiAA; XP_001652945.1), argonauta 3 de *Drosophila melanogaster* (ago3DM; GenBank: ABO27430.1) e hiwi de *Homo sapiens* (hiwiHS; GenBank: AAK92281.1).

5.2- Expressão dos genes em diferentes órgãos de *R. prolixus*

Para avaliar a presença de transcritos dos genes *dicer 1* (*dcr-1*), *dicer 2* (*dcr-2*) e *argonata 2A* (*ago2A*), fêmeas adultas de *R. prolixus* foram dissecadas um dia após a alimentação com sangue e a expressão dos genes foi avaliada por PCR em corpo gorduroso, ovário, intestino médio anterior e intestino médio posterior, utilizando os iniciadores descritos no item 4.5. Como mostrado na Figura 15 os transcritos dos três genes foram detectados nos quatro órgãos analisados.

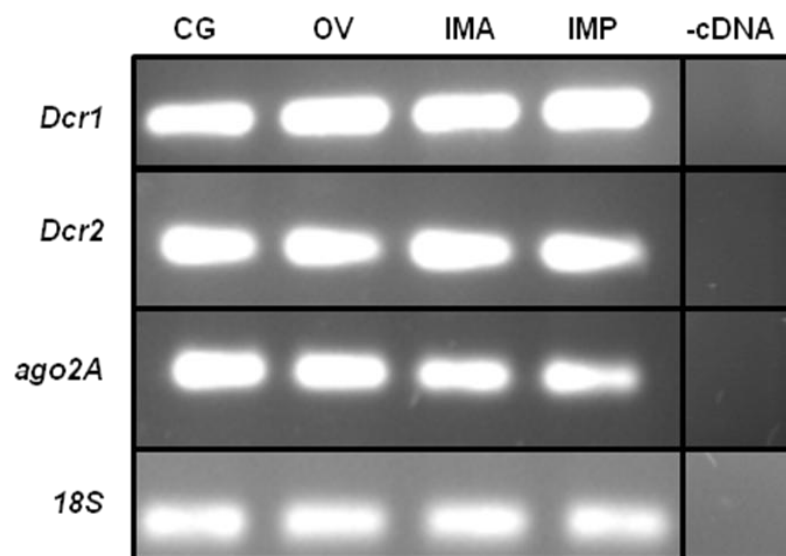


Figura 15: Expressão de *dicer 1* (*dcr1*), *dicer 2* (*dcr2*) e *argonata 2A* (*ago2A*) em diferentes órgãos. Corpo gorduroso (CG), ovário (OV), intestino médio anterior (IMA) e intestino médio posterior (IMP) foram obtidos de 5 fêmeas adultas um dia após a 1ª alimentação sanguínea. O RNA total foi extraído dos órgãos, tratado com DNase I e então utilizado para a síntese de cDNA. A PCR foi realizada utilizando-se iniciadores específicos desenhados para cada sequência gênica de *R. prolixus*. A amplificação do gene *Rp18S* foi utilizada como controle positivo. Reações foram corridas sem os cDNAs (-cDNA) dos respectivos tecidos e foram usadas como controles negativos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%.

5.3- Expressão dos genes em diferentes órgãos de *R. prolixus* em resposta à alimentação sanguínea

Com o intuito de acompanhar possíveis variações nos níveis de transcritos dos genes *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* em resposta à alimentação sanguínea, cDNAs de corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior foram submetidos a qPCR como descrito no item 4.9. A Figura 16 mostra que os genes *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* foram induzidos transcricionalmente pela alimentação sanguínea em corpo gorduroso. No 1º dia após a alimentação, os genes *dcr1* e *ago2A* apresentaram um aumento significativo de expressão no corpo gorduroso, com retorno ao nível basal de expressão nos dias que se seguiram (Figuras 16A e 16C). O aumento de expressão do gene *dcr2* foi mantido entre o 1º e o 4º dia após a alimentação, retornando ao nível basal após este período (Figura 16B). Em corpo gorduroso, os 3 genes analisados apresentaram aumento de expressão variando entre 3 e 4 vezes em comparação à amostra obtida do inseto em jejum (Figura 16).

A Figura 17 mostra que os genes *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* foram induzidos transcricionalmente pela alimentação sanguínea também em intestino médio anterior. Os três genes apresentaram um aumento significativo de expressão já no 1º dia após alimentação, o que foi mantido até o 7º dia após o repasto (Figuras 17A, 17B e 17C). Os níveis de expressão dos 3 genes foram similares, podendo o aumento atingir aproximadamente 9 vezes mais que o controle, em intestino médio anterior (Figura 17B).

Em relação ao intestino médio posterior, foi observado que a expressão do gene *dcr1* (Figura 18A) não respondeu significativamente à alimentação sanguínea, já que até o 7º dia após o repasto, o nível de expressão desse gene não se alterou de forma significativa em relação ao jejum (0), ao contrário do que ocorre nos outros tecidos analisados (Figuras 16A e 17A). Em contrapartida, os genes *dcr2* e *ago2A* apresentaram aumento de expressão significativo no 1º dia após a alimentação, sendo esse aumento de 3 e 5 vezes, respectivamente, para *dcr2* e *ago2A*. Após este dia, o nível de expressão dos dois genes diminuiu significativamente em relação ao jejum (Figuras 18B e 18C). O nível de expressão de *ago2A* volta a aumentar 3 vezes até o 7º dia após o repasto sanguíneo (Figura 18C).

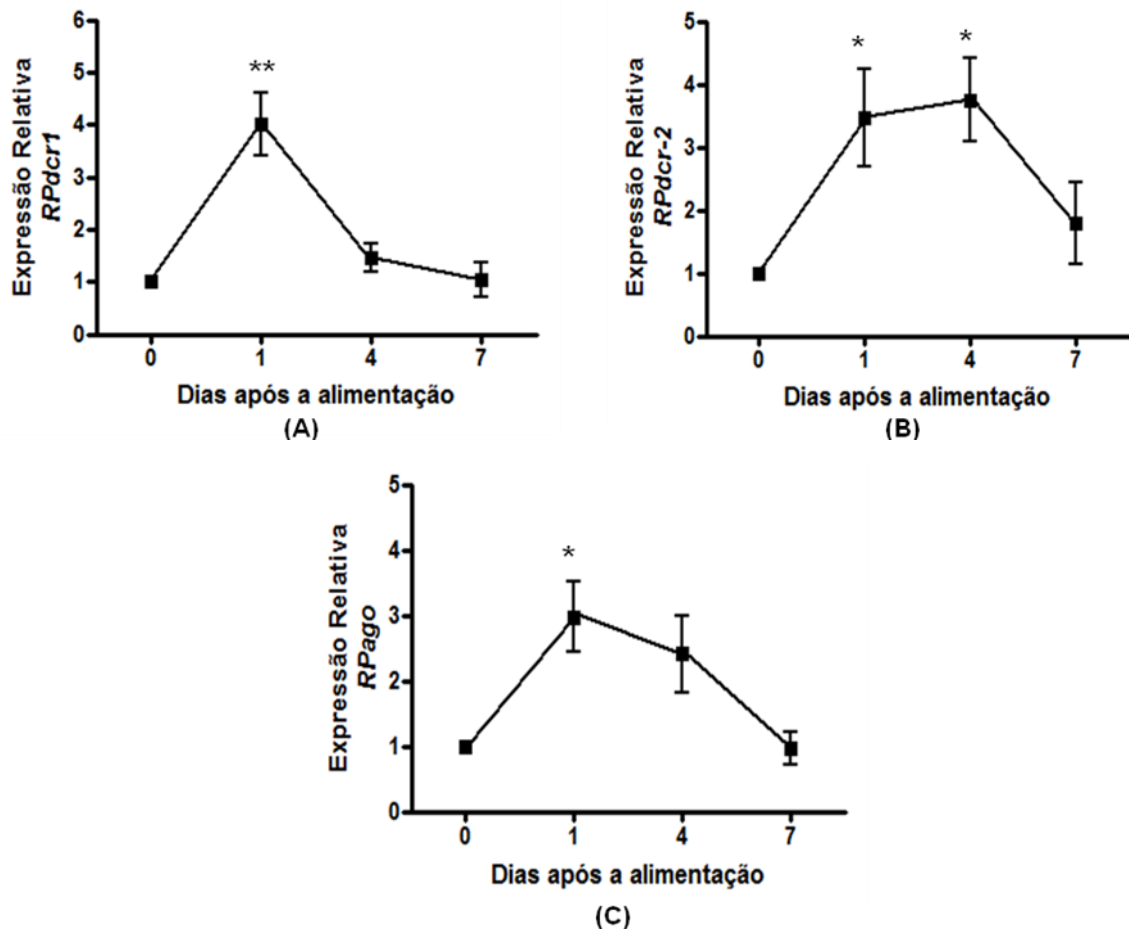


Figura 16: Expressão relativa de *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* em corpo gorduroso de *R. prolixus* em resposta à alimentação sanguínea. O RNA total foi extraído de corpos gordurosos de 5 fêmeas adultas em jejum (dia 0) e 1, 4 e 7 dias após a 1ª alimentação sanguínea como adultas. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase I e então utilizadas para a síntese de cDNA, como descrito em Materiais e Métodos. A qPCR foi realizada utilizando-se os iniciadores específicos desenhados para *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* de *R. prolixus*. A amplificação do gene *RpEF*, um fator de alongamento envolvido com a síntese de proteínas, foi utilizado como controle positivo. Os níveis de expressão dos genes são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0). Resultados são média \pm S.E.M para 3 determinações independentes. (*) e (**) significam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente, quando comparados ao valor de jejum (0) por teste ANOVA seguido de teste de Tukey.

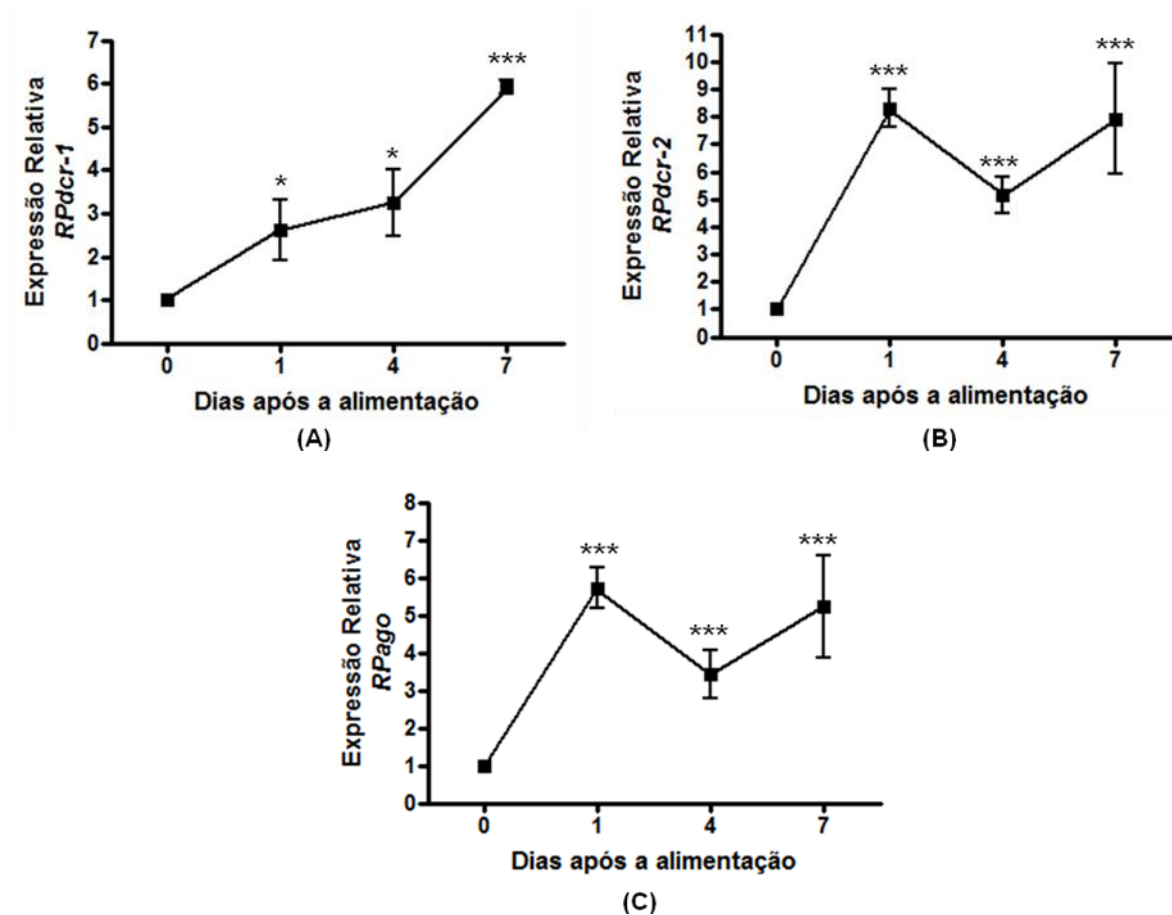


Figura 17: Expressão relativa de *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* em intestino médio anterior de *R. prolixus* em resposta à alimentação sanguínea. O RNA total foi extraído de intestinos médios anteriores de 5 fêmeas adultas em jejum (dia 0) e 1, 4 e 7 dias após a 1ª alimentação sanguínea como adultas. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase I e então utilizadas para a síntese de cDNA, como descrito em Materiais e Métodos. A qPCR foi realizada utilizando-se os iniciadores específicos desenhados para *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* de *R. prolixus*. A amplificação do gene *RpEF*, um fator de alongamento envolvido com a síntese de proteínas, foi utilizado como controle positivo. Os níveis de expressão dos genes são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0). Resultados são média \pm S.E.M para 3 determinações independentes. (*) e (***) significam $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente, quando comparados aos valores de jejum por teste ANOVA seguido de teste de Tukey.

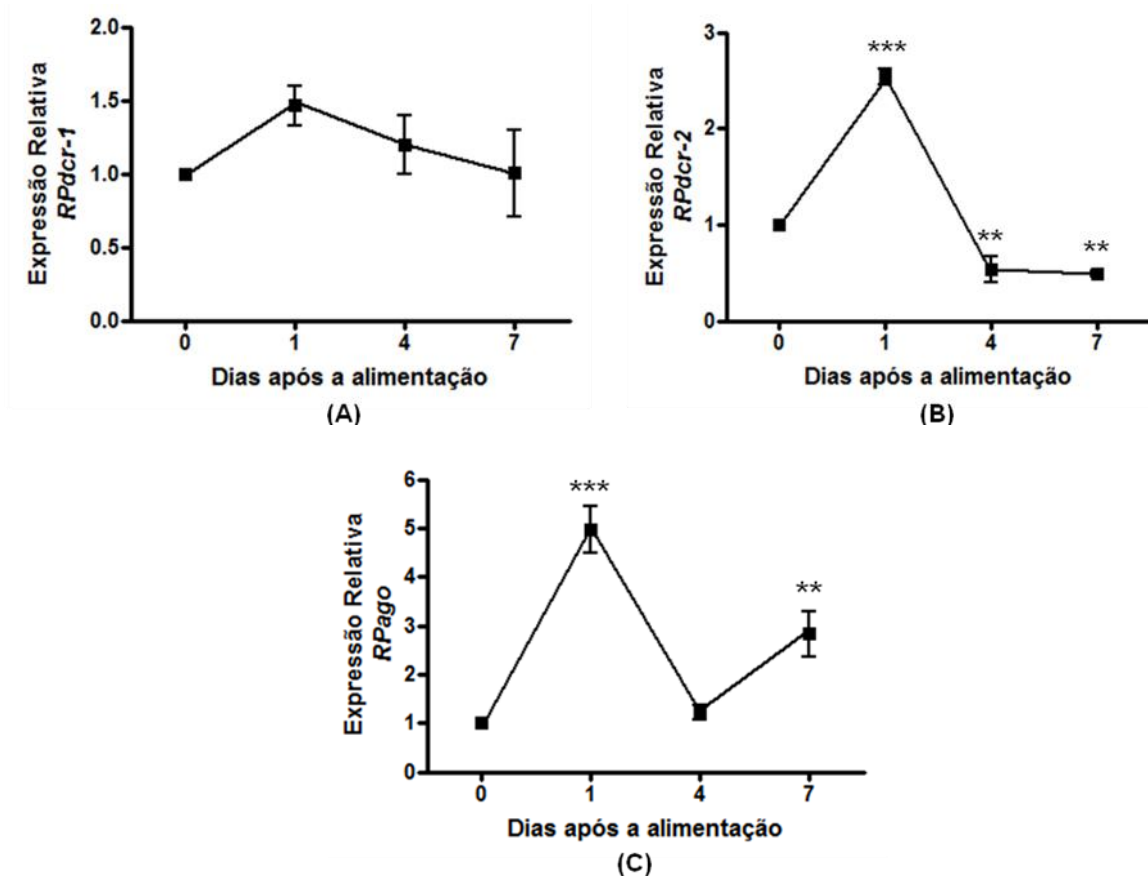


Figura 18: Expressão relativa de *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* em intestino médio posterior de *R. prolixus* em resposta à alimentação sanguínea. O RNA total foi extraído de intestinos médios posteriores de 5 fêmeas adultas em jejum (dia 0) e 1, 4 e 7 dias após a 1ª alimentação sanguínea como adultas. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase I e então utilizadas para a síntese de cDNA, como descrito em Materiais e Métodos. A qPCR foi realizada utilizando-se os iniciadores específicos desenhados para *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* de *R. prolixus*. A amplificação do gene *RpEF*, um fator de alongamento envolvido com a síntese de proteínas, foi utilizado como controle positivo. Os níveis de expressão dos genes são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0). Resultados são média \pm S.E.M para 3 determinações independentes. (**) e (***) significam $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, quando comparado aos valores de jejum por teste ANOVA seguido de teste de Tukey.

Esses resultados sugerem que a alimentação sanguínea é capaz de induzir o aumento da transcrição dos genes *dcr-1*, *dcr-2* e *ago2A*, envolvidos com a via de RNAi, na maioria dos tecidos analisados.

5.4- Expressão dos genes em diferentes órgãos de *R. prolixus* em resposta à injeção de dsRNA não relacionada (dsMAL)

Para analisar se a expressão dos genes *ago2A*, *dcr1* e *dcr2* é regulada pela presença de dsRNAs exógenas, insetos foram injetados com dsRNA não relacionada (dsMAL). Com isso, buscou-se analisar a resposta do gene à presença de uma dsRNA que não desencadeasse silenciamento de nenhum gene específico de *R. prolixus*. Todos os dados de expressão relativa mostrados a partir daqui são médias de duas determinações independentes e precisam ser repetidos para que os testes estatísticos possam ser realizados.

5.4.1- Expressão dos genes em resposta à injeção de diferentes concentrações de dsMAL

A fim de investigar se a expressão dos genes *ago2A*, *dcr1* e *dcr2*, nos tecidos de *R. prolixus*, seria induzida por dsMAL, de forma dependente da concentração, hemocele de fêmeas foram injetadas com 1 µg, 2 µg e 4 µg de dsMAL 25 dias após a 1ª alimentação. Fêmeas não injetadas foram usadas como controle (0). Transcorridas 12 horas após as injeções, os tecidos dos insetos foram dissecados, com posterior extração de RNA e síntese de cDNA. A expressão relativa dos três genes de interesse foram medidas através de qPCR, usando os cDNAs de corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior. A Figura 19A mostra que o gene *dcr1* apresentou aproximadamente o dobro de expressão no corpo gorduroso após a injeção de 1 µg de dsMAL, o que não ocorreu com a injeção de 2 µg e 4 µg de dsMAL. Em intestino médio anterior (Figura 19B) e médio posterior (Figura 19C) a injeção de dsMAL não elevou o nível de expressão de *dcr1*. Ao contrário, o nível de expressão de *dcr1* foi diminuído nos cDNAs de intestino médio anterior e posterior de insetos injetados com qualquer concentração de dsMAL, se comparados com o controle. Em contrapartida, a expressão do gene *dcr2* foi consideravelmente aumentada em resposta a diferentes concentrações de dsMAL em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior. Os dois últimos tecidos apresentaram aumento da expressão de *dcr2* concomitante ao aumento da concentração de dsMAL (Figuras 20B e 20C), ao contrário de corpo gorduroso, em que a resposta à dsMAL parece não ter sido dose dependente (Figura 20A). Essas observações indicam que o gene *dcr2* pode estar relacionado com a via de siRNA, atuando na resposta à presença de dsRNAs exógenas.

A expressão do gene *ago2A* foi aumentada em torno de 1,5 vezes em corpo gorduroso de insetos injetados com 1 μ g de dsMAL (Figura 21A). A expressão do mesmo gene foi aumentada em torno de 2,5 vezes em intestino médio posterior (Figura 21C) de insetos injetados tanto com 1 μ g quanto com 4 μ g de dsMAL. No intestino médio anterior a expressão de *ago2A* não foi alterada (Figura 21B), mostrando que este gene não respondeu ao aumento da concentração de dsMAL nesse tecido.

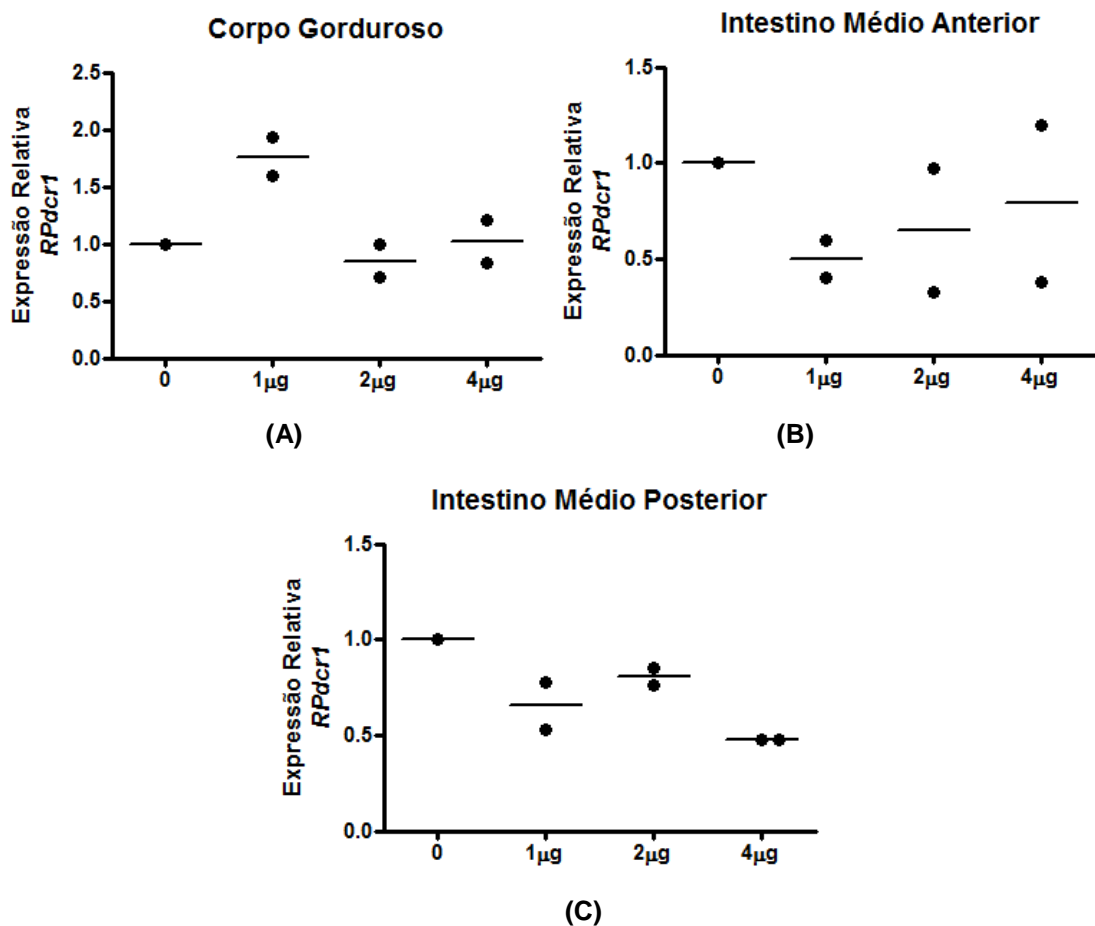


Figura 19: Expressão relativa de *dcr1* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de *R. prolixus* em resposta à injeção de diferentes concentrações de dsMAL. Fêmeas 25 dias após a 1^a alimentação tiveram 1 μ g, 2 μ g e 4 μ g de dsMAL injetados na hemocèle. Fêmeas não injetadas foram usadas como controle (0). Após a extração de RNA dos tecidos, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I e então utilizadas para a síntese de cDNA, como descrito em Materiais e Métodos. Os níveis de expressão do gene *RPdcr1* são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0). O gene *RPEF*, um fator de alongamento envolvido com a síntese de proteínas, foi utilizado como gene de referência. Resultados são médias de 2 determinações independentes.

