

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**MAIARA DO VALLE FARIA GAMA**

**Caracterização funcional de quitinases de *Rhodnius prolixus***

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador:** Dr. Fernando Ariel Genta

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2017

Gama, Maiara do Valle Faria .

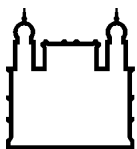
Caracterização funcional de quitinases de *Rhodnius prolixus* / Maiara do Valle Faria Gama. - Rio de Janeiro, 2017.  
77 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Fernando Ariel Genta.

Bibliografia: f. 71-77

1. *Rhodnius prolixus*. 2. Quitinase. 3. RNA de interferência. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**MAIARA DO VALLE FARIA GAMA**

### **CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE QUITINASES DE *RHODNIUS PROLIXUS***

**ORIENTADOR: Dr. Fernando Ariel Genta**

**Aprovada em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### **EXAMINADORES:**

**Dra.** Renata Schama Lellis – IOC (titular - Presidente)

**Prof. Dr.** Gustavo Lazzaro Rezende – UENF (titular)

**Prof. Dr.** Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso – UFRJ (titular)

**Prof. Dr.** Marcelo Salabert Gonzalez – UFF (suplente - Revisor)

**Dra.** Luciana Ordunha Araripe – IOC (suplente)

Rio de Janeiro, 24 de Março de 2017

Dedico este trabalho a minha família em especial ao meu Marido por todo o incentivo e ajuda para que o mesmo se tornasse possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades concedidas, e esperanças renovadas.

Ao meu orientador Dr. Fernando Ariel Genta pela paciência, confiança, e por todos os ensinamentos e esclarecimentos necessários que culminaram na conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Hector Diaz-Albiter pela amizade e ensinamentos prestados.

Ao laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz bem como meus companheiros de jornada Raquel Santos Souza, Caroline Moraes, Daniele Castro, Cecília Stahl, obrigada pela amizade e por todas as trocas de experiências que me ajudaram no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Ricardo Araújo Nascimento em especial a Rafaela Paim pelos ensinamentos.

A Dr<sup>a</sup>. Celeste da Silva Freitas de Souza pelo suporte e conselhos oferecidos.

Aos meus familiares, Minha Mãe Iosane Pereira do Valle, minha Irmã Ana Carolina do Valle Faria, minha Tia-avó Terezinha Sanches de Souza Lacerda, minha Avó Aracy Pereira do Valle, minha Tia Luciane Pereira do Valle, e Primo Gustavo do Valle Monsorens, por sempre acreditarem em mim.

Ao meu marido Diogo de Lima Gama da Silva, por toda paciência, compreensão, confiança, incentivo, apoio e carinho. Com você ao meu lado me incentivando os obstáculos ficaram mais fáceis de serem vencidos.

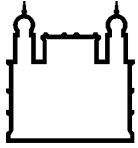
Às agências CNPq, CAPES, FAPERJ e FIOCRUZ pelos recursos financeiros concedidos.

Aos membros da banca examinadora pela atenção a este trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“I drink, and I know things”

Tyrion Lannister  
George R. R. Martin



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

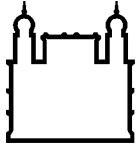
## RESUMO

Quitinases são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações glicosídicas no interior de cadeias de quitina. Em insetos, elas estão relacionadas ao remanejamento da quitina durante o desenvolvimento e ecdise, na digestão de insetos detritívoros e predadores, e no controle da espessura da membrana peritrófica intestinal. As quitinases de insetos descritas até o momento pertencem à família 18 das glicosídeo hidrolases.

O *Rhodnius prolixus* é um dos principais vetores da doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*. No genoma de *R. prolixus* são encontrados 9 genes de quitinases, mas o papel dos transcritos correspondentes ainda não foi estudado em detalhe.

O objetivo deste trabalho é o estudo detalhado da expressão dos transcritos de quitinase de *R. prolixus* e análise de seu papel fisiológico através do silenciamento por RNAi. O conhecimento do papel de quitinases neste inseto pode revelar novos alvos para controle do vetor, assim como revelar novos aspectos de sua fisiologia e da interação entre o inseto e microrganismos.

Através de análises filogenéticas das sequências codificantes de quitinases, foi constatado que esses genes pertencem à diferentes grupos da família 18 das glicosídeo hidrolases, já descritos em outros insetos. Para estudo funcional verificou-se o efeito do silenciamento da expressão desses genes utilizando RNAi. Foi realizada uma curva de concentração injetando quantidades crescentes de dsRNA nos insetos (1µg, 3µg, 6µg e 2 x 3µg) a fim de definir qual a menor concentração que permitiria obter uma maior porcentagem de silenciamento para os diferentes genes GH18. Com base nos resultados obtidos o gene RpCht7 foi escolhido para análise dos fenótipos, pois apresentou uma alta taxa de silenciamento. O silenciamento do gene RpCht7 dobrou a mortalidade de insetos em jejum quando comparado ao controle injetado com dsGFP, mas não alterou a ingestão sanguínea, diurese, digestão, porcentagem de muda, defeitos na muda, razão sexual, tempo médio de eclosão e porcentagem de eclosão dos ovos postos. Entretanto, foi observada uma alteração na oviposição, uma vez que as fêmeas silenciadas para esse gene colocam 34% ovos a menos que os controles. As diferenças na postura de ovos ocorrem de 14 a 20 dias após a alimentação sanguínea. Dessa forma, fica inferido que o gene RpCht7 tem um papel importante na reprodução e pode ser um alvo promissor pra manipulação da aptidão vetorial de *R. prolixus*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## ABSTRACT

Chitinase enzymes are responsible for the hydrolysis of glycosidic linkages within chitin chains. In insects, they belong to glycoside hydrolase family 18 and are related to relocation of chitin during development and molting, digestion in detritivorous and predators, and control of thickness of the peritrophic membrane.

*Rhodnius prolixus* is a main vector of Chagas disease, that is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*. There are 9 chitinase genes in the *R. prolixus* genome, but the role of their corresponding transcripts has not yet been studied in detail yet.

Our goal is the detailed study of expression of *R. prolixus* chitinase transcripts, as well as analysis of their physiological role through silencing by RNAi. Knowledge of chitinase role in insects may reveal new targets for vector control, as well as reveal new aspects of their physiology and interaction between insects and microorganisms.

Through phylogenetic analysis of coding sequences, we found that these genes belong to different subfamilies of GHF18 chitinases already described in other insects. We decided to check the effect of RNAi silencing to better understand the function of these genes. We conducted a concentration curve injecting increasing amounts of dsRNA (1µg, 3µg, 6µg and 2 x 3µg) in order to define which is the lowest concentration that would allow us to get a higher percentage of silencing. Based on the results, the RpCht7 gene was chosen for phenotype analysis, since it showed a higher rate of silencing after treatment with dsRNA. RpCht7 knock down doubled the mortality in starving fifth instar nymphs when compared to dsGFP injected controls. However, it does not alter blood intake, diuresis, digestion, molting rate, molting defects, sexual ratio, percentage of hatching and mean hatching time. Nevertheless, RpCht7 silencing reduces female oviposition in 34%, and differences in oviposition occur within 14 to 20 days after a regurgitating blood meal. These results suggest that RpCht7 is involved in *R. prolixus* reproduction and might be a promising target for manipulation of vector fitness.



# ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Considerações Iniciais.....	1
1.2. Doença de Chagas .....	1
1.2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
1.2.2. Interação <i>T. cruzi</i> x inseto.....	4
1.3. <i>Rhodnius prolixus</i> .....	5
1.4. Quitina.....	7
1.5. Quitinases.....	7
1.6. RNA de interferência .....	10
1.7. Justificativa.....	12
2. OBJETIVO GERAL .....	13
2.1. Objetivos específicos .....	13
3. METODOLOGIA .....	14
3.1. Bioinformática .....	14
3.2. Criação e manutenção de insetos .....	14
3.3. Análise qualitativa da expressão gênica.....	15
3.3.1. Coleta de Material para análise ao longo do desenvolvimento.....	15
3.3.2. Dissecção das ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> .....	15
3.3.3. Extração de RNA total a partir de <i>R. prolixus</i> com Trizol.....	15
3.3.4. Preparação de cDNA.....	16
3.3.5. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR, <i>Polimerase Chain Reaction</i> ).....	16
3.4. Síntese de dsRNA .....	18
3.4.1. Extração de RNA total a partir de <i>R. prolixus</i> com RNazol.....	18
3.4.2. Preparação de cDNA.....	18
3.4.3. PCR.....	19
3.4.4. Purificação do produto de PCR.....	22
3.4.5. Preparação do dsRNA .....	22
3.5. Injeção de dsRNA.....	23
3.6. Análise de fenótipos .....	23
3.6.1. Mortalidade .....	23
3.6.2. Ingestão sanguínea e diurese .....	23
3.6.3. Ecdise.....	24
3.6.4. Ingestão dos adultos .....	24

3.6.5.	Ovoposição e eclosão .....	24
4.	RESULTADOS .....	25
4.1.	Mapeamento das sequências dos genes codificantes de proteínas da família 18 das glicosídeo hidrolases em <i>R. prolixus</i> . .....	25
4.2.	Análise das sequências dos genes codificantes de proteínas da família GH18 em <i>R. prolixus</i> . .....	41
4.3.	Análise semi-quantitativa da expressão dos genes de glicosídeo hidrolases da família 18 em <i>R. prolixus</i> ; .....	45
4.4.	Screening do silenciamento dos transcritos de GH18 por RNAi .....	50
4.5.	Injeção de dsRNA para análise dos fenótipos .....	52
4.5.1.	Mortalidade .....	53
4.5.2.	Ingestão sanguínea, diurese e digestão .....	54
4.5.3.	Muda .....	55
4.5.4.	Fenótipos da muda .....	56
4.5.5.	Razão sexual .....	57
4.5.6.	Ingestão sanguínea em adultos .....	58
4.5.7.	Média de ovos por fêmea .....	58
4.5.8.	Média de ovos ao longo dos dias .....	59
4.5.9.	Porcentagem de eclosão dos ovos .....	60
4.5.10.	Tempo médio de eclosão dos ovos .....	61
5.	DISCUSSÃO .....	62
6.	CONCLUSÕES .....	69
7.	ANEXOS .....	70
8.	REFERÊNCIAS .....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> - Áreas de transmissão vetorial da doença de chagas na América Latina em 2014 .....	<b>3</b>
<b>Figura 1.2</b> - O ciclo de vida do <i>T. Cruzi</i> no inseto.....	<b>5</b>
<b>Figura 1.3</b> - Diferentes estádios de desenvolvimento de <i>R. prolixus</i> .....	<b>6</b>
<b>Figura 1.4</b> - Esquema das vias que levam à interferência por microRNAs e siRNAs.....	<b>11</b>
<b>Figura 3.1</b> - Esquema representativo da PCR utilizada para produção de dsRNA.....	<b>21</b>
<b>Figura 4.1</b> - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de diferentes ordens de insetos com RpCht1 .....	<b>26</b>
<b>Figura 4.2</b> - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de diferentes ordens de insetos com RpCht2 .....	<b>29</b>
<b>Figura 4.3</b> - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de diferentes ordens de insetos com RpCht3 .....	<b>32</b>
<b>Figura 4.4</b> - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de diferentes ordens de insetos com RpCht4 .....	<b>34</b>
<b>Figura 4.5</b> - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de diferentes ordens de insetos com RpCht5 .....	<b>35</b>
<b>Figura 4.6</b> - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de diferentes ordens de insetos com RpCht6 .....	<b>36</b>
<b>Figura 4.7</b> - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de diferentes ordens de insetos com RpCht7 .....	<b>37</b>
<b>Figura 4.8</b> - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de diferentes ordens de insetos com RpCht8 .....	<b>38</b>
<b>Figura 4.9</b> - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de diferentes ordens de insetos com RpCht9 .....	<b>39</b>
<b>Figura 4.10</b> - Diagrama esquemático da organização de exons e introns nos genes de <i>R. prolixus</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 4.11</b> - Diagrama esquemático da arquitetura dos domínios de quitinases de <i>R. prolixus</i> .....	<b>42</b>
<b>Figura 4.12</b> - Análise filogenética das quitinases de sete espécies de insetos baseado nas sequencias de aminoácidos das proteínas codificadas .....	<b>44</b>

<b>Figura 4.13</b> - Perfil de expressão de genes de quitinase ao longo do desenvolvimento em <i>R. prolixus</i> (RT-PCR).....	<b>45</b>
<b>Figura 4.14</b> - Expressão relativa dos genes de quitinase em diferentes estádios de desenvolvimento em <i>R. prolixus</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 4.15</b> - Perfil de expressão de genes de quitinase em diferentes tecidos em ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> (RT-PCR). .....	<b>47</b>
<b>Figura 4.16</b> - Expressão relativa dos genes de quitinase em diferentes tecidos em ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> ,. ....	<b>49</b>
<b>Figura 4.17</b> - Perfis de expressão dos genes de quitinase obtidos por densitometria de bandas através do programa ImageJ, após injeção de dsRNA em ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> . ...	<b>519</b>
<b>Figura 4.18</b> - Expressão relativa do gene RpCht7 e controles, após injeção de dsRNA em ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> . ....	<b>52</b>
<b>Figura 4.19</b> - Porcentagem de ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> mortas após injeção com dsGFP ou dsRpCht7. ....	<b>53</b>
<b>Figura 4.20</b> - Peso em gramas das ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> . ....	<b>54</b>
<b>Figura 4.21</b> – Porcentagem das ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> que realizaram a ecdise se tornando adultos. ....	<b>55</b>
<b>Figura 4.22</b> - Defeitos na muda de quinto estágio para a forma adulta de <i>R. prolixus</i> . ....	<b>56</b>
<b>Figura 4.23</b> - Porcentagem das ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> que apresentaram defeitos durante a ecdise para a fase adulta. ....	<b>57</b>
<b>Figura 4.24</b> - Razão sexual de adultos de <i>R. prolixus</i> . ....	<b>57</b>
<b>Figura 4.25</b> - Peso em gramas de insetos adultos de <i>R. prolixus</i> . ....	<b>58</b>
<b>Figura 4.26</b> - Número de ovos por fêmea de <i>R. prolixus</i> . ....	<b>59</b>
<b>Figura 4.27</b> - Média de ovos por fêmea de <i>R. prolixus</i> ao longo dos dias. ....	<b>60</b>
<b>Figura 4.28</b> - Porcentagem de eclosão dos ovos de <i>R. prolixus</i> . ....	<b>61</b>
<b>Figura 4.29</b> - Tempo médio de eclosão dos ovos de <i>R. prolixus</i> . ....	<b>61</b>
<b>Figura suplementar 7.1</b> - Expressão relativa do gene RpCht7 em diferentes estádios de desenvolvimento em <i>R. prolixus</i> . ....	<b>70</b>
<b>Figura suplementar 7.2</b> - Expressão relativa do gene RpCht7 em diferentes tecidos em ninfas de quinto estágio de <i>R. prolixus</i> . ....	<b>70</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Sequência de iniciadores olinucleotídicos utilizados para rt-PCR semi quantitativo de transcritos que codificam para a família GH18 em <i>R. prolixus</i> . .....	<b>17</b>
<b>Tabela 3.2</b> - Sequência de iniciadores olinucleotídicos utilizados para produção de dsRNA de transcritos que codificam para a família GH18 em <i>R. prolixus</i> . .....	<b>19</b>
<b>Tabela 3.3</b> - Sequência de iniciadores olinucleotídicos com a sequência T7 utilizados para produção de dsRNA de transcritos que codificam para a família GH18 em <i>R. prolixus</i> . .....	<b>20</b>
<b>Tabela 4.1</b> - Resumo das características dos genes que codificam as proteínas da família 18 das glicosil hidrolases em <i>R. prolixus</i> . .....	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIACOES

- Ago2 – Proteína Argonauta
- AM - intestino médio anterior (*Anterior Midgut*)
- Amplicon* – fragmento esperado
- CBD – Domínio de ligação de quitina (*Chitin Binding Domain*)
- CHT – Quitinase (*Chitinase*)
- CC – carcaça
- cDNA – DNA codificante
- dsRpCht – dupla fita de RNA para quitinase de *Rhodnius prolixus*
- dsGFP – dupla fita de RNA para GFP
- dsRNA – RNA dupla fita (*double stranded RNA*)
- FB - corpo gorduroso (*Fat Body*)
- GFP – *Green fluorescent protein*
- GPI – Glicosil fosfatidil inositol
- GH18 – glicosídeo hidrolases da família 18
- HG - intestino posterior (*Hindgut*)
- HL – hemolinfa
- IGR - *Insect Growth Regulators*
- IDGF – Fator de disco imaginal (*Imaginal Disk Growth Factor*)
- mRNA – RNA mensageiro
- miRNA – micro RNA
- mW - peso molecular (*molecular weight*)
- PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
- PM - intestino médio posterior (*Posterior Midgut*)
- R. prolixus* – *Rhodnius prolixus*
- RNAi – RNA de interferência (*RNA interference*)
- RISC – *RNA induced silencing complex*
- RpCht – Quitinase de *Rhodnius prolixus*
- siRNA – *small interfering RNA*
- shRNA – *small hairpin RNA*
- SG - glândulas salivares (*Salivary Glands*)
- T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Considerações Iniciais**

Os insetos (classe Insecta do filo Arthropoda) são o grupo de organismos mais diversificado já estudado pelo homem, correspondendo a cerca de um milhão de espécies (RUPERT & BARNES, 1994). Constituem o grupo com o maior número de espécies biológicas descritas, 75% das conhecidas. Provavelmente os insetos são a classe de seres vivos a ocupar o mais diversificado conjunto de nichos ecológicos da natureza, estando significativamente ausente apenas de ecossistemas aquáticos marinhos (RICHARDS & DAVIES, 1977).

A grande diversidade do grupo resulta na necessidade do estudo detalhado da fisiologia de cada uma de suas ordens, pois encontramos uma organização anatômica, fisiológica e bioquímica bastante diferenciada (TERRA & FERREIRA, 1994). Essa situação difere radicalmente, por exemplo, do conhecimento já obtido para mamíferos, aonde podem ser feitas muitas generalizações ao longo da classe (HILDEBRAND, 1995). Cada ordem de insetos, assim, apresenta-se como um modelo de bioquímica e fisiologia a ser estudado separadamente.

O estudo da fisiologia e bioquímica de insetos possui uma grande relevância econômica e social, pois 10% (aproximadamente 90.000) das espécies conhecidas do grupo são prejudiciais ao homem (PFADT, 1978). Algumas espécies são pragas agropecuárias que através da herbivoria ou transmissão de doenças causam enormes prejuízos ao país. Outras são vetores de doenças humanas, como a doença de Chagas, malária, febre amarela, dengue, filariose e leishmaniose, endêmicas no Brasil (PETERS, 1988).

### **1.2. Doença de Chagas**

A doença de Chagas é uma doença parasitária, sistêmica e crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, com fatores de risco fortemente associados a uma baixa condição socioeconômica. A doença humana foi primeiramente descrita por Carlos Chagas no município de Lassance em Minas Gerais (Chagas 1909). Chagas (1909) não só a descobriu, como também identificou seus processos patogênicos. Ele também identificou o agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*, os insetos vetores e alguns hospedeiros silvestres. Emanuel

Dias (1934) posteriormente completou a descrição da enfermidade com a fase do ciclo biológico deste protozoário no inseto vetor.

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada. É endêmica em 21 países das Américas, embora a migração de pessoas infectadas possa transportar a doença para países não endêmicos da América e do Mundo (PAHO, 2017).

Os parasitas *T. cruzi* podem ser transmitidos através de transfusão sanguínea, transmissão vertical (mãe para filho), transplante de órgãos, acidente laboratorial, transmissão oral (comida contaminada ex.: açaí e caldo de cana) e também pelas fezes infectadas de triatomíneos vetores, conhecidos como "barbeiros". As áreas de transmissão vetorial da doença de chagas na América Latina podem ser observadas no mapa da figura 1.2.1.



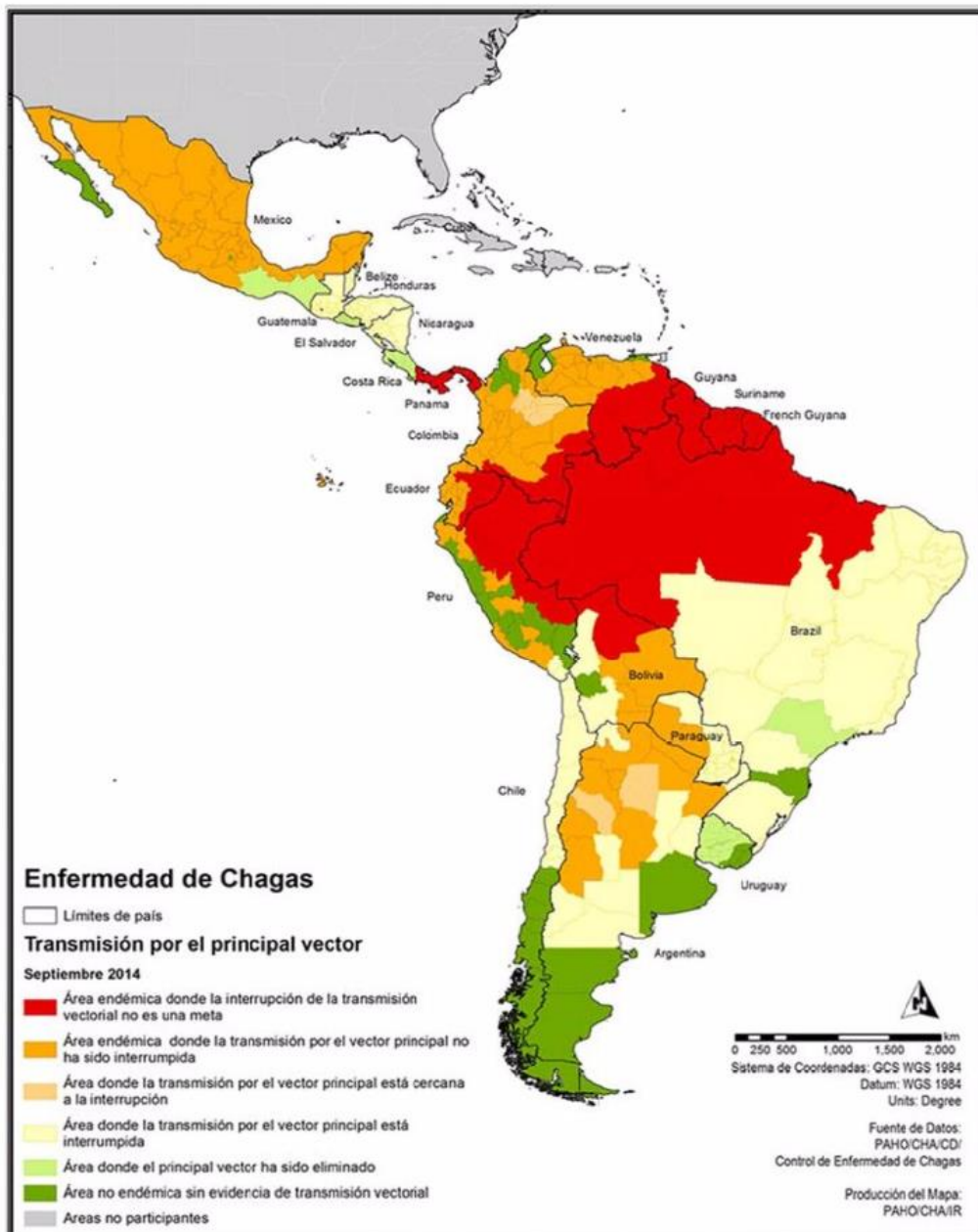


Figura 1.1 – Áreas de transmissão vetorial da doença de chagas na América Latina em 2014. Em vermelho: Áreas endêmicas onde interromper a transmissão vetorial não é uma meta. Laranja escuro: Áreas endemias onde a transmissão pelo vetor principal não foi interrompida. Laranja Claro: Áreas onde a transmissão pelo vetor principal esta perto de ser interrompida. Bege: Área onde a transmissão pelo vetor principal foi interrompida. Verde claro: Áreas onde o principal vetor foi considerado eliminado. Verde escuro: Áreas não endêmicas sem evidência de transmissão vetorial. Cinza: Áreas não participantes.

Fonte: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en)

Com uma incidência anual de 28.000 casos na região das Américas, a doença de Chagas afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas e causa, em média, cerca de 12.000 mortes por ano. Não existe vacina nem cura para doença de Chagas, apenas tratamento com drogas antiparasitárias. Embora a mortalidade tenha diminuído significativamente, a doença pode causar consequências irreversíveis e crônicas sobre o coração, sistema digestivo e sistema nervoso. Estima-se que 65 milhões de pessoas nas Américas vivem em áreas de exposição e estejam em risco de contrair esta doença (PAHO, 2017).

Atualmente o controle do vetor é o método de prevenção mais utilizado na América Latina. (WHO, 2017). Dados do Ministério da Saúde relativos à vigilância entomológica (passiva ou ativa) específica do período de 2007 a 2011 (DIAS J. C. P. ET AL, 2016) indicam o registro da captura de mais de 770 mil triatomíneos nos contextos locais de domicílios e peridomicílios no país.

### **1.2.1. *Trypanosoma cruzi***

O agente etiológico da Doença de Chagas é o parasita *T. cruzi*. Que se desenvolve de modo cíclico entre hospedeiros invertebrados (triatomíneos) e vertebrados (mamíferos). Durante seu ciclo de vida, esse protozoário adota diferentes tipos morfológicos que variam em forma física, metabolismo e componentes da membrana. Seu ciclo evolutivo é complexo, constituído por formas reprodutivas: chamadas de epimastigotas no vetor e amastigotas no mamífero, e formas infectivas: tripomastigotas metacíclicas no vetor e tripomastigotas sanguíneas no mamífero (GARCIA E AZAMBUJA 1991).

