



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **BR 10 2012 010303-6 A2**



(22) **Data de Depósito:** 02/05/2012

(43) **Data da Publicação:** 07/04/2015
(RPI 2309)

(54) Título: SISTEMA E USO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE RNA DE DUPLA FITA PARA SILENCIAMENTO DE GENES EM TRIATOMÍNEOS

(51) Int.Cl.: A01N63/02; A01P7/04; C12N1/21; C12N15/12; C12R1/01

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio de Janeiro

(72) Inventor(es): Ellen Marie Dotson, Gabriela de Oliveira Paiva e Silva, Mabel Laline Taracena Oliva, Pamela Marie Pennington Aycinena, Pedro Lagerblad de Oliveira

(57) Resumo: SISTEMA E USO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE RNA DE DUPLA FITA PARA SILENCIAMENTO DE GENES EM TRIATOMÍNEOS. A presente invenção refere-se ao silenciamento de todo e qualquer gene expresso por triatomíneos. Assim, são descritos sistemas e uso de *R. rhodnii*, *Corynebacterium* sp, bem como outros simbiontes intestinais de triatomíneos, transformados para expressão de dsRNA específico para genes do vetor, sendo administrados via oral para gerar dsRNA in situ no intestino do inseto, promovendo a inibição da expressão de genes. Este invento descreve uma estratégia de controle de infestação de Triatomíneos visando redução dos casos de Doença de Chagas, sendo que são fornecidos novos métodos de controle da expressão de genes de triatomíneos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**SISTEMA E USO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE RNA DE DUPLA FITA PARA SILENCIAMENTO DE GENES EM TRIATOMINEOS.**”

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a um sistema e uso do mesmo, produzido por bactérias, para o silenciamento de genes de insetos vetores mediante a expressão de ácidos ribonucleicos em dupla fita (dsRNA, do inglês double strand ribonucleic acid), com aplicação no controle da doença de Chagas.

10 Mais especificamente são descritos métodos para expressão de ácidos ribonucleicos em dupla fita (dsRNA), produzidos por bactérias capazes de sobreviver no intestino dos triatomíneos, para expressão local de dsRNA específicos para os genes de triatomíneos.

Ainda, é fornecido um método de controle de infestação de Triatomíneos para a redução da incidência de casos da Doença de Chagas.

15 **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A doença de Chagas, ou tripanossomíase humana americana, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, sendo uma das principais doenças transmitidas por vetores na América Latina, presente em cerca de 19 países. Com a análise de dados obtidos pelo projeto para as prioridades de controle de doenças do Banco Mundial e o “National Institutes of Health” (NIH) dos Estados Unidos, estima-se que uma prevalência de 9.8 milhões de pessoas infetadas e 40 milhões em risco de contrair a doença no continente (C.J. Schofield ET AL.,2006).

20 A doença inicia com uma fase aguda que frequentemente passa despercebida. A fase indeterminada é assintomática e pode durar mais de 20 anos. A fase crônica acontece aproximadamente em 20% dos indivíduos infetados e é caracterizada por cardiomiopatia ou disfunção neuronal autonômica e presença de megacólon ou megaesôfago.

30 As opções de tratamento farmacológico existentes para essa tripanossomíase humana são pouco eficientes e altamente tóxicas, sendo que são eficazes somente na fase aguda da doença.

Persiste assim, a necessidade de novas maneiras de controlar essa moléstia, que tenha eficiência no extermínio do agente parasita, bem como reduzida toxicidade para o ser humano e o meio ambiente.

35 Essa doença crônica, causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, é transmitida pela contaminação das fezes de insetos hematófagos da família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*.

Os triatomíneos são insetos hematófagos e procuram obter seu alimento preferencialmente de animais de sangue quente, como mamíferos e aves. Eventualmente, eles podem estar infectados pelo *T. cruzi*, um parasito que desenvolve parte da sua vida no intestino dos triatomíneos e é eliminado junto com as suas fezes.

5 No momento da alimentação destes insetos pode ocorrer a liberação de formas infectantes do parasito sobre a pele de um hospedeiro suscetível. Neste caso, poderá haver a contaminação do animal e o desenvolvimento de uma nova fase do ciclo do parasito neste hospedeiro vertebrado. Quando este hospedeiro é o homem, a doença de Chagas poderá se desenvolver.

10 Na natureza, existem mais de 400 espécies de triatomíneo, sendo que aproximadamente 60 transmitem o parasito (C.J. Schofield, 1994). Esses insetos habitam nos ninhos dos reservatórios do parasito, incluindo gambás, tatus e roedores, entre outros. Contudo, algumas espécies lograram adaptar-se a habitats humanos, incluindo o interior de casas de construção precária e ambientes peridomésticos como galpões e piquetes (C.J. Schofield, 1994).