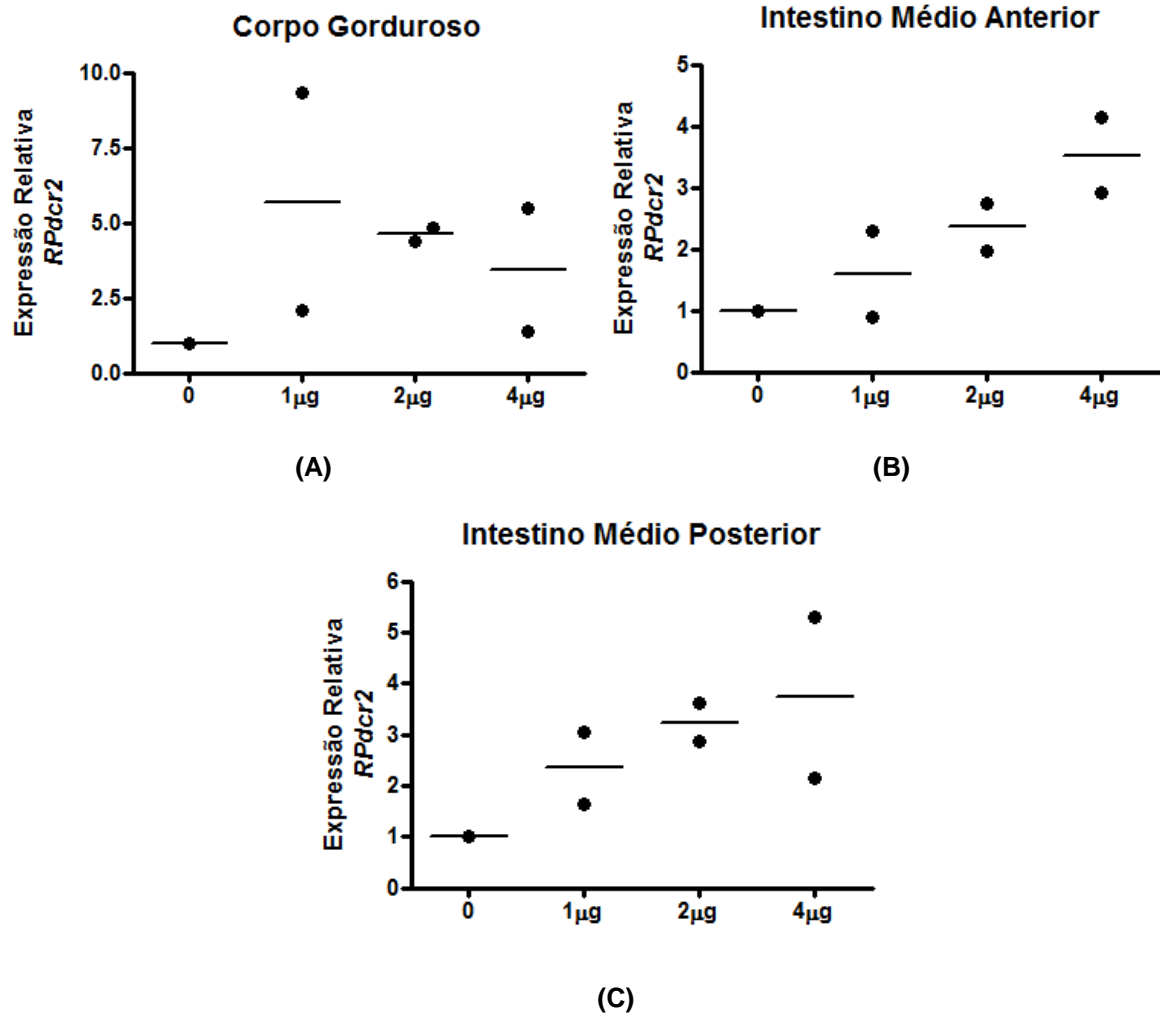


Figura 20: Expressão relativa de *dcr2* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de *R. prolixus* em resposta à injeção de diferentes concentrações de dsMAL. Fêmeas 25 dias após a 1ª alimentação tiveram 1µg, 2µg e 4µg de dsMAL injetados na hemocele. Fêmeas não injetadas foram usadas como controle (0). Após a extração de RNA dos tecidos, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I e então utilizadas para a síntese de cDNA, como descrito em Materiais e Métodos. Os níveis de expressão do gene *RPdcr2* são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0). O gene *RPEF*, um fator de alongamento envolvido com a síntese de proteínas, foi utilizado como gene de referência. Resultados são médias de 2 determinações independentes.

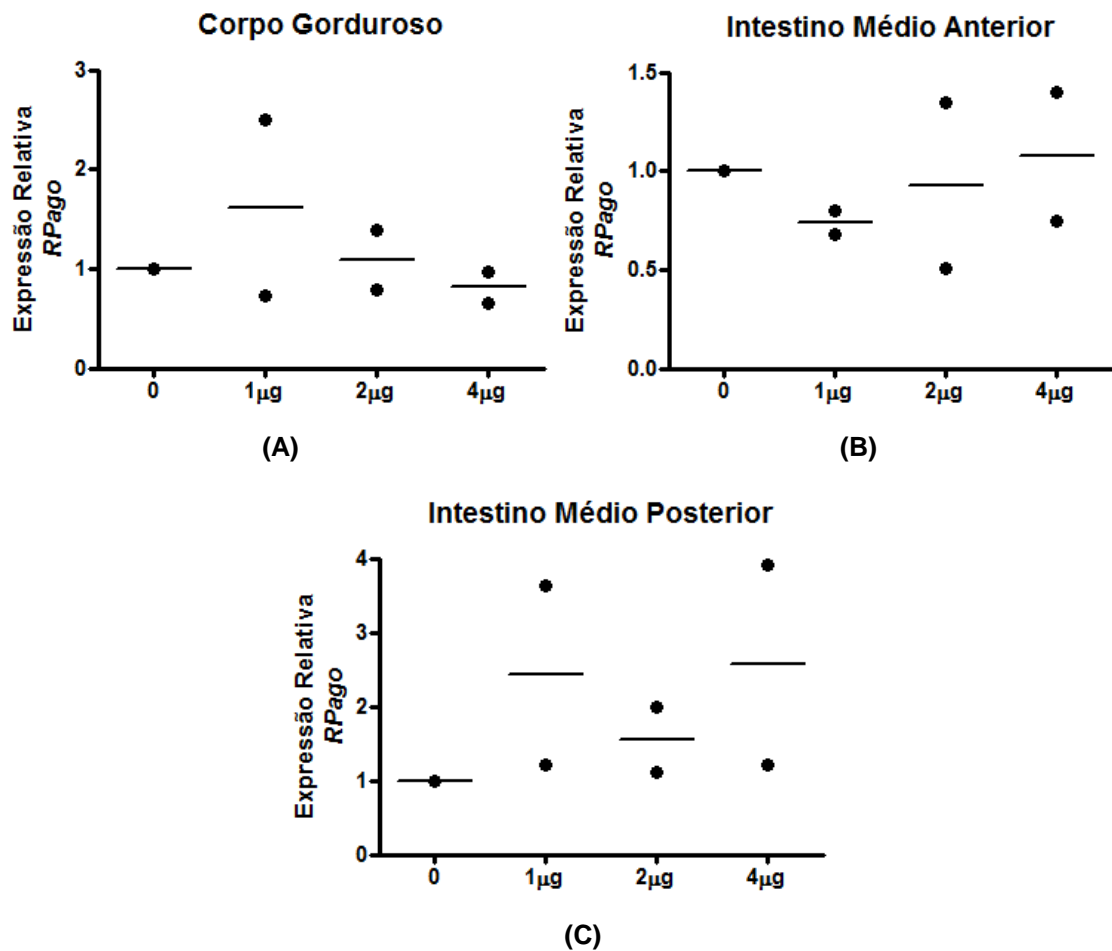


Figura 21: Expressão relativa de *ago2A* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de *R. prolixus* em resposta à injeção de diferentes concentrações de dsMAL. Fêmeas 25 dias após a 1ª alimentação tiveram 1µg, 2µg e 4µg de dsMAL injetados na hemocela. Fêmeas não injetadas foram usadas como controle (0). Após a extração de RNA dos tecidos, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I e então utilizadas para a síntese de cDNA, como descrito em Materiais e Métodos. Os níveis de expressão do gene *RPago2A* são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0). O gene *RPEF*, um fator de alongamento envolvido com a síntese de proteínas, foi utilizado como gene de referência. Resultados são médias de 2 determinações independentes.

5.4.2- Expressão dos genes em diferentes tempos após a injeção de dsMAL

Para investigar o perfil de resposta da expressão dos genes após a injeção de dsMAL, hemocele de fêmeas em jejum foram injetadas com 1µg de dsMAL e seus tecidos foram coletados no momento da injeção (0), 1/2, 1 e 4 dias após a injeção. Os níveis dos genes *dcr1*, *dcr2* e *ago2A* foram analisados por qPCR utilizando cDNA de corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior. No corpo gorduroso, o nível de expressão do gene *dcr1* aumentou 2 vezes em relação ao controle meio dia após a injeção de dsMAL e esse nível diminuiu para próximo de 1,5 nos dias 1 e 4 após a injeção de dsMAL (Figura 22A). As figuras 22B e 22C mostram que, a expressão do gene *dcr1* diminuiu em relação ao controle, desde o momento da injeção (0) até o 4º dia após a injeção de dsMAL, em intestino médio anterior e posterior.

Conforme mostrado anteriormente, a expressão do gene *dcr2* variou consideravelmente em resposta à injeção de dsMAL (Figura 20). Nos 3 tecidos analisados, a expressão de *dcr2* é mantida elevada entre 1/2 e 1 dia após a injeção de dsMAL, apresentando diminuição de expressão até o 4º dia após a injeção em corpo gorduroso (Figura 23A) e intestino médio anterior (Figura 23B). No intestino médio posterior, o 4º dia é o que apresenta maior nível de expressão relativa de *dcr2* entre os tempos analisados (Figura 23C). O aumento de expressão de *dcr2* chega a 10, 3 e 20 vezes, respectivamente, em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior (Figura 23) desafiados com dsMAL, o que indica respostas tecido-específica do gene *dcr2*.

O nível de expressão do gene *ago2A* foi aumentado em corpo gorduroso já no momento da injeção de dsMAL, sendo este nível mantido no 1º dia após a injeção e retornando próximo ao nível de expressão do controle somente no 4º dia após a injeção (Figura 24A). Foi visto que o nível de expressão de *ago2A* foi pouco alterado em resposta à dsMAL no intestino médio anterior 12 h, 1 e 4 dias após a injeção de dsMAL (Figura 24B). Em contrapartida, em intestino médio posterior, a expressão de *ago2A* duplicou 12 h após a injeção, diminuiu no 1º dia em torno de 25% em relação a 12h e retornou ao mesmo nível de 12h no 4º dia após a injeção de dsMAL (Figura 24C).

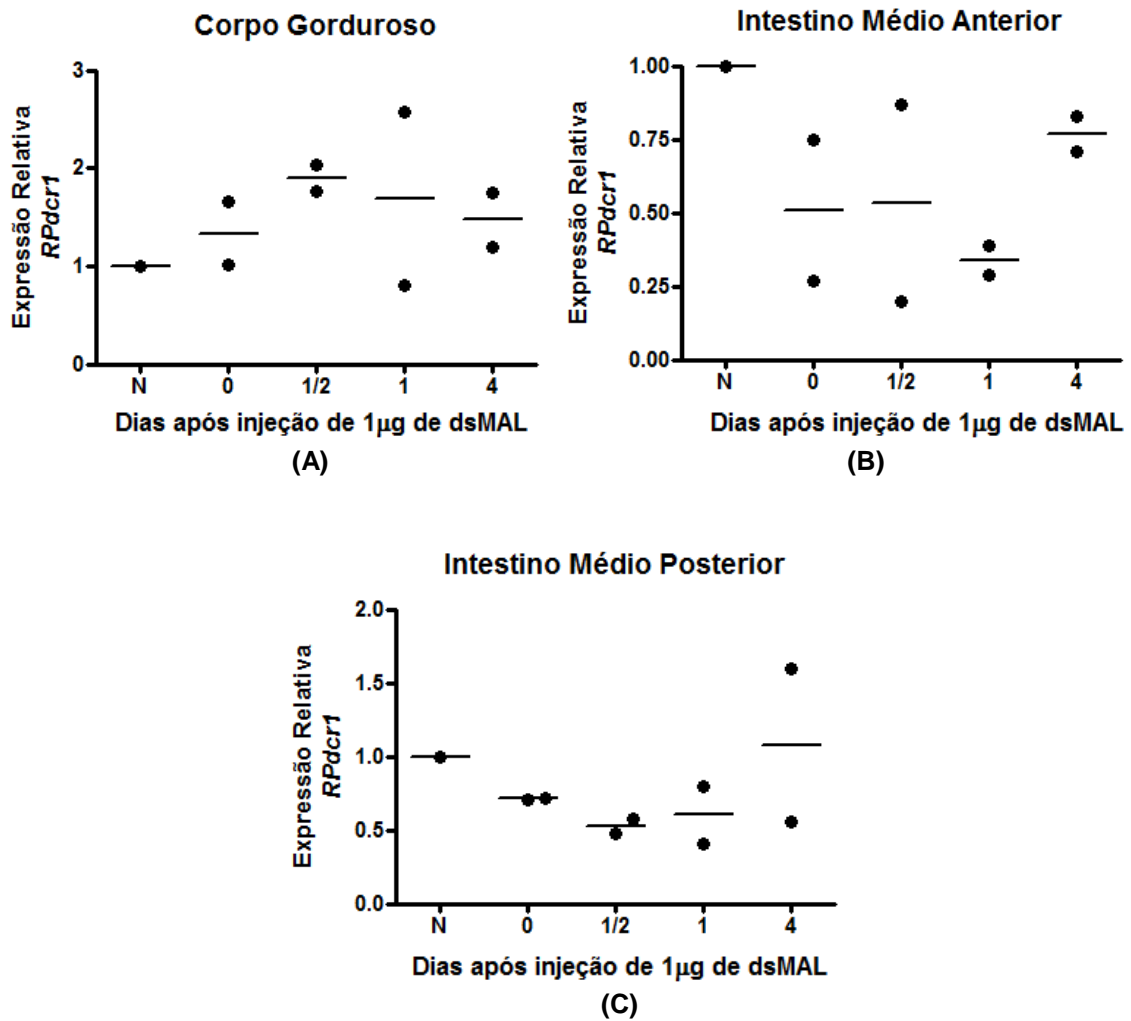


Figura 22: Expressão relativa de *dcr1* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de *R. prolixus* dias após a injeção de dsMAL. Fêmeas 25 dias após a 1^a alimentação tiveram 1 μ g de dsMAL injetados na hemocele. Fêmeas não injetadas foram usadas como controle (N). Após a extração de RNA dos tecidos, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I e então utilizadas para a síntese de cDNA, como descrito em Materiais e Métodos. Os níveis de expressão do gene *RPdcr1* são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0). O gene *RPEF*, um fator de alongamento envolvido com a síntese de proteínas, foi utilizado como gene de referência. Resultados são médias de 2 determinações independentes.

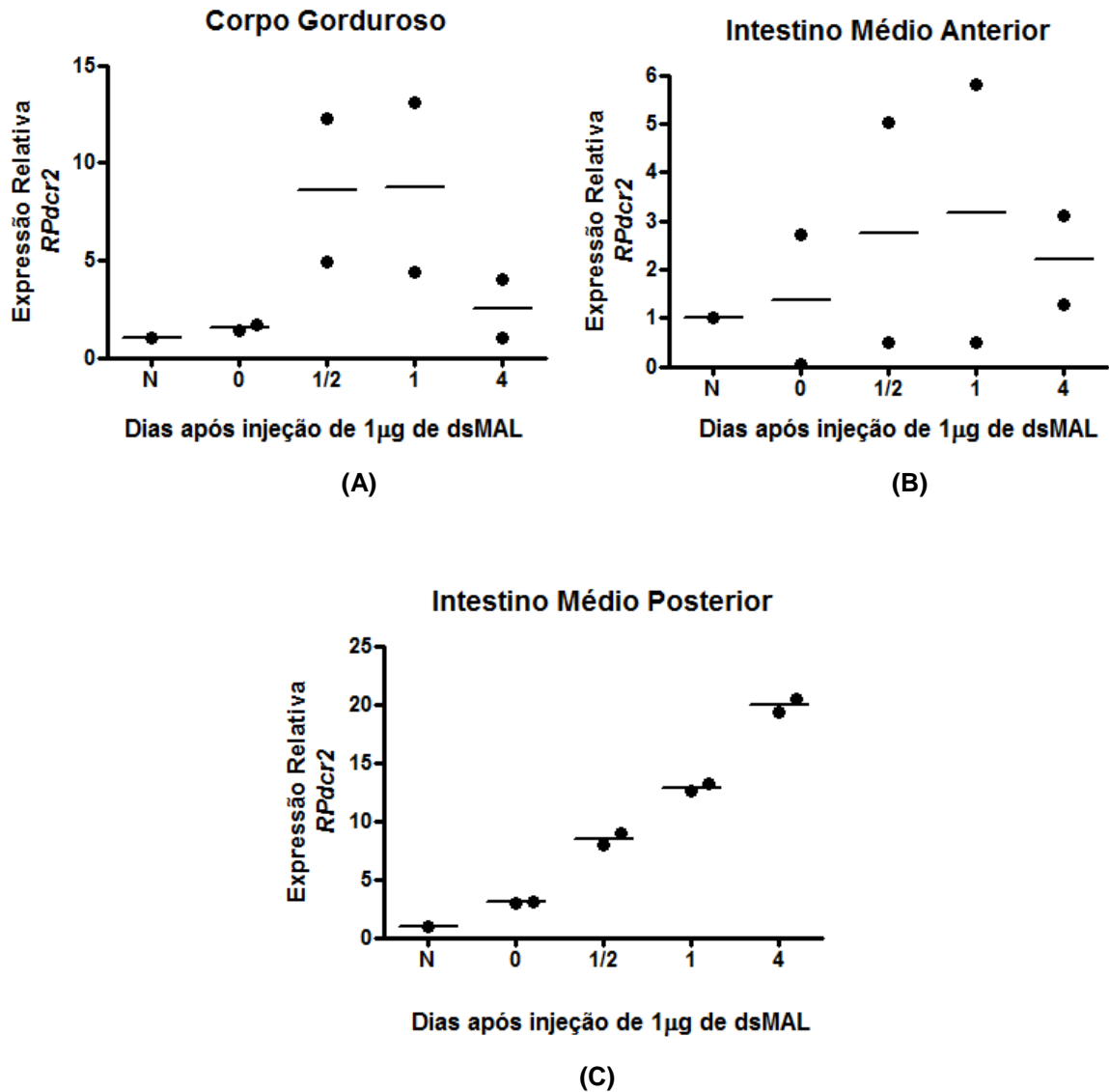


Figura 23: Expressão relativa de *dcr2* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de *R. prolixus* dias após a injeção de dsMAL. Fêmeas 25 dias após a 1ª alimentação tiveram 1µg de dsMAL injetados na hemocele. Fêmeas não injetadas foram usadas como controle (N). Após a extração de RNA dos tecidos, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I e então utilizadas para a síntese de cDNA, como descrito em Materiais e Métodos. Os níveis de expressão do gene *RPdcr2* são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0). O gene *RPEF*, um fator de alongamento envolvido com a síntese de proteínas, foi utilizado como gene de referência. Resultados são médias de 2 determinações independentes.

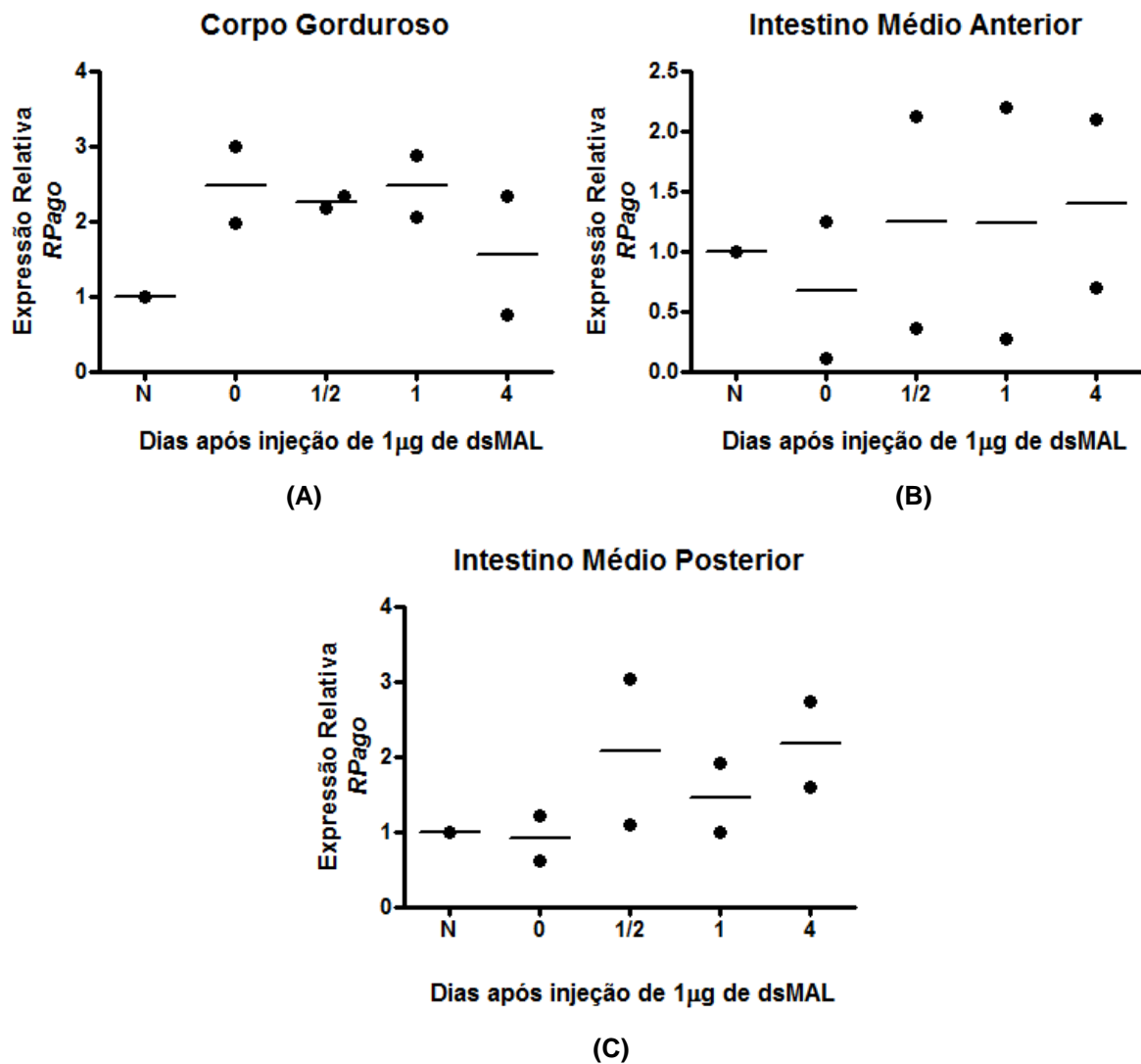


Figura 24: Expressão relativa de *ago2A* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e intestino médio posterior de *R. prolixus* dias após a injeção de dsMAL. Fêmeas 25 dias após a 1^a alimentação tiveram 1 μ g de dsMAL injetados na hemocele. Fêmeas não injetadas foram usadas como controle (N). Após a extração de RNA dos tecidos, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I e então utilizadas para a síntese de cDNA, como descrito em Materiais e Métodos. Os níveis de expressão do gene *RPago2A* são representados em relação ao valor obtido para o controle (1,0). O gene *RPEF*, um fator de alongamento envolvido com a síntese de proteínas, foi utilizado como gene de referência. Resultados são médias de 2 determinações independentes.