### **1.2.2. Interação *T. cruzi* x inseto**

O *T. cruzi* pode infectar várias espécies de triatomíneos hematófagos, a maioria dos quais são encontradas nas Américas. O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no triatomíneo se inicia quando o barbeiro se alimenta de um hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo sangue infectado com tripomastigotas. No intestino médio anterior do inseto, os tripomastigotas sanguíneos diferenciam-se em epimastigotas onde iniciam a sua multiplicação. Epimastigotas, no intestino médio posterior, sofrem intensa multiplicação por divisão binária. Quando as epimastigotas chegam ao intestino posterior, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são posteriormente eliminados nas fezes do inseto (GARCIA & AZAMBUJA, 1991). O ciclo de vida do *T. cruzi* no tubo digestivo do inseto pode ser observado na figura 1.2.

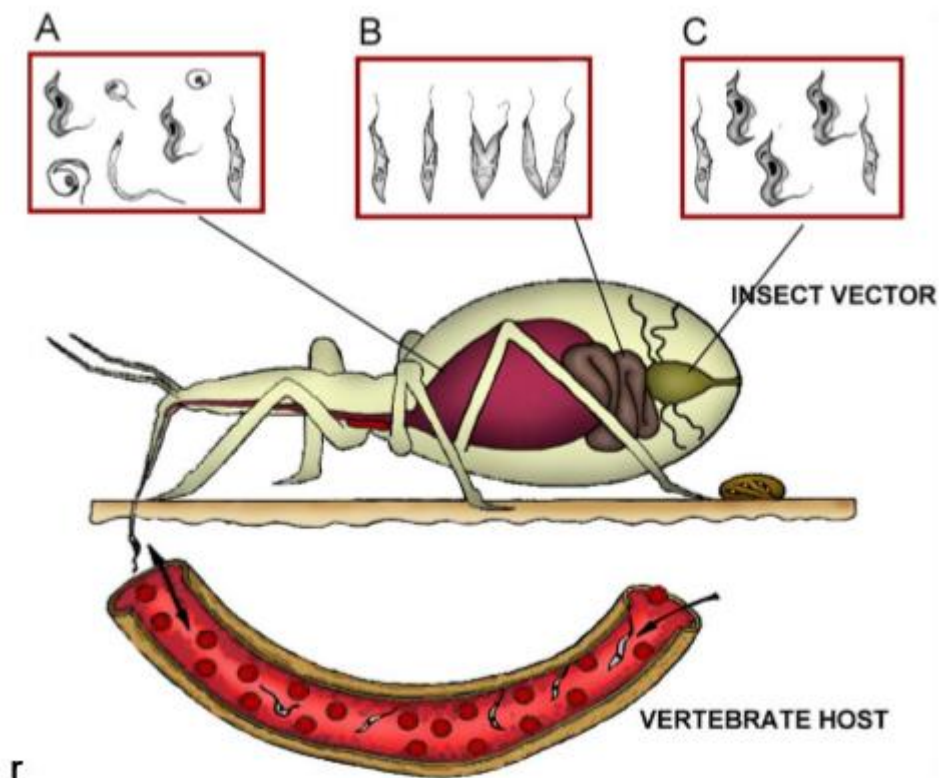


Figura 1.2. – O ciclo de vida do *T. cruzi* no inseto. A) Diferenciação de tripomastigotas sanguíneas em epimastigotas no intestino médio anterior (estômago). B) Epimastigotas se multiplicam por divisão binária no intestino médio posterior. C) Epimastigotas migram para o intestino posterior e lá se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas. Retirado de Garcia et al., 2007.

### 1.3. *Rhodnius prolixus*

*Rhodnius prolixus* é um hemíptero hematófago pertencente à família Triatominae, subfamília Reduviidae. Os membros desta família apresentam coloração castanho-amarelada, com manchas castanho-escuras em várias regiões do corpo e dos apêndices. As fêmeas medem 19.5 a 21.5 mm de comprimento, e por 6 ou 7 mm na parte mais larga do abdome. Os machos são 1 ou 2 mm menores que as fêmeas (FIOCRUZ, 2011).

Essa espécie é encontrada no México, na América Central e na Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Brasil e Bolívia. Na Venezuela, aonde chega a constituir 90% da população de triatomíneos capturados nas casas, sua distribuição vai do nível do mar a até 2000 metros de altitude (FIOCRUZ, 2011).

Esse inseto coloniza as casas (especialmente com telhados de palha), onde pode transmitir a tripanossomíase humana, sendo o principal vetor da doença de Chagas na Venezuela e nos demais países da região setentrional da América do Sul (FIOCRUZ, 2011).

O *Rhodnius prolixus* habita também o peridomicílio e os ecótopos naturais, representados por tocas e ninhos de tatus, pacas, ouriços e aves, tanto no solo como em palmeiras. Como os ovos desta espécie aderem aos substratos, é possível que aves possam contribuir para a disseminação da espécie a longa distância (FIOCRUZ, 2011).

Em laboratório, seu desenvolvimento está claramente vinculado à temperatura e umidade constantes em torno de 28° C e 75%. Fatores abióticos podem interferir no desenvolvimento dessa espécie de triatomíneo. Por exemplo, a exposição a temperaturas extremas como 15° ou 35°C bloqueia o desenvolvimento desse inseto (FIOCRUZ, 2011).

Trata-se de um inseto hemimetábolo (metamorfose incompleta), possuindo, sob o ponto de vista ontogênico, três fases de desenvolvimento: ovo, ninfa (com cinco estádios) e adulto (AZAMBUJA & GARCIA, 1981), como podemos observar na figura 1.3. Através de ecdises, o *R. prolixus* passa por cinco estádios ninfais, chegando ao estágio adulto após a 5ª muda. A muda em *R. prolixus* ocorre em intervalos regulares após a alimentação sanguínea, que tem caráter não contínuo. Dessa forma, um único repasto sanguíneo é capaz de desencadear a muda, agindo como regulador de processos metabólicos e hormonais (WIGGLESWORTH 1951). Com isso, há a liberação do exoesqueleto seguido pelo crescimento do inseto, cuja regulação se dá por dois hormônios, a ecdisona e o hormônio juvenil (RIDDIFORD 1996 E RIDDIFORD ET AL. 2000).

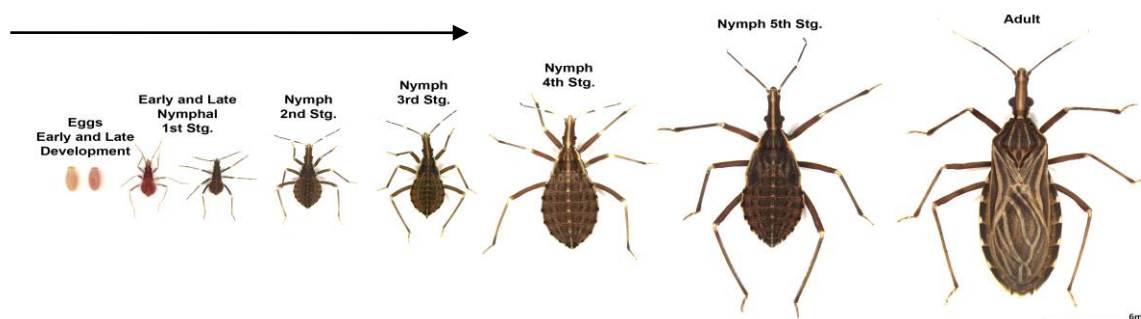


Figura 1.3. Diferentes estádios de desenvolvimento de *R. prolixus*.

Fonte: <http://science-explained.com/blog/project/egg-immunity-in-the-kissing-bug-the-carrier-of-chagas-disease>.

As formas jovens diferenciam-se dos adultos pela ausência de determinadas estruturas. Na cabeça, o rostro não atinge o proesterno, os ocelos são ausentes e os olhos compostos têm tamanho menor do que o da forma adulta. No tórax, o pronoto é desprovido de tubérculos e carenas, e o proesterno não apresenta sulco estridulatório.

A partir do terceiro estágio já é possível visualizar no meso e metatórax as manchas alares, que passam a denominar-se de teca alar no 4° e 5° estádios. As patas apresentam segmentação idêntica ao de um adulto com exceção dos tarsos que são dímeros (FIOCRUZ,

2011). A partir das ninfas de 5º estágio é possível diferenciar os sexos dos futuros adultos através do 8º e 9º segmentos ventrais, segundo Corrêa e Espínola e Gonçalves e colaboradores, que começam a se diferenciar em placas genitais apesar de não ter ainda a genitália formada (FIOCRUZ, 2011).

*Rhodnius prolixus* vem sendo usado como modelo de estudo fisiológico, além de estudos com abordagens epidemiológica e parasitológica. Isso se deve à sua tolerância a processos cirúrgicos e por seus processos reprodutivos e de desenvolvimento dependerem de apenas do sinal iniciado pela hematofagia. Além disso, é de fácil manutenção em laboratório e tem uma grande importância na transmissão da Doença de Chagas (WIGGLESWORTH 1933 E GARCIA 1975).

#### **1.4. Quitina**

A quitina é um polissacarídeo composto por uma cadeia linear de monômeros de N-acetil-β-D-glicosamina, ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo β-1,4. A quitina é um constituinte importante da parede celular de fungos, da cutícula do exoesqueleto de artrópodes que é trocado entre as mudas, e da matriz peritrófica, que é uma estrutura que está presente no intestino de muitos insetos. Na cutícula de insetos e na matriz peritrófica, as cadeias de quitina são organizadas em estruturas que conferem às matrizes quitinosas suas propriedades únicas de rigidez, elasticidade e impermeabilização. A quitina está presente não apenas na cutícula e na membrana peritrófica, mas também nas traquéias e no intestino anterior e posterior de insetos (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN 2010; MERZENDORFER E ZIMOCH 2003).

#### **1.5. Quitinases**

Quitinases (E.C 3.2.1.14) são enzimas que hidrolisam o polímero quitina. Constituem parte da família 18 das glicosídeo hidrolases (COUTINHO & HENRISSAT, 1999). As proteínas dessa família possuem uma estrutura modular (ARAKANE ET AL., 2003), podendo ser constituídas de um peptídeo sinal (aminoácidos 1 a 19 da sequência da quitinase de *Manduca sexta*), um domínio catalítico (resíduos 20 a 395), um domínio conector rico em serinas e treoninas (resíduos 396 a 496) e um domínio de ligação a quitina rico em cisteínas (resíduos 497 a 554). A presença de um peptídeo sinal indica que essas enzimas são secretadas para o espaço extracelular. Esse peptídeo, entretanto, não é conservado, sendo característico do táxon considerado.

O domínio catalítico das quitinases de insetos possui uma série de resíduos conservados. Entre eles encontram-se os resíduos de aspartato e tirosina envolvidos diretamente em catálise (VAN AALTEN *ET AL.*, 2001). O domínio conector rico em serinas e treoninas parece ser importante para o dobramento adequado dessas proteínas durante a secreção e para a estabilidade dessa enzima frente a proteases (ARAKANE *ET AL.*, 2003). O domínio C-terminal rico em cisteínas é importante para o reconhecimento e atividade sobre quitina. A retirada desse domínio na quitinase de *M. sexta* reduz drasticamente a atividade dessa enzima sobre o substrato natural, mas não afeta a atividade sobre oligossacarídeos ou substratos sintéticos como metil-umbelliferil- $\beta$ -D-quitotriosídeo (ARAKANE, 2003).

Em insetos, quitinases da família GH18 costumam fazer parte de uma família multigênica, com vários genes de quitinase presentes no genoma. O mapeamento de genes de quitinase, a análise filogenética das sequências de aminoácidos das proteínas dessa família e o estudo de seu papel funcional em diferentes insetos modelo como *Anopheles gambiae*, *Aedes Aegypti*, *Acyrtosiphon pisum*, *Drosophila melanogaster*, *Pediculus humanus* e *Tribolium castaneum* permitiram classificar essas proteínas em 8 grupos homólogos funcionais (ZHANG *ET AL.*, 2011; NAKABACHI *ET AL.*, 2010).

Quitinases pertencentes ao grupo I provavelmente são enzimas envolvidas na muda. Elas foram obtidas a partir de fluidos de muda e/ou do integumento e, além disso, todos os genes desse grupo de quitinases são altamente expressos na epiderme. Seus transcritos aparecem antes da ecdise e desaparecem após o término da mesma, sugerindo seu papel na degradação da cutícula e da MP (ZHU *ET AL.* 2008). Estruturalmente, quitinases do grupo I contém um peptídeo sinal, um domínio catalítico, uma região linker rica em serina e treonina e um CBD contendo 6 cisteínas (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN 2010).

As quitinases do grupo II são proteínas contendo alto peso molecular e possuem 4 ou 5 domínios catalíticos e 4 a 7 domínios de ligação à quitina (CBDs) (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN 2010). Segundo Zhu e colaboradores (2008), a duplicação e rearranjo dos domínios durante a evolução desse grupo foi responsável pela formação de uma proteína grande com atividade quitinolítica e ligação à quitina no ancestral comum das ordens Lepidoptera e Coleoptera. O possível papel dessas quitinases dentro da fisiologia dos insetos é a quebra de microfibrilas de quitina cristalina gerando cadeias simples e desagregadas, facilitando o acesso de outras quitinases (ZHU *ET AL.* 2008).

Quitinases do grupo III possuem dois domínios catalíticos e um CBD (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN 2010). Algumas quitinases pertencentes a esse grupo possuem predição

de peptídeo sinal na região N-terminal, entretanto algumas quitinases possuem predição de ancoragem à membrana, como por exemplo, a CHT7 de *T. castaneum* (ZHU ET AL. 2008).

O grupo IV das quitinases de insetos é o maior e mais divergente. Estruturalmente, essas quitinases possuem peptídeo sinal, um único domínio catalítico e a maioria, porém não todas, não possuem CBD (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN 2010), sendo comumente expressas no intestino ou corpo gorduroso dos insetos (ZHU ET AL. 2008). Como exemplo, pode-se citar TmChi, encontrada no intestino médio de larvas de *T. molitor*. TmChi possui peso molecular de 44 kDa, similaridade de 46% com CHT16 de *T. castaneum*, a qual está classificada como quitinase do grupo IV (GENTA ET AL. 2006), assim como o transcrito OnCht encontrado no intestino de larvas de *Ostrinia nubilalis* o qual através de análises filogenéticas foi classificado como pertencente ao grupo IV das quitinases (KHAJURIA ET AL. 2010).

O grupo V das quitinases é na verdade composto por proteínas similares a quitinases, chamadas de fatores de desenvolvimento de disco imaginal (IDGFs), as quais são caracterizadas pela ausência de atividade quitinolítica. A perda da atividade enzimática está vinculada à substituição do resíduo catalítico. Além disso, resíduos de ácido aspártico (D) da sequência conservada FDGXDLWEYP também são importantes para a atividade das quitinases e em IDGFs esse resíduo é substituído por alanina ou glicina (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN, 2010).

Quitinases do grupo VI são maiores que as do grupo I mas ambas são estruturalmente similares, possuindo peptídeo sinal, um domínio catalítico e um CBD. Em *A. gambiae*, CHT6 foi caracterizada como pertencente ao grupo VI e seu transcrito é expresso exclusivamente na carcaça de larvas desse díptero (ZHANG ET AL. 2011).

Quitinases do grupo VII são estruturalmente similares às do grupo IV entretanto, na análise filogenética o grupo VII forma um clado anexo que fica próximo ao grupo II (ZHANG ET AL. 2011; ARAKANE E MUTHUKRISHNAN 2010).

O último grupo de quitinases é o VIII, o qual possui um domínio catalítico e nenhum CBD. Além disso há um domínio transmembranar indicando que a mesma é ancorada à membrana (ARAKANE E MUTHUKRISHNAN 2010).

Diversas funções têm sido propostas para as quitinases de insetos. Grande parte delas está claramente envolvida no processo da muda, participando na digestão do exoesqueleto a ser substituído. Nesses casos, a quitinase é secretada para o espaço entre a cutícula velha e a cutícula nova. Outra função seria a de regular o processo de síntese e degradação da membrana peritrófica. Além disso, algumas quitinases de insetos estão relacionadas à digestão

de fungos (em insetos detritívoros) ou da cutícula de outros artrópodes (no caso de insetos predadores) (KRAMER E KOGA, 1986).

## 1.6. RNA de interferência

O RNA de interferência (RNAi) é um processo pós-transcricional desencadeado pela presença na célula de um RNA de cadeia dupla (dsRNA - *double stranded* RNA) que inibe a expressão gênica na fase da tradução e/ou dificulta a transcrição de genes específicos. O *knockdown* de um gene alvo ocorre em resposta a introdução de um dsRNA homólogo ao RNA mensageiro (mRNA) (PETERSEN ET AL., 2005).

A técnica de RNAi foi parcialmente elucidada em estudos com organismos como o nematóide *Caenorhabditis elegans* e a mosca *D. melanogaster* (ROIGNANT ET AL., 2003, BISCHOFF ET AL., 2006; MILLER ET AL., 2008). Os dsRNAs envolvidos no mecanismo de RNAi podem ser classificados em pelo menos três categorias: miRNAs (microRNAs), siRNAs (*small interfering* RNAs) e shRNAs (*small hairpin* RNAs) (MEISTER E TUSCHL, 2004).

Os siRNAs, miRNAs e shRNAs são produtos da clivagem de longas moléculas de dsRNA pela ação da nuclease Dicer. A Dicer é uma RNase III, sendo responsável pelo tamanho do dsRNA gerado e está envolvida na incorporação de uma das fitas do miRNA ao complexo ribonucleoprotéico denominado RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) do qual faz parte juntamente com a proteína Argonauta (Ago2) e outras proteínas. (RICARTE E KIMURA, 2006).

O complexo RISC permite o pareamento entre a fita do miRNA incorporada e a região homóloga do mRNA-alvo por complementaridade de bases. Quando a complementaridade é total, ocorre a degradação do mRNA e, quando parcial, ocorre a repressão da tradução e posterior degradação do mRNA (Figura 1.4). (RIVAS ET AL., 2005)

As proteínas argonautas presentes no complexo RISC se ligam aos siRNA e miRNA, e apresentam atividade de endonuclease contra a fita de mRNA complementar ao siRNA ou miRNA. As proteínas argonautas são também responsáveis pela seleção da fita do siRNA, que será incorporada ao RISC. (RAND ET AL., 2005) (HÖCK E MEISTER, 2008).

Em resumo, os siRNA e miRNA atuam por meio de pareamento a sequências complementares ao RNA mensageiro alvo, causando sua degradação e, portanto, silenciamento específico do gene. Esse processo pode ser desencadeado pela intrusão de cadeias longas de dsRNA que, ao serem clivados pela Dicer, geram fragmentos do siRNA. O



silenciamento do gene-alvo possibilita a obtenção de informações sobre a função exercida na célula pela proteína que esse gene codifica. (MORRIS ET AL, 2004).

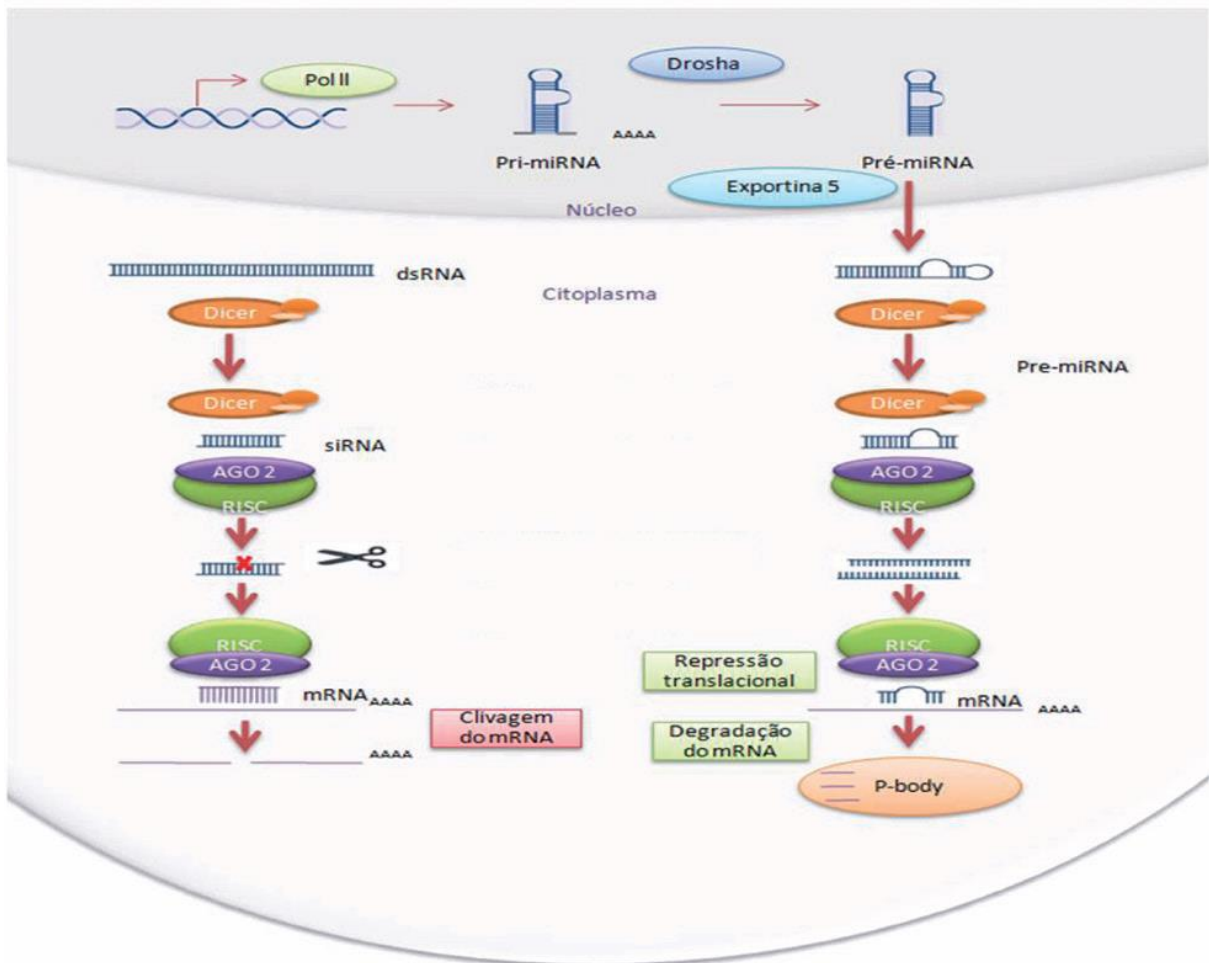


Figura 1.4. Esquema das vias que levam à interferência por microRNAs e siRNAs.

Fonte: Franca et al. 2010.

A técnica de RNAi emergiu como uma ferramenta atraente e útil para estudar a função do gene. A tecnologia já tem sido amplamente utilizada em estudos genéticos em várias áreas da biologia. Entre os insetos, tem sido aplicada a *Drosophila melanogaster* (BELLES, 2010), um dos principais organismos modelo para estudos genéticos, ao coleóptera *Tribolium sp.* (TOMOYASU ET AL., 2008) e *Tribolium castaneum* (TOMOYASU & DENELL, 2004, ARAKANE ET AL., 2008, KONOPOVA & JINDRA, 2008; MINAKUCHI ET AL., 2009), a lepidópteras (TERENIUS ET AL., 2011), triatomíneos (ARAUJO ET AL., 2006) dentre outros.

O sucesso da técnica de RNAi é devido à sua simplicidade, facilidade e velocidade com que pode ser aplicada *in vivo*, utilizando organismos completos, ou *in vitro*, por estudos em cultura de células ou tecidos (FJOSE ET AL., 2001).

### **1.7. Justificativa**

Nosso grupo descreveu anteriormente algumas propriedades cinéticas das quitinases de *R. prolixus* e sua purificação parcial. Pudemos demonstrar atividades de quitinase em diferentes tecidos de ninfas de quinto estágio (FARIA, 2013), assim como mapear e caracterizar os genes de quitinase no genoma desse inseto. Os dados obtidos permitiram uma classificação funcional preliminar para as quitinases de *R. prolixus*, mas estudos mais detalhados da expressão e de inibição por RNAi, propostos nesse projeto, são necessários para obter um entendimento mais completo do papel dessas enzimas. A obtenção de novos dados sobre o papel dessas enzimas pode resultar na descoberta de novos alvos de inibição e controle do vetor, assim como novos aspectos da fisiologia básica de insetos e de sua interação com microorganismos.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar a função de transcritos de quitinases da família GH18 no desenvolvimento e fisiologia de *Rhodnius prolixus*, utilizando ferramentas de bioinformática e genômica funcional.

### **2.1. Objetivos específicos**

- 2.1.1.** Análise e classificação das sequências de GH18 de *R. prolixus* utilizando ferramentas computacionais;
- 2.1.2.** Análise semi-quantitativa da expressão dos genes GH18 em *R. prolixus*;
- 2.1.3.** Silenciamento de transcritos GH18 por RNAi e análise fenotípica

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Bioinformática**

As sequências das quitinases de *R. prolixus* foram obtidas através da utilização do software FAT (SEABRA-JUNIOR *ET AL.*, 2011) ou através das ferramentas ClustalW e HMMER usando o código PFAM 00704 da família GH18 contra o genoma de *Rhodnius* depositado no Vector Base (<http://www.vectorbase.org>). As sequências foram obtidas em colaboração com o Dr. Rafael Dias Mesquita da Universidade Federal do Rio de Janeiro e curadas com o auxílio do Prof. Bruno Gomes de Liverpool School of Tropical Medicine.