15 *Triatoma dimidiata*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, são os principais transmissores da doença de Chagas na América .

20 *R. prolixus* encontra-se em estado silvestre em palmas na Venezuela e na Colômbia, sendo estas fontes importantes de re-infestação doméstica (Feliciangeli ET AL., 2007; Sanchez-Martin ET AL., 2006). Na América Central, na Guatemala, tem se relatado a presença de *R. prolixus* no ambiente doméstico, associado a tetos de palma e construções de pau-a-pique.

25 Por outro lado, *T. dimidiata* é um vetor com ampla distribuição geográfica com elevadas taxas de migração e encontrado no ambiente silvestre (Dom ET AL., 2003; Melgar ET AL., 2007; M. Monroy ET AL., 2003b; Zeledón ET AL., 2001). Esse comportamento gera uma alta taxa de re-infestação das casas, o que provavelmente tornará o seu controle por inseticidas convencionais muito mais difícil como foi relatado para vetores domiciliados como *T. infestans* em países do Cone Sul e *R. prolixus* na América Central (Hashimoto et al., 2006; Nakagawa et al., 2003a; Nakagawa et al., 2003b).

30 Atualmente existem três iniciativas de controle para a doença: Cone Sul, Andina e de América Central ([HTTP://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/chagas.htm](http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/chagas.htm)).

35 O principal método de controle do vetor consiste na aplicação intradomiciliar de inseticidas residuais. Esse controle químico ajuda a minimizar o risco de contrair a doença e diminuir a densidade do vetor dentro das moradias.

Essas iniciativas, baseadas em controle químico utilizando inseticidas convencionais foram bastante bem sucedidas, levando a uma redução de mais de 90 % da transmissão vetorial da doença no Brasil (Pinto-Dias 2009).

5 Apesar do êxito alcançado no controle, tem sido reconhecido que a sustentabilidade desse método será limitada pela necessidade de aplicações periódicas, somada ao potencial de reinfestação por espécies silvestres e ao provável desenvolvimento de resistência, como já têm sido documentado para *Triatoma infestans* no Chaco Argentino (Ricardo Gurtler, Comunicação pessoal) e em *Rhodnius prolixus* na Venezuela (C.J. Schofield ET AL, 2006c, Vassena ET AL., 2000).

10 Assim, há necessidade de novos métodos de controle vetoriais e o método proposto apresenta uma alternativa sustentável e de baixo custo de aplicação para áreas rurais onde a doença é transmitida.

15 Em 2002, o Conselho Técnico e Científico de Investigação em Doenças Tropicais e a Assembléia Mundial da Saúde (resolução World Health Assembly, Resolution 51.14) recomendou focar os futuros esforços de investigação na extensão e sustentabilidade das estratégias de controle e em estudos epidemiológicos e entomológicos que possam ter relevância no controle de espécies domiciliadas e silvestres de triatomíneos nas regiões Andinas e Centro-americanas (Research, 2002).

20 Assim, é necessário desenvolver novas estratégias para assegurar a sustentabilidade no controle dos vetores da doença de Chagas. (C. J. Schofield et al., 2006; Vassena et al., 2000). O método proposto apresenta uma alternativa sustentável e de baixo custo de aplicação para áreas rurais onde a doença é transmitida.

25 Um dos métodos baseados em mRNA para silenciamento de genes é a utilização de agentes antisense, baseado na introdução de oligonucleotídeo complementar ao mRNA-alvo dentro de uma determinada célula, por exemplo.

Técnica que tem sido largamente utilizada é o estudo da função de genes mediante o uso de RNAs de interferência de cadeia curta (siRNAs).

30 Essas moléculas de RNA participam de um fenômeno conhecido como interferência de RNA (RNA interference, em inglês), caracterizado por moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) capazes de inibir a expressão de um determinado gene com sequência similar àquele dsRNA.

35 A dupla fita de RNA é importante no processo de inibição, por ser clivado em fragmentos menores por nucleases dentro da célula. Essa enzima, homóloga à RNase III de *E. coli*, apresenta um domínio de ligação a dsRNAs e domínios helicase. Os pequenos fragmentos de dsRNA, conhecidos como "small

interfering RNAs" (siRNAs), correspondem às fitas senso e antisenso do RNA alvo e se associam a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC (RNA Interference Specificity Complex). Uma helicase abre a dupla-fita dos siRNAs, de forma que a fita antisenso do duplex guia o complexo até o mRNA alvo. Uma endorribonuclease é responsável pela clivagem do referido mRNA, degradando-o.

Assim, o silenciamento é causado por um mecanismo pós-transcricional em que o gene é normalmente transcrito dentro da célula, mas não consegue ser traduzido, uma vez que é degradado.

É de conhecimento do estado da técnica o silenciamento de genes, sua aplicação para o controle de pragas, bem como processos para a obtenção de construtores e sua utilização em bactérias e outros organismos para inibição da expressão de genes.

