

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa De Pós-Graduação Em Parasitologia

Marcela Cristina Raso Mattos

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA PELA
APLICAÇÃO TÓPICA DE RNA DE FITA DUPLA EM *Rhodnius prolixus*
(HEMIPTERA, TRIATOMINAE) UTILIZANDO O GENE DA NITROFORINA 2
SALIVAR**

Belo Horizonte - MG
2023

Marcela Cristina Raso Mattos

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA PELA
APLICAÇÃO TÓPICA DE RNA DE FITA DUPLA EM *Rhodnius prolixus*
(HEMIPTERA, TRIATOMINAE) UTILIZANDO O GENE DA NITROFORINA 2
SALIVAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Dr. Marcos Horácio Pereira

Co-orientador: Dr. Leonardo Barbosa Koerich

Belo Horizonte - MG
2023

043

Mattos, Marcela Cristina Raso.

Padronização da técnica de RNA de interferência pela aplicação tópica de RNA de fita dupla em *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) utilizando o gene da nitroforina 2 salivar [manuscrito] / Marcela Cristina Raso Mattos. – 2023.

70 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Marcos Horácio Pereira. Co-orientador: Dr. Leonardo Barbosa Koerich.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Triatominae. 3. *Rhodnius*. 4. Interferência de RNA. I. Pereira, Marcos Horácio. II. Koerich, Leonardo Barbosa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO 458/2023/13

TÍTULO: "Padronização da técnica de RNA de interferência pela aplicação tópica de RNA de fita dupla em *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) utilizando o gene da nitroforina 2 salivar".

ALUNA: MARCELA CRISTINA RASO MATTOS

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENTOMOLOGIA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **dezoito de agosto de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Rafaela Magalhaes Macedo Paim

UEMG-campus Divinópolis

Ricardo Nascimento Araújo

UFMG

Leonardo Barbosa Koerich - Coorientador

UFMG

Marcos Horácio Pereira - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 18 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Horacio Pereira, Membro**, em 21/08/2023, às 17:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Nascimento Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 22/08/2023, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Barbosa Koerich, Professor do Magistério Superior**, em 24/08/2023, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafaela Magalhães Macedo Paim, Usuária Externa**, em 14/09/2023, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2518355** e o código CRC **3278798B**.

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), Belo Horizonte, Brasil, sob orientação do Dr. Marcos Horácio Pereira e co-orientação do Dr. Leonardo Barbosa Koerich.

Colaboradores:

César Nonato (ICB /UFMG)

Dra. Grasielle Caldas D'Avila Pessoa (ICB /UFMG)

Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna (ICB /UFMG)

Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo (ICB /UFMG)

Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda (ICB /UFMG)

Ma. Daniela Viana dos Santos (ICB /UFMG)

Ma. Lidiane Medeiros da Costa (ICB /UFMG)

Com muito amor, aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todas as pessoas que desempenharam um papel fundamental na conclusão desta dissertação. Seu apoio, carinho e presença foram de extrema importância em cada etapa desse percurso.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus amados pais e irmãos. Vocês são os pilares da minha vida e fontes inesgotáveis de amor e apoio. Agradeço de todo o coração pelo amor incondicional, encorajamento constante e pela crença em mim, mesmo nos momentos mais desafiadores. Sou verdadeiramente abençoada por tê-los ao meu lado, compartilhando essa jornada comigo. Obrigada por serem minha família, meu porto seguro e meu maior motivo de orgulho. À minha afilhada Olivia, você é um raio de luz na minha vida. Sua alegria contagiante e presença constante trouxeram inspiração e motivação em todos os momentos. Obrigada por ser uma fonte de felicidade em minha vida.

Ao meu noivo Matheus, sou imensamente grata por sua compreensão, paciência e encorajamento constantes. Seu apoio e amor incondicional foram essenciais para enfrentar os desafios e alcançar meus objetivos acadêmicos.

Quero estender meus agradecimentos especiais ao meu orientador, Marcos Horácio, e ao meu coorientador, Leonardo. Sua orientação, expertise e dedicação foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Agradeço por compartilharem seu conhecimento e me guiarem ao longo dessa jornada acadêmica. Sou muito grata pela oportunidade de aprender com vocês.

Aos amigos e colegas do Laboratório LFIH, em especial Lidi e Dani, minha gratidão por estar ao meu lado nos experimentos e por todo o suporte oferecido. Agradeço também ao César, além da amizade e conversas enriquecedoras, por sua generosidade em ajudar a todos do laboratório. E aos demais amigos que contribuíram com bom humor, discussões científicas, compartilhamento de experiências e momentos descontraídos, seja durante um cafezinho à tarde ou uma cerveja à noite. Davi, Luccas, Luisa Lara, Luiza Guerra, Nat, Daniel, Carlos, Rafa, Pedro, Mamute, Laurinha, Geisler, Bianca e Letícia cada um de vocês trouxe leveza e diversão para essa jornada. Além disso, gostaria de expressar minha gratidão aos professores, Grasi, Nelder, Maurício e Samyra. Sua experiência e orientação foram inestimáveis ao longo desse processo.

Aos amigos do mestrado, João, Luiz, Carol, Gabi e Aline, agradeço por compartilharmos essa caminhada juntos. Nossas trocas de ideias, apoio mútuo e amizade fortaleceram nossa trajetória acadêmica.

E aos amigos de longa data, Gigi, Leleco, Carlos, Raj, Diel, Mati, Mareu, João e Seba, minha gratidão por estarem ao meu lado em todas as ocasiões. Vocês foram minha base, meu suporte emocional e minha inspiração. Nossa amizade é um tesouro que guardarei para sempre.

A todos vocês, minha profunda gratidão. Seu apoio, amizade, conversas científicas e momentos de descontração foram essenciais para a realização deste sonho acadêmico. Cada um de vocês deixou uma marca indelével em minha vida e levarei todos em meu coração com imenso carinho.

RESUMO

O triatomíneo *Rhodnius prolixus*, um importante vetor do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas na América do Sul e Central, representa um modelo ideal para pesquisas de fisiologia integrativa em vetores de doenças. No entanto, apesar do amplo conhecimento acumulado sobre sua fisiologia e da disponibilidade de seu genoma, ainda existem muitas lacunas no entendimento da função gênica em vários processos biológicos nesses vetores. Para abordar essas questões, optamos por explorar a aplicação tópica de dsRNA como uma estratégia de entrega de RNAi. Essa abordagem foi escolhida devido à sua natureza pouco invasiva, rapidez e baixo custo, embora tenha sido pouco investigada em triatomíneos. O objetivo principal do nosso estudo foi avaliar a eficácia da aplicação tópica de RNAi, utilizando o gene Nitroforina 2 (NP2), em ninfas de *R. prolixus*, bem como compreender seus impactos na expressão gênica e no fenótipo das glândulas salivares desses insetos. Os resultados mais significativos mostraram que a aplicação tópica de RNAi no dorso das ninfas resultou em um silenciamento gênico significativo, com efeitos que se propagaram para os estágios subsequentes de desenvolvimento (transmissão transtadiária). Uma característica notável dessa técnica é sua não invasividade, preservando a integridade dos insetos para futuras investigações em comportamento e fisiologia. Em comparação com a injeção, onde houve uma coloração mais clara nas glândulas salivares dos insetos, as ninfas tratadas com dsRNA por aplicação tópica no estágio anterior exibiram coloração semelhante ao grupo controle. Considerando a significativa redução na expressão de mRNA NP2 obtida com a administração tópica no dorso (95,6 a 71,5%) e a sua transmissão transtadiária, essa metodologia promissora oferece vantagens notáveis para futuros estudos de genômica funcional de proteínas salivares através do RNAi, especialmente em ninfas de tamanho reduzido.

Palavras-chave: Triatominae, *Rhodnius prolixus*, Nitroforinas, RNA de interferência, Aplicação tópica, Transmissão transtadiária, Análise de imagens, Hematofagia

ABSTRACT

The triatomine bug *Rhodnius prolixus*, a significant vector of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease in South and Central America, serves as an ideal model for integrated physiology research in disease vectors. However, despite the extensive knowledge accumulated regarding its physiology and the availability of its genome, there remain numerous gaps in our understanding of gene function in these vectors. To address these questions, we chose to explore the topical application of dsRNA as an RNAi delivery strategy. This approach was selected for its minimally invasive nature, speed, and cost-effectiveness, even though it has been underexplored in triatomines. Our primary objective in this study was to assess the effectiveness of topical RNAi application in *R. prolixus* nymphs and comprehend its impact on gene expression and the phenotype of their salivary glands. The most significant results revealed that topical RNAi application on the dorsal side of the nymphs resulted in significant gene silencing, with effects extending to subsequent developmental stages. A notable feature of this technique is its non-invasiveness, preserving the insects' integrity for future investigations in behavior and physiology. In comparison with injection, where there was lighter staining in the insects' salivary glands, nymphs treated with dsRNA through topical application in the previous stage exhibited similar staining to the control group. Given the substantial reduction in NP2 mRNA expression achieved through topical dorsal application (95.6% to 71.5%) and the effective transmission of the silencing effect to the next stage, this promising methodology presents significant advantages for future research focused on salivary gene silencing through RNAi.

Keywords: Triatominae, *Rhodnius prolixus*, RNA interference, Nitrophenols, Image analysis, Hematophagy

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo de desenvolvimento (paurometábolo) de *Rhodnius prolixus*. A espécie percorre três fases distintas em seu ciclo de vida, incluindo ovo, ninfa (com cinco estádios ninfais) e adultos alados (macho e fêmea). 15
- Figura 2:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura da glândula salivar de um adulto de *Rhodnius prolixus*. Na imagem é possível observar: LP – lóbulo principal; LA - lóbulo acessório; dp - ducto principal; da – ducto acessório. 20
- Figura 3:** Fotografia das glândulas salivares de N5 de *R. prolixus* microinjetadas com dsRNA para NP2 e solução salina (controle). A – par de glândulas salivares de ninfas N5 com 7 dias após a muda, submetidas à microinjeção de solução salina (controle) e B – a dsRNA para Nitroforina 2 (gene alvo), as setas indicam a localização das glândulas salivares com conteúdo de cor vermelho claro. 21
- Figura 4:** Esquema ilustrativo da inserção de um dsRNA em uma célula eucariota. dsRNA representa o RNA de dupla fita; siRNA corresponde aos pequenos RNAs; RISC refere-se ao complexo de proteínas; e mRNA representa o RNA mensageiro alvo. 24
- Figura 5:** Injeção de dsRNA em ninfas de terceiro estádio de *R. prolixus*. (A) Administração de dsRNA utilizando uma agulha fina (13x3, 30 g, 1/2) acoplada a uma seringa Hamilton. (B) Microinjeção de dsRNA através de um microdispensador (diâmetro de aproximadamente 0,05 mm) acoplado a um microinjetor (Nanoinjetor; Drummond). Comparação da agulha (C) e do capilar chanfrado (D) utilizado. 31
- Figura 6:** Alimentador artificial de vidro para insetos. O alimentador é composto por duas câmaras: uma câmara externa (A para B) para circulação de água a 37°C e uma câmara interna onde o sangue artificial contendo dsRNA é injetado. Uma membrana é esticada sobre a parte inferior da câmara interna. O alimentador montado é posicionado no topo de uma caixa telada junto com os insetos. 33
- Figura 7:** Aplicação tópica de dsRNA no ventre de ninfas de segundo estádio e terceiro estádio de *R. prolixus*. Foram tratadas com 1 µl de dsRNA-HhIAP ou dsRNA-RpIAP (2 µg/µl) (dsRNA-LacZ como controle). 34
- Figura 8:** Colônia de triatomíneos mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG. A) Recipientes cilíndricos utilizados para alojar os insetos. B) Cada pote é forrado com papel filtro, possui uma sanfona de cartolina e a tampa é protegida por tecido voal. 38
- Figura 9:** Esquema representativo dos experimentos de introdução de dsRNA. Os experimentos foram divididos em dois grupos principais: Grupo M, no qual o dsRNA foi administrado por microinjeção, e Grupo AT, no qual o dsRNA foi aplicado topicamente. No Grupo AT, duas formas de aplicação foram utilizadas: dorso (AT-D) e ventre (AT-V). O subgrupo AT-D foi subdividido em ninfas recém-eclodidas (AT-D-RE) e ninfas com cinco dias após a eclosão (AT-D-RE-5D). 41
- Figura 10:** Representação ilustrativa da microseringa Hamilton com o aplicador, utilizada para a aplicação tópica de dsRNA nas ninfas de *R. prolixus*. A microseringa é composta por um corpo cilíndrico e um êmbolo ajustável, permitindo a liberação precisa do volume desejado. 42
- Figura 11:** Processo de aplicação tópica de dsRNA em ninfas de *Rhodnius prolixus*. A) Placa de Petri contendo ninfas de *Rhodnius prolixus* que serão submetidas à aplicação tópica no dorso utilizando uma microseringa Hamilton. B) Ninfa de primeiro estádio de *R. prolixus* com o dorso molhado, indicando que acabou de receber a aplicação tópica de dsRNA. 43

Figura 12: Equipamento adaptado para anestesia e aplicação tópica de dsRNA em ninfas de *Rhodnius prolixus*. A) Ilustração do equipamento adaptado para anestesiá-las ninfas de *Rhodnius prolixus*. A seta azul indica a saída do CO₂, utilizado para anestesiá-las ninfas. A caixa foi adaptada a partir de uma caixa de ponteiros de micropipeta, com a presença de um papel filtro na área de posicionamento das ninfas, permitindo a passagem do CO₂. Essa abordagem proporcionou a anestesia controlada das ninfas, facilitando a aplicação tópica de dsRNA. B) Fotografias do equipamento utilizado. É possível observar o processo de imobilização das ninfas e a aplicação tópica no ventre. 44

Figura 13: Fotografia da glândula salivar de uma ninfa de quinto estágio (N5) de *Rhodnius prolixus*. A máscara em amarelo foi aplicada para delimitar a área de análise da glândula salivar. O quadrado amarelo indica a região de fundo selecionada para análise. 47

Figura 14: Análise da coloração da glândula salivar utilizando diferentes canais de cor (RGB). A) canal vermelho, B) canal azul, C) canal verde, D) imagem original. As glândulas estão destacadas com máscaras destacando a região de interesse e uma máscara adicional para indicar o fundo. 47

Figura 16: Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo, mostrando a estabilidade do dsRNA da Nitroforina 2 em presença de acetona em diferentes tempos de exposição. As amostras foram colocadas no gel na seguinte ordem: padrão, 60 min de incubação a temperatura ambiente com água, e com acetona, 30 minutos de incubação com acetona, e 15 minutos de incubação com acetona. O dsRNA da Nitroforina possui um tamanho de 548pb. 50

Figura 17: Expressão relativa de NP2 medida por qPCR após microinjeção de ninfas de terceiro estágio de *R. prolixus*. Foram utilizados 2 pares de glândula de N4 (5 dias pós muda) por pool (total de 5 pools). Foi utilizado o teste t e são considerados $p < 0,05$ como significativo. O primer para o gene constitutivo utilizado foi o beta actina. 51

Figura 18: Efeito do silenciamento na coloração de glândulas salivares em ninfas de 3º estágio de *R. prolixus* tratadas com microinjeção de dsRNA. Glândulas salivares de ninfas de quarto estágio (N4) de *R. prolixus* 7 dias após a muda que foram tratadas quando em terceiro estágio (N3) por injeção com dsRNA-Ker (A) ou dsRNA-NP2 (B). 55

Figura 19: Efeito do silenciamento na coloração de glândulas salivares em ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* tratadas com aplicação tópica de dsRNA. Glândulas salivares de adultos de *R. prolixus* 7 dias após a muda que foram tratadas quando em quinto estágio (N5) por aplicação tópica com dsRNA-Ker (A) ou dsRNA-NP2 (B). 56

Figura 20: Expressão de nitroforinas (NP1, NP2 e NP4) em N5 silenciado por aplicação tópica no dorso com NP2. Gráfico com o resultado da qPCR após aplicação tópica de ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*. Foram utilizados 2 pares de glândula por pool (total de 5 pools). Foi utilizado o teste t e são considerados $p < 0,05$ como significativo. O primer para o gene constitutivo utilizado foi o beta actina. 58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequências dos iniciadores utilizados na PCR convencional (molde para síntese de dsRNA para silenciamento dos genes NP2 e Queratina). 40

Quadro 2: Sequências dos iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR. 48

Quadro 3: Resultados das qPCR do grupo AT-D-RE após muda para N2 de *R. prolixus*. Cada linha da tabela representa um estágio/idade/local da aplicação, o diluente utilizado, a dose de dsRNA aplicada por ninfa, quantos pares de glândula foram utilizados por pool (total de 5 pools por grupo) os valores de porcentagem de expressão do mRNA da NP2 (qPCR) obtidos, e a porcentagem de redução da expressão do mRNA da NP2, bem como o valor de p. Foi utilizado o teste t e foram considerados $p < 0,05$ como significativo. O primer para o gene constitutivo utilizado foi o beta actina. 52

Quadro 4: Resultados das qPCR do grupo AT-D-5D após aplicação tópica no dorso de *R. prolixus*. Cada linha da tabela representa um estágio/idade/local da aplicação, o diluente utilizado, a dose de dsRNA aplicada por ninfa, quantos pares de glândula foram utilizados por pool (total de 5 pools por grupo) os valores de porcentagem de expressão do mRNA da NP2 (qPCR) obtidos, e a porcentagem de redução da expressão do mRNA da NP2, bem como o valor de p. Foi utilizado o teste t e são considerados $p < 0,05$ como significativo. O primer para o gene constitutivo utilizado foi o beta actina, e ** foi o elongation fator 1. 53

Quadro 5: Resultados das qPCR do grupo AT-V após aplicação tópica no dorso de *R. prolixus*. Cada linha da tabela representa um estágio/idade/local da aplicação, o diluente utilizado, a dose de dsRNA aplicada por ninfa, quantos pares de glândula foram utilizados por pool (total de 5 pools por grupo) os valores de porcentagem de expressão do mRNA da NP2 (qPCR) obtidos, e a porcentagem de redução da expressão do mRNA da NP2, bem como o valor de p. Foi utilizado o teste t e são considerados $p < 0,05$ como significativo. O primer para o gene constitutivo utilizado foi o beta actina, e ** foi o elongation fator 1. 53

Quadro 6: Resultados da densidade óptica nos grupos (M e AT). A tabela apresenta os dados relevantes para a análise dos resultados, incluindo os estágios/idades das ninfas, o valor de p obtido na análise de qPCR, bem como as médias de densidade óptica (OD) das imagens obtidas nos dois protocolos de análise de imagens utilizados (“8-bit” e “green”). Foi utilizado teste t para análise estatística no qual $p < 0,05$ é considerado como significativo. Destaque em verde indica análises com diferenças significativas entre controle e tratamento, consistentes com qPCR. Em vermelho, análises com diferenças significativas em que o controle registrou O.D. menor que o tratamento. 57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cDNA	- DNA complementar
dNTP	- Desoxirribonucleotideo trifosfato
dsKer	- dsRNA produzido a partir das sequências do gene inespecífico Queratina
dsNP2	- dsRNA produzido a partir das sequências dos genes da Nitroforina 2
dsRNA	- RNA dupla fita, do inglês “ <i>double strand RNA</i> ”
mRNA	- RNA mensageiro
ICB	- Instituto de Ciências Biológicas
NP1	- Nitroforina 1
NP2	- Nitroforina 2
NP3	- Nitroforina 3
NP4	- Nitroforina 4
NO	- Óxido nítrico
NPs	- Nitroforinas
pb	- Pares de base
PCR	- Reação em cadeia da Polimerase, do inglês “ <i>Polymerase Chain Reation</i> ”
qPCR	- PCR quantitativo (PCR em tempo real)
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNAi	- Técnica de silenciamento do RNA interferente, do inglês “ <i>Interference RNA</i> ”
RNase	- Ribonuclease

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVO	37
A. Objetivo geral.....	37
b. Objetivos específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Material biológico - <i>Rhodnius prolixus</i>	38
4.2 Coleta das glândulas salivares	38
4.3 Técnica de RNA de interferência	39
a. Gene alvo selecionado	39
b. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR	39
c. Síntese de dsRNA	40
4.4 Introdução do RNA de fita dupla (dsRNA) nos insetos	40
a. Microinjeção	41
b. Aplicação tópica	42
4.5 Estabilidade do dsRNA em acetona	44
4.6 Avaliação dos insetos tratados com dsRNA	45
b. Pela coloração das glândulas salivares	45
a. Por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	48
4.7 Análise estatística	48
5. RESULTADOS	50
5.1 Estabilidade do dsRNA em Acetona.....	51
5.2 Avaliação dos insetos tratados com dsRNA.....	51
a. Taxa de mortalidade e aplicabilidade da técnica.....	51
b. Por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	52
i. Aplicação tópica no dorso de ninfas recém eclodidas.....	52
ii. Aplicação tópica no dorso de ninfas com cinco dias após muda	52
iii. Aplicação tópica no ventre de ninfas com cinco dias após muda	53
c. Avaliação do fenótipo das glândulas salivares	57
d. Análise de qPCR das 4 nitroforinas salivares	60
6. DISCUSSÃO	59
7. REFERÊNCIAS	63

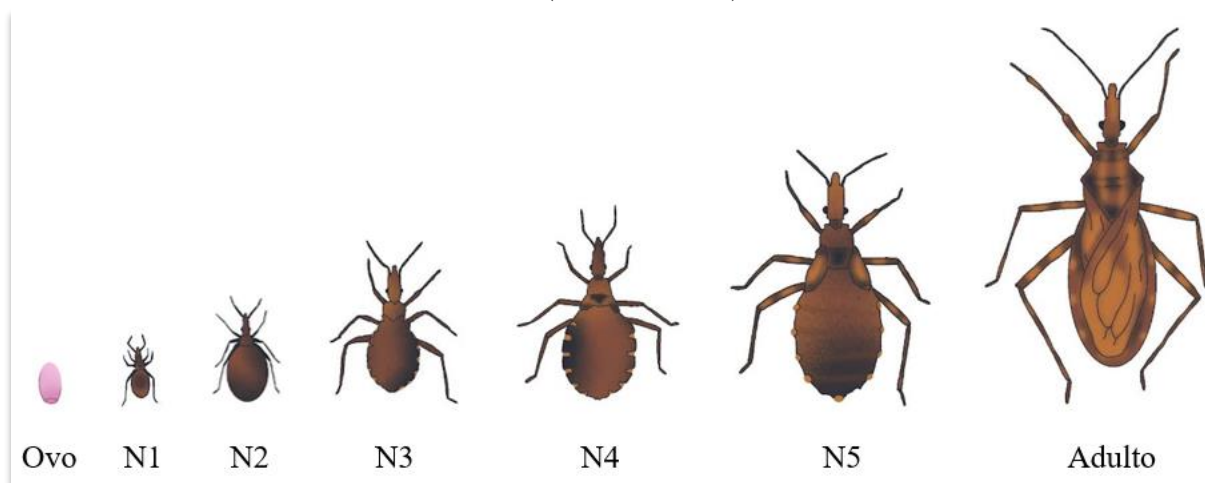
1. INTRODUÇÃO

1.1 Triatomíneos: Aspectos gerais

Os triatomíneos são insetos pertencentes à Ordem Hemiptera, Família Reduviidae, e Subfamília Triatominae (Lent; Wygodzinsky, 1979). A relevância dos triatomíneos é atribuída principalmente ao fato de serem vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Essa parasitose representa um significativo problema de saúde pública de dimensão internacional. Está presente de forma endêmica em 21 países das Américas, afetando aproximadamente 6 milhões de pessoas, com cerca de 70 milhões de indivíduos estimados a viverem em áreas de risco de exposição (OPS/OMS, 2022). Esses casos estão principalmente relacionados à ação antrópica nos ambientes silvestres, que causa a dispersão de muitas espécies de triatomíneos, que passam a habitar associados às moradias humanas (Barreto; Brener; Andrade, 1979).