Para o alinhamento de sequências de aminoácidos, as sequências de nucleotídeos de interesse foram traduzidas com a ferramenta Expsy Translate (<http://web.expasy.org/translate/>). As sequências obtidas foram utilizadas para pesquisa por similaridade usando o BLASTp do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e então alinhadas com as cinco sequências de maior similaridade utilizando a ferramenta ClustalW Multiple Alignment versão 1.4 encontrada no BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (HALL 1999). Outras informações a respeito das sequências como massa molecular, ponto isoelétrico, peptídeo sinal, N-glicosilações, O-glicosilações, âncora de GPI e domínio transmembrana foram obtidas através do Expsy (<https://www.expasy.org/proteomics>). A árvore filogenética foi construída com base nas sequências de aminoácidos dos domínios catalíticos GH18, utilizando o programa FIGTREE (RAMBAUT, 2009) após alinhamento com Clustal Omega (SIEVERS *ET AL.*, 2011) dos homólogos modelos (do qual se sabe o grupo de quitinase ao qual pertence). O pacote PHYLIP (FELSENSTEIN, 2008) PROTDIST e NEIGHBOR foram utilizados para cálculos de filogenia. A análise Bootstrap usou um conjunto de dados de 1000 repetições criado com SEQBOOT e analisados como acima, antes do cálculo de suporte usando CONSENSE. Todos os programas foram usados com parâmetros padrão. A árvore foi editada com o GIMP.

#### **3.2. Criação e manutenção de insetos**

Foram utilizados triatomíneos da espécie *Rhodnius prolixus*, provenientes da colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos - LABFISI (Instituto Oswaldo Cruz, RJ). Os triatomíneos foram mantidos à temperatura de 27-28°C e umidade entre 65-75%. A alimentação dos mesmos foi feita por meio de sangue de coelho desfibrinado em alimentador artificial (GARCIA E AZAMBUJA, 1997). Para a análise quantitativa da expressão de genes

GH18 ao longo do desenvolvimento, foram utilizados ovos, ninfas de primeiro a quinto estágio, adultos machos e fêmeas. Para os experimentos de análise tecidual da expressão e silenciamento, foram utilizadas ninfas de quinto estágio.

### **3.3. Análise qualitativa da expressão gênica**

#### **3.3.1. Coleta de Material para análise ao longo do desenvolvimento**

Os experimentos foram realizados com pools de 5 insetos para ovo e primeiro estágio, pools de 3 insetos para segundo, terceiro e quarto estágio e pools de 2 insetos para quinto estágio, adultos machos e fêmeas. As coletas foram realizadas com 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 21 e 23 dias após a alimentação. Ao final de cada dia o pool de insetos era acondicionado em microtubos de polipropileno, congelados em nitrogênio líquido e estocados no freezer -80°C. Ao final da coleta, insetos do mesmo estágio foram reunidos em um único pool para extração do RNA total.

#### **3.3.2. Dissecção das ninfas de quinto estágio de *R. prolixus***

Ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* foram anestesiadas no gelo e posteriormente dissecadas em solução salina 0,9 % (p/v) para retirada da glândula salivar, intestino médio anterior, intestino médio posterior, intestino posterior, hemolinfa, corpo gorduroso e carcaça. Os tecidos foram estocados em microtubos de polipropileno (pools de 3) contendo 200 µL de Trizol. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas no freezer -80°C até a extração do RNA total.

#### **3.3.3. Extração de RNA total a partir de *R. prolixus* com Trizol**

Para a extração do RNA total, as amostras de insetos inteiros foram reunidas no almofariz com 5 mL de Trizol e homogeneizadas com o pistilo na presença de nitrogênio líquido. As amostras de tecidos foram reunidas em um aparelho de Potter-Ehveljem e homogeneizadas em um volume total de 1,5 mL de Trizol.

O homogeneizado então permaneceu durante 5 minutos em temperatura ambiente e 200 uL de clorofórmio foram adicionados à amostra. A mesma foi submetida à agitação constante durante 15 segundos, permanecendo em temperatura ambiente durante 15 minutos. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. O

sobrenadante foi novamente transferido para microtubo de polipropileno limpo e 500 µL de isopropanol foram adicionados à amostra. A mesma foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de Etanol 75% (v/v). Em seguida a essa etapa, a amostra foi centrifugada a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C. Tal procedimento foi repetido mais uma vez e, após a centrifugação, o microtubo de polipropileno contendo o precipitado foi invertido na capela de fluxo laminar durante 3 minutos para retirar todo o álcool e secar a amostra. O precipitado foi então ressuspenso em 100 µL de água livre de nucleases.

O próximo passo foi o tratamento com DNase, utilizando o kit Turbo DNA-free™ (Ambion, AM1907). Uma alíquota de 10 µL de amostra de RNA total foi acondicionada em microtubo de polipropileno recebendo a adição de 1 µL de tampão DNase 10x e 0,5 µL da solução contendo enzima DNase. Em seguida, as reações foram incubadas durante 30 minutos a 37°C, interrompidas pela adição de 3 µL da solução inativadora de DNase e incubadas novamente por 2 min a temperatura ambiente. Seguiu-se a centrifugação a 21.000 g por 1 min, e 11 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de polipropileno.

Após a extração de ácido ribonucléico, a concentração de RNA total foi quantificada utilizando o equipamento Nanodrop® e as amostras foram estocadas a temperatura de -80°C.

### **3.3.4. Preparação de cDNA**

O RNA total obtido no item 3.3.3 foi submetido a transcrição reversa com o kit Superscript III First-Strand (Invitrogen, Cat. no. 18080-051) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras estocadas a -20°C (Sambrook e Russell, 2001).

### **3.3.5. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR, *Polimerase Chain Reaction*)**

As amostras de cDNA obtidas no item 3.3.4 foram utilizadas em reações de amplificação por uso de um termociclador (Veriti®, Applied Biosystems), utilizando os iniciadores oligonucleotídicos (*primers*) da tabela abaixo, que foram desenhados para anelamento em regiões de cada sequência que não fossem conservadas na família GH18. Isso foi feito no site da IDT (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) usando os parâmetros padrão, selecionando apenas o tamanho ótimo do *amplicon*.

Tabela 3.1. Sequência de iniciadores olinucleotídicos utilizados para RT-PCR semi quantitativo de transcritos que codificam para a família GH18 em *R. prolixus* e para o gene constitutivo utilizado, Actina. Forward: Iniciador senso. Reverse: Iniciador anti-senso. pb: pares de bases.

NOME	FORWARD	REVERSE	pb
<b>Actina</b>	CCAGGTATTGCTGACAGGATGCAA	ATGCCGGTCCAGATTTGTCGTAT	200
<b>RpCht1</b>	TCAGCCCAAGAATCGTGTG	CGCGGGTTGTAAACTGATC	300
<b>RpCht2</b>	AAGGACAAGTGAAGTATGATGGG	GAGGCATTATGATTTGGTCGATTG	400
<b>RpCht3</b>	TGCTAACGATATGTCTGCCATC	GCGCTAATTTCTTGTGTAGAGG	200
<b>RpCht4</b>	AAGAACAAGACTGAACGAGGAC	TGTAAAGCTGTGTCCGAACG	300
<b>RpCht5</b>	AAACGTTCAACCGCAGCGTAATGA	ATGGTGTGGGTTTGGTACCTCGTT	700
<b>RpCht6</b>	AGCGACCGCATGACCAATATGCTT	TTGGCGTTGTAGTCACAGTTGGCA	600
<b>RpCht7</b>	AACGCAGGGAGGCCTTTAAGGATGTT	TAAAGAGGCGCGTTTGGTCCAGTT	600
<b>RpCht8</b>	ACACAAAGACCAGTTTGTGGCGCT	TGCCAAGATTCAGTTTCTGGCCGT	500
<b>RpCht9</b>	AGCTGAAAGCGGCTTCATGGCATA	TGCGTGTGTTGCGAACATCCTTCT	500

Cada reação continha: 1 µL de cDNA 50 ng, 4 µL de tampão 10X Taq, 3,2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0,4 µL de dNTP 10mM, 1 µL de cada primer a 10mM, 0,1 µL de GoTaq DNA polymerase (Promega, USA) e água para um volume final de 20 µL.

As amplificações foram realizadas a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C para os primers RpCht1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9, e a 60°C para o RpCht7 por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 min com uma extensão final a 72°C por 5 min. Os amplicons foram armazenados a -20°C até a análise por eletroforese em gel de agarose 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídio (Sigma, Cat. no. 1239-45-8). A imagem do gel foi analisada no programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) onde a intensidade de cada banda, assim como do background e da banda do gene constitutivo foram quantificadas. O produto da amplificação foi recortado do gel e purificado com o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), seguindo as recomendações do fabricante, e enviadas para a plataforma de sequenciamento de DNA do IOC/FIOCRUZ.

### **3.4. Síntese de dsRNA**

#### **3.4.1. Extração de RNA total a partir de *R. prolixus* com RNazol**

Para a extração do RNA total, as amostras foram reunidas no almofariz com 500 µL de RNazol (MRC, Cat. no. RN 190) e homogeneizadas com o pistilo na presença de nitrogênio líquido.

O homogeneizado então foi transferido para microtubo de polipropileno limpo e 400 µL de água livre de nucleases foram adicionados. A mistura foi incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente sendo posteriormente centrifugada a 12.000 g durante 15 minutos.

Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi transferido para microtubo de polipropileno limpo e 5 µL de 4-bromoanisol foram adicionados à amostra, que permaneceu em temperatura ambiente durante 3 minutos. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada a 12.000 g durante 10 minutos.

O sobrenadante foi novamente transferido para microtubo de polipropileno limpo e 500 µL de isopropanol foram adicionados à amostra. A mesma foi incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 12.000 g durante 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 400 µL de Etanol 75% (v/v). Em seguida a essa etapa, a amostra foi centrifugada a 4.000 g durante 3 minutos. Tal procedimento foi repetido mais uma vez.

Após a centrifugação, o microtubo de polipropileno contendo o precipitado foi invertido na capela de fluxo laminar durante 15 minutos para retirar todo o álcool e secar a amostra. O precipitado foi então ressuspendido em 40 µL de água livre de nucleases. Após a extração, a concentração de ácidos nucleicos foi medida com o equipamento Nanodrop®

#### **3.4.2. Preparação de cDNA**

O RNA total obtido no item 3.3.1 foi submetido a transcrição reversa com o kit Superscript III First-Strand (Invitrogen, Cat.no. 18080-051) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram estocadas a -20°C (Sambrook e Russell, 2001).



### 3.4.3. PCR

As amostras de cDNA obtidas no item 3.4.2 foram submetidas à amplificação por uso de um termociclador (Veriti®, Applied Biosystems), utilizando os iniciadores da tabela 3.2 com os iniciadores específicos conjugados com 23 bases do promotor da T7 RNA polimerase na tabela 3.3, de maneira a obter 2 reações de PCR independentes, com um único promotor T7 de acordo com o esquema representado na figura 3.1. Os *primers* foram desenhados para regiões da sequência que não fossem conservadas na família GH18. Isso foi feito no site da IDT (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) usando os parâmetros padrão, selecionando apenas o tamanho ótimo do *amplicon* em 200 pares de bases.

Tabela 3.2. Sequência de iniciadores olinucleotídicos utilizados para produção de dsRNA de transcritos que codificam para a família GH18 em *R. prolixus*. Forward: Iniciador senso. Reverse: Iniciador anti-senso. pb: pares de bases.

NOME	FORWARD	REVERSE	pb
RpCht1	GAAGGAAAGTAGTTTTGGGAATGCC	CTTCATCTTTAACTACTGTCCATCCT	195
RpCht2	CAAACAACTTGTGTTGGGCATACC	TGTTCTTTGGATGTACTACAGTCCAG	195
RpCht3	GTGATAAATTAATCTTGATTCCAAC	TTTCATTTACATGTACTACAGTCCAGT	201
RpCht4	ATACCAACGTTCCGACACAGCTTTA	CGTCATCCCACATTTCTTTCCAACC	181
RpCht5	GTGCCCATGTATGGACGTACCTTC	CTAATATGGAAATCTATACAAATGGTGT	198
RpCht6	CTGACAAGCTGGTTGTTGGAGTTC	CATCATCCCCTTTTGTACCCATTG	213
RpCht7	GGACTAAAATCAATGTTGGCATCCC	CTTCATCAAATACATGGGTAGTACTTG	186
RpCht8	GCCAGAACTGAATCTTGCCATTGC	TACCAGCTGGTGCGCTAGGGTTG	201
RpCht9	AAGAGAACTTATGATTGGTATGCCAA	CATTATCCCAAACCAAAGTAGTGTTAT	195

Tabela 3.3. Sequência de iniciadores olinucleotídicos com a sequência T7 utilizados para produção de dsRNA de transcritos que codificam para a família GH18 em *R. prolixus*. F: (Forward) Iniciador senso. R: (Reverse) Iniciador anti-senso.

NOME		SEQUÊNCIA
dsRpCht1	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGGAAAGTAGTTTTGGGAATGCC
dsRpCht1	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTCATCTTTAACTACTGTCCATCCT
dsRpCht2	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAACAACTTGTGTTGGGCATACC
dsRpCht2	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGTTCTTTGGATGTACTACAGTCCAG
dsRpCht3	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGATAAATTAATCTTGGTATTCCAAC
dsRpCht3	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTTCAATTTACATGTACTACAGTCCAGT
dsRpCht4	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATAACCAACGTTCCGACACAGCTTTA
dsRpCht4	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGTCATCCCACATTTCTTTCCAACC
dsRpCht5	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGCCCATGTATGGACGTACCTTC
dsRpCht5	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTAATATGGAAATCTATACAAATGGTGT
dsRpCht6	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGACAAGCTGGTTGTTGGAGTTC
dsRpCht6	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACATCATCCCACATTTTGTACCCATTG
dsRpCht7	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGACTAAAATCAATGTTGGCATCCC
dsRpCht7	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTCATCAAATACATGGGTAGTACTTG
dsRpCht8	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCAGAACTGAATCTTGGCATTGC
dsRpCht8	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTGGTGCGCTAGGGTTG
dsRpCht9	F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGAGAAACTTATGATTGGTATGCCAA
dsRpCht9	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACATTATCCCAAACCAAAGTAGTGTTAT

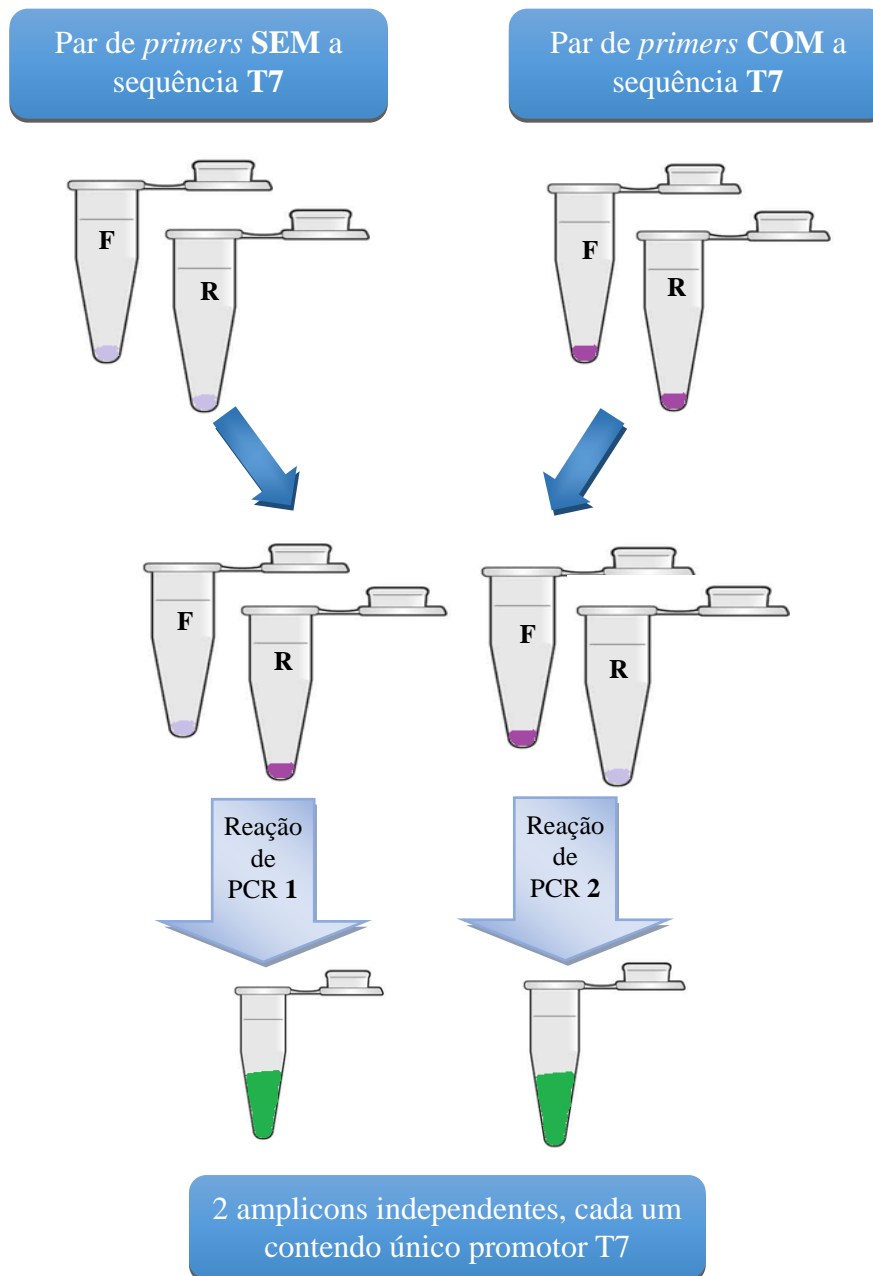


Figura 3.1. Esquema representativo da PCR utilizada para produção de dsRNA. 4 *primers*, sendo 2 deles com a sequência T7 e dois deles sem sequência T7 geram 2 produtos de PCR independentes, cada um contendo um único promotor T7.

Cada reação continha: 1  $\mu\text{L}$  de cDNA 50 ng, 4  $\mu\text{L}$  de tampão 10X Taq, 3,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25mM, 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTP 10mM, 1  $\mu\text{L}$  de cada primer a 10 mM, 0,1  $\mu\text{L}$  de GoTaq DNA polimerase (Promega, USA) e água para um volume final de 20  $\mu\text{L}$ .

As ampliações foram realizadas com uma incubação a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 60°C para os *primers* RpCht1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9, por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 min com uma extensão

final a 72°C por 5 min. Não foi possível amplificar o gene RpCht5 devido a um problema com o par de *primers* que continham a sequência T7. Os amplicons foram armazenados a -20°C.

#### **3.4.4. Purificação do produto de PCR**

Ao produto de PCR obtido no item 3.4.3 adicionamos 200µL de tampão NTI. A mistura foi então colocada na coluna do kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) com tubo coletor de 2 mL abaixo, e submetida a centrifugação a 11.000 g durante 30 segundos. A solução do tubo coletor foi descartada e a coluna recolocada no tubo. Para lavagem da coluna adicionamos 700µL de tampão NT3 e centrifugamos a 11.000 g durante 30 segundos. O procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez. Ao término da segunda centrifugação a solução do tubo coletor foi novamente descartada e a coluna recolocada no tubo para mais uma centrifugação a 11.000 g por 1 minuto para retirada dos resíduos do tampão NT3 da coluna. Para eluição do DNA, a coluna foi transferida para um microtubo de polipropileno limpo e 10 µL de água livre de nucleases foram adicionados à coluna. A mesma foi incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 11.000 g durante 1 minuto. O procedimento de eluição do DNA foi realizado duas vezes separadamente. As amostras foram armazenadas a -20°C.

#### **3.4.5. Preparação do dsRNA**

Os produtos de PCR purificados no item 3.4.4 foram utilizados como moldes para a síntese de dsRNA utilizando o sistema T7 RNAi RiboMAX express (Promega, EUA). A 1 µg de DNA adicionamos 10 µL do tampão 2x RiboMAX T7 e 2 µL da enzima T7 express completando com água livre de nucleases para um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada a 37°C durante 60 minutos. O procedimento foi realizado com os dois produtos de PCR separadamente. Após essa etapa as duas reações foram misturadas e incubadas a 70°C por 10 minutos seguido de uma incubação a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente às incubações foram adicionados 2 µL de solução (1 µL RNase do kit + 199 µL de água livre de nucleasse) juntamente com 2 µL de DNase do kit. A mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos seguido de adição de 4,4 µL de tampão 3M acetato de sódio, pH 5.2 e 44 µL de isopropanol para nova incubação em gelo durante 5 minutos e centrifugação a velocidade máxima por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de Etanol 70% (v/v) gelado. O microtubo de polipropileno contendo o precipitado foi invertido na capela de fluxo laminar durante 15 minutos para retirar todo o

álcool e secagem da amostra. O precipitado foi então ressuspensionado em 80 µL de água livre de nucleases. A concentração de dsRNA foi medida com o equipamento Nanodrop®.

### **3.5. Injeção de dsRNA**

A injeção foi realizada através de um microinjetor (Nanoinjector, Drummond, EUA) na hemolinfa torácica (PAIM *ET AL.*, 2013) com um capilar de aproximadamente 0,05mm evitando grandes danos à cutícula do inseto, diminuindo assim a mortalidade. Foram injetados os dsRNAs obtidos no item 3.4 e os controles de dsRNA exógeno (dsGFP, Green Fluorescent Protein). Injetamos a priori diferentes quantidades de dsRNA (1µg, 3µg, 6µg e 2 x 3µ), e com base nos resultados decidimos utilizar a quantidade de 1µg nos demais experimentos. A injeção foi feita em ninfas de quinto estágio uma semana após a ecdise.

### **3.6. Análise de fenótipos**

Para observação dos fenótipos, sincronizamos os insetos separando um grupo de 200 ninfas de 4º estágio de *R. prolixus* bem alimentadas e acompanhando a ecdise, utilizando para as injeções de dsRNA apenas ninfas de quinto estágio que mudaram dentro de 7 dias. Após a inoculação com dsRNA de *R. prolixus* ou dsGFP, foram acompanhados diferentes parâmetros de desenvolvimento dos insetos, como mortalidade, ecdise, defeitos na ecdise, razão sexual, oviposição, eclosão dos ovos, alimentação sanguínea, diurese e digestão.

#### **3.6.1. Mortalidade**

Para observação da mortalidade três grupos com vinte ninfas de quinto estágio foram utilizadas, totalizando 60 insetos por grupo e 120 insetos por experimento. Estes insetos foram acompanhados a cada dois dias, por aproximadamente 15 dias, até o repasto sanguíneo das ninfas de quinto estágio.

#### **3.6.2. Ingestão sanguínea e diurese**

Os grupos de insetos do item 3.6.1 foram pesados individualmente ainda em jejum e alimentados com sangue desfibrinado de coelho em alimentador artificial (GARCIA E AZAMBUJA, 1997), mantendo-se os grupos originais. Imediatamente após o repasto

sanguíneo os triatomíneos foram novamente pesados individualmente. O procedimento de pesagem individual se repetiu com 24 horas, 48 horas e 7 dias após alimentação sanguínea.

### **3.6.3. Ecdise**

Ao final da ecdise das ninfas do item 3.6.2, de quinto estágio para adulto, contabilizamos quantos insetos não conseguiram fazer a ecdise e por isso permaneceram no quinto estágio, quantos ficaram presos na exúvia, quantos morreram durante a ecdise e o total de adultos machos e fêmeas de cada grupo.

### **3.6.4. Ingestão dos adultos**

Os adultos de *R. prolixus* obtidos no item 3.6.3 foram pesados individualmente em jejum de duas semanas após o início da muda e alimentados com sangue desfibrinado de coelho em alimentador artificial (GARCIA E AZAMBUJA, 1997). Imediatamente após o repasto sanguíneo os triatomíneos foram novamente pesados individualmente.

### **3.6.5. Ovoposição e eclosão**

Após a alimentação dos adultos no item 3.6.4, os insetos foram separados em grupos menores com uma fêmea e dois machos, ambos injetados com o mesmo dsRNA. Estes insetos foram acompanhados a cada três dias, até sua completa mortalidade, durante esse período foi anotado a quantidade de ovos colocada, a eclosão dos ovos e a mortalidade dos adultos.

## **3.7. Análises estatísticas**

Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 5 para Windows. Foram observadas distribuições de normalidade Gaussiana pelo teste D'Agostino & Pearson. Os dados que apresentaram uma distribuição normal foram submetidos a testes paramétricos t de Student - não pareado, e os dados com distribuição não normal pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todos os resultados com p value < 0,05 foram classificados como estatisticamente significativos. Os valores de probabilidade são especificados nos gráficos quando forem significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Mapeamento das sequências dos genes codificantes de proteínas da família 18 das glicosídeo hidrolases em *R. prolixus*.

Durante o processo de anotação do genoma de *R. prolixus*, encontramos nesse inseto nove genes que codificam proteínas da família 18 das glicosídeo hidrolases (GH18). Essas sequencias foram nomeadas de RpCht1 a RpCht9. O alinhamento de sequências consiste no processo de comparar sequências de forma a se observar seu nível de similaridade, tendo isso em mente, realizamos um BLASTp das sequências de aminoácidos da família 18 das glicosídeo hidrolases de *R. prolixus* com a de diferentes ordens de insetos. Nas figuras 4.1 a 4.9 podemos observar nesses alinhamentos uma série de resíduos conservados, sobretudo os resíduos catalíticos, incluídos na sequência consenso FDGXDLWEYP, que é uma característica das proteínas do tipo quitinase. Além disso, algumas sequências proteicas possuem predição para peptídeo sinal, que tem por função marcar as proteínas que serão exportadas para o meio extracelular.

