



DANIEL FERNANDO PAULO

“Identificação e caracterização de microRNAs das espécies
Cochliomyia hominivorax e *Cochliomyia macellaria* (Diptera:
Calliphoridae).”

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIEL FERNANDO PAULO

“Identificação e caracterização de microRNAs das espécies *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).”

Este exemplar corresponde
à redação final da
DISSERTAÇÃO defendida
pelo candidato

DANIEL

FERNANDO

PAULO

e aprovada pela Comissão
Julgadora.

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal e
Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Lima De Azeredo Espin
Coorientadora: Dra. Ana Carolina Martins Junqueira

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P285i Paulo, Daniel Fernando, 1990-
Identificação de microRNAs das espécies *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) / Daniel Fernando Paulo. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin.
Coorientador: Ana Carolina Martins Junqueira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. microRNAs. 2. Mosca da bicheira. 3. Mosca-varejeira. 4. Parasitismo. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima, 1955-. II. Junqueira, Ana Carolina Martins. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification and characterization of microRNAs from *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae)

Palavras-chave em inglês:

microRNAs

Primary screwworm fly

secondary screwworm fly

Parasitism

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Ana Maria Lima de Azeredo-Espin [Orientador]

Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Zilá Luz Paulino Simões

Guilherme Targino Valente

Data de defesa: 27-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

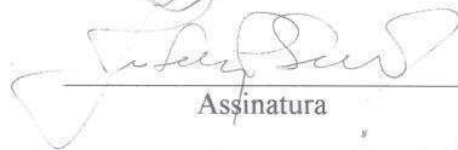
Campinas, 27 de março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Ana Maria Lima De Azeredo Espin
(orientadora)


Assinatura

Profª. Dra; Zilá Luz Paulino Simões


Assinatura

Dr. Guilherme Targino Valente


Assinatura

Dra. Katlin Brauer Massirer

Assinatura

Dr. Renato Vicentini

Assinatura

Resumo

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codantes que agem como moduladores pós-transcricionais da expressão gênica em todos os eucariotos investigados até o momento. Em animais, a complementariedade imperfeita de bases entre o miRNA e o sítio alvo do RNA mensageiro (mRNA) inibi sua tradução, tornando-os genes chaves no controle da expressão gênica. A identificação de miRNAs pode fornecer uma melhor compreensão de diversos processos biológicos e evolutivos das diferentes espécies. A família Calliphoridae é um grupo que compreende dípteros causadores de miíases, incluindo as espécies *Cochliomyia hominivorax* (mosca da bicheira) e *Cochliomyia macellaria* (mosca varejeira). A mosca da bicheira é uma das principais pragas na região Neotropical. Na fase larval, esta espécie causa infestações e alimenta-se de tecidos vivos de vertebrados de sangue quente, acarretando severas perdas na indústria pecuária. Diferentemente, a mosca varejeira, apresenta um hábito saprófago, se alimentando e reproduzindo em carcaças e tecidos em decomposição, ressaltando sua importância para a entomologia forense e para a saúde pública. Por serem filogeneticamente próximas e possuírem diferentes hábitos alimentares e reprodutivos, estas espécies representam modelos para estudos sobre as bases moleculares do parasitismo em Calliphoridae. Para identificar e caracterizar os miRNAs destas duas espécies, o transcriptoma de pequenos RNAs de adultos (macho e fêmea) e larva (terceiro instar) foram sequenciados em plataforma de nova geração MiSeq-Illumina. Os 6.2 milhões de *reads* gerados foram mapeados contra o genoma de *Drosophila melanogaster* e o banco de dados miRBase. Foram identificado 84 miRNAs evolutivamente conservados, dos quais 80 foram encontrados em *C. hominivorax* e 78 em *C. macellaria*. Também foi investigada a presença dos precursores em forma de grampo (pre-miRNAs) nos dados genômicos e

transcriptômicos disponíveis para estas espécies. Foram preditos 10 pre-miRNAs conservados e outros 5 que não apresentaram similaridade com nenhum miRNA já descrito para outras espécies de animais. A caracterização evolutiva dos miRNAs identificados mostrou que essas sequências são altamente conservadas desde Nephrozoa (641 MA), na base de bilatória, até Brachycera (195 MA). Substituições nucleotídicas observadas foram enviesadas na região 3'-final com raras mutações na região *seed*. Análises preliminares de expressão revelaram 79 miRNAs diferentemente expressos entre as espécies e os estágios de desenvolvimento investigados. Os resultados deste trabalho irão contribuir para uma melhor compreensão sobre os hábitos de parasitismo nas espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, com perspectivas para estudos evolutivos e funcionais na família e no controle de insetos-praga.

Palavras chave: microRNAs, Mosca da Bicheira, Mosca Varejeira, Parasitismo.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that act as post-transcriptional modulators of gene expression in all eukaryotes investigated so far. The imperfect complementarity between miRNA and the target site of messenger RNA (mRNA) inhibits their translation in animals, being key genes for the control of expression in cells. The identification of miRNAs can provide a better understanding of biological processes and evolution of traits in different species. The family Calliphoridae is a group of myiasis-causing flies with different feeding habits, which includes the species *Cochliomyia hominivorax* (screwworm fly) and *Cochliomyia macellaria* (secondary screwworm). The screwworm fly is one of the major pests in the Neotropical region. Their larvae infest and feed on live tissues of warm-blooded vertebrates, resulting in severe losses for livestock industry. Differently, the close-related secondary screwworm shows a saprophagous habit, feeding and breeding on carcasses and dead tissues, being crucial for forensic entomology and public health. Because of their close evolutionary relationship and contrasting feeding habits, they represent worthy models to study the molecular basis of parasitism and feeding specialization in the family Calliphoridae. To characterize the miRNAs from both species, the small-RNA transcriptomes of adults (male and female) and larvae (third instar) were sequenced using Illumina-MiSeq next generation sequencing platform. The 6.2 million reads generated were mapped against the *Drosophila melanogaster* genome and screened in miRBase. We identified 84 evolutionary conserved miRNAs which 80 was founded in *C. hominivorax* and 78 in *C. macellaria*. We also investigated the presence of hairpin precursors (pre-miRNAs) in the available genomic and transcriptomic data of these species, and predicted 10 conserved pre-miRNAs and others 5 that show no similarity with previously described animal miRNAs. The evolutionary characterization of identified

miRNAs showed that their sequences were highly conserved since the Nephrozoa ancestor (641 MYA) in the basis of Bilaterian clade, until Brachycera ancestor (195 MYA), with nucleotide substitutions biased to 3'-end portion of the miRNAs with rare substitutions in the seed region. The preliminary expression profile revealed 79 differentially expressed miRNAs between species, gender and life stages, given by hierarchical clustering and statistically significant change fold analysis. The results presented here will provide new information about the genetic background of parasitic habits in *C. hominivorax* and *C. macellaria*, with prospects to functional and evolutionary studies in Calliphoridae and pest control.

Key words: microRNAs, Primary Screwworm fly, Secondary Screwworm fly, Parasitism.

Índice

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de tabelas e figuras	xvii
Lista de abreviações e termos	xxi
Organização da dissertação	xxiii
Introdução	1
1. A família Calliphoridae (Diptera: Brachycera) e as espécies <i>Cochliomyia hominivorax</i> e <i>Cochliomyia macellaria</i> .	2
2. Os microRNAs: características, biogênese e regulação.	7
3. Os miRNAs nos processos biológicos.	11
Capítulo I	15
1. Resumo	16
2. Material e métodos	
2.1. Obtenção das amostras e extração de RNA total.	17
2.2. Construção das bibliotecas e sequenciamento de pequenos RNAs.	18
2.3. Pré-processamento dos dados gerados pelo sequenciamento em plataforma MiSeq-Illumina.	19
2.4. Identificação de miRNAs evolutivamente conservados.	20
2.5. Predição de pre-miRNAs através de dados transcriptômicos e genômicos.	21
3. Resultados	
3.1. Extração de RNA total e construção das bibliotecas.	23
3.2. Análise dos transcriptomas de pequenos RNAs e identificação de miRNAs.	25
3.3. Comparação dos repertórios de miRNAs evolutivamente conservados entre <i>C.hominivorax</i> e <i>C.macellaria</i> .	31
3.4. Predição de pre-miRNAs através de dados transcriptômicos e genômicos.	34
4. Discussão	37
5. Referências	41
Anexo A	47
Anexo B	53
Capítulo II	59
1. Resumo	60
2. Material e métodos	
2.1. Caracterização da expressão dos miRNAs identificados: análise indireta de expressão diferencial.	61

2.2. Caracterização da expressão dos miRNAs identificados: quantificação de miRNAs por PCR em tempo real.	62
2.3. Caracterização evolutiva dos miRNAs identificados: análise de coalescência e investigação de conservação.	64
3. Resultados	
3.1. Caracterização da expressão dos miRNAs identificados: Análise indireta de expressão diferencial.	65
3.2. Validação da expressão diferencial de miRNAs por qRT-PCR.	72
3.3. Caracterização evolutiva dos miRNAs identificados: Análise de coalescência e investigação de conservação.	73
4. Discussão	
4.1. Caracterização da expressão diferencial de miRNAs em <i>C. hominivorax</i> e <i>C. macellaria</i>	77
4.2. Caracterização evolutiva dos miRNAs de <i>C. hominivorax</i> e <i>C. macellaria</i>	83
5. Referências	87
Anexo A	95
Anexo B	103
Conclusões	107
Referências	111

“Run, rabbit, run,
Dig that hole, forget the sun.
And when at last the work is done,
Don’t sit down it’s time to dig another one.”
Breathe (in the air) (Roger Water, David Gilmore & Richard Wright).

“Around here, however, we don’t look
backwards for very long. We keep moving
forward, opening up new doors and doing new
things.”
Meet the Robinsons (Walt Disney).

Aos meus pais Fernando Paulo e Odalisia Zin, meus queridos irmãos Natália e Guilherme, meus sempre presentes avós Antônio e Maria e minha eterna companheira Claudia, por tudo.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, meus pais Fernando Paulo e Odalisia Zin, e meus irmãos Natália e Guilherme. Obrigado Mãe pelos “papos-cabeça” tarde da noite e obrigado Pai pela minha formação tanto educacional quanto pessoal. Aos meus avós, Antônio Moraes Zin e Maria Aparecida Zabiela Zin, obrigado por estarem sempre ao meu lado velando por mim. Aos meus padrinhos Walter e Odacira, por serem meu exemplo de luta, persistência e confiança. Agradeço especialmente a Claudia R.B. Frizzarini, obrigado por estes oito anos ao meu lado, sem você nada disso seria possível.

Gostaria de agradecer também aos amigos da república “Cativero”, Rafael Aguiar, Daniel Omai, Artur Mauro, Renan Suzuki, Johannes Barth e Túlio Geraldo, que continuam compartilhando bons momentos ao longo desses seis anos aqui em Campinas. Aos amigos de longa data de São Paulo, Pedro Destro, Felipe Blanes, Diogo Micossi e Bruno Dal Bianco, pela amizade que nem o tempo nem a distância puderam desfazê-la. Aos amigos da república “Cortiço”, Luana Bergamo e Raoni Peres, pelos incontáveis bons momentos compartilhados em Barão Geraldo: sou muito grato a vocês!

Agradeço a Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, que há quase cinco anos me proporcionou uma das minhas maiores alegrias: entrar no Laboratório de Genética e Evolução Animal (Lab.G.E.A). Obrigado pela oportunidade oferecida, me aceitando como aluno, e pela confiança que você sempre deposita em mim. Agradeço a Dra. Ana Carolina Martins Junqueira, pela minha orientação durante a iniciação científica, pela co-orientação durante o mestrado, e por estar sempre presente em minha vida acadêmica e científica, horas como professora, horas como amiga, nos momentos felizes e naqueles nem tanto. Sou muito grato a vocês duas, espero hoje estar retribuindo a alegria que vocês me deram.

Aos amigos e colegas do Lab.G.E.A, atuais, Dr. Thiago, Luana, Rogério, Felipe, Luíza, Lucas, Leonardo, Dr. Guilherme, e aos antigos, Dr. Marco, Dr. Pablo, Dr. Renato (que não eram Doutores quando eu os conheci), Dra. Mariana e Gisele. Obrigado por compreenderem minhas limitações e por participarem do meu crescimento pessoal e científico. Agradeço a Rosangela A. Rodrigues por sempre estar disponível, para ensinar e discutir, e por todo apoio técnico em todas as horas, especialmente aquelas mais difíceis. Um agradecimento especial ao Dr. Renato Vicentinni e ao Dr. Marco A.T. Marinho, por estarem sempre abertos a novas discussões, sejam elas científicas ou filosóficas, e por continuarem me acompanhando no meu crescimento científico. A todos, muito obrigado também pelos momentos de descontração e cerveja.

Agradeço a todos que contribuíram com esse trabalho: Dr. Thiago Mastrangelo e Salete Colto, pelo auxílio (e pela paciência) na criação das linhagens laboratoriais das espécies deste trabalho; Dr. Renato Vicentinni, Lucas Canesin e Dr. Guilherme Valente, pelos auxílios e discussões constantes nas análises de bioinformática; Dra. Tatiana T. Torres por ceder os dados iniciais do genoma de *C. hominivorax*; Profª. Dra. Zilá Simões, por participar das discussões deste trabalho, tanto na qualificação quanto na defesa, também agradeço a Dra. Érica Tanaka pela ajuda com as reações de qRT-PCR.

Gostaria de agradecer à FAPESP pelos financiamentos, tanto durante a iniciação científica (Processo nº 2010/09961-5), quanto durante a realização do mestrado (Processo nº 2012/06272-0), que foram essenciais para a realização deste trabalho. Também agradeço a CAPES e CNPq, além da FAPESP, pelos financiamentos dos diversos projetos e bolsas em andamento no Lab.G.E.A. Por fim, mas não menos importante, agradeço à PUC-Camp e a UNICAMP pela minha formação.

Lista de tabelas e figuras

Tabelas

Capítulo I - Tabela 1. Resultados do controle de qualidade em plataforma NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) da extração de RNA total das fases de desenvolvimento adulta (macho e fêmea) e larval (terceiro instar) das espécies *C. macellaria* e *C. hominivorax*. - pág. 24.

Capítulo I - Tabela 2. Análise dos *reads* correspondentes a miRNAs evolutivamente conservados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*. - pág. 29.

Capítulo I - Tabela 3. Espécies de Hexapoda que já possuem o repertório miRNAs identificados e anotados - pág. 30.

Capítulo I - Tabela A1. Lista dos miRNAs evolutivamente conservados identificados em *Cochliomyia hominivorax*. Os códigos de acesso do miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006) referem-se aos miRNAs ortólogos encontrados no genoma de *Drosophila melanogaster*. Outros acessos do são mostrados para os miRNAs sem homologia com *D. melanogaster*. - pág. 48.

Capítulo I - Tabela A2. Lista dos miRNAs evolutivamente conservados identificados em *Cochliomyia macellaria*. Os códigos de acesso do miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006) referem-se aos miRNAs ortólogos encontrados no genoma de *Drosophila melanogaster*. Outros acessos do são mostrados para os miRNAs sem homologia com *D. melanogaster*. - pág. 50.

Capítulo II - Tabela A1. Normalização dos miRNAs evolutivamente conservados identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria* utilizada nas análises indiretas de expressão diferencial. - pág. 96.

Capítulo II - Tabela A2. Análise interespecífica da expressão diferencial de miRNAs nos estágios de desenvolvimento (A) larval, e adulto (B) fêmea e (C) macho, das espécies *C. hominivorax* (C.hom) e *C. macellaria* (C.mac). - pág. 99.

Capítulo II - Tabela A3. Análise intraespecífica da expressão diferencial de miRNAs nos estágios de desenvolvimento larval e adulto (fêmea e macho), das espécies (A) *C. hominivorax* e (B) *C. macellaria*. - pág. 101.

Capítulo II - Tabela B1. Resultado da caracterização evolutiva dos miRNAs: miR-252, miR-2a-3p, miR-iab-4, miR-193-3p, miR-980 e miR-275-3p das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, conservados desde sua sequência ancestral em Protostomia, Arthropoda, Hexapoda, Endopterygota, Diptera, Brachycera e Calliphoridae, respectivamente. - pág. 104.

Figuras

Introdução – Figura 1. Relações filogenéticas da família Calliphoridae (direita) e da subfamília Chrysomyinae (esquerda). - pág. 4.

Introdução - Figura 2. Estrutura em forma de grampo do pre-miRNA let-7 de *Drosophila melanogaster*, mostrando os miRNAs maduros nas extremidades 3' (em vermelho) e 5' (em verde), e os sítios de reconhecimento de clivagem das enzimas Drosha e Dicer. - pág. 8.

Introdução - Figura 3. Modelo de reconhecimento canônico do mRNA-alvo pelo miRNA, onde a região 5'-seed e 3'-complementar do miRNA possui uma alta similaridade com os sítios alvos do mRNA. - pág. 10.

Capítulo I - Figura 1. Perfil gráfico das bibliotecas enriquecidas de miRNAs, onde: C.mac.04.M = Cm01; C.mac.05.F = Cm02; C.mac.06.L = Cm03; C.hom.01.M = Ch01; C.hom.02.F = Ch02 e; C.hom.03.L = Ch03, da Tabela 1. - pág. 25.

Capítulo I - Figura 2. Resultados das etapas realizadas para a identificação de miRNAs a partir dos 6.203.397 reads gerados dos transcriptomas de pequenos RNAs das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*: (A) etapa de pré-processamento dos dados; (B) filtragem de ncRNAs, que não miRNAs, RasiRNAs e fragmentos de mRNA; (C) mapeamento dos reads resultantes das etapas anteriores no genoma de referência de *D. melanogaster* e no banco de dados de miRNA miRBase v.20. - pág. 26.

Capítulo I - Figura 3. Distribuição do comprimento dos *reads* correspondentes a miRNAs mapeados no genoma de *D. melanogaster* e no banco de miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). - pág. 27.

Capítulo I - Figura 4. Logo da composição nucleotídica dos *reads* correspondentes a miRNAs mapeados no genoma de *D. melanogaster* e no banco de miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). - pág. 28.

Capítulo I - Figura 5. Diagramas de Venn dos miRNAs identificados em *C.hominivorax* e *C.macellaria* nos diferentes estágios de desenvolvimento investigados. Comparações intraespecíficas entre os estágios de desenvolvimento e gêneros de (A) *C.hominivorax* e (B) *C.macellaria*. Comparações interespecíficas entre (C) larvas e fêmeas, (D) machos e fêmeas e (E) machos e larvas de ambas as espécies. - pág. 32.

Capítulo I - Figura 6. Top 10 dos miRNAs mais abundantes, dada a normalizada de RPM, em (A) *C. hominivorax* e (B) *C. macellaria* nos estágios de desenvolvimento investigados. - pág. 34.

Capítulo I - Figura 7. Estruturas secundárias preditas de pre-miRNAs em *C. hominivorax* (cho) e *C. macellaria* (cma) utilizando os miRNAs previamente identificados e os dados transcriptômicos e genômicos disponíveis para essas espécies. - pág. 36.

Capítulo I - Figura 8. Estruturas secundárias preditas de pre-miRNAs em *C. hominivorax* (cho) e *C. macellaria* (cma) ainda não descritos na literatura utilizando os *reads* de pequenos RNAs não identificados anteriormente e os dados transcriptômicos e genômicos disponíveis para essas espécies. - pág. 37.

Capítulo I - Figura B1. Alinhamento dos pre-miRNAs evolutivamente conservados preditos para *C.hominivorax* e *C.macellaria* utilizando os dados genômicos e transcriptômicos disponíveis para essas espécies. Colunas em amarelo representam os sítios conservados em todas as espécies analisadas. As sequências dos miRNAs maduros nas extremidades 5-p e 3-p são mostradas em fonte vermelha e azul, respectivamente, e a região *seed* do miRNA em itálico. - pág. 54.

Capítulo II - Figura 1. Clusterização hierárquica dos miRNAs identificados em larvas, fêmeas e machos de *C. hominivorax* (C.ho) e *C. macellaria* (C.ma), baseada no perfil de expressão relativa dos miRNAs em cada transcriptoma de pequenos RNAs. - pág. 67.

Capítulo II - Figura 2. Comparação interespecífica da mudança da expressão relativa de miRNAs entre (A) Fêmeas, (B) Larvas e (C) Machos das espécies *C.hominivorax* e *C.macellaria*. - pág. 69.

Capítulo II - Figura 3. Comparação intraespecífica da mudança da expressão relativa de miRNAs em (A) *C.hominivorax* e (B) *C.macellaria*. - pág. 71.

Capítulo II - Figura 4. Comparação dos resultados de quantificação dos miRNAs miR-8-3p, miR-275-3p e miR-1000 obtidos através do (A) sequenciamento de nova geração em plataforma MiSeq-Illumina, e (B) qRT-PCR, pelo método $2^{-\Delta CT}$, em relação ao gene constitutivo U6. - pág. 73.

Capítulo II - Figura 5. Caracterização evolutiva dos 84 miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*. A árvore filogenética utilizada para inferir as sequências ancestrais de cada miRNA foi adaptada de Wheeler et al., (2009) e Wiegmann et al., (2009). Os tempos de divergência utilizados constam na Sessão 2.3. Cada nó apresenta a porcentagem de miRNAs conservados desde seu ancestral correspondente. Na direita estão apresentados os subgrupos de miRNAs formados pela sua ancestralidade. - pág. 74.