Apresentam um ciclo biológico paurometábolo, cujo desenvolvimento se inicia com o ovo, seguido por cinco estádios de ninfas e a fase adulta (macho e fêmea) (Figura 1) (Lent; Wygodzinsky, 1979). A hematofagia é um hábito alimentar essencial para os triatomíneos, em que cada estágio de ninfa requer pelo menos uma refeição sanguínea para realizar a muda, enquanto as fêmeas dependem do sangue para a maturação dos ovos e a postura subsequente.

Figura 1: Ciclo de desenvolvimento (paurometábolo) de *Rhodnius prolixus*. A espécie percorre três fases distintas em seu ciclo de vida, incluindo ovo, ninfa (com cinco estádios ninfais) e adultos alados (macho e fêmea).



Fonte: Autoria própria

As ninfas dos triatomíneos, embora semelhantes aos adultos em muitos aspectos, diferem destes em algumas características: não possuem ocelos, asas (exceto *Mepraia spinolai*), tarsos dímeros e genitália externa, além de serem menores em tamanho. No entanto, as ninfas do quinto estágio apresentam um broto alar e os últimos segmentos abdominais são modificados

para formar as genitálias, permitindo a distinção dos sexos: quando observados em posição ventral, os machos possuem o último segmento arredondado, enquanto nas fêmeas ele é menor e alongado.

Dentre aproximadamente 157 espécies de triatomíneos (incluindo três espécies fósseis), todas são consideradas potenciais vetores do *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas (Alevi et al., 2021). Embora o *T. cruzi* seja capaz de se desenvolver em diferentes gêneros de triatomíneos, o *T. rangeli* é encontrado preferencialmente em triatomíneos da tribo Rhodniini (Vallejo; Guhl; Schaub, 2009). Apesar de não ser considerado como patogênico para o homem, indivíduos infectados por *T. rangeli* podem apresentar resultados falsos positivos para a doença de Chagas. Além disso, outra distinção importante entre esses protozoários é que a transmissão vetorial do *T. cruzi* se dá por meio do contato do ser humano com as fezes e urina do inseto vetor infectado, enquanto o *T. rangeli* é transmitido pela saliva durante a alimentação do vetor infectado.

O intervalo entre o final da alimentação e a dejeção varia consideravelmente entre as espécies de triatomíneos e está relacionado a quantidade de sangue ingerido por cada indivíduo (Trumper; Gorla, 1991). Portanto, espécies que defecam mais rapidamente favorecem a transmissão do *T. cruzi*, caso estejam infectadas. O *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Triatominae, Triatomini) e o *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Triatominae, Rhodniini) estão entre os triatomíneos que apresentam a maior taxa de ingestão de sangue mg/min (Sant'anna et al., 2001), e, portanto, tendem a defecar mais rapidamente durante a alimentação. Essas espécies estão presentes principalmente na América do Sul e em alguns países da América Central (Schofield, 1994).

No ambiente natural, o *R. prolixus* está principalmente associado às copas de palmeiras (Schofield, 1994) e também pode ser encontrado em ambientes domésticos. Essa espécie pode ser criada em laboratório sob condições controladas de temperatura (24-26°C) e umidade (70-75% UR) e apresenta um ciclo de vida mais curto em comparação com outras espécies de triatomíneos. O tempo médio de desenvolvimento é de aproximadamente 114 dias para *R. prolixus* (Guarneri et al., 1998).

No caso do *R. prolixus*, os adultos copulam várias vezes ao longo de suas vidas e as fêmeas realizam múltiplas posturas de ovos, sendo que uma única fêmea é capaz de colocar de 100 a 600 ovos durante sua vida. Os ovos geralmente são depositados aderidos a um substrato seco. O período médio de incubação dura cerca de 13 dias e deles emergem ninfas de primeiro estágio (Marconato et al., 2006). Logo após a eclosão ou muda, as ninfas apresentam um

tegumento amolecido com coloração rosada. Após cerca de quatro horas, o exoesqueleto endurece e adquire a coloração característica marrom/preta.

Ao longo dos anos, os triatomíneos têm sido objeto de estudo em relação a suas adaptações à hematofagia, comportamento e busca de hospedeiros, além de aprendizagem e memória (Guarneri; Lorenzo, 2021). Compreender os mecanismos biológicos desses insetos é crucial para entender sobre seu papel como vetor e, assim, desenvolver estratégias eficazes de controle da transmissão do patógeno. Além disso, ao estabelecer conexões entre essas áreas de pesquisa, podemos aprimorar nossa compreensão global dos triatomíneos e da Doença de Chagas, visando a avanços significativos no campo da saúde pública.

Um marco na pesquisa foi alcançado em 2015, quando Mesquita e uma equipe internacional de mais de 110 cientistas sequenciaram o genoma do barbeiro *Rhodnius prolixus*. Isso, somado com a descrição do sialoma e de outros transcriptomas (Ribeiro et al., 2004, 2014), abriu caminho para estudos avançados de genômica funcional desse inseto, proporcionando um entendimento mais profundo das relações evolutivas, das adaptações à hematofagia e das complexas interações entre o vetor-parasita e o vetor-hospedeiro.

Os triatomíneos são conhecidos como insetos noturnos, permanecendo escondidos em locais escuros durante o dia. Os abrigos preferenciais são aqueles com temperatura e umidade relativa favoráveis (Lorenzo; Lazzari, 1999). Nas primeiras horas após o crepúsculo, eles iniciam a exploração do ambiente em busca de vertebrados de sangue quente para se alimentar. No entanto, adquirir acesso a esse recurso não é uma tarefa livre de riscos.

A capacidade dos triatomíneos de detectar e responder a estímulos sensoriais, como odores distintos, vapor de água e calor, desempenha um papel fundamental no seu comportamento de busca pelo hospedeiro (Barrozo et al., 2017). Quando os sinais químicos são detectados à distância, o inseto se posiciona contra as correntes de ar e passa a se movimentar em direção ao hospedeiro. O calor também desempenha um papel importante na localização de um hospedeiro vertebrado de sangue quente. Um exemplo notável é o *T. infestans*, que é capaz de detectar o calor emitido pelo rosto humano a uma distância de aproximadamente 2 metros (Lorenzo et al., 1999). Essa habilidade sensorial é resultado de adaptações evolutivas nos triatomíneos, permitindo-lhes encontrar seus hospedeiros de forma eficiente. A publicação do genoma de *R. prolixus* possibilitou uma exploração mais aprofundada dos aspectos moleculares do comportamento desses insetos.

A troca do exoesqueleto, conhecida como ecdise, é outro aspecto fisiológico de extrema importância no estudo desses insetos. Esse processo de muda torna os insetos triatomíneos valiosos como modelos experimentais. Enquanto a maioria dos estudos sobre esse tema utiliza

insetos holometábolos como modelos, os triatomíneos oferecem uma oportunidade para investigar a ecdise em insetos paurometábolos. Em particular, em *R. prolixus*, já foram descritas diversas moléculas envolvidas no processo de ecdise, como neuropeptídeos e hormônios, por meio da biologia molecular, como RT-qPCR e RNAi (Lee; Orchard; Lange, 2013; Wulff et al., 2017). No entanto, ainda há muitas lacunas no conhecimento da complexa sequência de eventos que ocorrem desde o momento da alimentação até a ocorrência da ecdise.

O exoesqueleto desses insetos desempenha uma função essencial na proteção, mobilidade e prevenção da dessecação em artrópodes. A cutícula é composta por fibrilas de quitina, proteínas, lipídios e ceras, organizados em diversas camadas, como a epicutícula, procutícula e células epiteliais epidérmicas (Andersen, 2010). A investigação da ecdise nesses insetos paurometábolos, em conjunto com a caracterização detalhada da cutícula, possibilita uma exploração abrangente dos aspectos fisiológicos e adaptativos dessas espécies.

Em resumo, os estudos de biologia molecular em triatomíneos, especialmente após o sequenciamento do genoma de *R. prolixus*, têm proporcionado avanços significativos no entendimento da fisiologia desses insetos. Essas descobertas têm permitido uma compreensão mais abrangente das adaptações à hematofagia, comportamento de busca do hospedeiro e processos fisiológicos como a ecdise. A integração de diferentes áreas de pesquisa relacionadas aos triatomíneos e à Doença de Chagas tem potencial para impulsionar estratégias eficazes de controle e prevenção da doença.

1.2 Hematofagia e a importância da saliva: Nitroforinas salivares de *R. prolixus*

A hematofagia apareceu em pelo menos 20 ocasiões distintas no curso da evolução dos artrópodes. Isso promoveu uma série de adaptações fisiológicas independentes, mas funcionalmente convergentes, a fim de resolver problemas comuns relacionados a esse hábito alimentar. Essas adaptações incluem um aparelho de alimentação morfologicamente especializado (Black; Kondratieff, 2005) e uma variedade de biomoléculas salivares (Ribeiro; Francischetti, 2003; Valenzuela, 2004) capazes de permitir a alimentação sanguínea da pele de hospedeiros vertebrados.

Os artrópodes possuem uma saliva rica em moléculas bioativas que desempenham papéis cruciais na interferência da homeostasia, inflamação e imunidade dos hospedeiros vertebrados (Ribeiro; Francischetti, 2003). A saliva de diferentes artrópodes hematófagos contém uma grande quantidade de proteínas bioativas, com estimativas variando de 100 a 200 proteínas para pulgas e a maioria dos nematoceros hematófagos (mosquitos, flebotomíneos e borrachudos), cerca de 250-300 proteínas para moscas tsé-tsé e tabanídeos, mais de 300 proteínas para triatomíneos e mais de 500 proteínas para carrapatos hematofagia (Arcà; Ribeiro,

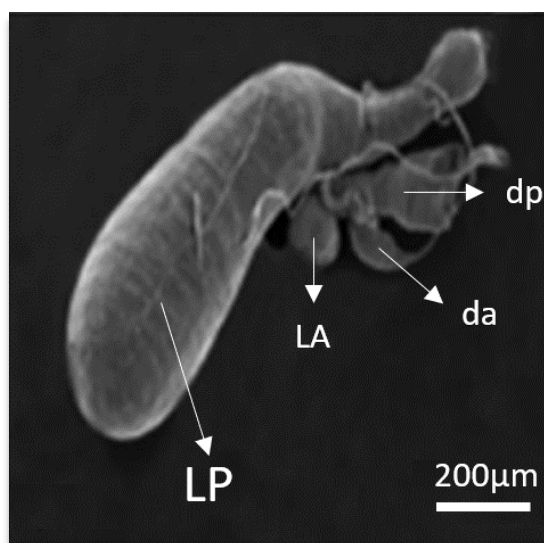
2018; Francischetti, 2009). Essas proteínas têm um papel crucial na adaptação desses artrópodes ao hábito hematofágico, permitindo-lhes obter sucesso na alimentação.

A alimentação dos triatomíneos é de natureza solenofágica, caracterizada pela ingestão do sangue diretamente do vaso sanguíneo do hospedeiro vertebrado, mais especificamente das vênulas e arteríolas (Lavoipierre; Dickerson; Gordon, 1959). Tanto as ninfas quanto os adultos são considerados ectoparasitas temporários, alimentando-se do hospedeiro periodicamente. Para uma alimentação eficiente, o inseto passa por três etapas importantes: a penetração do aparelho bucal na epiderme do hospedeiro, a localização do sangue (fase de sondagem ou *probing*) e o bombeamento do sangue para o trato digestivo (fase de ingurgitamento) (Lavoipierre, 1965).

Essa complexa atividade de hematofagia deve ser realizada de forma imperceptível ao hospedeiro, evitando a ativação dos sofisticados mecanismos de hemostasia do mesmo (Ribeiro; Francischetti, 2003). A irritação local causada pela alimentação do inseto pode ser desagradável ao hospedeiro, levando-o a notar a presença do ectoparasita e interromper seu processo alimentar (Guarneri et al., 2000; Sant'anna et al., 2001). Para contornar esse desafio, os triatomíneos possuem uma ampla variedade de biomoléculas salivares com atividades anti-hemostáticas que facilitam a alimentação. Dessa forma, a saliva auxilia os triatomíneos tanto na ingestão do sangue quanto na evasão do sistema imunológico do hospedeiro (Chapman; De Boer, 1995; Ribeiro; Francischetti, 2003).

R. prolixus possuem um par de glândulas salivares localizadas no tórax. Cada glândula é composta por duas estruturas distintas: uma estrutura maior e com o conteúdo avermelhado (unidade principal) e uma estrutura menor e translúcida (unidade acessória) (Figura 2) (Borella Marfil Anê et al., 2021; Lacombe, 1999; Reis; Meirelles; Soares, 2003).

Figura 2: Imagem de microscopia eletrônica de varredura da glândula salivar de um adulto de *Rhodnius prolixus*. Na imagem é possível observar: LP – lóbulo principal; LA - lóbulo acessório; dp - ducto principal; da – ducto acessório.



Fonte: Modificado de Borella Marfil Anhô et al., 2021

A salivação nos insetos hematófagos ocorre ao longo de todo o processo de alimentação sanguínea (Soares et al., 2006). Em *R. prolixus*, a salivação apresenta dois padrões distintos: durante a fase de sondagem, ocorre uma liberação incessante e abundante de saliva, enquanto na fase de ingurgitamento (durante a sucção do sangue), a saliva é liberada de forma lenta e diretamente nos vasos sanguíneos (Sant’anna et al., 2017; Soares et al., 2006). Durante a sucção, os insetos ingerem tanto o sangue quanto a própria saliva, permitindo que as biomoléculas salivares atuem durante o armazenamento do sangue no intestino do inseto (Ribeiro; Garcia, 1980; Soares et al., 2006).

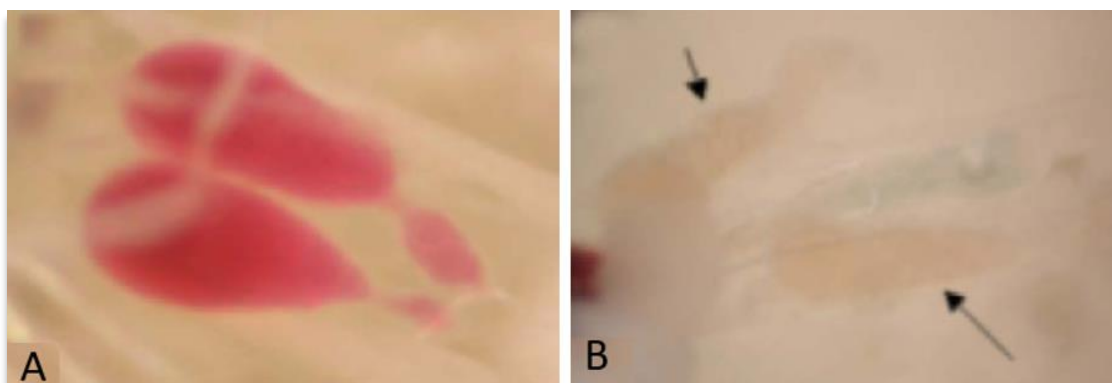
A saliva dos triatomíneos possui uma diversidade de atividades biológicas, incluindo a presença de substâncias anticoagulantes, vasodilatadoras, anti-histamínicas, bloqueadoras de canais de sódio e inibidoras da agregação plaquetária induzida por várias substâncias, como ADP, trombina, serotonina, ácido araquidônico, epinefrina e norepinefrina. Além dessas substâncias, a saliva também contém compostos com atividade imunossupressora, uma sialidase, uma proteína formadora de poros e atividade anti-complemento, todos essenciais para auxiliar o processo de alimentação, reduzindo a resposta imune e inflamatória do hospedeiro vertebrado (Andrade et al., 2005; Ribeiro; Arca, 2009; Ribeiro; Schneider; Guimarães, 1995; Santiago et al., 2020)

Nos triatomíneos e nos carrapatos, a maioria das proteínas salivares secretadas pertence à família das lipocalinas. Estudos mostraram que as lipocalinas têm a capacidade de se ligar a pequenas moléculas, como aminas biogênicas, nucleotídeos e eicosanoides, que são efetores

importantes na hemostasia e inflamação do hospedeiro (Andersen; Ribeiro, 2017). De forma intrigante, notáveis diferenças podem ser observadas nas moléculas expressas pelas glândulas salivares dentro da subfamília dos triatomíneos, especialmente entre as tribos Rhodniini e Triatomini (Ribeiro et al., 1998). Embora as nitroforinas (NPs) sejam as lipocalinas salivares mais abundantes no gênero *Rhodnius*, esta família de lipocalinas não ocorre em espécies da tribo Triatomini (Ribeiro et al., 2012).

As NPs são hemoproteínas responsáveis pela característica coloração vermelha distintiva das glândulas salivares em Rhodniini (Figura 3). Até o momento, sete NPs foram descritas em *R. prolixus*, sendo as NPs 1-4 as mais abundantes na glândula salivar. As NPs salivares de *R. prolixus*, além de apresentarem atividade anticoagulante (apenas a NP2) e anti-histamínicas, liberam óxido nítrico (NO) na pele do hospedeiro, que é um potente vasodilatador e anti-agregante plaquetário (Champagne; Nussenzweig; Ribeiro, 1995).

Figura 3: Fotografia das glândulas salivares de N5 de *R. prolixus* microinjetadas com dsRNA para NP2 e solução salina (controle). A – par de glândulas salivares de ninfas N5 com 7 dias após a muda, submetidas à microinjeção de solução salina (controle) e B – a dsRNA para Nitroforina 2 (gene alvo), as setas indicam a localização das glândulas salivares com conteúdo de cor vermelho claro.