As sequências codificantes de quitinases de *R. prolixus* apresentaram altos valores de identidade quando comparadas a outras sequências da família GH18. A identidade entre *R. prolixus* e homólogos variou bastante quando consideramos diferentes subgrupos de quitinases. Por exemplo, RpCht1 apresenta entre 48 a 52 % de identidade com os genes MaCht1, TcCht6, TcCht10, TmCht1 e MaCht2, enquanto RpCht2 apresentou valores de 19 a 36 % (AcypiCht1, DpCht1, TcCht1, DgCht1 e DaCht1). A identidade de RpCht3 com outras sequências GH18 variou entre 27 a 30 % (BmCht3, BmCht1, DpCht1, CcCht1 e AgCht1), e em RpCht4 esse valor oscilou entre 32 a 35 % (TcCht3, PhCht1, DpCht3, DpCht4 e MrCht2). Para RpCht5 observamos valores de 35 a 39 % (BmCht2, TcCht3, PhCht1, DpCht3 e DpCht4), em RpCht6 55 a 65 % (PcCht1, TcCht2, TcCht5, NvCht1 e DpCht2), em RpCht7 26 a 35 % (AmCht1, AdCht1, BiCht1, CbCht1 e BtCht1), em RpCht8 38 a 59 % (OnCht1, MbCht1, MrCht1, AmCht2 e AmCht3) e em RpCht9 68 a 69 % (PcCht1, TcCht2, TcCht5, NvCht1 e DpCht2).









```

RpCht2      1  ----MRFHOTLLFLALLCPSKERKVFLLSQLLKRDASQAEQKRVVCYYTNWSVYRPGTAKFNPNQINPYLCTHLVYAFGGLDRENGLRPYDKYQDIEQG  95
AcypiCht1  1  ----MQFLPWLILFGSIIISD-----AEHDIQKRES--SNQKVVVCYYTNWSVYRPGTAKFNPNQINPYLCTHLVYAFGGLDKENGRLRPYDKYQDIEQG  88
DpCht1     1  -----MLTKLISDSKEMRIVCYYYTNWSVYRPGCAKFNPNQINPYLCTHLVYAFGGFTKENTLKPFDKYQDIEQG  69
TcCht1     1  -----MNVSQKDSKEIRVVCYYTNWSVYRPGTAKFNPNQINPYLCTHLVYAFGGFTKENTLKPFDKYQDIEQG  68
DgCht1     1  MFWFPKKNFHFENLILRPGAAWQTLFLLCALAYCINVASSEGRVVCYYTNWSVYRPGTAKFNPNQINPYLCTHLVYAFGGFTKDNQMKPFDKYQDIEQG  100
DaCht1     1  -----MLFLLCALAYCINEASSSEGRVVCYYTNWSVYRPGTAKFNPNQINPYLCTHLVYAFGGFTKDNQMKPFDKYQDIEQG  76
Clustal
          :.:.:*****:***:*****:*****:*.:.:*****:*.

RpCht2      95  RYAKFTGLKTYNKALKTMLAIGGWNEGSSARFSPILVADEDRREFVKNVVKFLRQNFDFGLDLDWEYPAFRDGGKTHDKENYAQLVQVYHRCGGAVITML  195
AcypiCht   189  -GYAKFNGLKTYNKLNKTLAIGGWNEGSSARFSPILVDEDRREFVKNVVKFLRQNFDFGLDLDWEYPAFRDGGKSPDKENYASLVK-----  171
DpCht1     70  -GYAKFTGLKTYNKDLKTLAIGGWNEGSSARFSPILVDEDRREFVKNVVKFLRQNFDFGLDLDWEYPAFRDGGKPRDRDNYAQLVK-----  155
TcCht1     69  -GYAKFTGLKTYNKLNKTLAIGGWNEGSSARFSPIMANPERRELKLNKFLRQNFDFGLDLDWEYPAFRDGGKSRDKDNYAQLVQ-----  154
DgCht1     101  -GYAKFTGLKTYNKLNKTLAIGGWNEGSSARFSPILVASSDRRHFKLNILKFLRQNFDFGLDLDWEYPAFRDGGKSRDRDNYAQLVQ-----  186
DaCht1     77  -GYAKFTGLKTYNKLNKTLAIGGWNEGSSARFSPILVASSDRRHFKLNILKFLRQNFDFGLDLDWEYPAFRDGGKSRDRDNYAQLVQ-----  162
Clustal
          *****:***:*****:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.

RpCht2      196  IYLLFRRLRLREFFERESSKTGRVRLLLTMAVPAGIEYIDKGYDIPKLNKYLDFMNLISYDYHSAFEPNVNHHSPLYSLEEDSEYNYDLSQTLTDTATVKHYL  295
AcypiCht   172  -ELREEFNRSESSKTGRSRLLLTMAVPAGIEYIDKGYDIPKLNKYLDFMNLISYDYHSSFPAPVNHHSPLYPLEEDSEYNYDFAKLNIDHTIKHYL  264
DpCht1     156  -ELREEFNRSESSKTGRPRLLLTMAVPAGIEYINKGYDVPKLTLYLDMWNILSYDYHSAFEPVNHHSPLYSLEEDSEYNYDGELNIDYTIKHYL  248
TcCht1     155  -ELREEFNRSESSKTGRPRLLLTMAVPAGIEYINKGYDVPKLTLYLDMWNILSYDYHSAFEPVNHHSPLYPLEEDSEYNYDTELNIDYTIQHYL  247
DgCht1     187  -ELRAEFEREAETGRRLLLTMAVPAGIEYIDKGYDVPKLNKYLDFMNLISYDYHSSHEPSPVNHHPPLYSLEEDSEYNYDAELNIDYSIKHYL  279
DaCht1     163  -ELRAEFEREAETGRRLLLTMAVPAGIEYIDKGYDVPKLNKYLDFMNLISYDYHSSHEPSPVNHHPPLYSLEEDSEYNYDAELNIDYSIKHYL  255
Clustal
          ***:***:*****:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.

RpCht2      296  MKGADANKLVGLIPTYGRSYTLNNEASTDLGAPADGPGDQGGATREKGYLAYEITCSKVK--DGNITVHVEKNTAMGPIYAYKGNQVWGYDDENIKKLSRRY  393
AcypiCht   265  ASGADKEKLVGLIPTYGRSYTLNNEASKDIDGAPSDGPGGKGGATREKGYLAYEITCNLKKDDSWTIEQPKKAMGPIYAYKDNQVWGYDDDEFVVKLAKY  364
DpCht1     249  KMGADPNKLVGLIPTYGRSYTLNNEAPEAYEIGSPADGPGDMGBATRENGYLAYEITCENVKNQ--DNEVEEFPKAMGPIYAYKDNQVWGYDDENIVRKAAY  347
TcCht1     248  KKGADPSKLVGLIPTYGRSYTLNNEPDANEIGAPADGPGDMGBATRENGYLAYEIVCEYIKTQ--NNEVVOENPDAMGPIYAYKDNQVWGYDDDKIARKAEY  346
DgCht1     280  KAGADRDKLVGLIPTYGRSYTLNNEESTELGAPSEGPGEGGATREKGYLAYEITCQTLKDDPEWTVVQENANIMGPIYAYRNRQVWGYDDAELVRRKAEY  379
DaCht1     256  KAGADRDKLVGLIPTYGRSYTLNNEESTELGAPSEGPGEGGATREKGYLAYEITCQTLKDDPEWTVVQENANVMGPIYAYRNRQVWGYDDAELVRRKAEY  355
Clustal
          ***:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.

RpCht2      394  VNEKHLGGIMFVNSIDNDDFRGNCHQRAYPLLEAAKEAMLGKAATKQVPSAVRSSK-----TSSSKSKLKNQRSS  463
AcypiCht   365  VNENDLGGIMFVNSIDNDDFRGNSCHSRPYPLLEAGKEALLG--DSKVAPSQGKETK-----TTLKSRPKPRPVAR  432
DpCht1     348  VAENSLGGIMFVNSIDNDDFRGNCHGKPYPLLEAGKEALINAYGLTENDLISPPAKPTKLPKQRPRTSRTTTTTERSEE--IVEETTTRRRRIKPKIRNDNQ  446
TcCht1     347  VAEKGLGGIMFVNSIDNDDFRGNCHGKPYPLLEAAKEALISAYGLTENDLVSPPKPKIKTKTRNRQSSSKSTDENSEKKSSTSVSRRRNRIRKTKSEEL  446
DgCht1     380  VVAHGLGGIMFVNSIDNDDFRGTCGKPYPLLEAAKEAMLDAYGLG--INEVAKPSAPQKP--SRSRSDNEGNSNRNRVSSKPE--ASPRRPSAGRRPSSS  475
DaCht1     356  VVAQGLGGIMFVNSIDNDDFRGTCNGKPYPLLEAAKEAMVEALGLG--INEVAKPSGPKQP--SRSRSDN--GSTRNRNLNGKPEPNTSTSVRPANGARRPAVS  451
Clustal
          *:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.

RpCht2      464  TTTTSPPVSS-----TVTTEPPPTTPBEGSFVCKDEGEFPHPRDCKKYFWCLDSGPSNLGIVAHQFTCPSPGTLVDVSDSCDFA  543
AcypiCht   433  TTTTSAQKSD-----VSTTPEPPPTTPDGTFTCKDEGEFPHPRECKKYFWCLDSGPSNLGIVAHQFTCPSPGLVFNKISDSCDYT  515
DpCht1     447  LATPAKRRNESGRKAAETSYSSLKIVTPAYTTEPPPTTPDGGAKCEDEGEFPHPKDCKKYFWCLG--GPGDTGIVAHQFTCPAGLHFNKAAADSCDYS  545
TcCht1     447  SNSQSKSHRKES--RRTEGVPVSSLELVTPSYTTPAPPSTPDGSGEKCEDEGEYFPHPKDCKKYFWCLG--GPGELGIVAHQFTCPAGLYFNKAAADSCDY  544
DgCht1     476  STTTAG--PSTTIRLTEVEG--QSLYIGGRGSTTPEPPPTTPDGGSEFKCEDEGEFPHPRDCKKYFWCLDSGPSNLGIVAHQFTCPSPGLVFNPAADSCDFA  571
DaCht1     452  RTTQSPPPSTTFKLTDAEG--SSLYIGGRASTTPEPPPTTPDGGSEFKCEDEGEFPHPRDCKKYFWCLDSGPSNLGIVAHQFTCPSPGLVFNPAADSCDFA  548
Clustal
          :.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.

RpCht2      544  RNVIKCKKSTTTTSTSTTTTPRTTTRATT-----TLRSSLRVASTTTPFPPLQDYED-----DSEEDPQIVIKEL  609
AcypiCht   516  RNVVCKDKKTSDTTTTTTTTTTPKPKS-----GIKTTTTTTTTSTTQTPVEDDSEDEF-----EEEDPKIKEL  583
DpCht1     546  QNVFCKKSKPSTTTTKAGASTSTEASSAKPTVNSVSTTRAPSKITATSKTINFRTTTTTEAYDEEYEDDEE--EPNKR--EESSEDPQIVIKEL  641
TcCht1     545  RNVLCKKLSKATTTTTT--TTTEASTLKT-----STARVPPKITAATSRITV--FRSTTTTEAYDD--EYEDDV--EENK-----NSEEDPKVIKEL  628
DgCht1     572  RNVPKTKKSTTTPVSSSTTTTTTARPTSSYNRVTAAPVARVYPRFTSTSTTTTTTARTTTPAEEVLEEYEDGDND--SPNLGKLGSDAEDDPQIVIKEL  670
DaCht1     549  RNVPKTKKSTTVAPLTSTTTTTTTTARS--NRVTAAPTARVYPRFTSSTSTTTTTT--TTEPVEVLEEYEDTDEQSPNK--SHDGEDDPQIVIKEL  640
Clustal
          ***:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.

RpCht2      610  IHLIRKKGGVDELEKOLEGTTG-----SDVTFP--SISKSLFERILHR-----NGPSGPQNEGLTRETVRAP----YRRDKPQYVITIRRE  683
AcypiCht   584  ITLIRKKGGVABELEKOLNIDKGS-----TEVTFP--AISKSLYKLVKLPNRFQSSYINGP--GPQSEGLDKKDDSID---YKDKPQYVITIRRO  667
DpCht1     642  IDLIRKAGGIELEKOLKFGKDFSPSTS-----SSDATP--SISKSLYERVLKSKTSKN-----TLALKKT  702
TcCht1     629  IDLIRKAGGIELEKOLKIHEDGSASVS-----NSDTTP--SISKSLYERVLKSKGAKVGGKNSRGP--QNEGLNTHEDKETT---QDKGRPKYVITIRRO  718
DgCht1     671  IDLIRKKGGVDELEKHLRNKDGITLTKENSASGVTTPT--SISKSLYDRVLSRPGTLGFTFRNRNFTFKIQSSGTAESGTTDESSQINSKYSVLRG  770
DaCht1     641  IDLIRKKGGVDELEKHLRNKDGSI TLKENSANGAVTPT--SISKSLYDRVLSRPGTSSLTRNRLK--IAEASGTEATTST--VSAGNTYSKYSVLRG  736
Clustal
          :.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.

RpCht2      684  RPS-----TTEGLN-----LAEYADVDDVVEPDDRLEEI PKYKGLHYS--SRESDAE---NSDPPAKSERHFRPKYQSA---  750
AcypiCht   668  RPSKDVVDNIKESSEEDIPDATERFKPTKYTVDRFRDLGEVAD--ENSESDSLPKYTTISRKSSSENPPEE---TTPKYVTLRQRPTNKED---  759
DpCht1     703  NRNSGGR---QNGEEASRGKQSDTRGRPYKTLTRQLRVSFF--IPRKILNIFVCVNVKFN-----RRT-----  763
TcCht1     719  RSTNNKN---EDEEESDEASKSTKKQPEYVNIARRAVSTTTE--EPEENSQKQLNRNKLLEEDETEDEQPSRKTSG--PQYVNIARRQPSSTEETST  812
DgCht1     771  NSRQGP---QNEGLEQLAEFDGLFKERKQYVITINRNRGTATRDKATDNNSDDDIDEREPSQPKQSAETTRRPFSSATPSYTLRNRSPRTTTPS---  863
DaCht1     737  NSRQGP---QNEGIDKLAEDFGLFKERKQYVITINRQ---SPNQGDAEHSQHEEEDENEQVETTRRALSSVTPSYTLRTRPTTMAP---  821
Clustal
          :.:.:*****:*.:.:*****:*.:.:*****:*.

RpCht2      751  -----EQFR--PKHPSTEDQEAATKYSVLRSPSTFR-----  782
AcypiCht   760  -----EISDEEITPVAVSSTSQAPRYVLLRQRSTTTTTTDDRLIETTTKDNVEEPRENKTKVSMQMLTTESSIIISTILFNTE  839
DpCht1     764  -----  763
TcCht1     813  SKYTVIRRGTTTEPAEPEDETTKSNVSTSTEKIDLSRYSILRRGSTTEATTESGISTSTSSPKRGTTLPSVPERKRTRGTLAPGTPSSEDTTTT  912
DgCht1     864  -----VPIES--VTELEEEQVAPVAIKEQTQTKHYATLSR--TRGRTTERPESTASTAGLVSSSTNR-----  923
DaCht1     822  -----LVGESKQEEEEEEVVEKNSRSQQQVKSATLNR--ARERTTTPGPTTTEATEAVPSSSTTRYKYFERTRPTKAA--TLEASKDSEEP  906
Clustal

RpCht2      783  -----DHTSSSNTPRILTSTR-----VVTQIVEGSTQRQ-----  813
AcypiCht   840  PFTETIATTVVPTFTTAKNSETSKILLTLTEKMSDTSSTAKAPVSDISTINNSISTTKAPTSTVINVTSTIYEAATERQ-----  920
DpCht1     764  -----  763
TcCht1     913  RYKSIKRGSTSEAPPTDKTLPEDSTLKYSTFTRTPASTQAAPAATEPETAVTVINVQLLTPESLTVKTTLSSTKQSESNIESIGERVYQTQTPLLLEP  1012
DgCht1     924  -----  923
DaCht1     907  ADQEDEEEYEEENITVQRKQSTNTRKYASIGRRSTTTTAT----PETTTTTSGTETAKANNNNIHYNSNNKNSQAKQNNIIP-----T  987
Clustal

```

RpCht2 814 VPLHRLHELLPD-----TDNLKSTKSELSTQTSKK 881  
 AcypiCht 921 VRVKNIQNFLLEHKKTEPVTQSVTHTTPLTTLSTTMENIAPVEEPTQKSIKGRFGGVPVHFRPTLRKLIIPENNGTTEKFIEATTEKIVESTTEKK 1020  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1013 RPFskTSTRSPTPVVTESTRITKVSdSNYNLRLKPKLSQTQTEIISTTTLLTEKPTPFTRAPSFRFKLTTASyDQqATKQANRARKRfSTTTTELYSDNY 1112  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 988 VTEESSTALPTPTSTNQEPETTTETNTNETTEPNDRSSTTTTNNPSTTFTSTPTPLATTP-----TTTIPGVdSE 1061  
 Clustal

RpCht2 882 ----RISNRLIRKR-----SQLDTFAISASATT--EFPLNK-----RNQqIRPPLKERSESQNVt----- 931  
 AcypiCht 1021 NRLNKYTNRFIRPASNFSTENISTTSKIFVTSSTESSESTRQINRFQRTSSATDKQLPLTRKFVARYRQRTTELpVINNTEVQEVQRsRfFRSRPI 1120  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1113 EEFdLSrTYRPEIADLSSLTAVDFVALKELTRNSNSLRQRPRPESTTPRTSSfKSRRLISNK-----NEQNVEDQVNSSDKTHRIRGfTRSPVv 1205  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 1062 SSADGSPNPLIPESPDLPPTTTEPELATTTTTT-----PKTTTPVTTTSTGIHSELNNDI-----DNDNDSDDSEVTKPKTKYKATNRRRIT 1147  
 Clustal

RpCht2 932 -----TLTKKRTQSLVSTAESSNTFIRNR 955  
 AcypiCht 1121 SSTTTTTEETITELLNVEENADNVRYETTPYPTTMHVPTTNVEEISTNDEEIKKTTIDSFEPIKYSTTEITIIQIPITNKIKSFRGsvRANDGFQDSN 1220  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1206 STTTEGTTRHSLRNKRKVVRLRPTSSKLLSQNSDNKENVVPFKKRLVrPNTEtENLIENSLSLfnRRLTRPTEAPNEEQSDdVSAEEGENIKLSESN 1305  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 1148 NTTATRTTNTTANNNNSEAAN-DASPRNGLSSFNKIRASINTNPGRPPQTPeHTTIEPNSSASLSSVSSPRPFYPRRTRPSSSIPTTTTnQSDNNN 1246  
 Clustal

RpCht2 956 FMKTRNPTDDRE-----DGKDP-----LLSREFSRE---SSIRKPLFRYRSGTSS----- 1000  
 AcypiCht 1221 IDKSRSPSLGRQNSRFLKEEQKILFIRVMPSPDGRSQNEFTSNPVKNITRNrGRVrAYDSELENTLTDELtNEDRPNELFRGSETKFRPTTSTTTES-- 1318  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1306 IRENSVNNNNNNILSPDdGQKVRKVLKRIKPKVdDEKIVTEPNIVIRTRKIVRKLTPTESTITSTTETTVPGRKRIIRRLRPTTELKENSTQKTLyI 1405  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 1247 STDNDTNETD-----AVASVVKTRPSGDRPKVSAS-LQTATRSTLHNLHQD---QqESQVEVAGNGNSLRHEVVSSLSLQTP----- 1324  
 Clustal

RpCht2 1001 -----QISKEDSTLSHTTPVSTMTKNYSEfPRDPNSFILS-EESEKDRYtDEVSEdQVTDAE-----IYQLEEQVSG 1069  
 AcypiCht 1319 -----TEEIQKDRIRQRI TRPVQRSTTTTTTEESPSSSATESYSSKVNRRRKRfPEYTTTSTSSyEEIITQKTRNPERRFRSRTPLLKNTITTTSTP 1413  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1406 RGRPFLAHFNNEESGVDAStIKPDSSKYSTPNRGTTTEESEVTEQFIANSENTDSYKGTTEEAEAKQLISNSENSsQRtTDSYKGTTEEADStERTIDR 1505  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 1325 -----NHIDDADNGGITQTKKY-TWRAVRKPTARPNrSLARDDKDSRRfAGQLNDISLDQDLSSTTKFRSRRLNSAEDESEVAHAAAESDQKA 1413  
 Clustal

RpCht2 1070 DSKEQSSR-----LPDLANVAVAAIQSLATSAPS-----TQSTEKYKST 1108  
 AcypiCht 1414 ETLEDSDREFFSTSQPYFDDSSSLFAKTRDDRIGGSTEDLANTAVVAIHtLATAPPsDYE-----FRPSTHSPQqSVFRETtQNREYfEPQ 1500  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1506 SKYSTLNrGTIDSTREESfDKEIITDRGSPSRSTTEGTIDRtKYSTLNKGTTEEPEVREHFISNSDStERTIDRSKYSTLNrGTTESTKEEKIDEEt 1605  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 1414 RSYQSiNHQSGKKI----- 1427  
 Clustal

RpCht2 1109 PHAAVG-----KSVLSGTVRPSRSPRfPRPTTRAGVTRVrTSSPRfFSKP---TAQF----- 1158  
 AcypiCht 1501 APHSIDSFVdVQPARLPEQSLRQSAQPQLPPPPPSIKLPAVSfQPAFFQSPFQAGPFQVPYpGLPFQANNAFAFVARQSPtTALFPATSRQTFILR- 1599  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1606 ITTNRGSPSRfRNSNTStEGTIDRSKYSTLNrGTTEEAEVKEQHISSSDASTEGTIDRSKYSTLNrGTTEEAEVKEQHISNSDASTEGTIDRSKYSTLNrG 1705  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 1428 ----- 1427  
 Clustal

RpCht2 1159 -----TTPARGATSPHrTSLIYEDYDADY--YVEP-----VDLPLSGKVRIHADGYIECLDIGNFPHfPSCRKfISCakMENGRL 1231  
 AcypiCht 1600 -----RGPSRTPLGTAATSAPPQYLNdNTQEQYADYSEPEQASDSEQRVALKGKVRIHGDGYIECLDMGSfPHfPSCQKfISCakTEYGal 1687  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1706 TTSAKEEKIDEEIISTNRGSPSRfRIYRPTVFHDDEEEEDDSLKTRIVEPLfTEEITESNKLSNNAtnKTDdLNKEEADEENStIETNEENStEEHKD 1805  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 1428 ----- 1427  
 Clustal

RpCht2 1232 LGWEYTCPKGLSFDPIGGICNWNAGLGCKE----- 1301  
 AcypiCht 1688 FGWEYTCPKGLSFDQVGGICNWSGpVCNN----- 1717  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1806 EEDNEDIpVTTVKPYINpILNRQKNRPAfQRPKLTTQKPLSSSTTSRNRYKTFGRSTTAPSKETNEEITQEKfVPKNLDRNRKvSTSTTTTEVAPEIEQt 1905  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 1428 ----- 1427  
 Clustal

RpCht2 1302 ----- 1301  
 AcypiCht 1718 ----- 1717  
 DpCht1 764 ----- 763  
 TcCht1 1906 TDSVQINDTESDKTTLESIEVtTLKETEEVvNATTESRTILVETtTLRTTETTPSHLPRSTSRTRPKfNVPKRLTTPESRFSPKLRtQSTTPKAPTSLK 2005  
 DgCht1 924 ----- 923  
 DaCht1 1428 ----- 1427  
 Clustal

```

RpCht2      1302 ----- 1301
AcypiCht1  1718 ----- 1717
DpCht1      764 ----- 763
TcCht1      1906 DKFTRKYTTTERNDFVEEEDIPEEDEVENQSSSTQRTTRPKARPSNRPDFRKSTEAPKPTEDLKGIDTDAVKNRNKNLFSKRRKMNTPFAGHPLNQSILTT 2105
DgCht1      924 ----- 923
DaCht1      1428 ----- 1427
Clustal

RpCht2      1302 ----- 1301
AcypiCht1  1718 ----- 1717
DpCht1      764 ----- 763
TcCht1      2106 TPTISESVTKPSTPEFFETTEYLTLHIFIATERVTENSLPTTSSKIEKLIENVRIVEVHEMNNTEERDNKVVVDKVGVINRVTVVKKVVDGNFNPEDNEI 2205
DgCht1      924 ----- 923
DaCht1      1428 ----- 1427
Clustal

RpCht2      1302 ----- 1301
AcypiCht1  1718 ----- 1717
DpCht1      764 ----- 763
TcCht1      2206 TKSPKLDDEIATVREIPNREDRRYEQVAESAEIIDGRSNINIITPRPYSTEASTISLEGLFQTDTPQKLSDFNLNQLKQGTNDEELLELETGNSRYVNV 2305
DgCht1      924 ----- 923
DaCht1      1428 ----- 1427
Clustal

RpCht2      1302 ----- 1301
AcypiCht1  1718 ----- 1717
DpCht1      764 ----- 763
TcCht1      2306 RVLKEDDYITMKAEVVEVTPKISKDIKIVPIQVEMSRKLIAPSDFVTKVEQGVPKVTLQILKPQN 2370
DgCht1      924 ----- 923
DaCht1      1428 ----- 1427
Clustal

```

Figura 4.2 - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da proteína RpCht2 com proteínas homólogas da família 18 das glicosídeo hidrolases, mapeadas pela ferramenta Blastp. Os peptídeos sinais preditos estão destacados em caixa. O preenchimento em preto indica os resíduos idênticos e em cinza indica os resíduos similares. O sítio catalítico está indicado com caixa vermelha. As sequências das glicosídeo hidrolases utilizadas no alinhamento são provenientes de: *Acyrtosiphon pisum* (AcypiCht1: XP\_001942596.2), *Dendroctonus ponderosae* (DpCht1: ENN78373.1), *Tribolium castaneum* (TcCht1: EFA00965.1), *Drosophila grimshawi* (DgCht1: XP\_001991892.1) e *Drosophila ananassae* (DaCht1: XP\_001966685.1).



```

RpCht3      826 ----- 825
BmCht3      892 --DYKVKLEYDGPYETVLT---SGQYTTKDPTEVTCEEEDGHI SYHKDQADCTMYMCEGERKHHMPCPSNLVFNPNENVCDPENVEGCAHHTQAPPAR 986
BmCht1      920 --DYKVKLEYDGPYETVLT---SGQYTTKDPTEVTCEEEDGHI SYHKDQADCTMYMCEGERKHHMPCPSNLVFNPNENVCDPENVEGCAHHTQAPPAR 1014
DpCht1      828 ADNYQVQFVYDGPYERSASSLITGKPAKDPNVVTCDEEEGHI SYHPDKANCAMYMCEGERKHHMPCPVQLVFNPSQNVCDWPENVPGCETHFTAGTGR 927
CcCht1      919 --DYKVELEYEGPYESHGP---RGAYTTKDPHDVTCEEEDGHI SYHKDWNDCTHYMCCEGERKHHMPCPANLVFNPNQENVCDPENVEGCHEPTEAPA-- 1011
AgCht1      924 --DYKVALEYDGPYESFGP---RGAYTTKDPNEVTCAEEDGHI SYHPDKADCTHYFMCCEGERKHHMPCPANLVFNPNENVCDPENVEGCQHHTQAPAA- 1017
Clustal

RpCht3      826 - 825
BmCht3      987 R 987
BmCht1      1015 R 1015
DpCht1      928 R 928
CcCht1      1012 - 1011
AgCht1      1018 - 1017
Clustal