É conhecido do estado da arte a patente **EP2269444 - DSRNA as insect control agent**, que descreve o uso de dsRNAs para o controle de insetos, que utiliza células de bactérias transformadas, preferencialmente mortas por tratamento com calor, o que não permite a proliferação dos organismos modificados expressando o dsRNA, ao longo de toda a vida do inseto e também a transmissão para outros insetos através das fezes, como descrito no presente invento, facilitando a propagação no meio ambiente.

Ainda, o documento **WO199402591 - Genetic alteration of insect symbiont**, para o controle exclusivo da população do inseto vetor (inseticida) e não bactericida/ parasiticida, demonstrando a alteração genética de simbiotes de insetos para produzir um composto anti-parasítico, anti-bacteriano ou antiviral, de forma a eliminar agentes etiológicos, sem contudo mencionar a transformação de simbiotes com vetores para expressão de dsRNAs tendo como alvo os genes expressos no vetor.

Alguns pesquisadores do grupo inventor têm trabalhado durante a última década no desenvolvimento de uma nova estratégia de controle vetorial baseada em bactérias simbióticas de *R. prolixus* (C.B.Beard ET AL., 2001; C.B. Beard ET AL, 1992; R.V. Durvasula ET AL., 1997).

As bactérias simbiotes de *R. prolixus*, *Rhodococcus rhodnii*, são encontradas no lúmen do intestino (Wigglesworth, 1936, Lake & Friend, 1967, 1968), sendo excretadas e transmitidas através de coprofagia (Brecher & Wigglesworth, 1944). Experimentos realizados com insetos aposimbióticos sugeriram que as bactérias tem possivelmente um papel na produção de vitaminas essenciais ao inseto (Lake & Friend, 1968).

R. rhodnii cresce exponencialmente no intestino de *R. prolixus* depois da ingestão de sangue, chegando a uma densidade de 10^9 cfu por ninfa de 5° estágio, 10 dias depois da ingesta (Eichler & Schaub, 2002). Depois de 10 dias, os números descem a aproximadamente 10^6 cfu/ninfa, sendo localizadas na sua maioria (95-88%) no intestino anterior. O intestino posterior e reto contém aproximadamente 10^4 cfu/ml durante o processo de digestão com pouca variação nas densidades bacterianas. A maioria das bactérias são excretadas nas fezes durante as primeiras quatro horas de diurese intensa que se seguem ao repasto sanguíneo. É importante notar que o *T. cruzi* tem um ciclo de desenvolvimento no vetor similar ao do simbiote, vivendo também no lúmen do intestino. O parasito migra do intestino ao reto durante os dias subsequentes à ingestão de sangue e também é liberado junto com as fezes do inseto (Schaub 1992).

Originalmente, a estratégia de controle baseada no simbiote propunha transformar geneticamente as bactérias simbióticas para que expressassem peptídeos anti-parasitários que matassem o protozoário no intestino do vetor, bloqueando assim a sua transmissão. O comportamento coprofágico do vetor permitiria a introdução das bactérias transformadas à população do inseto ao apresentar essas numa pasta artificial simulando material fecal. Essas fezes artificiais com bactérias foram chamadas CRUZIGARD (CZG). As bactérias transformadas seriam dispersadas para outros indivíduos da colônia através da deposição natural de fezes. Uma vez que o vetor é transformado "indiretamente" através do simbiote, foi cunhada a expressão paratransgênese para descrever o uso de um simbiote recombinante para controle da doença.

O primeiro ensaio para comprovar a factibilidade dessa estratégia foi feita com *R. rhodnii* transformado para expressar Cecropina, um peptídeo do sistema imune de uma borboleta que forma poros em membranas das bactérias e tem um amplo espectro de ação antibacteriana (C.B. Beard et AL., 1992). Os vetores com *R. rhodnii* que expressavam a Cecropina demonstraram atividade anti-parasitária, baixando significativamente a taxa de infecção, comparado com vetores com *R. rhodnii* que não expressava a Cecropina.

Em outro experimento, foi empregado *R. rhodnii* expressando a porção Fab de um anticorpo específico para um hormônio humano como modelo da expressão dessas moléculas (R.V. Durvasula et AL., 1999). Esse experimento demonstrou que era possível detectar a porção Fab do anticorpo no intestino de *R. prolixus*. Além disso, foi demonstrado que *R. prolixus* podia adquirir a bactéria simbiótica do CZG em gaiolas de grandes dimensões que simulavam uma condição

de campo, com a presença de construções de pau-a-pique que constituem um ambiente domiciliar favorável ao estabelecimento do vetor no meio rural. Esse estudo comprovou a eficácia da dispersão da bactéria por meio de CZG (E. Dotson, resultados não publicados). Posteriormente, foi desenvolvido outro sistema de transformação usando um plasmídeo capaz de se integrar ao genoma de *R. rhodnii* (Dotson et AL., 2003), o que torna a transformação estável na ausência de seleção com antibiótico, um avanço essencial para uso no campo.