Fonte: Modificada de Araujo et al., 2006

As NPs são capazes de se ligar à histamina com alta afinidade, prevenindo assim o inchaço e a dor, que poderiam desencadear uma resposta defensiva do hospedeiro (Andersen et al., 2005). Outra atividade observada é a potente ação anticoagulante da Nitroforina 2 (NP2), que ocorre por meio da sua ligação ao fator Xa da cascata de coagulação sanguínea (Ribeiro; Schneider; Guimarães, 1995). Nas glândulas salivares de *R. prolixus*, o óxido nítrico realiza uma interação reversível com as nitroforinas. As NPs ligam-se fortemente ao NO em ambientes de baixo pH, característicos do lúmen da glândula salivar ($\text{pH} \leq 6,0$). Contudo, quando a saliva é secretada na pele do hospedeiro, onde o pH é de aproximadamente 7,4, há a liberação do NO pelas NPs (Ribeiro et al., 1993). Após sua liberação no sítio de alimentação do inseto, parte do NO se combina com moléculas do hospedeiro, formando compostos S-nitrosos, como a S-

nitroso-albumina. Essa S-nitroso-albumina, por sua vez, libera gradualmente o NO, resultando em uma vasodilatação de longo prazo na pele do hospedeiro. Essa resposta favorece o repasto sanguíneo do inseto, tornando-se essencial para sua eficaz alimentação hematofágica (Paim et al., 2017).

As NPs são produzidas e posteriormente transferidas para o lúmen da glândula salivar (LGS). Ao mesmo tempo, a óxido nítrico sintase (NOS), uma enzima intracelular, é responsável pela produção do NO, que é exportado para o LGS, onde se liga às NPs (Champagne; Nussenzveig; Ribeiro, 1995). Estudos recentes conduzidos por Paim et al., (2017) sugeriram que a NP2 é produzida constantemente na glândula salivar de *R. prolixus*, acumulando-se no LGS entre os repastos sanguíneos do inseto. Em contraste, a expressão da NOS é alta quando o inseto não está se alimentando, mas diminui drasticamente logo após a alimentação, mantendo-se baixa durante os primeiros dias após a refeição hematofágica.

Um estudo realizado por Moreira et al. (2003) revelou que o perfil de expressão de cada NP é diferenciado durante as fases de desenvolvimento. Nas primeiras fases de desenvolvimento, como as ninfas de primeiro e segundo estágio, as NP5 e NP6 são as mais abundantes, sugerindo sua possível importância nesse estágio inicial. Por outro lado, o quinto estágio e os adultos apresentam uma maior abundância de NP3, NP4 e NP1. A NP2 foi a única que demonstrou estar presente em grande quantidade ao longo de toda a vida do inseto, e acredita-se que isso se deva à sua atividade anticoagulante. Para a caracterização das Nitroforinas, foram conduzidos vários estudos *in vivo* utilizando a técnica de RNA de interferência.

1.3 RNA de interferência

A técnica de RNA de interferência (RNAi) foi inicialmente desenvolvida e demonstrada no nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Guo e Kemphues (1995) conduziram uma série de experimentos nos quais trataram o nematódeo com fitas simples de RNA tanto senso como anti-senso, observando uma diminuição na expressão do gene alvo. Em seguida, Fire e colaboradores (1998) purificaram as fitas de RNA senso, anti-senso e fitas duplas de RNA (dsRNA) e constataram que os dsRNAs eram significativamente mais eficientes (cerca de 10 a 100 vezes) do que as fitas simples de RNA.

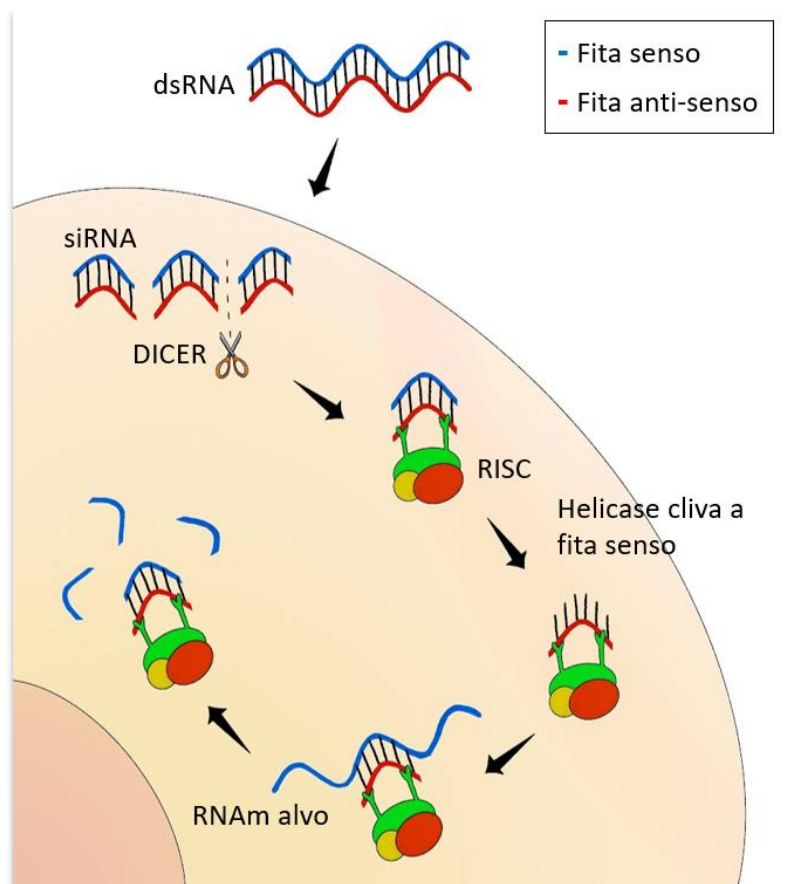
O RNAi é uma técnica que utiliza mecanismos celulares próprios dos eucariotos, altamente conservados na evolução. Acredita-se que esse mecanismo desempenhe um papel importante na proteção contra vírus e retrotransposons invasivos. Para que a maquinaria celular seja ativada, é necessário que um RNA de dupla fita (dsRNA) entre na célula. Estudos realizados em células de *Drosophila melanogaster* demonstraram que o dsRNA era clivado em

sequências mais curtas, chamadas de pequenos RNAs de interferência (siRNAs) (Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000). Em seguida, um complexo de proteínas desencadeia a degradação do RNA mensageiro alvo, utilizando a complementaridade de sequência entre os pequenos RNAs e o alvo (Meister, 2013). Trata-se de um mecanismo altamente específico de interferência a nível pós-transcricional, como resposta à introdução de um RNA exógeno ou endógeno.

Cada uma dessas vias (endógena ou exógena) evoluiu para desempenhar papéis celulares distintos. Por exemplo, a via de RNAi exógena atua na defesa das células contra infecção viral, enquanto as vias endógenas atuam principalmente no controle da expressão gênica (miRNA e siRNA) (Obbard et al., 2009). É possível induzir o silenciamento gênico utilizando material genético exógeno, como: dsRNAs, pequenos RNAs (siRNAs) ou uma fita simples e palindrômica de RNA que forma uma estrutura em grampo (shRNAs). Cada uma dessas vias ativa proteínas distintas no processo de degradação do mRNA alvo.

Dentro da célula, o dsRNA é clivado pela endonuclease Dicer em pequenos fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos, conhecidos como siRNAs (Elbashir; Lendeckel; Tuschl, 2001). Esses siRNAs possuem uma fita senso e uma anti-senso que correspondem ao RNA alvo. Proteínas celulares se associam para formar um complexo chamado RISC (*RNA-induced silencing complex*), que inclui a proteína Argonauta 2 (Ago2) (Paim et al., 2013a). A Ago2 se liga à fita anti-senso do siRNA, e o complexo RISC, junto com uma helicase, abre a dupla fita do siRNA, deixando apenas a fita anti-senso ligada no RISC. Isso permite que ela guie o complexo até o RNA mensageiro alvo complementar (Nykänen; Haley; Zamore, 2001). Ao encontrar o alvo, uma endorribonuclease presente no RISC cliva o mRNA, degradando-o, conforme representado na Figura 4.

Figura 4: Esquema ilustrativo da inserção de um dsRNA em uma célula eucariota. dsRNA representa o RNA de dupla fita; siRNA corresponde aos pequenos RNAs; RISC refere-se ao complexo de proteínas; e mRNA representa o RNA mensageiro alvo.



Fonte: A autoria própria

A técnica de RNAi tem sido amplamente utilizada em estudos funcionais para investigar a função de genes específicos nos triatomíneos, proporcionando uma abordagem poderosa para compreender os mecanismos moleculares subjacentes aos processos biológicos desses insetos. Por meio da supressão gênica, é possível explorar as vias de sinalização, os processos metabólicos e as interações hospedeiro-vetor que desempenham um papel crucial na biologia dos triatomíneos. A técnica de RNAi, combinada com outras abordagens, como o sequenciamento do genoma e transcriptoma, tem impulsionado avanços significativos na compreensão da fisiologia desses insetos e na busca por estratégias de controle de doenças transmitidas por eles.

1.4 RNAi como ferramenta de genômica funcional em insetos

Até o final do século passado, a caracterização funcional de genes em insetos era predominantemente realizada por meio da triagem de fenótipos de interesse provenientes de mutações genéticas aleatórias em *D. melanogaster*. Embora essa abordagem experimental tenha

sido notavelmente bem-sucedida, sua aplicação era limitada a modelos geneticamente transformáveis e com ciclos de geração curtos (Bellés, 2010).

O advento do RNAi revolucionou esse campo do conhecimento, permitindo a investigação de genes em uma ampla variedade de espécies não-modelo de insetos, pertencentes a diferentes ordens, proporcionando uma nova perspectiva sobre a genética funcional (Christiaens; Niu; Nji Tizi Taning, 2020; Fire et al., 1998). Essa técnica desempenha um papel crucial na descoberta das funções de genes recém-descobertos, funções adicionais para genes já conhecidos e identificação dos genes responsáveis por funções previamente estabelecidas. No entanto, o RNAi também apresenta desafios e questões em aberto, como as diferenças de sensibilidade entre as espécies, que representam um dos principais desafios nesse campo (Bellés, 2010).

O RNAi é de extrema importância nos insetos, pois os mecanismos celulares utilizados por essa via desempenham um papel fundamental no sistema imunológico inato desses organismos, oferecendo uma primeira linha de defesa contra infecções virais (Gammon; Mello, 2015). Embora essa via tenha evoluído para lidar com o dsRNA viral nas células, levando ao silenciamento de genes virais cruciais, os pesquisadores têm explorado esse sistema para introduzir dsRNA exógeno visando a reduzir a expressão de genes endógenos específicos das células.

Segundo Bellés (2010), a técnica de RNAi tem desempenhado um papel fundamental na investigação da função gênica *in vivo* em insetos, proporcionando avanços significativos na compreensão da regulação gênica e dos mecanismos moleculares subjacentes aos processos biológicos desses organismos, entre eles, desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, reprodução e vitelogenese, resistência a patógenos e produtos químicos, comportamento, e vias biossintéticas.

De acordo com Huvenne e Smagghe (2010), a eficiência do silenciamento mediado pelo RNAi é influenciada por uma série de fatores. A seguir, destacam-se alguns desses fatores que desempenham um papel crucial na efetividade do processo de silenciamento:

- **Concentração do dsRNA:** é importante determinar a concentração ideal para induzir um silenciamento ótimo, tanto para o gene específico quanto para o organismo-alvo. É importante destacar que exceder essa concentração ideal não necessariamente resulta em um maior silenciamento;
- **Sequência de nucleotídeos escolhida:** a sequência de nucleotídeos utilizada pode ter efeitos fora do RNA alvo no organismo e também ter efeito em outros insetos. Portanto, é crucial escolher uma sequência adequada e específica para o gene alvo;

- **Tamanho do fragmento de dsRNA:** o comprimento do fragmento de dsRNA também desempenha um papel crucial na eficiência de captação e silenciamento nos organismos ou linhagens celulares. É importante determinar o tamanho ideal do fragmento para obter os melhores resultados;
- **Persistência do efeito silenciador:** a persistência do efeito silenciador geralmente está relacionada à taxa de renovação da proteína alvo. Além disso, o estágio de vida do organismo-alvo também influencia a eficiência do silenciamento, sendo que estágios mais jovens tendem a apresentar maiores efeitos de silenciamento em comparação com estágios mais avançados.

Outro fator que influencia a eficiência do RNAi, ou a sensibilidade de um inseto à supressão de genes via tratamento com dsRNA, está relacionado com o **método de entrega do dsRNA**. Por exemplo, enquanto no besouro *Diabrotica virgifera virgifera*, altos níveis de silenciamento são obtidos tanto pela injeção quanto pela alimentação, nos gafanhotos *Locusta migratoria* e *Schistocerca gregária*, tal eficiência é observada apenas após a injeção, mas não na alimentação de dsRNA (Cooper et al., 2019).

Apesar desses desafios, o RNAi continua sendo uma ferramenta indispensável para investigar a função gênica em insetos e tem proporcionado avanços significativos na compreensão da biologia desses organismos.

1.5 Mecanismos de entrega de dsRNA em insetos

Diversas formas de entrega já foram empregadas em insetos, cada uma com suas vantagens e desvantagens. Entre outras, o RNAi pode ser introduzido nos insetos via injeção ou microinjeção, por ingestão ou por aplicação tópica.

a. Entrega de dsRNAs através de injeção

A microinjeção é o método mais comumente usado para a entrega do dsRNA em insetos, sendo amplamente utilizado desde o pioneiro experimento realizado por Kennerdell e Carthew em 1998. Nesse estudo, os pesquisadores conseguiram silenciar os genes *Frizzled* e *Frizzled 2* em *D. melanogaster* por meio da injeção de dsRNA em embriões, demonstrando uma interferência potente e específica em diversos genes testados. Desde então, a microinjeção tem se destacado como uma técnica popular para administrar dsRNA em embriões, formas imaturas e adultos de diversas espécies de insetos.

A microinjeção é amplamente reconhecida como um método altamente eficiente e preciso para a entrega de dsRNA em insetos (Yu et al., 2013). Ao contrário das aplicações tópicas, a microinjeção contorna as barreiras estruturais, como o tegumento, permitindo que os

pesquisadores direcionem o dsRNA diretamente para a hemolinfa (Yu et al., 2013). No entanto, é importante destacar que a microinjeção também apresenta algumas limitações e desafios. O dano causado pela inserção da agulha pode resultar em altas taxas de mortalidade, especialmente em insetos menores, além disso, prejudica a utilização dos insetos em experimentos subsequentes, como aqueles relacionados ao comportamento alimentar, e complicam a interpretação de experimentos devido aos processos fisiológicos desencadeados pelos danos (Paim et al., 2013a). Além disso, a microinjeção é um processo delicado e complexo, exigindo habilidades, treino e um tempo considerável para sua execução.

Fatores como a escolha da agulha (agulha fina ou capilar chanfrado), o volume ideal aplicado e o local da injeção são extremamente importantes e variam significativamente entre os organismos. Dessa forma, é fundamental considerar cuidadosamente esses aspectos para garantir o sucesso da microinjeção e a efetiva supressão do gene de interesse.

Portanto, embora a microinjeção seja amplamente reconhecida como uma abordagem eficiente para a entrega de dsRNA em insetos, é essencial considerar cuidadosamente suas vantagens e desvantagens, adaptando-a adequadamente às características específicas da espécie e/ou estágio evolutivo em estudo e às necessidades experimentais. Uma abordagem personalizada e precisa é fundamental para o sucesso da microinjeção como método de entrega de dsRNA em insetos.

b. Entrega oral de dsRNAs

A entrega de dsRNA através da alimentação é outro método amplamente utilizado, no qual os insetos são alimentados com uma dieta contendo dsRNA sintético ou microorganismos transgênicos que expressam o dsRNA de interesse (Yu et al., 2013). Após o sucesso da aplicação em *C. elegans* (Timmons; Fire, 1998), microorganismos que expressam dsRNAs também foram utilizados para silenciar genes alvo em insetos. Os principais microorganismos empregados são *Escherichia coli* (Tian et al., 2009; Zhu et al., 2011) e *Saccharomyces cerevisiae* (Murphy et al., 2016).

No estudo de 2009, Tian e seus colaboradores alimentaram larvas de *Spodoptera exigua* com “pellets” de dieta artificial contendo bactérias *E. coli* transgênicas que expressavam dsRNAs correspondentes ao gene quitina sintase A (CHSA). As larvas alimentadas com *E. coli* transgênica apresentaram um desenvolvimento alterado, maior taxa de mortalidade em comparação com o grupo controle e redução na expressão do gene alvo. É importante destacar que a quitina sintase são enzimas de extrema importância para o desenvolvimento da cutícula, traqueia e intestino médio e elas são separadas em duas classes de genes, CHSA (expressos especificamente em células ectodérmicas, incluindo células epidérmicas e traqueais) e a CHSB

(estão restritos às células epiteliais do intestino que produzem a matriz peritrófica do intestino médio). Dessa forma, o gene alvo utilizado no experimento não está presente no intestino médio e sim na cutícula e nas traqueias do inseto.

Além disso, os dsRNAs também podem ser sintetizados *in vitro* e adicionados aos alimentos para entrega oral aos insetos. Em 2009, Whyard, Singh e Wong desenvolveram dsRNAs de entrega oral que tinham o objetivo de matar seletivamente espécies-alvo. As soluções de dsRNA foram dissolvidas em alimento artificial líquido ou aplicadas na superfície de alimentos sólidos para esses insetos. Eles testaram diferentes espécies de insetos, como besouros-das-farinhas (*T. castaneum*), pulgões (*Acyrtosiphon pisum*) e lagartas-do-fumo (*Manduca sexta*). A ingestão de dsRNA direcionado ao gene alvo resultou em mortalidade de 50% a 75% para os três insetos. Estudos também demonstraram o uso de plantas transgênicas modificadas para expressar dsRNAs visando a genes de insetos, a fim de aumentar a resistência a insetos herbívoros (Baum et al., 2007; Mao et al., 2011).

A entrega oral de dsRNA em insetos oferece várias vantagens. É uma opção mais econômica, menos invasiva em comparação com a microinjeção e de fácil execução. Pode ser aplicada em um grande número amostral e tem potencial para ser utilizada em estudos de campo. Além disso, pode ser facilmente aplicada em insetos de menor tamanho. No entanto, apresenta algumas limitações, como menor efeito de redução do RNA mensageiro quando comparada à microinjeção, sendo menos eficaz (Araujo et al., 2006; Hunter, 1999) ou até mesmo ineficaz (Rajagopal et al., 2002) em alguns insetos. O ambiente intestinal dos insetos pode ser hostil para o dsRNA, pois possui enzimas digestivas, matriz peritrófica e sistema imunológico, que podem atuar como obstáculos ou/e degradar o dsRNA antes que ele alcance as células-alvo e silencie os genes desejados. Outra limitação da entrega oral de dsRNA é a impossibilidade de controlar a quantidade exata de dsRNA que cada inseto do grupo irá consumir, o que pode comprometer significativamente a eficiência do silenciamento obtido.

c. Entrega de dsRNAs através da aplicação tópica

A aplicação tópica do dsRNA em insetos tem sido pouco documentada na literatura em comparação com a ingestão e a microinjeção. Isso se deve à presença do exoesqueleto quitinoso, uma substância rígida e impermeável, que atua como uma proteção física para o corpo dos insetos, conferindo-lhes resistência mecânica e protegendo-os contra ameaças ambientais. No entanto, essa característica também pode dificultar a permeabilização do dsRNA nas células-alvo, tornando o processo de entrega mais desafiador. Apesar dessas barreiras, a aplicação tópica tem ganhado interesse como uma alternativa promissora para a entrega de dsRNA em

insetos devido à sua simplicidade e capacidade de contornar algumas das limitações associadas a outros métodos de entrega.

Wang e colaboradores (2011) demonstraram que é possível realizar o silenciamento por meio da aplicação tópica em fases do desenvolvimento em que o exoesqueleto da mariposa *Ostrinia furnalalis* está mais fragilizado. Nesse estudo, os pesquisadores utilizaram um micropulverizador para pulverizar diretamente dsRNA nas larvas recém-eclodidas. Em seguida, a mortalidade foi monitorada ao longo de 5 dias. Os resultados mostraram alta mortalidade nas larvas e esse efeito foi correlacionado com a regulação negativa da expressão do gene alvo, conforme verificado por qPCR.

Outros estudos também demonstraram a redução da expressão gênica em insetos tratados com dsRNA pela aplicação tópica em espécies mais próximas dos triatomíneos, como o pulgão *Diaphorina citri* (El-Shesheny et al., 2013; Killiny et al., 2014) e três espécies de afídeos: *Acyrtosiphon pisum* (pulgão-da-ervilha), *Aphis citricidus* (pulgão cítrico marrom) e *Myzus persicae* (pulgão-do-pessegueiro) (Niu et al., 2019).