```

Figura 4.3 - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da proteína RpCht3 com proteínas homólogas da família 18 das glicosídeo hidrolases, mapeadas pela ferramenta Blastp. Os peptídeos sinais preditos estão destacados em caixa. O preenchimento em preto indica os resíduos idênticos e em cinza indica os resíduos similares. O sítio catalítico está indicado com caixa vermelha. As sequências das glicosídeo hidrolases utilizadas no alinhamento são provenientes de: *Bombyx mori* (BmCht3: XP\_004922005.1 e BmCht1: XP\_004922004.1), *Daphnia pulex* (DpCht1: EFX88295.1), *Ceratititis capitata* (CcCht1: XP\_004524466.1) e *Anopheles gambiae* (AgCht1: XP\_308858.4 - EAA04006.4)

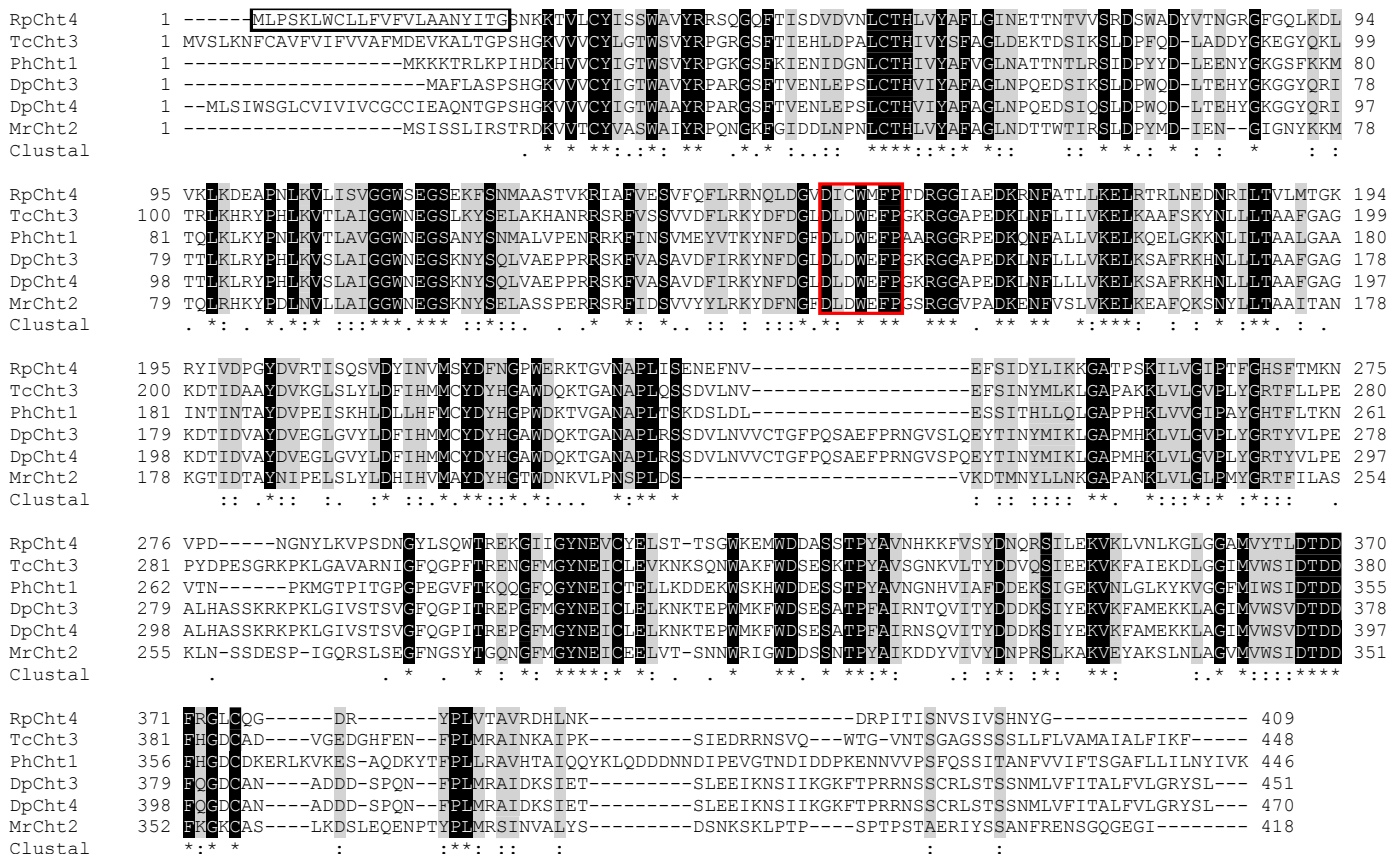


Figura 4.4 - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da proteína RpCht4 com proteínas homólogas da família 18 das glicosídeo hidrolases, mapeadas pela ferramenta Blastp. Os peptídeos sinais preditos estão destacados em caixa. O preenchimento em preto indica os resíduos idênticos e em cinza indica os resíduos similares. O sítio catalítico está indicado com caixa vermelha. As sequências das glicosídeo hidrolases utilizadas no alinhamento são provenientes de: *Dendroctonus ponderosae* (DpCht3: ENN72974.1 e DpCht4: ERL92170.1), *Tribolium castaneum* (TcCht3: XP\_970191.2 - EFA06923.1), *Pediculus humanus corporis* (PhCht1: XP\_002423089.1 - EEB10351.1) e *Megachile rotundata* (MrCht2: XP\_003706336.1).













Figura 4.9 - Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da proteína RpCht9 com proteínas homólogas da família 18 das glicosídeo hidrolases, mapeadas pela ferramenta Blastp. Os peptídeos sinais preditos estão destacados em caixa. O preenchimento em preto indica os resíduos idênticos e em cinza indica os resíduos similares. O sítio catalítico está indicado com caixa vermelha. As sequências das glicosídeo hidrolases utilizadas no alinhamento são provenientes de: *Plutella xylostella* (PxCht1: AFI55112.1), *Acyrtosiphon pisum* (AcypiCht2: XP\_001950380.1), *Ostrinia furnacalis* (OfCht1: AGX32025.1) e *Bombyx mori* (BmCht1: XP\_004922004.1 e BmCht3: XP\_004922005.1).

#### 4.2. Análise das sequências dos genes codificantes de proteínas da família GH18 em *R. prolixus*.

Os genes RpCht1-9 apresentam de 6 a 46 éxons, diferindo estruturalmente entre si (figura 4.10), e codificam proteínas com diferentes organizações modulares, apresentando de 1 a 5 domínios catalíticos, onde temos os resíduos envolvidos em catálise que fazem a quebra da ligação glicosídica e 0 (ausência) a 5 domínios de ligação a quitina, que é responsável pela ligação ao polissacarídeo insolúvel, rico em cisteínas e ligações dissulfeto (figura 4.11).

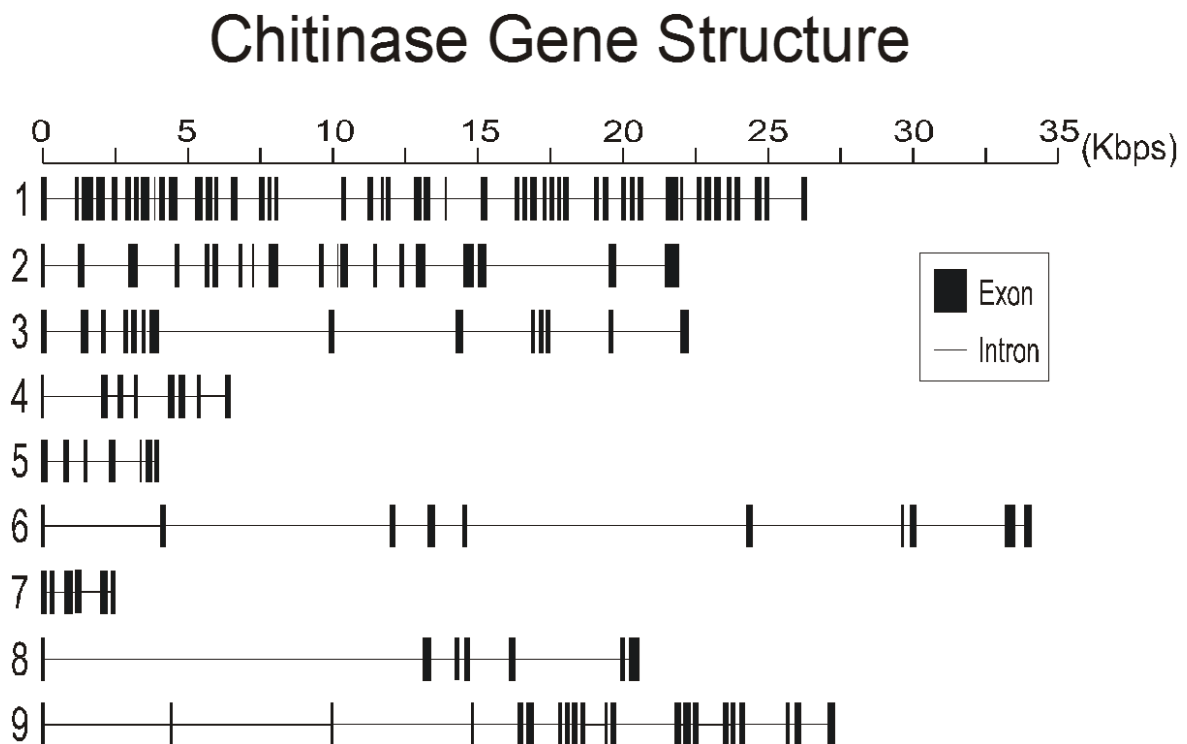


Figura 4.10 - Diagrama esquemático da organização de éxons e íntrons nos genes de quitinase RpCht1-9 de *R. prolixus*. As caixas pretas indicam os éxons e linhas cinzas indicam os íntrons. Os números de 1 a 9 correspondem aos genes de quitinase: 1 - RpCht1, 2 - RpCht2, 3 - RpCht3, 4 - RpCht4, 5 - RpCht5, 6 - RpCht6, 7 - RpCht7, 8 - RpCht8, 9 - RpCht9.

# Chitinase Domain Organization

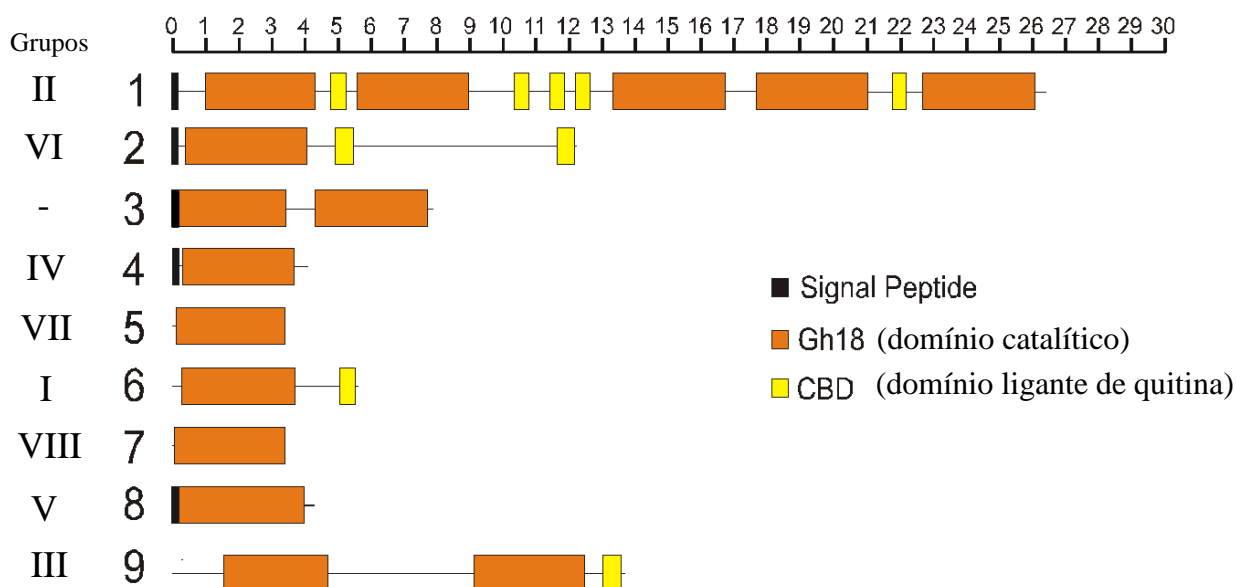


Figura 4.11 - Diagrama esquemático da arquitetura de domínios das quitinases de *R. prolixus*. As caixas pretas indicam peptídeo sinal, caixas laranjas indicam domínio catalítico, caixas amarelas indicam domínio de ligação a quitina (CBD). Os números de 1 a 9 são os genes de quitinase: 1 - RpCht1, 2 - RpCht2, 3 - RpCht3, 4 - RpCht4, 5 - RpCht5, 6 - RpCht6, 7 - RpCht7, 8 - RpCht8, 9 - RpCht9. Os números romanos representam os grupos homólogos funcionais.

Em 5 das sequências de quitinases de *R. prolixus* foi possível prever a presença de peptídeo sinal, indicando que essas proteínas são provavelmente secretadas para o meio extracelular. O ponto isoelétrico teórico, pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de uma proteína, varia de 5,25 a 8,84 nas sequências de quitinases de *R. prolixus* e a massa das proteínas preditas varia entre 38 e 297 kDa (Tabela 4.1). Todas as proteínas preditas apresentam possíveis sítios de glicosilação no domínio de ligação entre os domínios catalíticos e domínios de ligação à quitina (quando presentes), característica comum nas proteínas da família 18 das glicosídeo hidrolases. Encontramos nessas sequências de 1 a 8 N-glicosilações que são ligações no grupo amina da asparagina que tem início no retículo endoplasmático durante a síntese da proteína podendo afetar seu enovelamento e de 0 a 185 O-glicosilações, que são ligações no grupo hidroxila da serina ou treonina que ocorrem no complexo de Golgi após a tradução em proteínas totalmente enoveladas. Nenhuma das sequências de quitinase de *R. prolixus* apresentou âncora de GPI, que sinaliza as proteínas que são exportadas a membrana plasmática onde ficam expostas ao



ambiente externo, entretanto, 8 das 9 sequências de proteínas possuem predição de 1 hélice transmembranar, que é comum a proteínas de membrana (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Resumo das características das sequências codificantes de proteínas da família 18 das glicosídeo hidrolases no genoma de *R. prolixus*. Vector base: Código dos genes de quitinase em *R. prolixus* no Vector Base. Signal IP 4.1 e Signal IP 3.0: Peptídeo sinal. Phobius IP: Predição de domínio transmembrana e peptídeo sinal. PI: ponto isoelétrico teórico. MW: Peso molecular. N-Glyc: número de N-glicosilações. O-Glyc: número de O-glicosilações. GPI: Âncora de Glicosil Fosfatidil Inositol. Hmmtop: Hélices transmembrana.

NOME	Vector Base	Signal IP 4.1	Signal IP 3.0	Phobius IP	PI	MW	N-GLYC	O-GLYC	GPI	Hmmtop
RpCht1	RPRC015248	YES 16/17	YES 16/17	YES 1/19	6.53	297148.57	6 (230/ 476/ 1129/ 1540/ 1973/ 2474)	185	NO	1 (50-70)
RpCht2	RPRC005523	NO	YES 24/25 ou 16/17	YES 1/19	8.84	137811.19	2 (46/925)	181	NO	1(532-550)
RpCht3	RPRC011446	YES 19/20	YES 19/20	YES 1/21	5.60	44678.27	8 (151/227 /298/305/ 384/586/ 728/735)	12	NO	1 (16-32)
RpCht4	RPRC014089	YES 22/23	YES 16/17 ou 22/23	YES 1/22	6.84	48748.75	1 (66)	2	NO	1 (92-109)
RpCht5	RPRC014092	NO	NO	Não citoplasmática (falta peptídeo sinal)	5.84	38110.09	3 (51/103/ 309)	5	NO	1 (22-46)
RpCht6	RPRC012296	NO	NO	Não citoplasmática (falta peptídeo sinal)	5.25	64484.51	2 (69/90)	30	NO	1 (36-53)
RpCht7	RPRC012021	NO	YES 24/25	Domínio transmembrana - proteína extracelular	5.83	50239.03	6 (16/45/ 109/135/ 226/291)	0	NO	1 (19-43)
RpCht8	RPRC003338	YES 19-20	YES 19-20	Yes 1/19	6.77	48159.91	1 (215)	6	NO	0
RpCht9	RPRC014976	NO	NO	Domínio transmembrana - proteína extracelular	6.35	117743.31	5 (54/59/165/832/85)	37	NO	1 (93-110)

As sequências das proteínas RpCht1-9 de *R. prolixus* foram comparadas com as proteínas da família GH18 de outros insetos, e através de análises filogenéticas das sequências codificantes observamos que esses genes pertencem à diferentes subgrupos de quitinases já descritos em outros insetos. Na figura 4.12, podemos observar que o gene RpCht6 agrupou com as quitinases da família I, RpCht1 agrupou com as quitinases da família II, RpCht9 com as quitinases da família III, RpCht4 com as quitinases da família IV, RpCht8 com a família V, RpCht2 com a família VI, RpCht5 com a família VII, e RpCht7 com a família VIII. Essa comparação nos permitiu inferir o possível papel fisiológico de alguns genes de quitinases de *Rhodnius*.

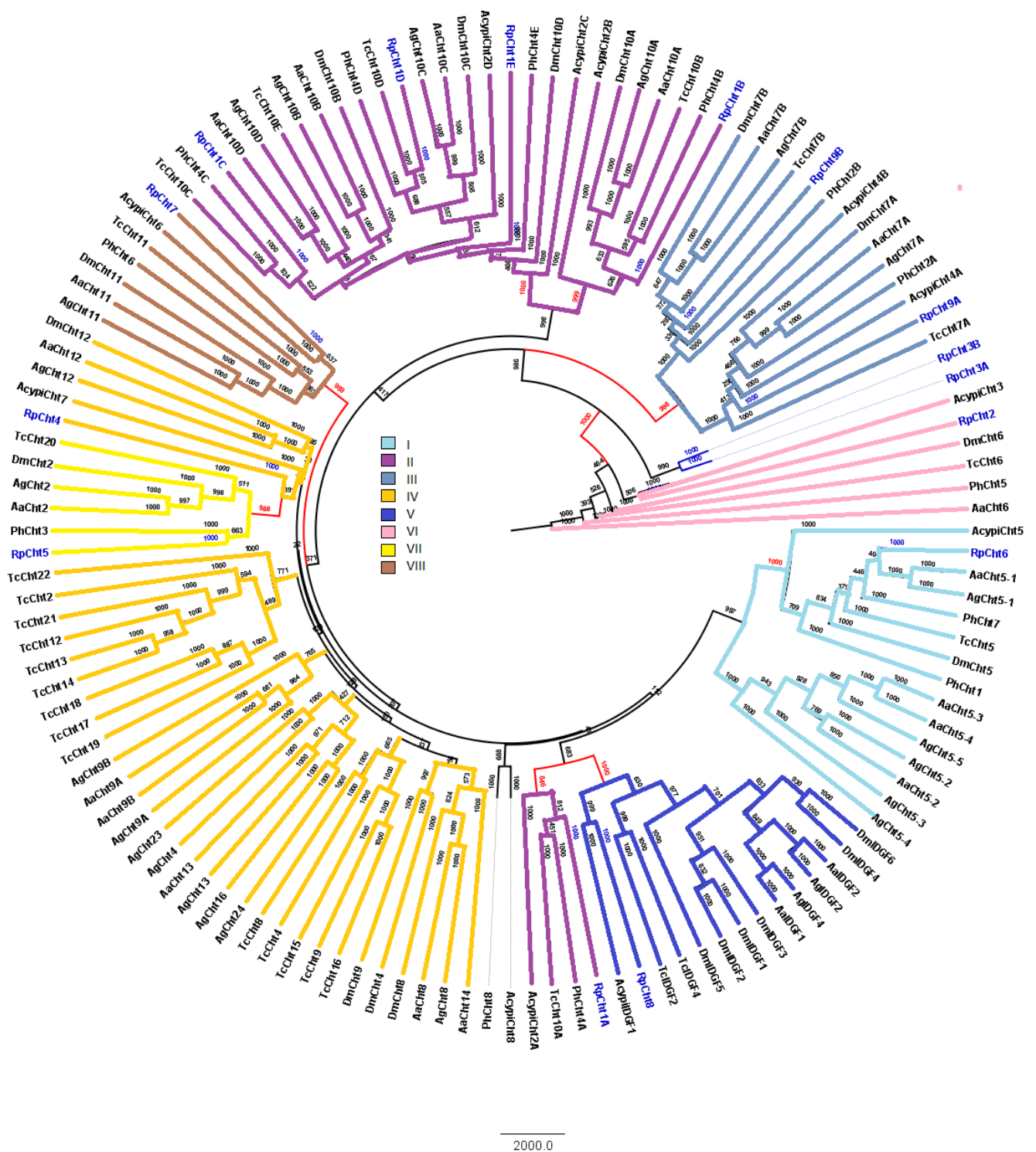


Figura 4.12: Análise filogenética das quitinases de sete espécies de insetos baseado nas seqüências de aminoácidos das proteínas codificadas. Rp: *Rhodnius prolixus*; Ag: *Anopheles gambiae*; Aa: *Aedes aegypti*; Tc: *Tribolium castaneum*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Ph : *Pediculus humanus*; Acypi: *Acyrtosiphon pisum*. Árvore filogenética das quitinases de insetos gerada pelo programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) após alinhamento usando ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)).

### 4.3. Análise semi-quantitativa da expressão dos genes de glicosídeo hidrolases da família 18 em *R. prolixus*;

Para uma melhor compreensão da classificação funcional das quitinases de *R. prolixus*, decidimos analisar a expressão dos genes de quitinase ao longo do desenvolvimento do inseto. Foram feitas preparações de cDNA utilizando insetos inteiros em cada um dos estádios de desenvolvimento – ovo, ninfas de primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto estágio, adultos machos e fêmeas – coletando exemplares a cada dois dias de vida. A expressão dos genes de quitinase foi avaliada usando a técnica de RT-PCR semi quantitativo convencional, e os resultados obtidos estão apresentados na figura 4.13, onde podemos observar diferentes padrões de expressão entre os genes ao longo do desenvolvimento.

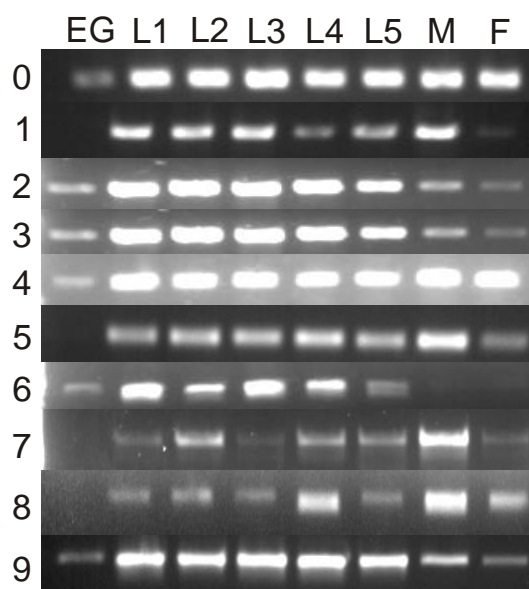


Figura 4.13 - Perfil típico de expressão de genes de quitinase ao longo do desenvolvimento em *R. prolixus* (RT-PCR). As raia correspondem ao resultado do RT-PCR de insetos inteiros, incluindo ninfas (primeiro ao quinto estágio: L1-L5), machos (M) e fêmeas (F) adultas, e ovos (EG). Os números das linhas de 1 a 9 indicam respectivamente os produtos dos genes RpCht1 a RpCht9 e 0 indica o gene de actina usado como constitutivo (actina). O experimento foi realizado 3 vezes independentemente.

A fim de compreender melhor o padrão de expressão dos genes ao longo do desenvolvimento, calculamos através da densitometria de bandas a expressão relativa utilizando o programa ImageJ. Na figura 4.14 observamos que no ovo, o gene significativamente mais expresso é o RpCht9 ( $p > 0.05$ ), e RpCht5 é significativamente diferente de RpCht1, RpCht3 e RpCht7 ( $p > 0.05$ ). Para os demais estádios não foi observado diferenças estatísticas entre os genes.