Capítulo II - Figura 6. Verificação da conservação das sequências dos miRNAs em cada subgrupo em relação as sequências ancestrais inferidas através da análise de coalescência, mostrando (A) o número de substituições nucleotídicas observadas, e (B) as razões e tendência de substituições nucleotídicas por miRNA. - pág. 75.

Capítulo II - Figura 7. Verificação das posições das substituições nucleotídicas nas sequências maduras dos miRNAs em cada subgrupo em relação às sequências ancestrais inferidas através da análise de coalescência. - pág. 77.

Lista de abreviações e termos

Bulges = Regiões salientes na estrutura secundária de RNA devido a presença de nucleotídeos não pareados.

C.elegans = *Caenorhabditis elegans*.

C.hominivorax = *Cochliomyia hominivorax*, a mosca da bicheira.

C.macellaria = *Cochliomyia macellaria*, a mosca varejeira.

cDNA = DNA complementar.

CDS = Sequência codificante de DNA.

Contigs = Sequência de DNA final montada utilizando os reads.

D.melanogaster = *Drosophila melanogaster*

for = gene *foraging*.

G.cho = Dados preliminares do sequenciamento do genoma da espécie *C. hominivorax*.

Instar = Estágio de desenvolvimento da larva ou ninfa em insetos holometábolos e hemimetábolos, respectivamente.

ITS = Espaçador Transcrito Interno.

Loop = Alça final da estrutura secundária de RNA em forma de grampo.

MA = Milhões de Anos Atrás.

miR-3-p = Sequência dos miRNA maduro presente na extremidade 3' do pre-miRNA.

miR-5-p = Sequência dos miRNA maduro presente na extremidade 5' do pre-miRNA.

miRISC = Complexo de silenciamento por miRNA.

miRNA = microRNA.

mlv = gene *malvolio*.

mRNA = RNA mensageiro.

ncRNA = RNA não codificante.

npf = gene *neuropeptide F*.

nts = Nucleotídeos.

pb = Pares de bases.

PCR = Reação em cadeia da Polimerase.

Pre-miRNAs = microRNA precursor.

Pri-miRNA = miRNA primário.

qRT-PCR = PCR quantitativo em tempo real.

RasiRNAs = Pequenos RNAs com repetições associadas.

Reads = Sequências de DNA obtidas através de sequenciamento.

Região seed = Região do 2º ao 8º nucleotídeo do miRNA.

RNA = Ácido ribonucleico.

RPM = Normalização de reads por milhão.

rRNA = RNA ribossomal.

T.carv = Transcriptoma disponível da espécie *C. hominivorax* (Carvalho et al., 2010).

T.cho1. e T.cho2 = Transcriptomas de RNAs totais da espécie *C. hominivorax*.

T.cma = Transcriptoma de RNA total da espécie *C. macellaria*.

tRNA = RNA transportador.

UTR = Região não traduzida do mRNA.

Organização da dissertação

O presente trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização inicial de miRNAs das espécies *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), possibilitando futuras investigações comparativas, funcionais e evolutivas em nível de regulação e expressão gênica nessas espécies. Os resultados apresentados nessa dissertação são os primeiros dados gerados de miRNAs para essas espécies não modelos, assim como para a família Calliphoridae e, até o momento, um dos únicos para dípteros muscóides não representantes do grupo *Drosophila*.

Duas abordagens foram realizadas durante o mestrado, e serão apresentadas em dois capítulos distintos, incluindo: (Capítulo I) o sequenciamento de miRNAs das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria* nos estágios de desenvolvimento larval e adulto, seguido pela identificação de miRNAs evolutivamente conservados, a caracterização das estruturas precursoras destes genes e a predição de miRNAs ainda não descritos na literatura; e (Capítulo II) a caracterização da expressão diferencial de miRNAs entre as espécies e os estágios de desenvolvimento investigados além de uma caracterização evolutiva dos miRNAs disponíveis desde Nephrozoa (~650MA) até Brachycera (~195MA). Os dois capítulos dessa dissertação fazem parte da versão final do artigo científico em fase de desenvolvimento.

Após uma breve introdução, visando contextualizar a problemática deste trabalho, cada capítulo da dissertação, descrito acima, será apresentado por um resumo, uma descrição das abordagens e das análises que foram conduzidas. Por fim serão apresentados os resultados e discussões dos dados gerados. As conclusões gerais deste trabalho são apresentadas no final da dissertação.

Introdução

Introdução

1. A família Calliphoridae (Diptera: Brachycera) e as espécies *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*.

A ordem Diptera é um dos grupos de insetos de maior riqueza de espécies, variações anatômicas e inovações ecológicas (Bertone & Wiegmann, 2009) estando entre as quatro megadiversas ordens de Holometabola (Frank, 2007; Pape et al., 2009), apresentando uma ampla gama de funções ecológicas, como espécies predadoras, herbívoras, polinizadoras e parasitas (Wiegmann et al., 2011). Estima-se que o surgimento desta ordem ocorreu na barreira Permo-Triássica há 250 milhões de anos (MA) (Blagoderov et al., 2007) seguido da especiação de dois grupos taxonômicos principais: Nematocera, que compreende os mosquitos, e Brachycera, que compreende os dípteros muscóides (Yeates & Wiegmann, 1999), que sobreviveram a duas extinções em massa (Permiano há cerca de 250 MA e Cretáceo-Paleógeno há cerca de 65 MA), concomitantes aos episódios de maior radiação na ordem (Wiegmann et al., 2011).

Com mais de 1.500 espécies descritas em 97 gêneros (Pape et al., 2011), distribuídas em todo globo, a família Calliphoridae (Brachycera: Schyzophora) está entre os dípteros muscóides que têm recebido particular atenção (Rognes, 1997; Nirmala et al., 2001; Kutty et al., 2010; Marinho et al., 2011; Marinho et al., 2012; Singh & Wells, 2011; Singh & Wells 2013) devido sua ampla diversidade ecológica, escolha de ambientes para oviposição e hábitos alimentares, neste último caso, principalmente devido à presença de espécies parasitas obrigatórias e facultativas (Stevens et al., 2006; Stevens & Wallman 2006).

Comumente, os indivíduos adultos da família são encontrados alimentando-se e reproduzindo-se em matéria orgânica em decomposição (Guimarães & Papavero, 1999), e

devido a este hábito podem agir como vetores de inúmeros patógenos para a saúde humana e animal. Ainda assim, algumas espécies também são responsáveis por severas injúrias a vertebrados, também conhecidas como miíasis (Zumpt, 1965), ressaltando a importância médica, veterinária, forense e econômica da família. As miíases são infestações de vertebrados vivos por larvas de dípteros que, por um período, alimentam-se dos tecidos vivos (miíase primária) ou em decomposição (miíase secundária) do hospedeiro (Zumpt, 1965).

Devido a estas características, a família tem sido alvo de extensivos estudos acerca do surgimento e evolução de seus hábitos parasíticos, principalmente em um contexto filogenético (Stevens & Wallman, 2006; Stevens et al., 2006; McDonagh & Stevens, 2011). Entretanto, a falta de um consenso sobre as relações evolutivas (Rognes, 1997; Kutty et al., 2010; Marinho et al., 2012) e classificações taxonômicas de Calliphoridae dificultam uma maior compreensão, em nível funcional e evolutivo, dos hábitos parasíticos encontrados na família, fazendo com que estas questões ainda permaneçam obscuras.

Dentre os grupos de califorídeos, destacam-se as subfamílias Chrysomyinae, Calliphorinae e Luciliinae (Figura 1), pelo fato de abranger espécies parasitas causadoras de miíases primárias e secundárias em animais e no homem (Zumpt, 1965; Guimarães et al., 1983; Amendt et al., 2004; Azeredo-Espin & Lessinger, 2006).

Na região Neotropical, a única espécie causadora de miíases primárias é a mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), que representa uma das principais pragas da pecuária (Guimarães et al., 1983), destacando-se entre os demais califorídeos de importância médica e veterinária por ser uma espécie ectoparasita obrigatória de vertebrados vivos, incluindo o homem (Hall & Wall, 1995). Atualmente, a distribuição geográfica de *C. hominivorax* compreende uma parte da região Caribenha e toda a América

do Sul (com exceção do Chile), após ter sido erradicada dos Estados Unidos e da maior parte dos países da América Central através da técnica de insetos estéreis (SIT: *Sterile Insect Technique*) (Bamhove et al., 1995).

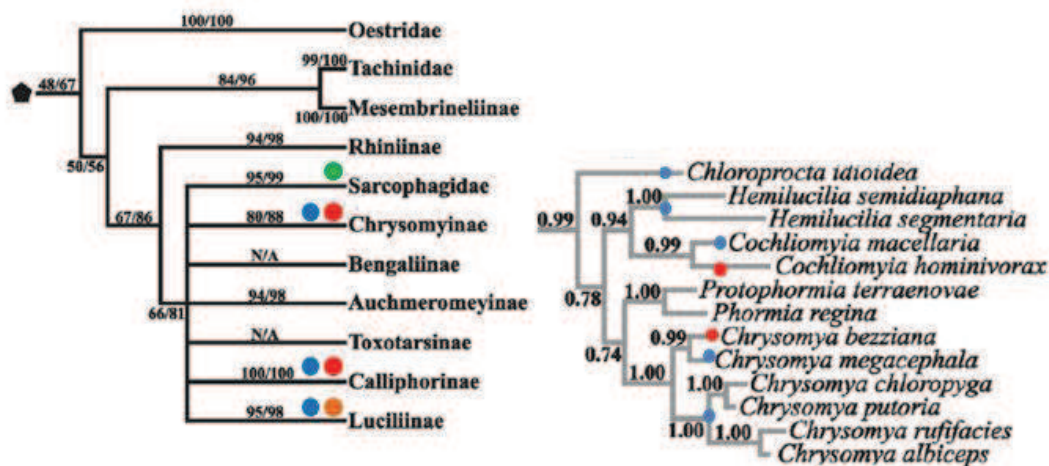


Figura 1. Relações filogenéticas da família Calliphoridae (direita) e da subfamília Chrysomyinae (esquerda). Árvore filogenética adaptada de Marinho et al., (2012). Em vermelho, espécies ectoparasitas obrigatórias de vertebrados; Azul, espécies principalmente facultativas, podendo causar miíasis secundárias; Verde, espécies parasitas obrigatórias de invertebrados; Laranja, espécies principalmente facultativas, algumas, como *Lucilia sericata*, causadoras de miíasis primárias. Adaptado de Stevens & Wallman, (2006) e Stevens et al., (2006).

Embora existam diversos ectoparasitas de importância veterinária na pecuária (e.g. *Rhipicephalus microplus*, o “carrapato do boi”, *Dermatobia hominis*, a “mosca da berne”, *Haematobia irritans irritans*, a “mosca dos chifres”), a mosca da bicheira é a principal responsável por perdas severas na produção animal. Os prejuízos são estimados em US\$ 150 milhões por ano na produção de leite, carne, couro e taxa de natalidade, além de gastos para o controle das infestações (Grisi et al., 2002). Seu ciclo de vida compreende

aproximadamente 21 dias. As fêmeas depositam seus ovos em bordas de feridas ou em orifícios do animal. Após 12 horas as larvas eclodem, passando por três estágios com duração de oito dias. A fase de pupa dura em média sete dias, seguida da emergência dos adultos. Em cinco dias as fêmeas já estão aptas para serem fecundadas (Adams, 1979).

A outra espécie desse gênero é a mosca varejeira, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775). Embora filogeneticamente próximas, as larvas da mosca varejeira possuem um hábito alimentar saprófago, sendo encontradas comumente em carcaças e tecidos necrosados expostos em feridas de vertebrados, neste último caso podendo ser agentes de miíases secundárias (Guimarães & Papavero, 1999). De fato, esta espécie é um dos primeiros dípteros a colonizar tecidos em decomposição tornando-a um indicador biológico para a predição do intervalo de “*post-mortem*” (Amendt et al., 2004). Devido ao seu hábito sinantrópico os indivíduos adultos desta espécie são responsáveis por atuar como vetores mecânicos de patógenos, assumindo importância médica e sanitária (Guimarães & Papavero, 1999). Esta espécie é distribuída em todo continente Americano e seu ciclo de vida é similar ao de *C. hominivorax* (Guimarães et al. 2001), com exceção da escolha do ambiente para oviposição e desenvolvimento larval.

Estudos sobre a variabilidade genética, estrutura de populações, biogeografia e mecanismos moleculares de resistência a inseticidas da mosca da bicheira têm sido extensivamente realizados no Laboratório de Genética e Evolução Animal (LabGEA) da UNICAMP (Lyra et al., 2009; Torres & Azeredo-Espin, 2009; Carvalho et al., 2010; Fresia et al., 2011). Além destes, estudos sobre relações evolutivas da família Calliphoridae, incluindo análises filogenéticas baseadas em genomas mitocondriais completos (Lessinger et al. 2000; de Azeredo-Espin & Lessinger 2006; Junqueira, 2008) e marcadores do genoma nuclear (Marinho et al., 2011; Marinho et al., 2012) também têm sido conduzidos. No

entanto, as bases moleculares relacionadas ao hábito de parasitismo são pouco entendidas para os califorídeos.

Ainda assim, a análise de genes relacionados com a busca e escolha de ambientes para reprodução e alimentação, como os genes *foraging* (*for*), *malvolio* (*mvl*) e *neuropeptide F* (*npf*), em *C. hominivorax* e *C. macellaria* também foi uma linha de pesquisa liderada no Lab.G.E.A (Cardoso., 2012; Cardoso et al., 2014), consistindo em um dos poucos trabalhos funcionais e de expressão gênica sobre os hábitos de parasitismo destas espécies.

Levando em consideração, que (1) o possível surgimento do hábito de parasitismo obrigatório tenha ocorrido três vezes independentemente na família Calliphoridae (Stevens & Wallman, 2006; Stevens et al., 2006), (2) *C. hominivorax* e *C. macellaria* são espécies filogeneticamente próximas e que, no entanto, possuem diferentes hábitos alimentares e reprodutivos, (3) que existem diferenças na expressão de genes associados à escolha de ambientes para reprodução, alimentação e desenvolvimento larval nessas espécies (Cardoso., 2012), e (4) uma vez que a variação fenotípica de uma espécie é diretamente controlado pela combinação entre fatores genéticos (tanto de genes codificantes quanto regulatórios) e ambientais (Caspi & Moffitt., 2006), é possível que o genoma destas espécies tenham se especializado, em nível transcricional e de regulação gênica (além de outras mudanças na estrutura do genoma como duplicações gênicas e desvios no uso de códons), juntamente com a especiação destas espécies.

Neste cenário, os microRNAs (miRNA) constituem uma importante classe de genes regulatórios a serem investigados, uma vez que estes genes têm sido identificados nas vias de regulação da maioria dos processos celulares analisados até o momento (Filipowicz et al., 2008; Stefani & Slack, 2008; Sun et al., 2010).

2. Os microRNAs: características, biogênese e regulação

Os miRNAs são pequenos RNAs transcritos não codificantes (ncRNAs) de aproximadamente 23 nucleotídeos (nts), que regulam negativamente genes endógenos através da complementaridade de bases entre sua sequência e o RNA mensageiro (mRNA) alvo (Brennecke et al., 2005). Estudos têm demonstrado que os miRNAs atuam como “genes chave” que emergiram como os principais reguladores pós-transcricionais da expressão gênica nas mais diversas vias biológicas, incluindo crescimento, apoptose e diferenciação celular, além do desenvolvimento embrionário (Pasquinelli et al., 2005; Filipowicz et al., 2008; Sun et al., 2010; Pasquinelli, 2012).

Desde a descoberta dos primeiros miRNAs em *Caenorhabditis elegans*, Lin-4 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) e Let-7 (Reinhart et al., 2000), e da subsequente identificação de outros miRNAs (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee & Ambros, 2001), mais de 24.521 miRNAs de 206 espécies de animais, plantas, fungos e vírus, foram registrados até o momento (Kozomara & Griffiths-Jones, 2013) ressaltando a importância destes ncRNAs nos mais diversos estudos genéticos e evolutivos.

A biogênese dos miRNAs envolve três passos principais: (1) primeiramente eles são transcritos em um longo RNA primário (pri-miRNA), os quais formam uma estrutura secundária em forma de grampo, que corresponde ao miRNA precursor (pre-miRNA); (2) após processado no núcleo, o pre-miRNA é exportado para o citoplasma onde (3) é processado novamente para sua forma madura (Winter et al., 2009).

O pri-miRNA é transcrito principalmente pela RNA polimerase II (Lee et al., 2004), embora em alguns casos a transcrição seja realizada pela RNA polimerase III (Borchert et al., 2006). A maior parte dos miRNAs possuem seus próprios promotores (monocistônicos), mas também podem estar arranjados em *clusters* que são transcritos em

um único e policistrônico pri-miRNA (Ryazansky et al., 2011). Este transcrito possui as mesmas características encontradas em outros transcrito, como o 5'-*cap* e uma calda 3'-Poli-Adenilada (Cai et al., 2004), no entanto ele é capaz de formar uma estrutura secundária em forma de grampo, com aproximadamente 70 pares de bases (pb), que é posteriormente processado, ainda no núcleo, pelo complexo composto pelas enzimas RNase III Drosha e Pasha (Denli et al., 2004), resultando no pre-miRNA.

O pre-miRNA é transportado para o citoplasma através da proteína Exportin5 (EXP5) (Kim, 2004), que é capaz de reconhecer a estrutura do pre-miRNA e assegurar que este foi corretamente processado (Lund et al., 2004). Já no citoplasma, o pre-miRNA é incorporado no complexo Dicer (também uma RNase do tipo III) responsável pela clivagem da região em *loop* do grampo (Figura 2), gerando dessa forma uma fita dupla de RNA de aproximadamente 22 bp que é imperfeitamente pareada.

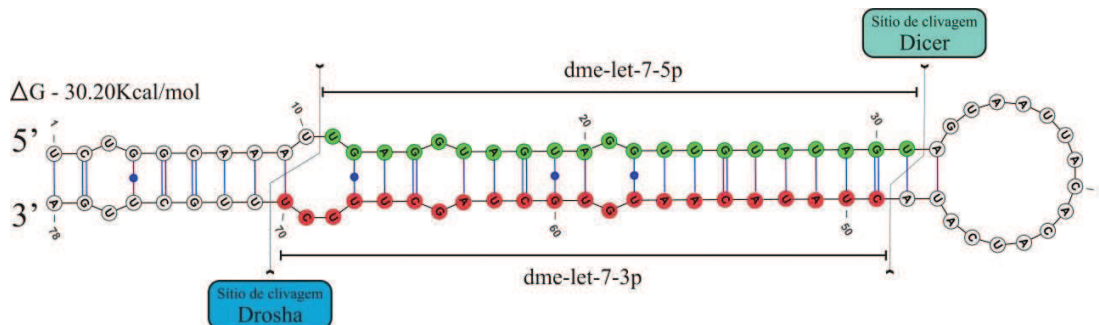


Figura 2. Estrutura em forma de grampo do pre-miRNA let-7 de *Drosophila melanogaster*, mostrando os miRNAs maduros nas extremidades 3' (em vermelho) e 5' (em verde), e os sítios de reconhecimento de clivagem das enzimas Drosha e Dicer. A sequência do dme-pre-miRNA let-7 foi obtido no banco de dados miRBase V.20 (Griffiths-Jones et al., 2006). O miRNA let-7 foi utilizado como exemplo adaptado de Belles et al., (2012).

Por último, a fita termodinamicamente menos estável do duplex de RNA é escolhida e se torna o miRNA maduro, que é então integrado no complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC) formado principalmente pela proteína Argonauta 2 (Winter et al., 2009). Após o miRNA ser carregado no complexo miRISC, inicia-se a fase de reconhecimento do alvo, baseado na complementariedade de bases entre o miRNA e o mRNA, principalmente na região correspondente do 2º ao 8º nts da extremidade 5' do miRNA, também conhecida como região *seed* (Lai et al., 2005). Em animais, a maior parte dos sítios de reconhecimento investigados nos mRNAs estão na região 3'-UTR, embora sítios de reconhecimento também presentes na região 5'-UTR do mRNA (Lee et al., 2009), assim como na região codificante (CDS) do alvo (Tay et al., 2008; Schnall-Levin et al., 2010) têm sido descritos.

Na maior parte dos casos, a complementaridade imperfeita de bases entre o miRNA e o mRNA leva ao bloqueio da tradução no estágio de iniciação (Seggerson et al., 2002) ou após a iniciação, na fase de elongação (Fabian et al., 2010) pelo complexo ribossomal, embora também possa ocorrer a degradação do mRNA (geralmente quando ocorre a complementariedade perfeita entre o miRNA e o sítio alvo no mRNA) ou seu armazenamento em corpúsculos de processamento celular (Sun et al., 2010).

Segundo Brennecke et al., (2005), existem duas categorias de reconhecimento por miRNAs. A primeira é denominada de “5'-dominante”, que ocorre quando existe uma alta complementariedade da região 5' do miRNA com o sítio alvo no mRNA. Essa categoria pode ser dividida em dois tipos: (1) a “canônica”, quando tanto a região *seed* quanto a região 3'-complementar do miRNA possuem uma alta similaridade com o sítio alvo no mRNA (Figura 3), e (2) “seed”, quando apenas a região *seed* possui uma alta similaridade com o sítio alvo no mRNA. A segunda é denominada “3'-compensatória”, que ocorre

quando a região *seed* do miRNA possui uma baixa similaridade com o sítio alvo no mRNA, mas sua região 3'-complementar possui uma complementariedade, gerando um efeito compensatório.