No estudo conduzido por El-Shesheny et al. (2013), ninfas de quinto estágio de *D. citri* foram utilizadas como modelo, tendo como alvo o gene anormal do disco da asa (*awd*). A aplicação do dsRNA foi realizada por meio de uma micropipeta, dispensando uma gota sobre a parte ventral do tórax dos insetos, e como controle foi utilizado água e dsRNA para GFP (Proteína fluorescente verde). A análise dos resultados revelou uma redução na expressão gênica nos adultos provenientes das ninfas tratadas com 10, 1 e 0,1 µg/inseto de dsRNA em comparação com o grupo controle. Os adultos que apresentaram o fenótipo de má formação das asas exibiram uma redução ainda maior na expressão gênica em comparação com os indivíduos adultos normais. A ausência do fenótipo em todos os adultos tratados sugere que níveis mais elevados de silenciamento são necessários para afetar o desenvolvimento do fenótipo de asa malformada.

Em 2014, Killiny e colaboradores conduziram um estudo demonstrando o silenciamento do gene pertencente à família 4 do citocromo P450 (CYP4), que pode resultar em resistência a inseticidas quando superexpresso. Os pesquisadores optaram por silenciar os adultos de *D. citri* algumas horas após a eclosão. Para a aplicação do dsRNA, os insetos foram anestesiados com CO₂ e uma gota contendo 10, 15 ou 20 ng de dsRNA foi administrada no lado ventral do tórax utilizando uma microseringa Hamilton (10µl). Os resultados foram analisados por meio de qPCR e Western Blot, revelando uma redução na expressão gênica nas três dosagens, sendo que a dosagem de 20 ng por inseto apresentou a maior redução, enquanto a dosagem de 10 ng por inseto apresentou a menor redução. Além disso, após o silenciamento, os autores

conduziram testes de susceptibilidade ao pesticida Imidacloprid utilizando a dosagem LD50 e observaram que os insetos silenciados foram mais suscetíveis em comparação com o grupo controle.

Niu e colaboradores (2019) também demonstraram a redução da expressão gênica utilizando a técnica de aplicação tópica, conforme mencionado anteriormente. Os pesquisadores utilizaram três espécies de afídeos: *Ac. pisum*, *Ap. citricidus* e *M. persicae*. Foram selecionados seis genes alvos, além de um gene utilizado como indicador da eficiência do RNAi (Aphunchback). Os pulgões adultos (com idades entre 3 e 5 dias) foram fixados com uma fita dupla face levemente aderente, e o dsRNA foi aplicado no lado dorsal do abdômen e esperavam a gota secar completamente. Diferentes doses foram testadas, e com exceção de 6 ng, todas as doses (60 a 1800 ng) resultaram em silenciamento significativo dos genes. A concentração de 540 ng foi considerada ideal para investigar a eficiência do RNAi ao longo do tempo.

No entanto, alguns estudos mostraram que a aplicação tópica não foi efetiva em determinados insetos. Basnet e Kamble (2018) realizaram a técnica em *Cimex lectularius* e compararam com a microinjeção. Utilizaram ninfas de quinto estágio e aplicaram 1 µg de dsRNA diluído em acetona (3:1) no abdômen para aumentar a absorção do dsRNA pela cutícula do inseto (Pridgeon et al., 2008). Os insetos foram submetidos a um processo de congelamento a -20°C por 5 minutos, com o objetivo de reduzir sua atividade e anestesiá-los. Os percevejos que receberam dsRNA por microinjeção apresentaram diferenças fisiológicas e redução na expressão do gene alvo em comparação com o grupo controle, enquanto aqueles que receberam aplicação tópica não apresentaram silenciamento.

A aplicação tópica do dsRNA é uma outra forma de entrega que é pouco invasiva e pode ser realizada em um maior número amostral. Quando comparada com a ingestão, ela permite padronizar a quantidade de dsRNA aplicada em todos os insetos do grupo. No entanto, a quantidade de dsRNA que consegue atravessar o tegumento do inseto não pode ser quantificada, tornando difícil determinar a eficiência da entrega. A cutícula do inseto também representa um desafio para a passagem do dsRNA.

Os resultados acima sugerem que, além das funções já mencionadas, o RNAi pode contribuir para o estudo dos mecanismos de ação de inseticidas conhecidos e abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de novos inseticidas. O próprio RNAi pode ser considerado uma ferramenta para o controle de insetos por meio do direcionamento de genes vitais, embora sistemas eficientes de formulação e entrega de dsRNA precisem ser desenvolvidos.

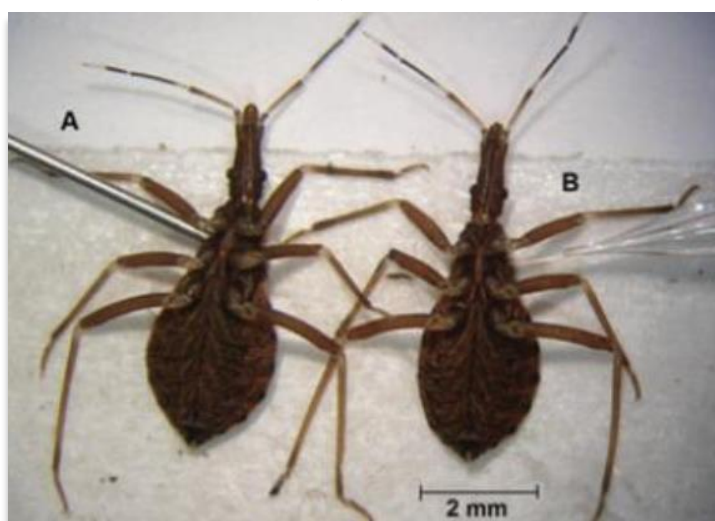
Em resumo, a escolha do método de entrega do dsRNA em insetos depende do objetivo do experimento, das características do inseto-alvo e das vantagens e desvantagens de cada técnica. É importante considerar a eficiência, a invasividade, a padronização e a viabilidade em aplicar em um grande número amostral ao selecionar o método mais adequado para a entrega do dsRNA.

1.6 Aplicação da técnica de RNAi em triatomíneos

A técnica de RNAi foi inicialmente padronizada em triatomíneos por Araujo e colaboradores (2006) em *R. prolixus*, onde observaram a redução dos níveis de mRNA da Nitroforina 2 (NP2), uma proteína presente na saliva do inseto, após o tratamento com dsRNA. Desde então, essa técnica tem sido amplamente utilizada como ferramenta principal para o estudo da função gênica em triatomíneos, destacando-se o intestino (Araujo et al., 2007; Paim et al., 2011) e a glândula salivar (Araujo et al., 2009; Paim et al., 2013a).

A microinjeção tem sido a forma de entrega de dsRNA que alcançou, até o momento, a maior redução da expressão gênica em *R. prolixus* (Figura 5). Em um estudo realizado por Araujo e colaboradores (2009), os pesquisadores conseguiram avaliar o papel das Nitroforinas 1-4 (NP1-4) durante a alimentação de ninfas de quarto estágio de *R. prolixus* no dorso de um camundongo, utilizando a técnica de dsRNA por microinjeção. Os resultados demonstraram que as Nitroforinas desempenham um papel importante na alimentação dos insetos, principalmente por suas funções anti-hemostáticas, e alcançaram 82% de redução das NPs em comparação com o grupo controle.

Figura 5: Injeção de dsRNA em ninfas de terceiro estágio de *R. prolixus*. (A) Administração de dsRNA utilizando uma agulha fina (13x3, 30 g, 1/2) acoplada a uma seringa Hamilton. (B) Microinjeção de dsRNA através de um microdispensador (diâmetro de aproximadamente 0,05 mm) acoplado a um microinjetor (Nanoinjetor; Drummond). Comparação da agulha (C) e do capilar chanfrado (D) utilizado.

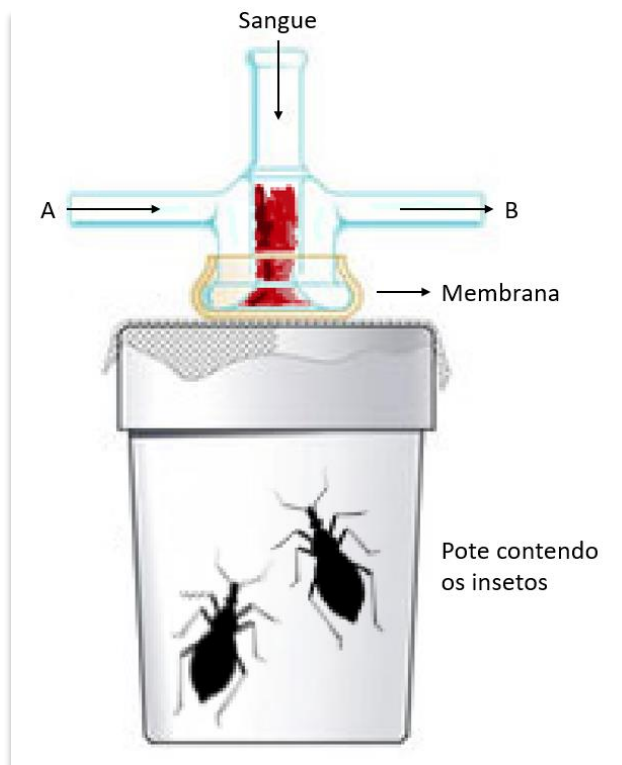


Fonte: Modificado de Rafaela M. M. Paim, 2013a

Em (Paim et al., 2013b) colaboradores realizaram o silenciamento das Nitroforinas 1-4 utilizando dsRNA e a técnica de microinjeção e mostraram que o silenciamento persistiu por mais de 7 meses após a aplicação. Ao injetar o dsRNA em ninfas de quinto estágio, os efeitos do RNAi foram transmitidos até o segundo estágio das ninfas da geração F1. Dessa forma, a introdução do RNAi por microinjeção foi demonstrada como um método sistêmico, robusto e de longa duração em *R. prolixus*, sendo uma das formas mais eficientes de alcançar o silenciamento no inseto. No entanto, é importante mencionar que a microinjeção pode resultar em alta mortalidade devido aos danos causados pela introdução da agulha/capilar no inseto, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento ou em insetos menores (Paim et al., 2013a).

Por outro lado, a introdução do dsRNA por meio da ingestão, embora seja mais prática e permita uma aplicação em um maior número amostral, não tem demonstrado uma taxa de eficiência tão alta quanto a microinjeção em triatomíneos. Essa técnica envolve a incorporação do dsRNA produzido *in vitro* em uma solução e a entrega dessa solução para o inseto se alimentar por meio de um alimentador artificial (Figura 6). Araujo et al. (2006) demonstraram que aplicar duas injeções de 15 µg de dsRNA de NP2 em ninfas de quarto estágio de *R. prolixus* resultou em uma redução da expressão gênica de 75%, enquanto a ingestão de duas vezes 80 µg de dsRNA de NP2 por insetos do mesmo estágio não apresentou redução significativa. Entretanto, em ninfas de segundo estágio que ingeriram cerca de 13 µg de dsRNA houve redução da expressão gênica de 42%. Alguns estudos sugerem que essa baixa eficiência do silenciamento por ingestão de dsRNA pode estar relacionada à sua degradação no ambiente intestinal, antes que ele consiga penetrar nas células e ativar a maquinaria de RNAi (Wang et al., 2016).

Figura 6: Alimentador artificial de vidro para insetos. O alimentador é composto por duas câmaras: uma câmara externa (A para B) para circulação de água a 37°C e uma câmara interna onde o sangue artificial contendo dsRNA é injetado. Uma membrana é esticada sobre a parte inferior da câmara interna. O alimentador montado é posicionado no topo de uma caixa telada junto com os insetos.



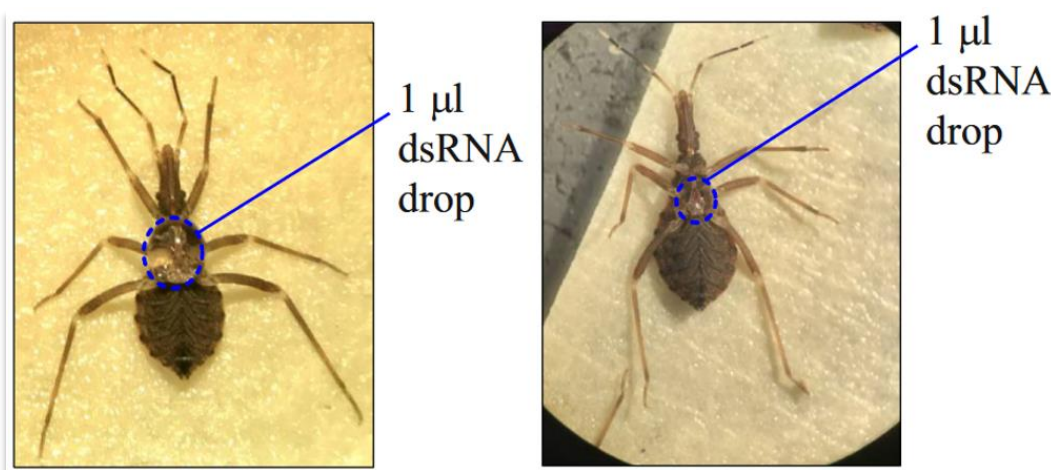
Fonte: A autoria própria

Outra abordagem de ingestão poderia ser a paratrangênese, na qual os insetos se alimentam de uma dieta enriquecida com bactérias, simbiontes naturais da microbiota dos triatomíneos, que foram geneticamente modificadas para expressar o dsRNA-alvo. Taracena et al. (2015) alimentaram ninfas e adultos de *R. prolixus* com bactérias (*Escherichia coli* ou seu simbionte natural *Rhodococcus rhodnii*) geneticamente modificadas para expressar o dsRNA-alvo e obtiveram um silenciamento gênico eficiente. No entanto, essa forma de entrega do dsRNA não resultou em um silenciamento persistente, como normalmente é observado após a injeção do dsRNA nos insetos.

O estudo realizado por (Finetti et al., 2023) teve como objetivo encontrar uma ferramenta de controle para o percevejo asiático *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae), testando a aplicação tópica de dsRNA em três genes alvo constitutivos. Para avaliar os riscos de silenciamento em organismos não alvo, eles utilizaram o *R. prolixus* como um modelo. Em *H. halys*, a aplicação tópica foi realizada em ninfas de segundo estágio, dois dias após a ecdise, utilizando diferentes doses de dsRNA. A gota de dsRNA foi aplicada no abdômen das ninfas e, após permitir que a solução de dsRNA secasse completamente, os insetos

foram transferidos para uma placa de Petri. Já em *R. prolixus*, foram utilizadas ninfas de segundo e terceiro estágio, com a aplicação de 1 μ l contendo 2 μ g de dsRNA por inseto, usando uma micropipeta (Figura 7). A gota de dsRNA foi colocada na parte ventral do tórax e as ninfas foram realocadas após a gota secar completamente. O gene alvo escolhido foi o 7-B-like contendo repetição IAP (RpIAP e HhIAP). Esse gene foi selecionado como alvo pois seu silenciamento induziu mortalidade tanto em ninfas quanto em adultos de *H. halys*, sua principal função é como regulador apoptótico e desempenha papéis cruciais na apoptose, na proliferação celular e no controle do ciclo celular. Ele foi selecionado com base no dsRNA que apresentou a maior redução na expressão em *H. halys* (-20%) e causou maior taxa de mortalidade. No entanto, em *R. prolixus*, não foi observado silenciamento gênico (avaliado por qPCR) nem aumento na taxa de mortalidade.

Figura 7: Aplicação tópica de dsRNA no ventre de ninfas de segundo estágio e terceiro estágio de *R. prolixus*. Foram tratadas com 1 μ l de dsRNA-HhIAP ou dsRNA-RpIAP (2 μ g/ μ l) (dsRNA-LacZ como controle).



Fonte: Modificada de Finetti et al., 2023

Por fim, a aplicação tópica como método de entrega de dsRNA tem se mostrado promissora e viável em insetos vivos, conforme demonstrado em outros estudos. Embora a utilização dessa técnica em *R. prolixus* tenha sido menos explorada, podemos inferir que a aplicação tópica do dsRNA é um método fácil e viável em outros insetos vivos, comprovando sua capacidade de penetrar no tegumento e desencadear os mecanismos de RNAi. Portanto, são necessários estudos adicionais para padronizar e avaliar a eficiência da aplicação tópica em diferentes organismos, incluindo o *R. prolixus*.

2. JUSTIFICATIVA

A grande quantidade de informações acumuladas sobre a fisiologia de *Rhodnius prolixus*, iniciada de maneira consistente com os clássicos trabalhos de Vincent Brian Wigglesworth no século passado, somada à recente disponibilização do seu genoma, torna o grupo dos triatomíneos um modelo de escolha para estudos de fisiologia integrativa em vetores de doenças na era pós-genômica. A técnica do RNA interferente (RNAi) tem se destacado nos estudos de genômica funcional em organismos não modelos devido à sua simplicidade, rapidez, custo relativamente baixo e facilidade de aplicação em organismos vivos (Bellés, 2010).

Nos triatomíneos, o RNAi tem sido aplicado em diferentes estudos, sobretudo em aspectos da sua fisiologia, comportamento e interação com parasitas. Nesses vetores, já foi demonstrado que o silenciamento pode ser sistêmico, de longa duração e seu efeito transmitido entre os estádios de desenvolvimento (transestadial) e para a sua prole (parental) (Paim et al., 2013b).

Diversas formas de entrega de dsRNA têm sido utilizadas para obter o silenciamento gênico em triatomíneos, cada uma com suas vantagens e desvantagens. A técnica mais estabelecida é a entrega diretamente na hemolinfa do inseto por microinjeção, que possibilita o controle da dose aplicada e, até o presente momento, é a forma de entrega que tem obtido os melhores resultados na redução da expressão do gene alvo. No entanto, a aplicação por microinjeção requer um cuidadoso manejo do inseto, fixação adequada para facilitar a penetração da agulha, causa um dano no exoesqueleto do inseto podendo afetar experimentos posteriores e exige treinamento prévio para correta aplicação. Portanto, embora eficiente, é uma técnica demorada e difícil de ser realizada, principalmente em ninfas menores, podendo gerar alta mortalidade devido à sua natureza invasiva. A técnica de ingestão, na qual o dsRNA é administrado ao inseto junto com a dieta em alimentador artificial, é menos invasiva e pode ser aplicada em muitos indivíduos simultaneamente. O controle da dose de dsRNA ingerida por cada inseto é menos preciso, mas pode ser estimado considerando a concentração de dsRNA na dieta e o ganho de peso do inseto. No entanto, o silenciamento induzido por ingestão é menos eficiente e de curta duração em relação ao obtido com a microinjeção (Araujo et al., 2006).

Por outro lado, a técnica de aplicação tópica é pouco invasiva, mais econômica em comparação com a ingestão e, por levar menos tempo para a sua execução, teoricamente, pode aumentar o número de insetos tratados por unidade de tempo. Em afídeos (Niu et al., 2019) e em pulgão (El-Shesheny et al., 2013; Killiny et al., 2014), essa técnica tem sido empregada com sucesso. No entanto, no único experimento até hoje realizado utilizando essa técnica em *R. prolixus*, Finetti et al. (2023) não obtiveram sucesso em reduzir a expressão do gene alvo após

o tratamento com dsRNA por aplicação tópica no ventre (tórax) de ninfas N2 e N3. Por outro lado, resultados preliminares do nosso grupo sugerem que é possível reduzir a expressão do gene da proteína de choque térmico 70 (HSP70) por aplicação tópica de dsRNA específico diluído em acetona (1:1 V/V) no dorso dos insetos. Assim, dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a aplicabilidade de silenciar (RNAi) por aplicação tópica de dsRNA para estudos de genômica funcional de genes salivares de *Rhodnius prolixus*.

3. OBJETIVO

A. Objetivo geral

Avaliar a técnica de aplicação tópica como método de entrega de dsRNA na redução de expressão do gene da nitroforina 2 (NP2) e no fenótipo da glândula salivar em ninfas de *Rhodnius prolixus*.