Esses resultados mostram que houve aumento de expressão gênica, principalmente de *dcr2* em corpo gorduroso e intestino médio de insetos desafiados com dsMAL. Se comparados ao gene *dcr2*, o aumento de expressão dos genes *dcr1* e *ago2A* é menor quanto à presença de dsMAL. Por isso, os dois últimos genes podem não estar relacionados com a resposta a dsRNAs exógenas. A resposta à dsMAL não foi dose dependente em todos os tecidos. Além disso, o aumento de expressão não foi sincronizado em todos os tecidos, já que o aumento da expressão dos genes em cada um deles ocorreu em momentos diferentes.

5.5- Detecção de dsRNAs nos tecidos de *R. prolixus*

5.5.1- Detecção de dsRNAs após ensaio *in vitro* com proteínas solúveis de corpo gorduroso, intestino médio e ovário

Um ensaio *in vitro* foi realizado a fim de verificar a integridade de dsRNAs após incubações com proteínas extraídas de tecidos de *R. prolixus*. A Figura 25A mostra que dsRNAs foram detectadas 24h após serem incubadas com proteínas solúveis de intestino médio anterior e de corpo gorduroso, ao contrário de dsRNAs incubadas com proteínas solúveis de ovário, que após 24h não são mais detectadas (Figura 25B). Como mostrado na Figura 26, dsRNAs não relacionadas (dsMAL) e dsRNA específica (dsGLU) também foram detectadas 24h após serem incubadas com proteínas solúveis do intestino médio posterior. Esses resultados podem indicar a presença de RNases no ovário, que estão ausentes no corpo gorduroso e no intestino médio de *R. prolixus*. Outros estudos precisam ser feitos a fim de se compreender melhor o que acontece com as dsRNAs no ovário do inseto.

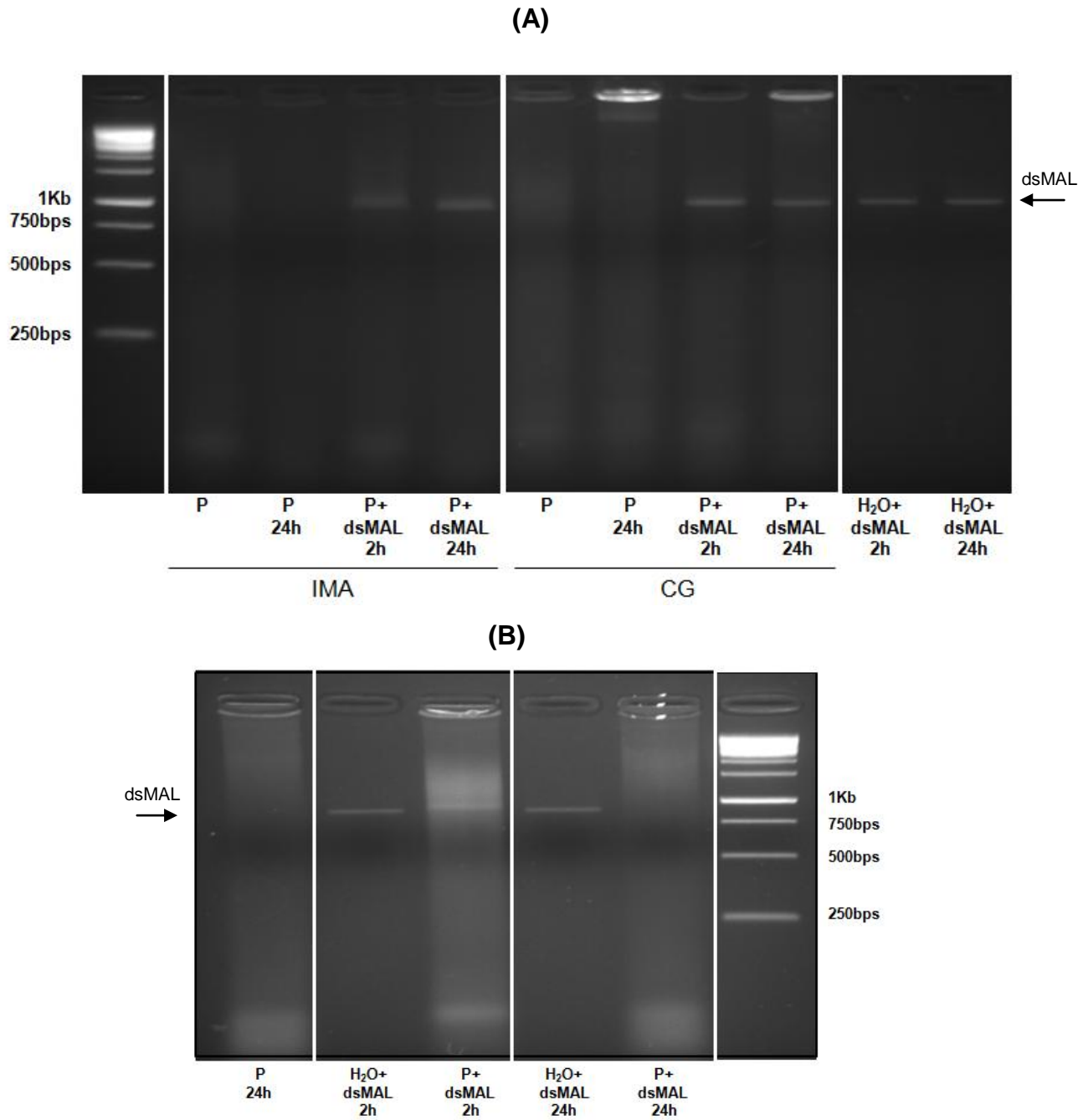


Figura 25: Detecção de dsRNAs após ensaio *in vitro* com proteínas solúveis de intestino médio anterior, corpo gorduroso e ovário de *R. prolixus*. (A) 20 μ g de proteínas solúveis de 10 intestinos médio anteriores (IMA), 10 corpos gordurosos (CG) e (B) 10 ovários de fêmeas em jejum foram incubados, na presença de água, com 200ng de dsMAL (P+dsMAL) por 2 e 24h a 28 °C. Proteínas solúveis dos respectivos tecidos incubadas com água por 24h (P24h) ou não incubadas (P) e água incubada com dsMAL (H₂O+dsMAL) também por 2 e 24h a 28 °C foram usados como controles. As imagens mostradas são dois géis de agarose representativos para dois experimentos independentes. Tamanhos das dsRNAs: dsMAL 1Kb (setas).

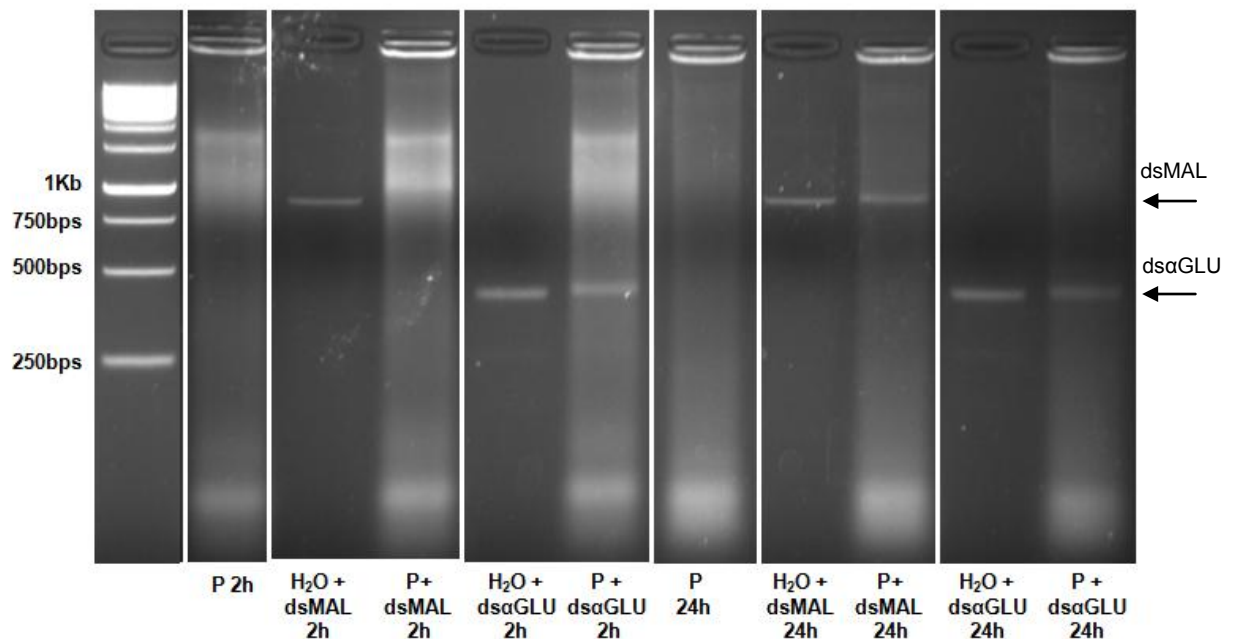


Figura 26: Detecção de dsRNAs após ensaio *in vitro* com proteínas solúveis de intestino médio posterior de *R. prolixus*. Aproximadamente 20µg de proteínas solúveis de intestinos médio posteriores de 10 fêmeas em jejum foram incubadas, na presença de água, com 200ng de dsMAL (P+dsMAL) ou com 200ng de dsαGLU (P+dsαGLU) por 2 e 24h a 28 °C. Proteínas solúveis de intestinos médio posteriores incubadas com água por 2h (P2h) e por 24h (P24h) e água incubada com dsMAL (H₂O+dsMAL) e dsαGLU (H₂O+dsαGLU) foram usadas como controles. A imagem mostrada é um gel de agarose representativo para dois experimentos independentes. Tamanhos das dsRNAs: dsMAL 1Kb e dsαGLU 400pb (setas).

5.5.2- Detecção de dsRNAs após ensaio *ex vivo* com hemolinfa

Para verificar a persistência de dsRNAs na hemolinfa de *R. prolixus*, dsMAL e dsRHBP foram incubadas com hemolinfa por 2h. A dsRHBP é uma dupla-fita construída para o silenciamento da RHBP, a proteína ligadora de heme do *R. prolixus*, que está presente na hemolinfa e no ovário do inseto. A Figura 27A mostra que após 2h de incubação tanto a dsRNA não relacionada (dsMAL) quanto a dsRNA específica para *R. prolixus* (dsRHBP) não foram detectadas na hemolinfa.

A partir desse resultado, tempos menores que 2h após a incubação foram analisados. Já no momento da incubação da hemolinfa com dsMAL (HL+dsMAL 0'), a mesma não foi detectada nem a 28 °C nem a 60 °C (HL 60°+dsMAL 0') (Figura 27B). Isso pode indicar a presença de uma ou várias RNAses solúveis na hemolinfa

que possivelmente são muito ativas nestas temperaturas, podendo atuar no processamento de dsRNAs de forma rápida e eficiente.

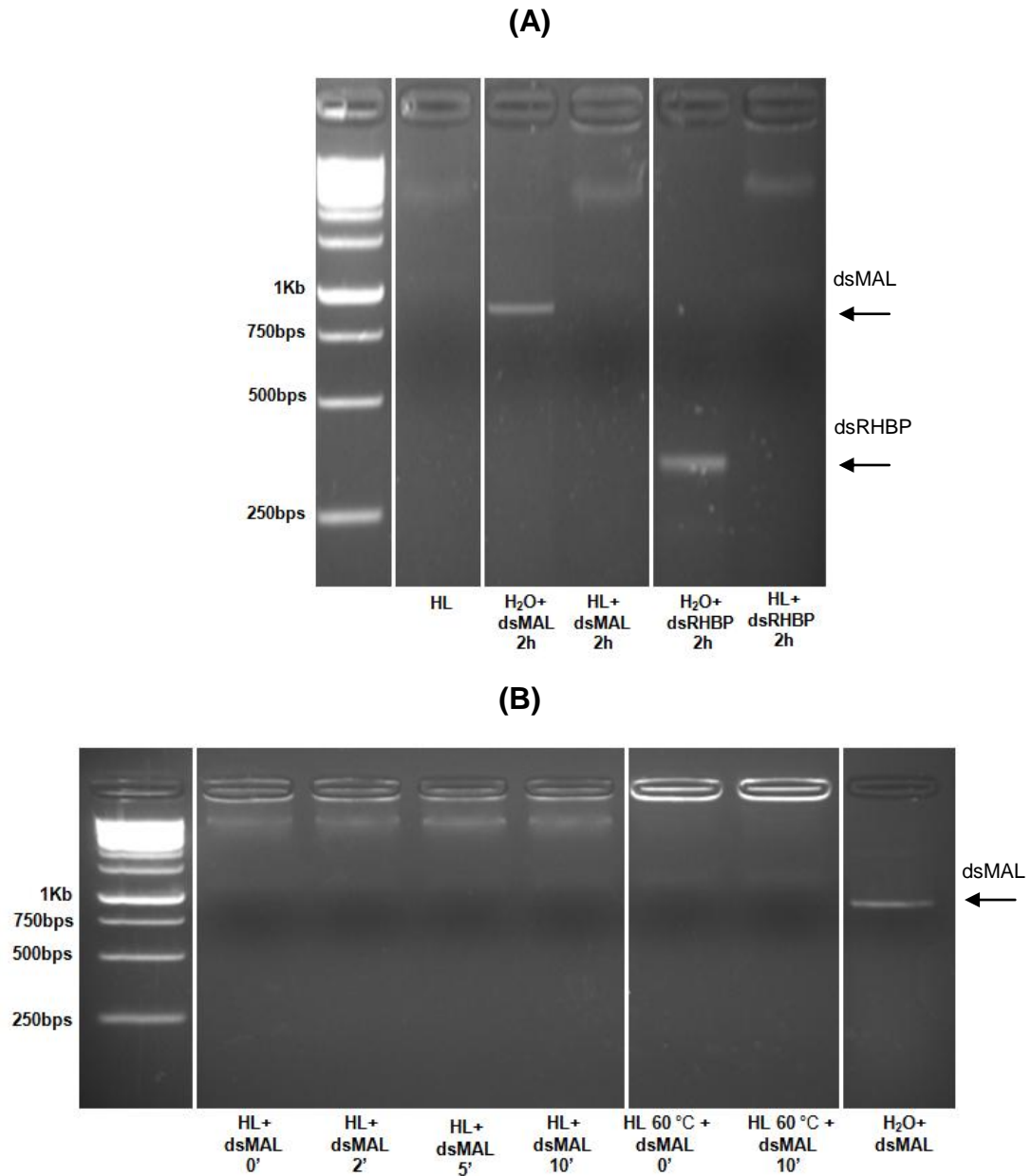


Figura 27: Ensaio *ex vivo* de incubação de dsRNAs com hemolinfa de *R. prolixus*.

Após 10 dias da alimentação, a hemolinfa de 10 fêmeas foi coletada na presença de feniltiouréia. (A) Foram incubadas 40 µg de proteínas da hemolinfa (equivalente a 1,6 µL de hemolinfa), na presença de água, com 200 ng de dsMAL (HL+dsMAL) ou com 200 ng de dsRHBP (HL+dsRHBP) durante 2h. (B) Hemolinfa foi incubada com dsMAL por 0, 2, 5, 10 minutos a 28 °C e durante 0 e 10 minutos a 60 °C. Hemolinfa incubada com água (HL) e água incubada com dsMAL (H₂O+dsMAL) e dsRHBP (H₂O+dsRHBP) foram usados como controles. As imagens mostradas são dois géis de agarose representativos para dois experimentos independentes. Tamanhos das dsRNAs: dsMAL 1Kb e dsRHBP 300pb (setas).

6- DISCUSSÃO

6.1 - Identificação de genes das vias de RNAi

Com a disponibilidade dos dados gerados pelo sequenciamento do genoma de *R. prolixus*, RNAi tem sido usado por vários grupos como ferramenta para elucidar a função de genes desse inseto através do silenciamento gênico induzido pela introdução de uma dsRNA. Além disso, a partir desses dados também é possível investigar os genes que eventualmente estão envolvidos com o sucesso de *R. prolixus* em responder ao sinal de silenciamento gênico. A partir daí, vários aspectos dos mecanismos de RNAi nesse inseto poderão ser esclarecidos.

Um dos objetivos do trabalho foi identificar genes envolvidos na via do RNAi em *R. prolixus*. Estudos mostraram que insetos como *D. melanogaster*, *T. castaneum* e *B. germanica* apresentam duas proteínas Dicer: Dicer1, que atua na resposta a dsRNAs endógenas, e Dicer2, que atua contra dsRNAs exógenas (LEE et al., 2004; LOZANO et al., 2012; TOMOYASU et al., 2008). O nematódeo *C. elegans* possui uma única Dicer, a qual participa da biogênese de ambos miRNAs e siRNAs (BERNSTEIN et al., 2001; KETTING et al., 2001; KNIGHT e BASS, 2001). A partir dos dados disponíveis do genoma de *R. prolixus*, foram encontrados 2 genes que codificam proteínas Dicer. Além destes, foram encontrados 6 genes que codificam Argonautas e um gene que codifica Drosha (Tabela 3). Três genes (*dcr1*, *dcr2* e *ago2A*) foram testados por PCR, quanto à presença de transcritos em ovário, corpo gorduroso, intestino médio anterior e posterior. Os transcritos dos três genes foram detectados nos quatro órgãos analisados (Figura 15).

As proteínas Dicer de *R. prolixus* foram denominadas Dicer1 (RPdcr1) e Dicer2 (RPdcr2), por terem apresentado alta similaridade, respectivamente, com proteínas Dicer1 de *A. gambiae*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*, *M. rotundata* e *T. castaneum* e com proteínas Dicer2 de *B. germanica*, *T. castaneum*, *D. melanogaster* e *A. gambiae*. Além disso, as duas Dicer de *R. prolixus* apresentaram alta similaridade com Dicer1 de *C. elegans* (Anexos 1 e 2).

Através da análise no portal de Bioinformática Expasy, foi possível prever em RPdcr1 todos os domínios característicos de proteínas Dicer (Figura 6A). RPdcr2 contém quase todos os domínios, faltando apenas o dsRBD carboxi-terminal (Figura 7A), que também está ausente na Dicer2 de *T. castaneum* (TOMOYASU et al., 2008). As árvores filogenéticas mostraram que RPdcr1 e RPdcr2 apresentaram

maior similaridade com Dicer1 de *D. melanogaster* (Figura 6C) e Dicer 2 de *B. germanica* (Figura 7C) respectivamente. Além disso, o gene *RPdcr2* parece estar envolvido com a resposta a dsRNAs exógenas, já que sua expressão aumentou consideravelmente em corpo gorduroso, intestino médio anterior e posterior após a injeção de dsMAL na hemolinfa de *R. prolixus* (Figuras 21 e 24), ao contrário de *RPdcr1* que não apresenta a mesma resposta à dsMAL naqueles tecidos (Figuras 20 e 23).

Das 6 sequências ortólogas de argonautas encontradas em *R. prolixus* até o momento, 2 estão em processo de análise. Apesar de argonautas apresentarem um domínio N-terminal e um MID, além dos domínios PIWI e PAZ (Figura 4), as 4 argonautas analisadas através do portal de Bioinformática Expasy apresentaram apenas os domínios PIWI e PAZ nessas sequências (Figura 10). Como mencionado anteriormente, as argonautas podem ser classificadas em 3 sub-famílias: AGO, PIWI e WAGO (TOLIA e JOSHUA-TOR, 2007; CZECH e HANNON, 2011). As sequências de *RPago1*, *RPago2A* e *RPago2B* apresentaram similaridade com proteínas piwi e aubergine de outros organismos (Figuras 11, 12 e 13; anexos 4, 5 e 6), enquanto *RPago3* apresentou similaridade com argonautas de insetos e também com *piwi* de *A. aegypti* e *hiwi* de *Homo sapiens* (Figura 14; anexo 7). Esses dados podem indicar que essas sequências fazem parte da sub-família PIWI, já que em *D. melanogaster* os membros dessa sub-família incluem proteínas PIWI, aubergine e argonauta3 (KLATTENHOFF e THEURKAUF, 2008). O genoma humano possui 4 genes que codificam 4 proteínas PIWI: HIWI (também conhecida como PIWIL1), HILI (também conhecida como PIWIL2), HIWI3 (também conhecida como PIWIL3) e HIWI2 (também conhecida como PIWIL4) (PETERS e MEISTER, 2007).

Além dos genes identificados nesse trabalho, foram encontrados, também no genoma de *R. prolixus*, sequências com alta similaridade a *armitage*, *trbp*, *pasha*, *r2d2* e *spindle2* de insetos (Ricardo N. Araujo, comunicação pessoal). Até o momento, não foram encontrados no genoma de *R. prolixus* os homólogos de RdRP e Sid-1 (Tabela 3), que estão envolvidas com a disseminação do sinal de silenciamento em *C. elegans*. Isso corrobora a hipótese de que os genes envolvidos com o RNAi sistêmico de *R. prolixus* não são os mesmo que desempenham essa função em *C. elegans*. O gene *RdRP* não é conservado em animais, estando ausente também em insetos como *D. melanogaster* e *T. castaneum* (TOMOYASU et

al., 2008). Em *D. melanogaster*, uma subunidade da RNA polimerase II, conhecida como D-elp1, tem atividade RdRP, sendo capaz de produzir secundários siRNAs endógenos responsáveis por amplificar o sinal de silenciamento (LIPARDI e PATERSON, 2009). Isso comprova que o efeito de persistência de RNAi não é baseado em RdRP em todos os organismos. Também não foram encontrados homólogos de *C3PO*, *Wago* e *Loquacious* (Tabela 3). Este último, codifica a proteína ligadora de dsRNA, LOQ, a qual é par da Dicer1 de *D. melanogaster* (FORSTEMANN et al., 2005). Com os genes identificados até o momento, é possível prever alguns possíveis participantes das vias de miRNA, siRNA e piRNA no *R. prolixus*, esquematizados na Figura 28.