Devido as suas características, os miRNAs fazem parte do grupo de RNAs mais conservados do genoma, provavelmente devido a forte seleção contra mudanças na estrutura do pre-miRNA (Price et al., 2011), principalmente na região *seed*, por estar envolvida em todos os tipos de regulação do mRNA-alvo (Brennecke et al., 2005). Devido a esta pouca variação, os miRNAs podem ser caracterizados, identificados e comparados em diferentes grupos de animais. Pasquinelli et al., 2000, demonstraram que o miR-*let-7* é idêntico em *C.elegans*, humanos e *Drosophila* sp., apesar dos bilhões de anos de evolução independente. Além disso, estes genes apresentam poucas perdas secundárias no genoma e raras substituições em sua sequência madura, permitindo a comparação de sequências ortólogas nos genomas de diferentes espécies (Sperling & Peterson, 2004, Speling & Peterson., 2009; Wheeler et al., 2009; Sperling et al., 2011). Além de sua alta conservação, os miRNAs são adicionados sequencialmente durante a diversificação das linhagens de animais (Sempere et al., 2006), o que torna possível a comparação destes genes em qualquer nível taxonômico investigado.

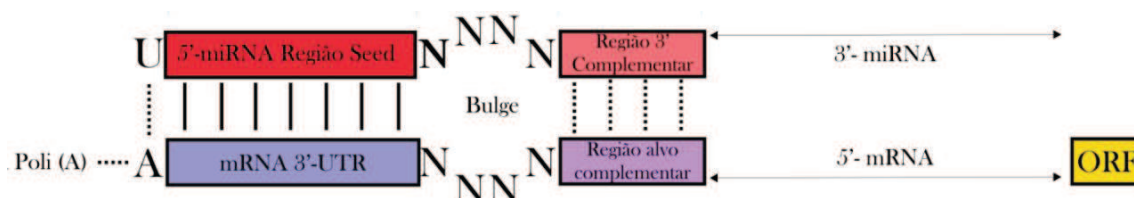


Figura 3. Modelo de reconhecimento canônico do mRNA-alvo pelo miRNA, onde a região 5'-*seed* e 3'-complementar do miRNA possui uma alta similaridade com os sítios alvos do mRNA. Adaptado de Wheeler et al., (2009).

3. Os miRNAs nos processos biológicos

Os miRNAs participam da regulação gênica fina, temporalmente e espacialmente durante o desenvolvimento do organismo (Aboobaker et al., 2005). É predito que cerca de 50% dos RNAs codificantes em mamíferos são regulados por miRNAs (Chekulaeva & Filipowicz, 2009), que além de reprimir, também parecem estar associados, em alguns casos, com a ativação da expressão gênica (Vasudevan et al., 2007; Mortensen et al., 2011).

Assim, os miRNAs fazem parte das redes de regulação gênica de quase todos os processos celulares investigados até o momento, incluindo apoptose (Xu et al., 2011), destino celular (Xie et al., 2013), desenvolvimento (Aboobaker et al., 2005), metabolismo (Rottiers & Näär, 2012), resposta imunológica (Fullaondo & Lee, 2012) comportamento (Greenberg et al., 2012; Yang et al., 2014), dentre outros. Além desse contexto funcional, a investigação de miRNAs também possibilitou dar origem a novas evidências de diversos processos evolutivos (Wheeler et al. 2009; Campbell et al. 2011; Campo-Paysaa et al. 2011; Rota-Stabelli et al. 2011), incluindo a explosão de complexidade e biodiversidade de Metazoários durante o período Cambriano (Peterson et al., 2009).

Dentre os trabalhos que investigam a interface entre miRNAs e os complexos processos biológicos encontrados em animais, Gunaratne et al., (2011) mostraram que miRNAs podem constituir um importante componente na aprendizagem da comunicação em Passeriformes através do controle da expressão gênica em células neurais. Outro estudo sugere que o surgimento de espécies eussociais em Hymenoptera está intrinsecamente relacionado à aquisição de miRNAs no grupo.

Greenberg et al. (2012) encontraram diversos miRNAs conservados ao longo de Aculeata (o clado que inclui todos os himenópteros eussociais) que estão ausentes em outros himenópteros solitários, criando a hipótese de que estes pequenos genes foram

importantes no surgimento do comportamento social destas espécies. Também foram encontrados diferentes níveis de expressão destes mesmos miRNAs em castas de *Apis mellifera* indicando que estes genes são fundamentais na regulação gênica que irá definir o papel que cada indivíduo terá na colônia (Li et al., 2012; Liu et al., 2012). Ainda em *A. mellifera*, os miRNAs podem estar associados a regulação das mudanças fisiológicas durante o voo nupcial da rainha (Wu et al., 2014).

Em alguns Artrópodes hematófagos, há indícios de que miR-1 pode estar associado a resposta ao estresse oxidativo causado pela ingestão de sangue, como observado no carrapato bovino *R. microplus* (Barrero et al., 2011). Já em *Aedes aegypti*, um díptero de grande relevância médica por ser vetor da Dengue, além da expressão diferencial de miR-1 (e de outros como miR-8), foi demonstrado que o miR-275 está intrinsecamente relacionado com a capacidade de digerir sangue e consequentemente na maturação dos ovos pelas fêmeas (Bryant et al., 2010).

O dimorfismo sexual em insetos também parece ser regulado por miRNAs (Wu et al., 2013), assim como a metamorfose em insetos holometábolos (Belles et al., 2012) e hemimetábolos (Gomez-Orte & Belles, 2009), maturidade sexual (Bryant et al., 2010; Cristino et al., 2011; Wu et al., 2014), e embriogênese (Pauli et al., 2011). Recentemente, foi descoberto também que miRNAs estão envolvidos com o comportamento de agregação em gafanhotos (Yang et al., 2014), ressaltando a importância desses genes regulatórios na plasticidade e variação fenotípica das espécies.

Neste contexto, a pergunta biológica central deste trabalho, que se quer responder futuramente a partir das investigações realizadas nesta dissertação é: “*Quais miRNAs podem estar associados aos diferentes hábitos reprodutivos e alimentares encontrados em Cochliomyia hominivorax e Cochliomyia macellaria ?*”. Essa é uma pergunta ambiciosa

com uma resposta ampla, sendo necessário inicialmente que investigações básicas sejam realizadas, incluindo a identificação de miRNAs destas espécies. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo principal gerar os primeiros dados sobre miRNAs para as espécies da família Calliphoridae *C. hominivorax* e *C. macellaria*, fornecendo a base para futuros estudos funcionais e evolutivos, envolvendo miRNAs, a cerca dos hábitos destas espécies, que poderão ser estendidos para outras espécies da família. O presente estudo constitui uma abordagem inovadora na investigação das bases genéticas regulatórias associadas às diferenças biológicas, principalmente alimentares e reprodutivas, em califorídeos. Especificamente os objetivos dessa dissertação foram:

1. Identificar miRNAs nas espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, nas fases de desenvolvimento larval e adulta, através do sequenciamento de pequenos RNAs e pela busca por similaridade com miRNAs já descritos para outros animais.

2. Comparar os miRNAs identificados entre *C. hominivorax* e *C. macellaria* e as fases de desenvolvimento investigadas.

(Os objetivos 1 e 2 serão abordados no Capítulo I dessa dissertação).

3. Estimar indiretamente a expressão dos miRNAs identificados, caracterizando sua possível expressão diferencial entre as espécies e as fases de desenvolvimento investigadas.

4. Caracterizar de forma evolutiva os miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, através da inferência de suas ancestralidades pela análise de coalescência.

(Os objetivos 3 e 4 serão abordados no Capítulo II dessa dissertação).

Capítulo I

Identificação de miRNAs das espécies *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).

1. Resumo

Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs endógenos não codificantes que atuam na modulação da expressão gênica em todos os eucariotos investigados até o momento. Por serem genes extremamente conservados, principalmente em sua forma madura, entre os grupos de animais, e por serem adicionados continuamente no genoma das espécies ao longo do tempo evolutivo, com raros eventos de perda secundária, esses genes podem ser identificados e comparados entre espécies filogeneticamente próximas e descobertos em organismos não modelos. Neste capítulo estão apresentadas as abordagens utilizadas na identificação do repertório parcial de miRNAs das espécies *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Seis transcriptomas de pequenos RNAs foram sequenciados em plataforma MiSeq-Illumina, compreendendo as fases de desenvolvimento larval (terceiro instar) e adulta (macho e fêmea) de ambas as espécies. Os dados gerados foram mapeados no genoma de referência de *Drosophila melanogaster*, e os miRNAs ortólogos identificados. No total, 84 miRNAs evolutivamente conservados foram identificados nas espécie *C. hominivorax* e *C. macellaria*. A maior parte dos miRNAs identificados são compartilhados entre as espécies e as fases do desenvolvimento investigadas, indicando uma expressão ubíqua destes genes. Ainda assim, foram verificadas diferenças na quantidade relativa de *reads* gerados para cada miRNAs nas bibliotecas, indicando uma possível expressão diferencial destes genes. Por fim, foram preditas 10 estruturas precursoras dos miRNAs identificados, assim como de 5 miRNAs ainda não descritos na literatura, utilizando dados genômicos e transcriptômicos disponíveis para essas espécies. Os dados apresentados a seguir representam os primeiros dados gerados de miRNAs para as espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, assim como para a

família Calliphoridae e um dos únicos para dípteros muscóides não representantes do grupo *Drosophila*.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção das amostras e extração de RNA total

As amostras de *C. hominivorax* e *C. macellaria* foram obtidas de linhagens estabelecidas e mantidas no Laboratório de Genética e Evolução Animal (LabGEA, UNICAMP). As colônias foram mantidas da seguinte maneira: as larvas de *C. hominivorax* foram criadas em meio de cultura a base de carne moída fresca suplementado com sangue e água (Infante-Vargas & Azeredo-Espin, 1995). Já as larvas de *C. macellaria* foram criadas em carcaça de rato (sacrificado com CO₂ e mantidos a -20°C até seu uso). Na fase larval, ambas as espécies foram mantidas em câmara climatizada a 35°C. Na fase adulta, os indivíduos foram mantidos em gaiolas de criação a 25°C com uma dieta composta de leite em pó, açúcar e extrato de levedura. A umidade relativa da câmara foi mantida em torno 70% RH com o fotoperíodo ajustado para 12:12 horas.

As extrações de RNA total foram realizadas utilizando um indivíduo para cada uma das fases de desenvolvimento: larval, 24 horas após atingir o terceiro instar, e adulta, compreendendo machos e fêmeas de cada espécie, 24 horas após a emergência. Os espécimes de ambas as espécies foram coletados, separadamente, com o auxílio de tubos esterilizados e subsequentemente congeladas a -80°C. Após congelar, os espécimens foram enxaguados com água DEPC 0.1% e homogeneizados em 1 ml de reagente TRIzol® (Invitrogen). O RNA total foi precipitado com 500 µl de Isopropanol, ressuspendido em 40 µl de água DEPC e armazenado em freezer -80°C. O controle de qualidade das extrações

foram conduzidas em plataforma espectrofotométrica NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e microfluídica Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

2.2. Construção das bibliotecas e sequenciamento de pequenos RNAs

Para a construção das bibliotecas de pequenos RNAs, inicialmente um total de 7 μ g de RNA total, isolado anteriormente, de cada amostra foram carregados separadamente em gel de poliacrilamida denaturante (PAGE) 15% TBE e as frações de diferentes tamanhos de RNAs separados por eletroforese. A fração de pequenos RNAs (18-30 nts) foi purificada do gel, para enriquecer as amostras de miRNAs maduros. As bibliotecas foram preparadas utilizando o Illumina TruSeq Small RNA Preparation Kit (Illumina INC., San Diego, CA).

Inicialmente o adaptador 5' foi ligado nas amostras enriquecidas para pequenos RNAs utilizando 1,3 μ l do adaptador SRA, 10X T4 RNA ligase, 40U de Ribolock (40U/ μ l, Fermentas) e 1U de T4 RNA ligase. O RNA previamente purificado foi acrescentado para o volume final de 10 μ l. A reação foi incubada a 20°C por 6 horas e mantida a 4°C *overnight*. A reação foi purificada novamente em gel PAGE 15%. O adaptador 3' foi ligado subsequentemente seguindo o mesmo protocolo. Cada adaptador continha uma região *Barcode* única para cada biblioteca, tornando possível sua identificação após o sequenciamento.

Posteriormente, as amostras ligadas aos adaptadores 3' e 5' foram tratadas com 2U de DNase turbo (Ambion). A transcrição reversa foi realizada com 2,5 μ g de RNA ligado e 2,5 μ M de oligonucleotídeo universal, 5X tampão SuperScript II (Invitrogen), 6,25 mM de dNTP, 1mM de DTT e Ribolock (Fermentas) para o volume final de 9 μ l. Para cada reação

1U de SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) foi adicionada e a síntese do cDNA foi feita a 42°C por 1 hora.

O enriquecimento das bibliotecas foi realizado via PCRs conduzidas para um volume final de 40 µl contendo 10x *Taq* Buffer (100mM Tris-HCl, 550 mM KCl, 0.8% Nonidet P40), 2 mM de cada dNTP, 2,5 µM de cada oligonucleotídeo, 0.5 U de *Taq* DNA polimerase, 2 mM MgCl₂ e 10 µl de cDNA. As amplificações foram realizadas com uma desnaturação inicial a 98°C por 30 seg., seguida por 15 ciclos a 98°C por 10 seg., 60°C por 30 seg. e 72°C por 15 seg. Os produtos foram verificados em gel de agarose 3% e purificados em coluna de sílica com o *GFXKit* (GE Helthcare). A qualidade das bibliotecas construídas foi verificada novamente em plataforma Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). O sequenciamento por síntese foi realizado através da plataforma MiSeq - Illumina, em *multiplex* (as bibliotecas combinadas foram sequenciadas e posteriormente identificadas através dos adaptadores com sequências únicas - *barcode*), com tamanho de fragmentos 1x50 pb *single-end*, no centro de genômica Ambry Genetics, Aliso Viejo, CA.

2.3. Pré-processamento dos dados gerados pelo sequenciamento em plataforma MiSeq-Illumina

O pré-processamento dos dados foi realizado com a ferramenta Fastx Tool kit V0.0.13 (Hannon lab). Inicialmente as sequências geradas para cada amostra foram separadas de acordo com a sequência *barcode* única utilizada na montagem das bibliotecas (Sessão 2.2). Posteriormente os dados foram filtrados de acordo com os índices de qualidade do sequenciamento. As sequências com mais de 90% das bases com qualidade < Q30 foram excluídas dos dados e as sequências dos adaptadores (utilizados na montagem das bibliotecas) retirados.

As sequências resultantes menores do que 18 nts, com bases desconhecidas (N), contendo apenas a sequência do adaptador ou não contendo o adaptador foram excluídas. Por último as sequências foram excisadas na região 3' para no máximo 35 nts. Uma vez que miRNAs possuem tamanhos entre 19-30 nts (Griffiths-Jones et al., 2006), *reads* de diferentes tamanhos foram obtidos. Estas sequências foram utilizadas para identificar os miRNAs das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*.

2.4. Identificação de miRNAs evolutivamente conservados

Após o pré-processamento, os dados resultantes foram filtrados a fim de descartar sequências que não representassem miRNAs maduros, incluindo outros ncRNAs (e.g. fragmentos de rRNAs, tRNAs e snRNAs), pequenos RNAs com repetições associadas (RasiRNAs) e fragmentos de degradação de mRNAs. Para essa filtragem foram utilizados os bancos de referência Rfam v11.0 (Burge et al., 2013), RepBase (Jurka et al., 2005) e os genes codificantes de *D.melanogaster* disponíveis no banco sem redundância do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), respectivamente. A ferramenta *stand-alone* Blastn (Altschul et al., 1990) foi utilizada como método de alinhamento, com e-value 10^{-5} e tamanho de palavra 15. Os *reads* mapeados nestes bancos foram excluídos das análises futuras.

Os *reads* restantes foram mapeados no genoma referência de *Drosophila melanogaster* (dme_r5.32: [http:// flybase.org](http://flybase.org)) através da ferramenta miRDeep 2 (Friedländer et al., 2008, 2012), que realiza uma busca por homologia entre os *reads* de pequenos RNAs e os miRNAs já descritos para o genoma de referência utilizado. Os alinhamentos foram inspecionados manualmente para confirmar sua acurácia e conservação e os critérios utilizados para definir a quais miRNAs de *D. melanogaster* os *reads* de

pequenos RNAs gerados são homólogos foram: (1) as posições 2 a 8 (região *seed* do miRNA maduro) deveriam ser idênticas entre as duas sequências e (2) o restante do alinhamento não deveria conter mais do que 3 *mismatches*.

Também foi realizada uma busca por homologia em todas as sequências disponíveis de miRNAs descritas para animais, até o momento, no banco de dados miRBase v.20 (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013), uma vez que é possível haver eventos de ganho e perda de miRNAs no genoma das espécies (Wheeler et al., 2009). A ferramenta *stand-alone* Blastn (Altschul et al., 1990) foi utilizada novamente com os mesmos parâmetros descritos acima. Para analisar as informações e contar os *reads* mapeados nestas etapas foram utilizados scripts em perl desenvolvidos pelo Laboratório de Bioinformática e Biologia de Sistemas (CBMEG-UNICAMP). Os *reads* de pequenos RNAs que não puderam ser identificados nesta etapa foram separados em um conjunto distinto de dados, que foram posteriormente utilizados na predição de miRNAs ainda não descritos.

2.5. Predição de pre-miRNAs através de dados transcriptômicos e genômicos

Dois conjuntos de dados transcriptômicos da espécie *C. hominivorax* (T.cho1. e T.cho2.) e um de *C. macellaria* (T.cma) foram sequenciados, a partir da extração de RNA total, de indivíduos adultos, sem enriquecimento para nenhuma classe específica de RNA (A.C.M. Junqueira., comunicação pessoal). O sequenciamento foi realizado no “*Center for Comparative Genomics and Bioinformatics*” da “*Pennsylvania State College*” (Penn State), USA, através da plataforma HiSeq-Illumina com tamanho de fragmento 2x150 pb *paired end*. Os indivíduos de *C. hominivorax* foram obtidos através de coletas realizadas em Manaus-MA pelo Dr. Thiago Mastrangelo em Outubro de 2012, enquanto *C. macellaria* foi obtida a partir da linhagem estabelecidas no LabGEA.

Os *reads* dos transcriptomas foram pré-processados (como descrito na Sessão 2.3) e posteriormente filtrados. Primeiramente, as sequências pré-processadas foram mapeadas contra as sequências disponíveis de RNAs ribossomais (rRNAs) e espaçadores transcritos internos (ITSs) para estas duas espécies (ncbi.nlm.nih.gov) utilizando a ferramenta *stand-alone* Blastn (Altschul et al., 1990), com e-value de 10^{-5} . As sequências sem similaridade com rRNAs e ITSs foram subsequentemente mapeadas contra o banco de CDS sem redundância de *D. melanogaster* (ncbi.nlm.nih.gov), para filtrar possíveis sequências de mRNAs degradados, utilizando a ferramenta *stand-alone* Blat v.34 (Kent, 2002) com os parâmetros padrão. Por último, as sequências filtradas foram mapeadas contra os genes de *Escherichia coli*, com o intuito de remover qualquer tipo de sequências provenientes de contaminações. Este último passo foi realizado com a ferramenta *stand-alone* Blastx v.2.2.18 (Altschul et al., 1990) com e-value de 10^{-5} . Finalmente, os *reads* resultantes da filtragem dos dados foram montados em *contigs* utilizando a ferramenta Velvet v.1.2.10 (Zerbino & Birney, 2008).

Duas análises foram realizadas com os transcriptomas montados, a primeira visando prever pre-miRNAs evolutivamente conservados de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, e a segunda visando prever miRNAs ainda não descritos na literatura. Para a primeira análise, os miRNAs evolutivamente conservados identificados anteriormente (Sessão 2.4) foram mapeados nos transcriptomas utilizando a ferramenta Bowtie v.1.0 (Langmead, 2010). Não foram permitidos *mismatches* na região *seed* (posições de 1-8 nts) e não mais do que 3 *mismatches* no restante do alinhamento. A segunda análise consistiu na mesma abordagem, no entanto, utilizando os *reads* de pequenos RNAs que não puderam ser identificados como miRNAs evolutivamente conservados anteriormente. Os alinhamentos, assim como a análise subsequente, também foram feitos utilizando o

transcriptoma de *C. hominivorax* previamente realizado no LabGEA e já descrito (T.carv.) (Carvalho et al., 2010), assim como para os dados preliminares do sequenciamento do genoma desta espécie (G.cho.) (T.T.Torres, comunicação pessoal).

Os alinhamentos resultantes foram utilizados no programa MIREAP v.0.2 (Chen et al., 2009) para predizer os possíveis pre-miRNAs encontrados, usando os parâmetros recomendados. Neste programa, as sequências adjacentes do alinhamento são utilizadas para explorar a existência de uma estrutura secundária correspondente a um pre-miRNA. As estruturas preditas foram consideradas correspondentes a pre-miRNAs apenas quando (1) a sequência do miRNA maduro estivesse presente em um dos “braços” da estrutura em grampo do pre-miRNA com mais de 60% de complementaridade com a sequência no outro “braço” da estrutura, (2) não apresentassem grandes *bulges* internos ou *loops* na extremidade da estrutura (e.g. *bulges* com mais de 4 nts), (3) a estrutura precursora deve apresentar uma mínima energia livre menor que -20 Kcal/mol. A presença dos sítios de clivagem das enzimas Drosha e Dicer também foi considerada quando os miRNAs das duas extremidades (3-p e 5-p) foram identificados no pre-miRNA.