B. Objetivos específicos

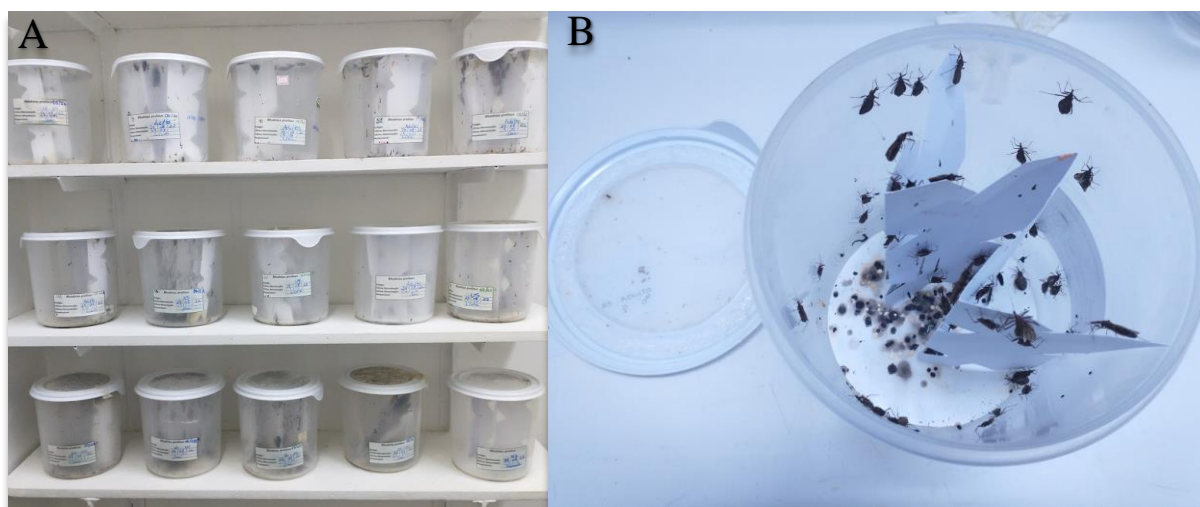
1. Investigar a estabilidade do dsRNA em acetona para avaliar sua viabilidade como diluente para experimentos futuros.
2. Investigar os efeitos da aplicação tópica no dorso do dsRNA diluído em água pura e acetona (1:1) nas ninfas de primeiro estágio recém eclodidas de *R. prolixus*.
3. Determinar a efetividade da aplicação tópica no dorso com água pura e acetona (1:1) em ninfas (N1-N5) de *R. prolixus*.
4. Determinar a efetividade da aplicação tópica no ventre com água pura e acetona (1:1) em ninfas (N1-N5) de *R. prolixus*.
5. Avaliar o fenótipo da glândula salivar de *R. prolixus* tratados com dsRNA de NP2 por aplicação tópica e por injeção.
6. Investigar a ocorrência de silenciamento inespecífico em outras nitroforinas salivares para avaliar seu impacto na regulação genética.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico - *Rhodnius prolixus*

A colônia de *R. prolixus* (procedência Honduras) do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG foi mantida em condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR e 12 horas claro/escuro). Para a acomodação dos insetos, foram utilizados potes cilíndricos de acrílico (15 cm de diâmetro e 19 cm de altura) forrados com papel filtro, contendo uma sanfona de cartolina para aumentar a superfície interna dos recipientes (Figura 9). As tampas dos potes foram revestidas com tecido voal. A alimentação dos triatomíneos foi realizada semanalmente, utilizando hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) anestesiados com solução de tiopental sódico (Thiopentax® Cristália- Brasil), em conformidade com as diretrizes do Conselho de Ética no Uso de Animais da UFMG (protocolo do CEUA: 16/2017 - 05/2022 a 05/2024).

Figura 8: Colônia de triatomíneos mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG. A) Recipientes cilíndricos utilizados para alojar os insetos. B) Cada pote é forrado com papel filtro, possui uma sanfona de cartolina e a tampa é protegida por tecido voal.



Fonte: Autoria própria

4.2 Coleta das glândulas salivares

Para a coleta das glândulas salivares, os triatomíneos foram dissecados sob uma lupa estereoscópica na presença de solução salina 0,9%. Utilizou-se pinças para a manipulação dos insetos. No grupo teste, que recebeu o tratamento com dsRNA para Nitroforina 2, e no grupo controle correspondente, foram tiradas fotografias das amostras utilizando uma câmera (Canon EOS 600D) acoplada à lupa estereoscópica e posteriormente analisadas através do software Fiji Image J versão 1.53t. Para a extração de RNA, foram coletados pares de glândulas que foram imediatamente colocadas em Trizol e armazenadas em freezer a -20°C para a posterior extração.

4.3 Técnica de RNA de Interferência

a. Gene alvo selecionado

Neste estudo, o gene Nitroforina 2 (Nº de acesso: U70582.1) de *R. prolixus* foi selecionado como alvo para investigar o mecanismo de RNAi nesses insetos. Esse gene é responsável pela codificação de uma proteína com função previamente caracterizada, cujo silenciamento já foi demonstrado por meio da técnica de RNAi. Além disso, já foi demonstrado que a supressão dessa proteína resulta em um fenótipo bem definido, como a alteração da cor do conteúdo da glândula salivar de vermelho cereja para transparente ou mais clara, sem causar impactos significativos na integridade física e sobrevivência dos insetos silenciados. Como controle inespecífico, utilizaremos o gene da Queratina (Nº de acesso: NM_027574), conforme descrito por Paim et al., (2011), nos ensaios de silenciamento pós-transcricional por RNAi.

b. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR

A produção de dsRNA foi realizada utilizando glândulas salivares de ninfas de quinto estágio, que foram extraídas em "pools" contendo dez pares de glândulas. Para a extração de RNA dos grupos experimentais, foram utilizados pools de glândulas que variam de acordo com a fase de vida dos insetos: dois a cinco pares para N2, três a quatro pares para N3, três a quatro pares para N4, dois a três pares para N5 e um a dois para adultos. A extração do RNA total foi realizada a partir da retirada das glândulas salivares das ninfas, utilizando o reagente Trizol e seguindo as instruções do fabricante.

Após a extração do RNA total, este foi eluído em 20 µL de água Milli-Q livre de RNase. Em seguida, o RNA foi tratado com DNase (Turbo DNase-free-Ambion) e sua concentração foi quantificada a 260 nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® (ThermoScientific). Foi utilizado 1 µg de RNA para a síntese de cDNA, utilizando 1 µg de hexâmeros randômicos (Promega) e a enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega), em um volume final de 40 µL. A reação de síntese foi realizada em um termociclador (Veriti 96 - Well Thermal Cycler, Life Technologies) com as seguintes etapas: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min, seguido de armazenamento a -20°C.

O cDNA sintetizado foi direcionado para uma das duas aplicações: PCR convencional ou qPCR (PCR quantitativa). Para a produção de dsRNA, foi realizada a PCR convencional utilizando iniciadores projetados com a adição do promotor T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA 3') na extremidade 5' para possibilitar a síntese do RNA fita dupla. Esses iniciadores específicos (Quadro 1) para os genes alvo (Nitroforina 2 e Queratina) foram utilizados nas reações de PCR, que foram realizadas em 35 ciclos, com as

seguintes condições de temperatura: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 45 s. Cada reação conteve 2 µL do cDNA, 200 nM de cada iniciador, 200 µM de dNTPs e 1 U de Taq polimerase (Phoneutria), em um volume final de 20 µL. Após a amplificação dos genes alvo por PCR convencional, os produtos obtidos foram analisados em géis de agarose a 1,5% corados com Brometo de etídeo. Em seguida, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e as imagens foram capturadas para análise posterior. Posteriormente, esses produtos foram utilizados para a produção de dsRNA (Paim, 2014).

Nos grupos experimentais, o cDNA foi utilizado na reação de qPCR. Nesse caso, foram utilizados iniciadores específicos e o cDNA foi amplificado em tempo real, permitindo a quantificação do RNA-alvo.

Quadro 1: Sequências dos iniciadores utilizados na PCR convencional (molde para síntese de dsRNA para silenciamento dos genes NP2 e Queratina).

Gene alvo	Iniciadores F: 5' → 3'	Iniciadores R: 5' → 3'	Amplicon (pb)
Nitroforina 2	T7 + GCCGTGACCATTCTCTGTCT	T7 + TCACGGCGCTTTTAACTTTT	548 pb
Queratina	T7 + GGGGTCTCCTCTCTGGAAAC	T7 + TTAGCAGCCGTGGAAGAGA	275 pb

Nota: pb – pares de base

c. Síntese de dsRNA

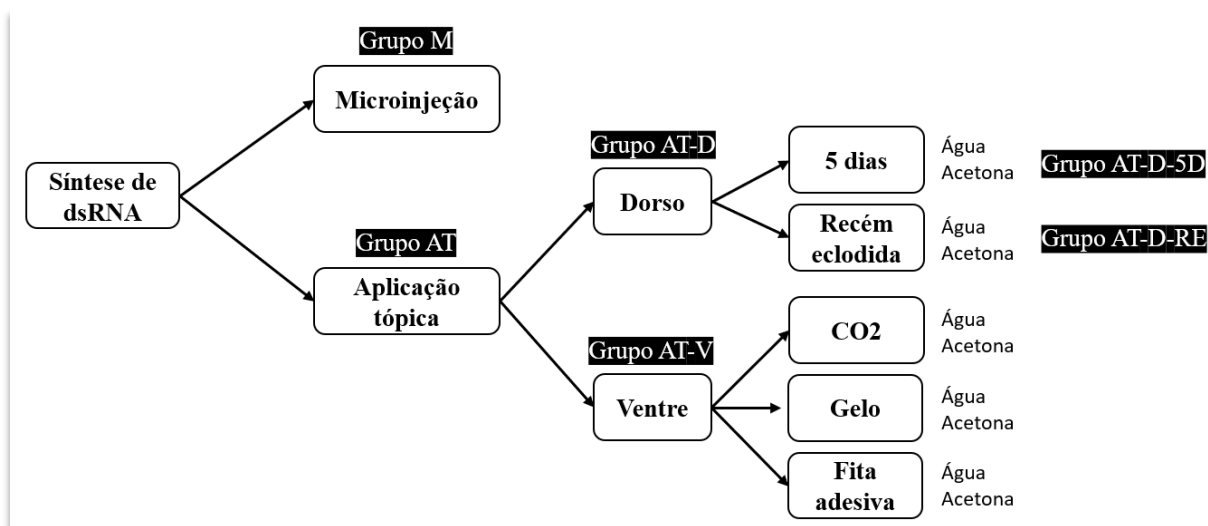
Os produtos de PCR, contendo o promotor T7, correspondentes à Nitroforina 2 e Queratina foram utilizados como molde para a síntese de RNA fita dupla (dsRNA) utilizando-se o Kit MegaScript T7 (Ambion), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a síntese, o dsRNA foi precipitado com isopropanol, ressuspendido em água Milli-Q e quantificado utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® (ThermoScientific). Para ajustar a concentração para 5 µg/µL, o dsRNA pode ser seco em uma centrífuga evaporadora e, em seguida, redissolvido em água DEPC. A qualidade do dsRNA foi avaliada através de um gel de agarose a 1,5%. Para verificação da integridade do dsRNA produzido, garantindo que ele estava livre de degradação e adequado para o uso nas análises subsequentes. A solução resultante foi armazenada a -20°C até o momento de sua utilização (Paim, 2014).

4.4 Introdução do RNA de fita dupla (dsRNA) nos insetos

Os experimentos de introdução do dsRNA seguiram o esquema representado na Figura 9 e foram organizados em dois grupos principais: o "grupo M," que recebeu o dsRNA por meio de microinjeção, e o "grupo AT," que recebeu o dsRNA por aplicação tópica. Dentro do "grupo AT," as aplicações foram realizadas de duas maneiras distintas: no dorso (AT-D) e no ventre

(AT-V). O subgrupo AT-D foi ainda subdividido em duas categorias: ninfas recém-eclodidas (AT-D-RE) e ninfas com cinco dias após a eclosão (AT-D-RE-5D).

Figura 9: Esquema representativo dos experimentos de introdução de dsRNA. Os experimentos foram divididos em dois grupos principais: Grupo M, no qual o dsRNA foi administrado por microinjeção, e Grupo AT, no qual o dsRNA foi aplicado topicamente. No Grupo AT, duas formas de aplicação foram utilizadas: dorso (AT-D) e ventre (AT-V). O subgrupo AT-D foi subdividido em ninfas recém-eclodidas (AT-D-RE) e ninfas com cinco dias após a eclosão (AT-D-RE-5D).



Fonte: Autoria própria

a. Microinjeção

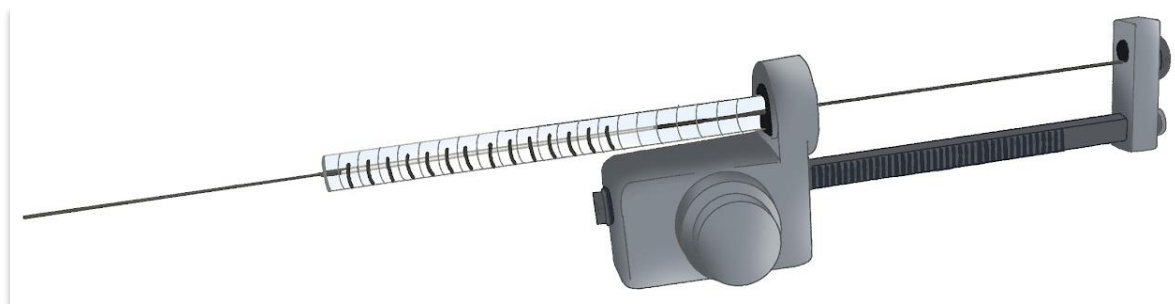
Nos insetos do grupo M, o dsRNA foi administrado por meio de uma única injeção na lateral do tórax dos insetos, entre o primeiro e o segundo par de pernas, diretamente na hemocele das ninfas de terceiro estágio, com 6 a 10 dias de jejum após a muda. Utilizamos um microinjetor (Nanoinjector, Drummond) para auxiliar na injeção. Os insetos foram divididos em dois grupos: controle (injetados com dsRNA-Ker) e teste (injetados com dsRNA-NP2). Em ambos os grupos, cada inseto recebeu 1 µg de dsRNA diluído em solução salina 0,9%.

Para confirmar o silenciamento dos genes alvos, avaliamos o fenótipo das glândulas por meio de, além de realizar quantificação de expressão do mRNA por qPCR. A avaliação do silenciamento foi realizada 5 dias após a muda, quando os insetos alcançaram o quarto estágio.

b. Aplicação tópica

A metodologia da aplicação tópica (Grupo AT) foi dividida em dois tratamentos: no dorso (AT-D) e no ventre (AT-V) dos insetos. Para aplicação do dsRNA, foi utilizada uma microseringa Hamilton acoplada a um dispensador (Figura 10). Foram utilizadas seringas de 10 μl , 25 μl e 50 μl , variando de acordo com o tamanho da ninfa. O dispensador libera um volume equivalente a 1/50 do valor da seringa. Portanto, a seringa de 10 μl liberava 0,2 μl em cada ninfa e assim por diante. A quantidade de líquido aplicada em cada ninfa foi determinada com base no método de Vassena (2000), utilizado para testar o efeito de inseticidas por aplicação tópica. Dessa forma, foi estabelecido um protocolo padrão para a aplicação de dsRNA, no qual foram administrados 0,2 μl em N1, 0,4 μl em N2, 0,5 μl em N3, 1 μl em N4 e 2 μl em N5.

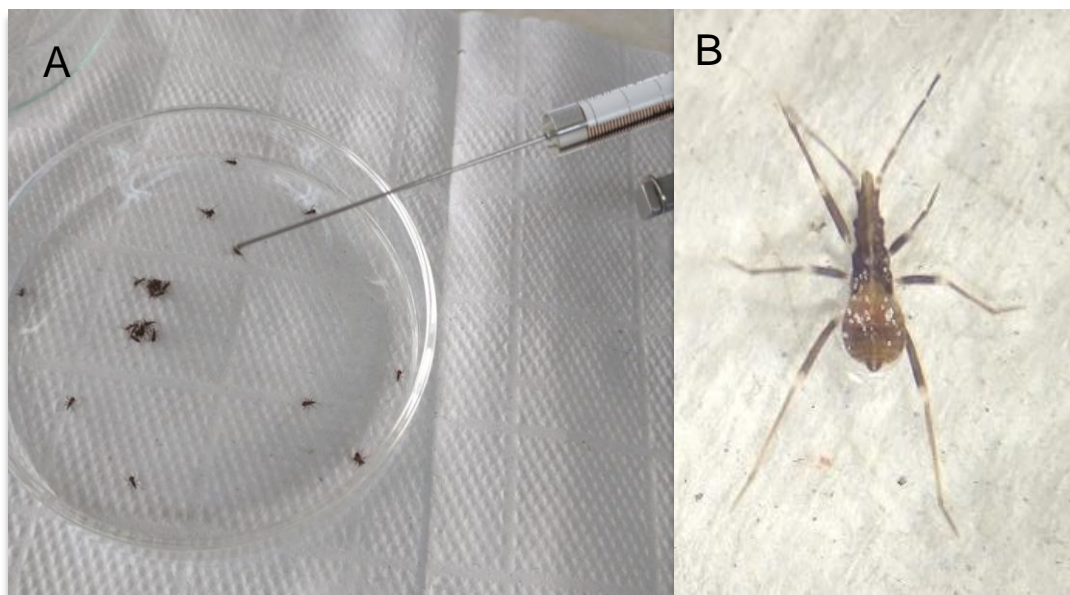
Figura 10: Representação ilustrativa da microseringa Hamilton com o aplicador, utilizada para a aplicação tópica de dsRNA nas ninfas de *R. prolixus*. A microseringa é composta por um corpo cilíndrico e um êmbolo ajustável, permitindo a liberação precisa do volume desejado.



Fonte: Autoria própria

A técnica de aplicação tópica no dorso (AT-D) envolveu o posicionamento das ninfas em placas de Petri, onde foram momentaneamente imobilizadas com o auxílio de uma pinça macia (Figura 11). Em seguida, uma gota contendo o dsRNA foi aplicada sobre o dorso de cada ninfa e o conteúdo da gota foi espalhado cuidadosamente por toda a região dorsal.

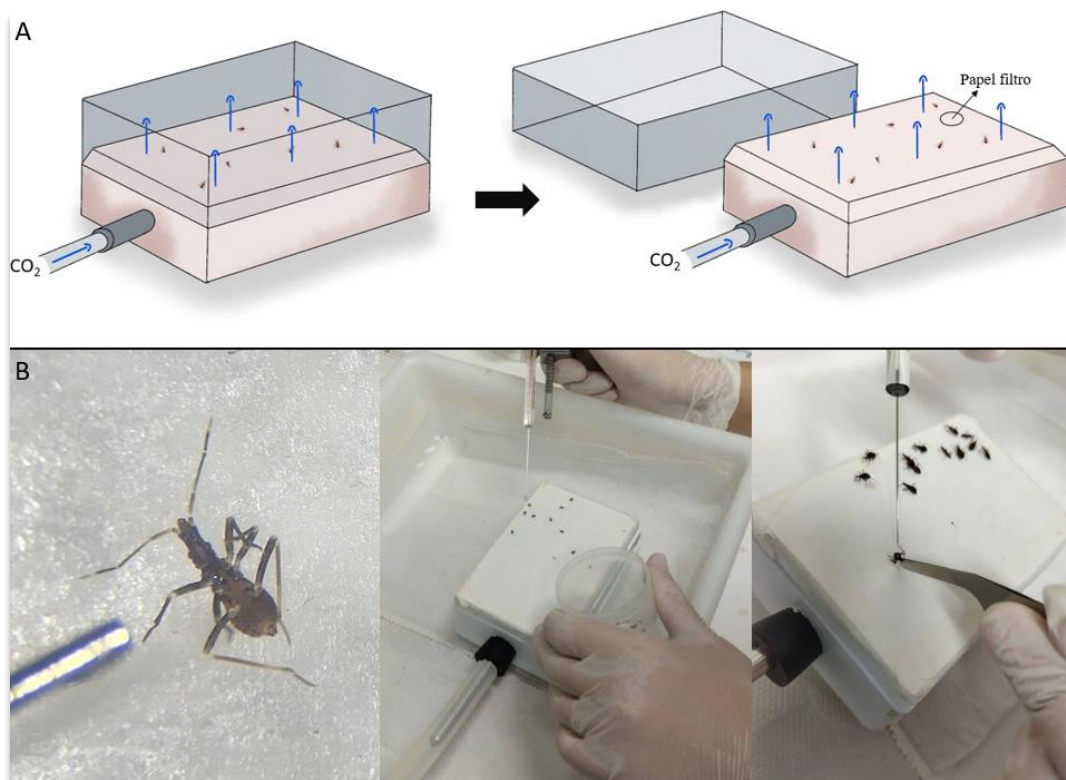
Figura 11: Processo de aplicação tópica de dsRNA em ninfas de *Rhodnius prolixus*. A) Placa de Petri contendo ninfas de *Rhodnius prolixus* que serão submetidas à aplicação tópica no dorso utilizando uma microseringa Hamilton. B) Ninfa de primeiro estágio de *R. prolixus* com o dorso molhado, indicando que acabou de receber a aplicação tópica de dsRNA.



Fonte: Autoria própria

No caso da aplicação tópica no ventre, foram testados três métodos diferentes de imobilização do inseto. O primeiro método consistiu em utilizar fita dupla face, amolecendo um pouco a cola para diminuir a aderência, e colar as ninfas com a parte ventral para cima. O segundo método foi utilizar uma cuba de gelo embaixo de uma placa de petri para imobilizar momentaneamente as ninfas, e para manter o vidro da placa seco, foi colocado um papel filtro entre a placa e as ninfas. Já o terceiro método envolveu a criação de uma caixa na qual CO_2 seria liberado para anestésiar as ninfas. A Figura 12 ilustra a montagem dessa caixa. Após a anestesia, a caixa era aberta para reduzir a emissão de CO_2 , e as ninfas eram viradas com a parte ventral para cima. Em seguida, as ninfas recebiam a aplicação tópica de dsRNA. A gota contendo o dsRNA foi cuidadosamente posicionada na região do tórax, entre as pernas, e espalhada de maneira uniforme, com especial atenção às junções das pernas. Foram registrados o tempo de exposição das ninfas ao CO_2 e o tempo de recuperação após a anestesia.