Essa estratégia do vetor paratransgênico foi criticada, uma vez que os insetos continuariam colonizando as casas e são de certa forma nocivos, mesmo na ausência de transmissão da doença.

No presente invento, descrevemos uma versão diferente dessa estratégia, empregando bactérias para atacar o vetor e não o parasito.

Bactérias produtoras de dsRNA podem agir como inseticidas biológicos que inibem a fisiologia do vetor, através da produção de RNA de dupla fita (dsRNA), induzindo um silenciamento específico para genes importantes para o desenvolvimento e/o fertilidade.

A redução seletiva dos níveis celulares de um determinado RNA mensageiro tem sido chamada de interferência de RNA (RNAi) porque o dsRNA induz o aparato enzimático que degrada o RNA mensageiro, complementar ao dsRNA, interferindo assim de forma específica na expressão do gene alvo.

A metodologia proposta aqui, descrevendo o uso de CZG associado a RNAi foi denominada como iCZG.

A estratégia de iCZG é parte de uma nova geração de métodos de controle de doenças transmitidas por vetores que estão sendo desenvolvidas por meio da engenharia genética (Brown & Catteruccia, 2006; Franz et AL., 2006).

O iCZG está baseado na biologia do *R. rhodnii*, que aumenta a sua densidade de forma logarítmica durante os primeiros dez dias após a ingestão de sangue. A maior quantidade de bactérias é achada no intestino anterior, onde o sangue é armazenado antes de passar ao intestino posterior, onde é digerido. Além disso, como já mencionado, existem plasmídios que tornam possível a transformação genética. Em *C. elegans* a ingestão de *E. coli* expressando dsRNA de vários genes foi efetivo no silenciamento gênico por RNAi (Timmons & Fire, 1998a). Em *R. prolixus* e em carrapatos, a administração de dsRNA por via oral levou a RNAi para genes de glândula salivar, mostrando que a via oral podia levar a um efeito sistêmico de interferência (RN.N. Araujo et AL., 2006a; Soares et AL., 2005).

SÚMARIO DA INVENÇÃO

De uma forma geral este invento propõe o silenciamento de todo e qualquer gene expresso por triatomíneos.

5 Assim, são descritos sistema e uso de *R. rhodnii*, *Corynebacterium sp*, bem como outros simbiontes intestinais de triatomíneos, transformados para expressão de dsRNA específico para genes do vetor, sendo administrados via oral para gerar dsRNA *in situ* no intestino do inseto, promovendo a inibição da expressão de genes.

10 Figura então como um primeiro objetivo do atual desenvolvimento, a obtenção de uma estratégia de controle de infestação de Triatomíneos visando redução dos casos de Doença de Chagas.

Assim, são fornecidos novos métodos de controle da expressão de genes de triatomíneos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

15 Desta forma, o presente invento prevê o uso de bactérias simbiontes, *R. rhodnii*, *Corynebacterium sp* ou outros simbiontes intestinais de triatomíneos, transformados para o silenciamento da expressão de dsRNA específico para todo e qualquer gene de triatomíneos, sendo administrados via oral para gerar dsRNA *in situ* no intestino do inseto, o que resulta em interferência efetiva, mesmo que o gene-alvo seja expresso em um tecido no interior do corpo do inseto.

20 A estratégia da presente invenção foi inicialmente desenvolvida utilizando-se como modelo experimental a espécie *R. prolixus*, pois é um dos vetores com um ciclo de vida mais rápido e fácil manutenção em colônias.

25 O ciclo de vida em colônias de laboratório é de 3-6 meses, comparado com 1-1.5 anos para *T. dimidiata* (Pennington & Beard, 2004). Outro aspecto interessante desse inseto é que o *R. prolixus* tem sido um modelo de estudo de fisiologia de insetos hematófagos muito importante (Ribeiro ET AL., 1998; Walker ET AL., 1999) e o seu genoma foi recentemente sequenciado, fazendo dele um modelo com alto potencial para estudos de genômica e proteômica (Huebner, 2006).

30 A proposta neste invento foi testada em *R. prolixus*, mas é aplicável a outras espécies de importância epidemiológica para Centro e Sul América, uma vez que todas apresentam simbiontes intestinais.