3. Resultados

3.1. Extração de RNA total e construção das bibliotecas

Os resultados de controle obtidos através das plataformas NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), das extrações de RNA total que foram usadas para o sequenciamento de nova geração em plataforma MiSeq-Illumina são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados do controle de qualidade em plataforma NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) da extração de RNA total das fases de desenvolvimento adulta (macho e fêmea) e larval (terceiro instar) das espécies *C. macellaria* e *C. hominivorax*.

Código	Espécie	Sexo	Estágio	NanoDrop			Bioanalyzer RIN		
				µg/µl	260/280	260/230	28S/18S ratio	RNA area (%)	RIN
Cm01	<i>C. macellaria</i>	Macho	Adulto	0.8	1.99	1.90	0.5	30.4	7.2
Cm02	<i>C. macellaria</i>	Fêmea	Adulto	2.72	2.05	1.82	0.9	22.6	6.9
Cm03	<i>C. macellaria</i>	-	3º inst. Larva	3.09	2.10	2.13	0.5	33.3	7.5
Ch01	<i>C. hominivorax</i>	Macho	Adulto	1.54	2.05	2.00	0.4	29.4	6.7
Ch02	<i>C. hominivorax</i>	Fêmea	Adulto	2.20	2.00	1.90	1.4	19.1	7.0
Ch03	<i>C. hominivorax</i>	-	3º inst. Larva	4.31	2.10	2.32	1.7	34.3	9.2

As análises conduzidas na plataforma NanoDrop demonstraram que uma quantidade suficiente de RNA total pode ser recuperado (razão 260/280) sem presença de outros compostos que poderiam interferir nos passos seguintes (razão 260/230). Os resultados do Bioanalyzer indicam uma boa razão entre os RNAs ribossomais 18S e 28S e uma integridade (RIN) compatíveis com resultados para outros insetos (Winnebeck et al., 2010).

Após a corrida em gel desnaturante PAGE 15%, os fragmentos entre 18 e 30 nts, foram excisados e os adaptadores 3' e 5' imediatamente ligados. O DNA complementar (cDNA), produzido pela transcrição reversa, foi utilizado para as reações de PCR a fim de enriquecer as bibliotecas de pequenos RNAs para o sequenciamento. Os resultados desta etapa foram analisados em plataforma Bioanalyzer (Figura 1).

Os picos de 35 e 10380 bp correspondem ao marcador de peso molecular utilizado na análise (como mostrado no perfil do controle, Figura 1). O pico de 150 bp corresponde a construção miRNA + adaptador 3' + adaptador 5', transcrita em cDNA e enriquecida via PCR. Todos os picos correspondentes das bibliotecas estão acima de 500 FU, parâmetro necessário para início do sequenciamento.

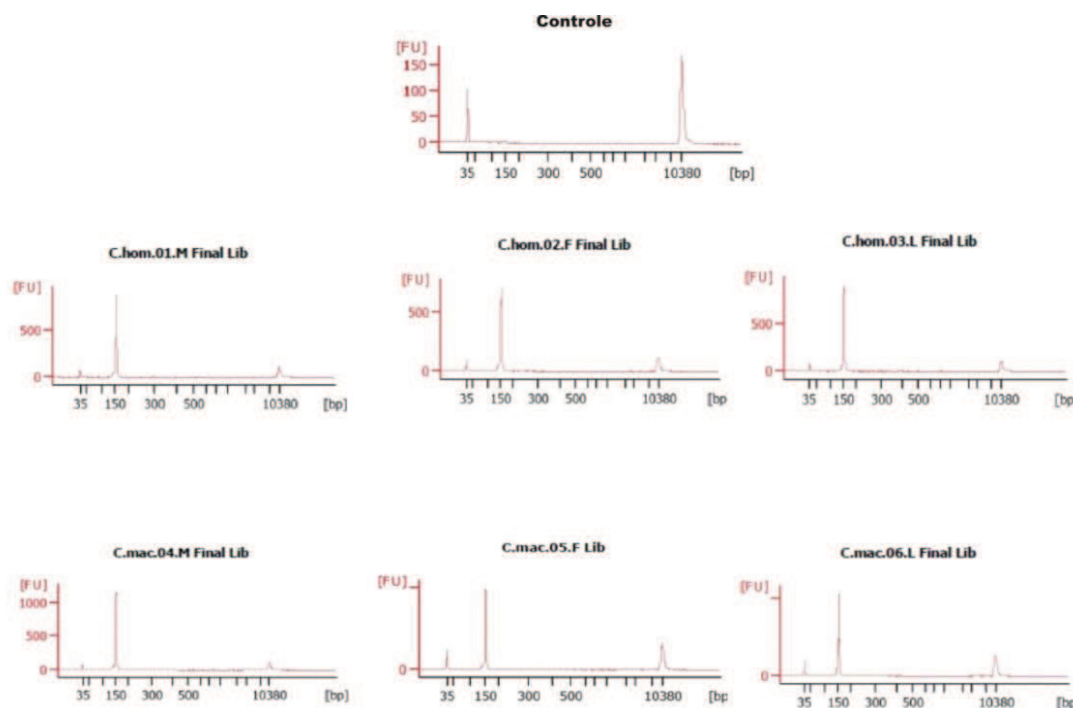


Figura 1. Perfil gráfico das bibliotecas enriquecidas de miRNAs, onde: C.mac.04.M = Cm01; C.mac.05.F = Cm02; C.mac.06.L = Cm03; C.hom.01.M = Ch01; C.hom.02.F = Ch02 e; C.hom.03.L = Ch03, da Tabela 1.

3.2. Análise dos transcriptomas de pequenos RNAs e identificação de miRNAs

Após o sequenciamento das bibliotecas de pequenos RNAs dos estágios de desenvolvimento larval (terceiro instar) e adulto (macho e fêmea) das espécies, os dados passaram por uma série de etapas para identificação de miRNAs, sendo eles: o pré-processamento dos dados brutos do sequenciamento, a filtragem dos *reads* e finalmente o mapeamento dos *reads* restantes no genoma de *D. melanogaster* e no banco de miRNAs miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013). Os resultados destas análises estão compilados na Figura 2.

O número total de *reads* gerados para todas as bibliotecas foi de 6.297.865 e, após o pré-processamento, cerca de 1.5% dos *reads* foram descartados (Figura 2.A). As

seqüências resultantes de cada biblioteca variaram entre 19 a 35 nucleotídeos, que foram mapeados contra seqüências de referência nos bancos de dados Rfam (Burge et al., 2012), RepBase (Jurka et al., 2005) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Uma grande quantidade de *reads* entre 30 e 33 nts foram gerados, representando mais de 85% dos dados processados que foram mapeados no banco de RNAs não-codantes Rfam (Figura 2.B). Estas seqüências correspondem a fragmentos de tRNAs, rRNAs, snRNAs e outros RNAs não codantes degradados durante a construção das bibliotecas de pequenos RNAs, uma vez que nenhum sinal de degradação foi observado anteriormente nas extrações de RNA total (Tabela 1).

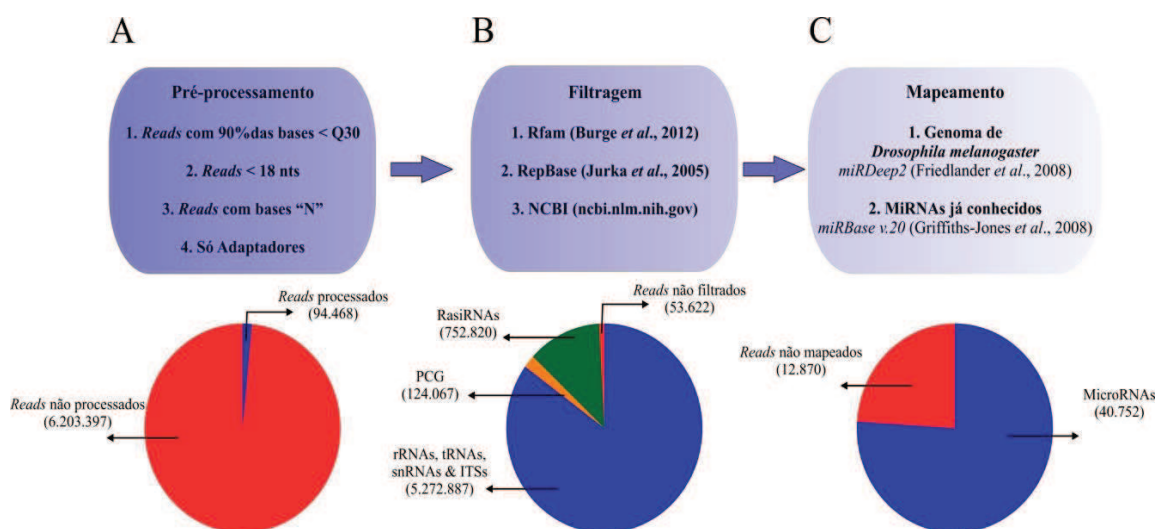


Figura 2. Resultados das etapas realizadas para a identificação de miRNAs a partir dos 6.203.397 *reads* gerados dos transcriptomas de pequenos RNAs das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*: (A) etapa de pré-processamento dos dados; (B) filtragem de ncRNAs, que não miRNAs, RasiRNAs e fragmentos de mRNA; (C) mapeamento dos *reads* resultantes das etapas anteriores no genoma de referência de *D. melanogaster* e no banco de dados de miRNA miRBase v.20 (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013).

Os *reads* sem similaridade nesses bancos foram então mapeados no genoma de *D. melanogaster* e no banco de miRNAs miRBase v.20 (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013). No total 40.752 *reads* foram mapeados nesses bancos de dados (Figura 2.C), apresentando um comprimento de sequência entre 19 e 25 nts (Figura. 3), com a maior parte das sequências entre 22 e 23 nts, representando a distribuição esperada para miRNAs (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011; Zhang et al., 2012).

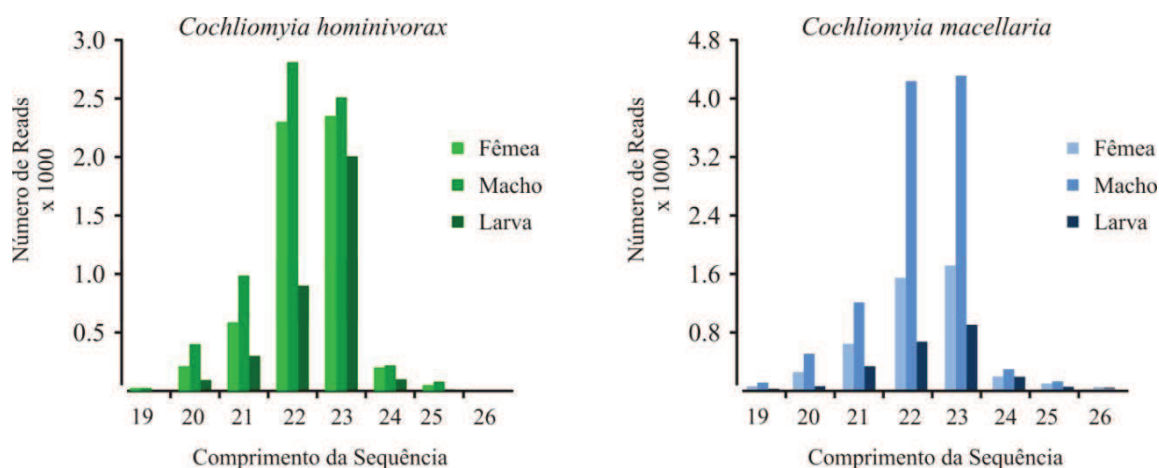


Figura 3. Distribuição do comprimento dos *reads* correspondentes a miRNAs mapeados no genoma de *D. melanogaster* e no banco de miRBase V.20 (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013).

A composição nucleotídica das sequências de miRNAs apresentou um viés de Uracila na primeira posição das sequências (Figura 4). Esse viés parece estar associado com o recrutamento do mRNA para o complexo de silenciamento miRISC (Felice et al., 2009). Já a região *seed* (2-8 nucleotídeos), responsável pelo pareamento entre o miRNA e o mRNA-alvo, apresentou uma alta proporção de Adenina e Citosina nas sequências de *C. hominivorax*, e de Adenina e Uracila em *C. macellaria*. A porção 3' das sequências também apresentou um viés de composição em Uracila, que parece estar associada com

contribuições indiretas para o mecanismo de regulação dos miRNAs, como sugerido por alguns autores (Ge et al., 2013).

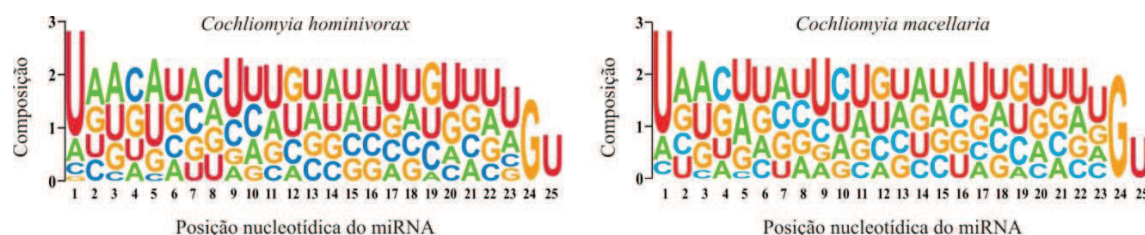


Figura 4. Logo da composição nucleotídica dos *reads* correspondentes a miRNAs mapeados no genoma de *D. melanogaster* e no banco de miRBase v.20 (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013).

No total, 40.752 *reads* foram identificados como miRNAs evolutivamente conservados (miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria* que já haviam sido descritos para outras espécies). Este resultado foi similar aos encontrados por outros autores (Marco et al., 2010; Barrero et al., 2011; Etebari et al., 2013; Ge et al., 2013) onde cerca de 0.2 a 10% dos *reads* dos transcriptomas de pequenos RNAs, gerados por plataformas de nova geração correspondem a miRNAs.

Os alinhamentos gerados pelas ferramentas mirDeep2 (Friedländer et al., 2008; Friedländer et al., 2012) e Blastn (Altschul et al., 1990), foram inspecionados manualmente para confirmar sua acurácia e conservação. Após anotar a contagem dos *reads* para cada miRNA identificado e retirar a redundância dos dados, foram identificados 80 e 78 miRNAs evolutivamente conservados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, respectivamente (Tabela 2 e Anexo A).

Tabela 2. Análise dos *reads* correspondentes a miRNAs evolutivamente conservados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*.

Espécie	Amostra	<i>Reads</i> *	<i>Reads</i> de miRNAs	miRNAs únicos (sem redundância)	Total de miRNAs únicos
<i>C. hominivorax</i>	Larva (3º Instar)	914.608	3.943	42	80
	Fêmea (24hrs)	1.007.375	6.715	66	
	Macho (24hrs)	976.677	9.193	66	
<i>C. macellaria</i>	Larva (3º Instar)	894.578	2.695	47	78
	Fêmea (24hrs)	1.308.980	5.234	55	
	Macho (24hrs)	1.101.179	12.972	65	
Total		6.203.397	40.752		

* Número de *reads* corresponde às sequências processadas.

Os repertórios parciais de miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria* assemelham-se com o número de miRNAs já descritos para a maior parte das espécies já investigadas de Hexapoda (Tabela 3). Até o momento, o repertório parcial de miRNAs de 31 espécies de Arthropoda já foram identificados e depositados no banco de dados miRBase, sendo que 25 destes correspondem a Hexapoda, o grupo de metazoários que possuem até o momento mais miRNAs identificados por espécie (Kozomara & Griffiths-Jones, 2013).

Na maior parte dessas espécies o número de miRNAs identificados variam entre 60 e 100, sendo *Bombix mori* (Lepidoptera), *Tribolium castaneum* (Coleoptera) e *D.melanogaster* (Diptera), as espécies com mais miRNAs identificados. No entanto, além destas espécies já possuem projetos genômicos em desenvolvimento (“*Silkworm genome database*”, desde 2002, “*Red Flour Beetle Genome Project*”, desde 2008, e “*Berkeley Drosophila Genome Project*”, primeiro genoma em 2000), elas representam espécies modelos amplamente utilizadas nos estudos de biologia molecular e evolução animal.

Tabela 3. Espécies de Hexapoda que já possuem miRNAs identificados e anotados

Taxonomia		Nº Descritos	
Ordem	Espécie	pré-miRNAs	miRNAs
Dictyoptera	<i>Blatella germanica</i> ^{1 2}	5	49 ³
Orthoptera	<i>Locusta migratoria</i> ²	7	14
Hemiptera	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	117	103
Hymenoptera	<i>Nasonia giraulti</i>	32	32
	<i>Nasonia longicornos</i>	28	28
	<i>Nasonia vitripennis</i>	53	53
	<i>Camponotus floridanus</i> ¹	nd	96
	<i>Harpegnathos saltator</i> ¹	nd	159
	<i>Apis mellifera</i>	218	222
Coleoptera	<i>Tribolium castaneum</i>	220	430
Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i>	489	567
	<i>Heliconius melpomene</i>	92	97
	<i>Manduca sexta</i>	94	89
Diptera	<i>Aedes aegypti</i>	101	124
	<i>Anopheles gambiae</i>	67	65
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	74	93
	<i>Mayetiola destructor</i> ^{1 2}	nd	89
	<i>Drosophila melanogaster</i>	238	426
	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	210	273
	<i>Drosophila simulans</i>	136	178
	<i>Drosophila persimilis</i>	75	69
	<i>Drosophila mojavensis</i>	71	71
	<i>Drosophila sechellia</i>	78	76
	<i>Drosophila grimshawi</i>	82	72
	<i>Drosophila ananassae</i>	76	75
	<i>Drosophila erecta</i>	81	78
	<i>Drosophila virilis</i>	74	74
	<i>Drosophila willistoni</i>	77	72
	<i>Drosophila yakuba</i>	80	75
	<i>Stomoxys calcitrans</i> ¹	nd	88

¹Espécies cujo repertório parcial de miRNAs ainda não foi depositados no banco miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013): *B.germanica* (Cristino et al., 2011); *C.floridamos* e *H.saltador* (Bonasio et al., 2010); *M. destructor* (Khajuria et al., 2013); *S.calcitrans* (Tuckow et al., 2013).

²Espécies cujo genoma ainda não foi descrito ou está sendo sequenciado, além de não estarem disponíveis genomas de espécies próximas.

³Número de miRNAs correspondentes a miRNAs evolutivamente conservados, Cristino et al., (2011) ainda reportaram 70 candidatos a miRNAs que são conservados em outras espécies e 170 miRNAs preditos apenas para *B.germanica* ainda não descritos na literatura.

3.3. Comparação dos repertórios de miRNAs evolutivamente conservados entre *C. hominivorax* e *C. macellaria*.

Dentre os 80 miRNAs identificados em *C. hominivorax*, 42 (52.5%) são compartilhados nos estágios de desenvolvimento larval e adulto, macho e fêmea (Figura 5.A), indicando que as diferentes fases do desenvolvimento investigadas compartilham mais da metade dos miRNAs identificados. Já os indivíduos adultos, macho e fêmea, compartilham 18 (22.5%) dos miRNAs encontrados neste trabalho. Resultados similares foram encontrados na comparação intraespecífica dos 78 miRNAs identificados em *C. macellaria* (Figura 5.B) com 45 (57.7%) e 12 (15.4%) miRNAs compartilhados entre todos estágios de desenvolvimento analisados e entre o macho e a fêmea, respectivamente.

Ainda assim, alguns miRNAs foram identificados apenas em um estágio específico de cada espécie, a maior parte destes associados ao desenvolvimento. Por exemplo, apenas na fase larval de ambas as espécies foram identificados os miRNAs miR-iab-4 e miR-iab-8, que estão envolvido na diferenciação do segmento torácico da larva que dará origem ao halteres em dípteros (Ronshaugen et al., 2005; Bender, 2008; Stark et al., 2008), e ao segundo par de asas em outros insetos (Hui et al., 2013).

As comparações interespecíficas também mostraram que a maior parte dos miRNAs identificados são compartilhados entre as diferentes fases de desenvolvimento investigadas de ambas as espécies, variando de 37 (47.43%) a 52 (65.8%) entre larvas e fêmeas e entre machos e fêmeas, respectivamente (Figura 5.C e 5.D).

Os resultados das comparações intraespecíficas e interespecíficas dos repertórios indicam que os miRNAs evolutivamente conservados apresentam uma expressão ubíqua nos estágios de desenvolvimento de uma espécie, enquanto apenas uma pequena parcela desses miRNAs desempenham um papel restrito a um estágio de desenvolvimento específico.

