

Tese de doutorado

Flávia Viana Ferreira

Caracterização das vias de RNA de interferência na
resposta a infecção viral em *Lutzomyia longipalpis*

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Belo Horizonte, 2015

Tese de doutorado

Flávia Viana Ferreira

Caracterização das vias de RNA de interferência na
resposta a infecção viral em *Lutzomyia longipalpis*

Defesa de tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. João Trindade Marques

Co-Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Belo Horizonte, 2015

AGRADECIMENTOS

Impossível não agradecer àquele que sempre me apoiou e que sempre me mostrou que podemos ir sempre mais além. Mostrou-me que não têm limites quando existe determinação, disciplina e principalmente força de vontade. A sua dedicação à ciência e os seus ensinamentos sempre são um estímulo para quem tem a oportunidade de conviver com você. Tenho muito orgulho de ser sua aluna, João. Muito obrigada por sua orientação, amizade, conversa, puxões de orelha, incentivo e por me permitir fazer parte de sua equipe. "Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Foram exatos 8 anos de convívio e orientação. Professora Erna, foi uma honra ter convivido com a senhora durante todo este tempo. Obrigada por todas as conversas, apoio, paciência e por ter sido chefe nos momentos de aprendizado e amiga nos momentos que mais precisava dos seus conselhos. O meu carinho, admiração e gratidão serão eternos. Muito obrigada!

Aos nossos colaboradores: Ao Maurício, César e a toda equipe do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos por nos cederem os flebotomíneos. Ao Jean-Luc Imler pelo sequenciamento e análises das bibliotecas.

Aos professores e funcionários do departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos e serviços prestados.

Aos queridos professores do Laboratório de Vírus: Paulo, Cláudio, Giliane e Jônatas e ao melhor técnico de todos os tempo, JR. Vocês foram essenciais no meu aprendizado e na minha formação acadêmica! Obrigada por tudo.

A todos que tive o prazer de conhecer e conviver durante todos os anos de Laboratório de Vírus. Foi um prazer trabalhar com todos vocês. Obrigada a todos por toda a atenção, amizade, conversas, paciência e principalmente pelo maravilhoso ambiente de trabalho. Levo com carinho todos os momentos de uma época inesquecível!

Aos amigos do Laboratório RNAi: com vocês tudo tornou mais leve, mais prazeroso e divertido. Com vocês, as conversas na bancada, nas reuniões e na hora do bar fez os meus dias mais felizes. Obrigada pela torcida, apoio e amizade durante esta caminhada. Sou muito feliz em fazer parte desta família.

À Fabíola e as meninas do Laboratório de Neurociência, pelas conversas, brincadeiras e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos amigos, por sempre acreditarem em mim e tornarem tudo mais leve com uma boa conversa.

A minha família, por me compreender e por sempre estar do meu lado!

Aos meus pais, pelos melhores abraços, pelo carinho, pelo amor!

LISTA DE ABREVIATURA

Ago1- proteína Agonauta-1 da via de RNAi

Ago2- proteína Agonauta-2 da via de RNAi

ATCC: American Type Culture Collection

BOD: baixo oxigênio dissolvido

CMC: carboximetilcelulose

dsRNA: RNA dupla fita

HEN1: metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina

hs: horas

IMD: via imune deficiente

loqs- proteína Loquacious da via de RNAi

MEM: mínimo essencial Eagle

mL: mililitro

ncRNA: pequenos RNAs não codificantes

ng: nanograma

nm: nanômetros

pfu: unidade formadora de placa

RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA

RFV: *Rift Valley Fever Virus*

RNA- ácido ribonucleico

RNAi- via de RNA de interferência

ROS: espécies de oxigênio reativo

U.S.A: Estados Unidos da América

VSV- *Vesicular stomatitis virus*

μL: microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de miRNA em <i>D.melanogaster</i>	14
Figura 2 Via de piRNA em <i>D. melanogaster</i>	17
Figura 3: Via de siRNA ativada por diferentes fontes de dsRNA.....	20
Figura 4: Caraterização do gene Dicer-2 de <i>L. longipalpis</i>	37
Figura 5: Caraterização do gene r2d2 de <i>L. longipalpis</i>	38
Figura 6: Caraterização do gene Ago2 de <i>L. longipalpis</i>	39
Figura 7: Caraterização do gene drosha de <i>L. longipalpis</i>	41
Figura 8: Caraterização do gene Dicer-1 de <i>L. longipalpis</i>	42
Figura 9: Caraterização do pasha de <i>L. longipalpis</i>	43
Figura 10: Caraterização do Ago1 de <i>L. longipalpis</i>	44
Figura 11: Caraterização do gene loqs de <i>L. longipalpis</i>	45
Figura 12: Caraterização da Ago3 de <i>L. longipalpis</i>	47
Figura 13 Caraterização das piwi de <i>L. longipalpis</i>	48
Figura 14: Análises filogenéticas de proteínas Ago em flebotomíneos.....	53
Figura 15: Análises filogenéticas de proteínas ribonucleases RNAsIII em flebotomíneos.....	54
Figura 16: Cinética da infecção do VSV em células LL5.....	56
Figura 17: Infecção produtiva do VSV em células de inseto.....	57
Figura 18: Cinética de multiplicação do VSV em fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectadas por alimentação artificial.....	59
Figura 19: Quantidade de VSV necessário para infectar flebotomíneos por alimentação.....	60
Figura 20: Os genes da via de siRNA não alteram a expressão após a infecção de <i>L. longipalpis</i> após a alimentação com sangue.....	62
Figura 21: Detecção do rRNA 2S em <i>L. longipalpis</i>	64
Figura 22: Grupos de RNA de <i>L. longipalpis</i> selecionadas para o preparo das bibliotecas de pequenos RNAs.....	65
Figura 23: Os vsiRNAs são originados ao logo de todo genoma viral.....	67
Figura 24: Produção de vsiRNA aumenta durante a infecção de flebotomíneos com o VSV.....	69
Figura 25: Silenciamento da Ago2 de <i>L. longipalpis</i>	70

Figura 26: Pequenos RNAs mapeados no genoma de <i>L. longipalpis</i> mostram enriquecimento de tamanhos entre 21-23 nucleotídeos e 24-30 nucleotídeos..	72
Figura 27: Detecção de três novos vírus após o sequenciamento de pequenos RNAs em flebotomíneos.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na detecção de carga viral e expressão gênica em células e <i>L. longipalpis</i>	30
Tabela 2 Proteínas de <i>D. melanogaster</i> utilizada na busca por genes das vias de RNAi em <i>L. longipalpis</i>	34
Tabela 3 Genes das vias de RNAi identificados no genoma de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	36
Tabela 4: Genes das vias de RNAi em <i>P. papatasi</i>	49
Tabela 5: Número de cópias dos genes das vias de RNAi de <i>L. lutzomyia</i> e <i>P. papatasi</i> comparados com alguns Diptera	50
Tabela 6: Genes das vias de RNAi de insetos e outros organismos utilizados nas análises filogenéticas.....	51
Tabela 7: Dados obtidos após o sequenciamento dos pequenos RNAs.	66

RESUMO

O aumento de casos de doenças transmitidas por insetos vetores têm contribuído cada vez mais com os encargos de saúde pública. O inseto ainda é o foco para a adoção de estratégias de controle e, para isso é essencial compreender os mecanismos envolvidos na resposta a infecção. Diversos estudos já mostraram a participação dos pequenos RNAs não codificadores (ncRNA), produtos das vias de RNA de interferência (RNAi; miRNA, siRNA e piRNA), nos processos biológicos do inseto e do papel protetor para algumas infecções, como por exemplo as causadas por arbovirus. O sequenciamento dos genomas de alguns insetos vetores facilitou o entendimento de vários destes mecanismos. Em flebotomíneos, o genoma já foi sequenciado e está em fase de anotação o que irá auxiliar no desenvolvimento de diversos estudos. Assim, neste trabalho, nós fizemos a anotação, caracterização e análises filogenéticas dos genes componentes das vias de RNAi, miRNA, piRNA e siRNA, em flebotomíneos. Os componentes das vias são conservados em insetos, sendo observado uma maior divergência entre proteínas das vias de siRNA e piRNA, que estão envolvidas na proteção antiviral e no controle de elementos móveis. Como as vias de siRNA e piRNA tem atividade antiviral em outros insetos, nós também analisamos ncRNAs produzidos em flebotomíneos após infecção pelo *Vesicular stomatitis virus* (VSV), um *Rhabdovirus* naturalmente transmitido por flebotomíneos na natureza. A análise dos pequenos ncRNA mostrou que a via de siRNA é a principal ativada após a infecção. Contudo, os ensaios funcionais para verificar se a via atua como uma resposta antiviral, sugerem que tratamento com dsRNA estimula, de forma não específica, a expressão gênica. Isto nos impediu de concluir algo sobre a funcionalidade desta via durante a infecção. É importante ressaltar que ncRNAs correspondentes as três vias de RNAi endógenas estão presentes no flebotomíneo, mesmo sem a infecção pelo vírus. Estudos estão em andamento para finalizar a caracterização das outras vias de RNAi em flebotomíneos em comparação aos outros insetos. Estes dados serão de grande uso para a comunidade.

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	3
1.1.	Insetos vetores	3
1.1.1.	Os Flebotomíneos	4
1.1.2.	Flebotomíneos como vetores da leishmaniose	6
1.1.3.	Flebotomíneos como vetores da transmissão de arbovirus	8
1.2.	As vias de RNA de interferência.....	11
1.2.1.	A via dos miRNAs	13
1.2.2.	A via dos piRNAs	15
1.2.3.	A via dos siRNAs.....	18
2.0.	JUSTIFICATIVA	21
3.0.	OBJETIVOS	22
3.1.	Objetivo Geral	22
3.2.	Objetivos específicos	22
4.0.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1.	Identificação e anotação dos genes componentes das vias de RNAi	23
4.2.	Análises filogenéticas	23
4.3.	Linhagens celulares	24
4.4.	Obtenção do estoque viral.....	25
4.5.	Cinética de infecção em células	26
4.6.	Manutenção da colônia de insetos	26
4.7.	Estratégia de infecção viral dos flebotomíneos por alimentação.....	27
4.8.	Extração do RNA total.....	28
4.9.	Quantificação relativa de RNA pela técnica de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (RT-qPCR).....	29
4.9.1.	Transcrição reversa (RT).....	29
4.9.2.	Desenho dos iniciadores	29
4.9.3.	PCR quantitativo (qPCR).....	30
4.10.	Preparo do RNA para a construção das bibliotecas	31
4.11.	Preparo das bibliotecas	31
4.12.	Pré-processamento das bibliotecas	31
4.13.	Análise dos pequenos RNAs.....	32

4.14. Experimento de silenciamento gênico	32
5.0. RESULTADOS	33
5.1. Identificação e anotação dos genes das vias de RNA de interferência no genoma de Flebotomíneos.....	33
5.2 - Análises filogenéticas.....	50
5.3. Padronização de modelo para infecção de arbovirus.....	55
5.3.1. Cinética de multiplicação em células de inseto	55
5.3.2 Infecção de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	58
5.4. Análise da expressão dos genes da via de RNAi.....	61
5.5. Análise dos pequenos RNAs em <i>L. longipalpis</i>	63
5.6. Caracterização funcional da via dos siRNAs em células de flebotomíneos	70
5.7. Análise global dos pequenos RNAs derivados do genoma de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	71
5.8. Identificação de vírus a partir dos dados de pequenos RNAs	73
6.0 DISCUSSÃO	75
7.0 CONCLUSÃO.....	80
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1.0 INTRODUÇÃO

Algumas das doenças infecciosas humanas mais importantes do mundo são transmitidas por artrópodes vetores, como mosquitos ou carrapatos. Infelizmente, as estratégias disponíveis para aliviar o impacto de muitas dessas doenças são insuficientes, e os encargos de saúde pública de algumas das principais ameaças, como a malária, leishmaniose e dengue está aumentando (WHO, 2002). Historicamente, algumas das medidas mais eficazes de saúde pública contra as doenças transmitidas por vetores têm sido aquelas focadas no controle do próprio vetor. Nos últimos anos, o estudo da genômica destes vetores artrópodes, principalmente os insetos, tem muito ajudado no entendimento da biologia natural destes animais (Hill, Kafatos et al. 2005).

1.1. Insetos vetores

Estimativas feitas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que as doenças transmitidas por insetos vetores são responsáveis pela morte de 1,5 milhão de pessoas anualmente. As principais delas, malária, dengue e leishmaniose são doenças transmitidas por insetos da família *Culicidae* (gênero *Anopheles* e *Aedes*) ou da família *Psychodidae* (gênero *Lutzomyia*) respectivamente. (Hill, Kafatos et al. 2005).

Historicamente, a transmissão de muitas destas doenças têm sido controladas tendo o vetor como o foco. Contudo, em muitos casos estas doenças são transmitidas por mais de uma espécie, o que limita na implementação de estratégias de controle. Nesta linha, várias medidas se tornaram mais eficazes após a era genômica do inseto vetor, iniciado com o sequenciamento do *Anopheles gambiae*, principal vetor da malária (Holt, Subramanian et al. 2002) Atualmente outros insetos como *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue (Nene, Wortman et al. 2007), *Culex quinquefasciatus* principal vetor para o West Nile (Arensburger, Megy et al. 2010), *Glossina morsitans* principal vetor para a doença do sono (International Glossina Genome 2014) também já tiveram o genoma sequenciado. Estes projetos

genômicos melhoraram o conhecimento da biologia dos vetores e ajudaram no desenvolvimento de insetos transgênicos e de estratégias de limitação da infecção no inseto vetor (Catteruccia, Nolan et al. 2000, Dimopoulos, Christophides et al. 2002, Ito, Ghosh et al. 2002)

Os mesmos esforços estão sendo aplicados para o sequenciamento do *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*. As informações genéticas fornecidas pelo genoma destes insetos irão auxiliar no desenvolvimento de estudos da biologia do vetor, de respostas imunes e de possíveis caracterizações de alvos envolvidos na infecção por patógenos.

1.1.1. Os Flebotomíneos

O inseto palha, nome popular dado aos flebotomíneos, se refere a cor pálida do inseto. Esta nomenclatura não é considerada a mais adequada e, portanto flebotomíneo é o termo mais correto para referir-se ao inseto vetor da leishmaniose. Este inseto é agrupado na ordem Diptera, subordem Nematocera família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* e é estimado que exista mais de 800 espécies em diferentes regiões do mundo. A classificação taxonômica destes insetos é controversa e ainda é baseada nas classificações pioneiras feitas por (Theodor 1948). Nesta classificação é proposta a existência de dois gêneros (*Sergentomyia* e *Phlebotomus*) no Velho Mundo e de três gêneros (*Brumptomyia*, *Warileya* e *Lutzomyia*) no Novo mundo. Na China, algumas espécies de flebotomíneos com características primitivas são classificadas como pertencentes ao gênero *Chinius* (Leng 1987).

Os flebotomíneos são encontrados em regiões de clima quente da Ásia, África, sul da Europa e Américas (Killick-Kendrick 1999), mas ainda não foram encontrados na Nova Zelândia nem nas Ilhas do Pacífico (Maroli, Feliciangeli et al. 2013)

O desenvolvimento dos flebotomíneos se dá por metamorfose completa, passando por quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva (4 estágios) pupa e adulto. As fases mais imaturas do inseto necessitam de umidade e calor para completar seu desenvolvimento. As fêmeas de flebotomíneos têm preferência em colocar os ovos em ambientes ricos em matéria orgânica que servirá como alimento para as larvas dos estágios iniciais. Os ovos destes insetos apresentam tamanhos com 0.3 -0.5 mm e apresentam coloração clara logo após a postura, tornando com aspecto escurecido poucas horas após. O tempo de desenvolvimento dos primeiros estágios larvais, após a fêmea ter alimentado do sangue varia de 12 a 19 dias e elas conseguem mover distâncias muito curtas do local de oviposição. O tempo de oviposição até a fase de pupa varia entre 25-59 dias e entre 35-59 dias até o estágio do inseto adulto. (Volf and Volfova 2011, Maroli, Feliciangeli et al. 2013).

O inseto adulto apresenta cerca de 3.5 mm de diâmetro corporal e é conhecido por ter uma densa cobertura de pêlos no dorso e apresentarem patas longas. Além disso, os adultos apresentam uma coloração que varia de tons claros aos mais escuros. Estes insetos vivem aproximadamente 40 dias e apresentam uma característica de manter as asas em formato “V” quando estão em repouso. Os flebotomíneos apresentam um voo com velocidade menor que 1m/s e é considerada baixa comparada com a de mosquito. A média de voo também é considerada curta (300 metros) o que, associado a baixa velocidade é um fator limitante para a dispersão destes insetos (Killick-Kendrick, Wilkes et al. 1986).

Tanto machos quanto as fêmeas alimentam-se de seiva de plantas, mas a fêmea precisa de realizar ao menos uma alimentação sanguínea para que ocorra a maturação dos ovos. Poucas espécies de flebotomíneos conseguem produzir ovos viáveis sem que tenham alimentado de sangue. Diferente dos mosquitos, os flebotomíneos atacam os hospedeiros de uma maneira silenciosa e apresentam hábitos mais noturnos e também em períodos da manhã (Maroli, Feliciangeli et al. 2013). Um fato interessante dos flebotomíneos é a forma como se alimentam no hospedeiro: o aparelho bucal

do inseto rasga a pele do hospedeiro e, com a saída do sangue dos capilares é formado uma poça, pela qual se alimentam. Esta característica é conhecida como alimentação em poço (Bates 2007). É próximo ao hospedeiro que ocorre o acasalamento dos flebotomíneos, onde os machos se reúnem liberando ferômonios sexuais e é vibrando as asas que eles atraem as fêmeas (Oliveira, Bottecchia et al. 2001).

Os flebotomíneos são conhecidos por serem vetores potenciais para diversas doenças de grande importância para a saúde pública. A principal delas é a leishmaniose, mas podem também transmitir outras doenças emergentes e re-emergentes causadas por bactérias (*Bartonella bacilliformis*) e também por arbovírus (Maroli, Feliciangeli et al. 2013).

1.1.2. Flebotomíneos como vetores da leishmaniose

A leishmaniose, causada pelo parasito *Leishmania sp* é considerada uma das doenças negligenciadas de maior importância mundial. A Organização mundial estima que cerca de 350 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção da leishmaniose e que 12 milhões de casos (incluindo as 600.000 morte) ocorram anualmente (Hotez, Remme et al. 2004).

Dentro das estimadas 800 espécies de flebotomíneos existentes, somente 98 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são vetores transmissores da leishmaniose humana. No Velho Mundo, cerca de 42 espécies são conhecidas por transmitirem a leishmaniose. As espécies do gênero *Phlebotomus* parecem estar envolvida na transmissão de apenas uma espécie de *Leishmania sp*, exceto o *Phlebotomus sergenti* na Etópia, que é considerado vetor para duas espécies (Gebre-Michael, Balkew et al. 2004). Nos flebotomíneos do Novo mundo, 56 espécies do gênero *Lutzomyia* estão envolvidos na transmissão de mais de 15 espécies de *Leishmania sp*. Ao contrário dos *Phlebotomus*, as espécies do gênero *Lutzomyia* podem transmitir mais de uma espécie do parasito. (Maroli, Feliciangeli et al. 2013).

Os agentes causadores da leishmaniose são parasitos pertencentes a classe Kinetoplastida e gênero *Leishmania*, transmitidos durante a alimentação de flebotomíneos. Os hospedeiros são comumente vertebrados, afetando principalmente humanos, cães e gatos (Kaye and Scott 2011). Cerca de 20 espécies e subespécies de *Leishmania* são patogênicas para humanos, podendo causar a leishmaniose com diversas manifestações clínicas. A leishmaniose visceral, causada pela *L. donovani* (Velho Mundo) e *L. infantum* (Novo Mundo) é considerada a forma mais grave e tem uma estimativa anual de 500.000 casos (Desjeux 1996). Várias *Leishmania sp* causam a doença tegumentar, que apresenta um espectro clínico de lesão variando de local, disseminada e difusa (Maroli, Feliciangeli et al. 2013).

A transmissão de *Leishmania sp* ocorre no momento do repasto sanguíneo do flebotomíneo no hospedeiro. A saliva do inseto contém uma variedade de anticoagulantes, agente vasodilatadores e anti-plaquetários, além de moléculas imunomodulatórias e anti-inflamatórias (Andrade, de Oliveira et al. 2007). Estas modificações imunes são partes da coevolução do vetor com o parasito. Alguns estudos já mostraram que o parasito consegue infectar melhor o hospedeiro na presença da saliva do flebotomíneo, porém quando camundongos foram previamente expostos a saliva do inseto, foi observado uma tolerância destes animais a infecção pelo parasito (Titus and Ribeiro 1988, Samuelson, Lerner et al. 1991, Donnelly, Lima et al. 1998). Algumas moléculas imunomodulatórias da saliva já estão sendo analisadas como candidatas para o desenvolvimento da vacina (de Moura, Oliveira et al. 2007).

As vacinas seriam um dos métodos mais eficazes no controle da doença, contudo atualmente existem vacinas comerciais somente para a leishmaniose canina (Palatnik-de-Sousa 2012). Apesar dos esforços feitos, as vacinas para a leishmaniose humana ainda estão em fase de desenvolvimento (Alvar, Croft et al. 2013, Das, Freier et al. 2014). As medidas de controle são baseadas em tratamentos que, além do custo elevado, apresentam efeitos colaterais adversos. Assim, as principais medidas de controle da leishmaniose, ainda são com foco no vetor (Stockdale and Newton 2013).

Diversos estudos visam compreender a biologia do inseto e os mecanismos envolvidos na infecção com o parasito. As barreiras de infecção para o parasito, são consideravelmente estudadas em flebotomíneos. Uma das principais seria o papel que as enzimas digestivas desempenham na sobrevivência do parasito (Borovsky and Schlein 1987). A tripsina é considerada uma das mais importantes proteínas envolvidas na digestão do sangue e, já foi mostrado o seu papel protetor nas infecções pelo parasito no intestino (Sant'anna, Diaz-Albiter et al. 2009). Diversos estudos já mostraram a importância da microbiota nas infecções pelo parasito, além da caracterização de genes de resposta imune e de moléculas reativas envolvidas na resposta à infecção (Telleria, Sant'Anna et al. 2012, Sant'Anna, Diaz-Albiter et al. 2014).

Todos estes estudos são extremamente importantes para conhecer melhor os mecanismos envolvidos na interação do flebotomíneo com o parasito, para futuramente adotar estratégias de controle à transmissão do parasito. Contudo, é importante considerar que os flebotomíneos também são vetores para muitos arbovirus de importância médica ainda desconhecida.

1.1.3. Flebotomíneos como vetores da transmissão de arbovirus

Os principais vírus transmitidos pelos flebotomíneos pertencem aos membros do gênero *Phlebovirus* (família *Bunyaviridae*) e gênero *Vesiculovirus* (família *Rhabdovirus*). Os *Orbivirus* (família *Reoviridae*) também transmitidos por flebotomíneos compreendem 12 espécies que circulam na América e pertencem ao grupo *Changuinola virus* (Tesh et al., 1977).

O gênero *Phlebovirus* representa a maioria dos vírus transmitidos por flebotomíneos e são considerados endêmicos da região do Mediterrâneo da Europa. O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) reconheceu alguns complexos antigênicos do gênero *Phlebovirus* associados à flebotomíneos no Velho Mundo: *Sandfly fever Naples virus* (inclui os *Sicilian*

virus, *Naples virus* e *Toscana virus*) e *Salehabad virus* (*Salehabad virus* e *Arbia virus*) (Depaquit, Grandadam et al. 2010, Maroli, Feliciangeli et al. 2013).

Insetos *P. papatasi* já foram encontrados na natureza infectados com o *Sandfly fever Sicilian virus* e o *Sandfly fever Naples virus* e já existem estudos que correlacionam o papel de alguns roedores como possíveis reservatórios para estes vírus (Schmidt, Schmidt et al. 1971, Chastel, Launay et al. 1982, Chastel, Bach-Hamba et al. 1983, Le Lay-Rogues, Valle et al. 1983, Depaquit, Leger et al. 2001). Na América Central o *Lutzomyia sp* é o vetor transmissor do *Punta Toro virus*, considerado o vírus mais próximo filogeneticamente do *Rift Valley virus* (associado a causas de morte em humanos) e utilizado como modelo alternativo para estudo de resposta imune (Gowen, Wong et al. 2007).

O *Toscana virus* (TOSV), também do gênero *Phlebovirus*, pode causar desde enfermidades semelhantes às causadas pela influenza até casos de meningite (Braito, Ciufolini et al. 1998). Este vírus pode infectar o vetor (*Phlebotomus sp*) por via transovariana quanto por via venérea (Tesh and Modi 1987). É sugerido que o próprio vetor seja o reservatório deste vírus, apesar do vírus já ter sido isolado em cérebros de morcego (*Pipistrellus kuhli*) (Tesh, Chaniotis et al. 1974) e em outros insetos não hematófagos (*Sergentomyia minuta*) (Charrel, Izri et al. 2006). Também já foram isolados na natureza, flebotomíneos infectados tanto com o parasito quanto com o TOSV e, os riscos de uma possível coinfeção também já foram confirmados em pacientes com leishmaniose com o vírus (Es-Sette, Ajaoud et al. 2014). (Bichaud, Souris et al. 2011).

O *P. papatasi* é considerado um eficiente vetor natural para o *Chandipura virus* (gênero *Vesiculovirus*) e já foi mostrado, sob condições de laboratório, a multiplicação viral com transmissão venérea e transovariana (Dhanda, Rodrigues et al. 1970, Tesh and Modi 1983, Mavale, Fulmali et al. 2006).

Os insetos *Lutzomyia sp* apresentam importante papel na manutenção de *Vesiculovirus* na natureza. Diversas observações já mostram que este inseto é o vetor biológico para aproximadamente 10 de 16 *Vesiculovirus* na natureza. No Brasil, já foram encontrados o *Caraja virus* e o *Maraba virus* em flebotomíneos coletados em campo. (Travassos da Rosa, Tesh et al. 1984). (Comer, Tesh et al. 1990, Comer, Corn et al. 1992). Diversos estudos já mostram a capacidade e competência vetorial dos flebotomíneos em infecções com o *Vesicular stomatitis virus* (VSV): detecção de machos e fêmeas infectadas na natureza, capacidade de transmitir o vírus para um hospedeiro vertebrado e detecção de fêmeas infectas em locais de surto da estomatite vesicular bovina. (Tesh, Chaniotis et al. 1971, Tesh, Chaniotis et al. 1974, Tesh, Boshell et al. 1987, Comer, Tesh et al. 1990, Comer, Corn et al. 1992, Clarke, Stallknecht et al. 1996). Análises feitas em células de linhagem contínua LL5, derivadas de ovos de flebotomíneo (Tesh and Modi 1983), mostraram que este vírus também estabelece uma infecção persistente neste modelo, sugerindo ser uma ferramenta opcional para análises de mecanismos envolvidos na infecção do VSV com o flebotomíneo (Llewellyn, Salman et al. 2002).

O VSV é um vírus envelopado com 45 a 100 nm de diâmetro e 100 a 430nm de comprimento. Apresenta genoma de RNA fita simples com cerca de 11 a 12 kb, não segmentado e de polaridade negativa. Logo após a etapa de desnudamento viral, o RNA genômico serve de molde para RNA polimerase viral transcrever cinco mRNA. O acúmulo de proteínas estimula a síntese de um RNA antígenômico (polaridade positiva) que servirá de molde para a síntese de mais RNA genômico. A polimerase viral (gene L) apresenta uma taxa de erro variando entre 1×10^{-4} a 2×10^{-5} substituições de nucleotídeos a cada replicação do genoma viral (Drake and Holland 1999). No envelope encontra-se a glicoproteína (proteína G) que está associada ao processo de adsorção e penetração do vírus. O nucleocapsídeo também está associado à proteína de matriz (proteína M), que é responsável pela forma de projétil adquirida pelo vírus (Fields Virology, 2007).

O VSV apresenta diferenças sorológicas conhecidas como os sorotipos VSV *Indiana* (protótipo), VSV *New Jersey* e VSV *Alagoas*. (ICTV) São vírus responsáveis por causarem a estomatite vesicular, uma doença de baixa mortalidade, mas que causa grandes prejuízos econômicos no setor agropecuário. Além disso, são considerados vírus protótipo em estudos de penetração, multiplicação e montagem de partículas virais, devido ao seu amplo espectro de hospedeiros e um ciclo de multiplicação simples, que pode ser estudado em uma grande variedade de células de mamíferos e de insetos (WHITT, 2010).

Apesar do grande número de vírus transmitidos por flebotomíneos, existem poucos estudos sobre os mecanismos envolvidos na resposta deste inseto à infecção viral. Em insetos, a principal resposta antiviral é a via de RNA de interferência (RNAi), mas em flebotomíneos nada se sabe sobre a participação destas vias em respostas a infecções.