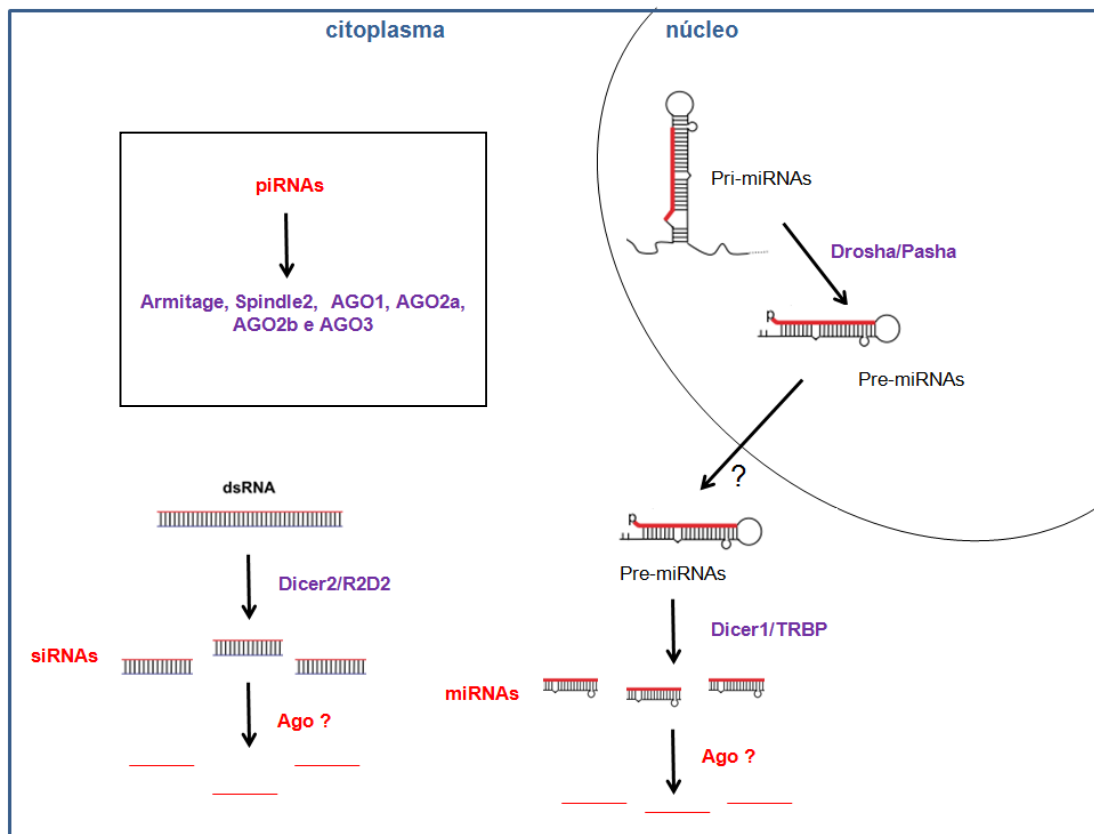


Figura 28: Esquema dos componentes das vias de RNAi em *R. prolixus*. No genoma do *R. prolixus* foram encontradas sequências com similaridade a genes que codificam para proteínas envolvidas com as vias do miRNA (*drosha* e seu par *pasha*; *dicer1* e seu par *trbp*), do siRNA (*dicer2* e seu par *r2d2*) e do piRNA (*armitage*, *spindleE*, *ago1*, *ago2A*, *ago2B* e *ago3*). Os genes *ago* envolvidos com a via de miRNA e siRNA estão em fase de análise. Os genes *armitage*, *trbp*, *pasha*, *r2d2* e *spindle2* foram identificados por Ricardo N. Araujo (UFMG, comunicação pessoal).

6.2 - Resposta à dsRNAs exógenas na expressão gênica

Estudos sobre a via de RNAi em alguns artrópodes mostraram que a expressão dos genes que codificam para as proteínas envolvidas com a via do siRNA tendem a aumentar quando os mesmos são injetados com dsRNAs (GAR BUTT e REYNOLDS, 2012; LOZANO et al., 2012) ou quando infectados com vírus de RNA (ALMEIDA, 2009; AMARAL, 2008; CHEN et al., 2011). No presente trabalho, foi visto que a injeção de dsRNAs na hemolinfa de *R. prolixus* desencadeia um aumento considerável de expressão do gene *dcr2* em corpo gorduroso, intestino médio anterior e posterior (Figuras 21 e 24). Esse aumento parece não ser dependente da dose de dsMAL em corpo gorduroso (Figura 20A), ao contrário dos intestinos médio anterior e posterior, os quais apresentaram aumento de expressão de *dcr2* com o aumento da concentração de dsMAL (Figuras 21B e 21C). Além disso, foi visto que a variação da expressão desse gene ocorreu em níveis e momentos diferentes nos três tecidos analisados. Em corpo gorduroso e intestino médio anterior houve um aumento da expressão de *dcr2* no 1º dia após a injeção de dsMAL, sendo esse aumento de 10 e 3 vezes, respectivamente, em corpo gorduroso e intestino médio anterior. No 4º dia após a injeção, os níveis de expressão de *dcr2* nesses dois tecidos diminuíram em relação ao 1º dia, mas ainda foi o dobro do nível do controle (Figuras 23A e 23B). Em intestino médio posterior, o nível de expressão de *dcr2* foi 15 vezes maior no 1º dia, aumentando para 20 vezes no 4º dia (Figura 23C), o que mostrou que esse tecido apresentou uma resposta de *dcr2* ainda maior e mais tardia que o corpo gorduroso e o intestino médio anterior, já que estes apresentaram diminuição dos níveis de expressão no 4º dia após a injeção de dsMAL, dia em que ocorreu a maior resposta de *dcr2* em intestino médio posterior (Figura 23).

O gene *dcr1* apresentou aproximadamente o dobro de expressão no corpo gorduroso após a injeção de 1µg de dsMAL. Curiosamente, no mesmo tecido, a injeção de 2µg e 4µg de dsMAL manteve os níveis de expressão de *dcr1* próximos ao nível da amostra não injetada (Figura 19A). Em intestino médio (anterior e posterior), a injeção de dsMAL não elevou o nível de expressão de *dcr1*. Ao contrário, o nível de expressão de *dcr1* foi diminuído nos cDNAs de intestino médio anterior e posterior de insetos injetados com qualquer concentração de dsMAL, se comparados com o controle (Figuras 20B e 20C). No corpo gorduroso, o nível de

expressão do gene *dcr1* aumentou 2 vezes em relação ao controle meio dia após a injeção de dsMAL e esse nível diminuiu para próximo de 1,5 nos dias 1 e 4 após a injeção de dsMAL (Figura 22A). Como era de se esperar, nas amostras de insetos injetados, o nível de expressão de *dcr1* em intestino médio (anterior e posterior) diminuiu em relação ao controle desde o momento da injeção até o 4º dia após a injeção de dsMAL (Figuras 22B e 22C). Assim, no intestino médio a injeção com dsMAL regulou negativamente a expressão de *dcr1*, ao contrário do que ocorreu no mesmo tecido com *dcr2*. Já o corpo gorduroso apresentou aumento de expressão desses dois genes em resposta à dsMAL, embora o nível de aumento de *dcr2* tenha sido cerca de 5 vezes maior que o de *dcr1*. Assim, o gene *dcr2* pode estar envolvido com a resposta a dsRNAs exógenas em *R. prolixus*, participando na formação dos siRNAs, enquanto o gene *dcr1* provavelmente está relacionado com a resposta à dsRNAs endógenas, formando miRNAs, já que a resposta em nível de transcrição de *dcr2* à dsMAL foi muito maior que *dcr1* nos tecidos analisados (Figuras 22 e 23).

O gene *ago2A* apresentou aproximadamente o dobro de expressão no corpo gorduroso após a injeção de 1µg de dsMAL. Curiosamente, no mesmo tecido, a injeção de 2µg e 4µg de dsMAL manteve os níveis de expressão de *ago2A* próximos ao nível da amostra não injetada (Figura 21A). Em intestino médio anterior, o nível de expressão de *dcr1* foi menor quando os insetos foram injetados com qualquer concentração de dsMAL, se comparados com o controle (Figura 21B). Esses resultados são bem similares aos resultados para *dcr1* em corpo gorduroso e intestino médio anterior (Figuras 20A e 20B). Entretanto, a variação de expressão de *ago2A* apresentou um perfil diferente em intestino médio posterior, em relação ao que foi visto para *dcr1*. Neste tecido, houve um aumento de mais de 2 vezes no nível de expressão de *ago2A* após a injeção tanto de 1µg quanto de 4µg de dsMAL. Curiosamente, a injeção de 2µg de dsMAL não apresentou o mesmo perfil (Figura 21C). Além disso, os níveis de expressão de *ago2A* foram aumentados em todos os tecidos até o 4º dia após a injeção com dsMAL (Figura 24). O nível do aumento da expressão de *ago2A* foi diferente entre os tecidos, da mesma forma como foi mostrado para os outros genes. No corpo gorduroso, o nível de expressão de *ago2A* mais que duplicou já no momento da injeção (tempo zero) e foi mantido nesse mesmo nível no 1º dia, sofrendo uma diminuição no 4º dia após a injeção de dsMAL (Figura 24A). O intestino médio anterior apresentou um pequeno aumento meio dia

após a injeção e esse aumento foi mantido até o 4º dia após a injeção de dsMAL (Figura 24B). Finalmente, no intestino médio posterior, o nível de expressão de *ago2A* duplicou meio dia após a injeção de dsMAL, apresentando diminuição no 1º dia e voltando ao mesmo nível do meio dia no 4º dia após a injeção de dsMAL (Figura 24C). Esse conjunto de resultados mostram que os tecidos apresentaram, para um mesmo gene, níveis diferentes de aumento de expressão após a injeção de dsMAL, o que indica que cada gene apresenta uma resposta à dsMAL tecido-específica.

Nossos resultados foram similares aos obtidos no estudo realizado por Garbutt e Reynolds (2012) em *Manduca sexta*, que também mostrou aumento dos níveis de transcrição de genes relacionados com via de RNAi, *dicer 2* e *argonata 2*, em resposta à injeção de dsRNA sintetizada para eGFP (dseGFP), um gene que não está presente no genoma de *M. sexta*. Os níveis de expressão de *dicer 2* aumentaram 79, 362 e 395 vezes, respectivamente, em corpo gorduroso, hemócitos e intestino médio, 6 horas após a injeção de dseGFP. Esses níveis caíram para 3, 5 e 7 vezes, respectivamente em corpo gorduroso, hemócitos e intestino médio, 18 horas após a injeção de dseGFP, mostrando que o aumento da transcrição de *dicer 2* em *M. sexta* é rápido e transitório (GARBUTT e REYNOLDS, 2012). Em *R. prolixus* o grau de aumento de expressão de *dcr2*, verificado no presente trabalho, foi menor e mais duradouro do que o observado para o mesmo gene de *M. sexta*.

Um trabalho realizado com ninfas de 5º estágio de *B. germanica* mostrou que o nível de expressão do gene *dcr2* aumentou 5 vezes, 6h após a injeção tanto de dsRNAs não relacionadas a *B. germanica*, quanto de dsRNAs para *dcr2* (dsBGdcr2) e para *dcr1* (dsBGdcr1) do inseto. No último caso, os níveis de *dcr1* diminuíram após 6h da injeção de dsBGdcr1, o que demonstrou o silenciamento de *dcr1*. Em contrapartida, após a injeção de dsBGdcr2, o gene *dcr2* apresentou um aumento de expressão nas primeiras 6 horas, que foi diminuindo gradativamente em relação ao controle a partir do 1º dia pós injeção, o que pode mostrar um silenciamento tardio de *dcr2*. Em *B. germanica*, assim como em *M. sexta* e *R. prolixus*, *dcr2* está diretamente envolvida na resposta à dsRNAs exógenas (LOZANO et al., 2012).

Em *M. sexta*, foi visto também que o gene *argonata 2* apresentou aumento de expressão de 8, 22 e 27 vezes, respectivamente, em corpo gorduroso, hemócitos e intestino médio, 6 horas após a injeção de dseGFP. Após 18 horas da injeção, o

nível de expressão de *argonauta 2* aumentou 10 vezes em corpo gorduroso e diminuiu 5 vezes em hemócitos e intestino médio. Isso mostrou que *argonauta 2*, assim como *dicer 2*, também responde positivamente a dsRNAs exógenas, mas de uma forma mais moderada (GAR BUTT e REYNOLDS, 2012). No presente trabalho, o grau de aumento de expressão de *ago2A* em *R. prolixus* também foi menor do que o observado para o mesmo gene de *M. sexta*. Em corpo gorduroso de *R. prolixus*, o tempo de persistência desse aumento de expressão de *ago2A* foi similar ao mesmo tecido de *M. sexta*, entretanto, foi mais duradouro em intestino de *R. prolixus* do que o observado para o mesmo tecido em *M. sexta*. Vale ressaltar que, até o momento, sabe-se que o genoma de *R. prolixus* apresenta 6 ortólogos de argonautas e apenas um desses genes foram testados nesse trabalho. Assim, é necessário testar os outros genes ortólogos de argonautas, a fim de avaliar se algum deles pode ser mais responsivo à dsRNAs exógenas do que o gene *ago2A* analisado neste trabalho.

Em muitos organismos a imunidade antiviral é mediada pela via de RNAi (DING, 2010). Em *D. melanogaster* foi demonstrado que moscas mutantes para Dicer 2 apresentaram susceptibilidade ao vírus C de *D. melanogaster* e aos vírus Sindbis e Flock House (GALIANA-ARNOUX et al., 2006). Mais tarde, também em *D. melanogaster*, foi visto que Dicer 2 induz a expressão do gene antiviral *Vago* (DEDDOUCHE et al., 2008). Esses trabalhos mostraram que Dicer 2 é elemento chave no reconhecimento da infecção viral na mosca-da-fruta. O silenciamento de *dcr2*, *ago2* e *r2d2* confirmou a resistência viral induzida por dsRNA em mosquitos, demonstrando que esses componentes da via de RNAi são cruciais para limitar a infecção viral e sua disseminação em mosquitos (BLAIR, 2011). No camarão *Litopenaeus vannamei*, foi visto que os níveis de transcritos de *dicer 2* aumentaram após a infecção com vírus da síndrome *White Spot* e também após desafio com dsRNAs não relacionadas a essa espécie (CHEN et al., 2011). Esses trabalhos demonstraram a participação de Dicer 2 e outros componentes da via de RNAi na indução da imunidade antiviral e na resposta eficaz a dsRNAs sintéticas.

R. prolixus não é vetor de arboviroses, havendo até o momento desconhecimento de infecções deste inseto por vírus de RNA. Em contrapartida, a resposta a dsRNAs exógenas mediada por RNAi tem se mostrado bastante eficaz. Hipoteticamente, a via de RNAi de *R. prolixus* pode apresentar uma potente

resposta contra vírus que produzam siRNAs, de forma que os mesmos não consigam completar a infecção.

6.3 - Resposta à alimentação sanguínea

Em estudos de silenciamento gênico realizados em *R. prolixus*, os insetos são mantidos aproximadamente 21 dias sem repasto sanguíneo e após a injeção das dsRNAs específicas para o gene que se quer silenciar, os mesmos são alimentados com sangue (MURY et al., 2010; WALTER-NUNO, 2011). Assim, a alimentação sanguínea parece ser um evento importante para uma resposta satisfatória de silenciamento gênico. Os resultados deste trabalho demonstraram que o repasto sanguíneo é capaz de aumentar a expressão dos genes envolvidos com a via de RNAi de *R. prolixus* em corpo gorduroso (Figura 16), intestino médio anterior (Figura 17) e intestino médio posterior (Figura 18) entre o 1º e o 7º dia após a alimentação sanguínea. Esses resultados comprovam a importância da alimentação sanguínea na resposta eficiente da via de RNAi em *R. prolixus*, já que aumentando a expressão do gene *dcr2*, o inseto consegue responder melhor à presença de dsRNAs exógenas.

A partir dessas informações, todos os experimentos realizados com o intuito de avaliar a expressão dos genes da via de RNAi de *R. prolixus* em resposta à dsMAL (Figuras 20 a 25) foram feitos com insetos fêmeas em jejum, para que a alimentação sanguínea não mascarasse qualquer aumento de expressão.

6.4 - Resposta tecidual à presença de dsRNAs exógenas

Foi visto que dsRNAs são detectadas 24h após a incubação das mesmas com proteínas solúveis extraídas de corpo gorduroso, intestino médio anterior e posterior de *R. prolixus*, ao contrário do que ocorre quando as mesmas são incubadas com proteínas solúveis extraídas de ovário (Figuras 25 e 26). No intestino médio posterior tanto a dsRNA específica para α -glucosidase (ds α GLU) quanto dsMAL foram detectadas 24h após a incubação (Figura 26), o que mostra que a persistência das dsRNAs na presença das proteínas de intestino médio posterior não depende da especificidade da dsRNA.

Esses resultados podem indicar que ovário apresenta uma ou mais proteínas solúveis com atividade RNásica, que estão ausentes em corpo gorduroso e intestino médio. Nossos resultados mostram ainda que a resposta à dsRNAs não ocorre da

mesma forma em todos os tecidos. Outros estudos precisam ser feitos a fim de elucidar como as dsRNAs são processadas nos tecidos, o que pode explicar o comportamento de silenciamento gênico em cada um deles.

O mesmo estudo foi realizado utilizando a hemolinfa de *R. prolixus* sem hemócitos. Em um ensaio *ex vivo* a hemolinfa foi incubada com dsMAL e dsRHBP, verificando-se a ausência das dsRNAs 2h após a incubação com a hemolinfa (Figura 27A). Tempos mais curtos de incubação foram testados e a Figura 27B mostrou que a ausência de dsMAL ocorreu instantaneamente na hemolinfa, independentemente da temperatura em que o ensaio foi realizado, 28 °C ou 60 °C.

Um ensaio parecido foi realizado com hemolinfa de larvas de 5º estágio de *M. sexta*, inseto que apresenta susceptibilidade variável ao RNAi, e de fêmeas adultas de *B. germanica*, inseto susceptível ao RNAi (GAR BUTT et al., 2012). Observou-se que a partir de 1h de incubação da hemolinfa com dseGFP ocorreu degradação de dsRNA, que foi inibida quando a hemolinfa foi aquecida a 100 °C antes da incubação. Em *B. germanica*, a degradação da dseGFP ocorreu parcialmente até 24h após a incubação e foi muito menor que a degradação vista em *M. sexta*. Isso mostrou que a persistência da dseGFP ocorre por mais tempo na hemolinfa de *B. germanica* do que em *M. sexta*, o que poderia justificar a alta susceptibilidade de *B. germanica* ao RNAi.

Insetos da ordem Lepidoptera, como *M. sexta*, apresentam eficiência variável ao RNAi e inúmeros motivos para essa diferença de susceptibilidade têm sido analisados (TERENIUS et al. 2011). Um dos motivos parece ser a presença de uma RNase não-específica na hemolinfa do inseto que degrada rapidamente dsRNAs exógenas, o que supostamente diminui o tempo de persistência das mesmas na hemolinfa e interfere na susceptibilidade do inseto ao RNAi (GAR BUTT et al., 2012). Considerando esses resultados e os obtidos para *R. prolixus*, que é um inseto susceptível ao RNAi, a presença de RNases na hemolinfa não é, provavelmente, o único indicador que explica a baixa susceptibilidade ao RNAi. São necessários trabalhos adicionais que investiguem a eficiência da penetração da dsRNA e a transmissão do sinal de interferência em células e tecidos, bem como o estudo da expressão relativa dos diferentes genes da via para se entender a susceptibilidade de diferentes espécies ao RNAi.

7 – CONCLUSÕES

- Foram encontrados no genoma de *R. prolixus* genes *dicer 1*, *dicer 2*, *drosha* e 6 genes *argonautas*;
- O gene *dicer 2* de *R. prolixus* parece estar envolvido com a via de siRNA, já que houve aumento elevado de sua expressão em corpo gorduroso e intestino médio em resposta à presença de dsRNAs exógenas, além de sua sequência protéica apresentar alta similaridade com sequências de Dicer 2 de outros organismos, incluindo insetos;
- As 4 sequências de Argonautas analisadas apresentaram similaridade com proteínas envolvidas com a via de piRNA em outros organismos;
- Transcritos dos genes *dicer 1*, *dicer 2* e *argonauta 2A* foram detectados em corpo gorduroso, ovário, intestino médio anterior e intestino médio posterior;
- A alimentação sanguínea induz aumento da transcrição do gene *dicer 1* em corpo gorduroso e intestino médio anterior e dos genes *dicer 2* e *argonauta 2A* em corpo gorduroso e intestino médio, indicando que o repasto sanguíneo é importante para a resposta do inseto a dsRNAs exógenas ou endógenas;
- O desafio com dsRNA (dsMAL) induz aumento de expressão gênica, principalmente de *dicer 2* em corpo gorduroso e intestino médio do inseto. O aumento de expressão dos genes *dicer 1* e *argonauta 2A* foi menor na presença de dsMAL, se comparado ao gene *dicer 2*. Por isso, *dicer 1* e *argonauta 2A* parecem não estar relacionados com a resposta a dsRNAs exógenas;
- A resposta à dsMAL não foi dose dependente em todos os tecidos e o aumento da expressão dos genes em cada tecido ocorreu em momentos diferentes;
- dsRNAs não foram detectadas após 24h incubadas com proteínas solúveis de ovário, sugerindo a presença de uma ou mais RNases nesse tecido; o mesmo não foi observado em corpo gorduroso e intestino médio;
- Na hemolinfa a ausência de dsRNAs ocorre de forma rápida e eficiente, tanto a 28 °C quanto a 60 °C, indicando que uma ou várias RNases solúveis podem estar presentes;
- A presença de atividade RNásica é tecido-específica e a relação desta atividade com a via de RNAi permanece a ser esclarecida.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R. e ALLSHIRE, R.C. (2005). RNA silencing and genome regulation. *Trends in Cell Biology*, 15(5):251–8.
- ALMEIDA, B. (2009). *Expressão de Genes da Via do RNAi em Populações Naturais de Aedes Aegypti em Resposta à Infecção Viral por DENV2*. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. Brasil.
- AMARAL, R.J.V (2008). *Expressão do Gene Argonauta em Populações Naturais de Aedes aegypti e sua Relação com a Resposta à Infecção Viral Mediada por RNA*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. Brasil.
- AMBROS, V., BARTEL, B., BARTEL, D.P., BURGE, C.B., CARRINGTON, J.C., CHEN, X., DREYFUSS, G., EDDY, S.R., GRIFFITHS-JONES, S., MARSHALL, M., MATZKE, M., RUVKUN, G., TUSCHL, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9(3):277–279.
- AMDAM, G.V., SIMÕES, Z.L., GUIDUGLI, K.R., NORBERG, K., OMHOLT, S.W. (2003). Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology*, 3:1.
- ARAUJO, R.N., SANTOS, A., PINTO, F.S., GONTIJO, N.F., LEHANE, M.J., PEREIRA, M.H. (2006). RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(9):683–693.
- ARAVIN, A. A., KLENOV, M. S., VAGIN, V. V., BANTIGNIES, F., CAVALLI, G., GVOZDEV, V. A. (2004). Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line. *Molecular and Cellular Biology*, 24(15):6742-50.
- BARTEL, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281–97.
- BATISTA, T. M. e MARQUES, J. T. (2011). RNAi pathways in parasitic protists and worms. *Journal of Proteomics*, 74(9):1504–14.
- BELLÉS, X. (2010). Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology*, 55:111–128.