Figura 12: Equipamento adaptado para anestesia e aplicação tópica de dsRNA em ninfas de *Rhodnius prolixus*. A) Ilustração do equipamento adaptado para anestesiá-las ninfas de *Rhodnius prolixus*. A seta azul indica a saída do CO₂, utilizado para anestesiá-las ninfas. A caixa foi adaptada a partir de uma caixa de ponteiros de micropipeta, com a presença de um papel filtro na área de posicionamento das ninfas, permitindo a passagem do CO₂. Essa abordagem proporcionou a anestesia controlada das ninfas, facilitando a aplicação tópica de dsRNA. B) Fotografias do equipamento utilizado. É possível observar o processo de imobilização das ninfas e a aplicação tópica no ventre.



Fonte: Autoria própria

A dose de dsRNA aplicada em cada ninfa foi 0,5 µg em ninfas do primeiro estágio (N1), 1 µg em N2, 1,25 µg em N3, 2,5 µg em N4 e 5 µg em N5. O dsRNA foi diluído em água DEPC ou acetona. Após a aplicação tópica, os insetos foram acomodados em frascos (recipientes de coleta de material fecal) de 80 mL, com a tampa cortada e coberta com voal. No fundo de cada frasco, foi colocado um pedaço de papel filtro e uma sanfona de cartolina para que os insetos subissem até a tampa para se alimentar. A alimentação dos insetos foi realizada após 3 a 4 dias da aplicação tópica. As análises de fenótipo e qPCR foram realizadas 5 a 10 dias após a muda. Durante esse período, a mortalidade e o tempo de muda foram observados.

4.5 Estabilidade do dsRNA em Acetona

Para investigar a degradação do dsRNA na presença de acetona, foram preparadas amostras contendo 2 µl de dsRNA de Nitroforina (5 µg/µl) e 2 µl de acetona ou água DEPC como controle. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por diferentes períodos: 60 minutos para as amostras de dsRNA + água e dsRNA + acetona, 30 minutos para as amostras

de dsRNA + acetona e 15 minutos para as amostras de dsRNA + acetona. Em seguida, as amostras foram aplicadas em um gel de agarose a 1,5% contendo Brometo de Etídeo. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e as imagens foram capturadas para análise posterior.

4.6 Avaliação dos insetos tratados com dsRNA

5.1 Pela coloração das glândulas salivares

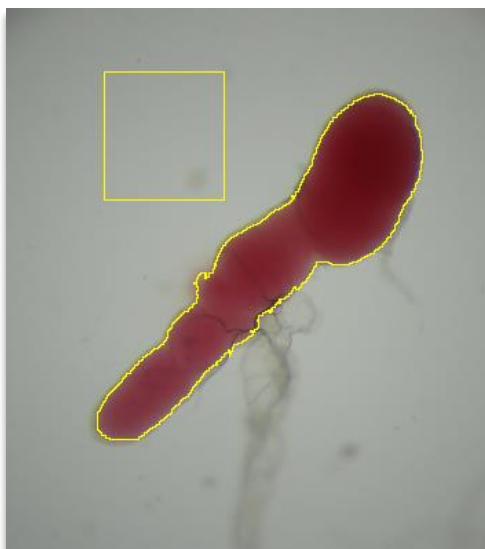
As fotografias foram capturadas com iluminação transmitida por meio de uma placa de LED posicionada na parte inferior da platina da lupa estereoscópico. Essa escolha foi feita porque a iluminação vinda de cima causava reflexos que interferiam na análise das imagens, tornando-as menos nítidas e mais difíceis de interpretar. A iluminação transmitida por baixo, por sua vez, proporcionou uma visualização mais clara e livre de interferências, o que possibilitou uma análise mais precisa e confiável das imagens obtidas. Para a preparação das amostras, gotas de solução salina (NaCl 0,9%) foram colocadas em uma placa de Petri, onde as amostras foram dissecadas. Utilizou-se um aumento de 4,5x para a captura das imagens. Posteriormente, foram analisadas utilizando o software Fiji Image J, versão 1.53t, seguindo o protocolo descrito a seguir:

- **Seleção das imagens:** Foram utilizadas imagens das glândulas salivares de insetos silenciados e insetos do grupo controle. Essas, foram obtidas por meio de microscopia óptica.
- **Máscara e Fundo:** Foi criada uma máscara ao redor das glândulas salivares nas imagens, para selecionar a região de interesse. Além disso, ao lado foi adicionado um quadrado fora da área ocupada pelas glândulas para estimar a luminosidade de fundo da imagem (Figura 13), visando a possibilitar uma análise mais precisa da coloração das glândulas, já que a luminosidade do fundo pode influenciar na intensidade da cor observada nas imagens.
- **Calibração:** O programa ImageJ foi calibrado usando um gradiente de cinza padrão utilizado para este fim que é disponibilizado pelo programa ImageJ. Essa imagem de referência contém uma tabela de etapas de densidade óptica previamente calibrada, que consiste em uma série de valores conhecidos de intensidade de cor. Ao calibrar o programa com a imagem de referência, o software é capaz de converter a intensidade de cor da imagem sob análise em valores quantitativos (densidade ótica), permitindo uma análise mais precisa e confiável dos dados.
- **Conversão da imagem para 8-bit:** As imagens foram convertidas para 8-bit clicando em "Image" e selecionando "Type" > "8-bit". Ao converter a imagem para 8-bit, cada

pixel da imagem é representado por um número, que indica a intensidade da cor em cada ponto da imagem.

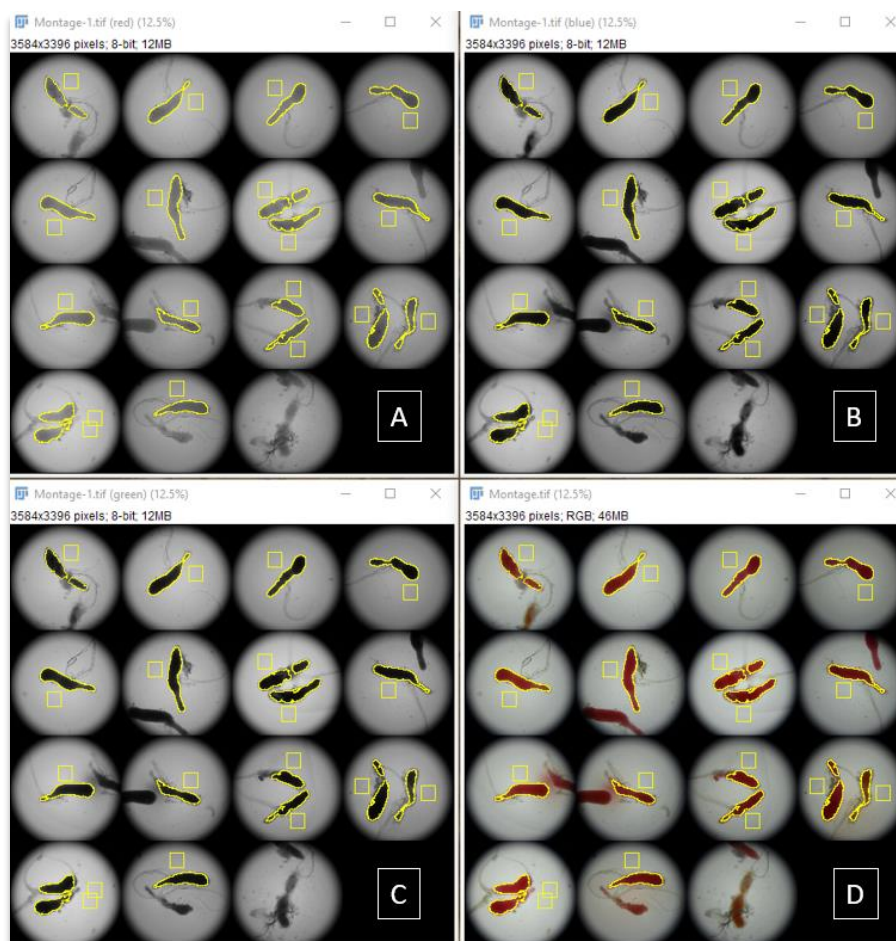
- **Separação das cores:** Utilizou-se a função "Color" > "Split Channels" no software ImageJ para separar as cores da imagem original em RGB (Figura 14). Dessa forma, obtiveram-se três imagens separadas, representando os canais de cor vermelho, verde e azul. A análise da coloração das glândulas salivares foi direcionada ao canal verde, pois constatou-se que é o mais sensível, permitindo uma melhor visualização e análise das características das glândulas. Portanto, ao focar o canal verde, foi possível avaliar de forma mais precisa a intensidade e variação da coloração das glândulas salivares nas imagens capturadas.
- **Processamento das imagens para a análise da coloração:** Utilizando a função "Multi Measure", foram realizadas medições nas áreas de interesse das glândulas salivares em cada imagem. Os dados obtidos foram registrados em uma tabela no software Excel.
- **Cálculo da média da cor (Densidade óptica – O.D.):** Para obter uma avaliação mais precisa da coloração das glândulas salivares, foi realizado o cálculo da média da cor para cada imagem analisada. Em seguida, essa média foi subtraída da média de cor do fundo presente na imagem. Essa abordagem permitiu obter um valor mais preciso e representativo da coloração específica das glândulas salivares, excluindo assim possíveis variações de cor causadas pelo fundo da imagem.

Figura 13: Fotografia da glândula salivar de uma ninfa de quinto estágio (N5) de *Rhodnius prolixus*. A máscara em amarelo foi aplicada para delimitar a área de análise da glândula salivar. O quadrado amarelo indica a região de fundo selecionada para análise.



Fonte: Autoria própria

Figura 14: Análise da coloração da glândula salivar utilizando diferentes canais de cor (RGB). A) canal vermelho, B) canal azul, C) canal verde, D) imagem original. As glândulas estão destacadas com máscaras destacando a região de interesse e uma máscara adicional para indicar o fundo.



Fonte: Autoria própria

a. Por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Após a extração do RNA total e a transformação em cDNA (como descrito em 4.3.b e 4.3.c), a quantificação dos níveis de mRNA foi realizada pela técnica de qPCR. As reações de qPCR foram realizadas com o Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. O PCR quantitativo foi realizado em termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). As reações foram executadas em triplicata, contendo 1 µL dos produtos da síntese de cDNA, 10 nM de cada iniciador, 5 µL do Power SYBR Green PCR Master Mix e água para completar um volume final de 10 µL.

As condições de amplificação foram: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto. Para cada conjunto de iniciadores utilizado (Quadro 2), incluímos um controle negativo para cada amostra testada sem o primer e um controle negativo sem cDNA (substituído por água Milli-Q) em cada placa. Esses controles foram adicionados para confirmar a ausência de amplificação de DNA genômico e avaliar a presença de dímeros de primers ou contaminação dos reagentes, respectivamente.

Após a realização das reações, analisamos a curva de dissociação dos amplificados de cada amostra para verificar se as qPCRs estavam produzindo mais de um produto ou se havia formação de dímeros. A quantidade relativa de transcritos-alvo em cada amostra foi determinada usando o método 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak; Schmittgen, 2001) utilizando genes constitutivos como a β - actina e o Elongation Factor (Paim et al., 2012) como normalizadores.

Quadro 2: Sequências dos iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR.

Gene alvo	Iniciadores F: 5' → 3'	Iniciadores R: 5' → 3'	Amplicon
β - actina	AATCAAGATCATTGCTCCACCAG	TTAGAAGCATTTGCGGTGGAC	151 pb
Elongation fator 1	GATTTCACTGAACCGCCTTA	GCCGGGTTATATCCGATTTT	92 pb
NP 1	TTTGCTGCAGTGGGTGTAAG	AGTTGCCCGACGTTACATCT	334 pb
NP 2	CATATGTTTGCGGGAAGGAT	ATCGTACTGGCACCCAAGAT	163 pb
NP 3	AACCCAGTGCAACGGTAAA	CTCCACCAATTGGCATTITT	185 pb
NP 4	TTAAAAGCGCCGTATCTGCT	AGAACGTCAAATGTCTCTTTACCT	248 pb

Nota: pb – pares de base

4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 9.0. A normalidade das distribuições foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk, com um nível de significância estabelecido em $P > 0,05$ para considerar a distribuição como normal. As análises de qPCR tiveram distribuição normal. Para variáveis que apresentaram uma distribuição

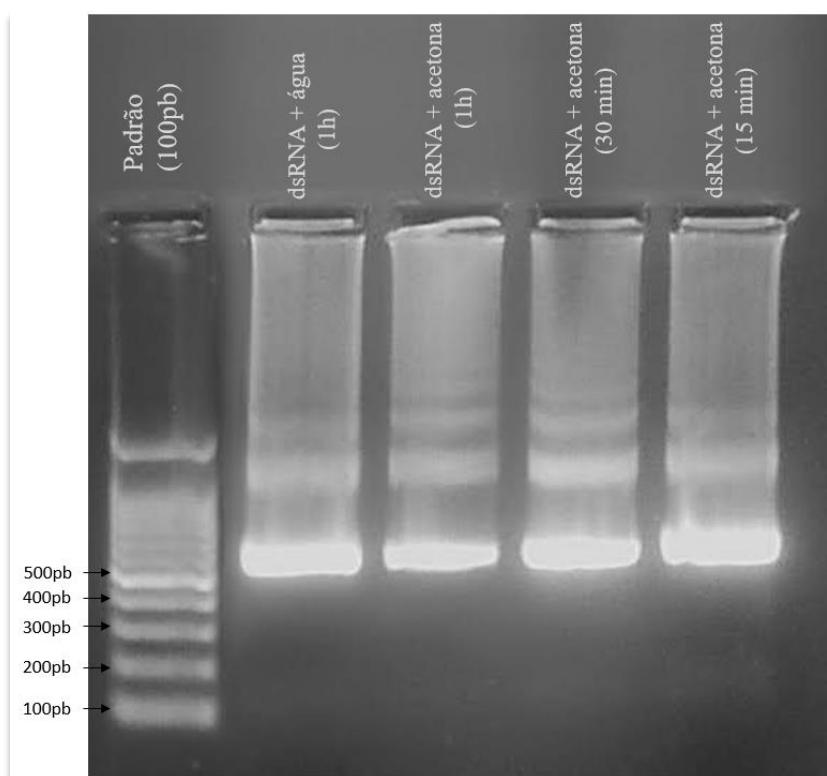
normal, foram aplicados testes t convencionais. No caso de variáveis que não atenderam aos critérios de normalidade, utilizou-se o teste t com correção de Welch. Foi adotado um nível de significância de $P < 0,05$ para determinar a significância estatística.

5. RESULTADOS

5.1 Estabilidade do dsRNA em Acetona

Após a realização do experimento de avaliação da estabilidade do dsRNA em presença de acetona, verificamos que o dsRNA não apresentou degradação em nenhum dos tempos testados. O gel de agarose contendo as amostras de dsRNA misturado com acetona, após diferentes períodos de exposição (15, 30 e 60min), revelou a presença do dsRNA intacto, sem a formação de bandas de degradação (Figura 16).

Figura 15: Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo, mostrando a estabilidade do dsRNA da Nitroforina 2 em presença de acetona em diferentes tempos de exposição. As amostras foram colocadas no gel na seguinte ordem: padrão, 60 min de incubação a temperatura ambiente com água e com acetona, 30 minutos de incubação com acetona e 15 minutos de incubação com acetona. O dsRNA da Nitroforina possui um tamanho de 548pb.



5.2 Avaliação dos insetos tratados com dsRNA

a. Taxa de mortalidade e aplicabilidade da técnica

Entre os grupos que receberam aplicação tópica de dsRNA, tanto para o gene da Nitroforina 2 (NP2) quanto para o gene da Queratina (Ker), não houve diferença na taxa de mortalidade em comparação com o grupo controle que não recebeu nenhum tipo de tratamento. Nas ninfas recém eclodidas que receberam aplicação tópica (com água ou acetona) no dorso, a taxa de mortalidade variou de 6% a 8%. No grupo que recebeu aplicação tópica no ventre e foi imobilizado utilizando CO₂ e gelo, a taxa de mortalidade foi de 1% a 10%. Essas abordagens

i. Aplicação tópica no dorso de ninfas recém eclodidas

No subgrupo de ninfas de primeiro estágio, recém-eclodidas (AT-D-RE), observou-se uma redução na expressão do mRNA da NP2 tanto nas ninfas que receberam dsRNA diluído em água quanto nas que receberam em acetona (conforme o Quadro 3). No grupo que recebeu aplicação com água, o silenciamento foi observado somente quando uma concentração de 1 µg de dsRNA por ninfa foi utilizada, resultando em uma redução da expressão do mRNA da NP2 de 71,5%. No grupo que recebeu acetona como diluente do dsRNA, houve uma redução na expressão de 90,6%, com metade da dose utilizada.

Quadro 3: Resultados das qPCR do grupo AT-D-RE após muda para N2 de *R. prolixus*. Cada linha da tabela representa uma forma de aplicação/local/idade da aplicação, o diluente utilizado, a dose de dsRNA aplicada por ninfa, quantos pares de glândula foram utilizados por pool (total de 5 pools por grupo) a média do $\Delta\Delta Ct$, o erro padrão, a porcentagem de expressão relativa do mRNA da NP2, bem como o valor de p. Foi utilizado o teste t e foram considerados $p < 0,05$ como significativo. O primer para o gene constitutivo utilizado foi o beta actina.

Estádio/Idade Grupo AT-D-RN	Diluente	Dose	Pool	$\Delta\Delta Ct$	Erro Padrão	% Expressão relativa	Valor p
N1	Água	1 µg	2	0,2849	0,1843	28,49%	0,0456
		0,5 µg	5	0,4299	0,1999	42,99%	0,2747
	Acetona	0,5 µg	2	0,0939	0,0425	9,39%	0,0014
		0,5 µg	5	1,1408	0,1962	114,08%	0,6071

ii. Aplicação tópica no dorso de ninfas com cinco dias após muda

Na aplicação tópica em ninfas com 5 dias após a muda (AT-D-5D), foi observado um efetivo silenciamento quando a acetona foi utilizada como diluente em ninfas do segundo ao quinto estágio (Quadro 4). No entanto, nas ninfas de primeiro estágio, não foi observada uma redução significativa na expressão do mRNA da NP2. Os resultados de silenciamento foram os seguintes: em ninfas de segundo estágio, houve uma redução de 72,0% na expressão da NP2. Nas ninfas de terceiro estágio, observou-se uma redução de 77,1% na expressão da NP2. Em ninfas de quarto estágio, a redução foi de aproximadamente 78,9%. Nas ninfas de quinto estágio, o silenciamento foi altamente eficaz, com uma redução de aproximadamente 97,8%.

Quadro 4: Resultados das qPCR do grupo AT-D-5D após aplicação tópica no dorso de *R. prolixus*. Cada linha da tabela representa uma forma de aplicação/local/idade da aplicação, o diluente utilizado, a dose de dsRNA aplicada por ninfa, quantos pares de glândula foram utilizados por pool (total de 5 pools por grupo) a média do $\Delta\Delta Ct$, o erro padrão, a porcentagem de expressão relativa do mRNA da NP2, bem como o valor de p. Foi utilizado o teste t e são considerados $p < 0,05$ como significativo. O primer para o gene constitutivo utilizado foi o beta actina, e ** foi o elongation fator 1.

Estádio/Idade Grupo AT-D-5D	Diluente	Dose	Pool	$\Delta\Delta Ct$	Erro Padrão	% Expressão relativa	Valor p
N1	Água	1 μg	2	1,4306	0,1217	143,06%	0,5395
	Acetona	0,5 μg	2	0,2864	0,1217	28,64%	0,1574
		0,5 μg	4	0,7763	0,3328	77,63% **	0,7484
		0,5 μg	5	1,1722	0,2911	117,22%	0,5984
N2	Acetona	1 μg	3	0,7968	0,3513	79,68% **	0,9552
		1 μg	5	0,2796	0,0999	27,96%	0,0375
N3	Acetona	1,25 μg	5	0,2293	0,0990	22,93%	0,0400
N4	Acetona	2,5 μg	2	0,2070	0,0543	20,70% **	0,0369
		2,5 μg	3	0,2160	0,0802	21,60%	0,0404
N5	Acetona	5 μg	1	0,0004	0,0001	0,04% **	0,0021
		5 μg	2	0,0443	0,0102	4,43%	0,0426

iii. Aplicação tópica no ventre de ninfas com cinco dias após muda

Nas ninfas que receberam aplicação tópica no ventre (AT-V), observou-se silenciamento significativo apenas nas ninfas de primeiro e quarto estágio (Quadro 5). Nas ninfas de primeiro estágio, o silenciamento foi efetivo quando o dsRNA foi diluído em água, tanto com uma dose de 1 μg por ninfa (redução de 99,6% na expressão de mRNA NP2) quanto com 0,5 μg (redução de 99,3%). Nas ninfas de quarto estágio, o silenciamento também foi observado quando o diluente utilizado foi a água, com uma redução na expressão de mRNA da NP2 de 60,9%.