35 Como forma de demonstrar a viabilidade do invento, o gene para a proteína de ligação do grupo heme de *Rhodnius* (Rhodnius heme binding protein, RHBP das siglas em inglês) foi escolhido como candidato para alvo molecular pela importância que ele tem como anti-oxidante e na fertilidade do inseto (Braz et al., 2001; Braz et al., 2002; M. Dansa-Petretski et al., 1995a; Machado et al., 1998;

Medeiros et al., 2004; Medeiros et al., 2002; M. F. Oliveira et al., 1999; P. L. Oliveira et al., 1995a; Paiva-Silva et al., 2002). Foram também realizados experimentos similares com o gene de catalase, um gene não relacionado a RHBP, que controla a detoxificação de peróxido de hidrogênio. A escolha deste gene deveu-se ao fato de que, em insetos hematófagos, a digestão de sangue produz uma concentração alta do grupo heme livre no intestino, o qual chega a circular na hemolinfa. Esse grupo gera intermediários de oxigênio reativos que provocam dano a moléculas biológicas como proteínas, lipídeos e DNA (Gutteridge & Smith, 1988; Vincent & Muller-Eberhard, 1987). *R. prolixus* tem vários mecanismos de proteção contra dano oxidativo, incluindo a RHBP que circula na hemolinfa na forma apo e liga o grupo heme livre para inibir a formação de radicais livres (M. Dansa-Petretski et al., 1995a; Pedro L. Oliveira et al., 1995b) e também a catalase, expressa no intestino, que atua na detoxificação do peróxido de hidrogênio, uma espécie oxidativa derivada de Oxigênio.

Além das funções anti-oxidantes, a RHBP é um componente importante do ovo (Machado et AL., 1998). Ela é incorporada aos ovócitos por endocitose e funciona como uma fonte importante do grupo heme para a embriogênese. Quando a fonte do grupo heme diminui (i.e. quando as fêmeas são alimentadas com plasma ou se a biossíntese do grupo heme é inibida artificialmente), o número de ovos diminui (Braz et AL., 2001).

O gene de RHBP é expresso em todas as etapas dessa espécie de vetor, mas aumenta depois do repasto sanguíneo, ao mesmo tempo que a bactéria simbiote, *R. rhodnii*, inicia a sua replicação no intestino (Eichler e Schaub, 2002; Paiva-Silva et AL., 2002). Para realizar um experimento de prova de conceito de que a administração oral de um microorganismo produzindo dsRNA é efetivo para a obtenção de RNAi sistêmico, bactérias *E. coli* HT115 foram modificadas para produzir dsRNA de RHBP e o estudo do efeito sobre a expressão, desenvolvimento e fertilidade em *R. prolixus* foi feita após a ingestão da bactéria. O cDNA de RHBP foi quantificado por PCR em tempo real, detectando um máximo de silenciamento da expressão da RHBP de 99.60% em fêmeas e 27%-89% em ninfas de 3º a 5º estágios. A inoculação de fêmeas conseguiu reduzir a ovipostura em 43.18%. O plasmídeo utilizado foi desenvolvido por Ellen Dotson no Center of Disease Control and Prevention (CDC em Atlanta, USA) e sua descrição ainda não foi publicada.

Experimentos similares foram realizados com o gene de catalase, também com *Rhodnius prolixus*, quando se obteve redução expressiva dos níveis de mRNA e também diminuição da ovipostura (>80%) e da viabilidade (>30%) dos ovos postos.

A prova de conceito do uso da interferência utilizando *E. coli* transgênica leva a conclusão de que outras cepas ou espécies de bactérias produtoras de dsRNA de forma constitutiva no intestino de triatomíneos podem ser utilizadas para controle do inseto, como proposto nesta patente.

5 Diferentes bactérias simbiotes podem ser usadas nessa estratégia, dependendo na espécie de triatomíneo. Diferentes simbiotes tem sido identificados em *T. protracta*, *T. sórdida*, *T. infestans*, *Panstrongylus megistus* e *R. prolixus*; sendo que todas as bactérias simbiotes isoladas são actinomicetos.

10 Cada espécie de triatomíneo tem diferentes espécies de simbiotes, pertencentes ao gênero *Nocardia*, *Gordonia* e *Rhodococcus* (Eichler, 1998, Goodchild 1955). *Rhodococcus rhodnii*, o simbiote de *R. prolixus*, não chega a ter uma função simbiótica em *Triatoma infestans*. Por outro lado, o simbiote de *T. infestans*, *Corynebacterium* sp., foi capaz de atuar como simbiote de *R. prolixus*.

15 Bactérias de *Triatoma dimidiata* tem sido isoladas e coletadas em casas infestadas na Guatemala. Quando essas bactérias foram testadas para potencial simbiótico em *T. dimidiata*, observou-se que *Gordonia terrae* é um bom candidato porque foi adquirido por meio do Cruzigard, promoveu o desenvolvimento, foi espalhado pelas fezes e foi conservado depois da muda (tabela 2). *R. rhodnii* também foi usado para alimentar *T. dimidiata* e foi capaz de colonizar, foi espalhado
20 pelas fezes e foi retido depois da muda (tabelas 2 e 3). Em *T. infestans*, foi achada uma *Corynebacterium* sp. que coloniza insetos e seu potencial de simbiote foi comprovado ao alimentar ninfas e seguir o desenvolvimento até a fase adulta (Durvasula ET AL).