- BERNSTEIN, E., CAUDY, A.A., HAMMOND, S.M., HANNON, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818):363-366.
- BERNSTEIN, E., KIM, S. Y., CARMELL, M. A, MURCHISON, E. P., ALCORN, H., LI, M. Z., MILLS, A. A, ELLEDGE, S.J., ANDERSON, K.V., HANNON, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics*, 35(3):215–7.
- BLAIR, C. D. (2011). Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiology*, 6(3):265-77.
- BLANDIN, S. MOITA, L.F., KOCHER, T., WILM, M., KAFATOS, F.C., LEVASHINA, E.A. (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Reports*, 3(9):852–6.
- BUCHER, G., SCHOLTEN J., KLINGLER, M. (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology*, 12(3):R85-86.
- BUXTON, P.A. (1930). Biology of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Trans. Ent. Soc. Lon.*, 78:227-236.
- CAMPBELL, C. L., KEENE, K. M., BRACKNEY, D.E., OLSON, K.E., BLAIR, C.D., WILUSZ, J., FOY, B.D. (2008). *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. *BMC Microbiology*, 8:47.
- CARTHEW , R.W. E SONTHEIMER, E.J (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4):642–655.
- CERUTTI, H. e CASAS-MOLLANO, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current Genetics*, 50(2):81-99.
- CHAMPAGNE, D.E. (2004). Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. *Current Drug Targets Cardiovascular and Haematology Disorders*, 4(4):375-96.
- CHAMPAGNE, D.E., NUSSENZVEIG, R.H., RIBEIRO, J.M. (1995). Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(15):8691-5.
- CHEN, Y.H., JIA, X.T., ZHAO, L., LI, C.Z., ZHANG, S., CHEN, Y.G., WENG, S.P., HE, J.G. (2011). Identification and functional characterization of Dicer2 and five single VWC domain proteins of *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(6):661–71.

CHENDRIMADA, T. P., GREGORY, R. I., KUMARASWAMY, E., NORMAN, J., COOCH, N., NISHIKURA, K., SHIEKHATTAR, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051):740–4.

CIUDAD, L., PIULACHS, M.D., BELLÉS, X. (2006). Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* *yolkless* mutant. *FEBS Journal*, 273(2):325-35.

CLUSTALW2. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>. Acessado em agosto de 2013.

CRUZ, J., MANÉ-PADRÓS, D., BELLÉS, X., MARTÍN, D., (2006). Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi in vivo. *Developmental Biology* 297:158–171.

CZECH, B. e HANNON, G.J. (2011). Small RNA sorting: Matchmaking for Argonautes. *Nature Reviews Genetic*, 12(1):19–31.

DEDDOUCHE, S., MATT, N., BUDD, A., MUELLER, S., KEMP, C., GALIANA-ARNOUX, D., DOSTERT, C., ANTONIEWSKI, C., HOFFMANN, J.A., IMLER, J.L. (2008). The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *drosophila*. *Nature Immunology*, 9(12):1425–32.

DENLI, A.M., TOPS, B.B., PLASTERK, R.H., KETTING, R.F, HANNON, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014):231-235.

DING, S.W. (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*, 10(9), 632–44.

DRINNENBERG, I.A., WEINBERG, D.E., XIE, K.T., MOWER, J.P., WOLFE, K.H., FINK, G.R., BARTEL, D.P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science*, 326(5952):544–50.

DUXBURY, M.S., ASHLEY, S.W., WHANG, E.E. (2005). RNA interference: a mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(2):459-463.

EDWARDS, J. S. (1998). Sir Vincent Wigglesworth and the coming of age of insect development. *The International Journal of Developmental Biology*, 42(3):471–3.

ENDER, C. e MEISTER, G. (2010). Argonaute proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 11), 1819–23.

EXPASY – SIB Bioinformatics Resorce Portal. Disponível em: <<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>>. Acessado em agosto de 2013.

FEINBERG, E.H. e HUNTER, C.P. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301(5639):1545-7.

FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S.E., MELLO, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806-811.

FORSTEMANN, K., TOMARI, Y., DU, T., VAGIN, V.V., DENLI, A.M., BRATU, D.P., KLAT-TENHOFF, C., THEURKAUF, W.E., ZAMORE, P.D. (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biology*, 3(7):e236.

FRANZ, A. W., SANCHEZ-VARGAS, I., ADELMAN, Z. N., BLAIR, C. D., BEATY, B. J. (2006). Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci*, 103: 4198–4203.

FRIEND, W.G., CHOY, C.T.H., CARTWRIGTH, E. (1965). The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* STHAL (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology*, 43(6): 892-903.

GALIANA-ARNOUX, D., DOSTERT, C., SCHNEEMANN, A., HOFFMANN, J.A., IMLER, J.L. (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nature Immunology*, 7(6):590-7.

GARBUTT, J.S.; BELLÉS, X.; RICHARDS, E.H.; REYNOLDS, S.E. (2012). Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: Evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology*, 59(2):171-8.

GARBUTT, J. S. e REYNOLDS, S. E. (2012). Induction of RNA interference genes by double-stranded RNA; implications for susceptibility to RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(9):621–8.

GIRARD, A., SACHIDANANDAM, R., HANNON, G. J., E CARMELL, M. A. (2006). A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442(7099):199–202.

GREGORY, R.I., YAN, K.P., AMUTHAN, G., CHENDRIMADA, T., DORATOTAJ, B., COOCH, N., SHIEKHATTAR, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014):235-40.

HAMMOND, S. M. (2005). Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters*, 579(26):5822–9.

HAN, J., LEE, Y., YEOM, K.H., KIM, Y.K., JIN, H. AND KIM, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 18(24):3016–27.

HAN, J., LEE, Y., YEOM, K.H., NAM, J.W., HEO, I., RHEE, J.K., SOHN, S.Y., CHO, Y., ZHANG, B.T., KIM, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5):887-901.

HUGHES, C.L. e KAUFMAN, T.C. (2000). RNAi analysis of deformed, proboscipedia and sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. *Development*, 127(17):3683–94.

HUVENNE, H. e SMAGGHE, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, 56(3):227–35.

JINEK, M. e DOUDNA, J.A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(7228):405-12.

KEENE, K.M.; FOY, B.D.; SANCHEZ-VARGAS, I.; BEATY, B.J.; BLAIR, C.D. (2004). RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 101(49):17240-5.

KENNERDELL, J.R. e CARTHEW, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7):1017–26.

KETTING, R.F., FISCHER, S.E., BERNSTEIN, E., SIJEN, T., HANNON, G.J., PLASTERK, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development*, 15(20):2654-59.

KLATTENHOFF, C. e THEURKAUF, W. (2008). Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*, 135(1):3–9.

KNIGHT, S.W. e BASS, B.L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 293(5538):2269-2271.

LAGERBLAD – Previsão Lagerblad. Disponível em: <http://rhodnius.iq.ufrj.br/index.php?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=34>. Acessado em agosto de 2012.

LAVORE, A., PAGOLA, L., ESPONDA-BEHRENS, N., RIVERA-POMAR, R. (2012). The gap gene giant of *Rhodnius prolixus* is maternally expressed and required for proper head and abdomen formation. *Developmental Biology*, 361(1):147–55.

LBVD - Laboratório de Bioquímica de Vetores de Doenças da UFRJ-RJ. Disponível em:<http://rhodnius.iq.ufrj.br/index.php?option=com_content&view=article&id=46:rhodnius-prolixus>. Acessado em maio de 2012.

LEE, Y. S., NAKAHARA, K., PHAM, J. W., KIM, K., HE, Z., SONTHEIMER, E. J., CARTHEW, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), 69–81.

LEHANE, M.J. (2005). *The evolution of the blood-sucking habit*. In: Lehane MJ, ed. *Biology of Blood-Sucking Insects*. London: Harper Collins Academic, p. 7–14.

LEUSCHNER, P.J., OBERNOSTERER, G., MARTINEZ, J. (2005). MicroRNAs: Loquacious speaks out. *Current Biology*, 15(15):R603-5.

LIPARDI, C. e PATERSON, B.M. (2009). Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* involved in RNAi and transposon suppression. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, 106(37):15645–50.

LIU, Q., RAND, T.A., KALIDAS, S., DU, F., KIM, H.E., SMITH, D.P., WANG, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, 301(5641):1921-5.

LIU, Q. e PAROO, Z. (2010). Biochemical principles of small RNA pathways. *Annual Review of Biochemistry*, 79:295–319.

LIU, Y., YE, X., JIANG, F., LIANG, C., CHEN, D., PENG, J., KINCH, L. N., GRISHIN, N.V., LIU, Q. (2009). C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science*, 325 (5941):750–3.

LIVAK, K.J. e SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4):402-8.

LOZANO, J., GOMEZ-ORTE, E., LEE, H.J., BELLES, X. (2012). Super-induction of Dicer-2 expression by alien double-stranded RNAs: an evolutionary ancient response to viral infection? *Development Genes and Evolution*, 222(4):229–35.

LUND, E., GUTTINGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, J. E., E KUTAY, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654):95–8.

MACRAE, I. J. e DOUDNA, J. A. (2007). Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(1):138–45.

MAJEROWICZ, D., ALVES-BEZERRA, M., LOGULLO, R., FONSECA-DE-SOUZA, A.L., MEYER-FERNANDES, J.R., BRAZ, G.R., GONDIM, K.C. (2011). Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Molecular Biology*, 20(6):713-22

MAORI, E., PALDI, N., SHAFIR, S., KALEV, H., TSUR, E., GLICK, E., SELA, I. (2009). IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Molecular Biology*, 18(1):55-60.

MAY, R.C. e PLASTERK, R.H. (2005). RNA interference spreading in *C. elegans*. *Methods in Enzymology*, 392:308-315.

MEISTER, G. e TUSCHL, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006):343-9.

MILLER, S.C., BROWN, S.J., TOMOYASU, Y. (2008). Larval RNAi in *Drosophila*? *Development Genes Evolution*, 218(9):505-10.

MURY, F.B., DA SILVA, J.R., FERREIRA, L.S., DOS SANTOS, FERREIRA B., DE SOUZA-FILHO, G.A., DE SOUZA-NETO, J.A., RIBOLLA, P.E., SILVA, C.P., DO NASCIMENTO, V.V., MACHADO, O.L., BERBERT-MOLINA, M.A., DANSA-PETRETSKI, M.(2009). Alpha-glucosidase promotes hemozoin formation in a blood-sucking bug: an evolutionary history. *Plos One*, 4(9):e6966.

NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *In trans*. *The Plant Cell*, 2:279- 289.

NCBI - The National Center for Biotechnology Information. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>>. Acessado em agosto de 2012.

- NOVINA, C. D. e SHARP, P. A. (2004). The RNAi Revolution. *Nature*, 430(6996):161-4.
- OBBARD, D. J., GORDON, K. H. J., BUCK, A. H., JIGGINS, F. M. (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1513):99–115.
- OLENA, A. F., e PATTON, J. G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3):540-5.
- OLIVEIRA, M. F., SILVA, J. R., DANSÁ-PETRETSKI, M., DE SOUZA, W., LINS, U., BRAGA, C. M., MASUDA, H., OLIVEIRA, P. L. (1999). Haem detoxification by an insect. *Nature*, 400(6744):517-8.
- OLIVEIRA, P.L., KAWOOYA, J.K., RIBEIRO, J.M.C., MEYER, T., POORMAN, R., ALVES, E.W., WAJCKER, F.A., MACHADO, E.A., NUSSENZVEIG, R.H., PADOVAN, G.J., MASSUDA, H. (1995). A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*: isolation and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(18):10897-901.
- OLSON, K.E., ADELMAN, Z. N., TRAVANTY, E. A., SANCHEZ-VARGAS, I., BEATY, B. J., BLAIR, C. D. (2002). Developing arbovirus resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10):1333-43.
- PAIM, R.M.M., ARAUJO, R.N., LEHANE, M.J., GONTIJO, N.F., PEREIRA, M.H. (2012). Application of RNA interference in triatomine (Hemiptera: Reduviidae) studies. *Insect Science*.
- PARKER, J. S., ROE, S. M., BARFORD, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, 434(7033):663-6.
- PASQUINELLI, A. E., HUNTER, S., BRACHT, J. (2005). MicroRNAs: a developing story. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(2):200-5.
- PELLINO, J.L. e SONTHEIMER, E.J. (2003). R2D2 leads the silencing trigger to mRNA's death star. *Cell*, 115(2):132-3.
- PETERS, L. e MEISTER, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular Cell*, 26(5):611-23.

ROIGNANT, J.Y., CARRÉ, C., MUGAT, B., SZYMCAK, D., LEPESANT, J.A., ANTONIEWSKI, C. (2003). Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*, 9(3):299–308.

ROMANO, N. e MACINO, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6(22):3343–53.

ROZEN, S. e SKALETSKY, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Ed.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, p.365-386.

SAITO, K. e SIOMI, M. C. (2010). Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. *Developmental Cell*, 19(5):687–97.

SAITO, K., ISHIZUKA, A., SIOMI, H., SIOMI, M. (2005). Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biology*, 3(7):e235.

SANCHEZ-VARGAS, I., TRAVANTY, E.A., KEENE, K.M., FRANZ, A.W., BEATY, B.J., BLAIR, C.D., OLSON, K.E. (2004). RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Research*, 102(1):65–74.

SIJEN, T., FLEENOR, J., SIMMER, F., THIJSEN, K.L., PARRISH, S., TIMMONS, L., PLASTERK, R.H., FIRE, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107(4):465-76.

SIJEN, T., STEINER, F.A., THIJSEN, K.L., PLASTERK, R.H. (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science*, 315(5809):244-7.

SMITH, P.R., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVEZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. (1985). Measurements of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1):76-85.

SONG, J., SMITH, S. K., HANNON, G. J. (2004). Crystal Structure of Argonaute Slicer Activity. *Science*, 305(5689):1434-7.

ST. JOHNSTON, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, 3(3):176–88.

SWEVERS, L., LIU, J., HUVENNE, H., SMAGGHE, G. (2011). Search for limiting factors in the RNAi pathway in silkworm tissues and the Bm5 cell line: the RNA-binding proteins R2D2 and Translin. *PLoS One*, 6(5):e20250.

TERENIUS, O., PAPANICOLAOU, A., GARBUTT, J.S., ELEFThERIANOS, I., HUVENNE, H., KANGINAKUDRU, S., ALBRECHTSEN, M., AN, C., AYMERIC, J.-L., BARTHEL, A., et al. (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57(2):231–245.

TGI - The Genome Institute at Washington University. Disponível em: < <http://genome.wustl.edu/genomes/detail/rhodnius-prolixus/>>. Acessado em agosto de 2012.

TOLIA, N.H. e JOSHUA-TOR, L. (2007). Slicer and the Argonautes. *Nature Chemical Biology*, 3(1):36–43.

TOMARI, Y. e ZAMORE, P.D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, 19(5):517-29.

TOMOYASU, Y., MILLER, S. C., TOMITA, S., SCHOPPEMEIER, M., GROSSMANN, D., BUCHER, G. (2008). Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*, 9(1):R10.

TURNER, C.T., DAVY, M.W., MACDIARMID, R.M., PLUMMER, K.M., BIRCH, N.P., NEWCOMB, R.D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15(3):383-91.

TUSCHL, T., ZAMORE, P.D., LEHMANN, R., BARTEL, D.P., SHARP, P.A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Development*, 13(24):3191-7.

VAGIN, V. V., SIGOVA, A., LI, C., SEITZ, H., GVOZDEV, V. AND ZAMORE, P. D. (2006). A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 313(5785):320-4.

VECTORBASE - BLAST - RHODNIUS PROLIXUS. Disponível em: < <https://www.vectorbase.org/blast/> >. Acessado em abril de agosto de 2012.

VECTORBASE - RHODNIUS PROLIXUS. Disponível em: < <https://www.vectorbase.org/news/new-r-prolixus-gene-set> >. Acessado em abril de agosto de 2012.

VOINNET, O., VAIN, P., ANGELL, S., BAULCOMBE, D.C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 95(2):177-87.

WALTER-NUNO, A.B (2011). *Estudos sobre a proteína ligadora de heme (RHBP) no inseto Rhodnius prolixus: efeitos do silenciamento na ovogênese e papel no transporte de heme*. Dissertação (Mestrado em Química Biológica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. Brasil.

WANG, X., ALIYARI, R., LI, W.X., LI, H.W., KIM, K., CARTHEW, R., ATKINSON, P., DING, S.W. (2006). RNA Interference Directs Innate Adult Drosophila. *Science*, 312(5772):452-4.

WEI, K.F., WU, L.J., CHEN, J., CHEN, Y.F., XIE, D.X. (2012). Structural evolution and functional diversification analyses of argonaute protein. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(8):2576-85.

WHANGBO, J. S. e HUNTER, C. P. (2008). Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*, 24(6):297-305.

WINSTON, W.M., MOLODOWITCH, C., HUNTER, C.P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295(5564):2456-2459.

YIGIT, E., BATISTA, P.J., BEI, Y., PANG, K.M., CHEN, C.C., TOLIA, N.H., JOSHUA-TOR, L., MITANI, S., SIMARD, M.J., MELLO, C.C. (2006). Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, 127(4):747-57.

YI, R., QIN, Y., MACARA, I. G., CULLEN, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), 3011-6.

ZAMORE, P.D., TUSCHL, T., SHARP, P.A., BARTEL, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1):25-33.

9- ANEXOS

Anexo 1

Alinhamento dos domínios ATP/helicase, helicase, dicer, PAZ, RNAses IIIa e IIIb e domínio dsRBD de Dicer 1 de *R. prolixus* (RPDcr1), *Drosophila melanogaster* (DMDcr1; CG4792), *Tribolium castaneum* (TCDcr1; EFA11550.1), *Megachile rotundata* (MRDcr1; XP_003706496.1), *Anopheles gambiae* (AGDcr1; ENSANGG00000014308), *Homo sapiens* (HSDcr1; NM_177438) e *Caenorhabditis elegans* (CEDcr1; K12H4.8). Resíduos idênticos são indicados por “*”, resíduos conservados por “:” e semi-conservados por “.”. Alinhamento realizado através do algoritmo CLUSTALW.

ATP/helicase

```

RPDcr1 -----MACFFTEN-IHTKSFTPREYQLELLDAAKDKNI 32
DMDcr1 -----MAFHWCDDNLHTTVFTPRDFQVELLATAYERNI 33
TCDcr1 -----MACYLNEN-VYTHFTPREYQVELLDSAKKRNT 32
MRDcr1 -----MAFPLNDQ-IYTKSFTPREYQVELFYAARDKNI 32
AGDcr1 -----MSLFHWTIDGNIHTALTPRDYQTELLATAREENL 34
HSDcr1 MKSPALQPLSMAGLQMTPASSPMGPFGLPWQQEAIHDNIYTPRKYQVELLEAALDHT 60
CEDcr1 -----MVRVRADLQCFNPRDYQVELLDKATKKNT 29
                                     .**.:* **: * ..*

RPDcr1 IVCLNHGANKTFIALKLLQELSNVRLSWKRGKRSLYIGNHSSVHYWQ-IVKHLTDLT 91
DMDcr1 IICLGHSSKQFIALKLLQELSRARRHGRVSVYLSCEVGTSTPCSIYT-MLTHLTDLR 92
TCDcr1 IVCSSASSAKAFITIKLLQEFSHKMRVPH---GKQALFVLDGP-NVPIMTSHVKLLTDLT 88
MRDcr1 IVCLGKSYEQTFIVIKLIQEFANRRRPLSEGGKRSLYILTDEEKCIKASYIQQLTDLK 92
AGDcr1 IVCIAHNSAKEFLAVKLIQSMRTNRWSSHPEAPGKAIYLTRMD--RSLSSMVSNLTDLQ 92
HSDcr1 IVCLNTGSGKTFIAVLLTKELSYQIRGDFSRNGKRTVFLVNSANQVAQQVSAVRTHSDLK 120
CEDcr1 IVQLGTGSGKTFIAVLLLKEYGVQLFAPLDQGGKRAFFVVEKVNIVEQQAIHIEVHTSFK 89
*:      : *.: * :.      : :      : :.

RPDcr1 VGEYYDAADKVNFE-----NNSFAKVIAATYNV-CAQWIEQHLLDWCRIINLVII 139
DMDcr1 VWQEOPDMQIPFDH-----CWTDYHVSILRPEG-FLYLLRELLLSSELIVL 140
TCDcr1 V---TSIDKEENPP-----SLKASNVIIVTAEV-CVLLCKKNFVHLDYALIVI 133
MRDcr1 VLMYTACSSNEFVD-----KFETSHVLVLTSEV-CTKLLAEKKILPHQINLVIV 140
AGDcr1 VANVDDVEDSEGSHEPDGASNTPVTDVASADVLFPGSETILLQYIEQGTVRVQDISLLIV 152
HSDcr1 VGEYSNLEVNASWTKERWN----QFPTKHQVLMTCYV-ALNVLKNGYLSLSDINLVF 174
CEDcr1 VGQVHGQTSSGLWDSKEQ----CDQFMKRHHVVVITAQCLLDLIRHAYLKIEDMCVLIF 144
*              .      :      :.:.

RPDcr1 EDCHNSI-KNHPLRKIIIS--LKEYKLEKPK----RILGLTTPFLNSDVEPGCVAEAVKQ 192
DMDcr1 EDCHDSA-VYQIRPLFENHIMPAPPADRP----RILGLAGPLHS-AGCELQQLSAMLAT 194
TCDcr1 DCLYGGQ-QSLVREIMARY---QAIQAPRP----RILGLTAGLLG-SEMQPDRLEAELQR 184
MRDcr1 DECHKFI-NDNKLKFIQT---FLSCTDVP---RIIGLAVPLFN-LTQEPGRGLEIEK 191
AGDcr1 DECHKNY-GRQELWEICARLTHQAPSSDRPAQRTIRILGLAGPLHG-AGCTPERLCWELHY 210
HSDcr1 DECHLAI-LDHPYREIMKL---CENCPCP---RILGLTASILN-GKCDPEELEEKIQK 225
CEDcr1 DECHHALGSQHPYRSIMVDYKLLKKDKFVP---RVLGLTASLIK-AKVAPEKLMEQLKK 199
: :      :      *      *.:*.: :      : :

```

Helicase

```

RPDcr1 PYITDTPKNNKERRGWKYRRGTGSTSSR----TLKHQTG--EDADHLCGIIIFVQHRFTAK 451
DMDcr1 ARVTPTPTPAHAKPKPSSGANTAQPRTRRRVYTRRHHRDHNDGSDTLCALIYCNQNHTAR 506
TCDcr1 PDLKD---PKKGKGNKYGPR-----RPYISRAQSDMLCALVFKNRYKAE 416
MRDcr1 NYIRDKFIHGRKGNENDKRPFK-----FQRHMRGATDPDLLCGVIFVDKGFVAK 446
AGDcr1 TLGVQSPRHGHSRANFRKRFRAGGG-----HSHHRSDTTDALCGLIFCNRAMAR 554
HSDcr1 DDEDEEIEEKEKPETFNFPSPFT-----NILCGIIFVERRYTAV 455
CEDcr1 -----EFQKERMKLEKAEHLSAIIIFVDQRYIAY 398
                                     : *.:*.: .. *

```

```

RPDcr1      ILYHLFHDLYKNDPFDANITTQYTVGKMAN-PHLDPREAEIEHRRKQEDVLKRRFRMRECNL 510
DMDcr1      VLFELLAIEISRRDPDLKFLRCQYTTDRVAD-PTTEPKAELEHRRQEEVLKRRFRMHDCNV 565
TCDcr1      ALFALLCVMSKSDDEEYVWVSVSFSVNKIAD-PVREPRAESEHKKQEEVLRKRSHECNI 475
MRDcr1      VLFYLLNEISAHDEDEFLSPLYTIERNID-DVSYSKDLEIEHKKQEEVLKRFRIHECNL 505
AGDcr1      ILYVLLYEVRSQRFEFISPOQYVVDKVAIINPQNCLKQTTIEHRRKQEEVLKRRFRMHECNL 614
HSDcr1      VLNRLIKEAGKQDPELAYISSNFITGHGIGKNQPRNKQMEAEFRKQEEVLRKFRRAHETNL 515
CEDcr1      SLLLMRHIKSWEPKFKFVNPDPYVVGASGR--NLASSDSQGLHKKRQTEVLRFRHNEINC 456
          *  ::      : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