1.2. As vias de RNA de interferência

O reconhecimento de ácido nucléico viral é comumente utilizado em bactérias, plantas e animais. Esta é a base para o sistema de defesa CRISPR em procariotos e RNA de interferência (RNAi) em eucariotos (de Faria, Olmo et al. 2013)

O termo RNAi foi inicialmente descrito para descrever o silenciamento gênico causado após a injeção de dsRNA em *Caenorhabditis elegans* (Fire, Xu et al. 1998). Atualmente, este termo é usado para referenciar as vias em que, pequenos RNAs não codificantes (ncRNA) associados com proteínas argonauta, são usados para regular a expressão gênica. Este mecanismo de regulação acontece com a biogênese dos ncRNA, pelas proteínas Dicer (RNaseIII), que irão se associar com as argonautas, formando o complexo ribonucleoprotéico, conhecido como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que irá desempenhar a função biológica de regulação gênica (Joshua-Tor and Hannon 2011). Em eucariotos existem uma grande variedade

de proteínas argonautas e de ncRNA que realizam diversas funções biológicas (Batista and Marques 2011).

As Dicer são as proteínas que irão processar o dsRNA em pequenos tamanhos de 21-24 nucleotídeos (Zamore, Tuschl et al. 2000) e são constituídas pelos domínios de reconhecimento ao dsRNA (DSRM), helicase, PAZ, DUF e RNaseIII, que, em conjunto, permitem a enzima reconhecer o dsRNA e processá-los. Em alguns fungos e protozoários, a Dicer não contém o domínio helicase (Carmell and Hannon 2004).

A argonauta é o componente principal para o silenciamento do RNA alvo e o seu funcionamento pode ser amplamente diverso, mas geralmente o resultado final é o silenciamento do alvo. A argonauta apresenta uma arquitetura biológica composta de domínio PAZ na região N-terminal e domínio Piwi na região C-terminal da proteína (Wang, Juranek et al. 2009). O domínio Piwi adota uma estrutura RNase H que confere a proteína a capacidade de atividade de clivagem (Song, Smith et al. 2004). O domínio Mid sequestra a região 5'fosfatada da fita guia do pequeno RNA (Parker, Roe et al. 2005) e o domínio PAZ reconhece os 2 nucleotídeos não pareados na extremidade 3' da fita guia. As regiões de 2-8 nucleotídeos (região semente) do RNA guia é que reconhece a região complementar do RNA alvo (Ma, Ye et al. 2004).

A mosca *Drosophila* é um modelo muito utilizado para o estudo das vias de RNAi e pode ser utilizado como referência para outros insetos, especialmente da ordem Diptera. As vias de RNAi são definidas pelas proteínas argonautas envolvidas e pelo tamanho dos ncRNA (20-30 nucleotídeos), sendo conhecidas três classes nos animais: microRNAs (miRNA), siRNA e *piwi interacting RNA* (piRNA). A biogênese do siRNA e do miRNA envolve o reconhecimento e processamento pela RNaseIII, enquanto os piRNA tem sua biogênese de ssRNA (Soares, Goncalves et al. 2014).

1.2.1. A via dos miRNAs

Os miRNAs tem um papel importante na regulação pós transcricional de genes em plantas e animais. São essenciais para as etapas de desenvolvimento e diferenciação celular, além de estarem envolvidos na resposta ao estresse e infecção.

A biogênese do miRNAs inicia com a formação do precursor de ssRNA conhecido como pri-miRNA que se dobra formando estruturas hairpin (Cai, Hagedorn et al. 2004). Em *Drosophila*, o pri-miRNA é processado pela enzima RNAselIII nuclear, a drosha que se associa com uma proteína com domínio de ligação a dsRNA chamada pasha (Landthaler, Yalcin et al. 2004). Este primeiro evento de processamento de miRNA gera um precursor de miRNA (pre-miRNA) com aproximadamente 65 nucleotídeos, que será transportado para o citoplasma via exportin-5 (Exp-5) (Yi, Qin et al. 2003). No citoplasma, o pre-miRNA é reconhecido por outra enzima RNAselIII, Dicer-1 associada com à isoforma PB da proteína loquacious (loqs-PB) que também possui domínios de ligação a dsRNA (Forstemann, Tomari et al. 2005, Saito, Ishizuka et al. 2005). Esta segunda etapa de processamento, gera miRNA fita dupla com cerca de 22 nucleotídeos, conhecido como miRNA maduro que se associa com a Ago1 (Okamura, Ishizuka et al. 2004). Este miRNA vai ter suas fitas dissociada, ficando a fita guia junto da Ago1 que formará o RISC (miRISC) (Forstemann, Horwich et al. 2007). O miRISC procura por sequências complementares parciais na região 3' não traduzida (UTR) no mRNA alvo, inibindo a tradução por diferentes mecanismos. Em *Drosophila*, miRNA são capazes de regular a grande maioria dos genes codificadores e estão envolvidos em diversos processos biológicos (Berezikov, Robine et al. 2011). (Figura 1).

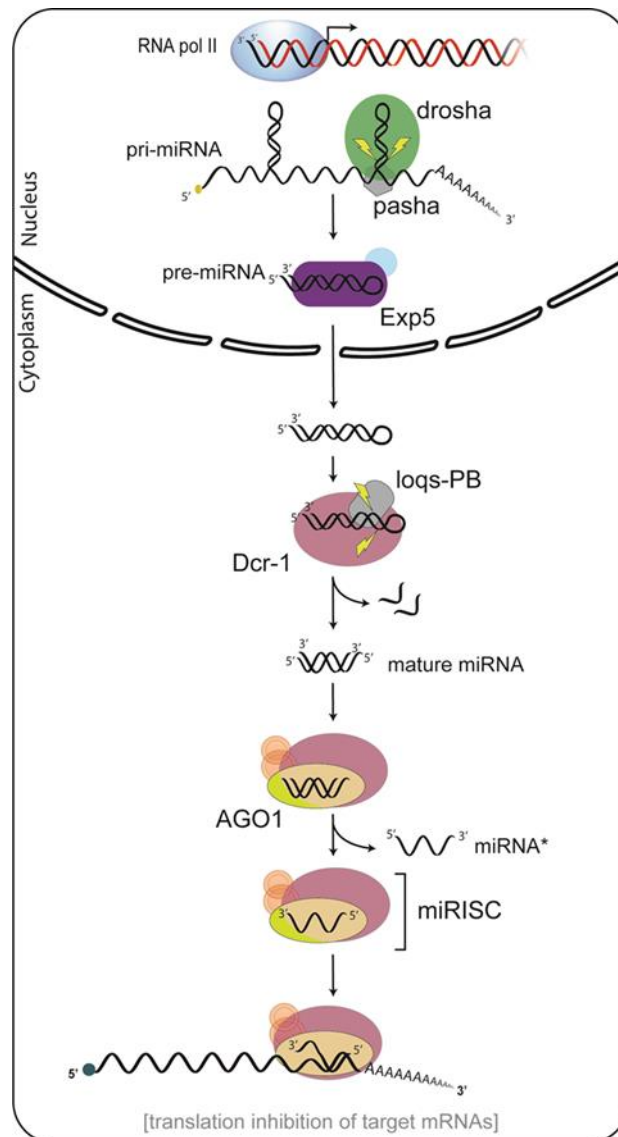


Figura 1: Via de miRNA em *D. melanogaster*. A) Os transcritos pela pol II originam os ssRNA precursores (pri-miRNA). A estrutura hairpin é reconhecida pela drosha/pasha e gera o pre-miRNA, ainda no núcleo. Este é exportado para o citoplasma (Exp-5), aonde será reconhecido pela Dicer-1/loqs-PB. Os miRNA ficam associados a Ago1 e as fitas passageiras serão liberadas (*miRNA). O miRISC é formado e, na procura por sequencias complementares parciais região 3'UTR do mRNA inibem a tradução. Fonte: (Soares, Goncalves et al. 2014)

1.2.2. A via dos piRNAs

Inicialmente, os pequenos RNAs com tamanho entre 24-30 nucleotídeos foram nomeados como siRNAs associados a sequências repetitivas (rasiRNA) (Aravin, LAGOIS-Quintana et al. 2003). Porém, mais tarde deu-se o nome de piRNAs devido a associação destes pequenos RNAs com as proteínas da família piwi. (Brennecke, Aravin et al. 2007).

As proteínas piwi formam um clado específico da proteína argonata e apresentam afinidade por pequenos RNAs e por DNA, sendo encontrados nos três domínios da vida. Estas proteínas, assim como outras argonautas, são endonucleases que clivam o alvo após complementariedade com o RNA guia (Cenik and Zamore 2011).

Apesar de alguns estudos mostrarem piRNA em células somáticas, (Malone, Brennecke et al. 2009), a grande maioria é originada de precursores ssRNA derivados de transposons e outras regiões repetitivas do genoma de células germinativas (cluster de piRNA) (Ghildiyal and Zamore 2009, Cenik and Zamore 2011). Mutações nas proteínas piwi contribui com o descontrole de transposons e regiões repetitivas, culminando na instabilidade de genes e a consequente esterilidade em animais (Aravin, Hannon et al. 2007). Contudo, já foi demonstrado piRNA originados de mRNA regular, o que sugere o papel desta via também na regulação de genes (Rouget, Papin et al. 2010). Além disso, estudos também já mostraram que piRNAs funcionam como resposta antiviral em insetos (Wu, Luo et al. 2010, Morazzani, Wiley et al. 2012, Vodovar, Bronkhorst et al. 2012)

A biogênese completa dos piRNA ainda não é totalmente compreendida, mas em *Drosophila*, o precursor do piRNA é originado da transcrição pela RNA polimerase II que é reconhecido por uma proteína associada a heterocromatina (Rhino) e uma RNA helicase (UAPS6). Estudos indicam que o tipo de precursor (senso ou antisense) depende do tipo de proteína que está associada a cromatina. Esse complexo é então transportado pelo poro nuclear

até o citoplasma aonde será reconhecido por um complexo formado por uma outra helicase (Vasa). É especulado que a formação destes complexos é que determinam a origem dos piRNAs. No citoplasma, o precursor será clivado por uma endonuclease conhecida como Zucchini (Zuc) e os fragmentos (geralmente com enriquecimento para U na região 5') são reconhecidos por proteínas acessórias (Shu e Hsp83) que irão auxiliar no carregamento para proteínas piwi ou aub. Em seguida, ocorrerá uma etapa de trimagem seguida da metilação na região 3' (Hen1). Conclui-se então, a etapa da biogênese primária de piRNA. Neste modelo é proposto que o piRNA primário antisense é gerado ou herdado (origem materna) e são carregados por proteínas piwi (aub) e direcionados ao alvo (cluster de piRNA ou mRNA de transposons) que será clivado (Luteijn and Ketting 2013).

A via secundária de piRNA inicia com o reconhecimento do piRNA antisense (vindo da biogênese primária) pelas proteínas aub (não piwi) que irá reconhecer o alvo e cliva-lo. O fragmento 3' desta clivagem é reconhecido por uma outra proteína da família piwi (Ago3) e com o auxílio de proteínas acessórias também será guiado para um novo alvo, sendo o produto desta clivagem reconhecido pela proteína aub. Este ciclo de amplificação é conhecido como sistema de amplificação por ping-pong (Brennecke, Aravin et al. 2007). Em *D. melanogaster* (machos e fêmeas), as proteínas Ago3 e aub são encontradas no citoplasma enquanto piwi é primariamente nuclear (Brower-Toland, Findley et al. 2007, Cenik and Zamore 2011, Luteijn and Ketting 2013) (Figura 2).

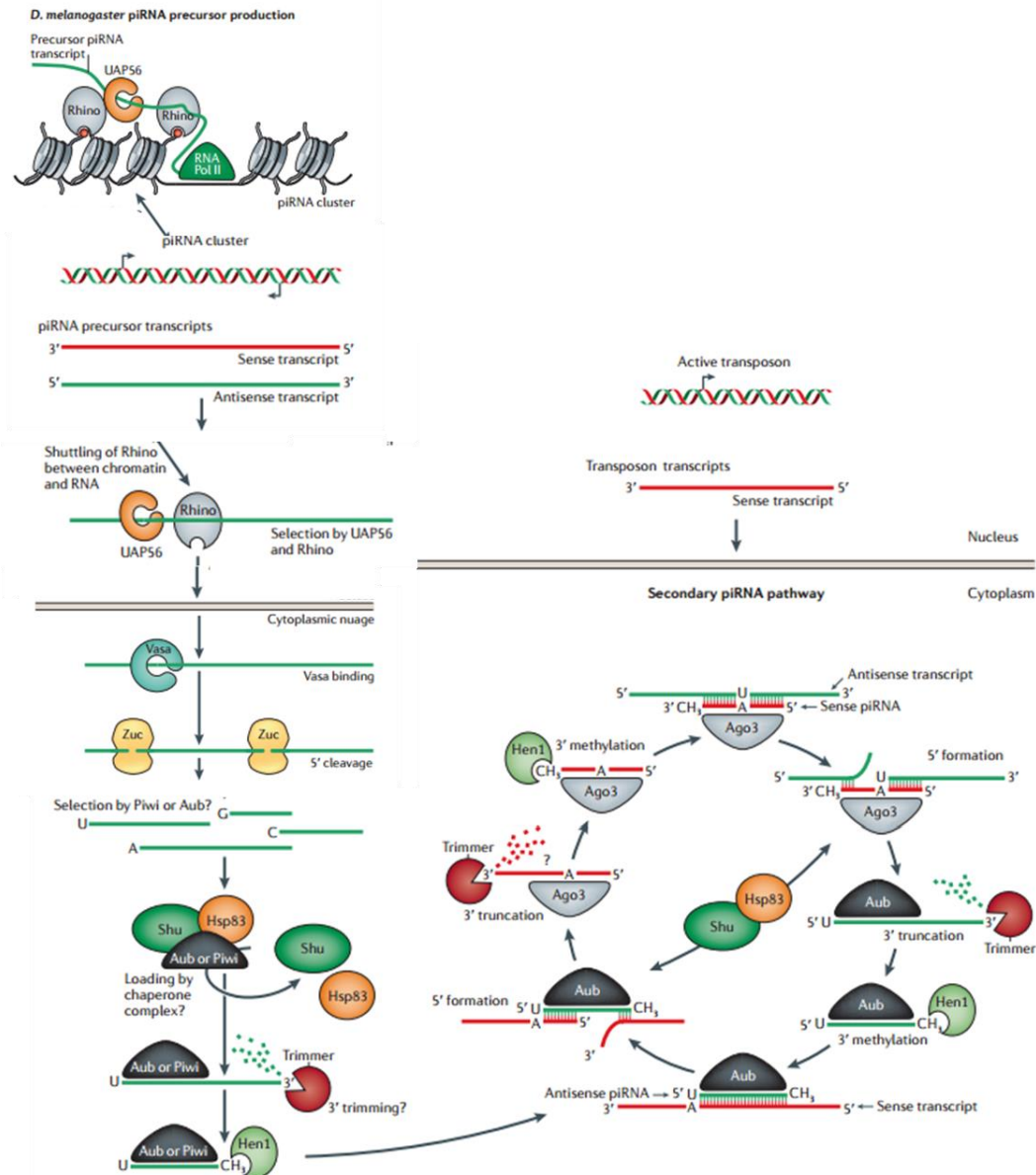


Figura 2 Via de piRNA em *D. melanogaster*. Os precursores de piRNA(ssRNA) são transcritos pela poli e reconhecidos por proteínas (Rhino e helicase UAPS6) que serão transportados para o citoplasma. Em seguida estes precursores antisensos reconhecidos pelo complexo Vasa e clivados por endonucleases (Zuc) cujos fragmentos (piRNAs) serão reconhecidos por proteínas piwi e aub. O término da biogênese do piRNA primário ocorre após trimagens e metilações (Hen1). Estes piRNA serão associados com aub que clivarão o alvo. A região 3' desta clivagem será reconhecida por proteínas Ago3, que clivarão um novo alvo, em que a região 5' deste alvo é reconhecida pela proteína aub. A este processo de amplificação, dá-se o nome de ping-pong. Fonte: Adaptado de Luteijn e Ketting 2013.

Algumas características do sistema ping-pong são bastante importantes: os piRNA associados com *aub* são antisenso ao mRNA do transposon alvo, enquanto o piRNA com *Ago3* são senso; os dez primeiros nucleotídeos do piRNA antisenso são complementares aos dez primeiros nucleotídeos do piRNA senso (assinatura ping-pong); o piRNA com *aub* tem um enriquecimento por base U na posição 1 e o piRNA senso tem um enriquecimento por base A na posição 10. Este sistema baseia no conceito de que o enriquecimento de A no piRNA senso é uma consequência do U do piRNA antisenso. Contudo, estudos recentes mostraram que a preferência de A na posição 10 do piRNA senso é originada do A na posição 1 do RNA alvo, que é reconhecido pelo U do piRNA antisenso (Wang, Yoshikawa et al. 2014).

1.2.3. A via dos siRNAs

Historicamente, análises feitas em embriões e células de *Drosophila* mostraram que dsRNA de origem exógena é que resultava na formação de pequenos RNAs (siRNA). Contudo, já se sabe que esta via também atua na regulação de genes endógenos, tais como os elementos transposons em células somáticas. Estes dsRNAs de origem endógena são gerados de *loci* estruturados, pares de transcritos sense-antisense natural (NAT) e elementos transposons (Marques, Kim et al. 2010).

Os componentes principais da via dos siRNAs em insetos são a enzima RNAselIII Dicer-2, *r2d2* (proteína com afinidade ao dsRNA) e a enzima argonauta-2 (*Ago2*). Inicialmente a enzima Dicer-2 atua no reconhecimento e processamento do dsRNA alvo em siRNA com 21 nucleotídeos com o auxílio da proteína *loqs* isoforma PD (Lee, Nakahara et al. 2004). Depois de sintetizados, estes siRNA de fita dupla são carregados até a proteína *Ago2* pelas proteínas Dicer-2 e *r2d2*, outra proteína de afinidade ao dsRNA. É importante destacar que as proteínas com afinidade ao dsRNA (*loqs* e *r2d2*) atuam de maneira sequencial na via, sendo a *loqs*-PD essencial no processo de reconhecimento do dsRNA a ser processado pela Dicer-2 e a proteína *r2d2*

no processo de carregamento do siRNA até a Ago2 (Liu, Rand et al. 2003, Liu, Jiang et al. 2006, Czech, Malone et al. 2008, Okamura, Chung et al. 2008, Marques, Kim et al. 2010)

A partir daí, forma-se um complexo de silenciamento induzidos por siRNA (siRISC) (Liu, Rand et al. 2003). Dentro do complexo, a Ago2 cliva a duas fitas do siRNA, liberando a fita guia que será posteriormente degradada (Kim, Lee et al. 2007). Ainda na Ago2, a fita guia é metilada na hidroxila 2' pela enzima Hen-1, o que contribui para a estabilidade do complexo siRISC (Haley and Zamore 2004). Dentro do complexo, estes siRNAs irão guiar a Ago2 para o local da clivagem do RNA alvo, que apresenta uma sequência complementar a ao siRNA (Carthew and Sontheimer 2009) (Figura 3).

A Ago2 tem uma preferência por RNA poliadenilado, sendo o mRNA o alvo preferencial (Marques, Wang et al. 2013). Isto pode ser confirmado, após evidências de que a Ago2 é encontrada em associação com ribossomos, sugerindo que ela poderia controlar a entrada do mRNA antes da etapa de tradução (Ishizuka, Siomi et al. 2002).

Os genes Dicer-2, Ago2 e r2d2 são essenciais na defesa antiviral de insetos. Moscas deficientes para estes genes foram susceptíveis ao aumento da infecção por vírus RNA e DNA. Estudos também mostraram que a depleção de Ago2 em *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* contribuiu com o aumento da multiplicação dos vírus naturalmente transmitidos por estes mosquitos (Keene, Foy et al. 2004, Sanchez-Vargas, Scott et al. 2009). Estes e outros vários estudos mostram que estes genes são essenciais na defesa antiviral do inseto. Por este motivo são considerados os que mais sofrem uma forte pressão, devido a seleção natural. Com isso, estes genes correspondem a 3% dos genes totais de *Drosophila* que mais evoluem, sendo superiores até mesmo dos demais genes de resposta imune (Obbard, Gordon et al. 2009).

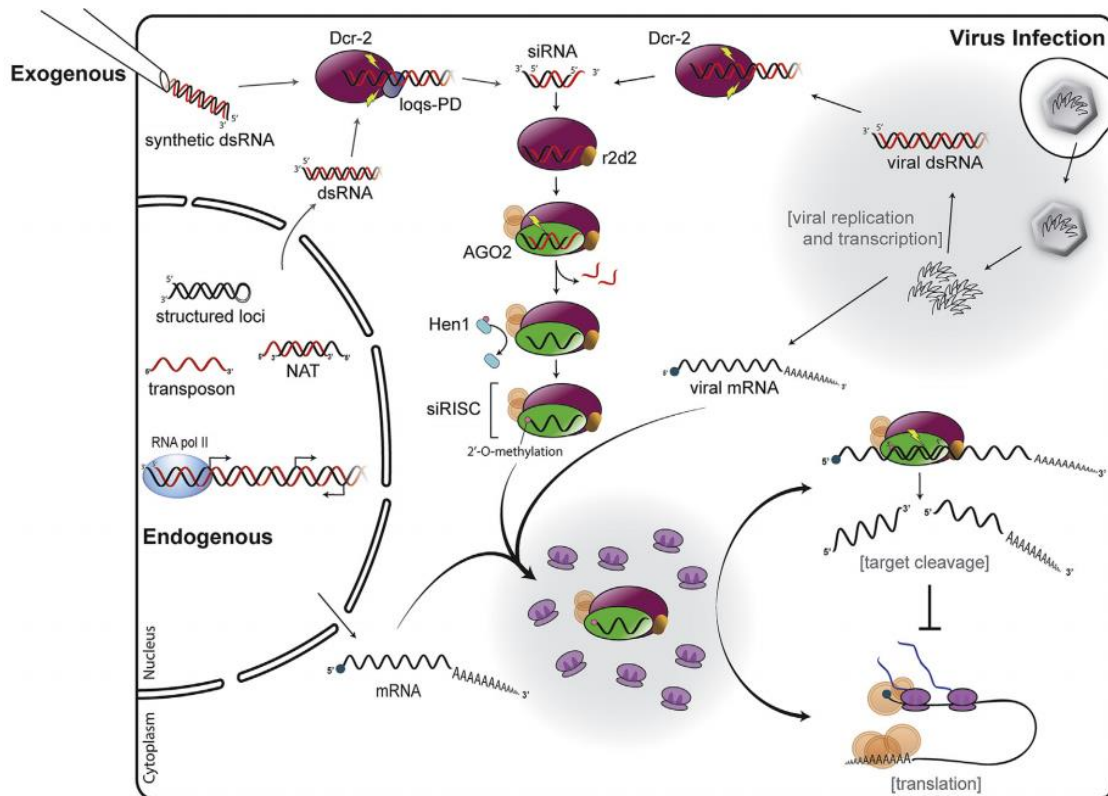


Figura 3: Via de siRNA ativada por diferentes fontes de dsRNA. Fontes de dsRNA originados de transcritos endógenos, dsRNA exógenos sintéticos ou de origem viral, são reconhecidos e processados em siRNAs pelo complexo loqs-PD/Dicer-2. A etapa de processamento do dsRNA de origem viral é completamente independente de loqs-PD. Estas diferentes fontes de dsRNA são reconhecidas pelo complexo Dicer-2/r2d2 e serão carregadas até a Ago2, que fica associada a ribossomos, e formarão o siRISC. Fonte: (Soares, Goncalves et al. 2014)

As vias de RNAi são portanto, muito importantes para diversos aspectos da biologia do inseto, podendo não só ser exploradas para estudos de função gênica como também podem contribuir com a melhor compreensão da biologia do vetor e dos mecanismos envolvidos na interação com patógenos.

2.0. JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial de Saúde estima que patógenos humanos transmitidos por insetos vetores ameacem mais da metade da população mundial. Estes patógenos causam doenças como malária, leishmaniose e dengue que têm grande impacto na saúde pública mundial e no Brasil, especificamente. Devido, a ausência de terapêutica específica e vacinas disponíveis para a maioria destas doenças, o vetor tem sido considerado o principal foco para medidas de controle.

O sequenciamento do genoma de vários mosquitos vetores, como *A. aegypti* e *A. gambiae* tem ajudado na compreensão da biologia destes insetos e nos mecanismos envolvidos com infecção por patógenos. O rascunho do genoma de flebotomíneos mesmo que disponível, ainda está em fase de anotação. Isto contribuirá com a caracterização funcional do genoma e com o aumento da informação sobre este potencial inseto vetor para a leishmaniose e diversas arboviroses que infectam homens e animais.

As vias de RNA de interferência (RNAi; miRNA, siRNA e piRNA) são conhecidas por desempenharem diversas funções biológicas em plantas e animais. Nos insetos já foi mostrado que os pequenos ncRNA, produtos das vias, desempenham importante papel na regulação gênica e também no desenvolvimento embrionário. A caracterização destas vias em flebotomíneos contribuirá com o entendimento da biologia do inseto e com o desenho de possíveis estratégias de controle para diversas destas doenças transmitidas por este inseto. Além disso, diversos estudos já mostraram a importância destes pequenos RNAs na proteção antiviral contra arbovirus de importância médica. Desta forma, sabendo que os flebotomíneos são também vetores para diversos arbovirus, a caracterização das vias de RNAi servirá para mostrar possíveis limitações de defesa antiviral neste potencial inseto vetor.

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar as vias de RNA de interferência em flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis*

3.2. Objetivos específicos

3.2.1- Anotação e caracterização dos genes componentes das vias de RNA de interferência em flebotomíneos *L.longipalpis*

3.2.2- Análises filogenéticas dos genes componentes das vias de RNAi encontrados no genoma de *L.longipalpis*

3.2.3- Caracterização da ativação das vias de RNAi em *L.longipalpis* após infecção com o *Vesicular stomatitis virus*

4.0. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Identificação e anotação dos genes componentes das vias de RNAi

Proteínas das vias de RNAi de *D. melanogaster* disponível no Flybase (Tweedie, Ashburner et al. 2009) foram usadas como referência por blast das proteínas de *L. longipalpis*, *P. papatasi*, *A. aegypti*, *A. gambiae* e *Culex quinquefasciatus*. A busca foi feita por similaridade de proteína/proteína seguida usando a ferramenta blastp disponível no Vectorbase (Megy, Hammond et al. 2009), banco de dados que contém informações científicas sobre vetores invertebrados de patógenos humanos. As sequências de aminoácidos de *Homo sapiens*, *Escherichia coli* e *Pyrococcus furiosus* foram encontrados no Centro Nacional de Biotecnologia e Informação (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih>). Os critérios usados para as proteínas encontradas eram o melhor hit e menor valor do e-value. As proteínas preditas encontradas eram avaliadas quanto a organização de domínios usando a ferramenta InterProScan (Goujon, McWilliam et al. 2010). Para as predições dos genes putativos das vias de RNAi em flebotomíneos, foi usado o software SoftBerry (Solovyev and Shahmuradov 2003), usando o genoma de *D. melanogaster* como referência para estas predições.

4.2. Análises filogenéticas

As sequências de domínios conservados das proteínas determinadas pelo PFAM (Punta, Coghill et al. 2012) foram analisadas com o alinhamento de sequências múltiplas usando o ClustalW. O ProTest (Abascal, Zardoya et al. 2005) foi utilizado para encontrar o melhor modelo a ser adotado nas análises filogenéticas. As árvores filogenéticas foram geradas usando o modelo Maximum likelihood (ML) foram construídas usando o PhyML e o valor suporte foi calculado usando 100 replicatas de bootstrap.(Guindon, Dufayard et al. 2010).

4.3. Linhagens celulares

As células Vero (derivadas de epitélio de rim de macaco verde-*Cercopithecus aethiops*) foram obtidas da ATCC, Maryland, USA. O cultivo foi feito em MEM suplementado com 5% de SFB (Gibco®), gentamicina (50 mg/L), penicilina potássica (200 U/mL) e fungizona (2.5 mg/L). As células foram incubadas a 37° C em ambiente com 5% de CO₂. Para a realização dos subcultivos foi utilizado solução de tripsina EDTA [NaCl 136 mM; KCl 5 mM; glicose 55 mM; NaHCO₃ 69 mM; 0,5 g p/v tripsina 1:250 (Difco); EDTA 0,5 mM; 1% vermelho de fenol].