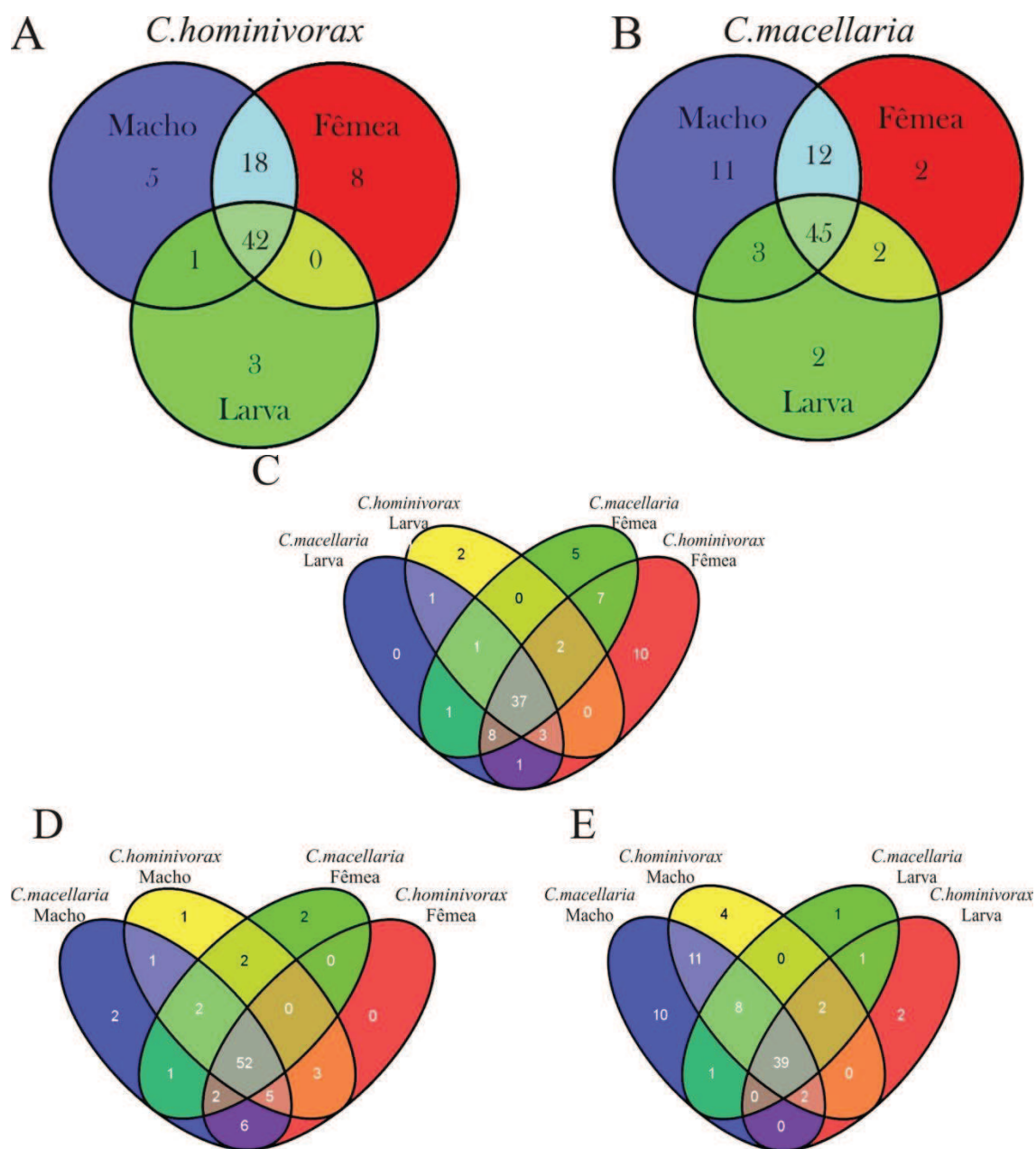


Figura 5. Diagramas de Venn dos miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria* nos diferentes estágios de desenvolvimento investigados. Comparações intraespecíficas entre os estágios de desenvolvimento e gêneros de (A) *C. hominivorax* e (B) *C. macellaria*. Comparações interespecíficas entre (C) larvas e fêmeas, (D) machos e fêmeas e (E) machos e larvas de ambas as espécies.

Ainda assim, analisando a porcentagem de *reads* gerados para cada miRNA, dado o tamanho total de *reads* mapeados (normalização RPT: “*reads per thousands*”), foi possível observar que apesar da maior parte dos miRNAs identificados nas espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria* serem ubiquamente expressos, eles apresentam diferentes quantidades relativas nas espécies e nos estágios de desenvolvimento investigados, provavelmente devido a expressão diferencial destes miRNAs (Figura 6).

Dentre os miRNAs mais abundantes em cada biblioteca, o miR-8-3p foi o mais representado na fase larval de ambas as espécies, correspondendo a cerca de 43.3% e 29.5% de todos os *reads* mapeados com miRNAs de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, respectivamente. Na fase adulta, o miR-956 foi o mais abundante variando entre 16.4% na fêmea de *C. hominivorax*, a 33.7% na fêmea de *C. macellaria*. O miR-8-3p também foi um dos miRNA mais abundante nesses estágios. A investigação mais abrangente da expressão diferencial dos miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria* será o tema abordado no Capítulo II dessa dissertação.

3.4. Predição de pre-miRNAs através de dados transcriptômicos e genômicos

Até o momento, os genomas de *C.hominivorax* e *C.macellaria* ainda não foram descritos, embora iniciativas nacionais (T.T.Torres, comunicação pessoal) e internacionais (Picard et al., 2012) estejam em andamento para este fim. No entanto, no final de 2013 alguns dados transcriptômicos dessas duas espécies foram gerados (A.C.M. Junqueira, comunicação pessoal) e puderam ser utilizados nesse trabalho para a predição dos pre-miRNAs destas espécies. Também foram utilizados os dados do transcriptoma de *C. hominivorax* previamente realizado no LabGEA (Carvalho et al., 2010), assim como os

dados preliminares do sequenciamento do genoma desta espécie que esta sendo realizado na Universidade de São Paulo (USP) (T.T. Torres, comunicação pessoal).

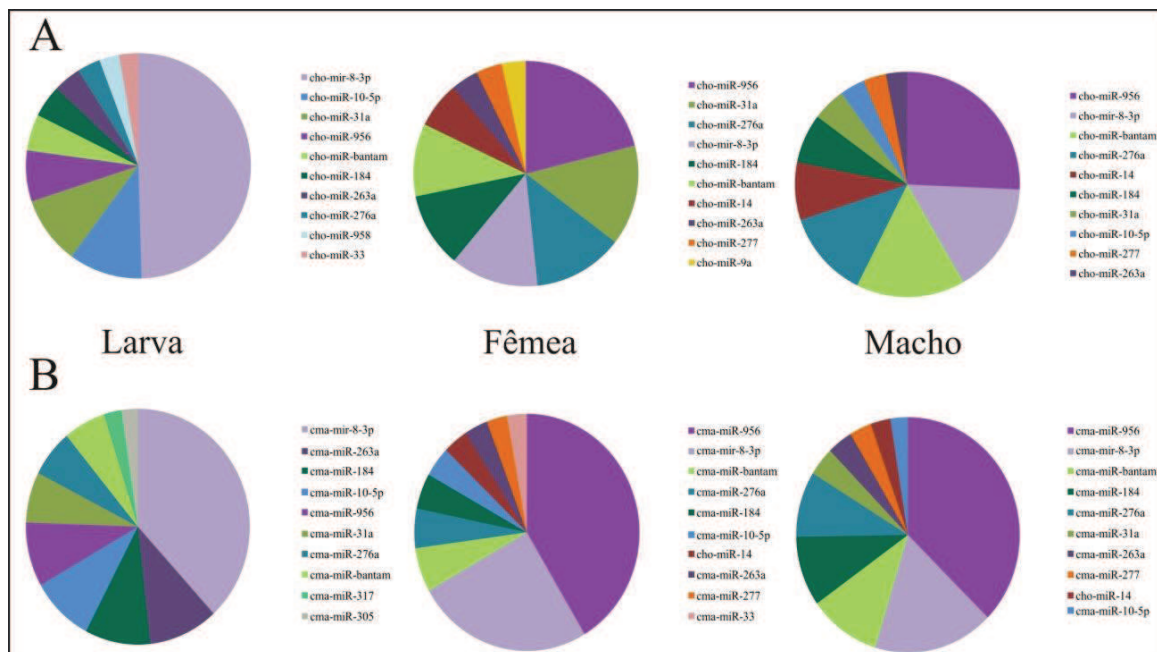


Figura 6. Top 10 dos miRNAs mais abundantes, dada a normalizada de RPT, em (A) *C. hominivorax* e (B) *C. macellaria* nos estágios de desenvolvimento investigados.

Utilizando esses dados foi possível prever 10 pre-miRNAs evolutivamente conservados (Figura 7: para mais informações sobre a metodologia ver Sessão 2.5), correspondentes aos miRNAs previamente identificados: cho/cma-miR-281-1-5p e 3p (identificados nos dados: G.cho. e T.cho1.); cho/cma-miR-184-5p e 3p (T.cma.); cho/cma-miR-8-5p e 3p (T.cma.); cho/cma-miR-1 (Tcho1. e T.cma.); cho/cma-miR-31a (T.cma.); cho/cma-miR-278-5p e 3p (T.cho1. e T.cho2.); cho/cma-miR-210 (G.cho.); cho/cma-miR-2a (T.cma. e T.carv.); cho/cma-miR-2b-5p e 3p (T.carv.); e cho/cma-miR-275-5p e 3p (T.cho1. e T.cho2.).

As estruturas preditas apresentaram todas as características esperadas para pre-miRNAs, como descrito por Ambros et al., (2004). Foram encontrados baixos valores de mínima energia livre do sistema, entre ΔG -24.30 Kcal/mol e ΔG -36.60 Kcal/mol, a sequência do miRNA maduro está presente em um dos “braços” da estrutura em grampo com mais de 60% de complementaridade com a sequência no outro “braço” da estrutura, e não há presença de grandes *bulges* internos. Quando os miRNAs das duas extremidades (3-p e 5-p) foram identificados no pre-miRNA, também é possível identificar os sítios de clivagem das enzimas Drosha e Dicer. As estruturas também apresentaram baixos níveis de entropia nas regiões em dupla fita da molécula, indicando que estes sítios possuem uma alta afinidade por sua região complementar na estrutura onde o miRNA maduro está localizado. Verificando a similaridade das sequências desses pre-miRNAs com de outras espécies de Hexapoda (Figura B1, Anexo B), foi possível observar que existe uma alta conservação nucleotídica nas regiões onde os miRNAs maduros estão alocados.

Uma segunda análise de predição de pre-miRNAs nos dados transcriptômicos e genômicos visou a identificação de miRNAs ainda não descritos na literatura utilizando os *reads* de pequenos RNAs que não puderam ser mapeados anteriormente (12.870 *reads*: Figura 2.C). Dentre todos os alinhamentos e as estruturas preditas, cinco apresentaram características de um pre-miRNAs (Figura 8).

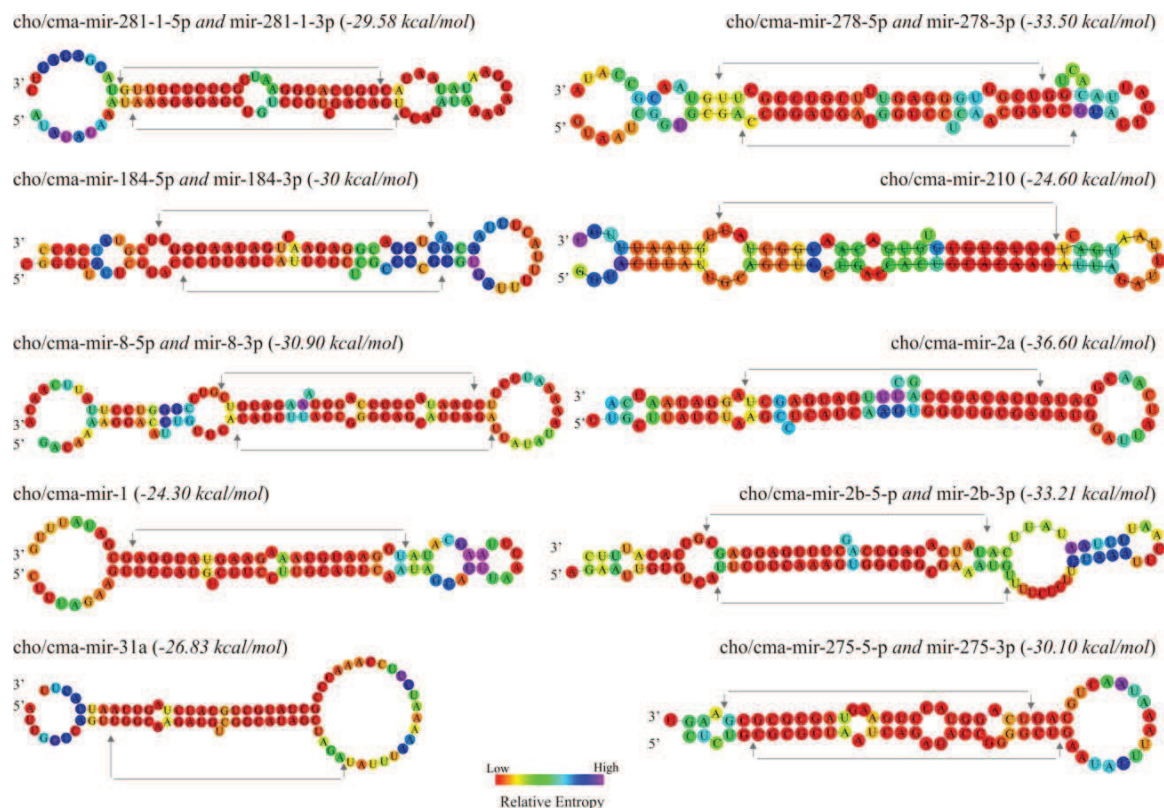


Figura 7. Estruturas secundárias preditas de pre-miRNAs em *C. hominivorax* (cho) e *C. macellaria* (cma) utilizando os miRNAs previamente identificados e os dados transcriptômicos e genômicos disponíveis para essas espécies.

Os candidatos 1 e 2 foram identificados em *C. hominivorax* nos dados G.cho, T.cho1 e 2 nas bibliotecas de fêmea e macho, respectivamente. Enquanto os candidatos 3 e 4 foram identificados na biblioteca de *C. hominivorax* em macho nos dados G.cho e T.cma. Os candidatos 5 e 6 foi predito em *C. macellaria* na biblioteca da fêmea nos dados T.cma. Esses miRNAs não foram validados neste estudo, por esse motivo eles não foram utilizados nas etapas subsequentes deste trabalho (capítulos II).

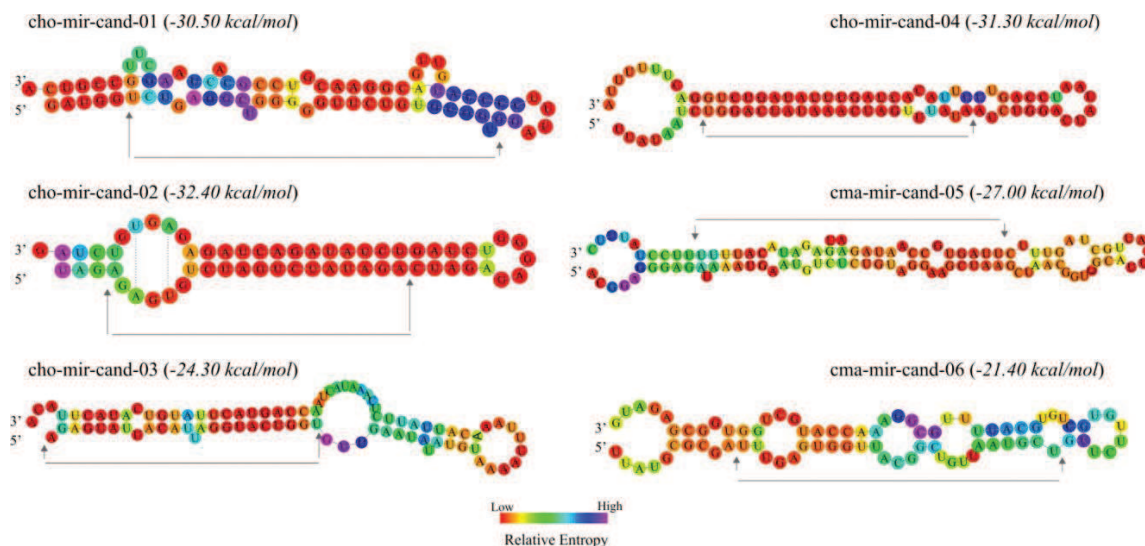


Figura 8. Estruturas secundárias preditas de pre-miRNAs em *C. hominivorax* (cho) e *C. macellaria* (cma) ainda não descritos na literatura utilizando os *reads* de pequenos RNAs não identificados anteriormente e os dados transcriptômicos e genômicos disponíveis para essas espécies.

4. Discussão

As tecnologias de sequenciamento de nova geração, aliadas ao avanço dos métodos implementados pela bioinformática, têm sido a metodologia mais eficaz na identificação de miRNAs de diversas espécies de insetos (Kozomara & Griffiths-Jones, 2013) incluindo espécies não modelos (Gomez-Orte & Belles, 2009; Wei et al., 2009; Bonasio et al., 2010; Barrero et al., 2011; Cristino et al., 2011; Ge et al., 2013; Tuckow et al., 2013). As plataformas de sequenciamento massivo (*high-throughput*) possibilitam a confirmação dos miRNAs preditos *in silico*, principalmente de espécies cujo o genoma já está disponível, e a descoberta *de novo* de miRNAs em espécies não modelos, geralmente sem dados genômicos (Belles et al., 2012). Já as ferramentas de bioinformática mais utilizadas baseiam-se na identificação de miRNAs a partir da busca por homologia (Wang et al., 2005; Friedländer et al., 2008), algoritmos baseados em genômica comparativa (Loots, 2008) e baseados em aprendizagem (Jiang et al., 2007).

Dentre essas metodologias, o presente estudo utilizou o sequenciamento de nova geração e a identificação de miRNAs a partir da busca por homologia em espécies filogeneticamente próximas. Seis transcriptomas de pequenos RNAs foram sequenciados para as fases de desenvolvimento larval (terceiro instar) e adulta (machos e fêmeas) das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria* utilizando-se a plataforma MiSeq-Illumina. Por meio da ferramenta miRDeep (Friedländer et al., 2008), um dos métodos mais eficazes na identificação de miRNAs (Yang et al., 2010), foi possível identificar 84 miRNAs evolutivamente conservados nessas espécies.

A metodologia computacional utilizada neste trabalho se baseia em três informações *a priori*, sendo elas: os dados do sequenciamento de pequenos RNAs; o genoma de referência da espécie analisada e; os miRNAs (precursores e maduros) já descritos para outras espécies. Uma vez que os genomas dessas espécies ainda não foram completamente sequenciados e descritos, a identificação de miRNAs dessas espécies se torna um processo completamente baseado na busca por miRNAs ortólogos em espécies filogeneticamente próximas.

Ainda assim, foram identificados 80 e 78 miRNAs evolutivamente conservados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, respectivamente (do total de 84 miRNAs únicos identificados). Interessantemente, os miRNAs identificados possuem uma alta conservação com os miRNAs descritos para o grupo *Drosophila* (Figura B1). Esses resultados podem ser um reflexo da rápida diversificação de *Schizophora* (65 Ma) e das relações filogenéticas próximas entre *drosophilídeos* e *califorídeos* (Wiegmann et al., 2011; Junqueira et al., artigo em preparação). Além disso, os repertórios de miRNAs identificados nas espécies investigadas foram quantitativamente semelhantes aos descritos por outros trabalhos, inclusive de espécies que possuem os genomas sequenciados.

No entanto, uma vez que os miRNAs são expressos de forma temporal e espacial durante as diferentes fases de desenvolvimento, metamorfose e maturação em artrópodes (Aboobaker et al., 2005; Chen et al., 2009; Gomez-Orte & Belles, 2009; Barrero et al., 2011; Rubio et al., 2012; Liang et al., 2013) é possível dizer que os miRNAs identificados neste trabalho representam o repertório parcial de miRNAs dessas espécies. Ainda assim, esses dados demonstraram que o sequenciamento através da plataforma MiSeq-Illumina e a metodologia adotada na identificação de miRNAs foi apropriada para identificar grande parte dos miRNAs evolutivamente conservados destas espécies, levando em consideração o número de miRNAs descritos para outras espécies de Hexapoda (Tabela 3).

As comparações intraespecíficas e interespecíficas dos miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, sugerem que os repertórios de miRNAs evolutivamente conservados das duas espécies são muito semelhantes, possuindo uma expressão ubíqua nos estágios de desenvolvimento investigados. Esse resultado está de acordo com as observações feitas por outros autores (Jagadeeswaran et al., 2010; Jia et al., 2010; Barrero et al., 2011; Wu et al., 2013), onde miRNAs evolutivamente conservados possuem funções essenciais para as espécies, apresentando uma expressão ubíqua nos diferentes estágios de desenvolvimento, enquanto miRNAs únicos de cada espécie provavelmente desempenham um papel restrito a um estágio de desenvolvimento específico e fazem parte da história evolutiva única dessas espécies.

Embora ubiquamente expressos, os miRNAs identificados apresentam diferentes quantidades relativas de *reads* gerados nas espécies e nos estágios de desenvolvimento investigados (Figura 6). Essas diferenças podem estar associadas à expressão diferencial destes miRNAs, que será melhor abordada no Capítulo II dessa dissertação. Ainda assim, os miRNAs mais abundantes nas larvas, fêmeas e machos adultos, são em sua maioria os

mesmos quando estes estágios de desenvolvimento são comparados entre as espécies, novamente indicando que esses miRNAs ubiquamente expressos possuem um papel fundamental no desenvolvimento das espécies.