```

RPDcr1      VVATSVLEEDGIELPRCNLIVRYDFVIDYKSFHASKGRARQQISYYISLVES----- 561
DMDcr1      LIGTSVLEEGIDVPKCNLVVRWDPPTTYRSYVQCKGRARAAPAYHVILVAPSYKSPTVGS 625
TCDcr1      MIATSALQGCGLPKCNLVIRFDLPQSFHSYIHSKARARANEAHFLLLANE----- 526
MRDcr1      LISTSIILEEGIDIPKCNFVMRYDFPKTYQSYVQCKSRARAI DALHVLLVPK----- 556
AGDcr1      LIGTSVLEEGIELPKCNLVIRWNSPANYRSYAQCKGRAKAPGAYHVLVFTPEN----- 667
HSDcr1      LIATSIVEEGVDPKCNLVVRFDLPTFYRSYVQSKGRARAPISNYIMLADT----- 566
CEDcr1      LIATSVLEEGVDVKQCNLVIKFDRPLDMRSYVQSKGRARRAGSRVYITVEE----- 507
          ::** :*: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

Dicer

```

RPDcr1      VPEYKPLPG-----ETDPKVMGTAIALVNRKYCAKLPSDTFTRLTPLWTTKEILYL 656
DMDcr1      LAAYRPKPHL-----LTGASVDLGSALVNRKYCARLPSDTFTKLTALWRCTRNERAG 857
TCDcr1      CRPYQPSAE-----PGANSVLSNATALVNRKYCAKLPSDTFTRLTPIWHEEKVENG- 620
MRDcr1      IPHYKPLSE-----DDAPKVFNSAISLVNRKYCAKLPSDTFTRLTPEWSIEQINSDN 651
AGDcr1      LEVYRPSGGVAVALQSNGTCSLWLGNAIQTLNKYCAKLPSDTFTKLTPIWRCATTVRKG 815
HSDcr1      FPPYVLRPD-----DGGPRVTINTAIGHINRYCARLPSDPFTHLAPKCTRRELPDG- 661
CEDcr1      -----KDTAAYCSKLPSDIFTRLVPHNQIPIEENG 538
          *: : * * * * * * * * * *

```

```

RPDcr1      EQMYFTLVRLPINSPIKEDIIGH-PMPTKVLARRIAALETCRVLHVRGELDDNLEPIGKE 715
DMDcr1      VTLFQYTLRLPINSPLKHDIVGL-PMPTQTLARRLAALQACVELHRIGELDDQLQPIGKE 916
TCDcr1      ---YICSIIRLPINSPVKKTIVTSP-PMINTLLARRAAAFMICQLLHKAAGELDDNLQPIGKE 676
MRDcr1      RMPYVCSLRLPINSPVKYAVSSY-PMPNRAMARRMAALQLCIDLHRKNEIDNLLPIGKE 710
AGDcr1      RKLQYQYIIRLPINSPVKEDIL----- 836
HSDcr1      --TFYSTLYLPINSPLRASIVGP-PMSCVRLAERVVALICCEKHLKIGELDDHMPVKGKE 718
CEDcr1      VTKYCAELLLPINSPIKHAIVLKNPMPNKKTAQMAVALEACRQLHLEGELDDNLLPKGRE 598
          : : : * * * * * : :

```

PAZ

```

RPDcr1      -----AENVVDWFLELIYSRRN-DIPHNVSEKERKNFVFDAARYHDVAVMPWY 932
DMDcr1      -----GGKHI DWQFLELIQANGN-TMPRAVPDEERQAQPFDPQRQDAVAVMPWY 1140
TCDcr1      -----ATTTVDWDFLDLIYANLT-VLPELIPPEVRKSYEFDPEKYRDAVAVMPWY 893
MRDcr1      -----SDVTVDWDFLECIYNNRT-TVPTKVPEEDRKDFKFDASKYQDAVAVMPWY 931
AGDcr1      AAGKDEPPLQSDDMVVDWDFVEKIATNVRSGPTFIPDEARKGYTFDVGKFRDAVAVMPWY 1032
HSDcr1      -----SSTLDIDFKFMEDIKSEARIGIPSTKYTKETPFVFKLEDYQDAVAVIPRY 936
CEDcr1      -----DMSYTIINMKYVSEVVANME-NMPRIKDEVRQYKFNEDYKDAVAVMPWY 819
          : : : . : : : . * . : : * * * * * *

```

```

RPDcr1      RNQDQPQYFYVAEICNHLNPKSAFFPGTDYSTFEDYMKKYGIQIQNFTQPLLDVDHTSAR 992
DMDcr1      RNQDQPQYFYVAEICPHLSPLSCFPGDNYRTFKHYLVKYGTLTIQNTSQPLLDVDHTSAR 1200
TCDcr1      RNQDQPQYFYVAEICSNLNPASDFPGSDYATFEEYLRKYSIQIQNKSQHLLDVDHTSAR 953
MRDcr1      RNQDQPQYFYVAEICNHLNPKSSFPDDYSTFEEYFVKYEQIQNLQPLLDVDHTSAR 991
AGDcr1      RNRDQPQYFYVAEICNHLSPKSTFPGSNYATFEEYHRKYKIHIQNRQPLLDVDHTSAR 1092
HSDcr1      RNFDPHRFYVADVYTDLTPLSKFPPSEYETFAEYKTKYNLNLNQLLDVDHTSSR 996
CEDcr1      RNLEQPVFYFYVAEILPEWRPSSKFPDTHFETFNEYFIKKYKLEIYDQNSLLDVDFTSTR 879
          ** : * : * * * : . * * * * . : * * . * : * : : : * * * * * * * *

```

```

RPDcr1      LNFLTFRYVNRKGVALPTSSEETKRAKRENLE-----KQIILVAELCLVHIV 1039
DMDcr1      LNFLTFRYVNRKGVALPTSSEETKRAKRENLE-----KQIILVPELCTVHPF 1247
TCDcr1      LNFLTFRYVNRKGVALPTSSEATKRAKREKLE-----KQIILVPELCAIHPF 1000
MRDcr1      LNFLTFRYVNRKGVALPTSSEETKRAKRENLE-----KQIILVAELCAIHPF 1038
AGDcr1      LNFLTFRYVNRKGVALPTSSEETKRAKRENLE-----KQIILVPELCTIHPF 1139
HSDcr1      LNLLTFRHLNQKPKALPLSSAEKRAKAWESLQ-----NKQIILVPELCAIHPI 1043
CEDcr1      LNLLQPRIQNRPRRSRTVSSNSTSNIPQASASDSKESNTSVPHSSQRQIILVPELMDIHPI 939
          * * * * * * : : . * . . . . : : * * * * * * * *

```

RNase IIIa

```

RPDcr1 -----NSHHLDSLNTSLIVPYADDEDYDSDEQFS----FSFDSQPD 1391
DMDcr1 -----EKQLKQYERIEIEPPTSTKAITSAILPAG----FSFDRQPD 1715
TCDcr1 -----SPNLHQHKALQIDLAPQDARNEYDISETMT----FKFDEQPNL 1344
MRDcr1 -----TEVLNNNNISQPVKQKSNSSKFTYHPSNNL----FSFDFQPEL 1409
AGDcr1 ICDPFPAAIAGQMACNYKPKQHSMSRDEANKNGHDSAGVLSTTDEAGGVDFYFSFDYQPD 1656
HSDcr1 -----TDTIQVLKGRMDSEQSPSIGYSSR----- 1288
CEDcr1 -----NCEVLVVAINEKRSFSFEKESKAINGRLIRQRSEEVSHIDS 1321

```

```

RPDcr1 EGHGPGSPSLLLQALTMNSNANDGINLERLETIGDSFLKYAITTYLYCTHENIHEGKLSHL 1451
DMDcr1 VGHGPGSPSIIILQALTMNSNANDGINLERLETIGDSFLKYAITTYLYITYENVHEGKLSHL 1775
TCDcr1 VEHGPGSPNVLLQALTMNSNANDGINLERLETIGDSFLKYAITNYLYSKYENVHEGKLSHL 1404
MRDcr1 ENHGPSPSIIILQALTMNSNANDGINLERLETIGDSFLKYAITTYLYCTYDNIHEGKLSHL 1469
AGDcr1 SQHPGSPPAIILQALTMNSNANDGINLERLETIGDSFLKYAITTYLYCRYDNVHEGKLSHL 1716
HSDcr1 --TLGPNPGLIILQALTLNSADGFNLERLEMLGDSFLKHAITTYLFTYDPAHEGRLSYM 1346
CEDcr1 DIGLGVSPCLLLTALTTNAADGMSLERFETIGDSFLKFATTDYLYHTLLDQHEGKLSFA 1381
      * . * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

```

```

RPDcr1 RSKQVSNLKLRYRLGQKVFGESEMIASKFEPHDNWLPPCYLVPR----- 1494
DMDcr1 RSKQVANLNLYRLGRRKRLGEYMIATKFEPHDNWLPPCYVVPK----- 1818
TCDcr1 RSKQVSNLNLYRLGRRKGLGEYMIATKFDPHDNWLPPCFYVVPK----- 1447
MRDcr1 RSKQVSNLNLYRLGRQKMLGESMIATKFEPHDNWLPPCYVVPK----- 1512
AGDcr1 RSKQVSNLNLYRLGRRKRLGDCMIAAKFEPHDNWLPPCYVVPK----- 1759
HSDcr1 RSKKVSNCNLYRLGKKKGLPSRMVVSIFDPVNWLPVPGYVNVQDKSNTDKWEKDEMIKDC 1406
CEDcr1 RSKKVSNCNLYRLGKKKGLPQLIVANKFDAQHDSWLPPCYIPTC----- 1424
      * * * * * : * * * * * : : : : : * : . * * * * :

```

```

RPDcr1 -----DAEQELLNTEP-----LATLPYNL 1513
DMDcr1 -----ELEKALIEAK-----IPTHHWKL 1836
TCDcr1 -----ELEEALIDAQ-----FPANCWTV 1465
MRDcr1 -----ELEQALIKSG-----IPSTLWNQ 1530
AGDcr1 -----ELEQTLIDAK-----IPACHWNL 1777
HSDcr1 MLANGKLDDEYEEDEEEESLMWRAPKEEADYEDDFLEYDQEHIRFIDNMLMGSGAFVVK 1466
CEDcr1 -----DFKAPNTDDAEE-----KDNEIERI 1444
      : :

```

```

RPDcr1 VTQHSIPDKSIADCVEALIGKPLN----- 1538
DMDcr1 ADLLDIKNLSSVQICEMVREKADALGLEQNGGAQNGQLDSDNS----- 1880
TCDcr1 ADMAATRDMILDDICSMVRQRGESLSLSN----- 1494
MRDcr1 ADIPTLQAVNPNEITQLVRETEQKLGIMKDELVRNEAILSNN----- 1572
AGDcr1 ADLPDIKRLSCAEICQLVKERARAKRREDVDRFDLQHADSNNGGEDGNEDDDDDDDDDDD 1837
HSDcr1 ISLSPFSTTDSAYEWKMPKSSLSGMPFSSDFEDFDYSSWDAMCYLDPKAVEEDDFVVG 1526
CEDcr1 LDGVVIEEKPENKTGWDIGGVSVKSTTDGIEITIFPKQARVG----- 1486

```

RNase IIIa

```

RPDcr1 SPLLRH-----LPDPESELMRLMAGFDSLERKLYNFKDKSYLLQAMTHASYSNP 1682
DMDcr1 SPLLHF-----APNATEELDQLLSGFEEFEESLGYKFRDRSYLLQAMTHASYTPN 2022
TCDcr1 SPLSNH-----LTYPREELDMLLDGYDQFERHIGYKFRDRSYLLQALTHASFSPN 1608
MRDcr1 NPLLRV-----IPNPEQELMMLLDGYEELKNIGYKFNDISYLLQAFTHASYQPN 1724
AGDcr1 SPMVRANITFGGIETGAAATSRELARLLQGFEEFEQALGYRFRDRSYLLQAMTHASYSNP 2008
HSDcr1 RCMFDH-----PDADKTLNHLISGFENFEKKINRYRKNKAYLLQAFTHASYHYN 1695
CEDcr1 NPNASLN-----FLNNLWQQFQFTQLEEKIGYRFRKRAYLVQAFTHASYINN 1607
      : . : * : * : * * * * * : *

```

```

RPDcr1      RLTDQYQRLEFLGDAVLG-LFLFYMYIDKRAHSPGALTDLRSALVNNTIFASLAVKHGFH 1741
DMDcr1      RLTDQYQRLEFLGDAVLGYLITRHLIEDPRQHSPGALTDLRSALVNNTIFASLAVRHGFH 2082
TCDcr1      TLTDCYQRLEFLGDAVLGYLITRHLIEDTRMHSPGALTDLRSALVNNTIFASLAVRNGFH 1668
MRDcr1      KLTDCYQRLEFLGDAVLGYLITRHLIEDARQHSPGALTDLRSALVNNTIFASLAVRCGFH 1784
AGDcr1      RLTDQYQRLEFLGDAILDYLIITRHLIEDRRQHSPGALTDLRSALVNNTIFASLAVRHGFH 2068
HSDcr1      TITDCYQRLEFLGDAILDYLIITKHLIEDPRQHSPGVLTDLRSALVNNTIFASLAVKYDYH 1755
CEDcr1      RVTGQYQRLEFLGDAVLGYMITRYLFDSDRQYSPGVLTDLRSALVNNTIFASLAVKFEFQ 1667
          :*.*****:*. : : : * * :***.*****: : :

RPDcr1      KYFRHLSPLGLGEVVRQFVITIQEEN--SHAISEEFYLVG----- 1777
DMDcr1      KFFRHLSPLGLNDVIDRFRVIQQEEN--GHCISEEYLLSEEE----- 2121
TCDcr1      RYFRNLSPSLNEVVEKFRVLRQEDS--GHTLVDELYLVVET----- 1706
MRDcr1      KYFRHLSPLGLSVVINRFVRIQQEEN--GHSISEEYLLIGEEK----- 1823
AGDcr1      KYFLHLSPLGLQEVIDRFRVIQQEEN--GHRITEEYLLPDEDELGEYGAMGEDGPGEGRG 2126
HSDcr1      KYFKAVSPELFHVIDDFVQFQLEK--NEMQGMDELRRSEED----- 1795
CEDcr1      KHFIAMCPGLYHMIKFKVLCSEENFDTNFNAEMYMVTTEEEID----- 1711
          :.* :.* * : : * : : . : :

```

dsRBD

```

RPDcr1      -EEAEDVEVPKALGDVFEVAGAIFLDSSMSLDIVWRIYYRMMKKEIEQFSTKVPKSPIR 1836
DMDcr1      CDDAEDVEVPKALGDVFEVAGAIFLDSNMSLDVWVHVYSNMMSPEIEQFSNSVPKSPIR 2181
TCDcr1      -EEVEDVEVPKALGDVFEVAGAIFLDSGMSLDVWVWVYVNMKKEIEQFSNKVPKSPIR 1765
MRDcr1      CEEAEDVEVPKALGDVFEVAGAIYLDGMSLDVWVSVYYVIMKNEIEQFSTNVKSPIR 1883
AGDcr1      VGEAEDVEVPKALGDVFEVAGAIYLDSDMSLDVWVWVYVYRMMKKEIEKFSNSVPKSPIR 2186
HSDcr1      EEKEEDIEVPKAMGDI FESLAGAIYMDSGMSLETVWQVYVPMRPLIEKFSANVPRSPVR 1855
CEDcr1      EGQEEDIEVPKAMGDI FESVAGAIYLDSGRNLDTTWQVIFHMMRGTIELCCANPPRSPIR 1771
          . ***:*****:***:*****:***. :.* : : * * . . :***:

RPDcr1      ELLELEPETAKFSKPEKLADGRRVRVTVEVFGKGTFRGIGRNYRIAKCTAAKCALQLK 1896
DMDcr1      ELLELEPETAKFGKPEKLADGRRVRVTVDVFCKGTFRGIGRNYRIAKCTAAKCALRQLK 2241
TCDcr1      ELLELEPETAKFGKPEKLADGRRVRVTVEVFGKGVFKGIGRNYRIAKCTAAKCALKNL 1825
MRDcr1      ELLELEPETAKFGKPEKLADGHRVRVTVDVFGKGSFKGIGRNYRIAKCTAAKCALK 1943
AGDcr1      ELLEMEPETAKFGKPEKLTIDGRRVRVTVEVFGKGTFRGIGRNYRIAKCTAAKCALRQL 2246
HSDcr1      ELLEMEPETAKFSPAERTYDG-KVRVTVEVWVFGKFKGVGRSYRIAKSAAARRALRSL 1914
CEDcr1      ELMEFEQSKVRFKMERILESGKRVVTVEVWVNMRFVGMGRNYRIAKATAAKRALKYL 1831
          ***:** . . . : * : : . :*****: * : : * ** : *****:*** : ** : *

```

Anexo 2

Alinhamento dos domínios ATP/helicase, helicase, dicer, PAZ, RNAses IIIa e IIIb de Dicer 2 de *R. prolixus* (RPDcr2), *Blattella germanica* (BGDCR2; CCF23094.1), *Drosophila melanogaster* (DMDCR2; CG6493), *Tribolium castaneum* (TCDCR2; NP_001107840.1), *Anopheles gambiae* (AGDCR2; XP_320248.4) e Dicer 1 de *Caenorhabditis elegans* (CEDCR1; K12H4.8). Resíduos idênticos são indicados por “*”, resíduos conservados por “:” e semi-conservados por “.”. Alinhamento realizado através do algoritmo CLUSTALW.

ATP/helicase

```

RPDcr2      --MEDTNSKVDFKAREYQVEILETAIKRNTIVFMPTGSGKTYIAAMLKHKMAKEIEKPYS 58
BGDcr2      --MEGEEGQDDFRARPYQEVLMNQAKKRNSIIYLP TGSGKTYIAVMLIKELSGALEL--- 55
TCDcr2      --MDEED---ELKPRNYQVNLMEIAIRENTIIYLP TGSGKTFIAIMVLKQLCAPILRPYS 55
AGDcr-2     MLPENKEPMEDFAPRNYQVMKEICLAKNTIIIFLPTGSGKTYIALMVMKEISHQLRNTVH 60
DMDcr2      -----MEDVEIKPRGYQLRLVDHLTKSNGIVYLP TGSGKTFVAILVLRKRFSDFDKPIE 54
CEDcr1      -MVRVRADLQCFNPRDYQVELLDKATKKNITIVQLGTGSGKTFIAVLLKLVGVQLFAPLD 59
          : . * * * : : * * : *****: * * : * :

```

RPDcr2 EGGKRTFFLVNTVALVSQQANSVASLLPLEVSTYSGDMGVVDYWD-RNRWHQEQLEKNQVLV 117
 BGDcr2 --GKHTFFMVTVALVQQAQAYIKRHSTHYSVGEYSGDMNVDFWT-RDKWEQELNKHQIMV 112
 TCDcr2 DGGKISVILVNSVALVDQHGKQYVRDHATFSVGTGTGEMNVDFWS-EAWEQQFNKYQVVI 114
 AGDcr-2 EGGKRTFFLANIVALAKQQAQFFARHMPFNRLYTSVNVDAWK-SDRWHEEFSEGQVII 119
 DMDcr2 SGGKRALFMCNTVELARQQAMAVRRCCTNFVGVFVGEQQVDDWT-RGMWSDEIKKNQVLV 113
 CEDcr1 QGGKRAFFVVEKVNLEQQAIHIEVHTSFVGVQVHGQTSGLWDSKEQCDQFMKRRHVVV 119
 ** : : : : : * * * : * : : . . : : : :

RPDcr2 MTAQIFLNLHAYIQMSRVNLLIMDECHHTMH-NHSMNQIMKIYR-L-DCSERPRIILGL 174
 BGDcr2 MTCQIFVDILSFGVVKLQNVNLLIFDECHHAVN-DQPMRQVMQHFERC-PIQQQPRLVGL 170
 TCDcr2 MTSQIMVNLINRFIDLQKVNLMIFDECHHGVE-DQPMRQIMKHFH---SCTDKPRLVGL 170
 AGDcr-2 CTAQIILLDVLRRHGYS PANINLIVFDECHRAVG-QHPMHAIMKEIVAA-PASERPRVLGL 177
 DMDcr2 GTAQVFLDMVTQTYVALSSLVVIIDECHHGTG-HHPFREFMRLFTIA-NQTKLPRVVGVL 171
 CEDcr1 ITAQCLLDLIRHAYLKI EDMCVLIFDECHHALGSQHPYRSIMVDYKLLKDKFVPRVLGL 179
 * . * : : : : : : : : : : * * * : * : : : : * * * : * * :

RPDcr2 TATLLNANCK-IERIDSEIKTLETNMDSIVITATD---EELVQKYSTNPKEKIVRYSSQA 230
 BGDcr2 TATLLNKNCN-AVKVANEVVKLETTFQSTVATCEN---MDEVCFATNPIELTVTFKEGC 226
 TCDcr2 TATLLNGNCK-LSKVMDEIRSLEVTFHSHKVVATVEG---LDVVVGYSTNPQELFKVCPGA 226
 AGDcr-2 SGTLLFKELKMASQVPDELERLENTFSSTIATVANYDDYATVASFSTNPNEVLVTVSKPA 237
 DMDcr2 TGVLIKGN---ITNVATKLKELEITYRGNIIITVSDTKEMENVMLYATKPTVMVVSFPH-Q 228
 CEDcr1 TASLIKAKVA-PEKLMEQKLEESAMDSVIETASD---LVSLSKYGAAPYEVVVIICKDFE 235
 : . * : : : : : : : : * * . : * . : : : : * * :

Helicase

RPDcr2 NGNDD-----ATNNTVPLVYSSAKLQKLCFFKNYEPENVAI----- 381
 BGDcr2 S---D-----CTLGTQIRNYSYKVLTLIEIKKYVPPDIAISPEDADCNTDSLQRKKE 396
 TCDcr2 AG-----YEPLKIRKFSDDKVLKVFILDEYKTKSDEE----- 375
 AGDcr-2 SGLRG-----THQILSFSSDQARKLLKYLEDYSRTAEDKN----- 384
 DMDcr2 QDMTYDDDDNVNTEEVIMNFTPKVQRFLMSLKVSFADKDPK----- 385
 CEDcr1 KKIKS-----IEALRPVYVQRVIRLFEILETFNPEFQKER-----MKLEKAE 383
 : : : : . . : :

RPDcr2 -----VFVERRLTAKVLFYVFNILSKTNSMYKG-----IRPEFIVGFNNNPYNDTRE 428
 BGDcr2 KFCTLVFEVRRFTAKVVYWILEELCKVDADFQH-----ISPDFIVGFNYPNPFNDTRE 448
 TCDcr2 -LCCLVFTKRRFTAKVLHHIIDKASQVDPKFYH-----IKSNFVVGNKNPNYNDTRE 426
 AGDcr-2 -KQALVFVRRFTAKVLYHLIRIYFHCLSKRDNEDELVEPIVKPDPFIVGAN-AALEESID 442
 DMDcr2 -ICCLVFEVRRYTCKCIYGLLLNYIQSTPELRN-----VLTQPQFMVGR--NNISPDFE 435
 CEDcr1 HLSAIFVDQRYIAYSLLMMRHHIKSWEPKFKF-----VNPDYVVGASGRNLASSDS 435
 : * . : * . : : : : . : : : : * * :