As células BKH-21 (ATCC® - CCL10™), derivadas de rim de hamster, foram cultivadas em MEM contendo 50 µg/mL de gentamicina, 100 UI/mL de penicilina, 5 µg/mL de fungizona e 5% de SFB, mantidas em estufa de CO₂ à 37 °C.

As células LL5 de *Lutzomyia longipalpis* (TESH; MODI, 1983) foram cedidas pelo Prof. André Pitaluga, do Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ-RJ. São células aderentes cultivadas em meio Leibowitz-15 (L-15; Cultilab, Brasil), contendo gentamicina (50 mg/L), penicilina potássica (200 U/mL) e fungizona (2.5 mg/L), 10% de SFB e Tryptose Phosphate Broth (TPB- Sigma) e mantidas em BOD à 25° C.

Células de linhagem contínua de larvas de mosquito *A. albopictus*, C6/36 (ATCC® CRL-1660™), foram cultivadas em meio Leibowitz-15 (Cultilab, Brasil), contendo 20 µg/ml de gentamicina, 5µg/ml de anfotericina B, 200 UI/ml de penicilina e 5% de soro fetal bovino e mantidas em estufa tipo BOD (baixo oxigênio dissolvido) a 28° C.

4.4. Obtenção do estoque viral

Para a realização deste estudo foi utilizado o VSV subtipo *Indiana virus* expressando a proteína GFP (VSV-G) cedido pelo Dr. Curt Horvath (Northwestern University).

O vírus foram multiplicados em garrafas de 125 cm² contendo 80% de confluência de células VERO (ATCC® CCL-81™). Para a infecção, o meio celular foi retirado e a monocamada lavada com PBS 1X. Em seguida foi acrescentado uma moi 0,01pfu/célula do VSV em 4 mL de meio MEM suplementado com 2% de SFB (Gibco®), gentamicina (50 mg/L), penicilina potássica (200 U/mL) e fungizona (2.5 mg/L). Após 1 hora de adsorção, este meio foi descartado e foram adicionados 15 mL de meio mínimo de Eagle (MEM- Cultilab, Brasil) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), e a garrafa foi mantida por cerca de 2-3 dias em estufa de CO₂ a 32° C. Após este período de incubação, o meio foi coletado, as células foram lisadas por congelamento à -80°C por 10 minutos e descongelada a 37° C. O meio de cultura previamente coletado foi misturado às células lisadas, sendo em seguida centrifugado a 1800 g por 10 minutos à 4° C, e o sobrenadante congelado a -80° C até o momento do uso.

Após a multiplicação, o VSV obtido foi titulado em células Vero e BHK-21(ATCC® - CCL10™). Para isso, foram utilizadas placas de 6 poços contendo a monocamada celular. As células foram infectadas com 200 µL de cada diluição do vírus em meio específico para cada tipo de célula por 1 hora. Após a adsorção, foi acrescentado o meio 199 suplementado com 2% de SFB e carboximetilcelulose (CMC) a 1,5%. As células foram mantidas a 37° C, em ambiente com 5% de CO₂ por 72 h e observadas ao microscópio em intervalos de 24 horas. Após estes períodos, as células foram fixadas em solução de formol a 10% por 30 min. Em seguida, a monocamada foi corada com solução contendo 1% (p/v) de cristal violeta em PBS por 15 min. O título foi expresso foi convertido para pfu/mL.

4.5. Cinética de infecção em células

Os experimentos de cinética foram feitos em células LL5 usando o vírus VSV. A cinética foi feita em placa de 6 poços contendo 3×10^6 células LL5/poço e, após as células terem aderido, foi acrescentado o inóculo viral. No grupo não infectado foi acrescentado somente meio celular. Após 1 hora de adsorção, as células foram lavadas com meio de cultura para que fosse retirado todo o vírus que estivesse associado à célula. Em seguida foi acrescentado 2 mL de meio L15 suplementado em cada poço e as placas foram mantidas em estufa tipo BOD a 25° C. Durante os tempos de coleta, foi retirado o sobrenadante celular de cada poço da placa, colocado em tubo tipo *Eppendorf* e submetidos a centrifugação de 800g em microcentrífuga a 4° C. Foi retirado um volume de 100 µL para posterior titulação em pfu/mL e 100 µL para a extração do RNA total. Este volume retirado do sobrenadante e o *pellet*, formado após a centrifugação, foram lavados com 1 mL de TRIzol®. As amostras foram acondicionadas a 80°C.

4.6. Manutenção da colônia de insetos

Os flebotomíneos *L. longipalpis* utilizados neste estudo pertencem a uma linhagem oriunda de Teresina (PI), criados em colônia fechada no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), localizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e toda a manutenção foi feita pelo técnico César Neonato baseada em metodologia já descrita (TESH; MODI, 1983). As larvas foram mantidas em potes de plástico com fundo coberto por gesso e alimentadas com dois tipos de ração: uma a base de fezes e ração de coelho juntamente com húmus, oferecida principalmente às larvas de primeiro e segundo estádios, e a outra a base de flocos de cereais integrais (Neston®) e proteína de soja, que suplementa a alimentação das larvas de terceiro e quarto estádios. Os adultos foram mantidos em gaiolas de náilon presas em armações de metal e se alimentam em bolinhas de algodão embebidas em solução de sacarose 30% oferecidas

em pequenas placas de Petri no interior da gaiola. Como fonte de sangue para as fêmeas foram utilizados hamsters machos anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax®) e colocados no interior da gaiola até que todas tenham se alimentado. As condições climáticas do insetário são controladas, com temperatura em torno de 25°C e umidade relativa entre 60 e 80%.

4.7. Estratégia de infecção viral dos flebotomíneos por alimentação

O procedimento de infecção foi baseado nos modelos de alimentação de *L. longipalpis* com *Leishmania sp* (TELLERIA *et al.*, 2013). Basicamente, mosquitos adultos fêmeas com 2 a 3 dias de vida foram colocados em gaiolas com o auxílio de um aspirador elétrico, e privadas de alimentação com solução de açúcar por um período de 24h antes da alimentação.

Para o preparo do sangue e do aparato usado durante a alimentação, foi adotado o seguinte procedimento: lavagem da pele de pintinho com álcool 70% seguida de sucessivas lavagens em água destilada. Esterilização do alimentador artificial Hemotek® com álcool 70%, no qual foi acoplada a pele de pintinho. Foi coletado sangue humano fresco e heparinizado para os experimentos de alimentação.

O preparo do sangue contaminado com o VSV ocorreu da seguinte maneira: foi usada uma proporção de 1 de VSV para 9 de sangue, o qual foi misturados gentilmente com o auxílio de uma pipeta, e acondicionados em gelo até o momento do uso.

O processo de montagem do alimentador foi ajustar a temperatura do mesmo para 37°C e fixar a pele de pintinho nos suportes de metal. Em seguida, foi acrescentado o sangue e colocado o mesmo em contato com as gaiolas. O tempo de contato da gaiola com o alimentador foi de 2 horas. Em seguida, os flebotomíneos foram anestesiados com CO₂ e transferidos para uma placa de Petri sobre o gelo. As fêmeas engorgitadas foram então

separadas, colocadas em novas gaiolas, e mantidas em uma área reservada para experimentos de infecção. A solução de açúcar a 30% embebida em algodão utilizada para alimentar os flebotomíneos foi trocada todos os dias, afim de evitar o surgimento de fungos. Para a coleta, os insetos foram anestesiados com CO₂ e coletados individualmente e imediatamente congelados à -80°C.

4.8. Extração do RNA total

Cada flebotomíneo coletado individualmente foi macerado com 200 µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™) utilizando o equipamento Mini-BeadBeater-16 (Biospec©) por 1,5 minutos. O homogeneizado foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 40 µL de clorofórmio (Sigma®) seguido de agitação vigorosa em Vortex por 15 segundos. Seguida uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000g em microcentrífuga a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado 100 µL de isopropanol (Sigma®), seguida de uma agitação leve em Vortex e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000g e, após o descarte do sobrenadante foi adicionado em cada tubo 1 mL de etanol 75% v/v (Sigma®) preparado utilizando água livre de nucleases (Nuclease-Free Water – Ambion®). Após agitação branda em Vortex, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 7.500g, e em seguida o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi seco pela inversão dos tubos em papel absorvente. Após a secagem do RNA, este foi homogeneizado em 10 µL de água livre de nucleases (Ambion®). As amostras foram armazenadas a -80°C.

Para a extração do RNA total de célula infectada foi utilizado 1mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™), 200 µL clorofórmio (Sigma®), 500 µL de isopropanol (Sigma®) e 1mL de etanol 75% v/v (Sigma®). Todos estes reagentes foram submetidos às mesmas condições descritas acima. O RNA foi

dissolvido em 10 μ L de água livre de nucleases (Ambion®) e as amostras armazenadas à -80°C

4.9. Quantificação relativa de RNA pela técnica de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (RT-qPCR)

4.9.1. Transcrição reversa (RT)

A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando a enzima Transcriptase Reversa M-MLV (Promega®), com tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂), 500 ng de RNA total, 15 mM de Random Primers, 625 μ M de dNTPs, 0,01 M de DTT e água livre de RNase para um volume final de 20 μ L. Inicialmente foi feita a desnaturação do RNA através da incubação da mistura RNA e Random Primers a 70°C em termociclador durante 10 minutos, seguido de banho de gelo. Em seguida, foram adicionados o tampão da enzima, DTT e 2 unidades da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, essa mistura foi incubada novamente em termociclador a 42°C durante 60 minutos e 72°C por 5 minutos. Por fim, a amostra foi estocada a -20°C até o momento do uso.

Foram feitos controles sem a presença da enzima (RT-) em todas as reações de transcrição reversa a fim de avaliar a possível contaminação com DNA, tendo em vista que não é feito o tratamento com DNase nas amostras de RNA total.

4.9.2. Desenho dos iniciadores

O design dos iniciadores utilizados neste trabalho foi feito utilizando o software (Untergasser, Cutcutache et al. 2012), com pequenas modificações nos parâmetros definidos como padrão, sendo tamanho do amplicon entre 70 e 150 nt, temperatura ideal de anelamento em 60°C, conteúdo GC ideal de 50%

e numero máximo de 3 bases seguidas repetidas. Os iniciadores utilizados neste estudo estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na detecção de carga viral e expressão gênica em células e *L. longipalpis*.

Iniciador	Nome	Sequência 5'-3'
VSV	VSV-L	cctttagaaggggaattggaagaa
	VSV-R	tctgccgacttgataggattg
GFP	GFP-L	cgaccactaccagcagaaca
	GFP-R	tctcgtggggtcttgc
<i>RpL32</i>	<i>RpL32</i> -L	ggcgtgtcttgagttgga
	<i>RpL32</i> -R	tgtccgtcgtcgtctcaa
Dicer-2	Dicer2-L	gcaatccaatcgcatcact
	Dicer2-R	gcgggaatgaatctggaat
Ago2	Ago2-L	gggcataagtgtggaaaga
	Ago2-R	caatggaatgttgctca
r2d2	r2d2-L	gatcgaagcaggaagcaaag
	r2d2-R	gaacgtgaaggatggagcat
loqs	loqs-L	ggattgcttcagtittgt
	loqs-R	cgtgtcttccggatcctt
LPRV1	LPRV1-L	tgtgtgcacgatgctacgat
	LPRV1-R	atcagcaccgcacattcta
LPRV2	LPRV2-L	cccagactacaacgtctgt
	LPRV2-R	actgacatcgagcaatgga
LPNV	LPNV-L	gcgcggaacactacagaac
	LPNV-R	cttctcgcgtcctgtcaact
dsRNA Ago2	Ago2-L T7	taatacgactcactataggagatcaaacagttgtgcagcgtg
	Ago2-R SP6	atthaggtgacactatagaagttcaacaatcgccctgggtgg
dsRNA luciferase	Fluc-L T7	taatacgactcactatagggagaacaatccggaagcgaccaa
	Fluc-R SP6	atthaggtgacactatagaagttgactggcgagcgtaatccac

L-sequência left
R- sequência right

4.9.3. PCR quantitativo (qPCR)

Para análise da expressão gênica e quantificação relativa da carga viral foi utilizada a técnica de PCR quantitativo ou Real Time PCR. As reações foram realizadas utilizando o kit SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied® Biosystems) conforme boletim técnico do fabricante, utilizando o equipamento StepOnePlus™ RealTime PCR System (Applied® Biosystems). As análises

foram realizadas utilizando o método do $2^{-\Delta Ct}$ calculado em relação ao gene constitutivo *RpL32* (Ribosomal particle L32). A eficiência dos diversos iniciadores foi verificada utilizando diluições seriadas de 10X de diferentes amostras de cDNA. Os ensaios foram realizados em duplicata e a concentração dos iniciadores foi de 400 nM. Os valores de baseline e threshold foram ajustados de acordo com cada par de iniciadores. Todas as análises foram realizadas com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 5.0 (Graphpad® Software).

4.10. Preparo do RNA para a construção das bibliotecas

A concentração do RNA total extraído foi primeiramente determinada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), e a integridade do RNA total extraído foi avaliada utilizando o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) com o kit RNA 6000 Nano (Agilent Technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

4.11. Preparo das bibliotecas

O preparo das bibliotecas a serem sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq™ 2000 foi realizado segundo descrito por Pfeffer em 2007 (Pfeffer 2007), com algumas modificações a partir do protocolo do fabricante.

4.12. Pré-processamento das bibliotecas

As bibliotecas foram submetidas a um filtro de qualidade utilizando o script `fastq_quality_filter`, disponibilizado no pacote FastX-toolkit (disponível em http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Os parâmetros utilizados foram `-q 15` e `-p 60`, que definem basicamente o score mínimo de qualidade e a porcentagem do número total de bases que tenham a qualidade mínima estipulada, respectivamente.

4.13. Análise dos pequenos RNAs

As bibliotecas de pequenos RNAs foram submetidas a remoção de adaptadores utilizando o software *cutadapt*. As sequências menores que 15 nucleotídeos, após a remoção dos adaptadores, foram descartadas. O mapeamento das sequências contra os genomas virais foi realizado utilizando o software Bowtie (Langmead and Salzberg 2012), utilizando os parâmetros $-v$ 0 e $-all$. Estes parâmetros são referentes ao número máximo de mismatches (base não pareadas) e a indicação que todos os mapeamentos, para cada sequência sejam reportados, respectivamente. Em seguida são realizadas análises da distribuição de tamanho das sequências que mapearam contra o genoma do vírus, e é feita a seleção das sequências de 21 nucleotídeos para a geração do perfil de cobertura por nucleotídeo no genoma viral, normalizada pelo tamanho da biblioteca. Todas estas análises são geradas utilizando scripts do nosso laboratório. Os gráficos são gerados utilizando o software estatístico R.

4.14. Experimento de silenciamento gênico

A escolha da região a ser silenciada foi feita no software SnapDragon do Flybase (http://www.flyrnai.org/cgi-bin/RNAi_find_primers.pl). Todo o protocolo de preparo do dsRNA foi segundo instruções disponíveis em DRSC (Drosophila RNAi Screening Center).

As células LL5 foram transfectadas com 10 μ L Cellfectin (Invitrogen®) e toda etapa de preparo do reagente de transfecção foi segundo recomendações do fabricante. O tempo de transfecção com o meio não suplementado decorreu 1 hora. Em seguida foi acrescentado o meio L15 suplementado e após 48 horas as células foram coletadas.

5.0. RESULTADOS

5.1. Identificação e anotação dos genes das vias de RNA de interferência no genoma de Flebotomíneos

Nosso grupo faz parte do Consórcio de Sequenciamento do Genoma de Flebotomíneos (*Sand Fly Genome Sequencing Consortium -SFGC*), que tem como objetivo fazer as anotações e curadoria manual dos genomas dos flebotomíneos *L. longipalpis* e *P. papatasi*. Este consórcio é composto por diversos grupos de pesquisa e é liderado pela Dr^a Mary Ann McDowell, da Universidade de Notre Dame (EUA). As nossas contribuições para o consórcio serão as anotações e análises filogenéticas dos genes das vias de RNAi tanto de *L. longipalpis* quanto de *P. papatasi*.

Inicialmente foram feitas procuras por genes das vias de RNAi de *L. longipalpis* usando como referência as sequências de *D. melanogaster* (Tabela 2). Estas buscas foram por blast de proteínas (blastp) no *data base* de vetores invertebrados de patógenos humanos (VectorBase).

Tabela 2 Proteínas de *D. melanogaster* utilizada na busca por genes das vias de RNAi em *L. longipalpis*.

Via de RNAi	Gene	Proteína/isoforma usada no BLAST	ORF	Tamanho da proteína	Flybase ID
siRNA	Dcr-2	Dcr-2-PA	5169 bp	1722 aa	FBpp0086061
	r2d2	r2d2-PA	936 bp	311 aa	FBpp0079112
	AGO2	AGO2-PB	3645 bp	1214 aa	FBpp0075312
	loqs-PD	loqs-PD	1080 bp	359 aa	FBpp0292361
miRNA	drosha	drosha-PA	3984 bp	1327 aa	FBpp0087926
	Dcr-1	Dcr-1-PA	6750 bp	2249 aa	FBpp0083717
	AGO1	AGO1-PC	2955 bp	984 aa	FBpp0086738
	loqs	loqs-PB	1398 bp	465 aa	FBpp0080076
	pasha	pasha-PA	1929 bp	642 aa	FBpp0085181
piRNA	AGO3	AGO3-PD	2604 bp	867 aa	FBpp0289158
	piwi	piwi-PA	2532 bp	843 aa	FBpp0079755
	<i>aub</i>	<i>aub</i> -PA	2601 bp	866 aa	FBpp0079754

Os genes preditos foram submetidos à curadoria manual da anotação. Todos a organização estrutural gênica, exons, introns e regiões codificadora (CDS) e não codificadora (UTR) foram posteriormente comparados com os dados de cobertura obtidos no RNA-seq . Estes dados são uma contribuição obtida pelo SFGC e são referentes a amostras de flebotomíneos alimentados com sangue e alimentados com açúcar.

Em seguida foi feita uma análise de organização de domínios conservados na proteína putativa codificada pelos genes encontrados.

É importante destacar que durante as análises de curadoria foram encontrados alguns problemas relacionados à montagem e predição gênica no genoma de *L. longipalpis*. O primeiro deles foi com os genes LLOTMP007780 e LLOTMP007780, que apresentaram homologia com o único gene Ago1 de *D. melanogaster*. Ambos os genes estão localizados em tandem na mesma região do genoma e codificam proteínas com tamanhos distintos e identidade de 89%. Embora exista a possibilidade dos dois genes terem sido gerados por um artefato de montagem do genoma, o fato deles serem relativamente distintos sugere a existência de dois genes parálogos em *L. longipalpis* que são homólogos ao gene Ago1 de *Drosophila*. Estes genes foram anotados como Ago1.1 e Ago1.2, respectivamente. O segundo problema de montagem foi observado no gene que apresentou homologia com o gene drosha, LLOTMP001478, cuja proteína predita possui 2438 aa, um tamanho muito maior que o esperado. Com isto, nós fizemos uma nova predição gênica para a região, o que levou a re-anotação do gene LLOTMP001478.2 codificando uma proteína com 1307 aa, que foi anotado como a drosha de *L. longipalpis*. Foi feita também curadoria do gene r2d2 (LLOTMP000693) devido a ausência de ATG no início da sequência codificadora. Outras predições também foram feitas para o gene LLOTMP005362, cuja proteína predita possui um tamanho de 1414 aa e com domínios não conservados em proteínas piwi de insetos. Este gene foi re-anotado como LLOTMP005362.1 e identificado como piwi3 com uma proteína predita de 916 aa. Este mesmo problema foi detectado no gene Ago3. O gene foi re-anotado como LLOTMP007793.1 e identificado como Ago3 que apresenta um proteína com tamanho de 1041 aa.

Os detalhes das predições gênicas e da curadoria manual de anotação dos genes da via de RNAi em *L. longipalpis*, estão na Tabela 3.

Tabela 3 Genes das vias de RNAi identificados no genoma de *Lutzomya longipalpis*

ID VectorBase	Gene ortólogo	ORF	Proteína	e-value	Identidade	Localização (scaffold)
LLOTMP006509	Dcr-2	4956 pb	1526 aa	0.0	32.7%	466:6,387-22,877
LLOTMP000693	r2d2	1129 pb	292 aa	2,00E-28	32.3%	1109:17,333-18,530
LLOTMP006148	AGO2	3383 pb	1086 aa	5,00E-155	40.5%	419:7,793-15,194
LLOTMP001478	droscha	9867 pb	1307 aa	0.0	68.9%	13:248,698-262,799
LLOTMP006865	Dcr-1	8054 pb	2243 aa	0.0	60.7%	50:215,363-224,716
LLOTMP002667	loqs	7919 pb	389 aa	*3E-132 / 2e-82	*62.1%-63.4%	172:2,714-17,598
LLOTMP007780	AGO1-1	5026 pb	910 aa	0.0	94.2%	611:6,014-14,820
LLOTMP007781	AGO1-2	2196 pb	914 aa	0.0	88.2%	611:15,891-18,957
LLOTMP005101	pasha	2010 pb	669 aa	8,00E-157	59.1%	317:118,601-122,633
LLOTMP007793	AGO3	5200 pb	1041 aa	0.0	42.4%	612:28,708-49,153
LLOTMP008700	piwi-1	2843 pb	887 aa	0.0	**45.7% - 45.7%	747:16,913-20,393
LLOTMP000423	piwi-2	3078 pb	972 aa	0.0	**43.1% - 43.1%	1063:19,681-25,005
LLOTMP005362	piwi-3	4385 pb	916 aa	0.0	**43.2% - 43.2%	34:40,427-54,140
LLOTMP006685	piwi-4	2614 pb	865 aa	0.0	**41.9% - 41.9%	487:44,683-48,080

* Valores obtidos com referência ao blastp com loqs-PB e loqs-PD de *D.melanogaster* respectivamente

** Valores obtidos com referência ao blastp com aub-PA e piwi-PA de *D.melanogaster* respectivamente

Os principais genes da via de siRNA, Dicer-2, Ago2 e r2d2 identificados, apresentaram proteínas com domínios condizentes com os observados nos proteínas correspondentes de *Drosophila melanogaster*. Além disso, a maioria destes genes apresenta uma organização gênica estrutural que correlacionam com os dados de cobertura do RNA-seq.

Os domínios preditos na proteína Dicer-2 de *L. longipalpis* indicam que as funções de reconhecimento do dsRNA (domínio Dicer), clivagem (domínio RNaseIII) e atividade de ATPase (domínio DEAD/ DEAH) e afinidade ao siRNA (domínio PAZ), seriam conservadas neste inseto (Figura 4). O mesmo perfil foi observado na proteína r2d2 que apresenta os domínios de afinidade por dsRNA (domínio DSRB) (Figura 5). Na proteína Ago2 foram preditos os domínios piwi e PAZ que sugerem que as atividade de endoribonuclease e de afinidade ao dsRNA, seja conservado com as de outros insetos. (Figura 6).

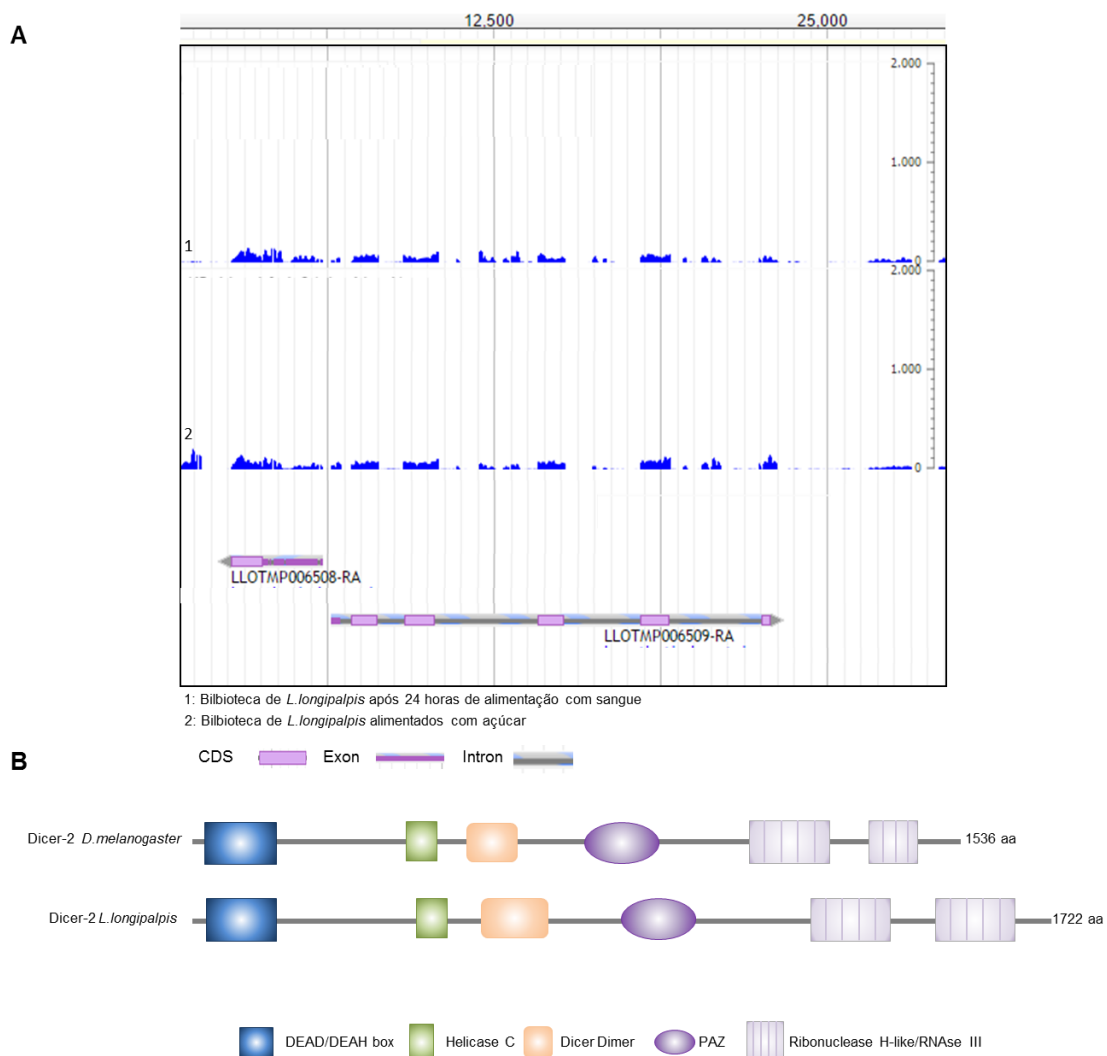


Figura 4: Caracterização do gene Dicer-2 de *L. longipalpis*. A) Gene predito LLOTMP006509 identificado como Dicer-2 em *L. longipalpis*. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. B) Organização estrutural dos domínios da proteína Dicer-2 de *L. longipalpis* composta de DEAD/DEAH box, Helicase C, Dicer dimer, PAZ e RNaseIII, comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*.

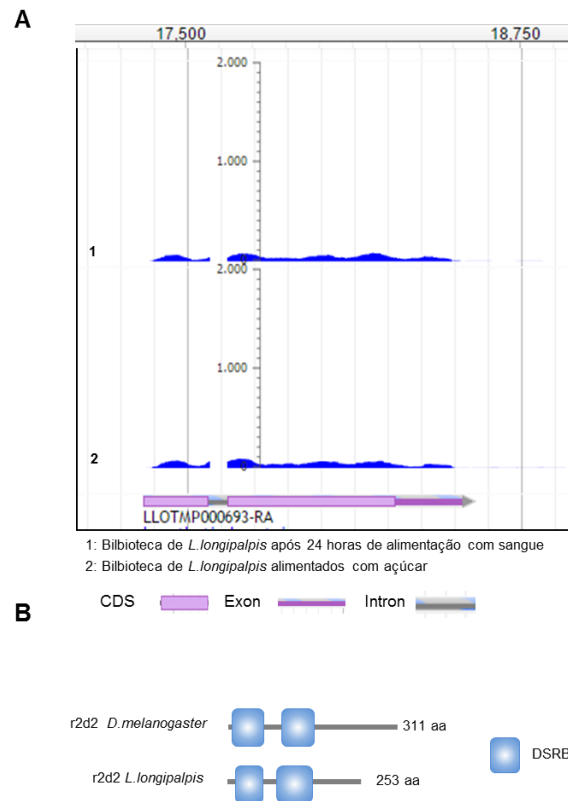


Figura 5: Caracterização do gene r2d2 de *L. longipalpis*. A) Gene predito LLOTMP000693 identificado como r2d2 em *L. longipalpis*. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. B) Organização estrutural dos domínios da proteína r2d2 de *L. longipalpis* composta de domínio de reconhecimento do dsRNA (DSRB), comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*.