Enquanto os genomas dessas espécies ainda não estiverem disponíveis, outros recursos serão necessários para investigações mais detalhadas acerca de seus miRNAs. Dentre esses recursos, o uso de transcriptomas na predição da estrutura em grampo do pre-miRNAs é possível devido ao fato dos miRNAs precursores serem transcritos pela RNA-Polimerase II e/ou III (Lee et al., 2004; Borchert et al., 2006). Embora estas sequências constituam a menor parcela de um transcriptoma, sendo transcritos extremamente raros quando comparados a rRNAs e mRNAs, Jia et al., (2010) foram capazes de predizer 86 miRNAs de 30 espécies de insetos utilizando apenas dados de transcriptoma disponível para elas.

Sendo assim, a última análise realizada neste Capítulo, compreendeu a predição das estruturas precursoras dos miRNAs evolutivamente conservados identificados, assim como de miRNAs ainda não descritos na literatura. Para esse fim, foram utilizados dados parciais do genoma de *C.hominivorax* (G.cho: T.T. Torres, comunicação pessoal), e os dados de transcriptoma disponíveis para *C. hominivorax* e *C. macellaria* (T.cho1., T.cho2. e T.cma: A.C.M. Junqueira, comunicação pessoal, e T.carv: Carvalho et al., 2010). Utilizando estes dados foram preditos 10 pre-miRNAs evolutivamente conservados, a partir dos miRNAs maduros identificados anteriormente, e 6 pre-miRNAs ainda não descritos na literatura. Dentre os pre-miRNAs evolutivamente conservados que puderam ser preditos, encontram-se o miR-8, miR-184 e miR-31a, que também foram alguns dos miRNAs mais frequentes nos transcriptomas de pequenos RNAs de *C. hominivorax* e *C. macellaria*.

A análise de similaridade dos pre-miRNAs evolutivamente conservados preditos para essas espécies com os descritos para as espécies *D.melanogaster* e *D.pseudoobscura* (Diptera: Brachycera), *C.quinquefasciatus* (Diptera: Nematocera), *B.mori* (Lepidoptera) e *A.mellifera* (Hymenoptera), mostrou que os sítios correspondentes a sequência madura dos miRNAs são altamente conservadas em todas as espécies analisadas, enquanto que nos sítios adjacentes na região 3' e 5' dos pre-miRNAs essa conservação diminui (Figura B1). Em resumo, a região do miRNA maduro corresponde a pareamentos na estrutura secundária em forma de grampo dos pre-miRNAs. Normalmente em ncRNAs estruturais é esperado haver menos variações em regiões associadas a dupla-fita na estrutura secundária do RNA (Fang et al., 2013). Por outro lado, as regiões que permanecem em fita simples nas estruturas secundárias dos pre-miRNAs (e.g. o *loop* terminal) tendem a apresentar mais variações (ver grau de entropia associado aos pre-miRNAs nas Figuras 7 e 8). Ainda assim essas regiões adjacentes aos miRNAs são mais conservadas entre as espécies de Calliphoridae e Drosophilidae do que nas outras espécies. A alta conservação observada na sequência dos miRNAs maduros, assim como os baixos valores de mínima energia livre das estruturas, estão associados com a formação do grampo na estrutura secundária do pre-miRNA, uma das mais estáveis entre os ncRNAs (Ni et al., 2010). A caracterização da conservação dos miRNAs maduros identificados, neste capítulo, será apresentada no Capítulo II dessa dissertação.

5. Referências

- Aboobaker, A.A., Tomancak, P., Patel, N., Rubin, G.M., Lai, E.C., 2005. *Drosophila* microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18017–18022.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-jones, S.A.M., 2004. A uniform system for microRNA annotation A uniform system for microRNA annotation 277–279.
- Barrero, R.A., Keeble-Gagnère, G., Zhang, B., Moolhuijzen, P., Ikeo, K., Tatenò, Y., Gojobori, T., Guerrero, F.D., Lew-Tabor, A., Bellgard, M., 2011. Evolutionary conserved microRNAs are ubiquitously expressed compared to tick-specific miRNAs in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics* 12, 328.
- Belles, X., Cristino, A.S., Tanaka, E.D., Rubio, M., Piulachs, M.D., 2012. Insect MicroRNAs: From Molecular Mechanisms to Biological Roles. In: *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier, pp. 30–56.
- Bender, W., 2008. MicroRNAs in the *Drosophila* bithorax complex. *Genes Dev.* 22, 14–19.
- Bonasio, R., Zhang, G., Ye, C., Mutti, N.S., Fang, X., Qin, N., Donahue, G., Yang, P., Li, Q., Li, C., Zhang, P., Huang, Z., Berger, S.L., Reinberg, D., Wang, J., Liebig, J., 2010. Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science* 329, 1068–1071.
- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101.
- Bryant, B., Macdonald, W., Raikhel, A.S., 2010. microRNA miR-275 is indispensable for blood digestion and egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22391–8.
- Burge, S.W., Daub, J., Eberhardt, R., Tate, J., Barquist, L., Nawrocki, E.P., Eddy, S.R., Gardner, P.P., Bateman, A., 2013. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Res.* 41, D226–32.
- Carvalho, R.A., Azeredo-Espin, A.M.L., Torres, T.T., 2010. Deep sequencing of New World screw-worm transcripts to discover genes involved in insecticide resistance. *BMC Genomics* 11, 695.
- Chen, X., Li, Q., Wang, J., Guo, X., Jiang, X., Ren, Z., Weng, C., Sun, G., Wang, X., Liu, Y., Ma, L., Chen, J.-Y., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C.-Y., 2009. Identification and characterization of novel amphioxus microRNAs by Solexa sequencing. *Genome Biol.* 10, R78.
- Cristino, A.S., Tanaka, E.D., Rubio, M., Piulachs, M.-D., Belles, X., 2011. Deep sequencing of organ- and stage-specific microRNAs in the evolutionarily basal insect *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *PLoS One* 6, e19350.
- Etebari, K., Hussain, M., Asgari, S., 2013. Identification of microRNAs from *Plutella xylostella* larvae associated with parasitization by *Diadegma semiclausum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 309–318.
- Fang, Z., Du, R., Edwards, A., Flemington, E.K., Zhang, K., 2013. The Sequence Structures of Human MicroRNA Molecules and Their Implications. *PLoS One* 8.
- Felice, K.M., Salzman, D.W., Shubert-Coleman, J., Jensen, K.P., Furneaux, H.M., 2009. The 5' terminal uracil of let-7a is critical for the recruitment of mRNA to Argonaute2. *Biochem. J.* 422, 329–341.
- Friedländer, M.R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., Knespel, S., Rajewsky, N., 2008. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep 26, 407–415.

- Friedländer, M.R., Mackowiak, S.D., Li, N., Chen, W., Rajewsky, N., 2012. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* 40, 37–52.
- Ge, X., Zhang, Y., Jiang, J., Zhong, Y., Yang, X., Li, Z., Huang, Y., Tan, A., 2013. Identification of microRNAs in *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* based on deep sequencing and homology analysis. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1–15.
- Gomez-Orte, E., Belles, X., 2009. MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolous insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21678–82.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34, D140–4.
- Hui, J.H.L., Marco, A., Hunt, S., Melling, J., Griffiths-Jones, S., Ronshaugen, M., 2013. Structure, evolution and function of the bi-directionally transcribed iab-4/iab-8 microRNA locus in arthropods. *Nucleic Acids Res.* 41, 3352–61.
- Jagadeeswaran, G., Zheng, Y., Sumathipala, N., Jiang, H., Arrese, E.L., Soulages, J.L., Zhang, W., Sunkar, R., 2010. Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. *BMC Genomics* 11, 52.
- Jia, Q., Lin, K., Liang, J., Yu, L., Li, F., 2010. Discovering conserved insect microRNAs from expressed sequence tags. *J. Insect Physiol.* 56, 1763–9.
- Jiang, P., Wu, H., Wang, W., Ma, W., Sun, X., Lu, Z., 2007. MiPred: classification of real and pseudo microRNA precursors using random forest prediction model with combined features. *Nucleic Acids Res.* 35, W339–W344.
- Jin, H., Kim, V.N., Hyun, S., 2012. Conserved microRNA miR-8 controls body size in response to steroid signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.*
- Jurka, J., Kapitonov, V. V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., Walichiewicz, J., 2005. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet. Genome Res.* 110, 462–467.
- Karres, J.S., Hilgers, V., Carrera, I., Treisman, J., Cohen, S.M., 2007. The Conserved microRNA MiR-8 Tunes Atrophin Levels to Prevent Neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell* 131, 136–145.
- Kent, W.J., 2002. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* 12, 656–664.
- Khajuria, C., Williams, C.E., El Bouhssini, M., Whitworth, R.J., Richards, S., Stuart, J.J., Chen, M.-S., 2013. Deep sequencing and genome-wide analysis reveals the expansion of MicroRNA genes in the gall midge *Mayetiola destructor*. *BMC Genomics* 14, 187.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 39, D152–7.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2013. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 1–6.
- Langmead, B., 2010. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinformatics* Chapter 11, Unit 11.7.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.
- Liang, P., Feng, B., Zhou, X., Gao, X., 2013. Identification and developmental profiling of microRNAs in diamondback moth, *Plutellaxylostella* (L.). *PLoS One* 8, e78787.
- Loots, G.G., 2008. Genomic identification of regulatory elements by evolutionary sequence comparison and functional analysis. *Adv. Genet.* 61, 269–293.

- Marco, A., Hui, J.H.L., Ronshaugen, M., Griffiths-Jones, S., 2010. Functional shifts in insect microRNA evolution. *Genome Biol. Evol.* 2, 686–696.
- Marrone, A.K., Edeleva, E. V., Kucherenko, M.M., Shcherbata, H.R., 2012. Dg-Dys-Syn1 signaling in *Drosophila* regulates the microRNA profile. *BMC Cell Biol.*
- Ni, M., Shu, W., Bo, X., Wang, S., Li, S., 2010. Correlation between sequence conservation and structural thermodynamics of microRNA precursors from human, mouse, and chicken genomes. *BMC Evol. Biol.* 10, 329.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Riley, K.M., Hodgson, J., Schweisguth, F., Hirose, S., Jaynes, J.B., Brock, H.W., Mazo, A., 2006. Transcription of bxd Noncoding RNAs Promoted by Trithorax Represses Ubx in cis by Transcriptional Interference. *Cell* 127, 1209–1221.
- Picard, C.J., Johnston, J.S., Tarone, A.M., 2012. Genome Sizes of Forensically Relevant Diptera. *J. Med. Entomol.*
- Ronshaugen, M., Biemar, F., Piel, J., Levine, M., Lai, E.C., 2005. The *Drosophila* microRNA *iab-4* causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. *Genes Dev.* 19, 2947–2952.
- Rubio, M., de Horna, A., Belles, X., 2012. MicroRNAs in metamorphic and non-metamorphic transitions in hemimetabolous insect metamorphosis. *BMC Genomics* 13, 386.
- Sedis, I., 2011. Order Diptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness* 1758, 222–229.
- Stark, A., Bushati, N., Jan, C.H., Kheradpour, P., Hodges, E., Brennecke, J., Bartel, D.P., Cohen, S.M., Kellis, M., 2008. A single Hox locus in *Drosophila* produces functional microRNAs from opposite DNA strands. *Genes Dev.* 22, 8–13.
- Tuckow, A.P., Temeyer, K.B., Olafson, P.U., León, A.P. De, Olafson, P.I.A.U., Leo, R.E.Z.D.E., 2013. Discovery of MicroRNAs of the Stable Fly (Diptera : Muscidae) by High-Throughput Sequencing Discovery of MicroRNAs of the Stable Fly (Diptera : Muscidae) by High-Throughput Sequencing 50, 925–930.
- Vargas, M.E., Espin, A.M., 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochem. Genet.* 33, 237–256.
- Wang, X., Zhang, J., Li, F., Gu, J., He, T., Zhang, X., Li, Y., 2005. MicroRNA identification based on sequence and structure alignment. *Bioinformatics* 21, 3610–3614.
- Wei, Y., Chen, S., Yang, P., Ma, Z., Kang, L., 2009. Characterization and comparative profiling of the small RNA transcriptomes in two phases of locust. *Genome Biol.* 10, R6.
- Wheeler, B.M., Heimberg, A.M., Moy, V.N., Sperling, E. a, Holstein, T.W., Heber, S., Peterson, K.J., 2009. The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol. Dev.* 11, 50–68.
- Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.-W., Lambkin, C., Bertone, M. a, Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Pape, T., Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S.N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G.E., Thompson, F.C., Grimaldi, D. a, Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K., 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5690–5.

- Winnebeck, E.C., Millar, C.D., Warman, G.R., 2010. Why does insect RNA look degraded? *J. Insect Sci.* 10, 159.
- Wu, W., Ren, Q., Li, C., Wang, Y., Sang, M., Zhang, Y., Li, B., 2013. Characterization and comparative profiling of MicroRNAs in a sexual dimorphism insect, *Eupolyphaga sinensis* Walker. *PLoS One* 8, e59016.
- Yang, J.-H., Shao, P., Zhou, H., Chen, Y.-Q., Qu, L.-H., 2010. deepBase: a database for deeply annotating and mining deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 38, D123–D130.
- Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829.
- Zhang, X., Zheng, Y., Jagadeeswaran, G., Ren, R., Sunkar, R., Jiang, H., 2012. Identification and developmental profiling of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 381–395.

Capítulo I

Anexo A

Tabela A1. Lista dos miRNAs evolutivamente conservados identificados em *Cochliomyia hominivorax*. Os códigos de acesso do miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006) referem-se aos miRNAs ortólogos encontrados no genoma de *Drosophila melanogaster*. Outros acessos do são mostrados para os miRNAs sem homologia com *D. melanogaster*.

miRNAs identificados		Número de acesso do miRBase
miR-ID	Sequência	<i>D.melanogaster</i>
cho-bantam-3p	UGAGAUCAUUUUGAAAGCUGAUU	MIMAT0000365
cho-bantam-5p	CCGGUUUUCGAUUUGAUUUGACU	MIMAT0020823
cho-let-7	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU	MIMAT0000396
cho-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGGAG	MIMAT0000105
cho-miR-100	AACCCGUAAAUCCGAACUUGUG	MIMAT0000357
cho-miR-1000	AUAUUGUCCUGUCACAGCAGUA	MIMAT0005520
cho-miR-10-3p	CAAAUUCGGUUCUAGAGAGGUUU	MIMAT0012531
cho-miR-10-5p	ACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUU	MIMAT0000115
cho-miR-11	CAUCACAGUCUGAGUUCUUGCU	MIMAT0000116
cho-miR-124	UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA	MIMAT0000351
cho-miR-125	UCCCUGAGACCCUAAUUGUGA	MIMAT0000397
cho-miR-12	AGAGUAUUACAUAAGGUACUGGU	MIMAT0000117
cho-miR-133	UUGGUCCCCUUAACAGCUGU	MIMAT0000340
cho-miR-13b	UAUCACAGCCAUUUUGACGAGUU	MIMAT0000119
cho-miR-14	UCAGUCUUUUUCUCUCUCCUUAU	MIMAT0000120
cho-miR-184-3p	UGGACGGAGAACUGAUAAAGGC	MIMAT0000331
cho-miR-184-5p	CCUUAUCAUUCUCUCGCCCCG	MIMAT0000330
cho-miR-190	AGAUUGUUUGAUUUUCUUGGUUG	MIMAT0005467
cho-miR-193	UACUGGCCUACUAAGUCCCA	MIMAT0005468
cho-miR-210	CUUGUGCGUGUGACAGCGGCU	MIMAT0000355
cho-miR-252	CUAAGUACUAGUGCCGCAGGAG	MIMAT0005516
cho-miR-263a	AAUGGCACUGGAAGAAUUCACGGG	(MIMAT0014289 : aae-miR-263a)
cho-miR-263b	CUUGGCACUGGGAGAAUUCAC	MIMAT0000362
cho-miR-274	UUUGUGACCGACACUAAACGGGU	MIMAT0000332
cho-miR-275-3p	UCAGGUACCUGAAGUAGCGCGCG	MIMAT0000333
cho-miR-275-5p	CGCGCUAAUCAGAGACCGGGGCU	MIMAT0020801
cho-miR-276a	UAGGAACUUCAUACCGUGCUCU	MIMAT0000337
cho-miR-276b	UAGGAACUUAUACCGUGCUCU	MIMAT0000354
cho-miR-277	UAAAUGCACUAUCUGGUACGAC	MIMAT0000338
cho-miR-278-3p	UCGGUGGGACUUUCGUCCGUUU	MIMAT0000339
cho-miR-278-5p	CCGGAUGAUGGUCCUCAACGACC	MIMAT0020805
cho-miR-279	UGACUAGAUCACACUCAUUAUAA	MIMAT0000341
cho-miR-281-1-3p	UGUCAUGGAAUUGCUCUCUUUG	MIMAT0000345
cho-miR-281-1-5p	AAGAGAGCTGTCCGTCGACAGT	MIMAT0000344
cho-miR-281-2	AAGAGAGCUAUCUGUCGACAGU(c)	MIMAT0000349
cho-miR-282	UAGCCUCUACUAGGCUUUGUCU	MIMAT0000346
cho-miR-283	AAAUACAGCUGGUAAUUCUGG	MIMAT0000347

Tabela A1. Continuação.

miR-ID	miRNAs identificados Sequência	Número de acesso do miRBase <i>D.melanogaster</i>
cho-miR-284	GUCAGCAACUUGAUUCCAGCAA	MIMAT0000348
cho-miR-285	UAGCACCAUUCGAAAUCAGUGC	MIMAT0000356
cho-miR-2a-2	UCACAGCCAGCUUUGAUGAGCU	MIMAT0000106
cho-miR-2a	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGC	MIMAT0000106
cho-miR-2b-3p	UAUCACAGCCAGCUUUGAGGAGC	MIMAT0000107
cho-miR-2b-5p	UUCUUCAAAGUGGCUGCGAAAUG	(MIMAT0019096 : tca-miR-2b-5p)
cho-miR-305	AUUGUACUUAUCAGGUGCUCUG	MIMAT0000391
cho-miR-305-3p	CGGCACAUGUUGAAGUACAUAUA	MIMAT0020827
cho-miR-306	UCAGGUACUUAGUGACUCUCAA	MIMAT0000393
cho-miR-307a	UCACAACCUCUUUGAGUGAGCU	MIMAT0000398
cho-miR-315	UUUUGAUUGUUGCUCAGAAAGC	MIMAT0000407
cho-miR-316	UGUCUUUUUCCGCUUACUGGCG	MIMAT0000408
cho-miR-317	UGAACACAGCUGGUGGUAUCUCAGU	(MIMAT0001488 : ame-miR-317)
cho-miR-318	UCACUGGGCUUUGUUUAUCUC	MIMAT0000410
cho-miR-31a	UGGCAAGAUGUCGGCAUAGCUGA	MIMAT0000400
cho-miR-31b	UGGCAAGAUGUCGGAAUAGCUGA	MIMAT0000389
cho-miR-33	GUGCAUUGUAGUCGCAUUGUC	MIMAT0000342
cho-miR-34	UGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUGUG	MIMAT0000350
cho-miR-375	UUUGUUCGUUUGGCUUAAGUUA	MIMAT0005472
cho-miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUU	MIMAT0000112
cho-miR-8-3p	UAAUACUGUCAGGUAAAGAUGUC	MIMAT0000113
cho-miR-8-5p	CAUCUUACCGGGCAGCAUUAGA	MIMAT0020791
cho-miR-927	UUUAGAAUCCUACGCUUUACC	MIMAT0005501
cho-miR-929	AAAUUGACUCUAGUAGGGAGUC	MIMAT0020892
cho-miR-92b	AAUUGCACUAGUCCCGGCCUGU	MIMAT0000358
cho-miR-932	UCAAUUCCGUAGUGCAUUGCAGU	MIMAT0005479
cho-miR-956	UUUCGAGACCACUCUAAUCCAAU	MIMAT0005469
cho-miR-957	UGAAACCGUCCAAAACUGAGGC	MIMAT0005470
cho-miR-958	UGAGAUUCUUCUUAUUCUACUUU	MIMAT0005471
cho-miR-970	UCAUAAGACACACGCGGCUAU	MIMAT0005486
cho-miR-971	UUGGUGUUACUUCUACAGUGA	MIMAT0005487
cho-miR-980	UAGCUGCCUUGUGAAGGGCUU	MIMAT0005496
cho-miR-981	UUCGUUGUCGACGAAACCUGCA	MIMAT0005497
cho-miR-987	UAAAGUAAAUAGUCUGGAUUGAUG	MIMAT0005504
cho-miR-993	GAAGCUCGUCUCUACAGGUUAUCU	MIMAT0005512
cho-miR-995	UAGCACCACAUGAUUCGGCUU	MIMAT0005514
cho-miR-996	UGACUAGAUUUAUGCUCGUCU	MIMAT0005515
cho-miR-998	ACUGAAUUCUCGUGGGUCUGCA	MIMAT0020898
cho-miR-999	UGUUAACUGUAAGACUGUGUCU	MIMAT0005519
cho-miR-9a	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	MIMAT0000114
cho-miR-9b	UCUUUGGUUAUUUAGCUGUAU	MIMAT0000395
cho-miR-9c	UCUUUGGUUAUUUAGCUGUAUGA	MIMAT0000392
cho-miR-iab-4	ACGUUAUCUGAAUGUAUCCUGA	MIMAT0000412