25 Nesse estudo, *R. rhodnii* não foi um simbiote efetivo em *T. infestans*, sugerindo um efeito espécie-específico de simbiose.

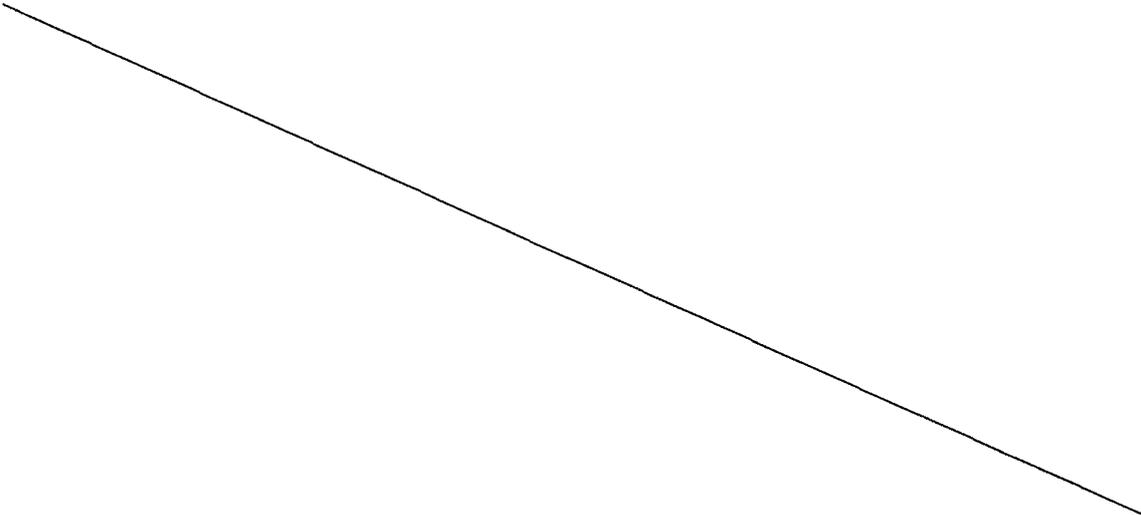


Tabela 1. Flora bacteriana de *T. dimidiata*

Morfologia da bactéria	Bactéria (16SrRNA)	% Identidade	% freqüência de isolamento
Gram + coccus	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99	29
	<i>Staph. Saprophyticus</i>	97	3
	<i>Staph. Equorum</i>	99	13
	<i>Staph. Simulans</i>	99	6
	<i>Lactococcus lactis</i>	99	3
	<i>Enterococcus faecalis</i>	99-100	1
	<i>E. malodoratus</i>	99	6
Gram + coccus bacilli	<i>Rhodococcus luteus</i>	99	3
	<i>Rh. Fascians</i>	98	3
	<i>Gordonia terrae</i>	99	3
	<i>Tsukamurella pulmonis</i>	96	3
Gram + filamentosa	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99	3
Gram – bacilos	<i>Alcaligenes SP</i>	99	6
	<i>Pseudomonas SP.</i>	99	6

Tabela 2. Capacidade de colonização de *T. dimidiata* (presença ou ausência) por *G. terrae* e *Staph. Xylosus* comparado com o simbionte conhecido de *R. prolixus*, *R. rhodnii*

	<i>R. rhodnii</i>	<i>G. terrae</i>	<i>S. xylosus</i>
<i>T. dimidiata</i>	9/14 (64%) a	14/24 (58%)	17/24(71%)b
<i>R. prolixus</i>	38/39 (97%)c, a	29/36 (81%)	3/37 (8%) b, c

Proporções estatisticamente diferentes pelo teste exato de Fisher: a, p=0.0035; b, p=9e10;8; c, p=1e10;8

Tabela 3. Eficiência do espalhamento bacteriano pelas fezes relativa a densidades bacterianas no intestino segundo a espécie de triatomíneo e de bactéria

Espécies Triatomíneos	Espécies Bacterianas	Nº de insetos	Média de ufc bacterianas no intestino do inseto (min-max)	ufc bacterianas totais no intestino	ufc bacterianas totais excretadas (ufc fecais)	% Excretado/ufc totais (ufc intestino+ ufc fecal)	Eficiência de derramamento relativa ao simbiote	Peso do material excretado	cfu/ mg fezes
<i>R. polixus</i>	<i>R. rnodnii</i>	39	2.8×10^9 (400- 8.9×10^6)	78,086.400	314.418	0,4010		154	2040
	<i>G. terrae</i>	36	1.8×10^9 (41- 6.9×10^6)	34.323.841	2.550	0,0074	0,0185	82	31
	<i>S. xylosus</i>	37	1.38×10^5 (400- 4.1×10^5)	415.000	219	0,0527	0,1315	105	2
<i>T. dimidiata</i>	<i>R. rnodnii</i>	14	4.2×10^5 (7.6×10^4 - 2.1×10^4)	3.810.000	19.563	0,5108	1,2737	48	407
	<i>G. terrae</i>	24	4.4×10^5 (48- 4×10^6)	8.380.448	141.823	1,6641	4,1495	107	1325
	<i>S. xylosus</i>	24	2.4×10^5 (36- 2.1×10^6)	4.077.608	1.147	0,0281	0,0701	nd	nd