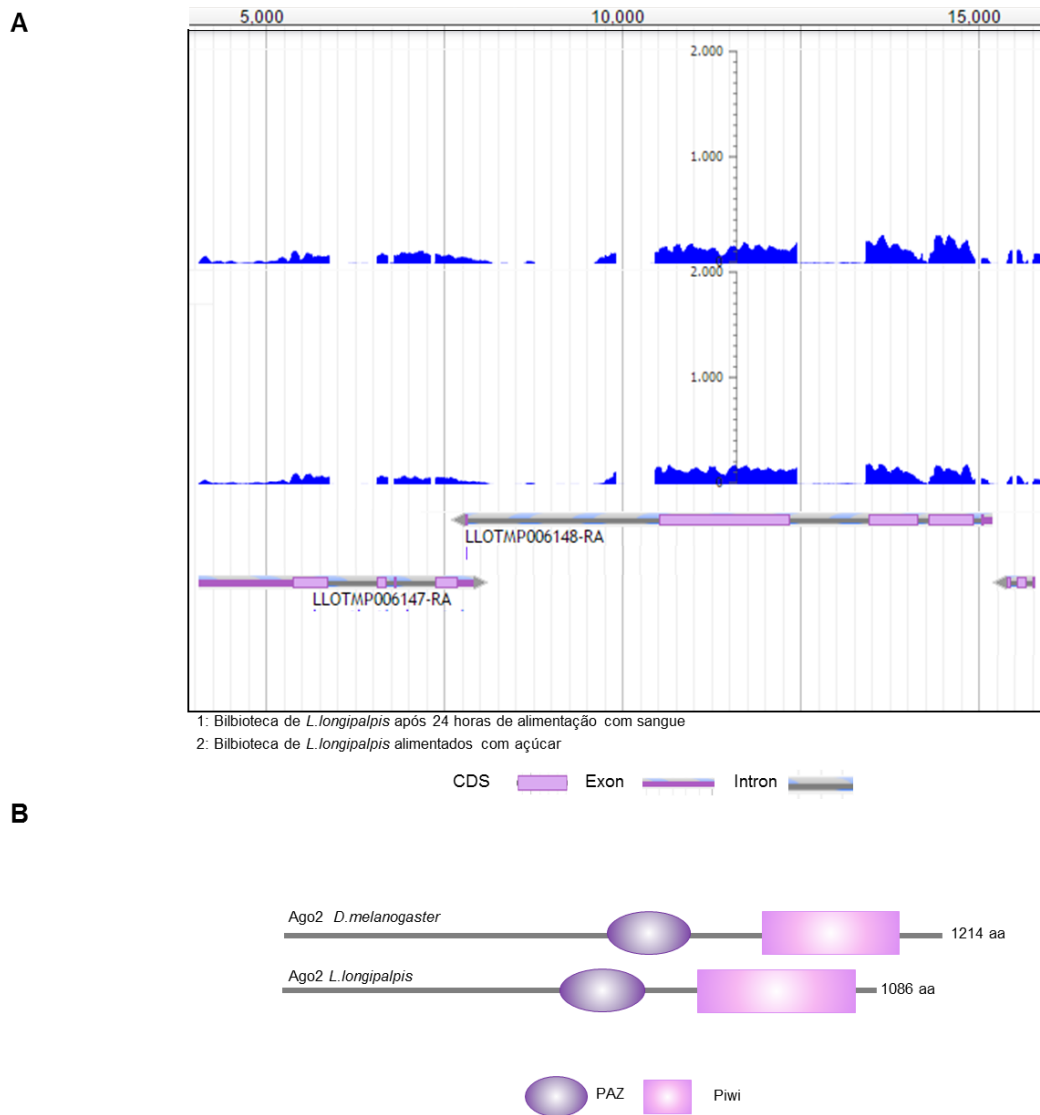


Figura 6: Caracterização do gene Ago2 de *L. longipalpis*. A) Gene predito LLOTMP006148 identificado como Ago2 em *L. longipalpis*. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. B) Organização estrutural dos domínios da proteína Ago2 de *L. longipalpis* composta de domínio PAZ e Piwi, comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*.

Os principais genes da via de miRNA, drosha, Dicer-1, pasha, Ago1 e loqs, foram analisados quanto a organização de domínios conservados comparados às proteínas correspondentes em *D. melanogaster*. A análise estrutural da proteína drosha indicou a presença de domínios com afinidade ao dsRNA (domínio DSRB) e com atividade de clivagem (domínio RNaseIII) (Figura 7). A Figura 8 mostra a organização da proteína Dicer-1 de *L. longipalpis* que é constituída pelos domínios que auxiliam no reconhecimento do dsRNA (domínio Dicer dimer), de afinidade ao pre-miRNA (domínio Helicase C), de clivagem (domínio RNaseIII) e de afinidade ao ssRNA (domínio PAZ). A proteína pasha de *L. longipalpis* apresenta o domínio DSRB relacionado a função exercida por esta proteína em *Drosophila* (Figura 9). As duas cópias da proteína Ago1 encontrados em *L. longipalpis* apresentam uma organização de domínios conservada com as proteínas da família argonauta de inseto. Estes domínios permitem o reconhecimento do pequeno RNA (domínio PAZ) e a clivagem do alvo (domínio piwi) (Figura 10). A proteína loqs apresenta o domínio DSRB, que sugere que desempenhe a função o reconhecimento do dsRNA em *L. longipalpis* (Figura 11).

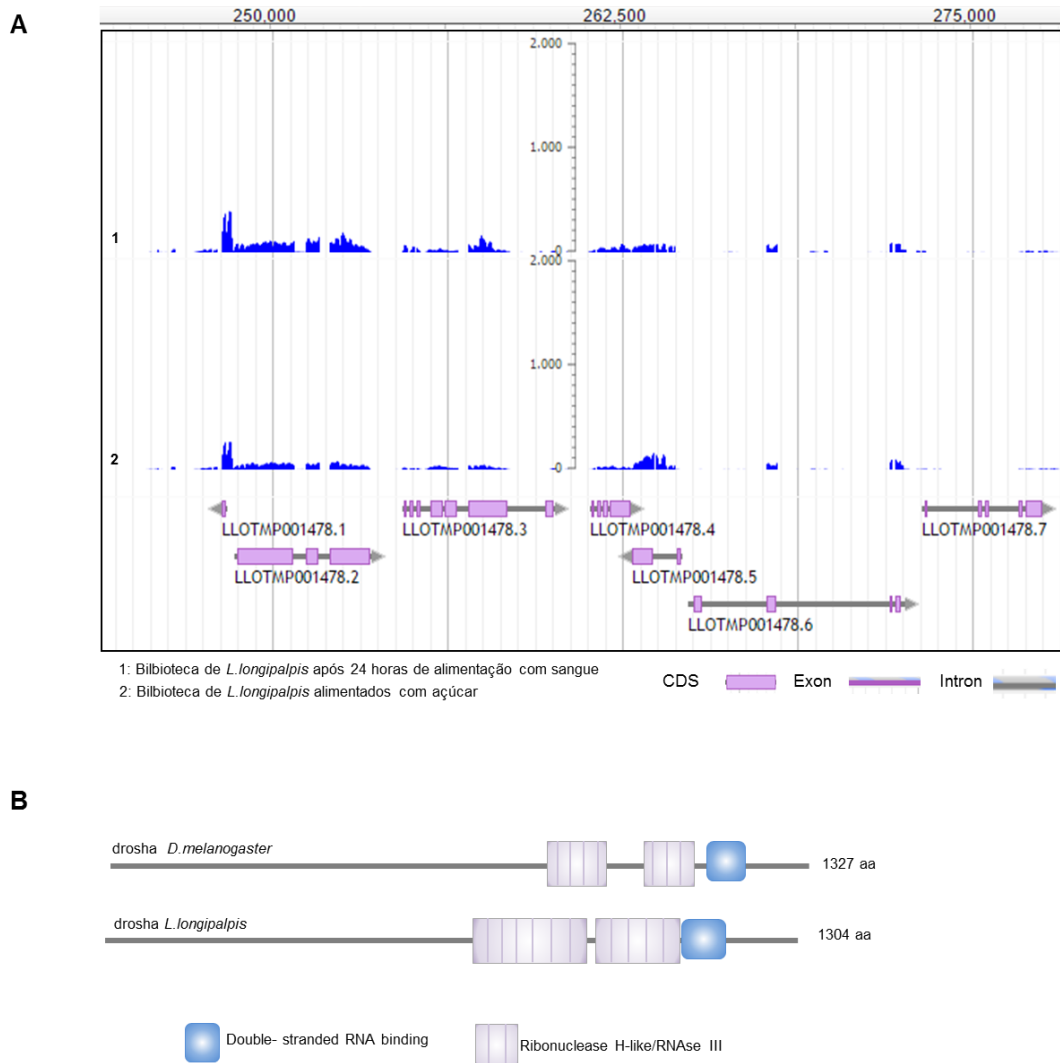


Figura 7: Caracterização do gene drosha de *L. longipalpis*. A) Gene predito LLOTMP001478.2 identificado como drosha em *L. longipalpis*. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. B) Organização estrutural dos domínios da proteína drosha de *L. longipalpis* composta de domínio de reconhecimento do dsRNA (DSRB) e RNaseIII, comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*

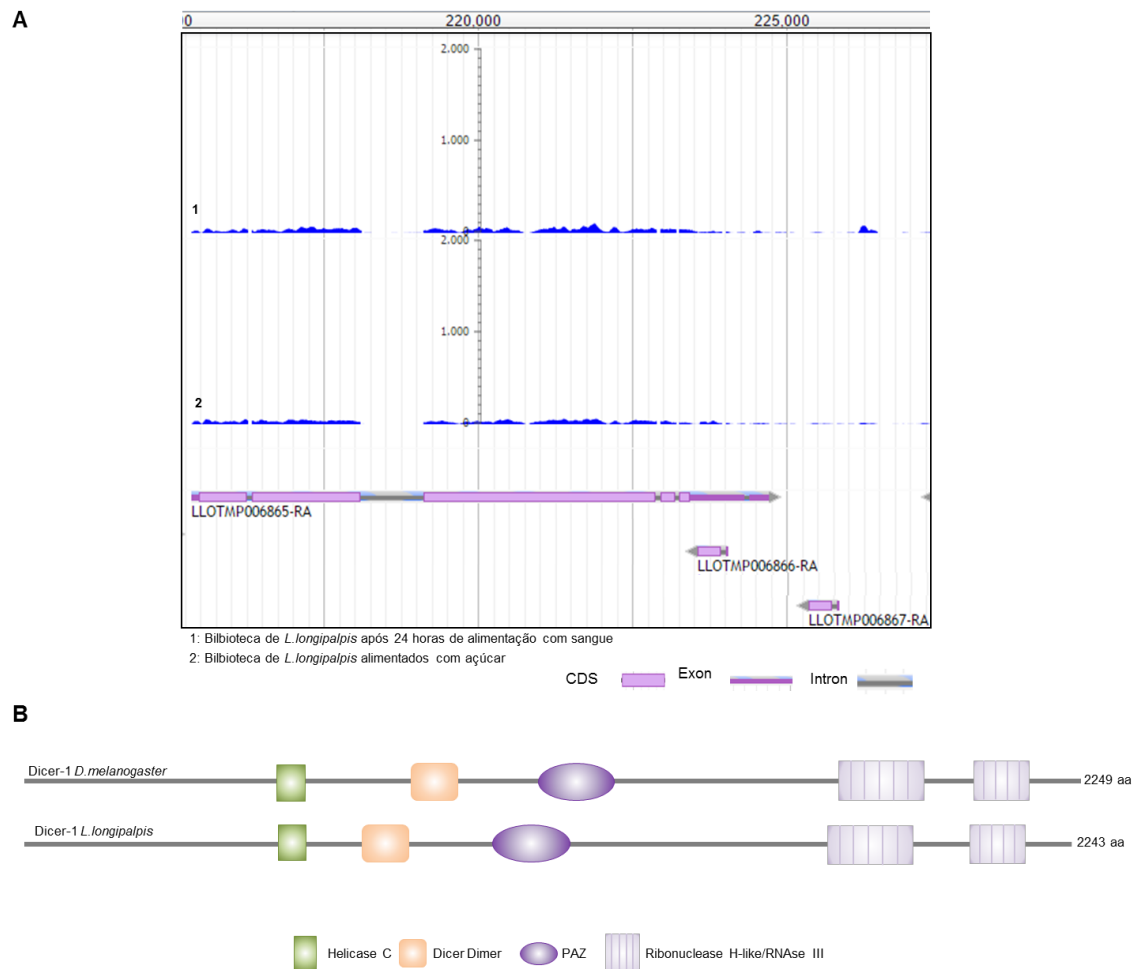


Figura 8: Caracterização do gene Dicer-1 de *L. longipalpis*. A) Gene predito LLOTMP006865 identificado como Dicer-1 em *L. longipalpis*. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. B) Organização estrutural dos domínios da proteína Dicer-1 de *L. longipalpis* composta de domínio de Helicase C, Dicer Dimer, PAZ e RNaseIII comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*

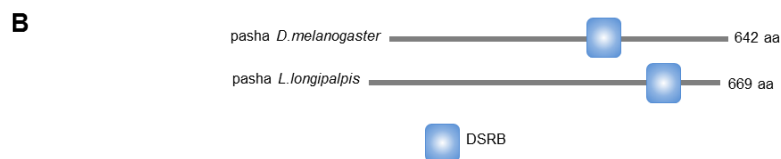
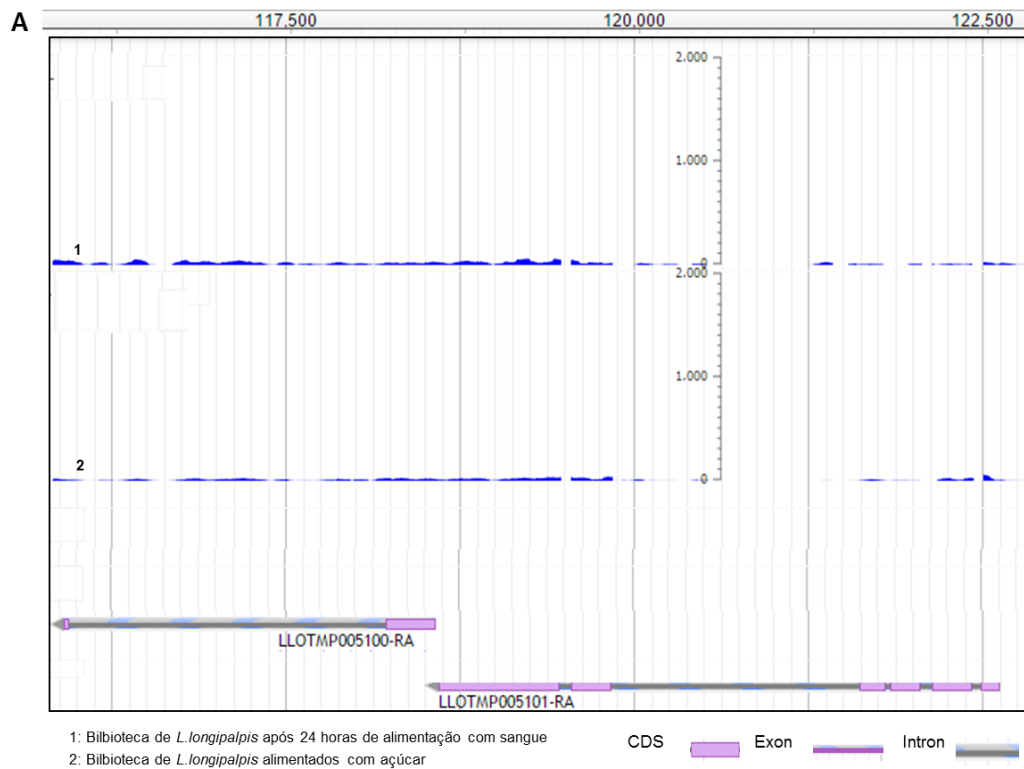


Figura 9: Caracterização do pasha de *L. longipalpis*. A) Gene predito LLOTMP005101 identificado como pasha em *L. longipalpis*. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. B) Organização estrutural dos domínios da proteína pasha de *L. longipalpis* composta de domínio de reconhecimento do dsRNA (DSRB) comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*

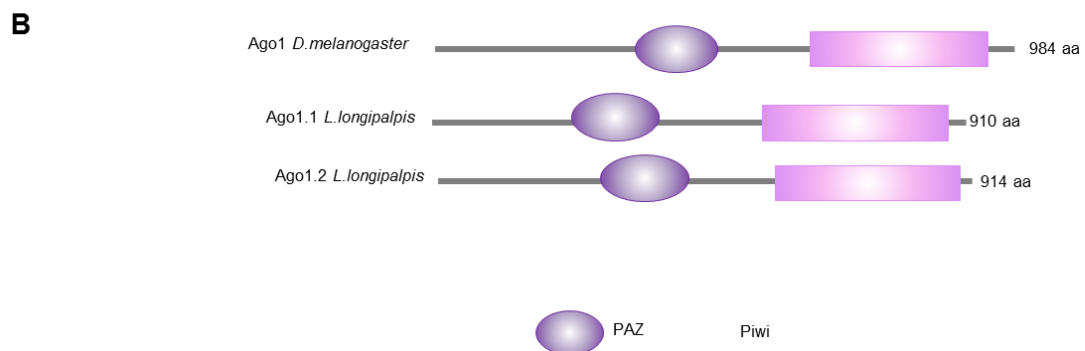
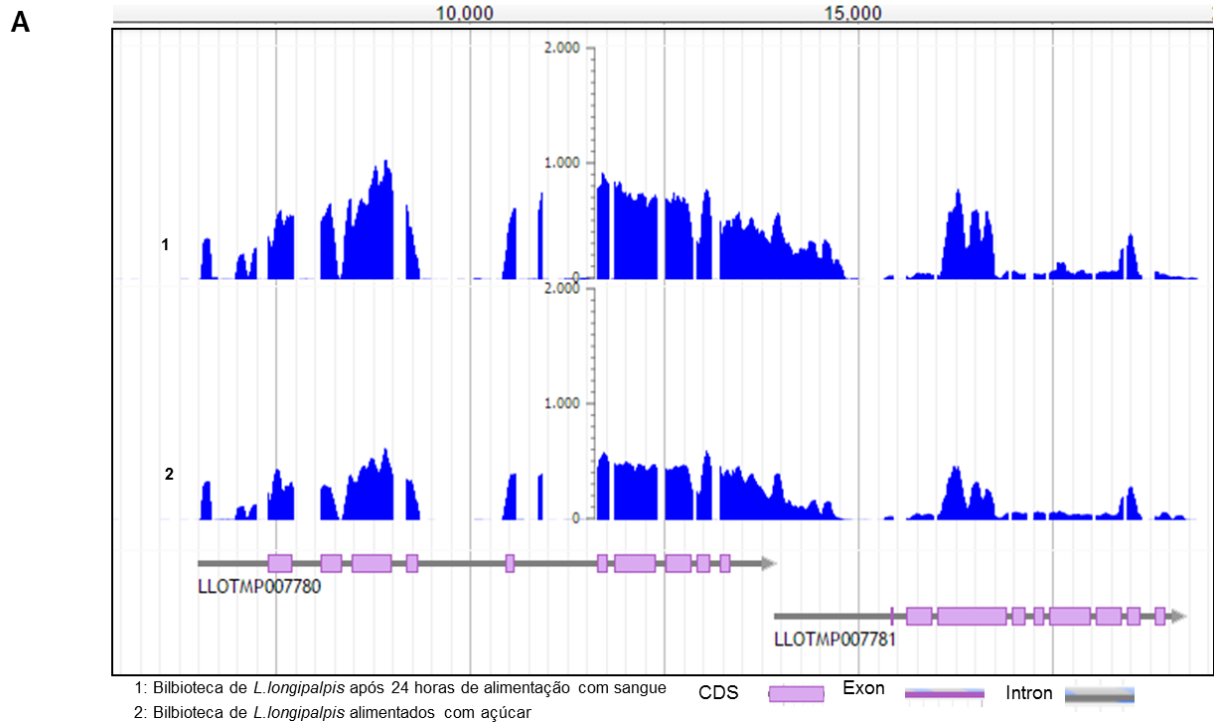


Figura 10: Caracterização do Ago1 de *L. longipalpis*. A) Os gene preditos LLOTMP007780 e LLOTMP007781 identificado como Ago1.1 e Ago1.2 em *L. longipalpis*. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. B) Organização estrutural dos domínios das proteínas Ago-1 de *L. longipalpis* composta de domínio Piwi e PAZ comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*

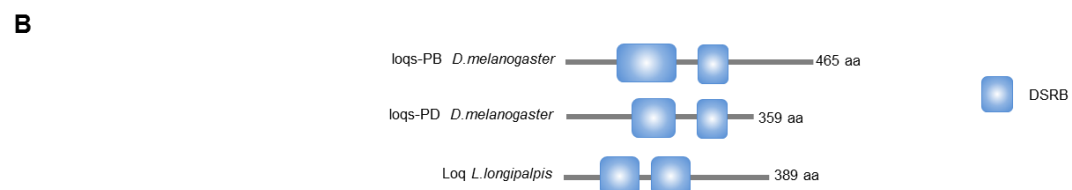
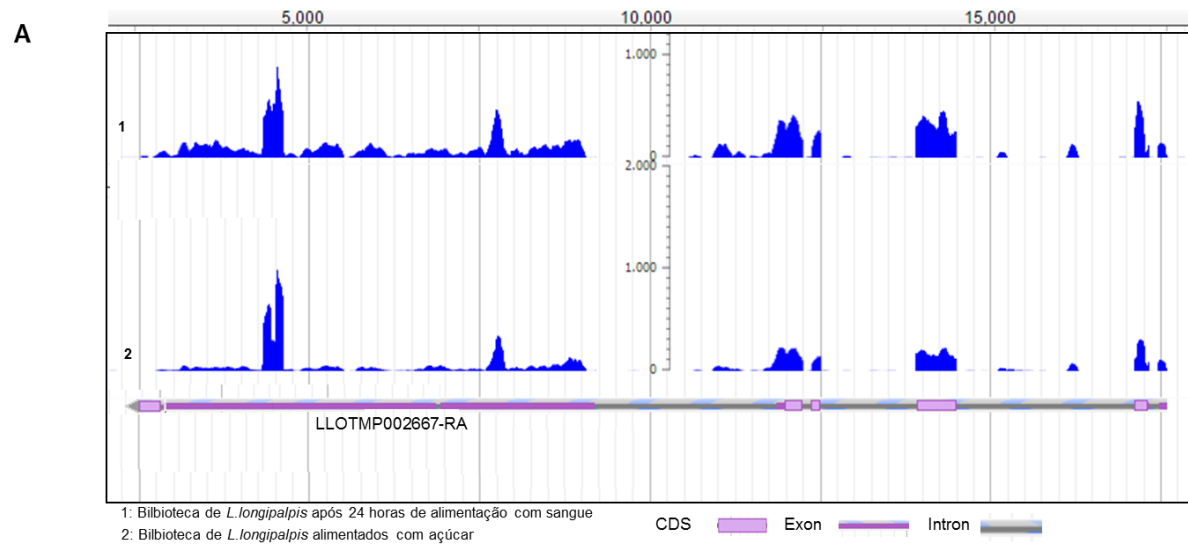


Figura 11: Caracterização do gene loqs de *L. longipalpis*. A) Gene predito LLOTMP002667 identificado como loqs em *L. longipalpis*. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. B) Organização estrutural dos domínios da proteína loqs de *L. longipalpis* composta de domínio de reconhecimento do dsRNA (DSRB), comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*

Os genes Ago3 e piwi componentes centrais da via de piRNAs foram encontrados em *L. longipalpis*. O gene LL0TMP007793.1 apresentou homologia com Ago3 e a proteína predita apresenta domínios piwi e PAZ que são conservados com a de *Drosophila*. Estes domínios sugerem que a Ago3 de *L. longipalpis* apresente atividade de afinidade ao piRNA e de atividade catalítica (Figura 12). Quatro genes apresentaram homologia com piwi de *Drosophila*, piwi1, piwi2, piwi3 e piwi4. As proteínas putativas codificadas por estes genes têm domínios piwi e PAZ preditos e similares à proteína piwi de *Drosophila* (Figura 13).

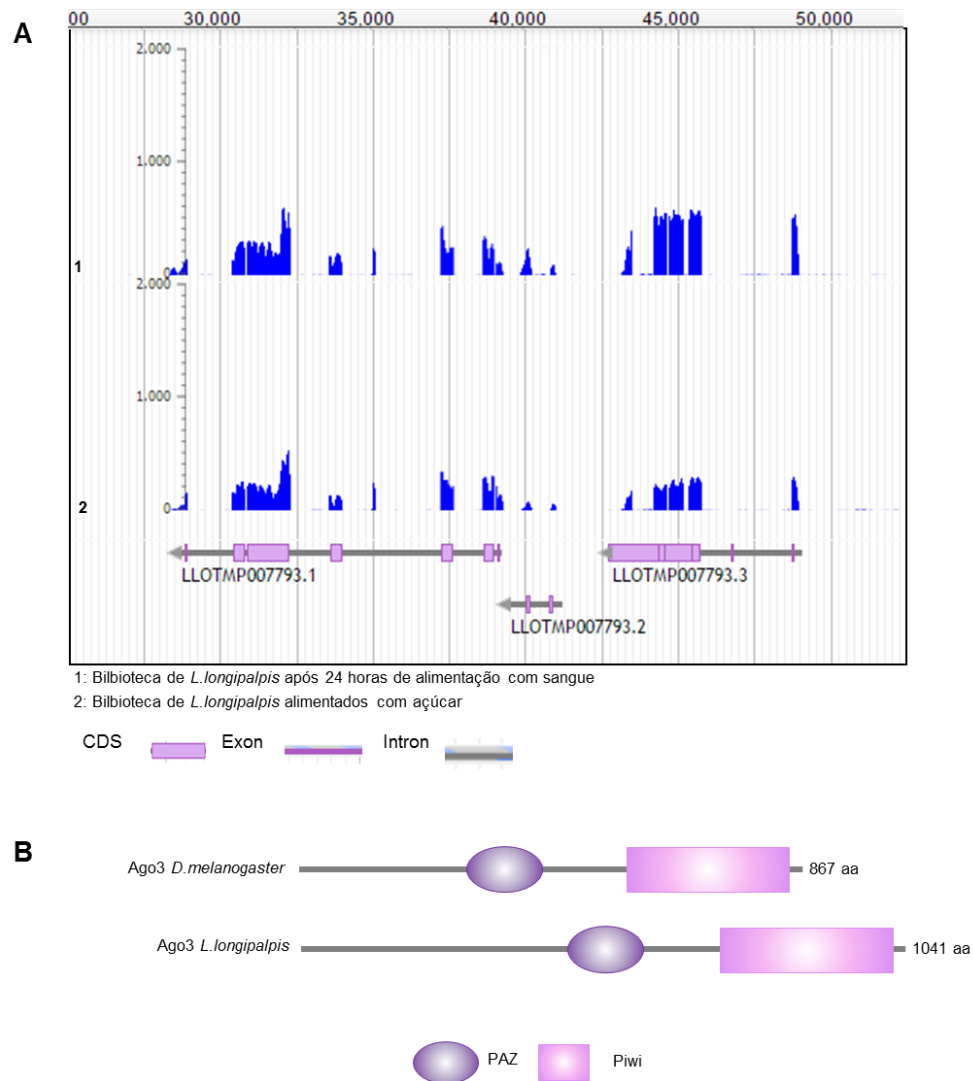


Figura 12: Caracterização da Ago3 de *L. longipalpis*. A) Gene predito LLOTMP007793.1 identificado como Ago3 em *L. longipalpis*. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. B) Organização estrutural dos domínios da proteína Ago3 de *L. longipalpis* composta de domínio Piwi e PAZ comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*

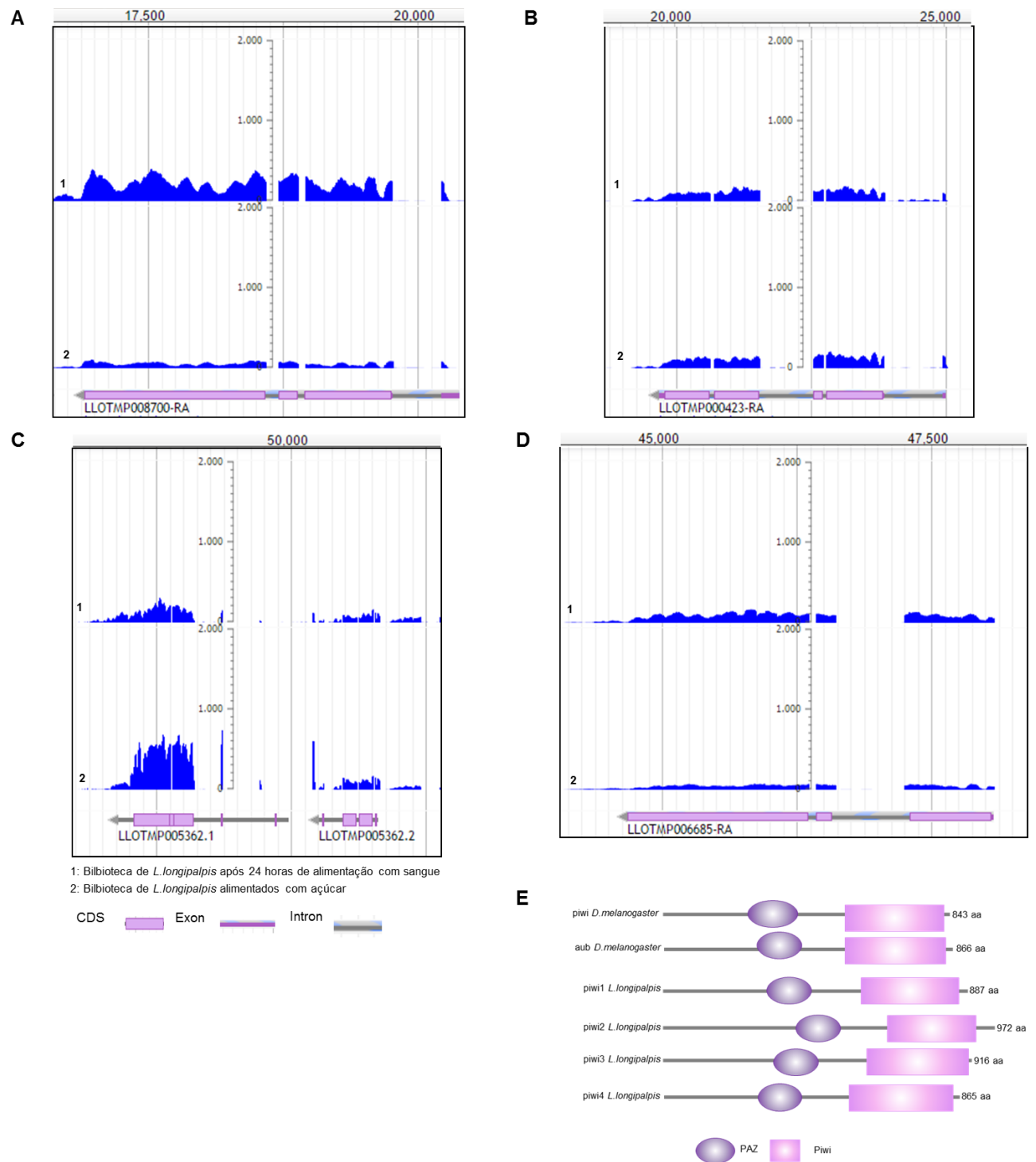


Figura 13 Caracterização das piwi de *L. longipalpis*. A) Gene predito LLOTMP008700, identificado como piwi1 em *L. longipalpis*. B) Gene predito LLOTMP000423 identificado como piwi2 em *L. longipalpis*. C) Gene predito LLOTMP005362.1 identificado como piwi3 em *L. longipalpis*. D) Gene predito identificado como piwi4 em *L. longipalpis* LLOTMP006685, piwi2, piwi3 e piwi4. A organização de CDS, exon e intron é comparada com os dados de cobertura do RNA-seq. E) Organização estrutural dos domínios das proteínas piwi de *L. longipalpis* composta de domínio Piwi e PAZ comparada com a estrutura da proteína ortóloga de *D. melanogaster*.