RPDcr2 VLYLKKS NLATLRKFNCKEVNVLFASNVI EEGIDIRLCNYVIKLDLPQTFRSYIQSKGRA 488
 BGDcr2 GALQRNWCYDCLNRFQIGEKLLVASNVLEEGMDIQKCNLVVKFDLPLNYSYVQSKGRA 508
 TCDcr2 NLYITKKNREVLNSFVSKENIVLVSNNVLEEGVDIPKCTLVIKFDEYRSYIQSKGRA 486
 AGDcr-2 AILVREDRRVIENFRKRKINVLICATINVLEEGIDLQMCNVMIMYDAPLSYASFMQSKGRA 502
 DMDcr2 SVLERKWKSAIQQFRDGNANLMICSSVLEEGIDVQACNHVFILDVPKTFNMYVQSKGRA 495
 CEDcr1 QGLHKR-QTEVLRFRHNEINCLIATS VLEEGVDVQKCNLVIKFDRPLDMSYVQSKGRA 494
 . : . * : * : : : * * * * : * . * * : : * * * * :

RPDcr2 RNKNSIFLLFPE-EVTKELSNYNLFKATEEYMKELQGGKAMGYLQ-SKEHGNEDEDNCN 546
 BGDcr2 RHRTSHYILMVP-SDNTFMSKYEEYKATEKAIERLLVGRTEEREGP-SEELIAKTYDQ 566
 TCDcr2 RHIKSLYITIVETTDAKYDKKYSAFKEIENLVNDLLIGKNSERDHPNLSERINMYNEDK 546
 AGDcr-2 RMKTSYLMMTPAADLQQAFAKRMKLYRDIENRLWEELVGKTIINRPEPLENDRKELDDL 562
 DMDcr2 RTTEAKFVLFTADKEREKTIQQIQYRKAHNDIAEYLDKRVLEKTEPELYEIKGHFQDDI 555
 CEDcr1 RRAGSRVITVEE----- 507
 * : : :

Dicer

RPDcr2 LPPYFADGPGSAMVTGISAISLINRYCMLPQDRFCSLTSYWFVKEINIDC-----LN 599
 BGDcr2 LVPPYRIS--KSSVNLVSAIPLLHRVCNMLPQDKFTVLAPIWYMAET-----T 612
 TCDcr2 LEPYVNGPNSAQVNMTSAVALLCRYCSNLASDKYTTYAPEWYEEEDSSS-----A 597
 AGDcr-2 IPPFYTPFK--AKLDALSAIQLLNRYCMLPRLDFTGNSVNTWERIDR-----SPT 610
 DMDcr2 DP-FTNENG--AVLLPNNALAILHRVCQTIPTDAFGFVWPWFVQLQEDERDRIFGVSAKG 612
 CEDcr1 -----KDTAAYCSKLPSDIFTRLVPHNQIPIEENG-----VT 540
 ** : . * :

RPDcr2 KYQGILQLPVNSAIKNLIEGP-LCDSKMNAKRGVALEACKLLHCHGELDSNLLPCGKNSE 658
 BGDcr2 KPKICLQLPMNSPLTELEGQ-EMDNRKLSKRSAALEACKRLHQMGELTDSLPTGRESA 671
 TCDcr2 KLRVVIPLPVVCPIDPIVGP-YMHNKKDAKRAAALVACIKLHQCGELDNLLPWKKQLD 656
 AGDcr-2 EIIVTVKLPQSTVREVIHQG-TMKNLKLAKQSAAFNACKRLFVVGELNMYLLPIATKDK 669
 DMDcr2 KHVISINMPVNCMLRDTIYSD-PMDNVKTAKISAAFKACKVLYSLGELNERFVPTLKER 671
 CEDcr1 KYCAELLPLINSPIKHAIVLKNPMPNKTAQMAVALEACRQLHLEGELDDNLLPKGRE-- 598
 : : * : . : . * . : : . * : * * * . * * : * :

RPDcr2 LLSD-KKLFPHWQLHES----- 674
 BGDcr2 VLDS-SDLFPLYVEDDETEELDTAPRGSKNRKYPIQFPDFLSNCRPKPNVDSFLHVIV 730
 TCDcr2 EADV-SYLFTHWPQEKESDAGNKKKKRLHDKIAPSVKS-----AIQPDRLVLYHTIN 708
 AGDcr-2 VEELSEQYFKLWRKMSDGMTKYV-----RGHKIVYPEETVGGCTPQADGEQCYVYIVR 721
 DMDcr2 VASIADVHFEHWNKYGDSVTATVKNADKSKDRTYKTECPLEFYDALPRVG-EICYAYEIF 730
 CEDcr1 --SIAKLLEHIDEEDPEYAPGIAAKVGSKRKQLYDKKIARALNESFVEADKECFIYAFE 656

PAZ

RPDcr2 DWETIKKHEKLPKPLSNKGR---ENLVVDEETYLNKVVVPWYRHQGDMSRYIVTKVC 810
 BGDcr2 DWDVRSHGTLPEVVEPTTEER---NNLVISEELFGKTVVVPWYRSTQPDQNYIVTQIT 902
 TCDcr2 DFRVIRDKNLKNKLEPAATER---INLNVTEETYLHKIVSPWYRS--PPKMYVTKVC 878
 AGDcr-2 DWELMGKFPYLRPAEETSTRAR---QHILRFETEYLLRNVHPWYKND-PDQNYVVVRV 890
 DMDcr2 DWELMTNFRRLPQSHGNSVQQR---QQPAPRPEDFEGKIVTQWYAN--YDKPMLVTKVH 899
 CEDcr1 TINMKYVSEVVANMENMPRIKDEVRQYKFNAEDYKDAIVMPWYRNLEQPVFYVAEIL 834
 : : : * : * * * * . . .

RPDcr2 SDEKPDSPFPSANYESYAQYFFQRYNQKLLN---LSQPLIEVRAISSKLNLLLPKGGKQ 866
 BGDcr2 S-LTPSSPFPSNDYTSYADYYDKYKLEIVK---VDQPLLEVKAISNKINCLRPGRNKV 957
 TCDcr2 PDKSALSRFPNHEYPNFVSYSEKHSLSILD---PSQPLLVKGLSERLNAFKPRGAG 934
 AGDcr-2 DDLRPTSPFPNAKYDSYEQYFAEQHHQVVVR---HEDQFLIEVKGITSLNRLHPG---- 943
 DMDcr2 RELTPLSYMKNQDQKTYEFTMSKYGNRIGDVVHKDKFMIEVRDLTEQLTFYVH----- 954
 CEDcr1 PEWRPSSKFPDTHFETFNIEYFIKKYKLEIYD---QNQSLLDVDFSTRLNLLQPRIQ 890
 . * : . . . : . : : * : : .

RPDcr2 S-----SRQKRLE-GDDFEETLIPCLLLEFPVYMLKATVL 903
 BGDcr2 SH-----STSKRRHELQEDFEENLIGELCMRFQFPVWLKATCL 998
 TCDcr2 K-----RKKEKMYELEEYLIPELVIKQEFPSCLWIQARFL 970
 AGDcr-2 AE-----ADGGASTRSRYWEFQEILIPELVHNFEPADYWLKATLL 984
 DMDcr2 -----NRGKFNASKAKMKVILIPELCFNFPFGDLWLKLI 992
 CEDcr1 PRRSRTVSNSSSTSNIPQASASDSKESNTSVPHSSQRQILVPELMDIHPISATLWNVIAAL 950
 . . . * : * * : . . *

RNase IIIa

RPDcr2 PKAFLSILNDKDNSIGPEQQVILQALTAVSATDIINYERLETLGDSFLKFIIVSLALFIYY 1130
 BGDcr2 EHWDAIILDISEDGLGPELREVQALTSASSNDIFNLERLETLGDSFLKLMASLYLYMHY 1201
 TCDcr2 EAKQLQILDVQFDNQSPNLCOIQALTAEEANDIVNLERLETLGDSFLKFFVASLYIIFKF 1184
 AGDcr-2 QIAMLRRLTMDNTANVALQQSDLLQALTTKSSADVFNLERFEVLGDAFLKFAVSVYILFRH 1251
 DMDcr2 PLLILQKTVSKEHITPAEQGEFLAAITASSAADVFDMERLETLGDSFLKLSATLYLASKY 1232
 CEDcr1 RSEEVVSHIDSIGLVSPCLLLLTALTTSNAAAGMSLERFETIGDSFLKFATTDYLYHTL 1370
 . . . * : : * . . * * * : * * * * : : :

RPDcr2 PDKDEGKLIQVKGKIIGNKNFFVGSNILLGSLKLVNDFSP-SDWDVPCFNIIRDFKNII 1189
 BGDcr2 LRLDEGKLIQVKGKLIIGNRNLYYCGINQKLGGMKVHDFVPTSDWIAPGICVDREIQQLM 1261
 TCDcr2 PTYNEGKSTILKGLVSNKNLYLGVKRNKLGILKNSDLSP-SDWVPPCFPCIPQTISKAI 1243
 AGDcr-2 TSWHEGYLITCKGRMVSNRNLLYCAMGYGLPGKIKAHFPDPKNDWVPLSTVPGAVRRAM 1311
 DMDcr2 SDWNEGTLTEVKSKLVSNRNLLFCLIDADIPKTLNTIQFTPRYTWLPFGISLPHNVLALW 1292
 CEDcr1 LDQHEGKLSFARSKEVSNCLYRLGKKGIPQLIVANKFDAHDSWLPVPCYIPTCDFKAPN 1430
 . * * : : : : * * : : : : . * *

RPDcr2 KHFRFSPNIMYQIGLS---PLERDSG---ILNEETRLKHELINKAEENDETSH----- 1237
 BGDcr2 RAMNVSPNPLYELVLP---PNEQMSG---VLENTKEIIRQKLTANVDSKGIH----- 1309
 TCDcr2 GNKEYSVVSLFNCCIS---PEEQVSG---NLNRKTLSDMITTEIAP--DEENSY----- 1289
 AGDcr-2 VDANESPALLYNLKLT---EEEIQSG---VVAQATVDKFLPLIEQAPAPSQ----- 1356
 DMDcr2 RENPEFAKIIIGHNLR---DLALGDEESLVKGNCSIDINYRNFVEGCRANGQSFYAGADF 1348
 CEDcr1 TDDAEKDNIEIRILDGQVIIEKPKENKTGWDIGGDVSKSTTDGIETITFPKQARVGNDDI 1490
 :


```

RPDcr2      -SSWA-IIGQHSVSDKTIISDAVEALVGVYLQACGIEGAVTLCQWLGIQAQISDVTQLFN 1295
BGDcr2      -SSMENFLAVRAVADKTIADGVEALIGAYLKGSGIRGALRLTLWLKILPSEALPGALLDT 1368
TCDcr2      -GNMCFLNKQYVGDKSIADSVALLGAYFLSGGIQGGIKFMEWIGILPLSEQIQRLLIET 1348
AGDcr-2     -STLHTVLQQVQIRDKVADVTEALLGVCVKTVGYERSFRFLSHLGIIPKGAADVPMLLRT 1415
DMDcr2      SSEVNFVGLVLTIPNKVIADTLEALLGVIVKNYGLQHAFKMLEYFKICRADIDKPLTQLL 1408
CEDcr1      SPLPYNLLTQQHISDKSIADAVEALIGVHLLTLGPNPTLKVNMWMLKVIQKDKSDVPS 1550
          :   :   : * : * : * : * . . . * . . . : :

```

RNase IIIb

```

RPDcr2      SP-----APTAQFNACLDVDCLLVEHQ--LEATIGYKFKDRSFLQALTHASYQNN-IT 1347
BGDcr2      QPP-TADVMDRDNQPGDIYVLLSIHECMAIENILQYTFKDRSYLLQALTHASYTPNKRVT 1427
TCDcr2      TQ-----VDPVLNKKSTKTDVDFHMPQWREIEQRLGYTFNRAFLLQALTHSSYSPNRIT 1403
AGDcr-2     TTF-PIGDYFPVRH---KVDQLLCNPER--IEATLGYFRNRITYLLQAFTHTSYTSNSLT 1469
DMDcr2      NLE-LGGKKMRANVNTIEIDGFLINHY--LEKNLGYTFKDRRYLLQALTHPSYPTNRIT 1465
CEDcr1      PLLRFIDTPTNPNASLNFLNNLWQQFQFTQLEEKIGYRFKERAYLVQAFTHASYINNVRT 1610
          : * : * * : * : * : * : * : * : * : *

```

```

RPDcr2      DCYQRFEFLGDAILDFLITAHYIYENCGNLSPGELTDLRSALVNNVTFACLSVRYGFHRYL 1407
BGDcr2      ECYQRLEFLGDAILDFLITCHIYESCGELTPGELTDLRSSLVNNVTFASLTVRYGFHKFM 1487
TCDcr2      LSYERLEFLGDAVLDFLITCYIFEHCGLHEPGQVTDLRSSLVNNNTFASLVVRCGFHKFL 1463
AGDcr-2     GSYQQLEFLGDAVLDFLVSMYIYERNPMSPGQLTDLRSALVNNVNLAACVLRNELHRHI 1529
DMDcr2      GSYQLEFLGDAILDFLISAYIFENNTKMNPGALTDLRSALVNNNTLACICVRHRLHFFI 1525
CEDcr1      GCYQRLEFLGDAVLDYMITRYLFEDSRQYSPGVLTDLRSALVNNNTIFASLAVKFFEQKHF 1670
          . * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

```

RPDcr2      NARSSKLNELVLRVFKHQESRDHKIGAEVLFLEEQNAQ----- 1446
BGDcr2      KYTSRRLMDMVDRFVQFQEDNGHSINEEVLILLEETEIN----- 1526
TCDcr2      LMMNSNLQGHIDKFADYLASKNYVIDDEVLLILLEEDENM----- 1502
AGDcr-2     LSQSPMLTDAIGKFAVHRCHRNGQSNVWRLLTEESDTP----- 1568
DMDcr2      LAENAKLSEIISKFVNFQESQGHVTVNYVRIILLEEADVQPTPLDLDELDMTELPHANKC 1585
CEDcr1      IAMCPGLYHMIKFKVLCSEFNFDTNFNAEMYMVTTEEEIDE----- 1712
          . * : : * . . . : :

```

```

RPDcr2      -----VAESVDVPKLIGDLFESIAAAIYLDGSKNLQLVNIVFYFNLMKKE 1490
BGDcr2      -----IAEAIQVQKVLGDLFESIAGAIYLDGSMNLKEVWRVYVYRIMRKE 1570
TCDcr2      -----IAEYVDVQKVLGDI FEALAGAIYLDNKLKTVWRVYFYKIWRRE 1546
AGDcr-2     -----MAEYVDVQKVLGDLVLEALIGAIYLDGNDLAATWEVCFRLLRDE 1612
DMDcr2      ISQEAQKGVPPKGEFNMSTNVDPKALGDLVLEALIAAVYLDGR-DLQRTWEVIFNLFEP 1644
CEDcr1      -----GQEEDIEVQKAMGDI FESVAGAIYLDGSRNLDTTWQVIFHMMRGT 1757
          : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

Anexo 3

Alinhamento dos domínios RNases IIIa e IIIb e dsRBD de Drosha de *R. prolixus* (RPDrosha), *Apis mellifera* (AMdrosha; XP_394444.3), *Caenorhabditis elegans* (CEDrosha; NP_001122460.2) e *Drosophila melanogaster* (DMdrosha; AAF59169.1). Resíduos idênticos são indicados por “*”, resíduos conservados por “:” e semi-conservados por “.”. Alinhamento realizado através do algoritmo CLUSTALW.

RNase I

```

RPdrosha    DVTIAISGEGFYRTGIMCDIVQHAMLIPVLVTHLRFHRSLDVLENEINYKFLNRSLLQLA 646
AMdrosha    DVTVDVSSEGIFYRTGIMCDIVQHAMLIPVLVCHLRFHKSLDNLERTLGYEFKNRYLLQLA 799
DMdrosha    NITVAISSEGIFYRTGIMCDVQAHAMLIPVLTGHLRFHKSLDLLEESIGYRFKNRYLLQLA 763
CEDrosha    NLKLRFPVAGFIETGLKPDVAHVMTILACHHIRYNFSLDVFEEVIEYKFNDRRVIELA 627
          : : : . * * . * : * . * : : : * : : * * : * . : * * : * : * : *

RPdrosha    LTHPSYRENFGTNPDHARNSLTNCGIRQPEYGDRIHYMNTRRKGINILINIMSRFGKCC 706
AMdrosha    LTHPSYRENFGTNPDHARNSLTNCGIRQPEYGDRIHYMNTRRKGINILINIMSRFGART 859
DMdrosha    LTHPSYKENYGTNPDHARNSLTNCGIRQPEYGDRIHYMNTRRKGINILVLSIMSRFGKEH 823
CEDrosha    LMHSSFKSHYGTPIDHVKNMITNCGYRR-KYG---AEDKREKRGIMSLFNIMK---GT 679
          * * : : : * * * : * : * * * : * : * . . : * * * : * : * *

```

```

RPdrosha      ETESNITHNERLEFLGDAVVEFVTSIHLFHLFPRLEEGGLATYRAAIVQNQH LAVLAKTL 766
AMdrosha      ETESSIAHNERLEFLGDAVVEFLTSLIHLFHMFPDLEEGGLATYRAAIVQNQH LAVLAKKL 919
DMdrosha      ETVSNITHNERLEFLGDAVVEFLSSIHLLFFMFPLEEGGLATYRAAIVQNQH LALLAKKL 883
CEdrosha      SGGEPILHNERLEYLGDVAVVELIVSHHLYFMLTHHFEGGLATYRTALVQNRNLATLAKNC 739
      . . * *****:*****: * *: :. . . *****:*****:*** **

```

```

RPdrosha      GLDGYMLYAHGSDLCHDLELRHAMANCFEALMGALFLDGGIEAADKVFGETLFGKGNPKLL 826
AMdrosha      NLEEYMLYAHGSDLCHDLELRHAMANCFEALMGSLFLDGGIEVADRVFGETLFGKDEEDLA 979
DMdrosha      QLEEFMLYAHGSDLCHDLELRHAMANCFEALMGALLLDGGIKVADEVFTDALFRQDEKLL 943
CEdrosha      RIDEMLQYSHGADLINVAEFKHALANAFVAVMAATYLDGGLAPCDVIFSKAMYGHQPVLK 799
      :: : * ***** : * : *****:*****: : : ***** : * * : : : : *

```

RNase I

```

RPdrosha      HVWVNYPPHPLQEQQPNGDRQWIPSFKILQDLTKFEETIGVQFTHIRLLARAFTRDSIGF 886
AMdrosha      KVWVNYPKHPLQEQQPTGDRQWIPSELLQKLTKFEEISIGIEFTHIRLLARAFTRDSIGY 1039
DMdrosha      SIWKNLPEHPLQEQQPLGDRSCIDSYRVLKELTKFEDSIGIKFKHIRLLARAFTRDSIGF 1003
CEdrosha      EKWDHINEHELKRDPQGRDLSFITPTLSTFHALEERLGIQFNNIRLLAKAFTRRNIPN 859
      * : * * : : * * * * . * . : : * : : * : * : * : * : * * *

```

```

RPdrosha      TNLTGNSQRLEFLGDTVLQLIASSEYLYKYFPEHHEGHLSSVLIKIDFYHKYSSCNLLRSS 946
AMdrosha      TNLTGNSQRLEFLGDTVLQLIVSEYLYKYFPEHHEGHLSS-----LLRSS 1084
DMdrosha      THLTGNSQRLEFLGDTVLQLICSEYLYRHFPEHHEGHLSS-----LLRSS 1048
CEdrosha      NDLTKGHNQRLEWLGDSVLQLIVSDFLYRRFPYHHEGHMS-----LLRTS 904
      ..** * *****:***** * : * : * * *****: * *****:

```

```

RPdrosha      LVNNTQSVVCCNDLGMGAYAIYA-NPKAELTKDRADLLEAFLGALYVDKGLIYCQTFAN 1005
AMdrosha      LVNNTQAVVCCDLGMTQYALYG-NPKAELTKDRADLLEAFLGALYVDKGLIYCRVFCN 1143
DMdrosha      LVNNTQAVVCCDLGMPKYAVYA-NPKADLTKDRADLLEAFLGALYVDKGLIYCEQFCH 1107
CEdrosha      LVSNQTQAVVCCDLGTFEFVIAKPYKTPELKLDKADLVEAFLGALYVDRGIEHCRAFIR 964
      ** : * : * : * : * : * : : : . . . : * * * : * : * : * : * : * : * : *

```

dsRBD

```

RPdrosha      VCFPRRLHDFIMHQDWNPKSKLQQCCCLTLRMEGGEPEIPIYKVIKCMGPTNTRLYTVA 1065
AMdrosha      VCFPRRLQDFIMNQDWNPKSKLQQCCCLTLRMDGGEPEIPYKVIKCKGPTNTRVYTVVA 1203
DMdrosha      VCLFPRRLQDFIMNQDWNPKSKLQQCCCLTLRMDGGEPEIPYKVVVEASGPTNTRVYKVA 1167
CEdrosha      IVFCPRRLKHFIESEKWNDAKSHLQQWCLAMRDPSSSEPEYRVLGIEGPTNTRIFKIA 1024
      : : * * : * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

RPdrosha      VYFRQKRLAQASGHSIQQAEMNAAREALKNSQRLFPQLDHQKRVIKSMKREPGSRALRD 1125
AMdrosha      VYFQKRLAKASGHSIQQAEMNSAKEALEKSQDLFPQLDHQKRVIKSMKMQQWP----- 1258
DMdrosha      VYFRKRLATSSGHSIQQAEMNAKQALENSRDLFPQLDHQKRVIKSIKQQTGN----- 1222
CEdrosha      VYKGRKRLASAAESNVHKAELRVAELALAN-----LESMSFSKMKAKNNS----- 1069
      * : * : * * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

Anexo 4

Alinhamento dos domínios PAZ e PIWI de Argonauta 1 de *R. prolixus* (RPAgo1), aubergine de *Tribolium castaneum* (aubTC; XP_001811159.1), piwi de *Tribolium castaneum* (piwiTC; GenBank: EFA07425.1); piwi de *Aedes aegypti* (piwiAA; XP_001653082.1), piwi de *Drosophila melanogaster* (piwiDM; GenBank: AAD08705.1), piwi de *Acromyrmex echinatior* (piwiAE; GenBank: EGI64222.1) e aubergine de *Apis mellifera* (aubAM; NP_001159378.1). Resíduos idênticos são indicados por “*”, resíduos conservados por “:” e semi-conservados por “.”. Alinhamento realizado através do algoritmo CLUSTALW.

PAZ

```

aubTC      QHEKDILLNVLDLQFKFMRITDVIYDNLLECGG----ANARKEFQSKIIIGSVVLTHYNNKTY 360
piwiTC     QHEKDILLNVLDLQFKFMRITDVIYDNLLECGG----ANARKEFQSKIIIGSVVLTHYNNKTY 348
RPAgo1     QHETSILMCAEITHKVMRRDALTDLIHMKSRRHRNADWRNAFVNAIVGTIVLTHHNRTY 377
piwiAE     QHERDILMCVEISNKVMRLETGLDILNFFYREDH-GRFRENFCAVIGTVVLTDYNNNTY 396
aubAM      QHEKSILMCAEIIHKVMRQQTLLDIINDCYKQDK-LDYETSFENQVIGLVVLTDYNNNTY 286
piwiAA     QHEQDILVCCIEIAHKTRMRTQCYDILRECRHD--RSYKDAFTRSVLGVVLTGYNNKTY 324
piwiDM     QHEKDILLGTEITHKVMRTEIYDIMRRC SHNP--ARHQDEVVNVLDLIVLTDYNNRTY 300
      *** .** : : * * * * * : . . . : : * : * * *

```