Tabela 4: Efeito da ingestão de bactérias produtoras de dsRNA para o gene da RHPB na produção e viabilidade dos ovos no vetor *Rhodnius prolixus*

Alimentação artificial	Quantidade de bactéria ingerida	Número total de ovos postos por fêmea	Viabilidade dos ovos postos (% do total)
Sangue	0	45,2	100
Sangue + <i>E. coli</i> HT115 (D3) não produtoras de dsRNA	5,54 ufc/mL de sangue	42,40	100
Sangue + <i>E. coli</i> HT115 (D3) produtoras de dsRNA para o gene ANT (gene da planta <i>Arabidopsis thaliana</i> , não expresso pelo vetor)	5,54 ufc/mL de sangue	44,6	100
Sangue + <i>E. coli</i> HT115 (D3) produtoras de dsRNA para o gene RHPB (gene expresso pelo vetor <i>R. prolixus</i>)	3,35 ufc/mL de sangue	27,76	ND
Sangue + <i>E. coli</i> HT115 (D3) produtoras de dsRNA para o gene RHPB (gene expresso pelo vetor <i>R. prolixus</i>)	4,02 ufc/mL de sangue	22	ND
Sangue + <i>E. coli</i> HT115 (D3) produtoras de dsRNA para o gene RHPB (gene expresso pelo vetor <i>R. prolixus</i>)	5,54 ufc/mL de sangue	19,4	80%

ND- não determinado. Valores médios de três experimentos com 10 fêmeas por grupo experimental.

5

Exemplo:

Para implementação foi sintetizado um plasmídeo de integração com o gene RHPB, catalase, e genes cuja redução de expressão foram capazes de induzir redução de viabilidade. O inserto deve ser capaz de promover a expressão do inseto de forma constitutiva. Já existem plasmídeos de transformação e promotores constitutivos descritos na literatura para *R. rhodnii* e *Corynebacterium* sp. (Durvasula et AL,).

10

Os oligos usados para produzir o ARN de dupla fita no plasmídeo são encontrados a montante 13'-34', 407'-420' e 421'-425' na sequência de ácidos SEQ ID NO 1, produzida por bactérias simbiotes ingeridas oralmente para inibir a expressão local de mRNA de genes em triatomíneos.

15

Deve-se ressaltar, entretanto, que os exemplos e realizações aqui apresentados possuem caráter meramente ilustrativo, não sendo, portanto, limitativos à invenção, restando evidente para os especialistas na matéria que outras concretizações poderão ser empregadas, sem fugir ao escopo da invenção.

20

Portanto, a presente invenção tem como principal característica inovadora o uso de bactérias simbiotes produtoras de dsRNA com objetivo de silenciar genes dos seus insetos vetores, neste caso Triatomíneos. O silenciamento

gênico visa causar alterações fisiológicas ao inseto, causando danos como morte, bloqueio do desenvolvimento (mudas) e/ou reprodução (inibição da produção de ovos). Desta forma, atua como um método de controle da população do vetor.

REIVINDICAÇÕES

- 5 1- Sistema para a expressão de ácidos ribonucleicos em dupla fita caracterizado por ser produzido por bactérias simbiotes ingeridas oralmente, para inibir a expressão local de mRNA e silenciamento de todo e qualquer gene em triatomíneos
- 2- Sistema, de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelas bactérias serem actinomicetos, simbiotes intestinais de triatomíneos
- 3- Sistema, de acordo com as reivindicações 1 e 2 caracterizado pelas bactérias serem de *Triatoma dimidiata*.
- 10 4- Sistema, de acordo com as reivindicações 1 a 3 caracterizado pela bactéria simbiote ser *R. rhodnii*, *Corynebacterium sp* e outros simbiotes intestinais de triatomíneos.
- 15 5- Sistema, de acordo com as reivindicações 1 a 4 caracterizado pelo triatomíneo ser *R. prolixus.*, *Triatoma infestans* e outros triatomíneos.
- 6- Sistema, de acordo com as reivindicações 1 a 5 caracterizado pela bactéria simbiote ser *R. rhodnii para o silenciamento de genes de R. prolixus.*
- 20 7- Sistema, de acordo com as reivindicações 1 a 5 caracterizado pela bactéria simbiote ser *Corynebacterium sp para o silenciamento de genes de Triatoma infestans.*
- 25 8- Uso de sequência de ribonucleotídeos de fita dupla para controle de insetos caracterizado por promover o silenciamento da expressão de todo e qualquer gene de insetos triatomíneos.
- 9- Uso, de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pela dita sequência de ribonucleotídeos de fita dupla ser produzida por bactérias simbiotes transformadas e ingeridas por insetos triatomíneos.
- 30 10- Uso, de acordo com as reivindicações 8 a 9 caracterizado pelas bactérias simbiotes serem actinomicetos, capazes de sobreviver no intestino de triatomíneos.
- 11- Uso, de acordo com as reivindicações 8 a 10 caracterizado pela bactéria simbiote ser *R. rhodnii*, *Corynebacterium sp* e outros simbiotes intestinais de triatomíneos.
- 35 12- Uso, de acordo com as reivindicações 8 a 11 caracterizado pelo triatomíneo ser *R. prolixus.*, *Triatoma infestans* e outros triatomíneos.