Os genes das via de RNAi encontrados em *L. longipalpis*, foram usados na referência para a busca por blast no draft do genoma de *P. papatasi*. Contudo, neste foram encontrados diversos problemas de identificação dos genes, devido ao genoma ainda estar em fase de curadoria. Vários dos genes identificados possuem apenas fragmentos de domínios, como a Dicer- 2, Ago3 e Ago1 e outros não foram encontrados, como Ago2 e r2d2 (Tabela 4).

Tabela 4: Genes das vias de RNAi em *P. papatasi*

ID VectorBase	Ortólogo	ORF	Proteína	e-value	Identidade	Localização (Scaffold)
PPATMP008140	Dcr-2	1644 bp	547 aa	0.0	64.7%	47738: 4,153-5,796
NE	r2d2					
NE	AGO2					
PPATMP006255	loqs	1040 bp	218 aa	9,00E-151	87.7%	4:1,392,711-1,397,363
PPATMP000853	drosha	3249bp	1082 aa	0.0	84.1%	1219: 28,667-33,606
PPATMP005440	Dcr-1	5588 bp	1839 aa	0.0	82.7%	334: 13,905-25,891
PPATMP005304	AGO1	1538 bp	477 aa	0.0- 2E-173	94.3%- 100%	3232: 1,621-10,587
PPATMP009756	pasha	1269 bp	422 aa	8,00E-154	79%	63318: 2,547-3,815
PPATMP005870	AGO3	2391 bp	649 aa	0.0	74.2%	3695:4,737-14,529
PPATMP001776	piwi2	2928 bp	975 aa	0.0	65.3% - 77.2%	1532: 22,048-30,014
PPATMP005745	piwi4	1194 bp	393 aa	2e-173 - 0.0	60.6% - 76.8%	3576: 753-1,946

NE- Gene não encontrado

O número de cópias dos genes encontrados nos dois organismos, *L.longipalpis* e *P.papatasi* estão representados na Tabela 5

Tabela 5: Número de cópias dos genes das vias de RNAi de *L. lutzomyia* e *P. papatasi* comparados com alguns Diptera

RNAi pathway	Gene name	<i>L.longipalpis</i>	<i>P.papatasi</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. aegypti</i>
siRNA	Dcr-2	1	1	1	1
	r2d2	1	NE	1	1
	AGO2	1	NE	1	1
miRNA	loqs	1	1	1	1
	drosha	1	1	1	1
	pasha	1	1	1	1
	Dcr-1	1	1	1	1
	AGO1	2	1	1	2
piRNA	AGO3	1	1	1	1
	piwi/aub	4	3	2	7

NE- Gene não encontrado

5.2 - Análises filogenéticas

As análises de organização de domínios das principais proteínas que compõem as vias de siRNA, miRNA e piRNA de *L. longipalpis*, mostram que todas apresentam domínios canônicos, suportando a ideia de conservação de função (Moran, Praher et al. 2013). Para analisarmos em detalhes a relação evolutiva entre estas proteínas, foram feitas análises filogenéticas comparando flebotomíneos com outros organismos (Tabela 6).

Tabela 6: Genes das vias de RNAi de insetos e outros organismos utilizados nas análises filogenéticas.

Proteína	<i>Homo sapiens</i> ^c	<i>Aedes aegypti</i> ^a	<i>Anopheles gambiae</i> ^a	<i>Culex quinquefasciatus</i> ^a	<i>Drosophila persimilis</i> ^b	<i>Escherichia coli</i> ^c	<i>Pyrococcus furiosus</i> ^c
Ago1	NP_036331.1	AAEL012410 AAEL015246	AGAP011717	CPIJ006138	FBgn0154681	gi: 253772534	gi:74536972
Ago2	NP_036286.2	AAEL017251	AGAP011537	CPIJ009898	FBgn0159794 (Ago2.pa)		
Ago3	NP_079128.2	AAEL007823	AGAP00886	CPIJ005275	FBgn0158264		
Ago4	NP_060099.2						
Dicer-1	AAI50288.1	AAEL001612	AGAP002836	CPIJ003169	FBgn0161368		
Dicer-2		AAEL006794	AGAP012289	CPIJ010534	FBgn0148229		
drosha	Q9NRR4.2	AAEL008592	AGAP008087	*	FBgn0149306		
pasha		AAEL002478	AGAP002554	CPIJ017023	FBgn0161579		
loqs		AAEL008687	AGAP00978	CPIJ004832	FBgn0163634		
r2d2		AAEL011753	AGAP009887	CPIJ011746	FBgn0156886		
Piwi-aub		AAEL013692		CPIJ002458			
		AAEL008098		CPIJ002459			
		AAEL007698	AGAP009509	CPIJ002415	FBgn0156620		
		AAEL006287	AGAP011204	CPIJ017381	FBgn0156737		
		AAEL013233		CPIJ012516			
		AAEL013227		CPIJ017382			
		AAEL008076					
PIWIL1	BAC81341.1						
PIWIL2	BAC81342.1						
PIWIL4	NP_689644.2						

^aDisponível no VectorBase

^bDisponível no Flybase

^cDisponível no GenBank

*Não foi encontrado drosha em *C. quinquefasciatus*

As proteínas argonauta são conservadas evolutivamente sendo encontradas em bactérias, archaea e eucariotos. Em animais, as proteínas argonautas podem ser subdivididas filogeneticamente em família Ago e família Piwi, (Hock and Meister 2008, Hutvagner and Simard 2008). As proteínas da família Ago associam-se com os miRNA e siRNA, enquanto as da família Piwi ficam associada com os piRNA que atuam em células germinativas, durante a etapa de gametogênese (Thomson and Lin 2009).

As análises filogenéticas das proteínas argonauta mostram que as proteínas Ago1 de insetos e mamíferos se agrupam em um mesmo clado

enquanto o clado com as proteínas Ago2 foi específico de inseto. As proteínas piwi também formaram um clado a parte onde piwi de flebotomíneos se agruparam em um clado separado das piwi de mosquitos e das piwi de *Drosophila*. Esta diferença de perfil de conservação das proteínas das vias de siRNA, miRNA e piRNA está provavelmente relacionada a diferentes pressões evolutivas sofridas por cada uma delas. É importante destacar que a coevolução entre hospedeiros e parasitos faz com os genes de resposta imune sofram uma maior pressão evolutiva. Em *D. melanogaster*, Dicer-2, Ago2 e r2d2 estão entre os 3% dos genes que apresentam maior taxa evolutiva no genoma (Marques and Carthew 2007, Obbard, Gordon et al. 2009). Alguns estudos já mostraram que genes da via de piRNA também apresentam função antiviral e isto pode justificar as pressões evolutivas sofridas por estes genes (Brosnan, Mitter et al. 2007) (Figura 14).

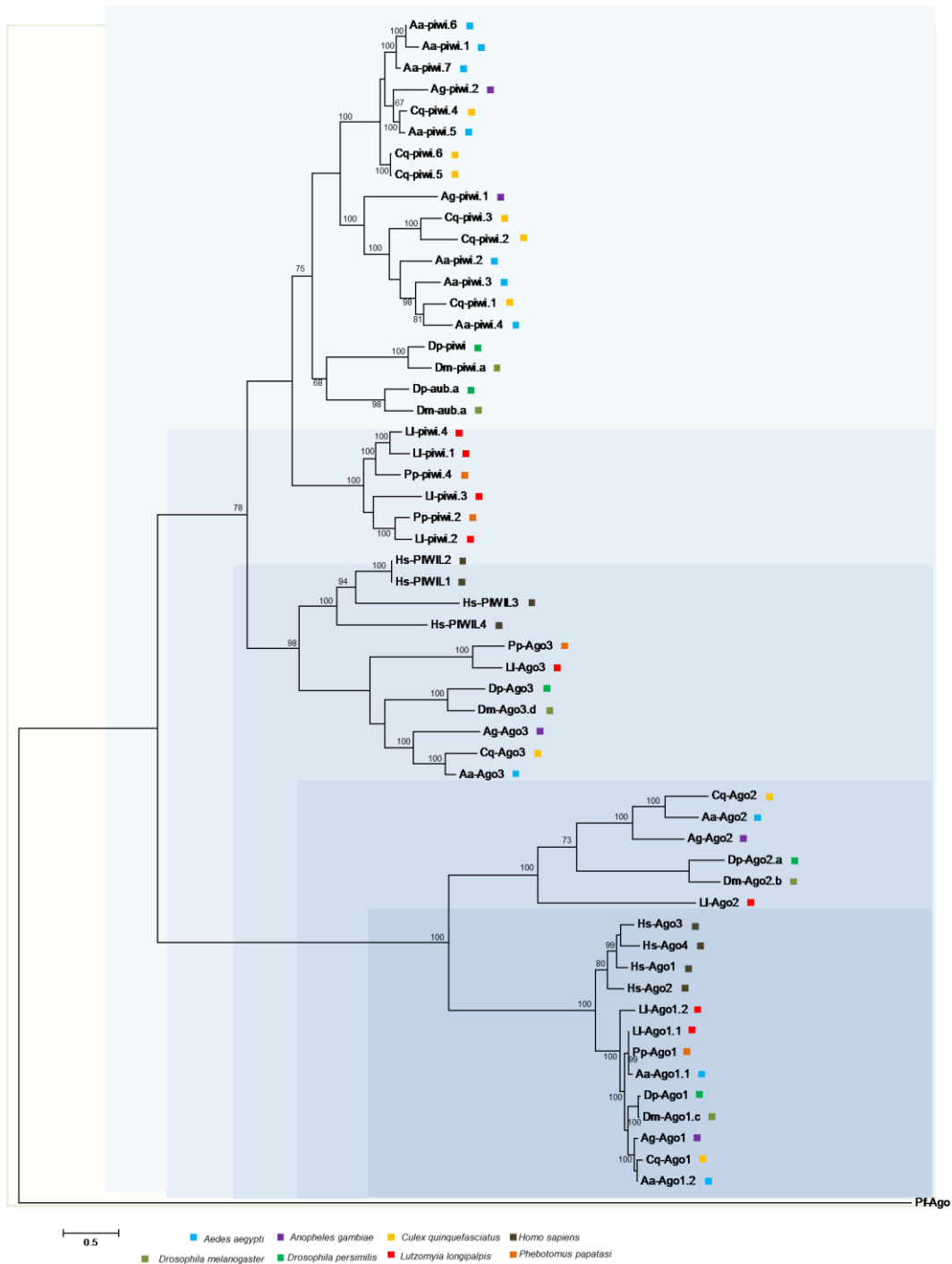


Figura 14: Análises filogenéticas de proteínas Ago em flebotomíneos. Árvore filogenética maximum-likelihood (ML) gerada com alinhamento de sequências no ClustalW e usando o modelo LG+I+G estipulado pelo Prottest. Foi construída no PhyML usando 100 como os valores suportes de bootstrap. Os valores abaixo de 60 foram omitidos. Aa (*A. aegypti*), Ag (*A. gambiae*), Cq (*C. quinquefasciatus*), Dm (*D. melanogaster*), Dp (*D. persimilis*), Hs (*Homo sapiens*), Ll (*L. longipalpis*), Pp (*P. papatasi*), Pf (*Pyrococcus furiosus*).

As análises filogenéticas usando sequências das enzimas RNaseIII, Dicers e droshas, mostrou que as duas são agrupadas em clados claramente distintos. Dentro do clado das Dicers, há ainda a separação clara do clado contendo Dicer-1 que é grupo irmão do clado da Dicer-2. Esta separação em inseto representam as proteínas que se especializaram na função de reconhecimento de dsRNA longo em siRNA e não na biogênese dos pequenos RNAs. A divergência observada também está intimamente ligada a maior evolução do gene da ribonuclease RNaseIII, devido a função antiviral exercida. Os genes com função reguladora (drosha) representam o grupo mais conservado, ficando a proteína drosha de insetos agrupadas com a drosha de mamífero (Figura 15).

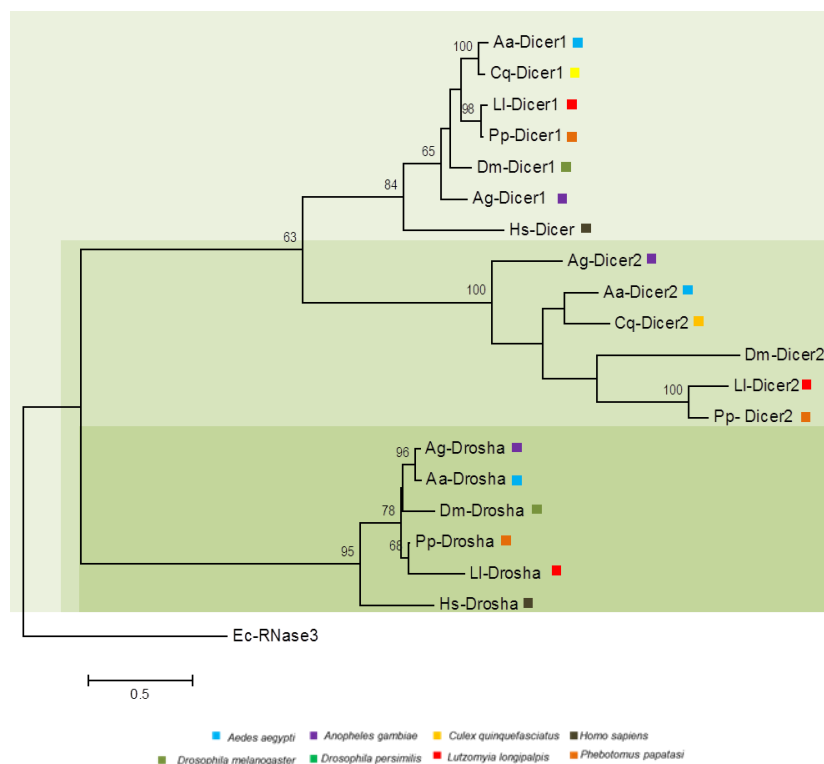


Figura 15: Análises filogenéticas de proteínas ribonucleases RNaseIII em flebotomíneos. Árvore filogenética maximum-likelihood (ML) gerada com alinhamento de sequências no ClustalW e usando o modelo LG+G estipulado pelo Prottest. Foi construída no PhyML usando 100 como os valores suportes de bootstrap. Os valores abaixo de 60 foram omitidos. Aa (*A. aegypti*), Ag (*A. gambiae*), Cq (*C. quinquefasciatus*), Dm (*D. melanogaster*), Dp (*D. persimilis*), Hs (*Homo sapiens*), LI (*L. longipalpis*), Pp (*P. papatasi*), Ec (*Escherichia coli*).

Nossos resultados de análise filogenética dos genes das vias de RNAi sugerem que estes genes são funcionais e conservados em flebotomíneos, sendo os genes das vias de siRNA e piRNA mais divergentes que a via de miRNA. Entretanto, o funcionamento destas vias está intimamente ligada à produção de pequenos RNAs não codificantes, o que nos levou a sequenciar pequenos RNAs de *L. Longipalpis*. Entretanto, como a via de siRNAs é a principal defesa antiviral em insetos, nós antes decidimos desenvolver um modelo de infecção de flebotomíneos por vírus onde o papel da via de siRNAs pudesse ser avaliado.

5.3. Padronização de modelo para infecção de arbovirus

5.3.1. Cinética de multiplicação em células de inseto

Diversos estudos já mostraram que os flebotomíneos são os agentes transmissores do VSV na natureza (Comer, Tesh et al. 1990, Comer, Corn et al. 1992). Da mesma forma, outras análises de infecção com este vírus foram feitas em linhagem celular de *L. longipalpis* (LL5) e também em células de mosquito C6/36 (Llewellyn et al., 2002).

No nosso estudo, as análises de cinética de infecção em células LL5 foram realizadas com o VSV expressando a proteína GFP fluorescente como gene repórter para facilitar a visualização da infecção. Células foram infectadas com diferentes multiplicidades de infecção do VSV. Foi observado que o VSV é capaz de se replicar nas células LL5, atingindo um platô de replicação do RNA viral entre 6 e 12 horas após a infecção. No entanto, o acúmulo de partículas liberadas no sobrenadante de células infectadas parece acontecer mais tardiamente (Figura 16).

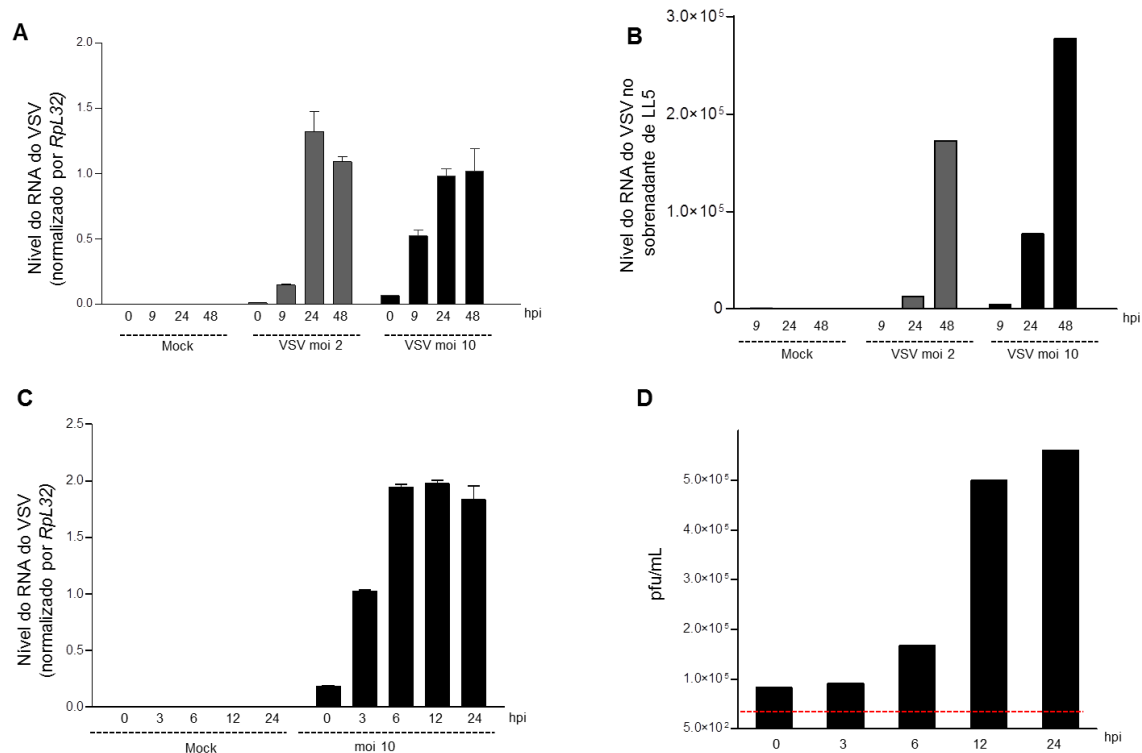


Figura 16: Cinética da infecção do VSV em células LL5. Células LL5 foram infectadas com diferentes moi de VSV e células e sobrenadante, de grupos infectados e controle (mock), foram coletadas nos tempos indicados. O RNA total foi extraído e as análises de expressão gênica do gene L do VSV foram feitas por RT-qPCR e normalizadas pelo gene constitutivo *Rpl32*. A) RNA viral detectado por RT-qPCR em cinética de células não infectadas (mock) e infectadas com moi 2 e 10 do VSV. B) Detecção de RNA viral no sobrenadante, através da técnica de RT-qPCR. C) RNA viral detectado por RT-qPCR em cinética de células não infectadas (mock) e infectadas com moi 10. D) Detecção de partículas virais infecciosas através da técnica de titulação por contagem de unidades formadoras de placas.

Durante os experimentos com células LL5, nós observamos que as células infectadas com o VSV não apresentaram fluorescência apesar do RNA correspondente ao GFP ter sido detectado. Logo, nós decidimos comparar a infecção do VSV-GFP em diferentes linhagens celular para verificarmos se estes fenômenos seriam exclusivo de células LL5.

Células Vero (derivadas de epitélio de rim de macaco verde-*Cercopithecus aethiops*) foram utilizadas na análise comparativa de curva de multiplicação do VSV, juntamente com células de mosquito C6/36 (derivadas de larvas de *Aedes albopictus*) e LL5. Estas células foram infectadas com uma moi 0,1 pfu/célula do VSV. Células e sobrenadantes foram coletados nos

tempos especificados. Observamos que o VSV se multiplica nas três células analisadas, sendo o nível de RNA viral na célula maior em Vero e C6/36. Porém, observamos efeitos citopáticos e a morte destas duas linhagens no tempo de 48 horas pós infecção. Entretanto, a fluorescência do GFP viral foi detectada apenas em células Vero, não sendo observada nas células de inseto (Figura 17).

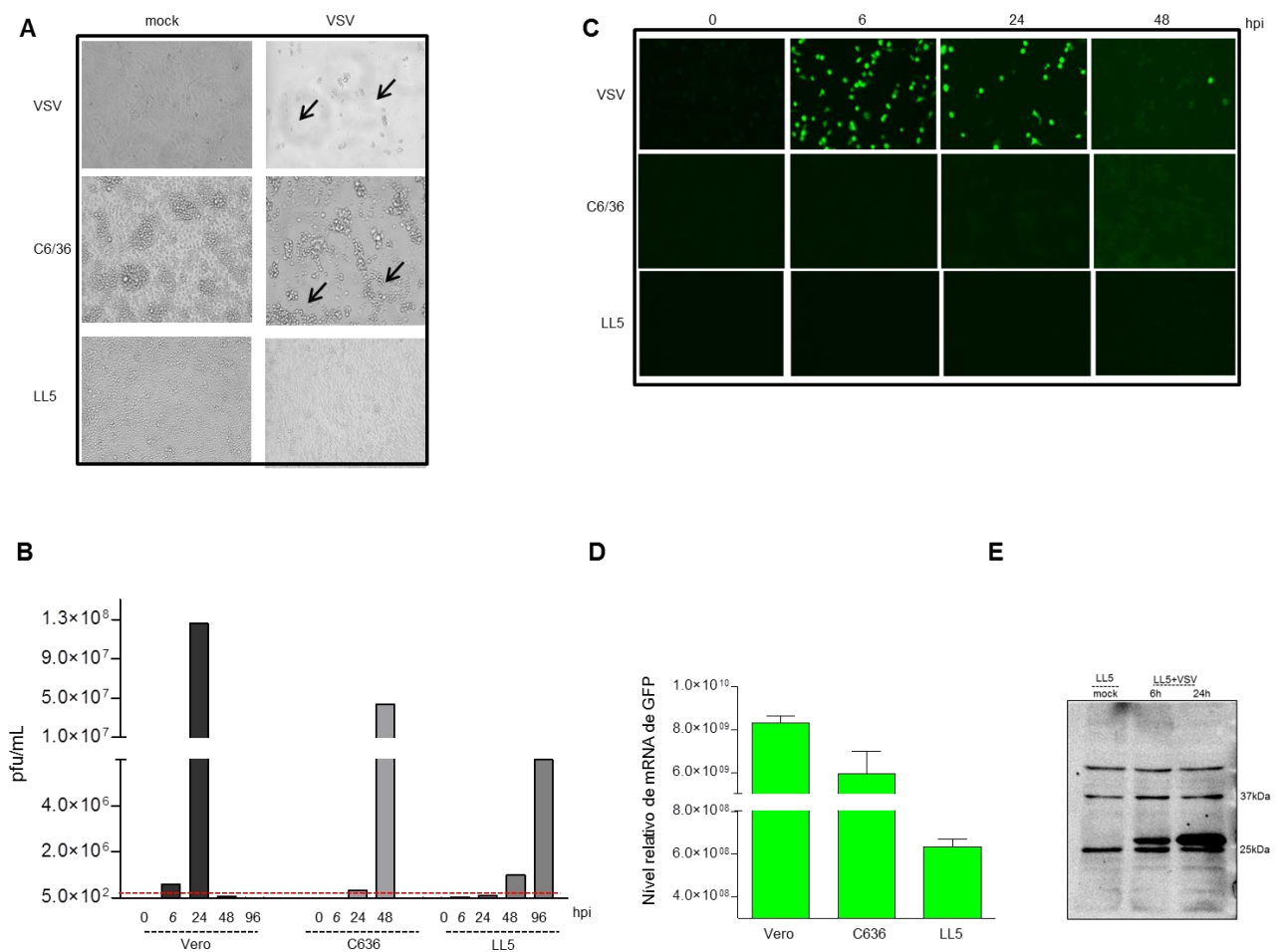


Figura 17: Infecção produtiva do VSV em células de inseto. Células foram infectadas com 10^{-1} do VSV e sobrenadante e células coletadas nos tempos acima. A) Imagens de célula Vero, C6/36 e LL5 após 48 horas de infecção. As setas indicam as alterações morfológicas causadas pelo vírus. B) Titulação por contagem de unidade de placa e sobrenadantes de células infectadas com o VSV, nos tempos indicados acima. O limite de detecção da técnica está representado pela linha pontilhada. C) Imagens mostrando a fluorescência do GFP em células Vero, C6/36 e LL5 nos tempos de 0, 6, 24 e 48 horas após a infecção. As imagens foram obtidas através do Fluid Cell Image Station®. D) Detecção do nível relativo de RNA do GFP por RT-qPCR, usando oligo-DT em células após 24 horas de infecção. E) Detecção da proteína GFP de 26.9 kDa em células LL5, usando anticorpo anti-GFP monoclonal.