Tabela A2. Lista dos miRNAs evolutivamente conservados identificados em *Cochliomyia macellaria*. Os códigos de acesso do miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006) referem-se aos miRNAs ortólogos encontrados no genoma de *Drosophila melanogaster*. Outros acessos do são mostrados para os miRNAs sem homologia com *D. melanogaster*.

miRNAs identificados		Número de acesso do miRBase
miR-ID	Sequência	<i>D.melanogaster</i>
cma-bantam-3p	UGAGAUCAUUUUGAAAGCUGAUU	MIMAT0000365
cma-bantam-5p	CCGUUUUUCGAUUUGAUUUGACU	MIMAT0020823
cma-let-7	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU	MIMAT0000396
cma-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGGAG	MIMAT0000105
cma-miR-100	AACCCGUAAAUCCGAACUUGUG	MIMAT0000357
cma-miR-1000	AUAUUGUCCUGUCACAGCAGUA	MIMAT0005520
cma-miR-10-3p	CAAAUUCGGUUCUAGAGAGGUUU	MIMAT0012531
cma-miR-10-5p	ACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUU	MIMAT0000115
cma-miR-11	CAUCACAGUCUGAGUUCUUGCU	MIMAT0000116
cma-miR-124	UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA	MIMAT0000351
cma-miR-125	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	MIMAT0000397
cma-miR-12	AGAGUAUUACAUAUAGGUACUGGU	MIMAT0000117
cma-miR-133	UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU	MIMAT0000340
cma-miR-13b	UAUCACAGCCAUUUUGACGAGUU	MIMAT0000119
cma-miR-14	UCAGUCUUUUUCUCUCUCCUAU	MIMAT0000120
cma-miR-184-3p	UGGACGGAGAACUGAUAAAGGCG	MIMAT0000331
cma-miR-184-5p	CCUUAUCAUUCUCUCGCCCCG	MIMAT0000330
cma-miR-190	AGAUUGUUUGAUUUCUUGGUUG	MIMAT0005467
cma-miR-193	UACUGGCCUACUAAGUCCCAAC	MIMAT0005468
cma-miR-210	CUUGUGCGUGUGACAGCGGCUA	MIMAT0000355
cma-miR-252	CUAAGUACUAGUGCCGCAGGAG	MIMAT0005516
cma-miR-263a	AAUGGCACUGGAAGAAUUCACGGG	MIMAT0000319
cma-miR-263b	CUUGGCACUGGGAGAAUUCACAG	MIMAT0000362
cma-miR-274	UUUGUGACCGACACUAACGGGU	MIMAT0000332
cma-miR-275-3p	UCAGGUACCUGAAGUAGCGCGCG	MIMAT0000333
cma-miR-275-5p	CGCGCUAAUCAGAGACCGGGGCU	MIMAT0020805
cma-miR-276a	UAGGAACUUCAUACCGUGCUCU	MIMAT0000337
cma-miR-276b	UAGGAACUUAUACCGUGCUCU	MIMAT0000354
cma-miR-277	UAAAUGCACUAUCUGGUACGAC	MIMAT0000338
cma-miR-278-3p	UCGGUGGGACUUUCGUCCGUUU	MIMAT0000339
cma-miR-279	UGACUAGAUCACACUCAUUA	MIMAT0000341
cma-miR-281-1-5p	AAGAGAGCUGUCCGUCGACAGUC	MIMAT0000344
cma-miR-281-2	AAGAGAGCUAUCUGUCGACAGU(c)	MIMAT0000349
cma-miR-281	UGUCAUGGAAUUGCUCUCUUUG	MIMAT0000345
cma-miR-282	UAGCCUCUACUAGGCUUUGUCU	MIMAT0000346
cma-miR-283	AAUAUCAGCUGGUAAUUCUGG	MIMAT0000347
cma-miR-2a	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGC	MIMAT0000106

Tabela A2. Continuação.

miRNAs identificados		Número de acesso do miRBase
miR-ID	Sequência	<i>D.melanogaster</i>
cma-miR-2b-3p	UAUCACAGCCAGCUUUGAGGAGC	MIMAT0000107
cma-miR-305	AUUGUACUUCaucAGGUGCUCUG	MIMAT0000391
cma-miR-306	UCAGGUACUUGAGACUCUCUA	MIMAT0000393
cma-miR-307a	UCACAACCUCUUGAGUGAGCU	MIMAT0000398
cma-miR-311-3p	UAUUGCACAAUCCCCGGCCUGU	MIMAT0000403
cma-miR-315	UUUUGAUUGUUGCUCAGAAAGC	MIMAT0000407
cma-miR-316	UGUCUUUUUCCGCUUACUGGCG	MIMAT0000408
cma-miR-317	UGAACACAGCUGGUGGUAUCUCAGU	(MIMAT0001488 : ame-miR-317)
cma-miR-318	UCACUGGGCUUUGUUUAUCUC	MIMAT0000410
cma-miR-31a	UGGCAAGAUGUCGGCAUAGCUGA	MIMAT0000400
cma-miR-31b	UGGCAAGAUGUCGGAAUAGCUGA	MIMAT0000389
cma-miR-33	GUGCAUUGUAGUCGCAUUGUC	MIMAT0000342
cma-miR-34	UGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUGUG	MIMAT0000350
cma-miR-375	UUUGUUCGUUUGGCUUAAGUUA	MIMAT0005472
cma-miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUU	MIMAT0000112
cma-miR-8-3p	UAAUACUGUCAGGUAAAAGAUUC	MIMAT0000113
cma-miR-8-5p	CAUCUUACCGGGCAGCAUUGA	MIMAT0020791
cma-miR-927	UUUAGAAUCCUACGCUUACC	MIMAT0005501
cma-miR-929	AAAUUGACUCUAGUAGGGAGUC	MIMAT0020892
cma-miR-92b	AAUUGCACUAGUCCCGGCCUGU	MIMAT0000358
cma-miR-932	UCAAUCCGUAGUGCAUUGCAGU	MIMAT0005479
cma-miR-956	UUUCGAGACCACUCUAAUCCAAU	MIMAT0005469
cma-miR-957	UGAAACCGUCCAAAACUGAGGC	MIMAT0005470
cma-miR-958	UGAGAUUCUUCUUAUUCUACUUU	MIMAT0005471
cma-miR-970	UCAUAAGACACACGCGGCUAU	MIMAT0005486
cma-miR-971	UUGGUGUUACUUCUACAGUGA	MIMAT0005487
cho-miR-980	UAGCUGCCUUGUGAAGGGCUU	MIMAT0005496
cma-miR-981	UUCGUUGUCGACGAAACCUGCA	MIMAT0005497
cma-miR-987	UAAAGUAAAUAGUCUGGAUUGAUG	MIMAT0005504
cma-miR-988	CCCCUUGUUGCAAACCUCACGC	MIMAT0005505
cma-miR-989	UGUGAUGUGACGUAGUGGAACA	MIMAT0005506
cma-miR-993	GAAGCUCGUCUCUACAGGUAUCU	MIMAT0005512
cma-miR-995	UAGCACCACAUGAUUCGGCUU	MIMAT0005514
cma-miR-996	UGACUAGAUUUCUAGCUCGUCU	MIMAT0005515
cma-miR-998	ACUGAAUUCUCGUGGGUCUGCA	MIMAT0020898
cma-miR-999	UGUUAACUGUAAGACUGUGUCU	MIMAT0005519
cma-miR-9a	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	MIMAT0000114
cma-miR-9b	UCUUUGGUGAUUUUAGCUGUAU	MIMAT0000395
cma-miR-9c	UCUUUGGUAUUCUAGCUGUAGA	MIMAT0000392
cma-miR-iab-4	ACGUUAUCUGAAUGUAUCCUGA	MIMAT0000412
cma-miR-iab-8	UUACGUUAUCUGAAGGUUAACCGGA	MIMAT0005463

Capítulo I

Anexo B

cho/cma-mir-281-1

<i>D.melanogaster</i> mir-281-1	A T A A G T G	A A T	A A A G A G A G C T G	T C C	G T C G A C A G T	C C A G A A A C
<i>D.pseudoobscura</i> mir-281-1	A T A G G T G	A A T	A A A G A G A G C T G	T C C	G T C G A C A G T	C A A C G T A C
cho/cma mir-281-1	A T A T A T A	A A T	A A A G A G A G C T G	T C C	G T C G A C A G T	C C A G A T A A
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-281-1	A T G T G A A	A A T	A A A G A G A G C T A	T C C	G T C G A C A G T	A G G G A T A T
<i>B.mori</i> mir-281	- T C T G T T	A A T	G A A G A G A G C T A	T C C	G T C G A C A G T	A T T G C T G -
<i>A.mellifera</i> mir-281	G C G C G C T	A - T	A A A G A G A G C T A	T C C	A T C G A C A G T	A T G G T T A T
<i>D.melanogaster</i> mir-281-1	T A T T T	A A	- - T A T C	A C T G T C A T G G A	A T T G C T C T C T T T	G T A T A
<i>D.pseudoobscura</i> mir-281-1	C A A T T	- -	- - T A A T	A C T G T C A T G G A	A T T G C T C T C T T T	G T A T A
cho/cma mir-281-1	A A A C G	A A	T A T A T A	A C G T C A T G G A	A T T G C T C T C T T T	G T A T G
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-281-1	G A T T	- -	- - - C	A C T G T C A T G G A	A T T G C T C T C T T T	A T G T A
<i>B.mori</i> mir-281	- A T A A	- -	- - A C	A C T G T C A T G G A	G T T G C T C T C T T T	A T G A A
<i>A.mellifera</i> mir-281	A A T A G	- -	- - A C	A C T G T C A T G G A	G T T G C T C T C T T T	G T A G A

cho/cma-mir-184

<i>D.melanogaster</i> mir-184	C G G T	G C A T T	- - C G T A	C C C T T A	T C A T T C T	C T C	G C C C C	G T G T G
<i>D.pseudoobscura</i> mir-184	C G G T	G C A T T	- - C G T A	C C C T T A	T C A T T C T	C G C	G C C C C	G T G T G
cho/cma mir-184	C G G T	G T A T T	- - C G T A	C C C T T A T C A	T T C T C T C	G C C C C	G T G T G	G T G
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-184	- - G T	G T A T T	- - C G C A	C C C T T A	T C A T T C T	T T C	G C C C C	G T G T A
<i>B.mori</i> mir-184	- - G T	G C A G T G	A C G T G	C C C T T G	T C A T T C T	T C A	G G C C C	- T G T G
<i>A.mellifera</i> mir-184	- T T C	G T G C C C	A A A G C	C C C T T A	T C A T T C T	C C T	G T C C G	G T G T A
<i>D.melanogaster</i> mir-184	C A C	T T A A A	- - G A	C A	A C T G G A C G G A G A A C T	G A T A A A G G G C	T C	
<i>D.pseudoobscura</i> mir-184	C A T	T A A A A	- - G A	C A	A C T G G A C G G A G A A C T	G A T A A A G G G C	T C	
cho/cma mir-184	A T T	T T T A C T T	T A A C A	A C	T G G A C G G A	G A A C T G A T A A G G G C	T C	
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-184	C T G	T T G T T	- - G C	G A	C T G G A C G G A G A A C T	G A T A A A G G G C	C C	
<i>B.mori</i> mir-184	T A T	T T A C A	- - - A	C T	A C T G G A C G G A G A A C T	G A T A A A G G G C	A C	
<i>A.mellifera</i> mir-184	G A A	T T G T T	A - - G A	C G	A C T G G A C G G A G A A C T	G A T A A A G G G C	C C	

cho/cma-mir-8

<i>D.melanogaster</i> mir-8	A T	C T	G T T C A	C A T C T T A C	C -	G G G C A G	C A T T A G A	T C C T T T T T A
<i>D.pseudoobscura</i> mir-8	A T	C T	G T T C A	C A T C T T A C	C -	G G G C A G	C A T T A G A	T C C T T T A G A
cho/cma mir-8	A T	C T	G T T C A	C A T C T T A C	C -	G G G C A G	C A T T A G A	T T A T A T A A A
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-8	G T	C T	G T T C A	C A T C T T A C	C -	G G G C A G	C A T T A G A	T A T T T T T T A
<i>B.mori</i> mir-8	A A	C G	G T T C G	C A T C T T A C	C -	G G G C A G	C A T T A G A	G T C C T G T C T
<i>A.mellifera</i> mir-8	- -	- -	- - - -	C G	T C T T A C	T T	G G G C A G	G A T T A G A G T G A C A A T T
<i>D.melanogaster</i> mir-8	T A	- -	A C	T C T A A T A C T	G T C A G G T A A	A	G A T G T C G T C C G	T G T C C
<i>D.pseudoobscura</i> mir-8	T A	- -	C C	T C T A A T A C T	G T C A G G T A A	A	G A T G T C G T C C G	T G T C C
cho/cma mir-8	A A	T T	C T	T C T A A T A C T	G T C A G G T A A	A	G A T G T C	G T C C G
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-8	A A	T A	C T	T C T A A T A C T	G T C A G G T A A	A	G A T G T C G T C C G	A - - -
<i>B.mori</i> mir-8	A T	A T T T	T C T A A T A C T	G T C A G G T A A	A	G A T G T C G T C C G	C G C T C	
<i>A.mellifera</i> mir-8	G A	T A T G	T C T A A T A C T	G T C A G G T A A	T	G A T G T C	- - - -	- - - -

Figura B1. Alinhamento dos pre-miRNAs evolutivamente conservados preditos para *C.hominivorax* e *C.macellaria* utilizando os dados genômicos e transcriptômicos disponíveis para essas espécies. Colunas em amarelo representam os sítios conservados em todas as espécies analisadas. As sequências dos miRNAs maduros nas extremidades 5-p e 3-p são mostradas em fonte vermelha e azul, respectivamente, e a região *seed* do miRNA em itálico.

cho/cma-mir-1

<i>D.melanogaster</i> mir-1	C	T	T	T	G	A	G	A	-	-	-	-	G	T	T	C	C	A	T	G	-	C	T	T	C	C	T	T	G	C	A	T	T	C	A	A	T	A	G	T	T
<i>D.pseudoobscura</i> mir-1	C	T	T	T	G	A	G	A	-	-	-	-	G	T	T	C	C	A	T	G	-	C	T	T	C	C	T	T	G	C	A	T	T	C	A	A	T	A	G	T	A
cho/cma mir-1	C	T	T	T	G	A	G	A	-	-	-	-	G	T	T	C	C	A	T	G	T	C	T	T	C	C	T	T	G	C	A	T	T	C	A	A	T	A	G	T	A
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-1	-	-	G	C	G	A	A	A	-	-	-	-	G	T	T	C	C	A	T	G	-	C	T	T	C	C	T	T	G	C	A	T	T	C	A	A	T	A	G	T	G
<i>B.mori</i> mir-1a	T	T	G	C	G	C	A	A	-	-	-	-	G	T	T	C	C	G	T	G	-	C	T	T	C	C	T	T	A	C	T	T	C	C	A	A	T	A	G	T	C
<i>A.mellifera</i> mir-1-1	-	-	G	G	G	C	G	A	T	G	C	T	G	T	T	C	C	G	T	G	-	C	T	T	C	C	T	T	A	C	T	T	C	C	A	A	T	A	G	T	G
<i>D.melanogaster</i> mir-1	A	T	-	-	A	T	T	C	A	A	G	C	A	T	A	T	G	G	A	A	T	G	T	A	A	A	G	A	A	G	T	A	T	G	G	A	G	C	G	A	A
<i>D.pseudoobscura</i> mir-1	T	A	A	C	A	T	-	A	A	A	G	C	A	T	A	T	G	G	A	A	T	G	T	A	A	A	G	A	A	G	T	A	T	G	G	A	G	C	G	A	A
cho/cma mir-1	T	T	T	A	A	T	T	T	A	A	G	C	A	T	A	T	G	G	A	A	T	G	T	A	A	A	G	A	A	G	T	A	T	G	G	A	G	C	G	A	T
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-1	A	T	C	T	T	T	G	A	A	A	-	C	G	T	A	T	G	G	A	A	T	G	T	A	A	A	G	A	A	G	T	A	T	G	G	A	G	C	G	C	T
<i>B.mori</i> mir-1a	A	T	-	-	-	T	G	T	A	A	T	C	A	T	A	T	G	G	A	A	T	G	T	A	A	A	G	A	A	G	T	A	T	G	G	A	G	C	T	G	C
<i>A.mellifera</i> mir-1-1	G	A	-	-	-	T	G	C	G	A	-	C	G	T	A	T	G	G	A	A	T	G	T	A	A	A	G	A	A	G	T	A	T	G	G	A	G	C	T	G	C

cho/cma-mir-31a

<i>D.melanogaster</i> mir-31a	G	T	T	G	G	T	A	A	A	T	T	G	G	C	A	A	G	A	T	G	T	C	G	G	C	A	T	A	G	C	T	T	G	A	A	A	
<i>D.pseudoobscura</i> mir-31a	G	T	T	G	G	T	A	A	A	T	T	G	G	C	A	A	G	A	T	G	T	C	G	G	C	A	T	A	G	C	T	T	G	A	A	A	
cho/cma mir-31a	A	T	T	G	G	T	C	A	G	T	T	T	G	G	C	A	A	G	A	T	G	T	C	G	G	C	A	T	A	G	C	T	A	G	A	A	
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-31	A	T	T	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	C	A	A	G	A	T	G	T	T	G	G	C	A	T	A	G	C	T	G	-	-	-	-	
<i>B.mori</i> mir-31	G	T	G	C	T	G	G	G	A	A	G	G	C	A	A	G	A	A	G	T	C	G	G	C	A	T	A	G	C	T	G	T	T	-	-	-	
<i>A.mellifera</i> mir-31a	G	G	C	G	C	T	C	G	A	A	G	G	C	A	A	G	A	T	G	T	C	G	G	C	A	T	A	G	C	T	G	A	T	G	-	-	
<i>D.melanogaster</i> mir-31a	A	G	C	G	A	T	T	T	T	G	A	A	G	A	G	A	G	C	-	G	C	T	A	T	G	C	T	G	C	A	T	C	T	A	G	T	C
<i>D.pseudoobscura</i> mir-31a	A	G	C	G	A	T	C	T	T	T	G	A	A	G	A	A	C	-	G	C	T	A	T	G	C	T	G	C	A	T	C	T	A	G	T	C	
cho/cma mir-31a	-	-	A	A	A	T	T	T	T	T	C	C	A	A	A	C	C	C	-	G	C	T	A	T	G	C	T	G	C	A	T	C	T	A	G	T	
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-31	-	-	A	A	A	G	T	T	T	T	G	A	G	T	T	T	A	-	G	C	T	A	T	T	C	A	A	C	T	T	C	T	T	G	T		
<i>B.mori</i> mir-31	-	-	T	G	A	A	T	A	A	G	A	T	A	C	A	C	G	-	G	C	T	G	T	G	T	C	A	C	T	T	C	G	A	G	C		
<i>A.mellifera</i> mir-31a	-	-	C	G	A	T	T	T	T	A	A	A	A	T	T	C	G	-	G	C	T	G	T	G	T	C	A	C	A	T	C	A	G	C	C		

cho/cma-mir-278

<i>D.melanogaster</i> mir-278	G	G	T	G	C	G	A	C	C	G	G	A	T	G	A	T	G	G	T	T	C	A	C	A	A	-	-	C	G	A	C	C	G	T	G	T	C	A	T	T	T	
<i>D.pseudoobscura</i> mir-278	G	G	T	G	C	G	A	C	C	G	G	A	C	G	A	T	G	G	T	T	C	A	C	A	A	-	-	C	G	A	C	C	G	T	G	T	C	T	C	T	T	
cho/cma mir-278	G	G	T	G	C	G	A	C	C	G	G	A	T	G	A	T	G	G	T	T	C	A	C	A	A	-	-	C	G	A	C	C	G	T	G	T	-	-	A	T	T	T
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-278	G	G	T	G	C	G	A	C	C	G	G	A	C	G	A	T	A	G	T	C	T	T	C	A	G	-	-	C	G	A	C	C	G	T	G	C	C	A	T	T	T	
<i>B.mori</i> mir-278	G	C	T	A	C	G	C	C	C	G	G	A	C	G	A	-	A	C	T	T	C	C	C	A	G	C	T	C	G	G	C	C	G	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A.mellifera</i> mir-278	A	G	T	G	T	G	T	C	C	G	G	A	T	G	A	-	G	G	T	C	T	T	C	A	T	-	-	C	G	A	C	C	G	T	G	-	-	A	T	T	T	

<i>D.melanogaster</i> mir-278	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	C	G	G	T	C	G	G	T	G	G	G	A	C	T	T	T	C	G	T	C	C	G	T	T	T	G	T	A	A	C		
<i>D.pseudoobscura</i> mir-278	A	A	A	C	T	-	-	-	-	-	-	G	G	T	C	G	G	T	G	G	G	A	C	T	T	T	C	G	T	C	C	G	T	T	T	G	T	A	A	C		
cho/cma mir-278	A	T	T	A	C	A	C	-	-	-	-	T	G	G	T	C	G	G	T	G	G	G	A	T	T	T	T	C	G	T	C	C	G	C	T	T	T	G	T	A	A	C
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-278	G	A	A	A	A	C	C	T	T	T	T	G	G	G	T	C	G	G	T	G	G	G	A	C	T	T	T	C	G	T	C	C	G	T	T	T	G	T	A	A	C	
<i>B.mori</i> mir-278	-	-	-	A	C	A	A	T	C	A	G	G	G	T	C	G	G	T	G	G	G	A	C	T	T	T	C	G	T	C	C	G	T	T	T	G	T	A	T	C		
<i>A.mellifera</i> mir-278	A	-	-	A	T	T	T	C	A	T	A	A	-	G	G	T	C	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	C	G	T	C	C	G	T	T	T	G	C	A	A	G	