Quadro 5: Resultados das qPCR do grupo AT-V após aplicação tópica no dorso de *R. prolixus*. Cada linha da tabela representa uma forma de aplicação/local/idade da aplicação, o diluente utilizado, a dose de dsRNA aplicada por ninfa, quantos pares de glândula foram utilizados por pool (total de 5 pools por grupo) a média do $\Delta\Delta Ct$, o erro padrão, a porcentagem de expressão relativa do mRNA da NP2, bem como o valor de p. Foi utilizado o teste t e são considerados $p < 0,05$ como

significativo. O primer para o gene constitutivo utilizado foi o beta actina, e ** foi o elongation fator 1.

Estádio/Idade Grupo AT-V-5D	Diluyente	Dose	Pool	$\Delta\Delta Ct$	Erro Padrão	% Expressão relativa	Valor p
N1	Acetona	0,5 μg	2	0,2450	0,0674	24,50%	0,0599
		0,5 μg	5	0,9964	0,2552	99,64%	0,9908
	Água	1 μg	2	0,0042	0,0012	0,42%	<0,0001
		0,5 μg	4	0,0074	0,7298	0,74% **	0,0439
		0,5 μg	5	2,2498	0,2490	224,98%	0,0810
N2	Acetona	1 μg	4	0,8048	0,1626	80,48%	0,5310
	Água	1 μg	3	0,9766	0,2310	97,66% **	0,9473
		1 μg	4	2,6140	0,7093	261,40%	0,0730
N3	Água	1,25 μg	4	2,1016	0,2826	210,16%	0,0462
N4	Água	2,5 μg	3	0,3911	0,0950	39,11%	0,0166
N5	Água	5 μg	2	0,9586	0,7214	95,86%	0,9162

A porcentagem de silenciamento geral alcançada pelo tratamento tópico com dsRNA no dorso dos insetos (AT-D) foi de 53,3% (8/15 experimentos). Com exceção das ninfas N1 com 5 dias, em todos os outros grupos foi possível obter silenciamento eficaz com esse método. Nos estádios N2-N5, o tratamento com dsRNA diluído em acetona por aplicação tópica no dorso apresentou um desempenho notável, atingindo uma porcentagem de silenciamento de 85,7% (6/7 experimentos). Além disso, a redução da expressão do mRNA da NP2 obtida com a administração do dsRNA por aplicação tópica no dorso nos grupos silenciados foi significativa, variando de 95,6% a 71,5%, demonstrando que o efeito do silenciamento foi transmitido para o estágio seguinte.

Já a porcentagem de sucesso dos tratamentos com entrega tópica do dsRNA no ventre dos insetos (AT-V) foi de 27,3% (3/11 experimentos), conforme indicado no Quadro 5. Entre os grupos testados em ambos os locais de aplicação tópica (dorso e ventre), o tratamento no ventre mostrou-se superior ao dorso somente nas ninfas N1 com 5 dias. Dentro desse grupo (N1 5 dias), a aplicação tópica do dsRNA diluído em água foi eficaz em 66,7% dos experimentos (2/3), enquanto o uso da acetona como diluente não obteve sucesso em nenhum dos experimentos (0,0%, 0/2 experimentos). Vale ressaltar que a redução da expressão da NP2 obtida com a administração tópica no ventre das ninfas N1 com 5 dias foi superior a 99%.

c. Avaliação do fenótipo das glândulas salivares

A coloração das glândulas salivares dos insetos dos grupos controle e teste que receberam o tratamento de dsRNA por aplicação tópica no estágio anterior foi visualmente muito parecido, diferentemente do observado nos grupos que receberam o dsRNA por injeção (Figuras 18 e 19).

Desta forma, utilizou-se a análise de imagem na tentativa de caracterizar o fenótipo produzido pelo silenciamento (RNAi) por aplicação tópica de dsRNA. Nesse sentido, as imagens das glândulas foram submetidas a dois protocolos de processamento que visam a detectar pequenas diferenças na tonalidade de cor, utilizando o valor da densidade ótica (O.D.) após a transformação da imagem colorida (RGB) em escala de cinza ("8-bit") ou no seu componente verde ("green"). Quanto maior a OD mais escura é a tonalidade da glândula salivar.

Figura 17: Efeito do silenciamento na coloração de glândulas salivares em ninfas de 3º estágio de *R. prolixus* tratadas com microinjeção de dsRNA. Glândulas salivares de ninfas de quarto estágio (N4) de *R. prolixus* 7 dias após a muda que foram tratadas quando em terceiro estágio (N3) por injeção com dsRNA-Ker (A) ou dsRNA-NP2 (B).

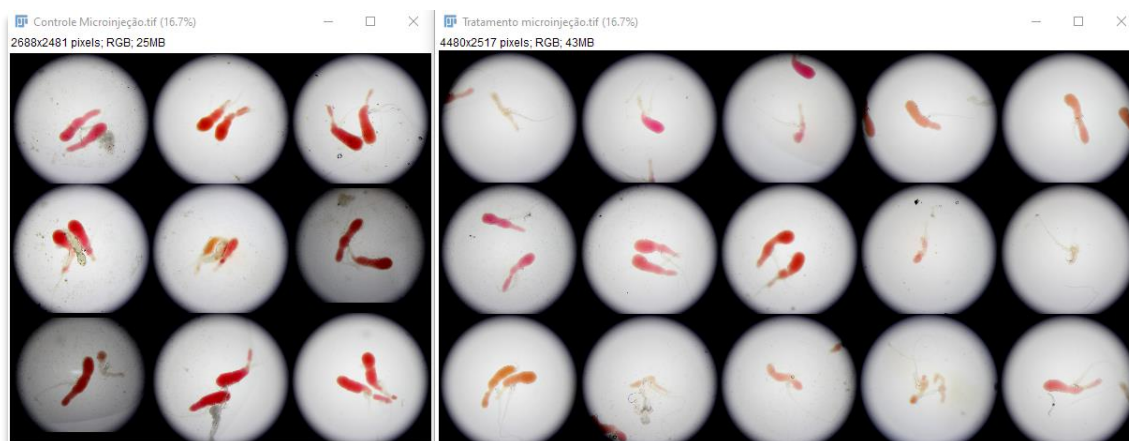
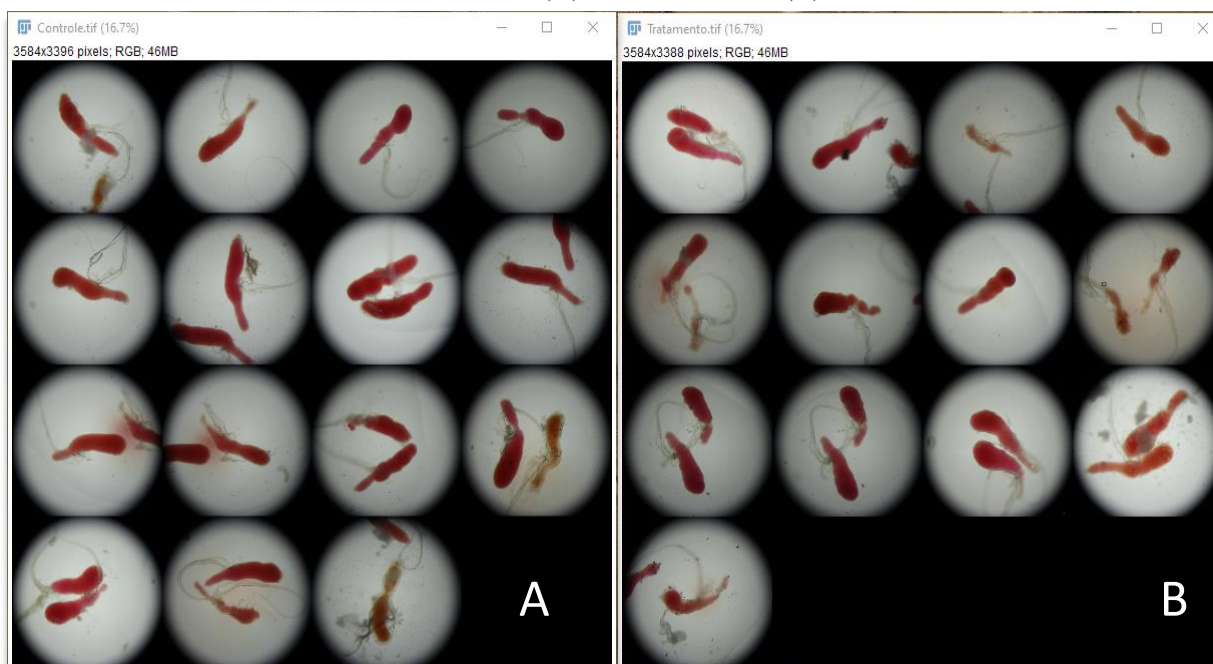


Figura 18: Efeito do silenciamento na coloração de glândulas salivares em ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* tratadas com aplicação tópica de dsRNA. Glândulas salivares de adultos de *R. prolixus* 7 dias após a muda que foram tratadas quando em quinto estágio (N5) por aplicação tópica com dsRNA-Ker (A) ou dsRNA-NP2 (B).



No presente estudo, empregamos os seguintes parâmetros da análise de imagem ("8-bit" e "green") para descrever o fenótipo da glândula salivar nos insetos submetidos ao silenciamento (Quadro 3): a) Avaliamos se houve variação na média da densidade ótica entre os grupos de controle e teste em cada experimento; b) Determinamos qual dos grupos (controle ou teste) apresentou a média de densidade ótica mais elevada.

Quadro 6: Resultados da densidade óptica nos grupos (M e AT). A tabela apresenta os dados relevantes para a análise dos resultados, incluindo os estádios/idades das ninfas, o valor de p obtido na análise de qPCR, bem como as médias de densidade óptica (OD) das imagens obtidas nos dois protocolos de análise de imagens utilizados (“8-bit” e “green”). Foi utilizado teste t para análise estatística no qual $p < 0,05$ é considerado como significativo. Destaque em verde indica análises com diferenças significativas entre controle e tratamento, consistentes com qPCR. Em vermelho, análises com diferenças significativas em que o controle registrou O.D. menor que o tratamento.

No.	Estádio/Idade	Local	O.D. Imagem Green (Ctrl e Teste)		O.D. (ctrl - teste)	p (Green)	p (qPCr)	O.D. Imagem 8-bit (Ctrl e Teste)		OD (ctrl - teste)	p (8 bits)
1	N1 - RE	D	0,269	0,219	ctrl > teste	< 0,05	< 0,05	0,162	0,139	ctrl > teste	ns
2	N1 - RE	D	0,348	0,314	ctrl > teste	ns	ns	0,248	0,222	ctrl > teste	ns
3	N1 - RE	D	0,343	0,452	ctrl < teste	< 0,05	< 0,05	0,218	0,295	ctrl < teste	< 0,05
4	N1 - RE	D	0,486	0,462	ctrl > teste	ns	ns	0,333	0,317	ctrl > teste	ns
5	N1 - 5 DIAS	D	0,323	0,268	ctrl > teste	< 0,05	ns	0,209	0,169	ctrl > teste	< 0,05
6	N1 - 5 DIAS	D	0,269	0,276	ctrl < teste	ns	ns	0,164	0,165	ctrl > teste	ns
7	N1 - 5 DIAS	D	0,464	0,433	ctrl > teste	ns	ns	0,297	0,283	ctrl > teste	ns
8	N1 - 5 DIAS	D	0,497	0,468	ctrl > teste	ns	ns	0,337	0,330	ctrl > teste	ns
9	N2 - 5 DIAS	D	0,528	0,568	ctrl < teste	ns	ns	0,334	0,355	ctrl < teste	ns
10	N2 - 5 DIAS	D	0,660	0,643	ctrl > teste	ns	< 0,05	0,415	0,413	ctrl > teste	ns
11	N3 - 5 DIAS	D	0,655	0,584	ctrl > teste	< 0,05	< 0,05	0,471	0,430	ctrl > teste	ns
12	N4 - 5 DIAS	D	0,751	0,846	ctrl < teste	< 0,05	< 0,05	0,472	0,507	ctrl < teste	ns
13	N4 - 5 DIAS	D	0,841	0,751	ctrl > teste	< 0,05	< 0,05	0,589	0,529	ctrl > teste	ns
14	N5 - 5 DIAS	D	0,923	0,980	ctrl < teste	ns	< 0,05	0,572	0,612	ctrl < teste	ns
15	N5 - 5 DIAS	D	1,011	0,944	ctrl > teste	ns	< 0,05	0,637	0,605	ctrl > teste	ns
16	N1 - 5 DIAS	V	0,269	0,419	ctrl < teste	< 0,05	ns	0,164	0,274	ctrl < teste	< 0,05
17	N1 - 5 DIAS	V	0,323	0,442	ctrl < teste	< 0,05	< 0,05	0,209	0,281	ctrl < teste	< 0,05
18	N1 - 5 DIAS	V	0,565	0,571	ctrl < teste	ns	ns	0,390	0,381	ctrl > teste	ns
19	N1 - 5 DIAS	V	0,466	0,448	ctrl > teste	ns	< 0,05	0,265	0,305	ctrl < teste	< 0,05
20	N1 - 5 DIAS	V	0,515	0,524	ctrl < teste	ns	ns	0,356	0,354	ctrl > teste	ns
21	N2 - 5 DIAS	V	0,683	0,575	ctrl > teste	< 0,05	ns	0,421	0,380	ctrl > teste	ns
22	N2 - 5 DIAS	V	0,547	0,556	ctrl < teste	ns	ns	0,354	0,346	ctrl > teste	ns
23	N2 - 5 DIAS	V	0,664	0,720	ctrl < teste	ns	ns	0,426	0,453	ctrl < teste	ns
24	N3 - 5 DIAS	V	0,782	0,861	ctrl < teste	ns	< 0,05	0,490	0,526	ctrl < teste	ns
25	N4 - 5 DIAS	V	0,940	0,707	ctrl > teste	< 0,05	< 0,05	0,630	0,490	ctrl > teste	< 0,05
26	N5 - 5 DIAS	V	0,775	0,904	ctrl < teste	ns	ns	0,522	0,569	ctrl < teste	ns
27	N3 - 5 DIAS	INJ	0,378	0,225	ctrl > teste	< 0,05	< 0,05	0,249	0,150	ctrl > teste	< 0,05

Quando comparamos os resultados das análises de imagem (“8-bit” e “green”) para caracterizar o fenótipo da glândula salivar de insetos silenciados por microinjeção, observamos uma concordância entre a análise de qPCR ($p < 0,05$) com as os dois protocolos utilizados ($p < 0,05$). Em ambas as análises, o grupo controle apresentou uma densidade óptica média maior do que a do grupo teste, indicando uma tonalidade de vermelho mais forte das glândulas salivares nos insetos do grupo controle.

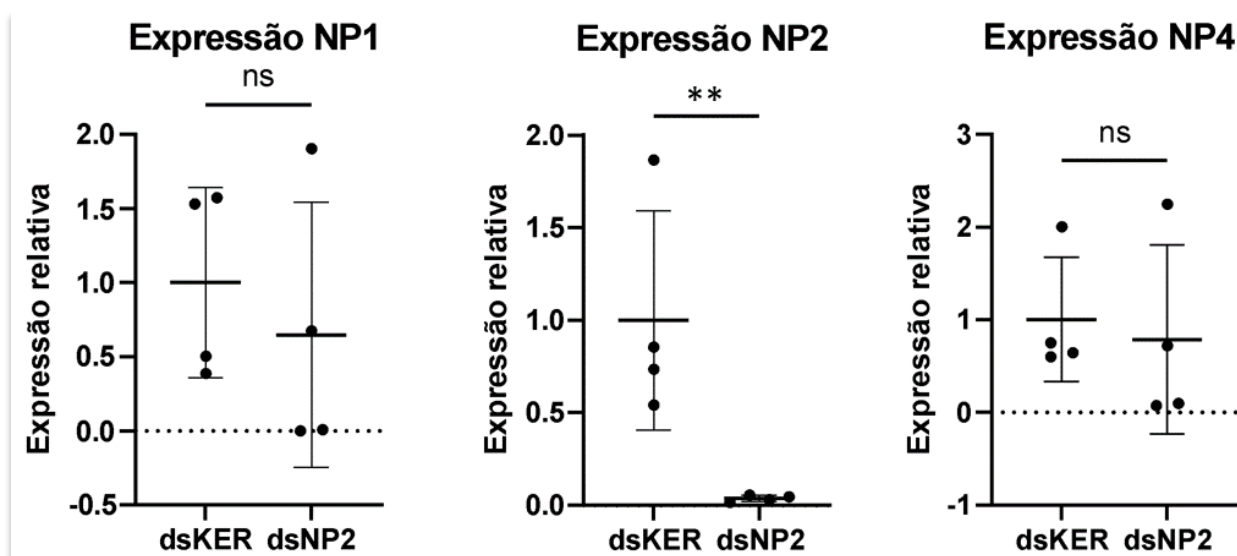
Quando se analisou os grupos de insetos silenciados por aplicação tópica e o fenótipo da glândula salivar baseado na análise de imagem, não houve uma concordância muito clara. Utilizando o protocolo de análise de imagem, “8-bit” observou-se diferença na densidade óptica em seis grupos experimentais, sendo que quatro deles também apresentaram diferença na análise de qPCR, destes quatro a O.D. média do grupo controle foi maior em um e menor em três. A taxa de concordância entre o protocolo “8-bit” e o resultado da análise de qPCR foi de 36,4% (4/11).

Já pela análise de imagem “green” observou-se diferença na densidade ótica em 10 grupos experimentais, sendo que sete deles também apresentaram diferença na análise de qPCR, desses sete, a O.D. média do grupo controle foi maior em quatro e menor em três. A taxa de concordância entre o protocolo “green” e o resultado da análise de qPCR foi de 63,6% (7/11).

d. Análise de qPCR das 4 nitroforinas salivares

Como nos experimentos anteriores, foram observadas algumas inconsistências entre o silenciamento genotípico (expressão significativamente reduzida do mRNA de NP2) e o fenotípico (sem diferenças significativas na perda de coloração da glândula salivar). Foi levantada a hipótese de que a expressão de outras nitroforinas (NP1, NP3 e NP4) poderia estar mascarando o fenótipo observado. Avaliamos então o efeito do silenciamento de NP2 e a expressão de todas as quatro nitroforinas em insetos tratados por aplicação tópica de 5 µg de dsRNA com acetona (1:1 V/V) no dorso de N5 (Figura 20) que já havia apresentado redução na expressão superior a 95%. Não foram observadas diferenças na expressão das NPs 1 e 4 entre o grupo teste (tratado com dsRNA-NP2) em relação ao grupo controle (tratado com dsRNA-KER), sugerindo que o silenciamento da NP2 não afetou a expressão dessas duas NPs. O dado da NP3 não foi mostrado por inconsistência no resultado da qPCR.

Figura 19: Expressão de nitroforinas (NP1, NP2 e NP4) em N5 silenciado por aplicação tópica no dorso com NP2. Gráfico com o resultado da qPCR após aplicação tópica de ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*. Foram utilizados 2 pares de glândula por pool (total de 5 pools). Foi utilizado o teste t e são considerados $p < 0,05$ como significativo. O primer para o gene constitutivo utilizado foi o beta actina.



6. DISCUSSÃO

A taxa de mortalidade entre os grupos que receberam dsRNA por aplicação tópica (no dorso e ventre, utilizando acetona e água) foi semelhante em todos os estádios dos insetos (<10%), exceto naqueles experimentos em que as ninfas foram imobilizadas com fita adesiva para receberem aplicação tópica pelo ventre, que apresentaram uma taxa de mortalidade elevada de 66% a 76%. Essa imobilização, especialmente desafiadora devido ao tamanho e rigidez do corpo das ninfas de primeiro estágio, também requer cuidado extra na remoção das ninfas da cola da fita adesiva, mesmo que a fita tenha sido amolecida anteriormente. Assim, devido à alta mortalidade, a fita adesiva não foi utilizada nos experimentos seguintes.