Para investigar a razão desta diferença, analisamos a expressão do mRNA e da proteína correspondentes ao GFP em células Vero, C6/36 e LL5. Entretanto, observamos que o mRNA do GFP foi detectado nas três linhagens de células. Observamos também que a proteína GFP de 26 kDa foi detectada por imunoblot nas células LL5 mesmo na ausência de fluorescência (Figura 17).

Mais estudos são necessários para entendermos a ausência de fluorescência do GFP em células de insetos, apesar da proteína ter sido detectada. É possível que a ausência de fluorescência esteja relacionada ao dobramento incorreto da proteína GFP derivada do VSV.

5.3.2 Infecção de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

Relatos na literatura já mostraram a competência de flebotomíneos de se infectarem com o VSV (via rota de injeção ou alimentação artificial) e de transmiti-lo para um hospedeiro vertebrado. (Tesh, Chaniotis et al. 1971, Tesh, Chaniotis et al. 1974, Tesh, Boshell et al. 1987, Comer, Tesh et al. 1990, Comer, Corn et al. 1992, Clarke, Stallknecht et al. 1996).

Para padronizar a infecção natural em nosso laboratório, fêmeas de *L. longipalpis* com 2-3 dias, foram alimentadas com sangue contendo VSV. Como controle, utilizamos grupos de fêmeas alimentadas com sangue suplementado com sobrenadante de células sem o vírus (mock). Nos dois primeiros dias, como ainda não tinha ocorrido a digestão do sangue nas fêmeas, a taxa de positividade de 100% mostrada pode ser referente ao inóculo. No 4º dia, a taxa de positividade caiu para 62,5%, mas o aumento do nível de RNA viral detectado indica a multiplicação do VSV nestes insetos. No 6º dia, a taxa de positividade foi de 72,7%. Não houve diferença na taxa de sobrevivência dos insetos infectados pelo vírus comparados ao grupo controle (Figura 18).

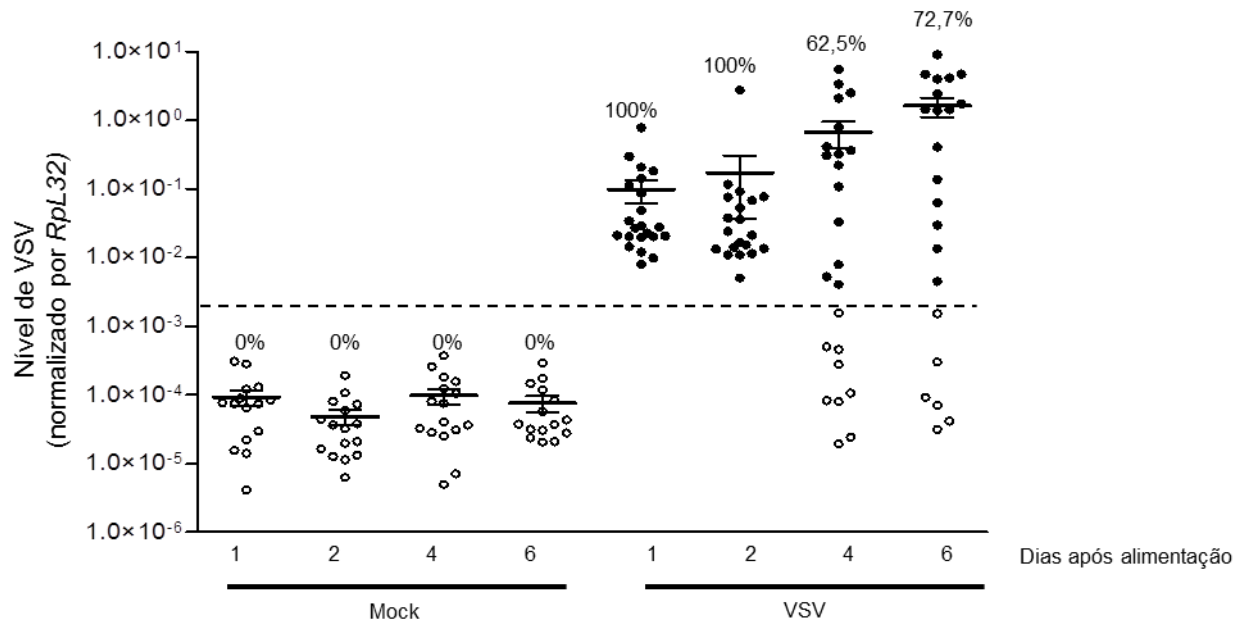


Figura 18: Cinética de multiplicação do VSV em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas por alimentação artificial. O gráfico mostra o perfil da infecção de insetos alimentados com sangue infectado com o VSV e insetos alimentados com sangue sem o vírus (mock). O nível de RNA viral normalizado pela expressão do gene constitutivo *RpL32* foi medido por RT-qPCR. Círculos em branco representam os indivíduos não infectados ou fora do limite de detecção da técnica, delimitada por uma linha pontilhada. Os círculos em verde representam os indivíduos em que foi detectado o RNA viral do VSV-GFP. Os círculos em preto representam os indivíduos em que foi detectado o RNA viral do VSV. As barras representam médias sem desvio padrão

Observamos também que a taxa de infecção de flebotomíneos com o VSV por alimentação é dose dependente. A dose mínima para a infecção destes insetos está entre 10^6 e 10^7 pfu/mL no sangue. Devido ao pequeno número de insetos alimentados na dose 10^5 pfu/mL, não foram feitas coletas nos dias 1 e 6, identificadas no gráfico como ND (*not done*) (Figura 19).

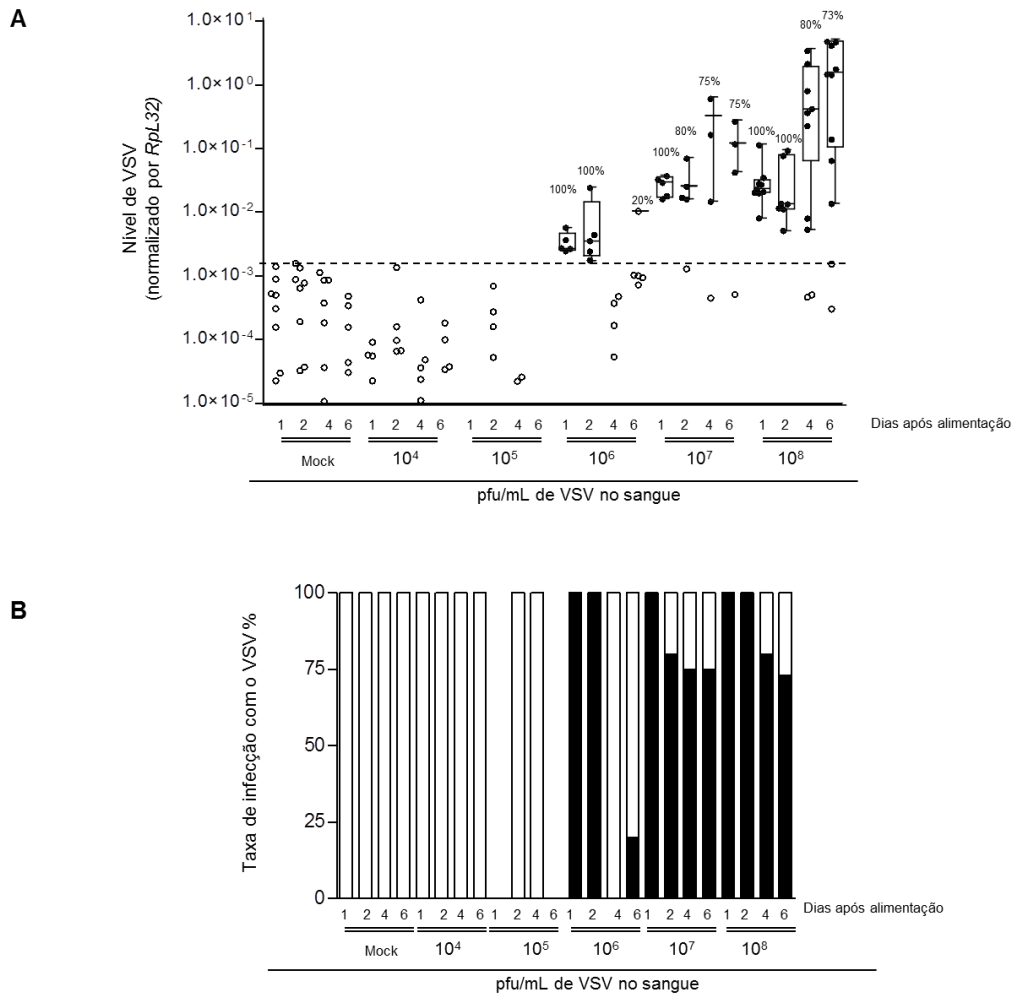


Figura 19: Quantidade de VSV necessário para infectar flebotomíneos por alimentação. O gráfico mostra a relação entre a carga viral e a expressão do gene constitutivo *RpL32* medidas por RT-qPCR. Flebotomíneos foram alimentados com sangue humano contendo diferentes doses do VSV, como indicado no gráfico. Grupo controle (Mock) foi alimentado com sangue sem o vírus. As coletas foram feitas nos dias indicados acima. Nos dias 1 e 6 do grupo alimentado com dose 10^5 pfu/mL não foi feita coleta conforme indicado (ND-not done). A) Os círculos pretos representam flebotomíneos positivos para o VSV, enquanto os círculos brancos representam os indivíduos fora do limite de detecção da técnica, delimitada por uma linha pontilhada no gráfico. As barras representam o desvio padrão dos indivíduos infectados em cada grupo. Os valores indicados acima dos símbolos representam a taxa de positividade para cada grupo de flebotomíneo. B) Representação dos valores da taxa de infecção pelo VSV, mostrado no gráfico A. As barras brancas e pretas representam os grupos não infectados e infectados, mostrados em A.

5.4. Análise da expressão dos genes da via de RNAi

Com o modelo de infecção padronizado em nosso laboratório, nós investigamos a ativação da via de siRNAs em flebotomíneos. Em primeiro lugar, nós analisamos o perfil de expressão de alguns genes da via de siRNA (Dicer-2, r2d2, Ago2) e da via de miRNA (loqs) em fêmeas alimentadas com sangue contendo sobrenadante de células e alimentadas com sangue infectado com o VSV (4×10^8 pfu/mL). Não observamos diferença de expressão de nenhum dos genes analisados e flebotomíneos. Os dados obtidos corroboram com os de mosquitos infectados com o *Dengue virus* e *Drosophila* infectada com *Drosophila C virus*, em que estes genes expressam constitutivamente sem alteração após infecção (Figura 20) (Dostert, Jouanguy et al. 2005, Xi, Ramirez et al. 2008).

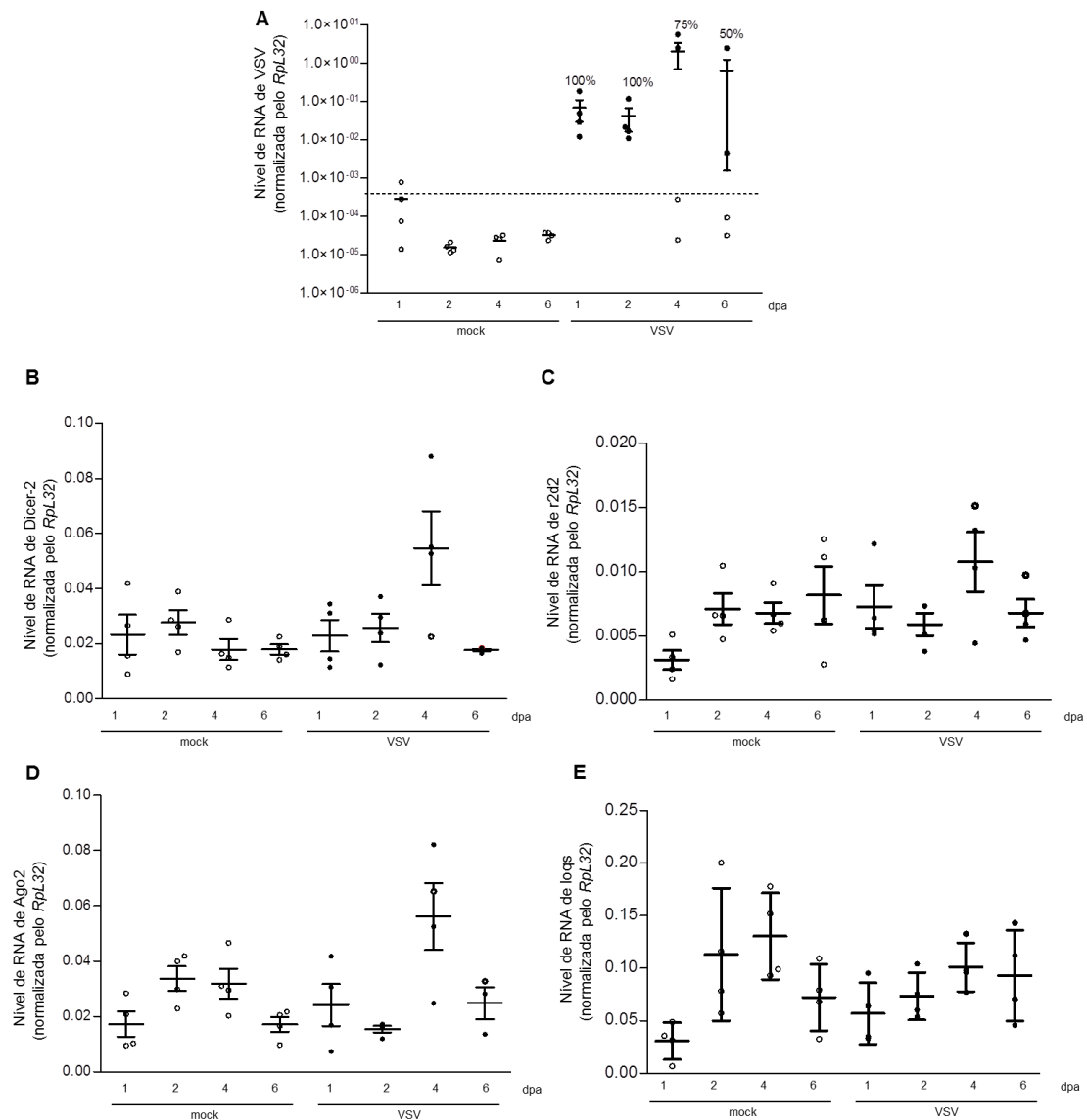


Figura 20: Os genes da via de siRNA não alteram a expressão após a infecção de *L. longipalpis* após a alimentação com sangue. *L. longipalpis* alimentadas com sangue não infectado (mock) e infectado com o VSV tiveram o RNA total extraído e analisado por RT-qPCR, normalizada pelo gene *RpL32*. A) Círculos em preto representam os indivíduos infectados pelo VSV e os círculos brancos os indivíduos não infectados ou abaixo do limite de detecção da técnica, representado pela linha pontilhada. A taxa de infecção está representada acima. B) Nível de expressão de RNA de Dicer-2 nos indivíduos representados em A. C) Nível de expressão de RNA de r2d2 nos indivíduos representados em A. D) Nível de expressão de Ago2 nos indivíduos representados em A. E) Nível de expressão de loqs nos indivíduos representados em A

5.5. Análise dos pequenos RNAs em *L. longipalpis*

As análises de expressão gênica dos componentes da via de RNAi em flebotomíneos não são suficiente para caracterizar estas vias no inseto. Para isto é preciso analisar a produção de pequenos RNAs, que são consideradas as assinaturas clássica de ativação das vias de RNAi. Em geral, isto é feito pelo sequenciamento dos pequenos RNAs derivados do RNA total extraído do inseto. Antes de realizar os sequenciamento de pequenos RNAs, nós observamos que, em *D. melanogaster* o rRNA 2S, com tamanho em torno de 30 nucleotídeos enviesava os resultados do sequenciamento (Jordan, Jourdan et al. 1976, Tautz, Hancock et al. 1988, Aravin, Lagos-Quintana et al. 2003). Assim, antes do preparo das bibliotecas, nós analisamos a presença potencial deste rRNA nas amostras de *Lutzomyia*. As amostras de RNA de células LL5 e de flebotomíneos foram analisadas usando RNA total de moscas e mosquitos para comparação. Em gel de poliacrilamida, foi observado uma banda de 30 nucleotídeos em todas as amostras analisadas, sugerindo a presença de rRNA 2S em *L. longipalpis* (Figura 21).

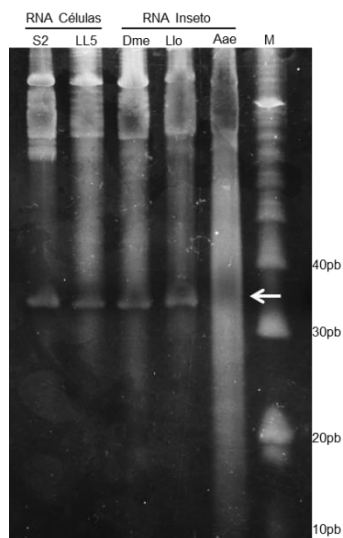


Figura 21: Detecção do rRNA 2S em *L. longipalpis*. RNA de células e de insetos foram extraídos e analisados quanto a presença do rRNA 2S em gel de poliacrilamida 12%. A seta indica o amplicon com cerca de aproximadamente 30 nucleotídeos, equivalente ao rRNA 2S em todas as amostras. O perfil de degradação do RNA de mosquito, dificultou a análise nesta amostra. Amostras S2: RNA de células de *D. melanogaster*, LL5: RNA de células de *L. longipalpis*, Dme: RNA de *D. melanogaster*, Llo: RNA de *L. longipalpis*, Aae: RNA de *A. aegypti*, M: marcador de DNA com peso molecular de 10pb.

Diante da detecção de um possível rRNA 2S em amostras de flebotomíneos, nós optamos em preparar bibliotecas de pequenos RNAs utilizando estratégias baseadas em frações de tamanhos distintos, de 16-28 e 16-33 nucleotídeos. A segunda estratégia foi utilizada, mesmo com o risco de detecção do rRNA 2S para evitarmos a perda de pequenos RNAs originados da via de piRNA que tem tamanho maior, entre 24-30 nucleotídeos.

A escolha das amostras a serem sequenciadas foi definida pela taxa de positividade das amostras nos resultados obtidos por RT-qPCR. Foram montados seis grupos de RNA de flebotomíneos, sendo três correspondentes a amostras controle e as outras três a amostras infectadas pelo VSV, ambas nos dias 2, 4 e 6 após a alimentação. A qualidade do RNA foi avaliada pelo equipamento Agilent™ 2100 Bioanalyzer® e as amostras foram consideradas íntegras e adequadas para o sequenciamento de próxima geração (Figura 22).

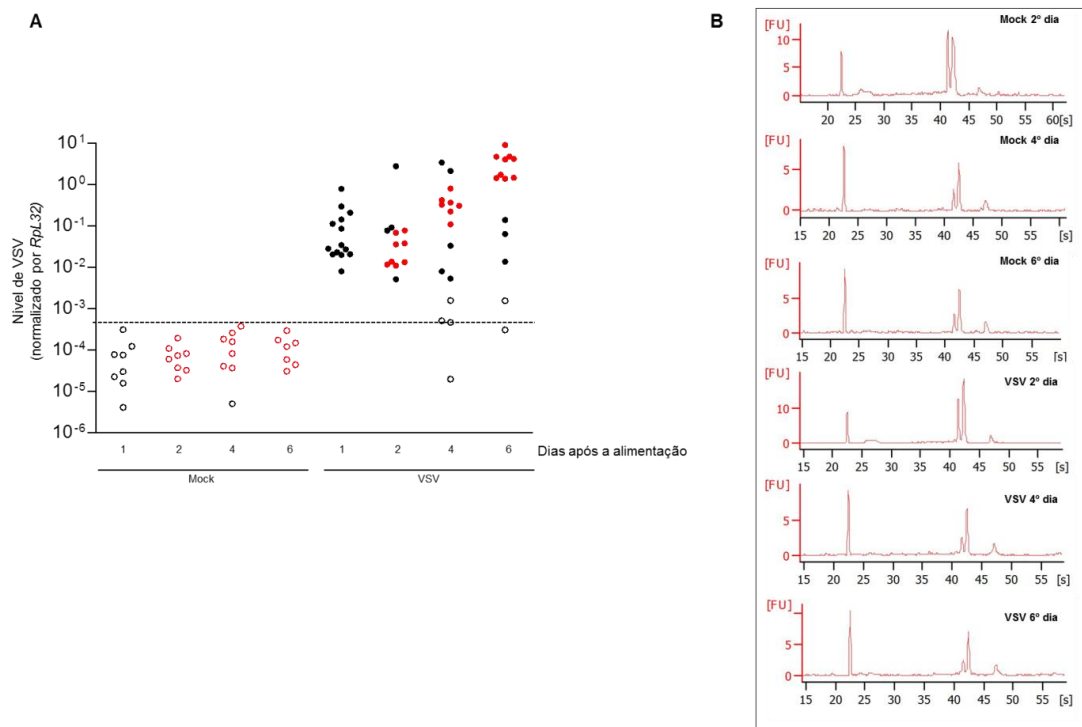


Figura 22: Grupos de RNA de *L. longipalpis* selecionadas para o preparo das bibliotecas de pequenos RNAs. RNA de flebotomíneos de dois experimentos independentes de infecção com VSV foram selecionados em grupos de acordo com o nível de RNA endógeno (Rpl32) e viral, detectados. A) Grupos de RNA de flebotomíneos separados para o preparo das bibliotecas. Foram selecionados 8 indivíduos no grupo mock 2º dia e 7 indivíduos nos grupos mock 4º dia e mock 6º dia. Estes indivíduos estão representados por círculos com borda vermelha. Nos grupos infectados, foram selecionados 8 indivíduos no 2º dia, 7 indivíduos no 4º dia e 9 indivíduos no grupo 6º dia. Os círculos em vermelho representam os indivíduos selecionados para o preparo da biblioteca. Os círculos em preto representam os indivíduos infectados com o VSV e os círculos em branco representam os indivíduos não infectados ou abaixo do limite de detecção da técnica, indicado pela linha pontilhada. B) Eletroferogramas obtidos com o auxílio do equipamento Agilent™ 2100 Bioanalyzer®. Cada um representa os grupos demonstrados no gráfico A. A concentração obtida para cada grupo de RNA está especificada a seguir: Grupo mock 2º dia (22 ng/μL), Grupo mock 4º dia (11 ng/μL), Grupo mock 6º dia (9 ng/μL), Grupo VSV 2º dia (24 ng/μL), Grupo VSV 4º dia (10 ng/μL) e Grupo VSV 6º dia (7 ng/μL).

A etapa de preparo das bibliotecas e análise pós-sequenciamento foram feitas pelos estudantes Roenick Olmo e Eric Aguiar do nosso laboratório. O preparo da biblioteca foi feito no Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) e o sequenciamento no Instituto de Genética e Biologia Molecular e Celular (IGBMC), ambos em Estrasburgo- França. A metodologia empregada no preparo das bibliotecas foi baseada na técnica desenvolvida por Sébastien Pfeffer em 2007 (Pfeffer 2007) e o sequenciamento feito pela plataforma Illumina HiSeq™ 2000.

Apesar de termos preparado duas bibliotecas com frações de tamanhos distintos, devido a problemas técnicos, todas as análises pós sequenciamento são referentes às bibliotecas com tamanho de 16-33 nucleotídeos. Conforme o esperado pelo tamanho dos RNAs sequenciados, nós observamos que sequências derivadas do rRNA 2S representaram cerca de 48%-65% das sequências totais (Tabela 7). Após o sequenciamento, todas as bibliotecas foram identificadas como mostrado na Tabela 7. Todas as sequências obtidas foram analisadas quanto ao mapeamento nos genomas de referência (*L. longipalpis* e VSV) e quanto ao perfil de tamanho.

Tabela 7: Dados obtidos após o sequenciamento dos pequenos RNAs.

Biblioteca	Condição	Nº de insetos	Sequências totais	Total pós trimagem	Mapeadas em <i>L. longipalpis</i>	Mapeadas em 2S	VSV	VSV	VSV
							1mm	1mm	1mm
							21nt	24-29nt	15-33nt
SPO-103	Mock 2º dpa	8	10,679,360	10,667,361	9,818,962	7,033,327	4	6	20
SPO-104	Mock 4º dpa	7	9,463,241	9,447,838	8,642,129	6,038,654	3	1	12
SPO-105	Mock 6º dpa	7	8,766,757	8,374,223	7,019,206	4,178,486	8	22	52
SPO-106	VSV 2º dpa	8	8,500,448	8,491,316	7,439,178	4,540,795	56	34	201
SPO-107	VSV4º dpa	7	8,109,613	8,097,672	7,266,038	5,343,542	260	224	927
SPO-108	VSV6º dpa	9	8,587,131	8,570,717	7,456,123	4,176,833	7,246	3,500	18,948

dpa: dias após a alimentação
nts: nucleotídeos

As sequências mapeadas no genoma de referência do VSV (vsiRNA) mostraram cobertura por toda a extensão do genoma tanto na fita negativa quanto na fita positiva. Logo, a produção dos pequenos RNAs não codificantes, acontece ao longo de todo o genoma, em ambas as fitas, sem preferências por regiões específicas (*hot spots*) (Figura 23).

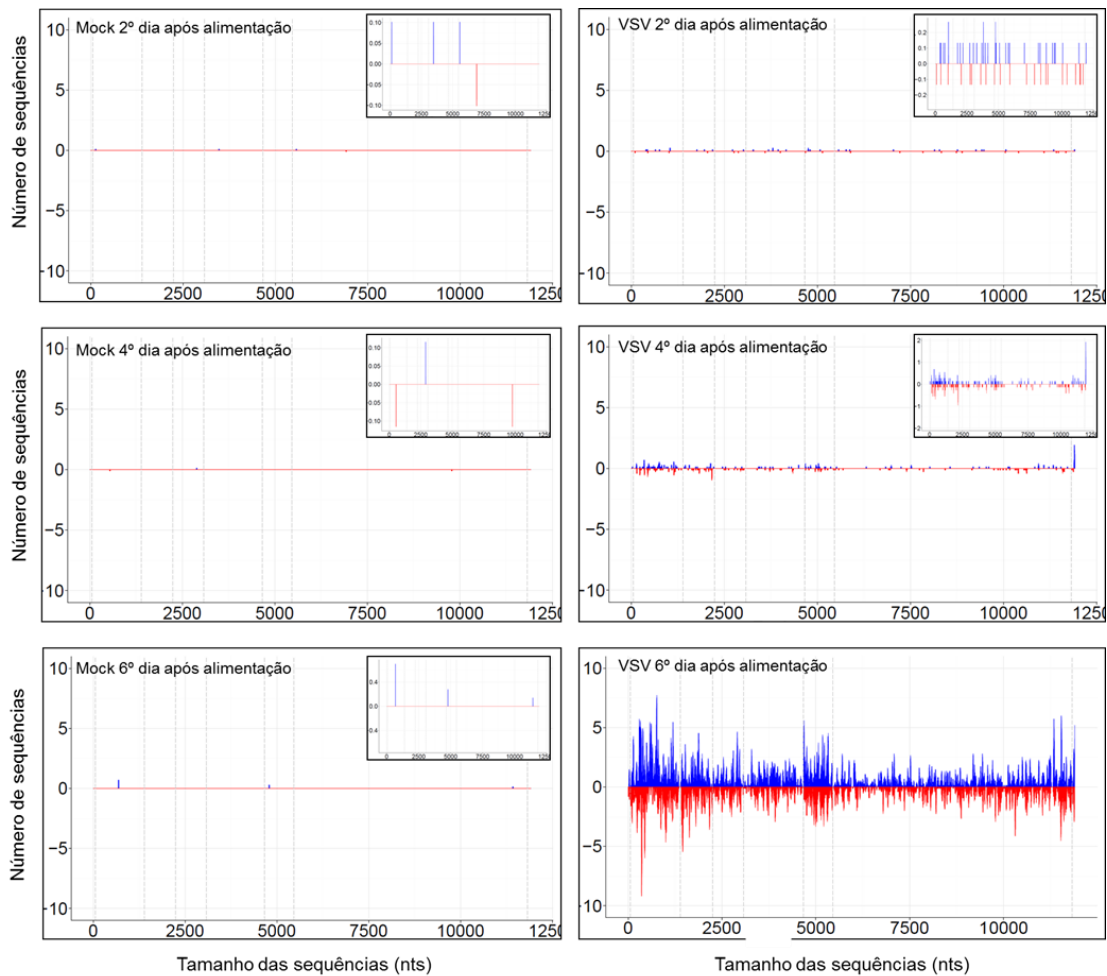


Figura 23: Os vsiRNAs são originados ao longo de todo genoma viral. Perfil de densidade dos pequenos RNAs gerados do VSV (vsiRNA) permitindo 1 mismatch (mm) durante o alinhamento. Os vsiRNAs mapeados na fita negativa (vermelho) e positiva (azul) apresentam uma cobertura ao longo de todo genoma do vírus. As bibliotecas mock (2^o, 4^o e 6^o dias após a alimentação) mostram a ausência de distribuição dos vsiRNA ao longo do genoma. No gráfico de cada biblioteca está destacado o resultado do mesmo mapeamento, porém com a escala alterada. O perfil de densidade dos vsiRNAs nas bibliotecas de VSV é aumentado com o decorrer da infecção. No gráfico das bibliotecas VSV 2^o e 4^o dias após a alimentação, está destacado o resultado do mesmo mapeamento, porém com a escala alterada.