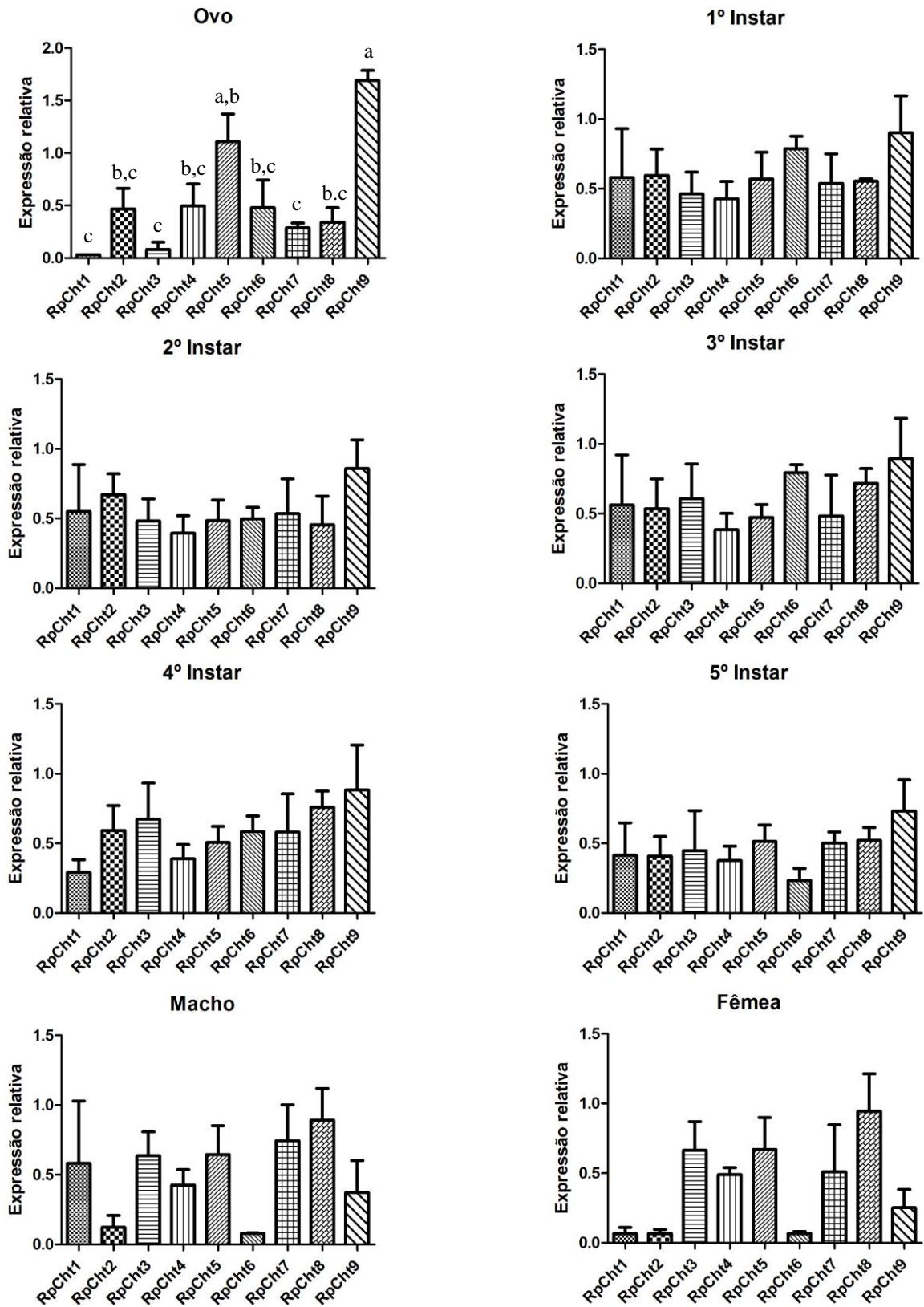


Figura 4.14 – Expressão dos genes de quitinase, em relação a Actina usada como constitutivo, em diferentes estádios de desenvolvimento em *R. prolixus*, obtidos através do programa ImageJ (por densitometria das bandas). Valores sinalizados com a, b e c correspondem a grupos significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Decidimos então verificar em quais tecidos de ninfas de quinto estágio os diferentes genes são preferencialmente expressos. Escolhemos esse estágio por que nele observou-se expressão de todos os genes de quitinase (ver figura 4.13). Foram realizadas reações de RT-PCR para transcritos de cada um dos genes a partir de: glândulas salivares (SG), intestino médio anterior (AM), intestino médio posterior (PM) e intestino posterior (HG) com 12 dias após alimentação sanguínea e hemolinfa (HL), corpo gorduroso (FB) e carcaça (CC), coletados com 16 dias após a alimentação. Os dias foram escolhidos de acordo com os pico de atividade quitinolítica descritos anteriormente (Faria, 2013). Os dados obtidos estão apresentados na figura 4.15, que nos permitiu observar que cada um dos genes de quitinase de *R. prolixus* apresenta um padrão de expressão tecidual específico.

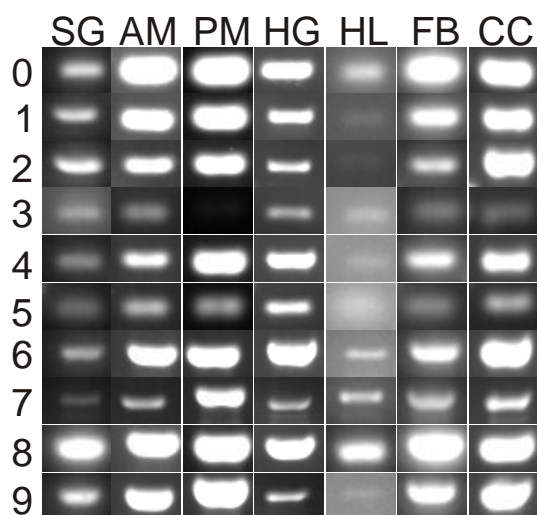


Figura 4.15 - Perfil de expressão de genes de quitinase em diferentes tecidos em ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* (RT-PCR). As raias correspondem ao resultado do RT-PCR de diferentes tecidos, incluindo glândulas salivares (SG), intestino médio anterior (AM), intestino médio posterior (PM), intestino posterior (HG), hemolinfa (HL), corpo gorduroso (FB) e carcaça (CC). Os números das linhas de 1 a 9 indicam respectivamente os produtos dos genes RpCht1 a RpCht9 e 0 indica o gene de actina usado como constitutivo. Foram utilizados tecidos de 5 insetos após 12 (FB, HF, CC) ou 16 (SG, HG, AM, PM) dias da alimentação sanguínea. O experimento foi realizado 3 vezes independentemente.

A fim de compreender melhor o padrão de expressão tecidual dos genes calculamos através da densitometria de bandas a expressão relativa dos genes utilizando o programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Na figura 4.16 podemos observar que na glândula salivar temos uma maior expressão do gene RpCht8 que é estatisticamente diferente

de RpCht3, RpCht4 e RpCht 7 ( $p>0.05$ ), no intestino médio posterior os genes RpCht3 e RpCht5 ( $p>0.05$ ) são significativamente diferentes dos demais genes, no intestino posterior o gene RpCht8 se difere dos genes RpCht1 e RpCht3 ( $p>0.05$ ), no corpo gorduroso os genes RpCht3 e RpCht5 distingue-se dos demais com exceção do RpCht2, entretanto RpCht2 é significativamente diferente de RpCht8 ( $p>0.05$ ), no intestino médio anterior o gene RpCht3 diverge de RpCht8, e RpCht7 diverge de RpCht8 e RpCht9 ( $p>0.05$ ), na hemolinfa e na carcaça não encontramos diferenças significativas entre os genes.

Os padrões de expressão tecidual e temporal foram utilizados para escolha das condições dos experimentos de silenciamento e teste da função fisiológica de cada gene.

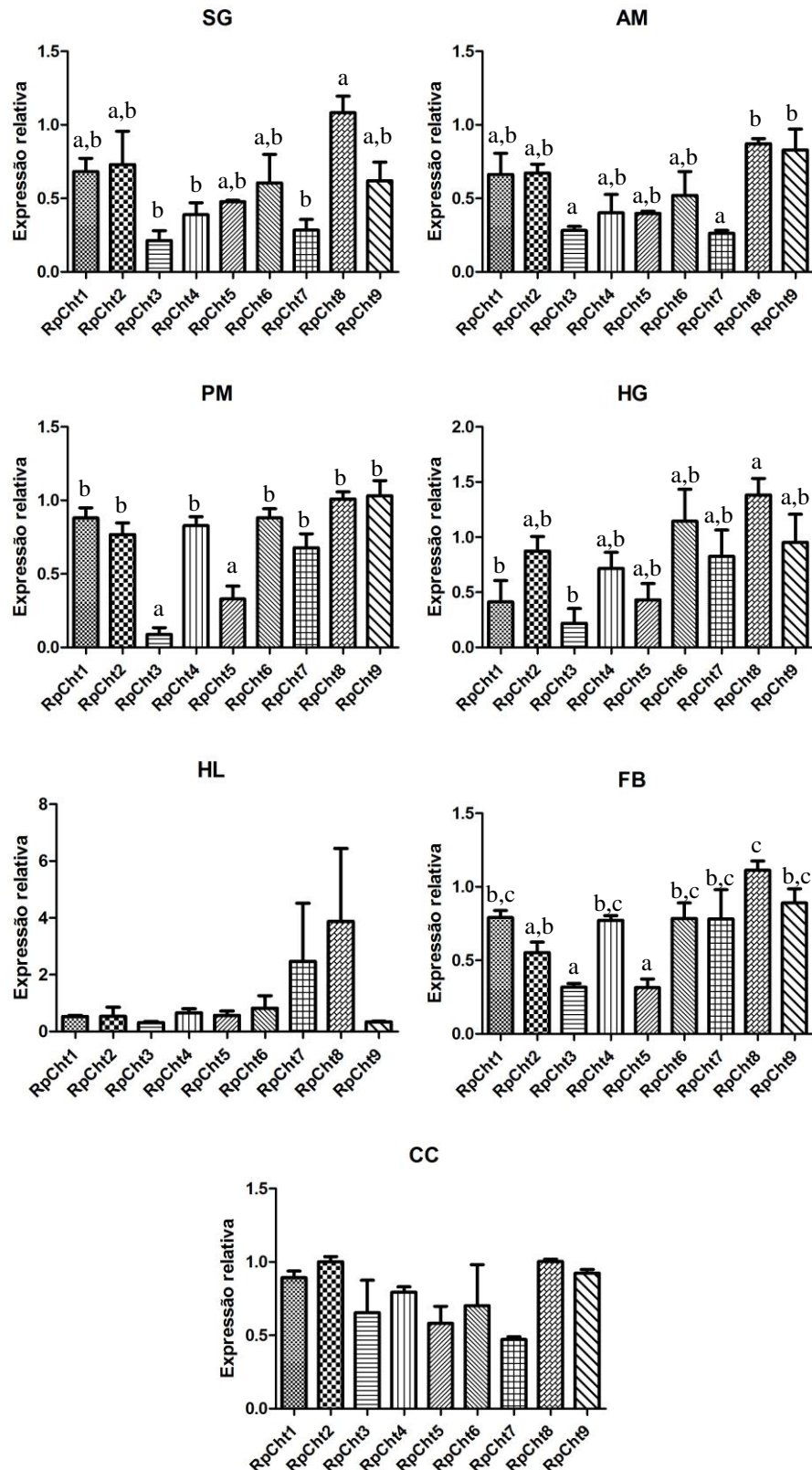


Figura 4.16 - Expressão relativa dos genes de quitinase em diferentes tecidos em ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*, obtidos através do programa ImageJ (por densitometria das bandas). SG: glândulas salivares. AM: intestino médio anterior. PM: intestino médio posterior. HG: intestino posterior. HL: hemolinfa. FB: corpo gorduroso. CC: carcaça. Valores sinalizados com a, b e c correspondem a grupos significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4. Screening do silenciamento dos transcritos de GH18 por RNAi

Para definirmos qual a menor concentração de dsRNA que nos permitiria obter uma maior porcentagem de silenciamento realizamos uma curva de concentração (injeções de 1µg, 3µg, 6µg e 2 x 3µg de dsRNA por inseto) para cada um dos 8 genes de quitinase para os quais conseguimos sintetizar dsRNA. O gene RpCht5 não foi estudado pois os primers solicitados com a sequência T7 não resultaram em produto após inúmeras reações de RT-PCR usando diferentes condições e moldes de cDNA.

Os insetos utilizados para os experimentos de silenciamento foram sincronizados. O dsRNA foi injetado em três grupo de 5 insetos para cada quantidade diferente: 1µg, 3µg, 6µg e 2 x 3µg de dsRNA por inseto. No grupo de recebeu 2 x 3 µg a segunda injeção de 3µg foi realizada 48h após a primeira. Passadas 48h (PAIM *et al*, 2013) após as últimas injeções, o RNA total de 3 insetos foi extraído em um pool para os genes RpCht8 e RpCht4. Já para os genes RpCht1, RpCht 2, RpCht3, RpCht6, RpCht7 e RpCht9 resolvemos extrair o RNA mensageiro de 3 insetos separadamente, por ser um material mais limpo e nos permitir observar o silenciamento individualmente. Entretanto não obtivemos resultado para o gene RpCht1 pois o RNAm se mostrou instável e facilmente degradável, assim sendo, para esse gene teríamos de repetir o experimento utilizando RNA total.

O RNA total ou mensageiro foi submetido a transcrição reversa e o cDNA obtido foi utilizado nas reações de PCR para confirmação do silenciamento. As bandas obtidas no gel de agarose tiveram sua densitometria medidas pelo programa ImageJ. Na figura 4.17 abaixo podemos observar que não houve silenciamento observável para o gene RpCht2. Os genes RpCht8 e 9 tiveram pouco silenciamento, não sendo suficiente para análise de fenótipo, e os genes RpCht3 e 7 tiveram um silenciamento de aproximadamente 80%. Os genes RpCht4 e 6 tiveram um aumento na sua expressão.



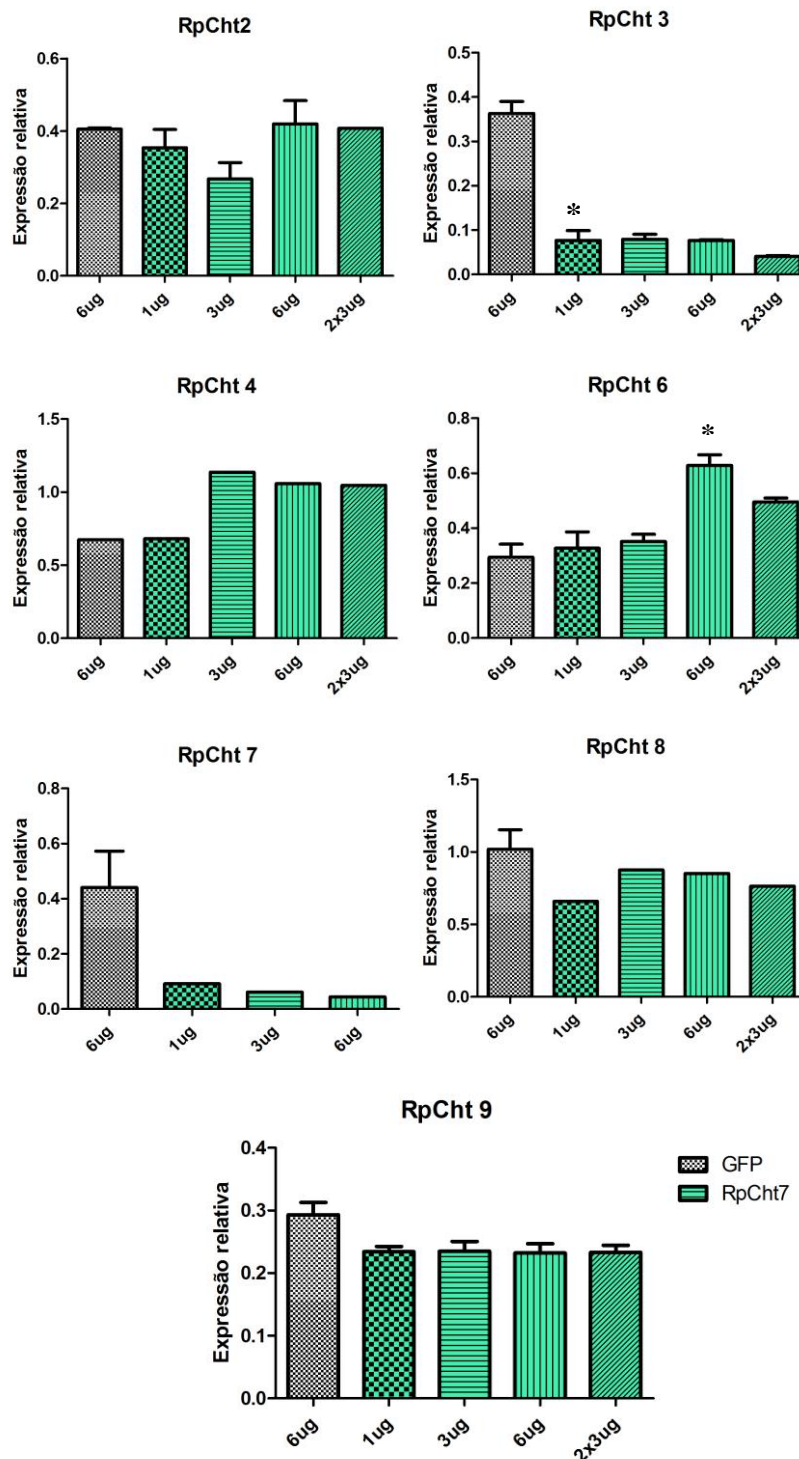


Figura 4.17 - Perfis de expressão dos genes de quitinase em relação a actina utilizada como constitutivo. Dados obtidos por densitometria de bandas através do programa ImageJ, após injeção de diferentes quantidades de dsRNA em ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*. Na primeira coluna, em cinza, temos o controle – insetos injetados com 6µg de dsGFP por inseto. Em verde temos diferentes quantidades de dsRNA injetadas: 1µg, 3µg, 6µg e 2 injeções de 3µg por inseto, com intervalo de 24 horas entre elas, para os respectivos os genes de quitinase. n=3, \*  $p < 0.05$ .

#### 4.5. Injeção de dsRNA para análise dos fenótipos

Com base nos resultados obtidos na figura 4.17, escolhemos dar continuidade ao trabalho com o estudo do gene RpCht7. O mesmo apresentou, além de uma alta taxa de silenciamento quando avaliado através do PCR qualitativo, um fenótipo interessante de mortalidade. Optamos por utilizar injeções de 1µg por inseto, uma vez que nessa quantidade já obtemos um silenciamento significativo, reduzindo assim as chances de efeitos colaterais e respostas não específicas.

Foram injetados três grupos com vinte ninfas de quinto estágio para dsRpCht7. Além disso, usamos dsGFP como controle de dsRNA exógeno, para observar se os efeitos se dariam apenas pela exposição a um dsRNA. Também injetamos água como controle para observar os efeitos devidos à injúria causada pela microinjeção.

Para confirmar o silenciamento extraímos o RNA total de acordo com a metodologia apresentada no item 3.4.1 para um inseto de cada pote, totalizando 3 insetos por grupo experimental. As extrações foram feitas 48 horas, 16 dias e 51 dias após as injeções, os resultados estão apresentados na figura 4.18, onde podemos observar que o silenciamento se reduz ao longo dos dias, ou seja, os níveis de expressão daquele gene no inseto estão aumentando com o passar do tempo. Entretanto, o silenciamento obtido ainda é suficiente para análise dos fenótipos.

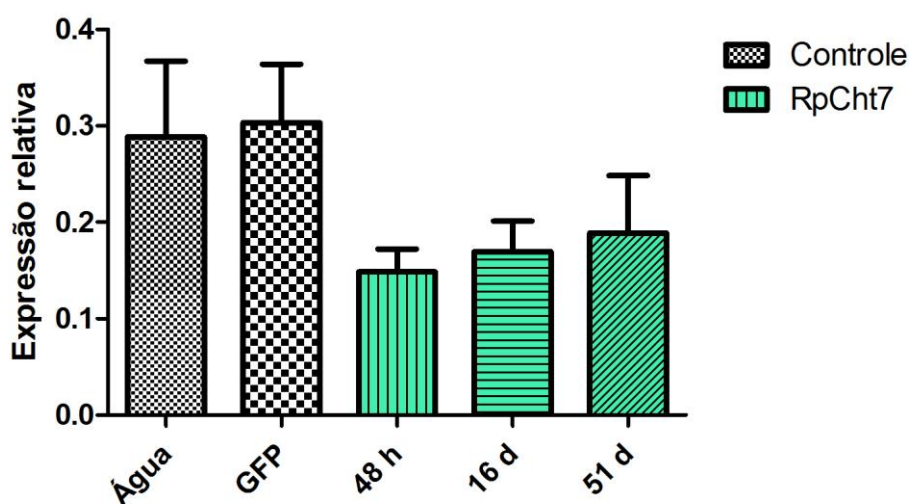


Figura 4.18 - Expressão do gene RpCht7 em relação ao gene deactina utilizado como constitutivo. A injeção do dsRNA foi realizada em ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*. Em cinza temos os controles (insetos injetados com água ou dsGFP) e em verde os insetos injetados com dsRpCht7. Foram utilizados 3 insetos por grupo experimental. Dados obtidos por densitometria de bandas através do programa ImageJ. 48h: 48 horas após a injeção. 16 d: 16 dias após a injeção. 51 d: 51 dias após a injeção.

#### 4.5.1. Mortalidade

Ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* em jejum, injetadas com o dsRNA para o gene RpCht7, demonstraram índices de mortalidade significativamente maiores do que os controles injetados com dsGFP. A mortalidade das ninfas foi acompanhada por aproximadamente 15 dias, com observações feitas a cada dois dias. Nesse período as ninfas injetadas com dsRpCht7 alcançaram uma mortalidade em torno de 20% (Figura 4.19).

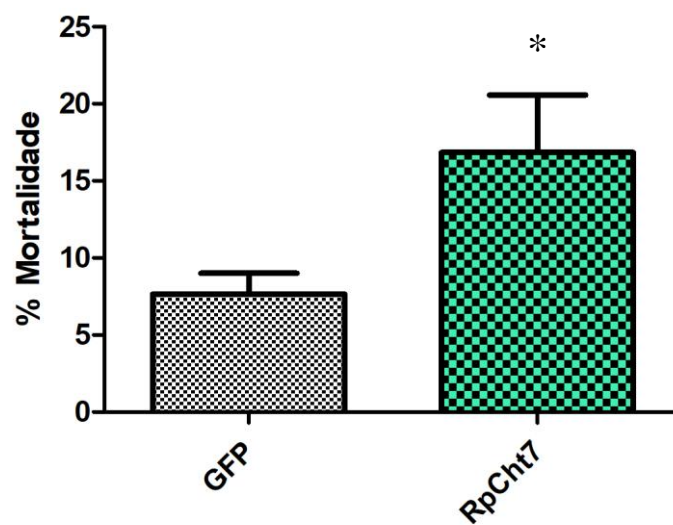


Figura 4.19 – Mortalidade de ninfas de quinto estágio em jejum. Porcentagem de ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* mortas após injeção com dsGFP (cinza) ou dsRpCht7 (verde). O experimento foi realizado 6 vezes independentemente. \*  $p < 0.05$ .

#### 4.5.2. Ingestão sanguínea, diurese e digestão

Com o propósito de verificar se o silenciamento do gene *RpCht7* de *R. prolixus* afeta os parâmetros de ingestão sanguínea, diurese e digestão, as ninfas de quinto estágio foram submetidas a pesagem individual antes e depois do repasto sanguíneo. Os insetos foram pesados antes e imediatamente após a alimentação, para averiguar se a ingestão de sangue estava sendo afetada, 24 e 48 horas após a alimentação para observar se haveria alguma alteração na diurese e 7 dias após alimentação pra analisar alterações gerais na digestão ou desenvolvimento.

Como podemos observar na figura 4.20, não há diferença entre os grupos controle (injetados com dsGFP) e experimental (injetados com ds*RpCht7*), ou seja, o silenciamento do gene *RpCht7* não afeta os parâmetros de ingestão, diurese e digestão de uma maneira geral.

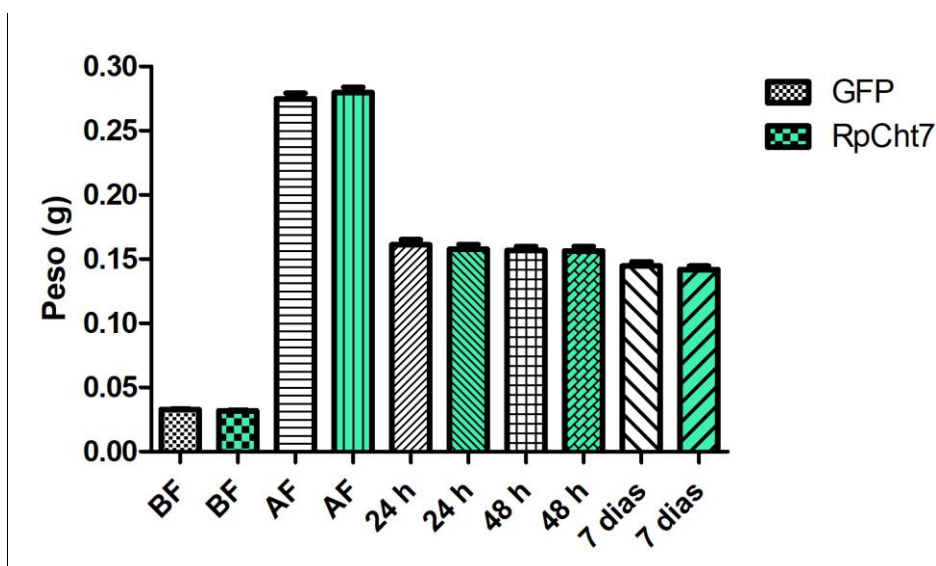


Figura 4.20 – Peso em gramas das ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* injetadas com diferentes dsRNAs. BF: Antes da alimentação sanguínea. AF: Após alimentação sanguínea. 24h: 24 horas após alimentação sanguínea. 48h: 48 horas após alimentação sanguínea. 7 dias: 7 dias após alimentação sanguínea. Em cinza temos os insetos injetados com dsGFP. Em verde temos os insetos injetados com ds*RpCht7*. O experimento foi realizado 9 vezes independentemente.