A comparação entre a aplicação tópica e a microinjeção revelou vantagens significativas da aplicação tópica em termos de facilidade e simplicidade de utilização. Enquanto a microinjeção demanda o uso de um microinjetor, um capilar de vidro (necessitando de microforja e lixa especial para a formação do bisel) ou uma microseringa, esta última podendo prejudicar ainda mais o inseto, e exige habilidades específicas para montagem e aplicação, a aplicação tópica no dorso requer preferencialmente uma microseringa Hamilton (ou alternativamente uma micropipeta) e uma pinça delicada. Já a aplicação tópica no ventre foi viabilizada por meio do uso de um balão de CO₂ e de uma caixa adaptada para o procedimento, garantindo uma imobilização adequada das ninfas, além disso, foi demonstrada a mesma efetividade utilizando uma cuba gelada para imobilizar os insetos. Adicionalmente, é importante destacar que a aplicação tópica não resulta em danos aos insetos, caracterizando-a como uma técnica não invasiva. Isso permite que os insetos sejam submetidos a testes de fisiologia comportamental e alimentação sanguínea sem comprometimentos significativos.

Para que a entrega do dsRNA atinja as células-alvo dos insetos através da aplicação tópica, é necessário transpor o exoesqueleto quitinoso desses animais. Esse exoesqueleto, normalmente recoberto por cera (hidrocarbonetos de cadeia longa), funciona como uma barreira físico-química, tornando-o pouco permeável à água e, portanto, dificultando a penetração do dsRNA.

No presente estudo, empregamos tanto a água quanto a acetona como diluente do dsRNA. Essas substâncias possuem propriedades físico-químicas distintas. A água apresenta uma distribuição desigual de cargas elétricas, enquanto, em comparação, a acetona é uma molécula mais apolar. Além disso, devido a essas diferentes características, essas substâncias desempenham papéis distintos como solventes. Enquanto a água é considerada um solvente inorgânico, capaz de dissolver muitos compostos iônicos e polares, a acetona tem maior afinidade por compostos orgânicos.

O dsRNA, por ser uma molécula orgânica com alta polaridade, dissolve-se bem em ambos os solventes. No entanto, a acetona pode proporcionar um ambiente menos favorável para a estabilidade do dsRNA em comparação com a água. Por esse motivo, foi realizado um experimento para avaliar a estabilidade do dsRNA na presença de acetona. Constatou-se que o dsRNA não sofreu degradação em nenhum dos intervalos de tempo testados (15, 30 e 60 minutos).

Nos experimentos em que os insetos foram tratados com dsRNA por aplicação tópica no dorso, os resultados do presente estudo sugerem que o uso de acetona como diluente foi mais eficaz do que o uso de água para o silenciamento dos insetos. Essa diferença no desempenho da técnica pode estar relacionada às propriedades físico-químicas dessas duas substâncias utilizadas como diluentes e à forma como as soluções de dsRNA interagem com o corpo dos insetos.

Essas características físico-químicas desempenham um papel crucial na interação entre essas duas substâncias quando entram em contato com uma superfície. A acetona, por exemplo, uma molécula que possui interação intermolecular através de dipolo induzido, exibe uma tensão superficial menor, resultando em uma superfície que é mais prontamente molhada. Isso se traduz na tendência geral de a água (que envolve ligações de hidrogênio) formar gotas mais compactas em uma superfície, enquanto a acetona se espalha de maneira mais ampla. Vale ressaltar que esse comportamento diferenciado entre as duas substâncias também foi observado ao serem aplicadas em conjunto com o dsRNA nos insetos.

Ao aplicar a gota contendo dsRNA e água no dorso (assim como no ventre) dos insetos, observou-se que a absorção era mais lenta. Mesmo após ser uniformemente espalhada sobre a região do tórax e abdômen, a gota demorava um período considerável para evaporar/ser absorvida por completo. Por outro lado, quando a gota que continha acetona e dsRNA era aplicada no inseto, ela se espalhava e era absorvida/evaporava rapidamente, e em pouco tempo o inseto já estava seco novamente.

No entanto, a característica principal que pode explicar o melhor desempenho da aplicação tópica quando o dsRNA é diluído em acetona, em comparação com a água, é que a acetona apresenta uma maior capacidade de penetração através da cutícula dos insetos. Essa habilidade de atravessar a cutícula, aliada à sua baixa toxicidade, tem estabelecido a acetona como um solvente amplamente empregado na entrega de diversas substâncias (como inseticidas, hormônios, entre outros) por meio de aplicação tópica em diversos estudos com insetos (Jatsch; Ruther, 2021).

Interessantemente, em contraste com os resultados observados na aplicação tópica no dorso, os resultados obtidos na aplicação tópica no ventre indicam um melhor desempenho quando a água é usada como diluente do dsRNA, em comparação com a acetona. Enquanto a água resultou na redução da expressão do NP2 em três grupos experimentais (dois N1 - 5 dias e um N4 - 5 dias), com a acetona não se obteve nenhum silenciamento estatisticamente significativo. Entretanto, o tamanho amostral dos testes no ventre necessita ser ampliado para confirmar esse achado.

Os resultados do silenciamento da NP2 obtidos pelo tratamento tópico com dsRNA, considerando o número de grupos experimentais avaliados no dorso (53,3%), foi numericamente maior do que o obtido no ventre (27,3%). Contudo, ao comparar diretamente as duas áreas de aplicação tópica, é necessário levar em consideração que não houve uma homogeneidade no número de experimentos entre estes dois tratamentos. É importante considerar fatores que provavelmente interferiram no desempenho da técnica como estágio evolutivo, idade pós-emergência dos insetos e o diluente utilizado (água ou acetona).

A aparente menor eficácia da aplicação tópica na região do ventre vai ao encontro do estudo de Finetti et al. (2023), que realizaram a aplicação tópica de dsRNA diluído em água no ventre de ninfas de segundo e terceiro estágio de *R. prolixus*, buscando silenciar genes relacionados às proteínas IAP, mas não obtiveram sucesso na redução na expressão deste gene alvo. Uma observação importante é que a concentração de dsRNA utilizada pelos autores (2 µg/ninfa) foi maior do que a empregada neste estudo (1 µg e 1,25 µg/ninfa). Essa similaridade nos resultados sugere que a aplicação tópica no ventre para ninfas de segundo e terceiro estágio pode não ser a abordagem mais eficaz para induzir o silenciamento gênico em ninfas de *R. prolixus*.

A coloração das glândulas salivares (GSs) dos insetos silenciados e do grupo controle que receberam o tratamento de dsRNA por aplicação tópica no estágio anterior foi bastante semelhante, ao contrário do observado nos grupos que receberam o dsRNA por injeção, onde a tonalidade das GSs dos insetos do grupo teste apresentaram um tom de vermelho mais claro. Resultado semelhante com o obtido por Araujo et al., (2006), quando compararam o silenciamento induzido por ingestão e por injeção, onde eles apenas observaram diferença no fenótipo das GSs dos insetos silenciados (coloração vermelho claro), quando o dsRNA-NP2 foi introduzido por injeção.

Em resumo, considerando que a taxa global de silenciamentos dos grupos experimentais foi relativamente alta (53,3%), que a redução da expressão da NP2 obtida com a administração do dsRNA por aplicação tópica no dorso nos grupos silenciados foi significativa (95,6 a 71,5%)

e que o efeito do silenciamento foi transmitido para o estágio seguinte, essa metodologia apresentou características favoráveis para sua aplicação em experimentos que visem ao silenciamento de genes salivares por meio do RNAi.

Com o objetivo de gerar uma publicação, pretende-se aumentar o número amostral de alguns grupos experimentais. Isso inclui testar a aplicação tópica no ventre com água em ninfas N1 recém-emergidas, verificar se o efeito de silenciamento é transmitido para a prole (RNAi parental), confirmar que o silenciamento da NP2 por meio da aplicação tópica não afeta a expressão de outras NPs salivares, além de comparar o tempo de recalcificação do plasma pobre em plaquetas do extrato da glândula salivar de insetos silenciados e seus respectivos controles.

Esses resultados indicam que a acetona não afeta negativamente a estabilidade do dsRNA, o que sugere que ela pode ser uma opção viável para a entrega desse material genético, como no presente estudo. A preservação da integridade do dsRNA é de grande importância, pois assegura a eficácia do silenciamento gênico desejado.

Com o aprimoramento da facilidade de aplicação, o aumento significativo no tamanho amostral de diversos experimentos se torna possível. Anteriormente, em um período de 6 horas, era viável microinjetar 120 ninfas de 4º estágio, entretanto, com a aplicação tópica, torna-se factível aplicar em 500 ninfas nesse mesmo intervalo de tempo.

7. REFERÊNCIAS

- ALEVI, K. C. C. et al. Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1627, 15 dez. 2021.
- ANDERSEN, J. F. et al. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 58, n. 2, p. 97–105, fev. 2005.
- ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary Kratagonists. Em: **Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 2**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 51–63.
- ANDERSEN, S. O. Insect cuticular sclerotization: A review. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 166–178, mar. 2010.
- ANDRADE, B. B. et al. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 4, p. 665–693, dez. 2005.
- ARAUJO, R. N. et al. 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**, v. 36, n. 9, p. 683–693, set. 2006.
- ARAUJO, R. N. et al. Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 12, p. 1351–1358, out. 2007.
- ARAUJO, R. N. et al. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 83–89, fev. 2009.
- ARCÀ, B.; RIBEIRO, J. M. Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit. **Current Opinion in Insect Science**, v. 29, p. 102–109, out. 2018.
- BARRETO, M. P.; BRENER, Z.; ANDRADE, Z. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**, n. 1º Edição, p. 89–152, 1979.
- BARROZO, R. B. et al. An inside look at the sensory biology of triatomines. **Journal of Insect Physiology**, v. 97, p. 3–19, fev. 2017.
- BASNET, S.; KAMBLE, S. T. RNA Interference of the Muscle Actin Gene in Bed Bugs: Exploring Injection Versus Topical Application for dsRNA Delivery. **Journal of Insect Science**, v. 18, n. 3, 1 maio 2018.
- BAUM, J. A. et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322–1326, nov. 2007.
- BELLÉS, X. Beyond *Drosophila*: RNAi In Vivo and Functional Genomics in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 111–128, 1 jan. 2010.
- BLACK, W. C.; KONDRATIEFF, B. Evolution of arthropod disease vectors. **Elsevier: Amsterdam**, p. 9–23, 2005.

- BORELLA MARFIL ANHÊ, A. C. et al. Microanatomical and secretory characterization of the salivary gland of the *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), a main vector of Chagas disease. **Open Biology**, v. 11, n. 6, p. 210028, jun. 2021.
- CHAMPAGNE, D. E.; NUSSENZVEIG, R. H.; RIBEIRO, J. M. C. Purification, Partial Characterization, and Cloning of Nitric Oxide-carrying Heme Proteins (Nitrophorins) from Salivary Glands of the Blood-sucking Insect *Rhodnius prolixus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 15, p. 8691–8695, abr. 1995.
- CHAPMAN, R. F.; DE BOER, G. (EDS.). **Regulatory Mechanisms in Insect Feeding**. Boston, MA: Springer US, 1995.
- CHRISTIAENS, O.; NIU, J.; NJI TIZI TANING, C. RNAi in Insects: A Revolution in Fundamental Research and Pest Control Applications. **Insects**, v. 11, n. 7, p. 415, 3 jul. 2020.
- COOPER, A. M. et al. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. **Pest Management Science**, v. 75, n. 1, p. 18–28, jan. 2019.
- ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes & Development**, v. 15, n. 2, p. 188–200, 15 jan. 2001.
- EL-SHESHENY, I. et al. Silencing Abnormal Wing Disc Gene of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Disrupts Adult Wing Development and Increases Nymph Mortality. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e65392, 29 maio 2013.
- FINETTI, L. et al. Topical delivery of dsRNA in two hemipteran species: Evaluation of RNAi specificity and non-target effects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 189, p. 105295, jan. 2023.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, fev. 1998.
- FRANCISCHETTI, I., M. B. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v. Volume, n. 14, p. 2051, 2009.
- GAMMON, D. B.; MELLO, C. C. RNA interference-mediated antiviral defense in insects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 8, p. 111–120, abr. 2015.
- GUARNERI, A. A. et al. Population Biology of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) under Laboratory Conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 273–276, mar. 1998.
- GUARNERI, A. A. et al. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. **Journal of Insect Physiology**, p. 7, 2000.
- GUARNERI, A.; LORENZO, M. (EDS.). **Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors**. Cham: Springer International Publishing, 2021. v. 5
- GUERENSTEIN, P. G.; GUERIN, P. M. Olfactory and Behavioural Responses of the Blood-Sucking bug *Triatoma Infestans* to Odours of Vertebrate Hosts. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 3, p. 585–597, 1 fev. 2001.

GUERENSTEIN, P. G.; LAZZARI, C. R. Host-seeking: How triatomines acquire and make use of information to find blood. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2–3, p. 148–158, maio 2009.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 611–620, maio 1995.

HAMMOND, S. M. et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, v. 404, n. 6775, p. 293–296, mar. 2000.

HUNTER, C. P. Genetics: A touch of elegance with RNAi. **Current Biology**, v. 9, n. 12, p. R440–R442, jun. 1999.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 3, p. 227–235, mar. 2010.

JATSCH, A.-S.; RUTHER, J. Acetone application for administration of bioactive substances has no negative effects on longevity, fitness, and sexual communication in a parasitic wasp. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0245698, 20 jan. 2021.

KENNERDELL, J. R.; CARTHEW, R. W. Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* Act in the Wingless Pathway. **Cell**, v. 95, n. 7, p. 1017–1026, dez. 1998.

KILLINY, N. et al. Double-Stranded RNA Uptake through Topical Application, Mediates Silencing of Five CYP4 Genes and Suppresses Insecticide Resistance in *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110536, 20 out. 2014.

LACOMBE, D. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 557–564, jul. 1999.

LAVOPIERRE, M. M. J. Feeding Mechanism of Blood-sucking Arthropods. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 302–303, out. 1965.

LAVOPIERRE, M. M. J.; DICKERSON, G.; GORDON, R. M. Studies on the Methods of Feeding of Blood-sucking Arthropods: I—The Manner in Which Triatomine Bugs Obtain Their Blood-Meal, as Observed in the Tissues of the Living Rodent, with Some Remarks on the Effects of the Bite on Human Volunteers. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 53, n. 2, p. 235–250, jun. 1959.

LEE, D.; ORCHARD, I.; LANGE, A. B. Evidence for a conserved CCAP-signaling pathway controlling ecdysis in a hemimetabolous insect, *Rhodnius prolixus*. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, 2013.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. REVISION OF THE TRIATOMINAE (HEMIPTERA, REDUVIIDAE), AND THEIR SIGNIFICANCE AS VECTORS OF CHAGAS' DISEASE. p. 408, 1979a.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. v. 163, p. 125–520, 1979b.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LORENZO, M. et al. **Atlas of Chagas' disease vectors in America**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1999. v. III
- LORENZO, M. G.; LAZZARI, C. R. Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 72, n. 3, p. 241–249, abr. 1999.
- MAO, Y.-B. et al. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. **Transgenic Research**, v. 20, n. 3, p. 665–673, jun. 2011.
- MARCONATO, E. et al. Estudo biológico e biométrico dos estádios ninfais de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) sob condições laboratoriais. v. 27, n. 2, p. 157–161, 2006.
- MEISTER, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 7, p. 447–459, jul. 2013.
- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343–349, set. 2004.
- MESQUITA, R. D. et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 48, p. 14936–14941, dez. 2015.
- MOREIRA, M. F. et al. Changes in salivary nitrophenol profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 23–28, jan. 2003.
- MURPHY, K. A. et al. Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22587, 2 mar. 2016.
- NIU, J. et al. Topical dsRNA delivery induces gene silencing and mortality in the pea aphid. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2873–2881, nov. 2019.
- NÚÑEZ, J. A. Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 72, n. 2, p. 253–262, jun. 1982.
- NYKÄNEN, A.; HALEY, B.; ZAMORE, P. D. ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. **Cell**, v. 107, n. 3, p. 309–321, nov. 2001.
- OBBARD, D. J. et al. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1513, p. 99–115, 12 jan. 2009.
- OPS/OMS. **CHAGAS DISEASE**. , 2022. Disponível em: <www.paho.org/en/topics/chagas-disease>
- PAIM, R. M. et al. 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. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 128, dez. 2012.

- PAIM, R. M. M. et al. Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 7, p. 765–773, jun. 2011.
- PAIM, R. M. M. et al. Application of RNA interference in triatomine (Hemiptera: Reduviidae) studies: *Application of RNAi in triatomines*. **Insect Science**, v. 20, n. 1, p. 40–52, fev. 2013a.
- PAIM, R. M. M. et al. Long-term effects and parental RNAi in the blood feeder *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 11, p. 1015–1020, nov. 2013b.
- PAIM, R. M. M. Genômica funcional de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae): avaliação da persistência do silenciamento (RNAi) e caracterização in vivo de genes importantes na interação do inseto com hospedeiros e parasitos. p. 160, 2014.
- PAIM, R. M. M. et al. Functional aspects of salivary nitric oxide synthase of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) and nitric oxide trafficking at the vector-host interface. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16036, 22 nov. 2017.
- PRIDGEON, J. W. et al. Topically Applied *AaeIAP1* Double-Stranded RNA Kills Female Adults of *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 3, p. 414–420, 1 maio 2008.
- RAJAGOPAL, R. et al. Silencing of Midgut Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by Double-stranded RNA Establishes Its Role as *Bacillus thuringiensis* Toxin Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46849–46851, dez. 2002.
- REIS, M. M.; MEIRELLES, R. M. S.; SOARES, M. J. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Tissue and Cell**, v. 35, n. 5, p. 393–400, out. 2003.
- RIBEIRO, J.; ARCA, B. From sialomes to the sialoverse: an insight into the salivary potion of blood feeding insects. v. 37, p. 59–118, 2009.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. Reversible Binding of Nitric Oxide by a Salivary Heme Protein from a Bloodsucking Insect. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 539–541, 23 abr. 1993.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. Role of Salivary Antihemostatic Components in Blood Feeding by Triatomine Bugs (Heteroptera). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 599–610, 1 jul. 1998.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 61–79, jan. 2004.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. An Insight Into the Sialotranscriptome of *Triatoma rubida* (Hemiptera: Heteroptera). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 563–572, 1 maio 2012.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2594, 9 jan. 2014.

RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 48, n. 1, p. 73–88, jan. 2003.

RIBEIRO, J. M. C.; GARCIA, E. S. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 26, n. 5, p. 303–307, jan. 1980.

RIBEIRO, J. M. C.; SCHNEIDER, M.; GUIMARÃES, J. A. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochemical Journal**, v. 308, n. 1, p. 243–249, 15 maio 1995.

SANT'ANNA, M. R. V. et al. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 12, p. 1459–1465, dez. 2001.

SANT'ANNA, M. R. V. et al. Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) blood intake: Physical constraints and biological adaptations. **Journal of Insect Physiology**, v. 97, p. 20–26, fev. 2017.

SANTIAGO, P. B. et al. The Pharmacoepa within Triatomine Salivary Glands. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 3, p. 250–265, mar. 2020.

SCHOFIELD, C. J. **Triatominae: biology & control**. Bognor Regis: Eurocommunica, 1994.

SOARES, A. C. et al. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 5, p. 468–472, maio 2006.

TANEJA, J.; GUERIN, P. M. Oriented responses of the triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours on a servosphere. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 176, n. 4, abr. 1995.

TARACENA, M. L. et al. Genetically Modifying the Insect Gut Microbiota to Control Chagas Disease Vectors through Systemic RNAi. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003358, 12 fev. 2015.

TIAN, H. et al. Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6225, 13 jul. 2009.

TIMMONS, L.; FIRE, A. Specific interference by ingested dsRNA. **Nature**, v. 395, n. 6705, p. 854–854, out. 1998.

TRUMPER, E. V.; GORLA, D. E. Density-dependent timing of defaecation by *Triatoma infestans*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 800–802, jan. 1991.

VALENZUELA, J. G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S83–S94, out. 2004.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: Vector–parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2–3, p. 137–147, maio 2009.

VASSENA, C. V.; PICOLLO, M. I.; ZERBA, E. N. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, n. 1, p. 51–55, mar. 2000.

WANG, K. et al. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation in vivo. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 77, p. 1–9, out. 2016.

WANG, Y. et al. Second-Generation Sequencing Supply an Effective Way to Screen RNAi Targets in Large Scale for Potential Application in Pest Insect Control. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18644, 11 abr. 2011.

WHYARD, S.; SINGH, A. D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 11, p. 824–832, nov. 2009.

WULFF, J. P. et al. Orcokinin neuropeptides regulate ecdysis in the hemimetabolous insect *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 81, p. 91–102, fev. 2017.

YU, N. et al. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions: *Delivery of dsRNA for RNAi in insects*. **Insect Science**, v. 20, n. 1, p. 4–14, fev. 2013.

ZAMORE, P. D. et al. RNAi. **Cell**, v. 101, n. 1, p. 25–33, mar. 2000.

ZHU, F. et al. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Ingested RNA interference for control of *L. decemlineata*. **Pest Management Science**, v. 67, n. 2, p. 175–182, fev. 2011.