Isto sugere que o precursor de pequenos RNAs é um dsRNA provavelmente gerado como intermediário durante a replicação viral. De acordo com esta análise, a densidade ao longo do curso da infecção, é proporcional à quantidade de genomas virais, ou seja, quanto maior a quantidade de vírus maior a produção de pequenos RNAs.

A ativação das principais vias envolvidas em respostas antivirais (siRNA e piRNA) é indicada pela presença de pequenos RNAs com tamanhos de 21 e 24-29 nucleotídeos, respectivamente. A classe de pequeno RNA com 21 nucleotídeos foi a mais abundante no genoma do VSV, mapeados tanto na fita negativa (vermelho) quanto na fita positiva (azul). Este perfil de distribuição de tamanho no genoma e antígenoma do vírus corrobora a ideia de que estes vsiRNA, canônicos da via de siRNA, são sintetizados após o reconhecimento do dsRNA replicativo pela Dicer-2. Não foi observado um enriquecimento de vsiRNAs com tamanhos entre 24-29 nucleotídeos, considerados uma das assinaturas de ativação da via de piRNA. Assim, a via de siRNA parece ser a única via de RNAi ativada após a infecção do VSV em *L. longipalpis* (Figura 24).

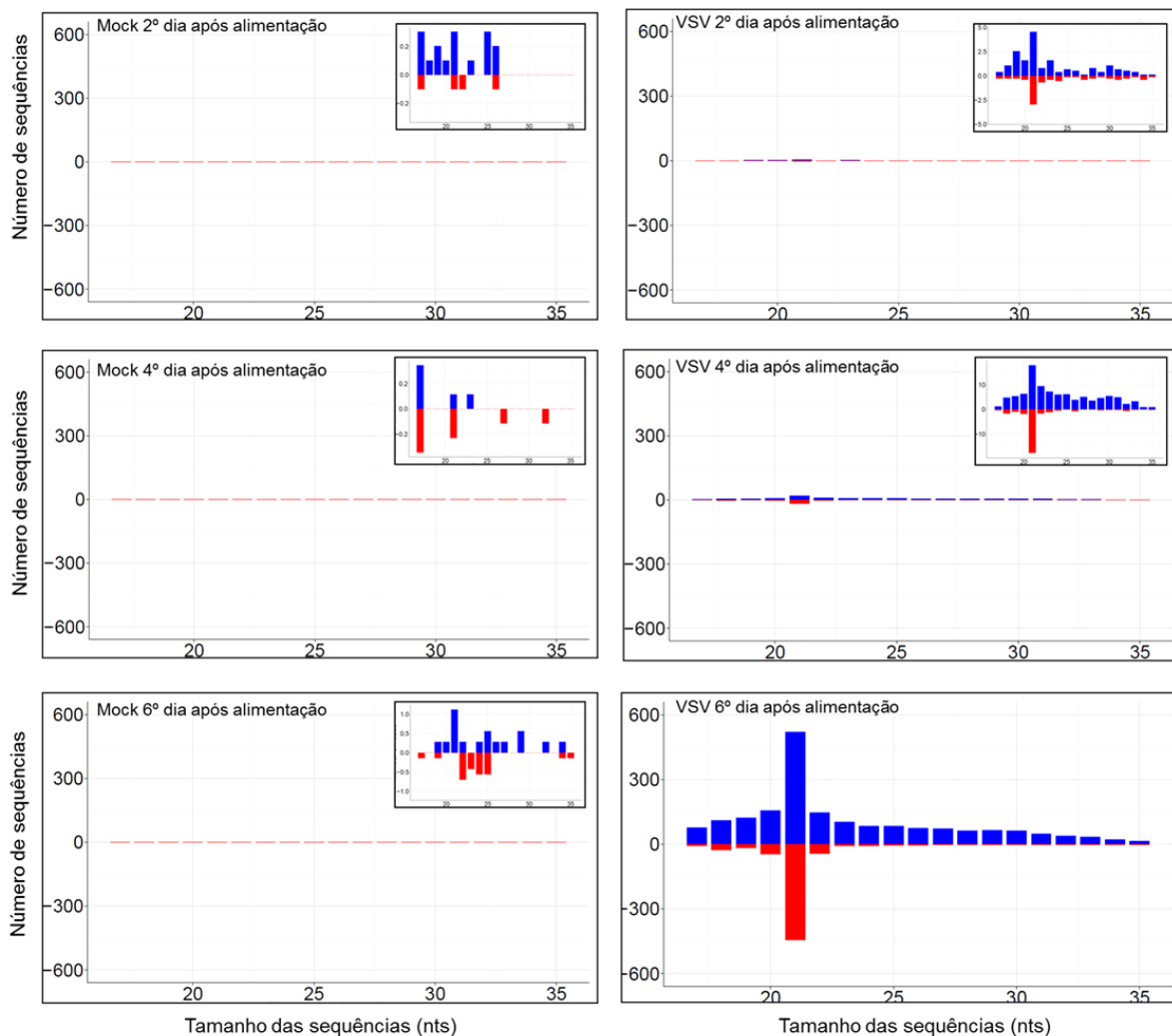


Figura 24: Produção de vsiRNA aumenta durante a infecção de flebotomíneos com o VSV. Perfil de distribuição de tamanho dos pequenos RNAs gerados do VSV (vsiRNA) permitindo 1 mismatch (mm) durante o alinhamento. Os vsiRNAs mapeados na fita negativa (vermelho) e positiva (azul) mostram que existe um enriquecimento para a classe de vsiRNA com 21 nucleotídeos que tem a sua produção aumentada com o decorrer da infecção. As bibliotecas mock (2^o, 4^o e 6^o dias após a alimentação) mostram a ausência de distribuição dos vsiRNA ao longo do genoma. No gráfico de cada biblioteca está destacado o resultado do mesmo mapeamento, porém com a escala alterada. Nos gráficos das bibliotecas de VSV 2^o e 4^o dias após a alimentação, está destacado o resultado do mesmo mapeamento, porém com a escala alterada.

5.6. Caracterização funcional da via dos siRNAs em células de flebotomíneos

Ao observarmos que a via de siRNA foi ativada após a infecção com VSV em *L. longipalpis*, foi questionado se esta via estaria participando da resposta antiviral. Para isto, foi proposto realizar um ensaio funcional usando em células LL5, usando dsRNA alvo para a Ago2. Inicialmente, foi analisado o perfil de silenciamento obtido, usando o dsRNA para luciferase (Fluc) como controle da técnica. Foi observado uma diminuição de 75% do nível de RNA de Ago2 comparado com as células transfectadas com o dsFluc. Porém o nível de RNA de Ago2 detectado nas células não transfectadas (mock), sugere que o dsRNA estimula o aumento da expressão gênica (Figura 25). Análises do perfil de multiplicação viral, após o silenciamento da Ago2 ainda estão em andamento.

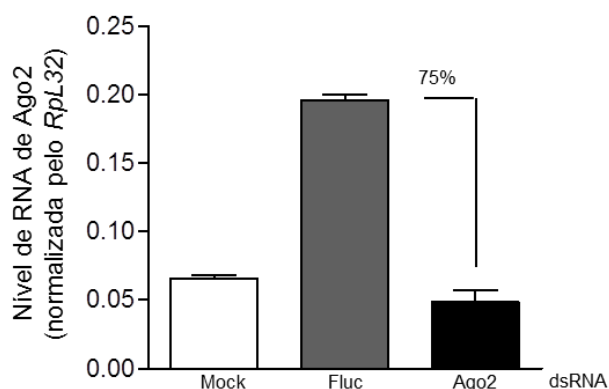


Figura 25: Silenciamento da Ago2 de *L. longipalpis*. Células LL5 foram transfectadas com dsRNA alvo específico para a Ago2 e com alvo não específico, a luciferase (Fluc). Células não transfectadas também foram analisadas (mock). No tempo de 48 horas após a transfecção, o RNA total foi extraído e analisado por RT-qPCR usando o gene constitutivo *Rpl32* como normalizador. O valor de inibição do RNA de Ago2 comparado ao dsRNA controle (Fluc) está indicado no gráfico.

5.7. Análise global dos pequenos RNAs derivados do genoma de *Lutzomyia longipalpis*

Pequenos RNAs mapeados no genoma de *L. longipalpis* corresponderam a grande maioria (82-92%) das sequências em nossas bibliotecas. O perfil de distribuição de tamanhos das sequências mapeadas no genoma do hospedeiro indicam que, ncRNA com tamanhos de 21-23 nucleotídeos e de 24-29 nucleotídeos foram os que apresentaram maior quantidade. Este perfil também já observado em outros insetos e sugere a presença de todas as vias de RNAi endógenas, miRNAs, endo-siRNAs e piRNAs. As análises dos pequenos RNAs endógenos ainda estão em andamento e fazem parte do trabalho de outros alunos do laboratório de RNAi (Figura 26).

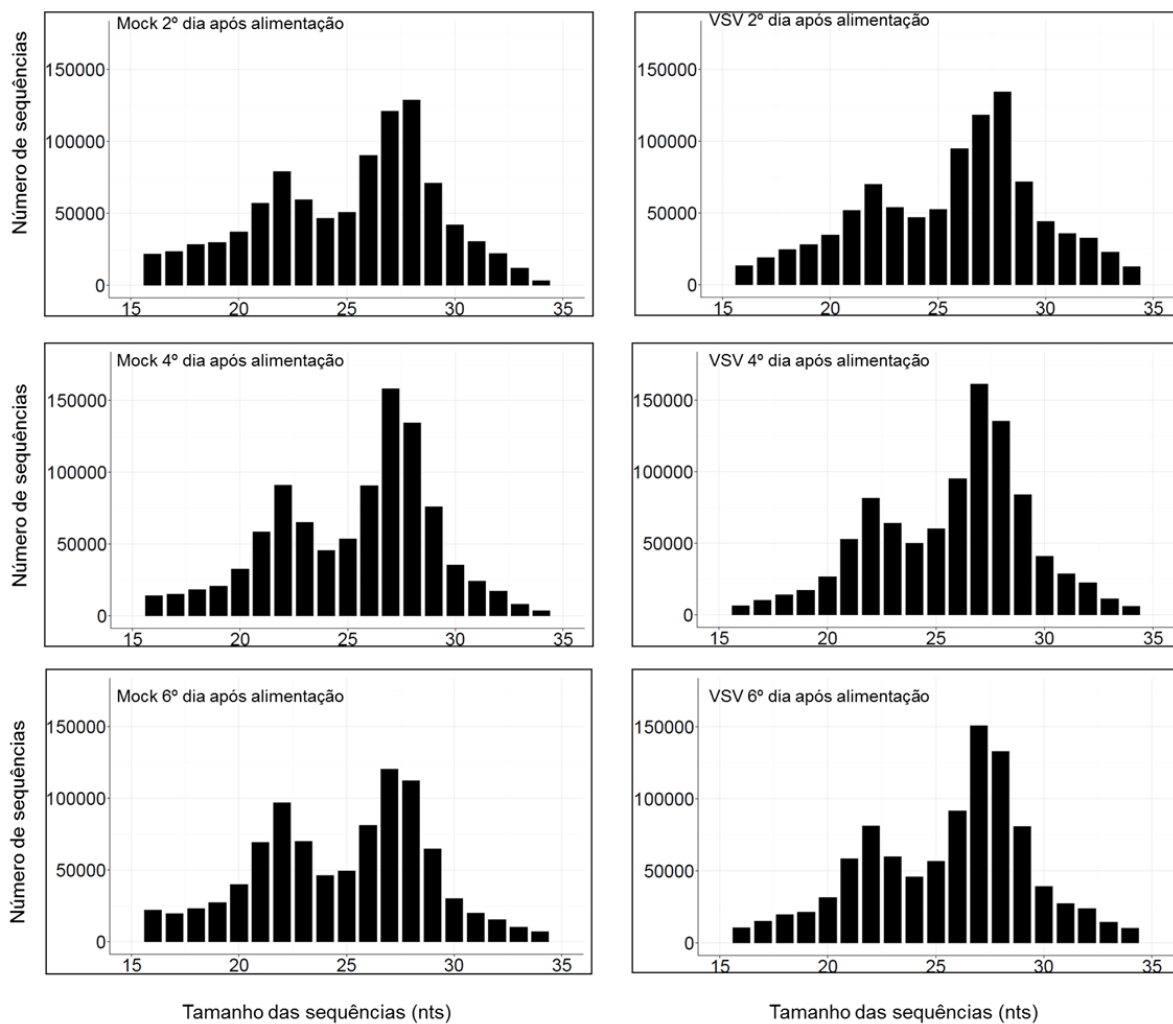


Figura 26: Pequenos RNAs mapeados no genoma de *L. longipalpis* mostram enriquecimento de tamanhos entre 21-23 nucleotídeos e 24-30 nucleotídeos. Pequenos RNAs de grupos de flebotomíneos não infectados e infectados com o VSV foram sequenciados e após etapas de filtragem mostradas na tabela 6, foram mapeados no genoma de *L. longipalpis*. É observado que o maior número de seqüências obtidas são com tamanhos de 21-23 nucleotídeos e de 24-30 nucleotídeos. Isto sugere ser o perfil de ativação de vias de miRNA, siRNA e piRNA mesmo em amostras não infectadas pelo VSV.

5.8. Identificação de vírus a partir dos dados de pequenos RNAs

Algumas sequências obtidas no sequenciamento não mapearam no genoma de *L. longipalpis* e nem no genoma do VSV e, com isto, foi aplicada uma estratégia desenvolvida no laboratório para detectar novos vírus em amostras de insetos. As sequências contíguas montadas foram analisadas por perfil de similaridade, utilizando dados disponíveis no Genbank. Foram encontrados três novos vírus em flebotomíneos e, análises filogenéticas posteriores indicaram que dois deles pertençam à família *Reoviridae* e o outro a família *Nodaviridae*. Estes vírus foram nomeados de *Lutzomyia Piau*i reovirus 1 (LPRV1), *Lutzomyia Piau*i reovirus 2 (LPRV2) e *Lutzomyia Piau*i nodavirus (LPNV) (Figura 27).

A origem dos vsRNAs gerados pelo LPRV1 e LPRV2 ocorre tanto na fita positiva (azul) quando na fita negativa dos vírus (vermelha). Ao contrário, no LPNV foi observado que os vsRNAs têm origem somente na fita positiva (azul). Nas análises de distribuição de tamanho dos vsRNAs não houve um enriquecimento para nenhum deles e o perfil obtido nos três vírus indica se tratar de alguma degradação. É sabido que acúmulo de RNA vindo da inibição da via de RNAi causa degradação. O LPNV codifica uma proteína homóloga a B2 de *Flock house virus* (FHV) que atua inibindo a via (Figura 27) (Singh, Popli et al. 2009).

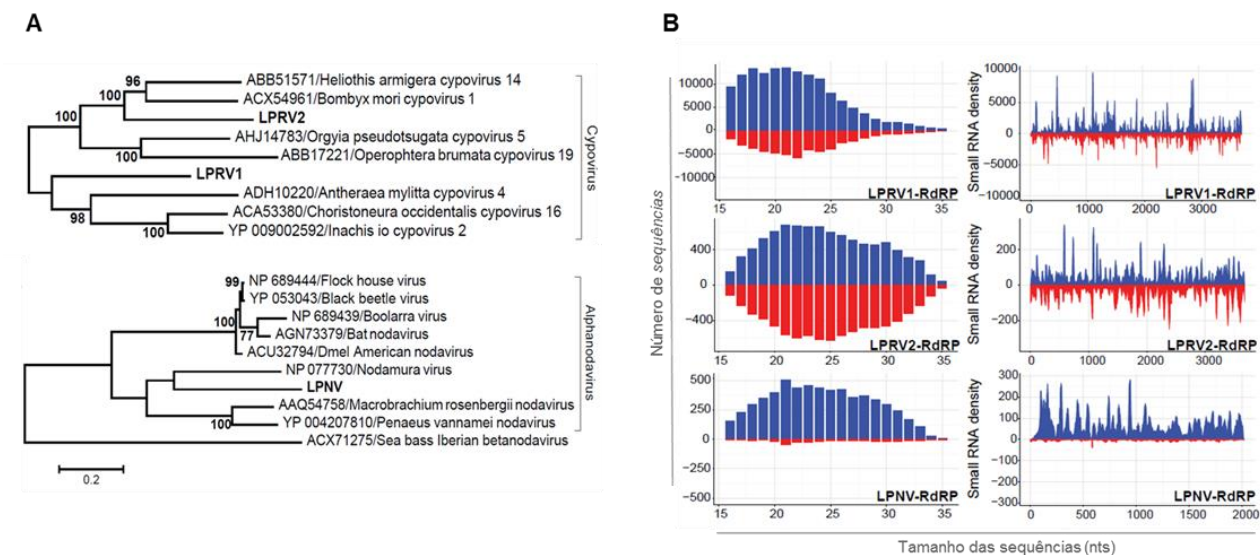


Figura 27: Detecção de três novos vírus após o sequenciamento de pequenos RNAs em flebotomíneos. Os *Lutzomyia piaui reovirus 1* (LPRV1), *Lutzomyia piaui reovirus 2* (LPRV2) e *Lutzomyia piaui nodavirus* (LPNV) foram identificados após o sequenciamento de pequenos RNAs de flebotomíneos. A) Agrupamento filogenético dos LPRV1 e LPRV2 com outras com as espécies do gênero *Cypovirus* e do LPNV com outras espécies do gênero *Alphanodavirus*.

6.0 DISCUSSÃO

O consórcio SFGC fez o sequenciamento do genoma de dois flebotomíneos *L. longipalpis* e *P. papatasi*, que apresentam comportamento, distribuição geográfica e especificidade distinta com patógenos, está sendo sequenciado e anotado. A anotação destes genomas está em andamento e é uma contribuição de diversas comunidades científicas que fazem parte do Consórcio de sequenciamento do genoma de flebotomíneos (SFGC). O nosso grupo contribuiu com as anotações dos genes dos principais componentes das vias de RNAi encontrados no genoma de *L. longipalpis* e *P. papatasi*. Em alguns casos, foi preciso refinar os modelos gênicos preditos e, em outros, principalmente no caso do genoma de *P. papatasi* nós observamos problemas com identificação de apenas fragmentos incompletos dos genes, que pode ser devido aos problemas de sequenciamento e montagem observados no rascunho atual dos genomas.

O número de cópias dos genes identificados de componentes das vias de RNAi em flebotomíneos foi, de maneira geral, similar ao observado em outros insetos da ordem Diptera. Contudo, é importante destacarmos que foram observadas duas cópias do gene Ago1 e quatro cópias de piwi encontrados no genoma de *L. longipalpis*, comparados com a cópia única de Ago1 e duas cópias de piwi (considerando-se piwi e aub) no genoma de *D. melanogaster*. Em diferentes espécies de mosquitos, o número de cópias destes genes é variado, chegando a ser encontrado sete cópias no gene piwi e duas cópias do gene Ago1 no genoma de *A. aegypti* (Nene, Wortman et al. 2007). Os genes piwi parecem ter sofrido amplificação linhagem específica, em mosquitos, flebotomíneos e moscas, todos partindo de um única ancestral comum. Assim, estas variações do número de cópias em piwi, pode estar associada a diferentes funções adquiridas pelas proteínas piwi em cada linhagem. Por exemplo, pressões diferentes observadas em cada espécie com relação a função antiviral e de silenciamento de sequências repetitivas executada pela via de piRNA podem ser diferentes em cada espécie de inseto. Em *A. aegypti*, por exemplo, foi mostrado que mais de 50% do genoma é

constituído por elementos transposons que poderia exercer grande pressão sobre a via de piRNAs (Nene, Wortman et al. 2007).

A organização de domínios das proteínas putativas das vias de RNAi em *L. longipalpis* foi bastante conservada comparada a organização dos genes canônicos de *Drosophila melanogaster*, o que sugere que as funções desempenhadas sejam bastante semelhantes. Isto pode ser observado com as inferências filogenéticas feitas com as proteínas argonata e com as ribonuclease RNaseIII. Nelas podemos observar que os genes dos principais componentes da via de miRNA (Ago1, Dicer-1, drosha) são conservados não só entre insetos mas também em mamíferos, refletindo a grande importância desta via para todos os animais. Em contraste, as mesmas análises mostram que a via de siRNAs, composta por Dicer-2 e Ago2, é exclusiva dos insetos e mostra maior divergência que as proteínas da via de miRNAs. A análise filogenéticas dos genes envolvidos na via dos piRNAs, piwi e Ago3, mostra também que os componentes desta via apresentam maior divergência comparada a via dos miRNAs e até mesmo com a via dos siRNAs.

É sabido que os genes envolvidos na resposta imune tendem a evoluírem mais rápido por estarem sofrendo maior pressão seletiva (Obbard, Jiggins et al. 2006). O envolvimento dos genes das vias de siRNA e piRNA na resposta antiviral e regulação da expressão de transposons foi sugerido como a razão da sua maior divergência comparados à via dos miRNA em insetos (Obbard, Gordon et al. 2009). Estas diferenças foram claramente observadas nas nossas análises. Nos genes da via de piRNA observamos que as proteínas Ago3 e piwi originaram-se de ancestrais diferentes. Além disso, foi visto que o clado de Ago3 agrupou todas as proteínas de inseto enquanto, o clado para as proteínas piwi foi grupo específico, sendo observado um clado para flebotomíneos, outro para mosca e outro para mosquito. Nos genes das vias de siRNA observamos uma divergência clara entre as proteínas Ago2, apesar de ser um grupo específico de insetos. Nós investigamos a ativação das vias de RNAi pela infecção viral em flebotomíneos infectados com o VSV. Experimentos em *Drosophila* infectadas com o mesmo vírus, mostraram que

somente a via de siRNAs foi ativada (Mueller, Gausson et al. 2010). Nós observamos que a infecção pelo VSV induz a produção de pequenos RNAs com tamanho predominante de 21 nucleotídeos derivados de ambas as fitas e com cobertura homogênea de todo o genoma viral. Estes resultados sugerem que de maneira similar à *Drosophila*, que a via dos siRNAs é ativada em flebotomíneos após a infecção e que os pequenos RNAs são produzidos após o reconhecimento do dsRNA intermediário da replicação. É interessante destacar que no segundo dia após a infecção já foi possível detectar a presença de siRNAs derivados do VSV, sugerindo que o vírus já está se multiplicando em flebotomíneos, mesmo sem a digestão completa do sangue. Estes dados obtidos em nossos estudos representam o modelo de infecção natural do inseto vetor transmissor do *Rhabdovirus* na natureza sugerindo que as observações em *Drosophila* refletem mesmo o observado em condições naturais.

O silenciamento de alvos das vias de siRNA pelo tratamento com dsRNA é uma excelente ferramenta para ensaios funcionais tanto em células quanto no próprio inseto, como *A. gambiae* e *A. aegypti* (Keene, Foy et al. 2004, Sanchez-Vargas, Scott et al. 2009). Com estes mesmos objetivos, foi feito inicialmente ensaios de transfecção na linhagem LL5 usando dsRNA alvo específico para Ago2 e alvo não específico (luciferase) para análise funcional da via de siRNAs na defesa antiviral em flebotomíneos. Contudo, apesar de ocorrer o silenciamento do alvo foi observada também a indução da expressão do gene Ago2 pelo dsRNA de maneira não específica. Outro trabalho usando também LL5 fez transfecções com dsRNAs tendo como alvo o gene da proteína VLP do *West Nile virus*. As análises feitas apenas por ensaio de luciferase, sugerem que houve inibição do alvo específico, comparado com a célula controle (Pitaluga, Mason et al. 2008). Entretanto, este trabalho não analisou a expressão do gene Ago2 após o tratamento com dsRNA. Diante destas observações, ainda não foi possível realizarmos a análise funcional da via de siRNAs durante a resposta antiviral. A indução do gene Ago2 e possivelmente outros genes da via de RNAi após o tratamento com dsRNA poderia servir como um mecanismo amplificador do silenciamento. É

importante destacar que um mecanismo similar de amplificação da resposta de RNAi por aumento da expressão dos componentes só foi demonstrado em fungos até o momento (Choudhary, Lee et al. 2007). Ainda não está claro se este mecanismo é funcional no inseto além das células e qual seria a consequência deste aumento da expressão de Ago-2.

Com relação aos pequenos RNAs endógenos, nós observamos que 82-92% dos pequenos RNAs totais foram derivados do genoma de *L. Longipalpis*. Apesar de cerca de 56 e 71% destes pequenos RNAs serem derivados do rRNA 2S, nós também observamos um enriquecimento de pequenos RNAs com tamanho entre 22 e 28 nucleotídeos, correspondentes aos produtos das vias de miRNA, siRNA e piRNA. Análises estão sendo feitas em nosso laboratório com o intuito de caracterizar estas vias endógenas em *L.longipalpis*, como por exemplo, a procura por miRNAs conservado entre insetos, presença da assinatura de piRNA e procura das regiões codificadoras de endo-siRNAs.

Por fim, é importante destacar que as sequências não mapeadas no genoma de *L. Longipalpis* ou do VSV, foram também utilizadas para uma análise de metagenômica para investigarmos a presença potencial de sequencias derivadas de outros vírus. Esta análise foi baseada em uma estratégia, semelhante a já descrita por Wu e colaboradores em 2010 (Wu, Luo et al. 2010)(REF), e desenvolvida em nosso laboratório. Como resultado, nós encontramos três novos vírus presentes na colônia de *L. longipalpis*. Destes três vírus, através de análises filogenéticas, nós determinamos que dois deles pertencem à família *Reoviridae* (LPRV1 e LPRV2) e um à família *Nodaviridae* (LPNV). Estes vírus forma detectados em pupas e larvas, sugerindo que o LPRV1, LPRV2 e LPNV estão circulando na colônia de *L.longipalpis* coletados no Piauí em 2008 e mantidos desde então em laboratório. Estas descobertas levam a possibilidade da existência de uma possível competição destes vírus com o VSV. Para isso, seria ideal realizamos a infecção com o VSV em insetos não infectados pelo LPRV1, LPRV2 e LPNV. Além disso, o isolamento dos três vírus, seguida da caracterização biológica, permitiria fazer algumas inferências sobre a possível competição com o VSV. De qualquer maneira,

estas descobertas contribuirão com informações epidemiológicas futuras quanto a circulação de possíveis arbovirus em flebotomíneos.

7.0 CONCLUSÃO

- 01-Os principais genes das vias de RNAi estão presentes em *L. longipalpis* e são conservados. Em termos de conservação, os genes das vias de miRNA são mais conservados que os da via de siRNAs seguida da via de piRNAs.
- 02- Somente a via dos siRNAs é ativada em resposta a infecção pelo VSV em *L. longipalpis* de forma semelhante ao organismo modelo *Drosophila melanogaster*.
- 03- Todas as classes de pequenos RNAs, siRNAs, miRNAs e piRNAs, encontradas em outros insetos são também observadas em flebotomíneos.
- 04-A expressão do gene codificador da proteína Ago-2 é estimulada pelo tratamento com dsRNA em células LL5 de forma independente da sequência.
- 05- Três novos vírus, LPRV1, LPRV2 e LPNV, foram encontrados em nossa colônia de flebotomíneos através da análise metagenômica de pequenos RNAs sequenciados.

8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abascal, F., R. Zardoya and D. Posada (2005). "ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution." Bioinformatics **21**(9): 2104-2105.

Alvar, J., S. L. Croft, P. Kaye, A. Khamesipour, S. Sundar and S. G. Reed (2013). "Case study for a vaccine against leishmaniasis." Vaccine **31 Suppl 2**: B244-249.

Andrade, B. B., C. I. de Oliveira, C. I. Brodskyn, A. Barral and M. Barral-Netto (2007). "Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights." Scand J Immunol **66**(2-3): 122-127.

Aravin, A. A., G. J. Hannon and J. Brennecke (2007). "The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race." Science **318**(5851): 761-764.

Aravin, A. A., M. Lagos-Quintana, A. Yalcin, M. Zavolan, D. Marks, B. Snyder, T. Gaasterland, J. Meyer and T. Tuschl (2003). "The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development." Dev Cell **5**(2): 337-350.