- 13- Uso, de acordo com as reivindicações 8 a 12 caracterizado pela bactéria simbiote ser *R. rhodnii* para o silenciamento de genes de *R. prolixus*.
- 5 14- Uso, de acordo com as reivindicações 8 a 12 caracterizado pela bactéria simbiote ser *Corynebacterium sp* para o silenciamento de genes de *Triatoma infestans*.
- 10 15- Uso da interferência de RNA caracterizado por bactérias produtoras de dsRNA silenciarem todo e qualquer gene expresso pelos vetores triatomíneos.
- 16- Uso, de acordo com a reivindicação 15 caracterizado pela pelas bactérias simbiotes serem transformadas e ingeridas por insetos triatomíneos.
- 17- Uso, de acordo com as reivindicações 14 a 16 caracterizado pelas bactérias simbiotes serem actinomicetos, capazes de sobreviver no intestino de triatomíneos.
- 15 18- Uso, de acordo com as reivindicações 14 a 17 caracterizado pela bactéria simbiote ser *R. rhodnii*, *Corynebacterium sp* e outros simbiotes intestinais de triatomíneos.
- 19- Uso, de acordo com as reivindicações 14 a 18 caracterizado pelo triatomíneo ser *R. prolixus*, *Triatoma infestans* e outros triatomíneos.
- 20 20- Uso, de acordo com as reivindicações 14 a 18 caracterizado pela bactéria simbiote ser *R. rhodnii* para o silenciamento de genes de *R. prolixus*.
- 25 21- Uso, de acordo com as reivindicações 14 a 18 caracterizado pela bactéria simbiote ser *Corynebacterium sp* para o silenciamento de genes de *Triatoma infestans*.
- 30 22- Método de silenciamento de genes de triatomíneos para o controle da Doença de Chagas caracterizado por utilizar bactérias simbiotes ingeridas oralmente pelo inseto vetor, ditas bactérias simbiotes produzem RNA dupla fita.
- 23- Método, de acordo com a reivindicação 22 caracterizado pelas bactérias simbiotes serem actinomicetos, capazes de sobreviver no intestino de triatomíneos.
- 35 24- Método, de acordo com as reivindicações 22 a 23 caracterizado pela bactéria simbiote ser *R. rhodnii*, *Corynebacterium sp* e outros simbiotes intestinais de triatomíneos.

25- Método, de acordo com as reivindicações 22 a 24 caracterizado pelo triatomíneo ser *R. prolixus.*, *Triatoma infestans* e outros triatomíneos.

5 26- Método, de acordo com as reivindicações 22 a 25 caracterizado pela bactéria simbiote ser *R. rhodnii* para o silenciamento de genes de *R. prolixus.*

27- Método, de acordo com as reivindicações 22 a 25 caracterizado pela bactéria simbiote ser *Corynebacterium sp* para o silenciamento de genes de *Triatoma infestans.*

RESUMO

Patente de Invenção para “**SISTEMA E USO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE RNA DE DUPLA FITA PARA SILENCIAMENTO DE GENES EM TRIATOMÍNEOS.**”

5 A presente invenção refere-se ao silenciamento de todo e qualquer gene expresso por triatomíneos.

Assim, são descritos sistema e uso de *R. rhodnii*, *Corynebacterium sp*, bem como outros simbiontes intestinais de triatomíneos, transformados para expressão de dsRNA específico para genes do vetor, sendo
10 administrados via oral para gerar dsRNA *in situ* no intestino do inseto, promovendo a inibição da expressão de genes.

Este invento descreve uma estratégia de controle de infestação de Triatomíneos visando redução dos casos de Doença de Chagas, sendo que são
15 fornecidos novos métodos de controle da expressão de genes de triatomíneos.