### 4.5.3. Muda

Outro fenótipo avaliado foi a porcentagem de insetos que chegavam à fase adulta, ou seja, realizavam a ecdise. A ecdise ou muda é o rompimento e liberação do exoesqueleto antigo, um processo de mudança do exoesqueleto que permite o crescimento dos insetos. Na figura 4.21 podemos observar que não há diferença na porcentagem de insetos que mudaram entre o grupo injetado com dsGFP e o grupo injetado com dsRpCht7. Ambos os grupos tiveram uma taxa de ecdise de aproximadamente 60%.

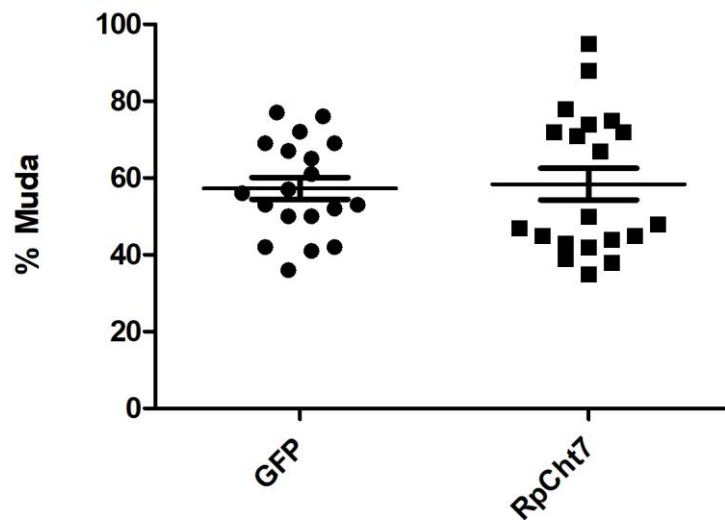


Figura 4.21 – Porcentagem das ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* que realizaram a ecdise se tornando adultos, após injeção com dsRNA e alimentação sanguínea. GFP: Insetos injetados com dsGFP. RpCht7: Insetos injetados com dsRpCht7. O experimento foi realizado 8 vezes independentemente.

#### 4.5.4. Fenótipos da muda

Ao final da ecdise notamos que alguns insetos ficavam presos na exúvia, como na figura 4.22-A e outros morriam durante a muda deformados, como na figura 4.22-B. Decidimos então contabilizar os defeitos na muda e observar se haviam diferenças entre o grupo controle injetado com dsGFP e o experimental injetado com dsRpCht7.

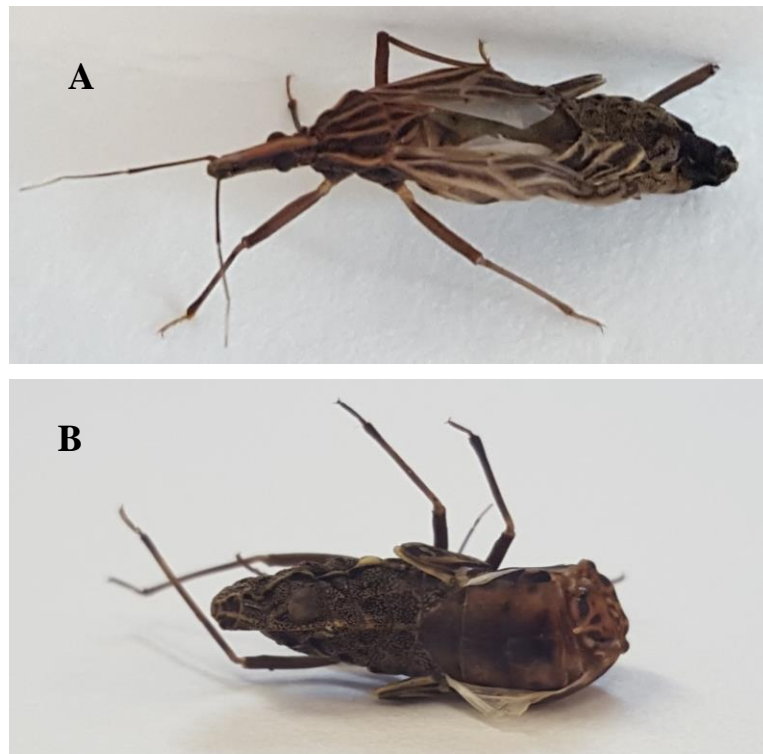


Figura 4.22 – Defeitos na muda de quinto estágio para a forma adulta de *R. prolixus*. A: Inseto preso na exúvia. B: Inseto deformado.

Na figura 4.23 podemos observar que a porcentagem de defeitos na muda no grupo injetado com dsGFP é de aproximadamente 20%, e do grupo injetado com dsRpCht7 é de aproximadamente 25%, logo concluímos que não há diferença significativa entre os grupos controle e experimental, ou seja, o silenciamento do gene RpCht7 não afeta a porcentagem de defeitos na muda.

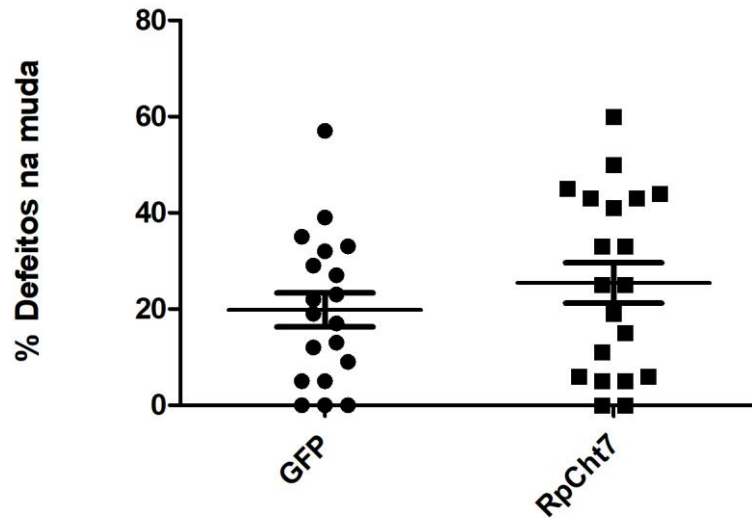


Figura 4.23 – Porcentagem das ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* que apresentaram defeitos durante a ecdise para a fase adulta. GFP: Insetos injetados com dsGFP. RpCht7: Insetos injetados com dsRpCht7. O experimento foi realizado 8 vezes independentemente.

#### 4.5.5. Razão sexual

Outro parâmetro analisado foi a razão sexual nos insetos adultos, para analisarmos se o silenciamento do gene RpCht7 estaria afetando de alguma forma o desenvolvimento ou a muda de machos ou fêmeas especificamente. Na figura 4.24 podemos observar que não há diferença entre os grupos injetados com dsGFP ou dsRpCht7. Temos aproximadamente 45% de fêmeas e 55% de machos em ambos os grupos.

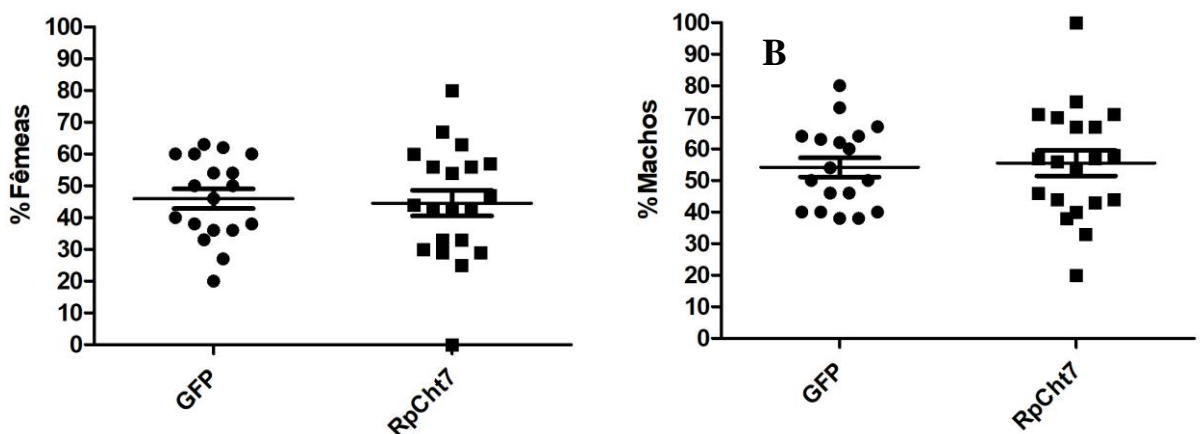


Figura 4.24 – Razão sexual de adultos de *R. prolixus* obtidos após injeção de dsRNA em ninfas de quinto estágio. GFP: Insetos injetados com dsGFP. RpCht7: Insetos injetados com dsRpCht7. A: Porcentagem de fêmeas. B: Porcentagem de machos. O experimento foi realizado 8 vezes independentemente.

#### 4.5.6. Ingestão sanguínea em adultos

O parâmetro de ingestão sanguínea em insetos adultos foi avaliado para termos certeza de que fenótipos observados após o repasto, como a ovoposição, não fossem reflexos de má alimentação. Assim sendo, observamos que não há diferença nesse aspecto entre os insetos injetados com dsGFP ou dsRpCht7 (Figura 4.25).

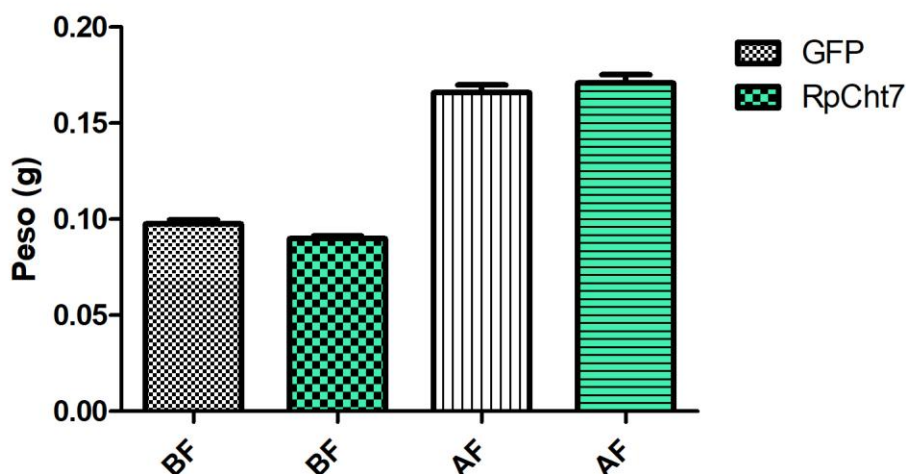


Figura 4.25 – Peso em gramas de insetos adultos de *R. prolixus* após injeção de dsRNA no quinto estágio. BF: Antes da alimentação sanguínea. AF: Após alimentação sanguínea. Em cinza temos os insetos injetados com dsGFP. Em verde temos os insetos injetados com dsRpCht7. O experimento foi realizado 8 vezes independentemente.

#### 4.5.7. Média de ovos por fêmea

O primeiro parâmetro observado no fenótipo de oviposição foi a média de ovos por fêmea. Na figura 4.26 podemos observar uma diminuição significativa ( $p > 0.05$ ) do número de ovos postos por fêmeas injetadas com dsRpCht7, quando comparados com fêmeas injetadas com dsGFP. Enquanto no grupo controle temos uma média de 33 ovos por fêmea, no grupo experimental a média é de 22 ovos por fêmea. Com isso concluímos que o gene RpCht7 afeta a oviposição, causando uma redução dos números de ovos postos.



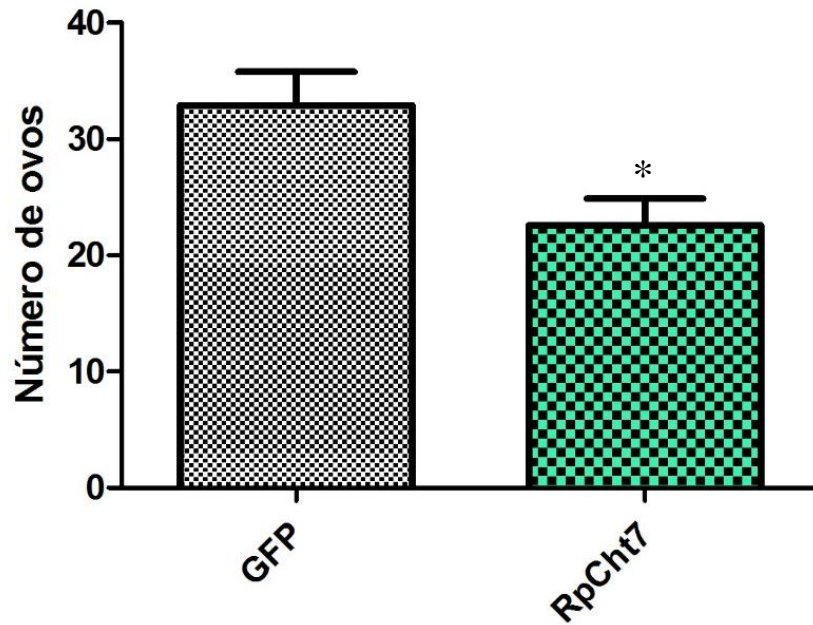


Figura 4.26 – Número de ovos colocados por fêmea de *R. prolixus* após injeção de dsRNA em ninfas de quinto estágio. Em cinza temos os insetos injetados com dsGFP. Em verde temos os insetos injetados com dsRpCht7. O experimento foi realizado 5 vezes independentemente. \*  $p > 0.05$

#### 4.5.8. Média de ovos ao longo dos dias

Verificamos a cinética de oviposição através da observação dos ovos colocados por fêmea ao longo dos dias observados, para analisar se algum dos grupos estaria demorando mais tempo para colocar determinada quantidade de ovos. Na figura 4.27-A com 14 dias as curvas controle e experimental já são bem diferentes, enquanto na figura 4.27-B e 4.27-C podemos observar que com 20 dias as duas curvas estão bem próximas, começando a se diferenciar a partir deste ponto já na figura 4.27-D as curvas divergem a partir de 13 dias.

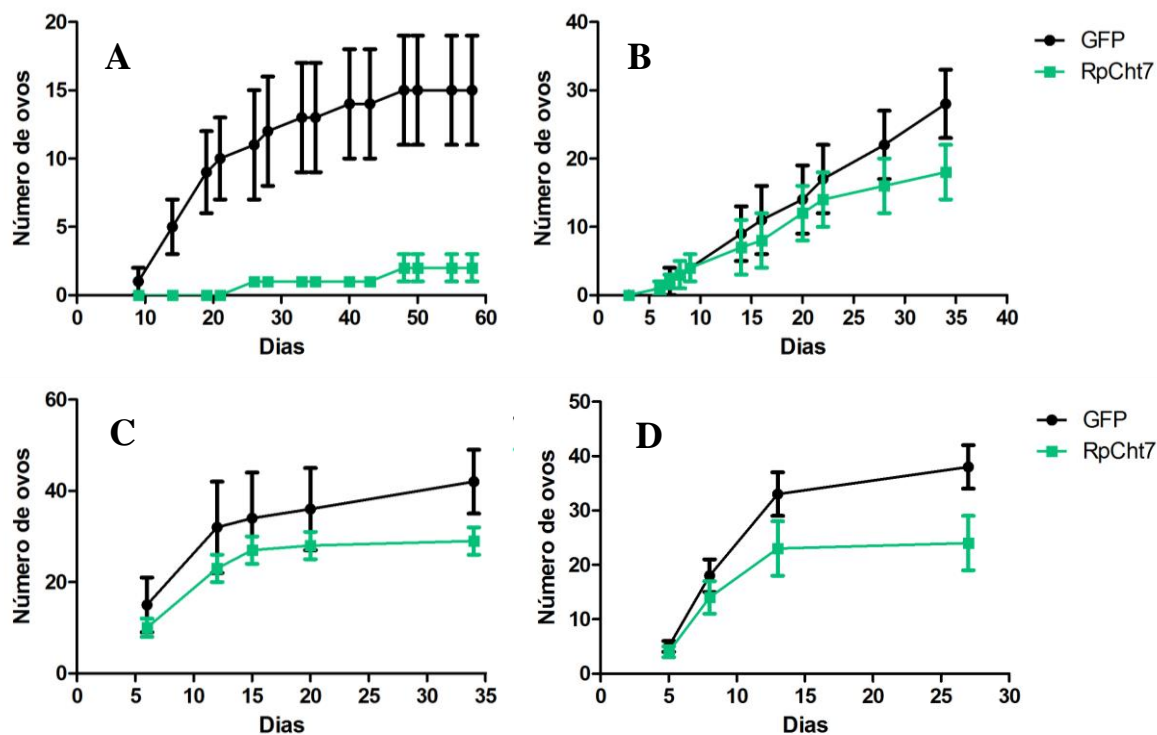


Figura 4.27 – Média de ovos postos por fêmeas de *R. prolixus* ao longo dos dias. Em preto temos os insetos injetados com dsGFP. Em verde temos os insetos injetados com dsRpCht7. A, B, C e D são diferentes réplicas do experimento, em A temos 9 fêmeas GFP e 4 fêmeas RpCht, em B - 16 fêmeas em cada grupo, C - 7 fêmeas GFP e 13 fêmeas RpCht7, D - 12 fêmeas GFP e 13 fêmeas RpCht7.

#### 4.5.9. Porcentagem de eclosão dos ovos

Observamos também o parâmetro de eclosão dos ovos. A partir do total de ovos postos, calculamos a porcentagem de ovos que eclodiram. Na figura 4.28 podemos observar que aproximadamente 54% dos ovos postos pelo grupo controle e 58% dos ovos postos pelo grupo experimental eclodiram. Não há, portanto, diferenças significativas na porcentagem de ovos eclodidos.

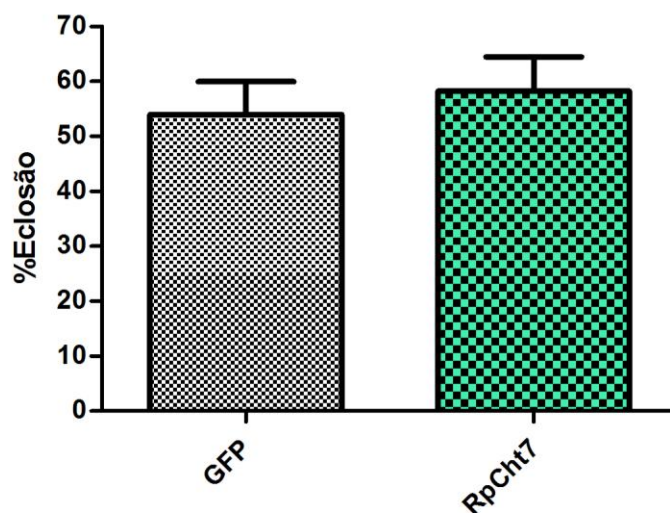


Figura 4.28 – Porcentagem de eclosão dos ovos de *R. prolixus*. Em cinza temos os insetos injetados com dsGFP. Em verde temos os insetos injetados com dsRpCht7. O experimento foi realizado 5 vezes independentemente.

#### 4.5.10. Tempo médio de eclosão dos ovos

Calculamos o tempo médio de eclosão dos ovos de *R. prolixus*, injetados com o dsGFP ou dsRpCht7 e observamos na figura 4.29 que os ovos levam em média 30 dias após a alimentação para eclodirem, em ambos os grupos, controle e experimental. Com isso, inferimos que o gene RpCht7 não influencia no tempo de eclosão dos ovos.

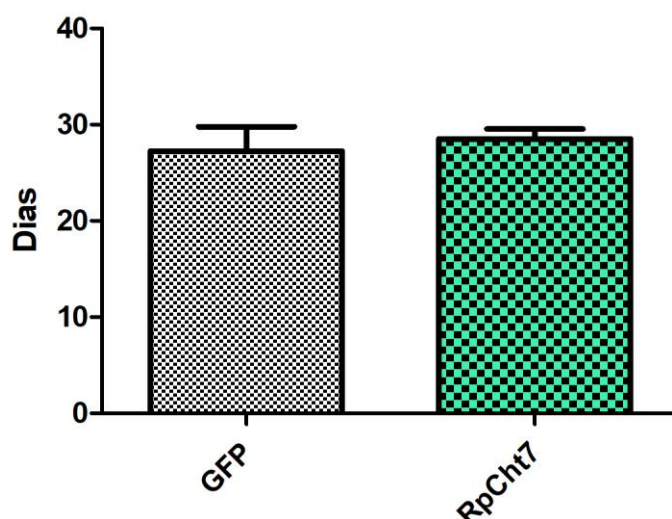


Figura 4.29 – Tempo médio de eclosão dos ovos de *R. prolixus*. Em cinza temos os insetos injetados com dsGFP. Em verde temos os insetos injetados com dsRpCht7. O experimento foi realizado 4 vezes independentemente.

## 5. DISCUSSÃO

Um estudo recente do transcriptoma do trato digestivo de *Rhodnius prolixus* (RIBEIRO J. M. C. ET AL., 2014) identificou 4 genes de quitinases ativos nesse inseto. Estendendo essas observações, nós pudemos confirmar a existência de 9 genes de quitinases da família GH18 preditos no genoma de *R. prolixus* (MESQUITA, R. D. ET AL., 2015). Todas os transcritos encontrados apresentaram altos níveis de similaridade com outras quitinases de insetos, com identidades variando entre 19 e 69% na sequência de aminoácidos da proteína predita. Isso sugere que os genes de quitinase de *R. prolixus* apresentam homólogos em outras espécies de insetos e invertebrados.

Os genes da família GH18 das quitinases possuem uma estrutura modular, compreendendo domínios catalíticos e de ligação de quitina que são unidos por regiões altamente glicosiladas (*linker*). Com base nas semelhanças entre sequências e organização de domínios essas enzimas são classificadas em grupos de I a VIII. Em todos os insetos estudados até o momento observou-se que GH18 é uma família multigênica (ZHANG ET AL., 2011).

O programa Signal IP 3.0 identificou peptídeo sinal em 6 sequências de quitinases de *R. prolixus*, enquanto a versão 4.1 localizou o peptídeo sinal em apenas 4 sequências. Tendo em vista essa discordância resolvemos utilizar mais um programa para essa predição, o Phobius IP, que identifica também domínios transmembrana. O Phobius IP identificou 5 sequências com peptídeo sinal. Analisando os 3 programas em paralelo pudemos observar que as sequências RpCht1, RpCht3, RpCht4 e RpCht8 foram marcadas pelos 3 programas, enquanto a sequência RpCht2 foi marcada apenas pelos programas Signal IP 3.0 e Phobius IP. Já a sequência RpCht7 foi marcada apenas pelo programa Signal IP3.0. Com base nesses resultados decidimos usar o programa Phobius IP, e as sequências de quitinases de *Rhodnius* que consideramos como provavelmente secretadas para o meio extracelular são: RpCht1, RpCht2, RpCht3, RpCht4 e RpCht8.

Corroborando os dados do Phobius IP, observamos na figura 4.12 da árvore filogenética que RpCht1 pertence ao grupo II das quitinases. Outros genes desse grupo também possuem peptídeo sinal, como AgCht10, AaCht10 e TcCht10. RpCht2 pertence ao grupo VI, e outro gene desse grupo que também possui peptídeo sinal é AaCht6. RpCht4 pertence ao grupo IV e as sequências AaCht12 e DmCht12 deste mesmo grupo também possuem peptídeo sinal. RpCht8 pertence ao grupo V assim como AgIDGF2, AaIDGF1 e TcIDGF4, que também possuem peptídeo sinal.

A massa molecular das proteínas preditas para as quitinases de *R. prolixus* estão próximas as massas moleculares observadas nos grupos de quitinases. RpCht6 tem massa de 64kDa e as sequências de outros insetos do mesmo grupo (Grupo I) variam em torno de 60-70 kDa. RpCht1 tem massa de 297kDa e as sequências do mesmo grupo (II) aproximadamente 300 kDa. RpCht9 tem massa de 118kDa, e as quitinases do grupo III tem massas moleculares de aproximadamente 120 kDa. Nos grupos IV e V a massa molecular gira em torno de 50kDa, corroborando os pesos dos genes RpCht4 de 49 kDa e RpCht 8 de 48kDa. A massa molecular de RpCht2 é 138kDa, sendo um pouco menor do que a de os outros membros do grupo (VI), que variam de 200-500 kDa. RpCht5 tem massa de 38kDa, enquanto no seu grupo (VII) as massas variam entre 40-50kDa. RpCht7 tem massa de 50kDa enquanto no grupo VIII as massas variam entre 30-60 kDa.

As quitinases de *R. prolixus* tem uma maior quantidade de O-glicosilações do que de N-glicosilações. Enquanto para N-glicosilações a quantidade varia de 1 a 8, para O-glicosilações varia de 0 a 185, sendo que as sequências que possuem CBD, RpCht1, RpCht2, RpCht6 e RpCht9 são as quem uma maior quantidade de O-glicosilações, 185, 181, 30 e 37 respectivamente. Essas O-glicosilações estão em uma região entre domínios denominada linker, que é um domínio semelhante a mucinas. Esse caráter de mucina confere elasticidade a essa região, sendo ela também responsável pela estabilidade frente a proteases e pelo dobramento correto dessas proteínas.

Em 8 das 9 sequências de quitinases do genoma de *R. prolixus* encontramos os resíduos catalíticos conservados que são responsáveis pela reação de hidrólise da ligação glicosídica e que ficam no sítio ativo da enzima. A única sequência que não apresentou os resíduos catalíticos conservados foi a sequência RpCht8, que é provavelmente um fator de crescimento de disco imaginal (IDGF), com função promotora de crescimento.