Arensburger, P., K. Megy, R. M. Waterhouse, J. Abrudan, P. Amedeo, B. Antelo, L. Bartholomay, S. Bidwell, E. Caler, F. Camara, C. L. Campbell, K. S. Campbell, C. Casola, M. T. Castro, I. Chandramouliswaran, S. B. Chapman, S. Christley, J. Costas, E. Eisenstadt, C. Feschotte, C. Fraser-Liggett, R. Guigo, B. Haas, M. Hammond, B. S. Hansson, J. Hemingway, S. R. Hill, C. Howarth, R. Ignell, R. C. Kennedy, C. D. Kodira, N. F. Lobo, C. Mao, G. Mayhew, K. Michel, A. Mori, N. Liu, H. Naveira, V. Nene, N. Nguyen, M. D. Pearson, E. J. Pritham, D. Puiu, Y. Qi, H. Ranson, J. M. Ribeiro, H. M. Roberston, D. W. Severson, M. Shumway, M. Stanke, R. L. Strausberg, C. Sun, G. Sutton, Z. J. Tu, J. M. Tubio, M. F. Unger, D. L. Vanlandingham, A. J. Vilella, O. White, J. R. White, C. S. Wondji, J. Wortman, E. M. Zdobnov, B. Birren, B. M. Christensen, F. H. Collins, A. Cornel, G. Dimopoulos, L. I. Hannick, S. Higgs, G. C. Lanzaro, D. Lawson, N.

H. Lee, M. A. Muskavitch, A. S. Raikhel and P. W. Atkinson (2010). "Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics." Science **330**(6000): 86-88.

Bates, P. A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." Int J Parasitol **37**(10): 1097-1106.

Batista, T. M. and J. T. Marques (2011). "RNAi pathways in parasitic protists and worms." J Proteomics **74**(9): 1504-1514.

Belo, F. Astrid J Mejía; María del Pilar Corena; Martha Ayala; Ladys Sarmiento; Claudio Zuñiga; María T Palau (2005). Experimental infection of *Leishmania* (L.) *chagasi* in a cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) "Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Berezikov, E., N. Robine, A. Samsonova, J. O. Westholm, A. Naqvi, J. H. Hung, K. Okamura, Q. Dai, D. Bortolamiol-Becet, R. Martin, Y. Zhao, P. D. Zamore, G. J. Hannon, M. A. Marra, Z. Weng, N. Perrimon and E. C. Lai (2011). "Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence." Genome Res **21**(2): 203-215.

Bichaud, L., M. Souris, C. Mary, L. Ninove, L. Thirion, R. P. Piarroux, R. Piarroux, X. De Lamballerie and R. N. Charrel (2011). "Epidemiologic relationship between Toscana virus infection and *Leishmania infantum* due to common exposure to *Phlebotomus perniciosus* sandfly vector." PLoS Negl Trop Dis **5**(9): e1328.

Borovsky, D. and Y. Schlein (1987). "Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence." Med Vet Entomol **1**(3): 235-242.

Braitto, A., M. G. Ciufolini, L. Pippi, R. Corbisiero, C. Fiorentini, A. Gistri and L. Toscano (1998). "Phlebotomus-transmitted toscana virus infections of the central nervous system: a seven-year experience in Tuscany." Scand J Infect Dis **30**(5): 505-508.

Brennecke, J., A. A. Aravin, A. Stark, M. Dus, M. Kellis, R. Sachidanandam and G. J. Hannon (2007). "Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*." Cell **128**(6): 1089-1103.

Brosnan, C. A., N. Mitter, M. Christie, N. A. Smith, P. M. Waterhouse and B. J. Carroll (2007). "Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14741-14746.

Brower-Toland, B., S. D. Findley, L. Jiang, L. Liu, H. Yin, M. Dus, P. Zhou, S. C. Elgin and H. Lin (2007). "*Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a." Genes Dev **21**(18): 2300-2311.

Cai, X., C. H. Hagedorn and B. R. Cullen (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." RNA **10**(12): 1957-1966.

Carmell, M. A. and G. J. Hannon (2004). "RNase III enzymes and the initiation of gene silencing." Nat Struct Mol Biol **11**(3): 214-218.

Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." Cell **136**(4): 642-655.

Catteruccia, F., T. Nolan, T. G. Loukeris, C. Blass, C. Savakis, F. C. Kafatos and A. Crisanti (2000). "Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*." Nature **405**(6789): 959-962.

Cenik, E. S. and P. D. Zamore (2011). "Argonaute proteins." Curr Biol **21**(12): R446-449.

Charrel, R. N., A. Izri, S. Temmam, X. de Lamballerie and P. Parola (2006). "Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* flies." Emerg Infect Dis **12**(8): 1299-1300.

Chastel, C., D. Bach-Hamba, H. Launay, G. Le Lay, H. Hellal and J. C. Beaucournu (1983). "[Arbovirus infections in Tunisia: new serological survey of small wild mammals]." Bull Soc Pathol Exot Filiales **76**(1): 21-33.

Chastel, C., H. Launay, H. Bailly-Choumara, G. Le Lay and J. C. Beaucournu (1982). "[Arbovirus infections in Morocco: serosurvey in small wild mammals in the northern part of the country]." Bull Soc Pathol Exot Filiales **75**(5): 466-475.

Choudhary, S., H. C. Lee, M. Maiti, Q. He, P. Cheng, Q. Liu and Y. Liu (2007). "A double-stranded-RNA response program important for RNA interference efficiency." Mol Cell Biol **27**(11): 3995-4005.

Clarke, G. R., D. E. Stallknecht and E. W. Howerth (1996). "Experimental infection of swine with a sandfly (*Lutzomyia shannoni*) isolate of vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype." J Vet Diagn Invest **8**(1): 105-108.

Comer, J. A., J. L. Corn, D. E. Stallknecht, J. G. Landgraf and V. F. Nettles (1992). "Titers of vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype, in naturally infected male and female *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in Georgia." J Med Entomol **29**(2): 368-370.

Comer, J. A., R. B. Tesh, G. B. Modi, J. L. Corn and V. F. Nettles (1990). "Vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype: replication in and transmission by *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae)." Am J Trop Med Hyg **42**(5): 483-490.

Czech, B., C. D. Malone, R. Zhou, A. Stark, C. Schlingeheyde, M. Dus, N. Perrimon, M. Kellis, J. A. Wohlschlegel, R. Sachidanandam, G. J. Hannon and J. Brennecke (2008). "An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*." Nature **453**(7196): 798-802.

Das, S., A. Freier, T. Boussoffara, S. Das, D. Oswald, F. O. Losch, M. Selka, N. Sacerdoti-Sierra, G. Schonian, K. H. Wiesmuller, K. Seifert, M. Schroff, C. Juhls, C. L. Jaffe, S. Roy, P. Das, H. Louzir, S. L. Croft, F. Modabber and P.

Walden (2014). "Modular multiantigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis." Sci Transl Med **6**(234): 234ra256.

de Faria, I. J., R. P. Olmo, E. G. Silva and J. T. Marques (2013). "dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals." J Interferon Cytokine Res **33**(5): 239-253.

de Moura, T. R., F. Oliveira, F. O. Novais, J. C. Miranda, J. Clarencio, I. Follador, E. M. Carvalho, J. G. Valenzuela, M. Barral-Netto, A. Barral, C. Brodskyn and C. I. de Oliveira (2007). "Enhanced Leishmania braziliensis infection following pre-exposure to sandfly saliva." PLoS Negl Trop Dis **1**(2): e84.

Depaquit, J., M. Grandadam, F. Fouque, P. E. Andry and C. Peyrefitte (2010). "Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review." Euro Surveill **15**(10): 19507.

Depaquit, J., N. Leger, H. Ferte, J. A. Rioux, J. C. Gantier, A. Michaelides and P. Economides (2001). "[Phlebotomines of the Isle of Cyprus. III. Species inventory]." Parasite **8**(1): 11-20.

Desjeux, P. (1996). "Leishmaniasis. Public health aspects and control." Clin Dermatol **14**(5): 417-423.

Dhanda, V., F. M. Rodrigues and S. N. Ghosh (1970). "Isolation of Chandipura virus from sandflies in Aurangabad." Indian J Med Res **58**(2): 179-180.

Dimopoulos, G., G. K. Christophides, S. Meister, J. Schultz, K. P. White, C. Barillas-Mury and F. C. Kafatos (2002). "Genome expression analysis of Anopheles gambiae: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8814-8819.

Donnelly, K. B., H. C. Lima and R. G. Titus (1998). "Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with Leishmania

braziliensis in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate." J Parasitol **84**(1): 97-103.

Dostert, C., E. Jouanguy, P. Irving, L. Troxler, D. Galiana-Arnoux, C. Hetru, J. A. Hoffmann and J. L. Imler (2005). "The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila." Nat Immunol **6**(9): 946-953.

Drake, J. W. and J. J. Holland (1999). "Mutation rates among RNA viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13910-13913.

Es-Sette, N., M. Ajaoud, L. Bichaud, S. Hamdi, F. Mellouki, R. N. Charrel and M. Lemrani (2014). "Phlebotomus sergenti a common vector of Leishmania tropica and Toscana virus in Morocco." J Vector Borne Dis **51**(2): 86-90.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." Nature **391**(6669): 806-811.

Forstemann, K., M. D. Horwich, L. Wee, Y. Tomari and P. D. Zamore (2007). "Drosophila microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1." Cell **130**(2): 287-297.

Forstemann, K., Y. Tomari, T. Du, V. V. Vagin, A. M. Denli, D. P. Bratu, C. Klattenhoff, W. E. Theurkauf and P. D. Zamore (2005). "Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein." PLoS Biol **3**(7): e236.

Gebre-Michael, T., M. Balkew, A. Ali, A. Ludovisi and M. Gramiccia (2004). "The isolation of Leishmania tropica and L. aethiopia from Phlebotomus (Paraphlebotomus) species (Diptera: Psychodidae) in the Awash Valley, northeastern Ethiopia." Trans R Soc Trop Med Hyg **98**(1): 64-70.

Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." Nat Rev Genet **10**(2): 94-108.

Goujon, M., H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern and R. Lopez (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI." Nucleic Acids Res **38**(Web Server issue): W695-699.

Gowen, B. B., M. H. Wong, K. H. Jung, A. B. Sanders, W. M. Mitchell, L. Alexopoulou, R. A. Flavell and R. W. Sidwell (2007). "TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules." J Immunol **178**(8): 5200-5208.

Guindon, S., J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk and O. Gascuel (2010). "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0." Syst Biol **59**(3): 307-321.

Haley, B. and P. D. Zamore (2004). "Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex." Nat Struct Mol Biol **11**(7): 599-606.

Hill, C. A., F. C. Kafatos, S. K. Stansfield and F. H. Collins (2005). "Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era." Nat Rev Microbiol **3**(3): 262-268.

Hock, J. and G. Meister (2008). "The Argonaute protein family." Genome Biol **9**(2): 210.

Holt, R. A., G. M. Subramanian, A. Halpern, G. G. Sutton, R. Charlab, D. R. Nusskern, P. Wincker, A. G. Clark, J. M. Ribeiro, R. Wides, S. L. Salzberg, B. Loftus, M. Yandell, W. H. Majoros, D. B. Rusch, Z. Lai, C. L. Kraft, J. F. Abril, V. Anthouard, P. Arensburger, P. W. Atkinson, H. Baden, V. de Berardinis, D. Baldwin, V. Benes, J. Biedler, C. Blass, R. Bolanos, D. Boscus, M. Barnstead, S. Cai, A. Center, K. Chaturverdi, G. K. Christophides, M. A. Chrystal, M.

Clamp, A. Cravchik, V. Curwen, A. Dana, A. Delcher, I. Dew, C. A. Evans, M. Flanagan, A. Grundschober-Freimoser, L. Friedli, Z. Gu, P. Guan, R. Guigo, M. E. Hillenmeyer, S. L. Hladun, J. R. Hogan, Y. S. Hong, J. Hoover, O. Jaillon, Z. Ke, C. Kodira, E. Kokoza, A. Koutsos, I. Letunic, A. Levitsky, Y. Liang, J. J. Lin, N. F. Lobo, J. R. Lopez, J. A. Malek, T. C. McIntosh, S. Meister, J. Miller, C. Mobarry, E. Mongin, S. D. Murphy, D. A. O'Brochta, C. Pfannkoch, R. Qi, M. A. Regier, K. Remington, H. Shao, M. V. Sharakhova, C. D. Sitter, J. Shetty, T. J. Smith, R. Strong, J. Sun, D. Thomasova, L. Q. Ton, P. Topalis, Z. Tu, M. F. Unger, B. Walenz, A. Wang, J. Wang, M. Wang, X. Wang, K. J. Woodford, J. R. Wortman, M. Wu, A. Yao, E. M. Zdobnov, H. Zhang, Q. Zhao, S. Zhao, S. C. Zhu, I. Zhimulev, M. Coluzzi, A. della Torre, C. W. Roth, C. Louis, F. Kalush, R. J. Mural, E. W. Myers, M. D. Adams, H. O. Smith, S. Broder, M. J. Gardner, C. M. Fraser, E. Birney, P. Bork, P. T. Brey, J. C. Venter, J. Weissenbach, F. C. Kafatos, F. H. Collins and S. L. Hoffman (2002). "The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*." Science **298**(5591): 129-149.

Hotez, P. J., J. H. Remme, P. Buss, G. Alleyne, C. Morel and J. G. Breman (2004). "Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project." Clin Infect Dis **38**(6): 871-878.

Hutvagner, G. and M. J. Simard (2008). "Argonaute proteins: key players in RNA silencing." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 22-32.

International Glossina Genome, I. (2014). "Genome sequence of the tsetse fly (*Glossina morsitans*): vector of African trypanosomiasis." Science **344**(6182): 380-386.

Ishizuka, A., M. C. Siomi and H. Siomi (2002). "A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins." Genes Dev **16**(19): 2497-2508.

Ito, J., A. Ghosh, L. A. Moreira, E. A. Wimmer and M. Jacobs-Lorena (2002). "Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite." Nature **417**(6887): 452-455.

Jordan, B. R., R. Jourdan and B. Jacq (1976). "Late steps in the maturation of *Drosophila* 26 S ribosomal RNA: generation of 5-8 S and 2 S RNAs by cleavages occurring in the cytoplasm." J Mol Biol **101**(1): 85-105.

Joshua-Tor, L. and G. J. Hannon (2011). "Ancestral roles of small RNAs: an Ago-centric perspective." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(10): a003772.

Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol **9**(8): 604-615.

Keene, K. M., B. D. Foy, I. Sanchez-Vargas, B. J. Beaty, C. D. Blair and K. E. Olson (2004). "RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17240-17245.

Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." Clin Dermatol **17**(3): 279-289.

Killick-Kendrick, R., T. J. Wilkes, M. Bailly, I. Bailly and L. A. Righton (1986). "Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly." Trans R Soc Trop Med Hyg **80**(1): 138-142.

Kim, K., Y. S. Lee and R. W. Carthew (2007). "Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes." RNA **13**(1): 22-29.

Landthaler, M., A. Yalcin and T. Tuschl (2004). "The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis." Curr Biol **14**(23): 2162-2167.

Langmead, B. and S. L. Salzberg (2012). "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2." Nat Methods **9**(4): 357-359.

Le Lay-Rogues, G., M. Valle, C. Chastel and J. C. Beaucournu (1983). "[Small wild mammals and arboviruses in Italy]." Bull Soc Pathol Exot Filiales **76**(4): 333-345.

Lee, Y. S., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. He, E. J. Sontheimer and R. W. Carthew (2004). "Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways." Cell **117**(1): 69-81.

Leng, Y. J. (1987). "A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*." Ann Trop Med Parasitol **81**(3): 311-317.

Liu, Q., T. A. Rand, S. Kalidas, F. Du, H. E. Kim, D. P. Smith and X. Wang (2003). "R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway." Science **301**(5641): 1921-1925.

Liu, X., F. Jiang, S. Kalidas, D. Smith and Q. Liu (2006). "Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes." RNA **12**(8): 1514-1520.

Llewellyn, Z. N., M. D. Salman, S. Pauszek and L. L. Rodriguez (2002). "Growth and molecular evolution of vesicular stomatitis serotype New Jersey in cells derived from its natural insect-host: evidence for natural adaptation." Virus Res **89**(1): 65-73.

Luteijn, M. J. and R. F. Ketting (2013). "PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics." Nat Rev Genet **14**(8): 523-534.

Ma, J. B., K. Ye and D. J. Patel (2004). "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain." Nature **429**(6989): 318-322.

Malone, C. D., J. Brennecke, M. Dus, A. Stark, W. R. McCombie, R. Sachidanandam and G. J. Hannon (2009). "Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary." Cell **137**(3): 522-535.

Maroli, M., M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel and L. Gradoni (2013). "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern." Med Vet Entomol **27**(2): 123-147.

Marques, J. T. and R. W. Carthew (2007). "A call to arms: coevolution of animal viruses and host innate immune responses." Trends Genet **23**(7): 359-364.

Marques, J. T., K. Kim, P. H. Wu, T. M. Alleyne, N. Jafari and R. W. Carthew (2010). "Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*." Nat Struct Mol Biol **17**(1): 24-30.

Marques, J. T., J. P. Wang, X. Wang, K. P. de Oliveira, C. Gao, E. R. Aguiar, N. Jafari and R. W. Carthew (2013). "Functional specialization of the small interfering RNA pathway in response to virus infection." PLoS Pathog **9**(8): e1003579.

Mavale, M. S., P. V. Fulmali, G. Geevarghese, V. A. Arankalle, Y. S. Ghodke, P. C. Kanojia and A. C. Mishra (2006). "Venereal transmission of Chandipura virus by *Phlebotomus papatasi* (Scopoli)." Am J Trop Med Hyg **75**(6): 1151-1152.

Megy, K., M. Hammond, D. Lawson, R. V. Bruggner, E. Birney and F. H. Collins (2009). "Genomic resources for invertebrate vectors of human pathogens, and the role of VectorBase." Infect Genet Evol **9**(3): 308-313.

Moran, Y., D. Praher, D. Fredman and U. Technau (2013). "The evolution of microRNA pathway protein components in Cnidaria." Mol Biol Evol **30**(12): 2541-2552.

Morazzani, E. M., M. R. Wiley, M. G. Murreddu, Z. N. Adelman and K. M. Myles (2012). "Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma." PLoS Pathog **8**(1): e1002470.

Mueller, S., V. Gausson, N. Vodovar, S. Deddouche, L. Troxler, J. Perot, S. Pfeffer, J. A. Hoffmann, M. C. Saleh and J. L. Imler (2010). "RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(45): 19390-19395.

Nene, V., J. R. Wortman, D. Lawson, B. Haas, C. Kodira, Z. J. Tu, B. Loftus, Z. Xi, K. Megy, M. Grabherr, Q. Ren, E. M. Zdobnov, N. F. Lobo, K. S. Campbell, S. E. Brown, M. F. Bonaldo, J. Zhu, S. P. Sinkins, D. G. Hogenkamp, P. Amedeo, P. Arensburger, P. W. Atkinson, S. Bidwell, J. Biedler, E. Birney, R. V. Bruggner, J. Costas, M. R. Coy, J. Crabtree, M. Crawford, B. Debruyne, D. Decaprio, K. Eiglmeier, E. Eisenstadt, H. El-Dorry, W. M. Gelbart, S. L. Gomes, M. Hammond, L. I. Hannick, J. R. Hogan, M. H. Holmes, D. Jaffe, J. S. Johnston, R. C. Kennedy, H. Koo, S. Kravitz, E. V. Kriventseva, D. Kulp, K. Labutti, E. Lee, S. Li, D. D. Lovin, C. Mao, E. Mauceli, C. F. Menck, J. R. Miller, P. Montgomery, A. Mori, A. L. Nascimento, H. F. Naveira, C. Nusbaum, S. O'Leary, J. Orvis, M. Pertea, H. Quesneville, K. R. Reidenbach, Y. H. Rogers, C. W. Roth, J. R. Schneider, M. Schatz, M. Shumway, M. Stanke, E. O. Stinson, J. M. Tubio, J. P. Vanzee, S. Verjovski-Almeida, D. Werner, O. White, S. Wyder, Q. Zeng, Q. Zhao, Y. Zhao, C. A. Hill, A. S. Raikhel, M. B. Soares, D. L. Knudson, N. H. Lee, J. Galagan, S. L. Salzberg, I. T. Paulsen, G. Dimopoulos, F. H. Collins, B. Birren, C. M. Fraser-Liggett and D. W. Severson (2007). "Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector." Science **316**(5832): 1718-1723.

Obbard, D. J., K. H. Gordon, A. H. Buck and F. M. Jiggins (2009). "The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1513): 99-115.

Obbard, D. J., F. M. Jiggins, D. L. Halligan and T. J. Little (2006). "Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes." Curr Biol **16**(6): 580-585.

Okamura, K., W. J. Chung, J. G. Ruby, H. Guo, D. P. Bartel and E. C. Lai (2008). "The Drosophila hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs." Nature **453**(7196): 803-806.

Okamura, K., A. Ishizuka, H. Siomi and M. C. Siomi (2004). "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways." Genes Dev **18**(14): 1655-1666.

Oliveira, S., M. Bottecchia, L. Bauzer, N. Souza, R. Ward, C. Kyriacou and A. Peixoto (2001). "Courtship song genes and speciation in sand flies." Mem Inst Oswaldo Cruz **96**(3): 403-405.

Palatnik-de-Sousa, C. B. (2012). "Vaccines for canine leishmaniasis." Front Immunol **3**: 69.

Parker, J. S., S. M. Roe and D. Barford (2005). "Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex." Nature **434**(7033): 663-666.

Pfeffer, S. (2007). "Identification of virally encoded microRNAs." Methods Enzymol **427**: 51-63.

Pitaluga, A. N., P. W. Mason and Y. M. Traub-Cseko (2008). "Non-specific antiviral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*." Dev Comp Immunol **32**(3): 191-197.

Punta, M., P. C. Coggill, R. Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Bournsnel, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E. L. Sonnhammer, S. R. Eddy, A. Bateman and R. D. Finn (2012). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D290-301.

Rouget, C., C. Papin, A. Boureux, A. C. Meunier, B. Franco, N. Robine, E. C. Lai, A. Pelisson and M. Simonelig (2010). "Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo." Nature **467**(7319): 1128-1132.

Saito, K., A. Ishizuka, H. Siomi and M. C. Siomi (2005). "Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells." PLoS Biol **3**(7): e235.

Samuelson, J., E. Lerner, R. Tesh and R. Titus (1991). "A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva." J Exp Med **173**(1): 49-54.

Sanchez-Vargas, I., J. C. Scott, B. K. Poole-Smith, A. W. Franz, V. Barbosa-Solomieu, J. Wilusz, K. E. Olson and C. D. Blair (2009). "Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway." PLoS Pathog **5**(2): e1000299.

Sant'Anna, M. R., H. Diaz-Albiter, K. Aguiar-Martins, W. S. Al Salem, R. R. Cavalcante, V. M. Dillon, P. A. Bates, F. A. Genta and R. J. Dillon (2014). "Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection." Parasit Vectors **7**: 329.

Sant'anna, M. R., H. Diaz-Albiter, M. Mubarak, R. J. Dillon and P. A. Bates (2009). "Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*." Parasit Vectors **2**(1): 62.

Schmidt, J. R., M. L. Schmidt and M. I. Said (1971). "Phlebotomus fever in Egypt. Isolation of phlebotomus fever viruses from *Phlebotomus papatasi*." Am J Trop Med Hyg **20**(3): 483-490.

Singh, G., S. Popli, Y. Hari, P. Malhotra, S. Mukherjee and R. K. Bhatnagar (2009). "Suppression of RNA silencing by Flock house virus B2 protein is

mediated through its interaction with the PAZ domain of Dicer." FASEB J **23**(6): 1845-1857.

Soares, Z. G., A. N. Goncalves, K. P. de Oliveira and J. T. Marques (2014). "Viral RNA recognition by the Drosophila small interfering RNA pathway." Microbes Infect **16**(12): 1013-1021.

Solovyev, V. V. and I. A. Shahmuradov (2003). "PromH: Promoters identification using orthologous genomic sequences." Nucleic Acids Res **31**(13): 3540-3545.

Song, J. J., S. K. Smith, G. J. Hannon and L. Joshua-Tor (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." Science **305**(5689): 1434-1437.

Stockdale, L. and R. Newton (2013). "A review of preventative methods against human leishmaniasis infection." PLoS Negl Trop Dis **7**(6): e2278.

Tautz, D., J. M. Hancock, D. A. Webb, C. Tautz and G. A. Dover (1988). "Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*." Mol Biol Evol **5**(4): 366-376.

Telleria, E. L., M. R. Sant'Anna, J. R. Ortigao-Farias, A. N. Pitaluga, V. M. Dillon, P. A. Bates, Y. M. Traub-Cseko and R. J. Dillon (2012). "Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in sand fly host *Lutzomyia longipalpis*." J Biol Chem **287**(16): 12985-12993.

Tesh, R. B., J. Boshell, G. B. Modi, A. Morales, D. G. Young, A. Corredor, C. Ferro de Carrasquilla, C. de Rodriguez, L. L. Walters and M. O. Gaitan (1987). "Natural infection of humans, animals, and phlebotomine sand flies with the Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus in Colombia." Am J Trop Med Hyg **36**(3): 653-661.

Tesh, R. B., B. N. Chaniotis and K. M. Johnson (1971). "Vesicular stomatitis virus, Indiana serotype: multiplication in and transmission by experimentally

infected phlebotomine sandflies (*Lutzomyia trapidoi*)." Am J Epidemiol **93**(6): 491-495.

Tesh, R. B., B. N. Chaniotis, P. H. Peralta and K. M. Johnson (1974). "Ecology of viruses isolated from Panamanian phlebotomine sandflies." Am J Trop Med Hyg **23**(2): 258-269.

Tesh, R. B. and G. B. Modi (1983). "Development of a continuous cell line from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to infection with arboviruses." J Med Entomol **20**(2): 199-202.

Tesh, R. B. and G. B. Modi (1983). "Growth and transovarial transmission of Chandipura virus (Rhabdoviridae: Vesiculovirus) in *phlebotomus papatasi*." Am J Trop Med Hyg **32**(3): 621-623.

Tesh, R. B. and G. B. Modi (1987). "Maintenance of Toscana virus in *Phlebotomus perniciosus* by vertical transmission." Am J Trop Med Hyg **36**(1): 189-193.

Theodor, O. (1948). "Classification of the Old World species of the subfamily phlebotominae (Diptera, Psychodidae)." Bull Entomol Res **39**(Pt 1): 85-115.

Thomson, T. and H. Lin (2009). "The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect." Annu Rev Cell Dev Biol **25**: 355-376.

Titus, R. G. and J. M. Ribeiro (1988). "Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity." Science **239**(4845): 1306-1308.

Travassos da Rosa, A. P., R. B. Tesh, J. F. Travassos da Rosa, J. P. Herve and A. J. Main, Jr. (1984). "Carajas and Maraba viruses, two new vesiculoviruses isolated from phlebotomine sand flies in Brazil." Am J Trop Med Hyg **33**(5): 999-1006.

Tweedie, S., M. Ashburner, K. Falls, P. Leyland, P. McQuilton, S. Marygold, G. Millburn, D. Osumi-Sutherland, A. Schroeder, R. Seal, H. Zhang and C. FlyBase (2009). "FlyBase: enhancing Drosophila Gene Ontology annotations." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D555-559.

Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm and S. G. Rozen (2012). "Primer3--new capabilities and interfaces." Nucleic Acids Res **40**(15): e115.

Vodovar, N., A. W. Bronkhorst, K. W. van Cleef, P. Miesen, H. Blanc, R. P. van Rij and M. C. Saleh (2012). "Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells." PLoS One **7**(1): e30861.

Volf, P. and V. Volfova (2011). "Establishment and maintenance of sand fly colonies." J Vector Ecol **36 Suppl 1**: S1-9.

Wang, W., M. Yoshikawa, B. W. Han, N. Izumi, Y. Tomari, Z. Weng and P. D. Zamore (2014). "The initial uridine of primary piRNAs does not create the tenth adenine that is the hallmark of secondary piRNAs." Mol Cell **56**(5): 708-716.

Wang, Y., S. Juranek, H. Li, G. Sheng, G. S. Wardle, T. Tuschl and D. J. Patel (2009). "Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes." Nature **461**(7265): 754-761.

Wu, Q., Y. Luo, R. Lu, N. Lau, E. C. Lai, W. X. Li and S. W. Ding (2010). "Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1606-1611.

Xi, Z., J. L. Ramirez and G. Dimopoulos (2008). "The Aedes aegypti toll pathway controls dengue virus infection." PLoS Pathog **4**(7): e1000098.

Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-3016.

Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp and D. P. Bartel (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.