```

aubTC      KIDDVDFNSTPAHTFKLKDGETTFKDYFKKKYNVDIRVKDQPMILSRSKPREIRVGVPE 420
piwiTC    KIDDVDFNSTPAHTFKLKDGETTFKDYFKKKYNVDIRVKDQPMILSRSKPREIRVGVPE 408
RPAgo1    RIDDVEFDVRPNSRFKLRNNEELTYVEYYLKRKYDLRIKNLDQPMIVSRAKPREIRAGMTE 437
piwiAE    RIEDVDFASPSSSFPLKNGENITYIDYYRKKYDIKIRNSGHPMLVTKSKRRDRQAEERGE 456
aubAM     CISDVDFDSSPDSTFQLRTGEEKISYREYYRNKYQISITNASQPMLVTRLKPRERRAGQAE 346
piwiAA    TIHDVSFDTPSSTFETKNG-KISFIDYYQQKYNIRIRDPNQPMILSRRAKRRDLRAGGNE 383
piwiDM    RINDVDFGQTPKSTFSCKGR-DISFVEYYLTKYNIRIRDHNQPLLSKNRDKALKTNASE 359
          * * * . * * : . : : : : * . : : : : : : : .

```

```

aubTC      TVYLVPELCLMTGLTDRQRENFNLMKMLATHTRIGVEGRIKKLMEFSQKLNKPDVVNEI 480
piwiTC    TVYLVPELCLMTGLTDRQRENFNLMKMLATHTRIGVEGRIKKLMEFSQKLNKPDVVNEI 468
RPAgo1    NIFLVPELCRLTGLTDDMRSNFQLMRALAEHTRVLPQSRIEKLNKFSQRLRSSPTVKEDL 497
piwiAE    RVYLVPELCRATGLTDSMRNYRLMSSLAVETRLQPGKRIEKLRFNKRKLCERTIKQEL 516
aubAM     LVYLVPELCRATGLTDAIRDNFHLMRTLAEYTRVSPAARIDKLMVFNRRLRGNPSIVREL 406
piwiAA    LMALVPELCQMTGLTEQMRSDFRMMRAMSDYTRLNPDRRIERLETFNRRLQITPESMEVF 443
piwiDM    LVVLIPELCRVTLGNAEMRSNFQLMRAMSSYTRMNPQRTRDLRAFNRHLQNTPEVSKVL 419
          : * : * * * * * * . * : : : : * : : * : * * * * * . : :

```

PIWI

```

aubTC      TMILVILPNNSTERYSAIKKKCYVDRGIPTQMFVARNLTSK-----GVMSIATKVAIQMN 652
piwiTC    TMILVILPNNSTERYSAIKKKCYVDRGIPTQMFVARNLTSK-----GVMSIATKVAIQMN 640
RPAgo1    QLIMCIVPNNRSDRYAAIKKKCCVDRAPTQVVLAKNLNSK-----GIMSIA TKIAVQIN 669
piwiAE    QLVFCAVSNRSDRYSAIKKKCCVDRPVPSQICLTRIMTHK-----NIKSIATKIAIQMS 687
aubAM     ELIFCVVSNRADRYSAIKKKCTHDRVASQVFLAKNLTK-----GIRSIATKVAIQLN 578
piwiAA    QLIMCVVTNQKADRYTAIKKKCCVDRAPTQVICQKITTPKGGNVRTLMSVATKVIQMN 620
piwiDM    KLILCLVPNDNAERYSSIKKRGYVDRAPTQVVTLLKTKPKP----YSLMSIATKIAIQLN 592
          : : : : * : : : : * * * : : * : : . : : : : * : * * * : : : .

```

```

aubTC      CKIGGAPWCVPPIPLSGLMVVGYDVCRTVNKKKSFAGIVGSLDK---NISRFYNICCEHK 709
piwiTC    CKIGGAPWCVPPIPLSGLMVVGYDVCRTVNKKKSFAGIVGSLDK---NISRFYNICCEHK 697
RPAgo1    CKIGGTPWTVAVPLS-----VSILKTKAAMK----- 695
piwiAE    CKLGGAPWYVDVPLEGLMMIGFDVCHDTTMRNKDFGATIATLNR---RMTQYFSAVNVHH 744
aubAM     CKLGGAPWSVELPPINLMVVGVDVCHDPAKSRDFGAMVASLDR---SLTRYSSAVAAHT 635
piwiAA    CKLGGVPWKVIPLNGLMTVGFVCHDNDKSKSYGAMVATFDHNRGTPKFFSTVSQHG 680
piwiDM    CKLGYTPWMIELPLSGLMTIGFDIAKSTRDRKRAYGALIASMDLQQNST--YFSTVTECS 650
          ** : * . ** : : *

```

```

aubTC      MEEELSDNFAAAVVLLCKQYKEQNGHYPERILYRDGVGEGQLPFVVEHEVANIKRKLQE 769
piwiTC    MEEELSDNFAAAVVLLCKQYKEQNGHYPERILYRDGVGEGQLPFVVEHEVANIKRKLQE 757
RPAgo1    -----YRKYNDN--ALPSCIVIYRDGVGEGQIPFVYNHEVRLIKDKL-A 736
piwiAE    TGEELSDNLSDNICKSAQAYYALNKTLPGRIVYRDGVGEGQVPLVMDREVIQIKKKLDG 804
aubAM     TGEELSDFGESLEKAVLCYRQVNKILPISHIVIYRDGVGEGQVPYVYKHEVDDIKAKLNK 695
piwiAA    HGEEICNYLPLNTVKALNEYRKEYNELPKRIFRYRDGVGEGQLHYVYHEVKAIVDKLN 740
piwiDM    AFDVLANLWPMIAKALRQYQHEHRKLP SRIVFYRDGVSSGSLKQLFEFEVKDII EK LKT 710
          * * * : * : * * * : : : : : * * * * *

```

```

aubTC      EIYINGEVK---MAFVVVSKRINTRIFTEKDNPPP GTVVDDVITLPERYDFYIVSQVQRQ 826
piwiTC    EIYINGEVK---MAFVVVSKRINTRIFTEKDNPPP GTVVDDVITLPERYDFYIVSQVQRQ 814
RPAgo1    DLYNGKPPK---LAFIVVTKRLNTRIFHLNKNPPP GTVADDCITSPDKYDFFLVSQSVQRQ 793
piwiAE    LYGGPDRYR---MAFIIVTKRLNTRFFENNDNPEPGTIVDDVITSPIKYDFFIVSQVQRQ 861
aubAM     LYGDPSTIK---LAFVIVTKRINTRLFYNNQNNPPP GTVVDDIVTNPLRYDFFIVSQSVQRQ 752
piwiAA    IYKSAGAEQDVMFTFFIVNKRINTRRFFDRKQNP RP GTVVDDVITLPERYDFYIVSQVQRQ 800
piwiDM    EYARVQLSP-PQLAYIVVTRSMNTRFFFLNGQNPPP GTIVDDVITLPERYDFYIVSQVQRQ 769
          : : : : * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


Anexo 6

Alinhamento dos domínios PAZ e PIWI de Argonauta 2b de *R. prolixus* (RPAgo2B), aubergine de *Nilaparvata lugens* (aubNL; GenBank: AEI25513.1), piwi de *Tribolium castaneum* (piwiTC; GenBank: EFA07425.1), piwi de *Harpegnathos saltator* (piwiHS; GenBank: EFN83189.1), piwi de *Aedes aegypti* (piwiAA; XP_001663870.1), piwi de *Drosophila melanogaster* (piwiDM; GenBank: AGA18882.1), piwi de *Acromyrmex echinator* (piwiAE; GenBank: EGI61307.1), aubergine de *Apis mellifera* (aubAM; GenBank: ACV84378.1) e piwi de *Culex quinquefasciatus* (piwiCQ; XP_001844068.1). Resíduos idênticos são indicados por “*”, resíduos conservados por “:” e semi-conservados por “.”. Alinhamento realizado através do algoritmo CLUSTALW.

PAZ

```

Ago2b      ITITRTKDLVMGDPNYVEFFNLVLRKCIASLNLQQIGGNYFDIAGKIVLEKFNLELWPGF 243
aubNL      VRMVDKDAIKYGDQTYLQVNLIVVRKCIANLDMTLLGRNYYDPKAKITIPFSLLELWPGY 89
piwiAE     IYLVG--RMPEDPHYITIFNIIMRKQLEYLNLQVGRDYDAYNKISVHQFRLELWPGY 146
piwiHS     IRFVG--DMSRDDPHHIQVFNIIMRKCLEHLRLQMVGRNYYDANNKIGIHDYKLELWPGY 172
aubAM      IRLVG--EMEKVDQRYLQFFNIIMRKCCLALLNLQVGRDYFDAHSKVEVRDFRLELWPGY 194
piwiTC     IRLVG--DLAWGDMHYIQLFNIIIRKCLKMLGLQQVGRNYFMPDNKIVISEHKIQLWPGY 287
piwiAA     IVHTG--TVDMTNETGIQVNLILRRAMGGLNLQVGRNLYDAAAKIAIRD FHIELWPGY 268
piwiCQ     Iihtg--SVDMTNETGIQVNLILRRAMAGLNLQVGRNLFDAAAKIAIREYQIELWPGY 245
piwiDM     IKFVG--FISCAEPRFLQVNLILRRSMKGLNLELVGRNLFDPRAKIEIREFKMELWPGY 237
           : . : : : : : * : : : : : : * : : : : : : * : : : : : : * : : : : : :
           : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

Ago2b      MTSIRQHERDIMLGI DVTNKIIRTDTALDLL-IDISQGSSENWEERFAQAIVGASVLT PYN 302
aubNL      LTSMRQHEHSFLLCVEI IHKVL RQDTAYDLRLAMQRDSRNYQDIFRNEMIGQVVLTSYG 149
piwiAE     ITSIRQHERDILLNAEITHKVMRQETLYHVLMDCYRH-SNNYRVKFCNSVIGIMVLT DYN 205
piwiHS     VTSIRQHEYNILMNCEVTHKVL RQQTL LDVLLDCYKYSYDFRSEFCRNVI GITVLT DYN 232
aubAM      LTSIRQHEKSIILMCAEIIHKVMRQQTL LDILNDCYKQDKLDYETS FENQVIGLVVLT DYN 254
piwiTC     FTSMRQHEKDILLNVDLQFKFMR TDVYDNLLECGA---NARKEFQSKIIGSVVLT HYN 344
piwiAA     VTSIRQHEQDILVCCEIAHK TMRMQTCYDVL RDCRTN-DRNYKDAFTRSVLGVVLT GYN 327
piwiCQ     ITSIRQHERDILVCCEIAHK TMRMQTCYDIL RDCQKH-DRNYKDSFKRAVLGVVLT GYN 304
piwiDM     ETSIRQHEKDILLGTEITHKVMRTETIYDIMRRCSHN-PARHQDEVRVNVLDLIVLT DYN 296
           ** : * * * * : : : : * : * : * . : . . : : . * * * * .

Ago2b      N-RIYRVDDVDFGSSPLSFFKQG-NKRVTFIEYYCTRYSLKISNIRQPLLI SHPKKSDLL 360
aubNL      NTATYKVVDDVDFTSNPDIT FDMK-GVKT TIRDYNSKYGLKI QDSRQPLLVSRPKARDER 208
piwiAE     N-HTYRIEDVDFETNPSST FPMKDGQHSYQ EYYKTKYKINISSASQPMVLRTPKPTRN 264
piwiHS     K-YTYRIEDVDFDASPSST FSMKTGEVISYRDYYWQYTI RITDMTQPMVLRTPKPRVN 291
aubAM      N-NTYICISDVD FSSPDST FQLRTGEEKISYREYYRNKYQISITNASQPMVLRTRPKPRER 313
piwiTC     N-KTYKIDVD FNSTPAHTFKLKDGETTFKDYFKKKYNVDIRVKDQPMVLRTRPKPREIR 403
piwiAA     N-KTYTIHDVSFETTPSST FETK-NGKISFVEYYQKYNIRIRDPNQPMVLRTRPKPRDLR 385
piwiCQ     N-KTYTINDVTFDTTPEST FDTK-AGKTSFVEYYKQKYNIRIRDPHQPMVLRTRPKPRDLR 362
piwiDM     N-RTYRINDVDFGQTPKST FSCK-GRDISFVEYYLT KYNIRIRDHNQPLLI SKNRDKALK 354
           : * : * * * . * : : : * : * : * * : * : : : : :

Ago2b      EGHSNVVLIPELCCLIGVSEMRYNVQLMKHLEKFTKIRPSAMMNKITAFMNRLLITNQ 420
aubNL      GGRDGPVFLVPELCRMTGIT DEMRNNQNLMRAMADRT RMDSRTRQERLMVQKRFTQTPK 268
piwiAE     AGQGDVLYLVPELCRATGLT DSMREN FHLMKALAVHTCISPTSRIDKLIQFNSRLRQEPK 324
piwiHS     AGQGDVLYLVPELCRATGLT DNMRNFHLMKALS VYTHVNPETRIAKLRITFNDRLRRESK 351
aubAM      AGQAEVLYLVPELCRATGLT DAIRDNFHLMR TLAEYTRVSPAARIDKLMVFNRRLRGNPS 373
piwiTC     VGVPEVLYLVPELCMTGLTDRQREN FNLMKMLATHTRIGVEGRIKKLMFESQKLNKPD 463
piwiAA     AGGNELMALVPELCQMTGLT DQMRNDFRMMRAMSDYTRLNPDRRIERLET FNRRLQITPE 445
piwiCQ     AGGSELMALVPELCQMTGLT DQMRSDFRMMRAMADHTRLNPDRRIERLET FNKRLQTSPE 422
piwiDM     TNASELVVLIPELCRVTGLNAEMRSNFQLMRAMSSYTRMNPKQRTDRLLRAFNRHLQNTPE 414
           . : * : * * * * * : . * : . : : : * : : : : * : : : .

```



```

Ago2b      FFLVLSQHVREGTATPTSYNVIYDTSNLSPLDILHKLTYKLCHLYYNWSGSRVVPAPVQYAR 821
aubNL      FFLIPQSVRQGTVSPAGYNVIYDKSGLSADHMQRITYKLCHLYFNWSGTVRVPAPCQYAH 669
piwiAE     FFIVSQQVRQGTISPTSYNVIFDNTGLEVDIVQVVTYKLTHMYNCSTTVRVPAPCHYAH 726
piwiHS     FLLVLSQVVRQGTVSPISFISIISDNTKLDVETIQQVVTYKLTHLYNCTNTVVPAPCHYAQ 752
aubAM      FFIVSQSVRQGTVTPCAYNVIADSTGWKADQMQRMTYKLCHMYNWSGTVRVPAPCQYAH 774
piwiTC     FYIVSQCVRQGTVAPTSYNVIEDSMGLPPEKLYLTYKLTHMYNWSGTVRVPAPCQYAH 864
piwiAA     FYIVSQSVRQGTVSPTAYNVLYDTSGLKVDHLQMLSYKQCHLYYNWSGTVRVPAPCQYAH 857
piwiCQ     FYLVSQSVRQGTVSPTAYNVIYDTSGLRIDHLQMLSYKQCHLYYNWSGTVRVPAPCQYAH 834
piwiDM     FYLVSQQVRQGTVSPTSYNVLYSSMGLSPEKMQKLYKMCCHLYYNWSGTVRVPAPCQYAK 818
* :.:* **:* :* .:.: . . : : : : ** *:* : : .***** :*:

Ago2b      KLALLCGQYLHCAPNEELNQQLYFL 846
aubNL      KLAFLCSQNLHGIPNEDLSDLLYFL 694
piwiAE     KLSFLVGRFLHQPPNSQLEKQLFFL 751
piwiHS     KLSYLVGKYLHRPPHTQLENQLFFL 777
aubAM      KLAFLVAQFVRRPPSARMQSLLYYL 799
piwiTC     KLAFMVSQYIHRPAHHDLDNVLYYL 889
piwiAA     KLSFLIGQFIHQAPSNNLEKKLYFL 882
piwiCQ     KLSFLVAQFLHQAPSNNLEKKLYFL 859
piwiDM     KLATLVGTNLHSIPQNALEKKFYFL 843
**: : . : : . : : : : *

```

Anexo 7

Alinhamento dos domínios PAZ e PIWI de Argonauta 3 de *R. prolixus* (RPAgo3), argonauta de *Apis mellifera* (agoAM; GenBank: ACV84372.1), argonauta 3 de *Bombyx mori* (ago3BM; dbj:BAF98575.1), piwi de *Aedes aegypti* (piwiAA; XP_001652945.1), argonauta 3 de *Drosophila melanogaster* (ago3DM; GenBank: ABO27430.1) e hiwi de *Homo sapiens* (hiwiHS; GenBank: AAK92281.1). Resíduos idênticos são indicados por “*”, resíduos conservados por “:” e semi-conservados por “.”. Alinhamento realizado através do algoritmo CLUSTALW.

PAZ

```

piwiAA     VSAVDEYEGGLMLNLDVSHRVLQTIVLDHIRTLLARANPQD-YKNMATKSLLGAVILTRY 395
ago3DM     VTAVDEYKGGMLMLCCDVSHRILCQKTIVLEMLVDLYQQNVEH-YQESARKMLVGNIVLTRY 324
hiwiHS     TTSILQYENSIMLCTDVSHKVLRSSETVLDVFMFNFYHQTEEHKFQEQVSRELIGLVVLTKY 226
ago3BM     VTAVDEYEGGLMLTLDSTHRVLRQTIVLSLIKEVVQTEGAN-WKRKMTDILIGASVMTTY 372
agoAM      VTAINERYDGGKLCIDARHRVMRTETVRDIMMKFG---GKPNFKDIIIRELIGLSVFTRY 360
RPAgo3     ITAIQEYEDGIMLCCDSSHRVLRQTIVLELMEQIISVDSRT-WKDEFIKLVIGQTVLTRY 837
: : : : * . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

piwiAA     NNKTYRIDDIILFDQNPTMTFEANGQP----ISYLQYYKQQYNIDIHDLKQPLLINRKERR 451
ago3DM     NNRTYKINDICFDQNPTCQFEIKTGC----TSYVEYYKQYHNINIKDVNQPLIYSIKKSR 380
hiwiHS     NNKTYRVDDIDWDQNPKSTFKKADGSE---VSFLEYRKQYNQEITDLKQPVLSQPKRR 283
ago3BM     NKKLFRVDTIDDKMSPRSTFEKTEKGETIQISFIDYYKKNYGIEMDWDQPLLISRDKR 432
agoAM      NNKTYRIDDIAWDKNPTYEFDKGTDK----ISLINYKLVHWNLEITDNGQPLLVHCANKK 416
RPAgo3     NNKMYRVDDVSFDES PKDKFEKKDGTK---MSYIDYFQHYNIKISNTSQPLLKSRVGR 894
* : : : : : : . . * * . * : : : * . . * : : : : : : :

```


PIWI

```

piwiAA      TKIRQETQIVVVICPTSRDDRYAAIKKRICCSEIPVPSQVINARTLSNEAKNRAIVQKIIIL 689
ago3DM      RNITMNTQMVVCICHNRRDDRYAAIKKICCCSEIPIPSQVINAKTLQNDLKIRSVVQKIVL 617
hiwiHS      QKVTADTQIVVCLLSSNRKDKYDAIKKYLCTDCPTPSQCVVARTLGKQQTVMAIATKIAL 520
ago3BM      KCITSSVQLVVAICSTKRDDRYAAIKKVCADNPVPSQVINARTLMNTNKIRSITQKILL 671
agoAM       KNIDQTVNLMVIVFPTNRIIDRYSAVKRVCCVEMPAPSQVIMSRTISRGDKLSITEKIAL 655
RPago3      STLARNLQIVVIVFPTCRIDKYSAVKKWCCIDHPIPSQVIQTRTIRKPEKLRSVTQKIAL 1130
           :      :::* : . * *:* *:* : * : * *** : ::: . . :. ** *

piwiAA      QMNCKLGGTLWSIRIPFDNVMIAGIDTYHD--PKQKSNSVSAFVASLNGDYTRWYSRACI 747
ago3DM      QMNCKLGGSLWTVKIPFKNVMICGIDSYHD--PSNRGNSVAAFVASINSSYSQWYSKAVV 675
hiwiHS      QMNCKMGGELWRVDIPLKLVMIIVGIDCYHD--MTAGRRSIAGFVASINEGMTRWFSRCIF 578
ago3BM      QLNCKLGGTLWSISIPFKSAMIVGIDSYHD--PSRRNRSVCSFVASYNQSMTLWYSKVI 729
agoAM       QINCKLGGALWALAIIPMDHMCICGIDVYHAGVGQSMKGSVAGFVASLDKLLTSWHSKICL 715
RPago3      QINCKLGGALWTVDIPLKHAMVIGLDTFHD--ASRQGKSVGAVVSSLNKGLTRWYSKIYS 1188
           *:*:*:* ** * : *:* . * : *:* : *      * : ..*:* : : *:*

piwiAA      QSKKEEFINGLCASMEKSLKAYQKANCQLPKKIIIFRDGVGDGQLRMCSYEIIPQLQESC 807
ago3DM      QTKREEIVNGLSASFIALKMYRKRNGKLPNTNIIIRYRDGIGDGQLYTCLNYEIPQFEMVC 735
hiwiHS      QDRGQELVDGLKVCQLAALRAWNSCNEYMPSRIIVYRDGVGDGQLKTLVNYEVPQFLDCL 638
ago3BM      QEKGQELVDGLKCCLVDALTHYLRNSGQLPDRIIRYRDGVGDGQLKLLQQYEIPQMKICF 789
agoAM       QGKHQELVDILQICLISAIRAYYRRNKRYPDRIIVYRDGVGDGQLDTVAKYEVKQLLATF 775
RPago3      QAPGIELIEGLEVSILACLQKFKAINGVYPEQILIIYRDGVGDGQLDAVEKFEIPLQIITAC 1248
           *      *::: * .: .: : * * .*:::***:***** :::: *

piwiAA      KLVPEPDYNPEITFIVVQKRINTRMFRIDGNNLENPNPGTVLDHTITRRNHFDYFLVPQSV 867
ago3DM      G-----NRIKISYIVVQKRINTRIFSGSGIHLENPLPGTVVDQHITKSNMYDFFLVSQLV 790
hiwiHS      KSIGRGYNPRLTVIVVKKRVNTRFFAQSGGRLQNPLPGTVIDVEVTRPEWYDFFIVSQAV 698
ago3BM      TILGSNYQPTLTYVVVQKRINTRIFLKS RDGYDNPNGTVVDHCITRRDWDYDFLIVSQV 849
agoAM       KTIEINYQPTLTVIVVQKRINTRLFEISSTGLKNPPPGTIVDSHITKPALYDFFLVSQNI 835
RPago3      RRISPNYDPKFLFVIERG-----DFVNPLPGTVLDHSITRKNYWDFFLVSQLV 1296
           :      : :      ** *:*:* * : * : *:::*. * :

piwiAA      RQGSVSPHYIVVHNQSNHSPDILQRLSYKLCYLYYNWPGSVRVPACCQYAHK MAYLIGQ 927
ago3DM      RQGTVPPTHYVVLRRDDCNYGPDIIQKLSYKLCFLYYNWAGTVRIPACCMYAHK LAYLIGQ 850
hiwiHS      RSGSVSPHYNVIYDNSGLKPDHIQRLTYKLCCHIYYNWPGVIRVPAPCQYAHK LAFVLGQ 758
ago3BM      TQGTVPPTHYVVVYDQSGITPDQCQRLTYKMCHLYYNWPGTVRVPAPCQYAHK LSYLVGQ 909
agoAM       RQGTVSPHYIVVIYDNKKMKPDHIQRLTYKLCCHIYYNWPGTIKVPAPCQYAHK LVS LGGQ 895
RPago3      RQGTVSPHYIVLHNTTKMTPDQVQRFYKLT HLYYNWCGTVRVPAPCQYAHK L ASLVGE 1356
           .*:*:*:* * : :      ** *:::*** .:***** * :::** * *:* : * *

```