Comparando a quantidade de exons das sequências de *R. prolixus* com as sequências de *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* e *Pediculus humanus* de cada um dos grupos da árvore filogenética (figura 4.12), observamos em RpCht1 46 exons, enquanto AaCht10 e AgCht10 possuem 9 exons, enquanto a sequência PhCht4 se aproxima mais com 34 exons. RpCht2 tem 18 exons, mesma quantidade que PhCht5, embora AaCht6 tenha apenas 9 exons. RpCht4 possui 7 exons, enquanto AaCht12 e AgCht12 possuem 5 exons. RpCht5 possui 7 exons, enquanto AaCht2 e AgCht2 possuem 6 e 4 exons respectivamente, entretanto a sequência PhCht3 possui a mesma quantidade de exons que a sequência de *R. prolixus*. RpCht6 possui 9 exons, mesma quantidade que PhCht7, embora AaCht5-1 e AgCht5-1 tenham 6 e 5 exons respectivamente. RpCht7 com 7 exons, PhCht6 com 6 exons, Ag Cht11 com 5 e AaCht11

com 4 exons, variando de 4 a 7 exons nesse grupo. RpCht8 possui 7 exons, enquanto AaIDGF e AgIDGF possuem apenas 3 exons. RpCht9 possui 17 exons, enquanto AaCht7 e AgCht7 possuem 8 exons, entretanto a sequência PhCht2 tem 16 exons. Com base nessas análises, concluímos que o número de exons das sequências de *R. prolixus* se assemelha mais às quantidades observadas em *Pediculus* do que a em *Anopheles* ou *Aedes*.

Com relação aos domínios catalíticos da família GH18, fizemos uma comparação com todas as sequências utilizadas na árvore que se encaixaram em algum grupo das quitinases. Para o gene RpCht1 encontramos 5 domínios catalíticos, o que é coerente com o grupo II ao qual pertence, que possui 4 ou 5 domínios catalíticos. O RpCht9 possui 2 domínios catalíticos, mesma quantidade das demais sequências do grupo III. RpCht4 pertence ao grupo IV que possui 1 ou 2 domínios catalíticos, sendo para a sequência de *Rhodnius* um domínio GH18. RpCht2, RpCht5, RpCht6, RpCht7 e RpCht8 pertencentes aos grupos VI, VII, I, VIII e V respectivamente, possuem um domínio catalítico assim como as demais sequências desses grupos.

As sequências de quitinases RpCht4, RpCht5, RpCht7 e RpCht8 não possuem domínio de ligação a quitina (CBD), assim como as sequências homólogas de *A. gambiae*, *A. aegypti* e *P. humanus*. As sequências RpCht6 e RpCht9 possuem um CBD, mesma quantidade que as outras sequências de seus grupos. Já RpCht2 possui 2 CBDs em um grupo onde as sequências possuem 1 ou 2 CBDs. Do mesmo modo, RpCht1 possui 5 CBDs, em um grupo com variação de 4 a 5 CBDs. Deste modo observamos que a quantidade de CBDs das sequências de *Rhodnius* são compatíveis com a de seus homólogos.

A análise da expressão gênica nos permitiu observar a ausência de uma quitinase exclusiva de ovo. Ainda que RpCht9 seja significativamente mais expressa em ovo que os demais genes, também é altamente expressa nos estádios de ninfa. Exclusivo para as fases de ninfa temos o gene RpCht6 que não é expresso em insetos adultos. Como nos adultos não ocorre a ecdise, esse gene deve estar relacionado com o hormônio ecdisona, responsável pela muda, o que é coerente com o fato de RpCht6 pertencer ao grupo I das quitinases cuja função está associada com a hidrólise da quitina durante a preparação para a muda. É possível que a expressão desse gene seja alterada por compostos do tipo IGR (Insect Growth Regulators), como Azadiractina, Triflubenuron, entre outros (Henriques et al., 2016). Não foi observado nenhuma quitinase exclusiva de adultos machos ou de fêmeas. Entretanto, embora não seja significativo, observamos uma expressão de RpCht1, RpCht5 e RpCht7 maior em machos quando comparado a fêmeas.

Não foi possível ver o predomínio de nenhuma isoforma isolada na maioria dos tecidos de *R. prolixus*. RIBEIRO J. M. ET AL. (2014) encontraram uma expressão significativa no intestino de *R. prolixus* de uma quitinase do grupo V, que corresponde à nossa RpCht8. Mesmo que não tenhamos obtido uma diferença significativa do gene RpCht8 quando comparado com as outras 8 sequências de quitinases, pudemos observar que o gene RpCht8 é um dos genes mais expressos e encontramos diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparamos o gene RpCht8 com os genes menos expressos em cada tecido.

O estudo de quitinase em *Lutzomyia longipalpis* (MORAES C. S. 2014) encontrou diferentes padrões de expressão ao longo dos estádios de desenvolvimento e em diferentes tecidos para alguns genes de quitinase. O gene LIChiti2 pertencente ao grupo VIII das quitinases, cujo papel funcional não está claro, assim como nosso RpCht7 do mesmo grupo, não mostrou diferenças significativas entre os estádios de desenvolvimento ou tecidos, (Figuras suplementares 1 e 2, respectivamente) o que é condizente com os resultados encontrados neste trabalho.

Para confirmarmos a função dos genes de quitinase, optamos por utilizar a técnica de RNA de interferência que tem se mostrado uma importante ferramenta no estudo da função gênica. A técnica de RNAi já foi aplicada em diferentes modelos experimentais como: *Drosophila melanogaster* (BELLES, 2010), *Tribolium sp.* (TOMOYASU ET AL., 2008), *R. prolixus* (ARAUJO ET AL., 2006) dentre outros. Como método de inserção do dsRNA escolhemos a microinjeção que nós permitiu um melhor controle do volume injetado e uma injúria menor, em torno de 0,05 mm de diâmetro, do que uma injeção convencional. Além disso, a eficácia do silenciamento em uma injeção (~75%) costuma ser maior do que em uma ingestão (~42%) (PAIM, R. M. M., 2013).

A eficácia do RNAi depende da capacidade de degradação enzimática de dsRNA na hemolinfa ou no intestino (WANG K. ET AL., 2016). Em *R. prolixus* já foi comprovada a persistência prolongada do efeito do silenciamento e sua transmissão para a próxima geração quando a injeção for em ninfas de quinto estágio (PAIM, R. M. M., 2013).

No silenciamento dos genes de quitinase obtivemos sucesso com os genes RpCht3 e RpCht7 com uma redução na expressão de aproximadamente 80%. Já para o gene RpCht2 não foi possível silencia-lo com o fragmento de dsRNA utilizado, sendo necessário o desenho de novos iniciadores e síntese de dsRNA correspondente a outra região do gene. Com relação aos genes RpCht9 e RpCht8, obtivemos uma redução da expressão de aproximadamente 20 e 15% respectivamente, o que não é suficiente para análise do fenótipo. Para esses genes seria interessante confirmar a porcentagem de silenciamento por qPCR e, caso se mantenha baixa,

redesenhar os iniciadores para o dsRNA como no gene RpCht2. Para os genes RpCht4 e RpCht6 observamos uma superexpressão dos genes 48h após a injeção do dsRNA, de 55% e 69%, respectivamente. É possível que com 24h esses genes tenham sido silenciados, e sofrido algum tipo de regulação em resposta ao silenciamento, resultando na superexpressão em 48h. Um fenômeno semelhante já foi observado em *Caenorhabditis elegans* (YING LIU, 2014).

Nós escolhemos o gene RpCht7 para análise do fenótipo pois já na fase de teste com observação de apenas 48h percebemos uma maior mortalidade neste grupo. Além disso, o gene RpCht7 pertence ao grupo VIII das quitinases, o qual não possui um papel funcional claro descrito na literatura. Até o momento existe apenas um trabalho de silenciamento de quitinase do grupo VIII, do gene NiCht2 no hemiptera *Nilaparvata lugens* (XI, Y. ET AL., 2015), onde não foi possível determinar um papel funcional. NiCht2 é expresso em todas as fases de desenvolvimento com ligeiras alterações, e é principalmente expresso nos órgãos reprodutores femininos em adultos, e sua inibição não altera a morfologia e sobrevivência do inseto.

O primeiro parâmetro de fenótipo avaliado foi a mortalidade em ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* após a injeção com dsRpCht7 e dsGFP, durante 15 dias. Nesse período notamos uma mortalidade cerca de 2 vezes maior nos insetos injetados com dsRpCht7 quando comparados com os insetos controle. O fenótipo de letalidade já foi observado nos lepidópteros *Mythimna separata* para os genes MseCht1 e MseCht2 (BUDAO CAO ET AL., 2017), *Helicoverpa armigera* para o gene HaChi (MAMTA ET AL., 2016) e no orthoptera *Locusta migratoria* para o gene LmCht5-1 (LI, D. ET AL, 2015). Entretanto, esses fenótipos estão relacionados a redução de peso corporal e deformidades no desenvolvimento e muda, respectivamente. Nenhum desses fenótipos foi observado após o silenciamento de RpCht7. Dessa forma, mais estudos são necessários para compreender como a supressão do gene RpCht7 afeta o inseto culminando em sua morte.

A ingestão sanguínea, diurese e digestão foram avaliadas através do peso corporal do inseto e não observamos diferenças entre os pesos dos insetos controle e experimentais. Dessa maneira, podemos concluir que a função do gene RpCht7 não está relacionada com a ingestão sanguínea, diurese e com a digestão de um modo geral. De qualquer maneira, seria interessante realizar a quantificação de carboidratos, proteínas e lipídios do bolo alimentar ao longo do processo da digestão, para ter um retrato mais detalhado dessas funções fisiológicas.

Durante a troca da cutícula das ninfas de quinto estágio para adulto, percebemos que alguns insetos ficavam presos na exúvia e outros ficavam deformados, por isso contabilizamos esses defeitos na muda para saber se a causa deles era o silenciamento do gene



RpCht7. Embora a porcentagem de deformidades seja maior nos insetos tratados com dsRpCht7 (25%) do que com dsGFP (20%), a diferença não é significativa. Além disso, não houve atraso no tempo de ecdise e não foi possível observar diferenças na porcentagem de insetos que mudaram de quinto estágio para adulto. Em ambos os grupos, injetados com dsRpCht7 ou dsGFP, a quantidade de insetos que viraram adultos foi de aproximadamente 60%. Levando em consideração esses três fatores: tempo de ecdise, porcentagem de ecdise e defeitos na muda, deduzimos que a função de RpCht7 não está relacionada com a ecdise em *R. prolixus*.

O parâmetro razão sexual foi avaliado com o propósito de ver diferenças no número de machos e fêmeas, verificando assim se o silenciamento do gene RpCht7 afetava preferencialmente um dos gêneros. Obtivemos 45% de fêmeas e 55% de machos em ambos os grupos, injetados com dsRpCht7 ou dsGFP, logo, inferimos que o gene RpCht7 não afeta a razão sexual.

Observamos a média de ovos colocados por fêmea, para checar se existia diferença entre a quantidade de ovos colocados pelo grupo injetado com dsRpCht7 ou dsGFP. A quantidade de sangue ingerida pelos insetos foi a mesma (Figura 4.25), eliminando assim este fator de ser a causa da diferença no número de ovos. Nosso grupo controle colocou uma média de 33 ovos por fêmea enquanto o experimental apenas 22 ovos por fêmea, uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos, com uma redução de 34% na quantidade de ovos colocados pelos insetos injetados com dsRpCht7. Além disso, observando a cinética de ovoposição (Figura 4.27) notamos que a diferença no número de ovos ocorre a partir de 14~20 dias após a alimentação. Esse mesmo fenótipo de redução na quantidade de ovos postos foi observado no silenciamento da quitinase Bx-chi-7, do nematódeo *Bursaphelenchus xylophilus* (JU, Y. ET AL, 2016), e no silenciamento da quitina sintase RpCHS em *R. prolixus* (MANSUR J. F. ET AL., 2014). A redução no número de ovos postos sugere que a função do gene RpCht7 é importante para ovoposição. Entretanto, sua função não está relacionada com a eclosão dos ovos, uma vez que o tempo médio de eclosão foi de 30 dias para ambos os grupos e não há diferença na porcentagem de eclosão dos ovos.

Mais estudos são necessários para confirmar a função do gene RpCht7 de *R. prolixus*. É importante avaliar em detalhes os efeitos do silenciamento do gene RpCht7 sobre a formação dos ovos, observar se há alguma alteração morfológica utilizando microscopia eletrônica, contabilizar e medir os oócitos, e realizar qPCR e ensaios enzimáticos de quitinase a partir dos ovários para verificar se a atividade do gene RpCht7 é reduzida especificamente nesse tecido. Entretanto, os resultados desse trabalho sugerem que o silenciamento por RNA

de interferência do gene RpCht7 aumenta a mortalidade dos insetos tratados e reduz o número de ovos postos, podendo ter um papel importante na fisiologia reprodutiva e ser um alvo promissor para o controle de insetos que possuam genes homólogos a ele.

## 6. CONCLUSÕES

- O genoma de *R. prolixus* contém 9 genes de quitinase que diferem estruturalmente entre si e possuem diferentes organizações modulares.
- Essas quitinases apresentam diferentes padrões de expressão e possivelmente papéis fisiológicos análogos aos de quitinases de outros insetos.
- Os genes RpCht3 e RpCht7 são passíveis de silenciamento por injeção do dsRNA correspondente.
- O silenciamento do gene RpCht7 aumentou significativamente a taxa de mortalidade das ninfas de quinto estágio em jejum.
- O gene RpCht7 não está diretamente relacionado à ingestão sanguínea, diurese e digestão em ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*, e também não está relacionado com a ecdise, defeitos na muda, razão sexual, ingestão sanguínea em adultos.
- O silenciamento gene RpCht7 reduziu o número de ovos postos por fêmea, mas não afetou a porcentagem ou o tempo de eclosão de ninfas a partir dos ovos postos.

## 7. ANEXOS

Reapresentação dos dados das figuras 4.14 e 4.16 respectivamente, com foco para o padrão de expressão do gene RpCht7 durante o desenvolvimento e em diferentes tecidos do quinto estágio de *Rhodnius prolixus*.

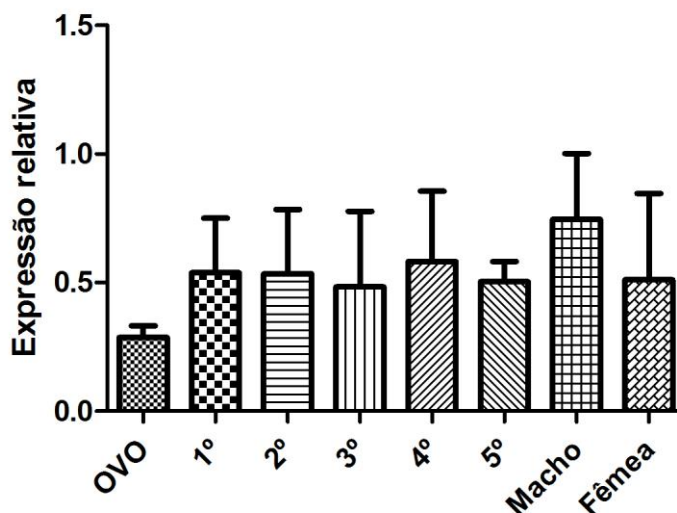


Figura suplementar 7.1. Expressão relativa do gene RpCht7 em diferentes estádios de desenvolvimento em *R. prolixus*, obtidos através do programa ImageJ (por densitometria das bandas). O experimento foi realizado 3 vezes independentemente.

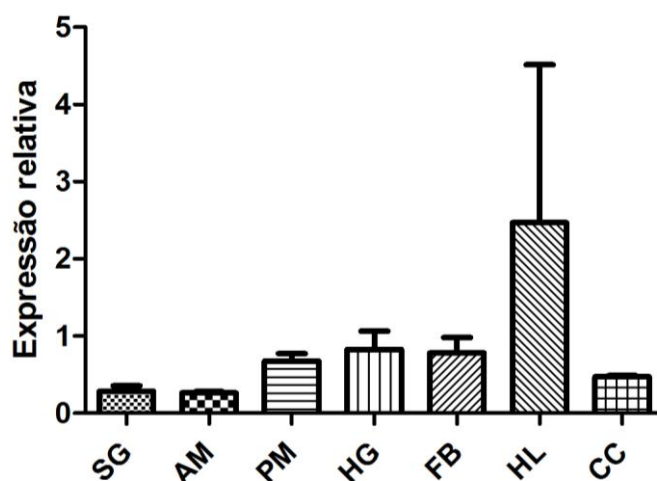


Figura suplementar 7.2. Expressão relativa do gene RpCht7 em diferentes tecidos em ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*, obtidos através do programa ImageJ (por densitometria das bandas). SG: glândulas salivares. AM: intestino médio anterior. PM: intestino médio posterior. HG: intestino posterior. HL: hemolinfa. FB: corpo gorduroso. CC: carcaça. O experimento foi realizado 3 vezes independentemente.

## 8. REFERÊNCIAS

- Arakane Y, Zhu Q, Matsumiya M, Muthukrishnan S, Kramer KJ. 2003. Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 631-648.
- Arakane Y, Muthukrishnan S. 2010. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(2): 201-216.
- Arakane Y, Specht CA, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Beeman RW. 2008. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 959–962.
- Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH. 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: 683–693
- Azambuja PD, Garcia ES, Ribeiro JM. 1981. Effects of ecdysone on the metamorphosis and ecdysis prevention induced by precocene II in *Rhodnius prolixus*. *General and Comparative Endocrinology*. 45(1):100-4.
- Aalten DMFV, Komander D, Synstad B, Gaseidnes S, Peter MG, Eijsink VGH. 2001. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 98. (16): 8979-8984.
- Belles X. 2010. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual review of entomology*. 55: 111-128.
- Bischoff V, Vignal C, Duvic B, Boneca IG, Hoffmann JA, Royet J. 2006. Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathogens*. 2:14.
- Cao B, Bao W, Wuriyangan H. 2017. Silencing of Target Chitinase Genes via Oral Delivery of dsRNA Caused Lethal Phenotypic Effects in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Biochemistry Biotechnology*. 181: 860–866.
- Chagas C. 1909. “Nova Tripanozomíaze Humana.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2: 159–218.

- Coutinho PM, Henrissat B. 1999. Life with no sugars. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 1(2): 307-308.
- Dias JCP, Silveira C, Schofield CJ. 2002. “The Impact of Chagas Disease Control in Latin America: a Review.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(5): 603–12.
- França NR, Júnior DM, Lima AB, Pucci FVC, Andrade LEC, Silva NP. 2010. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Revista brasileira de reumatologia*. 50(6):695-709.
- Faria MV. 2013. Quitinases de *Rhodnius prolixus*: padrão tecidual e temporal da atividade enzimática e caracterização da atividade quitinolítica intestinal. Monografia (Bacharelado em Química, UNIGRANRIO). Rio de Janeiro, 55p.
- Fiocruz. 2011. Portal Doença de Chagas. Acessado em Janeiro de 2011. In: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=22>
- Fjose A, Ellingsen S, Wargelius A, Seo HC. 2001. RNA interference: mechanisms and applications. *Biotechnology Annual Review*. 7: 31-57.
- Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P. 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology*. 53: 11–21.
- Garcia ES, Azambuja P. 1997. Infection of triatomines with *Trypanosoma cruzi*. *Molecular biology of insect disease vectors*. 146-155.
- Garcia ES, Azambuja P. 1991. Development and interactions of *Trypanosorna Cruzi* / within the insect vector. *Parasitology*. 7(9): 240–244.
- Garcia ES, Macarini JD, Garcia ML, Ubatuba FB. 1975. Feeding of *Rhodnius prolixus* in the laboratory. *Anais da academia brasileira de ciências*. 47(3-4):537-45.
- Genta FA, Blanes L, Cristofolletti PT, Lago CL, Terra WR, Ferreira C. 2006. Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut. *Insect biochemistry and molecular biology*. 36:789-800.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.

- Höck J, Meister G. 2008. The Argonaute protein family. *Genome biology*. 9(2):210.
- Hildebrand M. 1995. Análise da estrutura dos vertebrados. 3ªed. São Paulo: Atheneu, 700p.
- Henriques BS, Genta FA, Mello CB, Silva LR, Codogno TF, Oliveira AF, Marinho LP, Valle D, Lima JB, Feder D, Gonzalez MS, Azambuja P. 2016. Triflumuron Effects on the Physiology and Reproduction of *Rhodnius prolixus* Adult Females. *Biomed research international*. 8603140.
- Ju Y, Wang X, Guan T, Peng D, Li H. 2016. Versatile glycoside hydrolase family 18 chitinases for fungi ingestion and reproduction in the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *International journal for parasitology*. 46(12):819-828.
- João Carlos Pinto Dias,. 2016. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e serviços de saúde*. 25: 7-86.
- Khajuria C, Buschman LL, Chen MS, Muthukrishnan S, Zhu KY. 2010. A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40(8):621-629.
- Kramer KJ, Koga D. 1986. Insect Chitin - Physical state, synthesis, degradation and metabolic-regulation. *Insect Biochemistry*. 16: 851-877.
- Konopova B, Jindra M. 2008. Broad-Complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabolite metamorphosis. *Development*. 135: 559–568.
- Li D, Zhang J, Wang Y, Liu X, Ma E, Sun Y, Li S, Zhu KY, Zhang J. 2015. Two chitinase 5 genes from *Locusta migratoria*: molecular characteristics and functional differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 58:46-54.
- Liu Y, Samuel BS, Breen PC, Ruvkun G. 2014. *Caenorhabditis elegans* pathways that surveil and defend mitochondria. *Nature*. 508(7496): 406–410
- Mamta, Reddy KR, Rajam MV. 2016. Targeting chitinase gene of *Helicoverpa armigera* by host-induced RNA interference confers insect resistance in tobacco and tomato. *Plant Molecular Biology*. 90:281–292.
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. 2004. Small Interfering RNA-Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells. *Science*. 305(5688):1289-92.

- Moraes CS, Diaz-Albiter EM, Faria MV, Sant'Anna MRV, Dillon RJ, Genta FA. 2014. Expression pattern of glycoside hydrolase genes in *Lutzomyia longipalpis* reveals key enzymes involved in larval digestion. *Frontiers in Physiology*. 5: 276.
- Meister G, Tuschl T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431:343-9.
- Merzendorfer H, Zimoch L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*. 206(24): 4393- 4412.
- Miller SC, Brown SJ, Tomoyasu Y. 2008. Larval RNAi in *Drosophila*? *Development Genes and Evolution*. 218:505– 510.
- Minakuchi C, Namiki T, Shinoda T. 2009. Kruppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its antimetamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology*. 325: 341–350.
- Mansur JF, Alvarenga ES, Figueira-Mansur J, Franco TA, Ramos IB, Masuda H, Melo AC, Moreira MF. 2014. Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 51:110-21.
- Mesquita RD, et al. 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *PNAS*. 14936–14941 vol. 112 no. 48.
- Nakabachi A, Shigenobu S, Miyagishima S. 2010. Chitinase-like proteins encoded in the genome of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Molecular Biology*. 19(2): 175-85.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Development*. 16:948-58.
- Paim RMM, Araujo RN, Lehane MJ, Gontijo NF, Pereira MH. 2013. Application of RNA interference in triatomine (Hemiptera: Reduviidae) studies. *Insect Science*. 20: 40-52.



- Paim RMM, Araujo RN, Lehane MJ, Gontijo NF, Pereira MH. 2013. Long-term effects and parental RNAi in the blood feeder *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 43: 1015-1020.
- Paim RMM, Pereira MH, Ponzio R, Rodrigues JO, Guarneri AA, Gontijo NF, Araújo RN. 2012. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. *Research Notes*. 5:128.
- PAHO. 2017. Pan American Health Organization. Acessado em Janeiro de 2017. In: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en)
- Petersen CP, Doench JG, Grishok A, Sharp PA. 2005. The biology of short RNAs. In: *The RNA World*, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Pfadt RE. 1978. *Insects and man. Fundamentals of applied entomology*. 3rd ed. Mac-millan 798p.
- Peters TM. 1988. *Insects and human society*. Van Nostrand Reinhold Company Inc. 450p.
- Ricarte Filho JCM, Kimura ET. 2006. MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 50(6):1102-7.
- Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, *et al*. 2005. Purified Argonaute2 and a siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural and Molecular Biology*. 12(4):340-9.
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* . 123(4):621-9.
- Ruppert EE, Barnes RD. 1994. *Invertebrate Zoology*. 6°Ed. Fort Worth: Saunders College Publishing. 1102p.
- Richards OW, Davis RG. 1977. *Imm's General Textbook of Entomology*. 10° Ed. London: Chapman. 1354p.
- Riddiford LM. 1996. Juvenile hormone: the status of its "status quo" action. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 32(3-4):271-86.

- Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW. 2000. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitamins and hormones*. 60:1-73.
- Roignant JY, Carre C, Mugat B, Szymczak D, Lepesant JA, Antoniewski C. 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*. 9: 299–308.
- Ribeiro JM, *et al.* 2014. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS neglected tropical diseases*. 9;8(1):e2594.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 3 vol.
- Seabra-Junior ES, Souza EM, Mesquita RD. 2011. FAT - Functional Analysis Tool. IFRJ, editor. INPI. Brasil.
- Terra WR, Ferreira C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 109B (1): 1-62.
- Timmons L, Court DL, Fire A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 263: 103–112.
- Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G. 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*. 9, R10.
- Tomoyasu Y, Denell RE. 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution*. 214, 575–578.
- Terenius O, *et al.* 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J Insect Physiology*. 57(2):231-45.
- Xi Y, Pan PL, Ye YX, Yu B, Xu HJ, Zhang CX. 2015. Chitinase-like gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*. 24: 29–40.
- Zhang J, Zhang X, Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Ma E, Zhu KY, 2011. Comparative Genomic Analysis of Chitinase and Chitinase-Like Genes in the African Malaria Mosquito (*Anopheles gambiae*). *PLoS One*. 6: e19899.

- Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S. 2008. Characterization of recombinant chitinase-like proteins of *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 38(4): 467-477.
- Wigglesworth VB. 1951. Source of moulting hormone in *Rhodnius*. *Nature*. 168(4274):558.
- Wigglesworth VB. 1933. The physiology of the cuticle and of ecdysis in 9 *Rhodnius prolixus* (Triatomidae, Hemiptera) with special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. *Quarterly journal of microscopical science*. 76: 269– 318.
- WHO. 2017. World Health Organization. Acessado em Março de 2017. In: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Fact sheet 2017.
- Wang K, Peng Y, Pu J, Fu W, Wang J, Han Z. 2016. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation in vivo. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 77:1-9.