Figura B1. Continuação.

cho/cma-mir-210

<i>D.melanogaster</i> mir-210	G	G	T	G	C	T	T	A	T	T	G	C	A	G	C	T	G	C	T	G	G	C	C	A	C	T	G	C	A	C	A	A	G	A	T	T	A	G	A	C	T
<i>D.pseudoobscura</i> mir-210a	G	G	T	A	C	T	T	A	T	T	G	C	A	G	C	T	G	C	T	G	G	C	C	A	C	T	G	C	A	C	A	A	G	A	T	T	A	G	A	T	T
cho/cma mir-210	G	G	T	A	C	T	T	A	T	T	G	C	A	G	C	T	G	C	T	G	A	C	C	A	C	T	G	C	A	C	A	A	G	A	T	T	A	G	A	T	T
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-210	-	-	-	-	C	T	C	A	T	T	G	C	A	G	C	T	G	C	T	G	A	C	C	A	C	T	G	C	A	C	A	A	G	A	T	T	A	G	A	T	T
<i>B.mori</i> mir-210	G	A	A	G	T	C	C	A	A	A	G	C	A	G	C	T	G	C	T	G	G	C	C	A	C	T	G	C	A	C	A	A	G	A	T	T	A	G	T	C	A
<i>A.mellifera</i> mir-210	G	G	A	C	C	C	T	A	A	T	G	C	A	G	C	T	G	C	T	G	G	C	C	A	C	T	G	C	A	C	A	A	G	A	T	T	A	G	A	C	A

<i>D.melanogaster</i> mir-210	-	-	T	A	A	-	G	A	C	T	C	T	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	A	C	A	G	C	G	G	C	T	A	T	T	G	T	A	A	G	A	G
<i>D.pseudoobscura</i> mir-210a	-	-	T	A	A	-	G	A	C	T	C	T	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	A	C	A	G	C	G	G	C	T	A	T	T	G	T	A	A	G	A	G
cho/cma mir-210	-	-	T	A	A	T	G	A	C	T	C	T	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	A	C	A	A	C	G	G	C	T	A	T	T	G	T	A	A	G	T	T
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-210	-	-	-	-	A	T	G	A	C	T	C	T	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	A	C	A	A	C	G	G	C	T	A	T	T	G	-	-	-	-	-	
<i>B.mori</i> mir-210	A	G	T	T	T	A	T	A	C	T	C	T	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	A	C	A	G	C	G	G	C	T	A	T	T	G	C	G	G	C	A	
<i>A.mellifera</i> mir-210	-	-	-	T	A	A	G	A	C	T	C	T	T	G	T	G	C	G	T	G	T	G	A	C	A	G	C	G	G	C	T	A	T	T	G	A	T	G	G	T	

cho/cma-mir-2a

<i>D.melanogaster</i> mir-2a-1	G	C	T	G	G	G	C	T	C	T	C	A	A	A	G	T	G	G	T	T	G	T	G	A	A	A	T	G	C	-	-	A	T	T	T	C	C	G	C	T	T
<i>D.pseudoobscura</i> mir-2a-1	G	C	T	G	G	G	C	T	C	A	C	A	A	A	G	T	G	G	T	T	G	T	G	A	A	A	T	G	C	-	-	A	T	T	T	T	-	G	C	T	T
cho/cma mir-2a	C	T	A	A	G	C	C	T	C	A	T	C	A	A	A	G	T	G	G	T	T	G	A	T	A	T	A	T	G	G	-	-	A	T	T	A	T	-	-	-	-
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-2	T	A	T	C	C	A	C	T	C	T	C	A	A	A	G	T	G	C	T	G	T	G	A	A	A	T	G	-	-	-	G	T	T	C	C	T	C	C	A	G	T
<i>B.mori</i> mir-2a-1	G	T	C	G	T	G	G	C	A	T	C	A	A	A	G	T	C	G	G	T	T	G	T	C	A	T	A	G	-	-	G	T	C	A	T	A	A	C	G	T	
<i>A.mellifera</i> mir-2-1	G	C	A	C	C	G	C	T	C	A	C	A	A	A	G	T	G	G	T	T	G	T	G	A	T	A	T	G	C	T	G	A	T	A	C	G	A	G	C	G	T

<i>D.melanogaster</i> mir-2a-1	T	G	C	G	C	G	G	C	A	T	A	T	C	A	C	A	G	C	C	A	G	C	T	T	T	G	A	T	G	A	G	C	T	T	A	G	C	T	T	A	G	C
<i>D.pseudoobscura</i> mir-2a-1	T	G	C	-	C	C	G	C	A	T	A	T	C	A	C	A	G	C	C	A	G	C	T	T	T	G	A	T	G	A	G	C	T	T	C	G	G	C	T	T		
cho/cma mir-2a	-	-	C	A	A	C	G	C	A	T	A	T	C	A	C	A	G	C	C	C	A	G	C	T	T	T	G	A	T	G	A	G	C	T	T	A	G	G	A	T		
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-2	A	A	A	T	C	G	C	C	A	T	A	T	C	A	C	A	G	C	C	A	G	C	T	T	T	G	A	A	G	A	G	C	G	A	T	A	C	T	T			
<i>B.mori</i> mir-2a-1	A	A	C	-	-	-	-	-	-	T	A	T	C	A	C	A	G	C	C	A	G	C	T	T	T	G	A	T	G	A	G	C	A	C	G	A	C	T	T			
<i>A.mellifera</i> mir-2-1	T	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A	T	A	T	C	A	C	A	G	C	C	A	G	C	T	T	T	G	A	T	G	A	G	C	G	T	G	G	C			

cho/cma-mir-2b

<i>D.melanogaster</i> mir-2b-1	C	T	T	C	A	A	C	T	G	T	C	T	T	C	A	A	A	G	T	G	G	C	A	G	T	G	A	C	A	T	G	T	T	G	T	C	A	A
<i>D.pseudoobscura</i> mir-2b-1	C	T	G	C	G	A	C	G	C	T	C	T	T	T	A	A	A	G	T	G	G	C	G	G	T	G	A	C	G	T	G	T	T	G	G	T	A	A
cho/cma mir-2b	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	C	T	T	C	A	A	A	G	T	G	G	C	T	G	C	G	A	A	A	T	G	T	T	T	C	T	C	C
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-2	C	T	G	T	A	T	C	C	A	C	T	C	T	T	C	A	A	A	G	T	G	G	C	T	G	T	G	A	A	A	T	G	G	T	T	C	T	C

<i>D.melanogaster</i> mir-2b-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D.pseudoobscura</i> mir-2b-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cho/cma mir-2b	T	T	T	T	A	A	A	T	T	C	A	A	T	T	T	T	A	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<i>D.melanogaster</i> mir-2b-1	G	C	T	T	T	G	A	G	G	A	G	C	G	T	T	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
<i>D.pseudoobscura</i> mir-2b-1	G	C	T	T	T	G	A	G	G	A	G	C	G	T	T	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
cho/cma mir-2b	G	C	T	T	T	G	A	G	G	A	G	C	G	T	T	G	C	A	C	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-2	G	C	T	T	T	G	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	A	T	A	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	

Figura B1. Continuação.

cho/cma-mir-275

<i>D.melanogaster</i> mir-275	C C T T	G C G C G	C T A	A T	C A	G T G A	C	C G - G	G G C T	G G T T T T T	T	A T A T
<i>D.pseudoobscura</i> mir-275	C C A T	G C G C G	C T A	A T	C A	G A G A	C	C G - G	G G C T	G G T T T T T	T	C A C T
cho/cma mir-275	C T C T	G C G C G C T A	A T C	A G A G A C	C G - G	G G C T				G A A T A T T	T	A A A T
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-275	T A G C	G C G C G	C T A	A G	C A	G G A A	C	C G - G	G A C T	T G G T C A T	T	C G C T
<i>B.mori</i> mir-275	C G C C	G C G C G	C T A	C T	C G	G C G	C	C A - G	G A C T	G - - T C C	T	C A C C
<i>A.mellifera</i> mir-275	C A A C	G C G C G	T T A	C T	C G	G G T A	C	T T T A	G G C T	G T G C C A A	T	T T C G
<i>D.melanogaster</i> mir-275	A - -	- C A G T C A G G T A C C T G A A G T A G C G C G C G								T G G T		
<i>D.pseudoobscura</i> mir-275	G - -	- C A G T C A G G T A C C T G A A G T A G C G C G C G								T G G T		
cho/cma mir-275	A A C T	G C A G	T C A G G T A C	C T G A A G T A G C G C G C G						A A G T		
<i>C.quinquefasciatus</i> mir-275	A - -	G C A G T C A G G T A C C T G A A G T A G C G C G C G								T G A T		
<i>B.mori</i> mir-275	G - -	- A G T C A G G T A C C T G A A G T A G C G C G C G								G T G T		
<i>A.mellifera</i> mir-275	A A T -	- C A G T C A G G T A C C T G A A G T A G C G C G C G								C T G C		

Figura B1. Continuação.

Capítulo II

Caracterização dos miRNAs identificados nas espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria* (Diptera: Calliphoridae).

1. Resumo

O presente capítulo teve por objetivo a caracterização dos 84 miRNAs previamente identificados nas espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, a partir de duas abordagens. A primeira visou caracterizar a expressão diferencial de miRNAs, através da contagem e normalização dos *reads* gerados pelo sequenciamento em plataforma MiSeq-Illumina (análise indireta). Essa análise indicou que 79 miRNAs apresentam uma expressão diferencial entre os gêneros e estágios de desenvolvimento das espécies, sendo que na fase larval de ambas espécies foi observada uma baixa diversidade de miRNAs diferencialmente expressos quando comparada a fase adulta (fêmeas e machos). Para a validação destes dados, três miRNAs foram selecionados e sua expressão quantificada através da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). Os dados obtidos por qRT-PCR corroboraram com os resultados obtidos das análises indiretas de expressão diferencial, indicando que esta análise pode ser utilizada na seleção de miRNAs candidatos para a continuação deste trabalho. A segunda abordagem visou a caracterização dos miRNAs identificados ao longo do tempo evolutivo. Foi possível inferir que a maior parte dos miRNAs destas espécies são conservados desde sua sequência ancestral em Arthropoda (540 MA), Hexapoda (488 MA) e Brachycera (195 MA). Analisando as substituições nucleotídicas que ocorreram ao longo da evolução dos miRNAs em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, foi verificado que as sequências dos miRNAs conservadas desde um ancestral mais recente possuem uma tendência em acumular mais substituições em relação aos miRNAs conservados desde um ancestral mais antigo. Essas substituições nucleotídicas são enviesadas na região 3' das sequências dos miRNAs, com raras ocorrências na região *seed*.

2. Material e métodos

2.1. Caracterização da expressão dos miRNAs identificados: Análise indireta de expressão diferencial.

Para avaliar os padrões de expressão dos miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria* (Capítulo I), foram realizadas duas análises indiretas de expressão diferencial: (1) avaliação da mudança de expressão global de miRNAs identificados, através da análise de clusterização hierárquica, e (2) o cálculo estatístico de mudanças da expressão relativa de miRNAs entre as espécies e os estágios de desenvolvimento investigados.

Inicialmente, os *reads* de cada transcriptoma de pequenos RNAs que foram identificados como miRNAs evolutivamente conservados foram contados (número de *reads* mapeados em um único miRNA) e normalizados (Tabela A1), separadamente, pelo número total de *reads* mapeados no genoma de *D. melanogaster* e no banco de dados miRBase v.20 (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013; para mais detalhes ver Capítulo I-Sessão 2.3). Por exemplo: 1.110 *reads* foram mapeados no miRNAs bantam-3p nos dados do transcriptoma de pequenos RNAs de macho de *C. hominivorax*, sendo o total de *reads* mapeados nesse transcriptoma de 9193 *reads*. A normalização de cho-bantam-3p nesses dados é de 1207.4×10^{-4} , que representa seu perfil de expressão relativa no transcriptoma.

Os *reads* normalizados foram utilizados na análise das mudanças de expressão global entre as espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria* e entre os estágios de desenvolvimento investigados. Os *reads* normalizados foram ajustados através da transformação logarítmica $\log_2$ e clusterizados hierarquicamente pelo modelo de distância “Average-linkage”, como descrito por Eisen et al., (1998) através do software Cluster v3.0

(de Hoon et al., 2004). O modelo calcula a distância baseada na expressão relativa dos miRNAs para os 6 transcriptomas sequenciados (Capítulo I) e os 84 miRNAs evolutivamente conservados analisados, gerando um perfil gráfico da expressão global dos miRNAs identificados.

A segunda análise foi baseada no cálculo estatístico de mudanças da expressão relativa de miRNAs. As mudanças de expressão estatisticamente significantes dos *reads* normalizadas para cada transcriptoma foram calculadas usando o teste par-a-par de Audic & Claverie (AC; 1997), Chi-quadrado par-a-par (Chi2x2) e Chi-quadrado Geral (Chi), como descrito por Romualdi et al., (2003) utilizando o software IDEG6. Os graus de liberdade foram calculados através da correção de Bonferroni. Para os resultados estatisticamente significativos, os limiares de 3.96E-5 e 5.9E-4 foram definidos para os testes AC/Chi2x2 e Chi, respectivamente.

2.2. Caracterização da expressão dos miRNAs identificados: quantificação de miRNAs por PCR em tempo real.

Para validar a expressão relativa dos miRNAs identificados nos transcriptomas de pequenos RNAs das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, três miRNAs evolutivamente conservados foram escolhidos, incluindo os cho/cma-miR-8-3p, cho/cma-miR-275-3p e cho/cma-miR-1000, para as reações de quantificação por PCR em tempo real (qRT-PCR).

Os mesmos RNAs totais previamente isolado e utilizado para a construção das bibliotecas de pequenos RNAs, foram utilizados, separadamente, nas reações de transcrição reversa com o kit NCodeTM miRNA First-Strand cDNA synthesis Kit (Life Technologies). A pré-reação (poliadenilação dos miRNAs) foi realizada com 2.5µg de RNA total, 5x miRNA Reaction Buffer, 0.25 mM de MnCl₂ (25mM), 1µl de 10mM ATP diluído 1:50, 2.5U de Poly A Polimerase e Água DEPC para um volume final de 25µl. A reação foi

incubada a 37°C por 15 min, e subsequentemente utilizada nas reações de síntese da primeira fita de cDNA.

As reações de transcrição reversa foram realizadas com 4µl da reação de poliadenilação, 1µl do tampão de anelamento e 1.5µM do primer RT universal (25 µM) (o primer universal é complementar a calda adenilada ligada na pré-reação), para um volume final de 8µl. A reação foi incubada 65°C por 5 min. Após esta etapa, foram acrescentados o mix 2x First-Strand reaction (contendo 0.4 mM de cada dNTP e 3.2 mM de MgSO₄) e 2.5U da enzima SuperScript[®]III RT, para um volume final de 20µl. Para os controles negativos (RT-) 1µl de Água DEPC e 1µl de RNaseOUT[™] (Life Technologies) foram usados no lugar da enzima. A reação foi submetida a 50°C por 50 min e 85°C 5min em termociclador, e em seguida mantida a -20°C até a realização das reações de qPCR.

As reações de amplificação por qPCR foram conduzidas utilizando 10 µl de SYBR[®] Green PCR Master Mix (Life Technologies), 10µM de cada primer, o específico para o miRNA analisado (a sequência do primer específico é 100% idêntica a sequência do miRNA maduro) e o primer universal, e 2ul do cDNA diluído 1:10 para um volume final de 20 µl. As reações foram realizadas no sistema CFX384 Real-Time PCR Detection System (BioRad) de acordo com o protocolo: 50°C por 2 min e 95°C por 2 min, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 35 seg. As curvas de dissociação foram acessadas a 65°C por 35 seg. e 95°C por 50 seg., para assegurar a amplificação de apenas um produto por reação.

Todas as reações foram realizadas em triplicata e a quantidade relativa de cada miRNA foi determinada pelo método $2^{-\Delta CT}$ (Schmittgen & Livak, 2008) utilizando o ncRNA U6 como gene constitutivo de referência. O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para

calcular as diferenças de quantificação entre as amostras, e o teste exato de Fisher usado para calcular as mudanças estatisticamente significativas. Em todas as reações foram realizados os controles negativos RT- e NTC (*non-template control*).

2.3. Caracterização evolutiva dos miRNAs identificados: análise de coalescência e investigação de conservação.

A caracterização evolutiva dos miRNAs identificados foi realizada como descrita por Barrero et al., (2011) e Wheeler et al., (2009), através de uma análise de coalescência. Esta análise foi conduzida para determinar a origem evolutiva dos 84 miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*. Cada miRNA foi alinhado separadamente com seus ortólogos disponíveis no banco de dados mirBase v.20 (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013) para todas as 81 espécies de animais que possuem miRNAs anotados, desde Neoprotozoa, na base Bilateria, até Calliphoridae. Para condução dos alinhamentos utilizou-se o software Clustal Ω (Sievers et al., 2011).

Depois de alinhados, os miRNAs foram atribuídos a suas respectivas espécies em uma árvore filogenética, que abrange todas as espécies utilizadas, utilizando-se o software MEGA 5 (Tamura et al., 2011). A árvore utilizada foi adaptada de Wheeler et al., (2009) e Wiegmann et al., (2009), e os tempos de divergência utilizados foram: 641 MA para Neoprotozoa (Peterson et al., 2008), 618 MA para Protostomia, 540 MA para Arthropoda (Wheeler et al., 2009), 488 MA para Hexapoda (Regier et al., 2005), 284 MA para Endopterygota (Wiegmann et al., 2009), 230 MA para Diptera, 195 MA para Brachycera (Wiegmann et al., 2011) e 14,5 MA para Calliphoridae (Junqueira et al., artigo em preparação). As sequências ancestrais de cada nó na árvore (descritos acima) foram determinadas no software MEGA 5 (Tamura et al., 2011) usando o método de Máxima Verossimilhança (Yang et al., 1995) com o modelo de substituição JC69 (Jukes & Cantor, 1969). Cada miRNAs de *C.*

hominivorax e *C. macellaria* foi comparado com as sequências inferidas para cada nó da árvore e sua possível ancestralidade determinada, seguindo os critérios estabelecidos por Barrero et al., (2011) (Anexo B).

Por último, a conservação dos miRNAs ao longo do tempo evolutivo foi acessada examinando o número de substituições por miRNA, através da comparação da sequência ancestral inferida mais recente de cada miRNA de *C. hominivorax* e *C. macellaria* contra sua sequência ancestral inferida mais antiga (Por exemplo: o miRNA miR-1 em ambas as espécies é conservado desde sua sequência ancestral em Arthropoda. Esta sequência foi então comparada contra a sequência ancestral inferida para Nephrozoa, e o número de substituições anotado).

3. Resultados

3.1. Caracterização da expressão dos miRNAs identificados: Análise indireta de expressão diferencial.

A análise de clusterização hierárquica foi realizada como descrito por Eisen et al., (1998), a fim de investigar indiretamente a expressão global dos miRNAs identificado em *C. hominivorax* e *C. macellaria*. Esta análise revelou que poucos miRNAs são diferencialmente expressos na fase larval de ambas as espécies, enquanto em fêmeas e machos uma maior diversidade de miRNAs expressos foi observada (Figura 1). Fêmeas e larvas de ambas as espécies foram agrupadas nesta análise, indicando que grande parte da variação de expressão de seus miRNAs são parecidas, embora fêmeas possuam níveis de expressão mais elevados.

Esta análise mostrou que o miR-1 está sendo diferencialmente expresso entre as larvas de *C. hominivorax* e *C. macellaria* e, embora sua expressão não tenha sido

estatisticamente significativa em nossas análises ($P < 4.9E-3$), este miRNA poderá ser futuramente investigado nos estágios da fase larval (1º e 2º instar) de ambas as espécies que não foram utilizados neste trabalho.

A análise também pôde definir conjuntos específicos de miRNAs diferencialmente expressos nos estágios de desenvolvimento de ambas as espécies, que poderão ser utilizados na seleção de miRNAs candidatos associados ao desenvolvimento e hábitos das espécies. O primeiro conjunto de miRNAs diferencialmente expressos encontra-se nos machos, do miR-11 até o miR-1. Interessantemente, a maior parte desses miRNAs possuem uma associação com a metamorfose em insetos, como o miR-14 (Varghese & Cohen, 2007).

Dentre os miRNAs que apresentaram um perfil de expressão relativa semelhantes em larvas (cluster: miR-12-5p até o miR-9b) encontram-se o miR-8-3p, que já havia sido observada sua alta frequência nas bibliotecas de pequenos RNAs (Capítulo I, Sessão 3.3). Outros dois miRNAs altamente expressos em larvas são miR-275-3p e miR-305-5p. Em *D.melanogaster* esses miRNAs fazem parte do mesmo cluster, separados por apenas 125pb, mas que no entanto não são co-expressos (Aravin et al., 2003). A análise de clusterização indicou que esses miRNAs são expressos em todas as fases de desenvolvimento investigadas, mas que no entanto apresentam uma maior expressão, e também uma co-expressão, na fase larval.

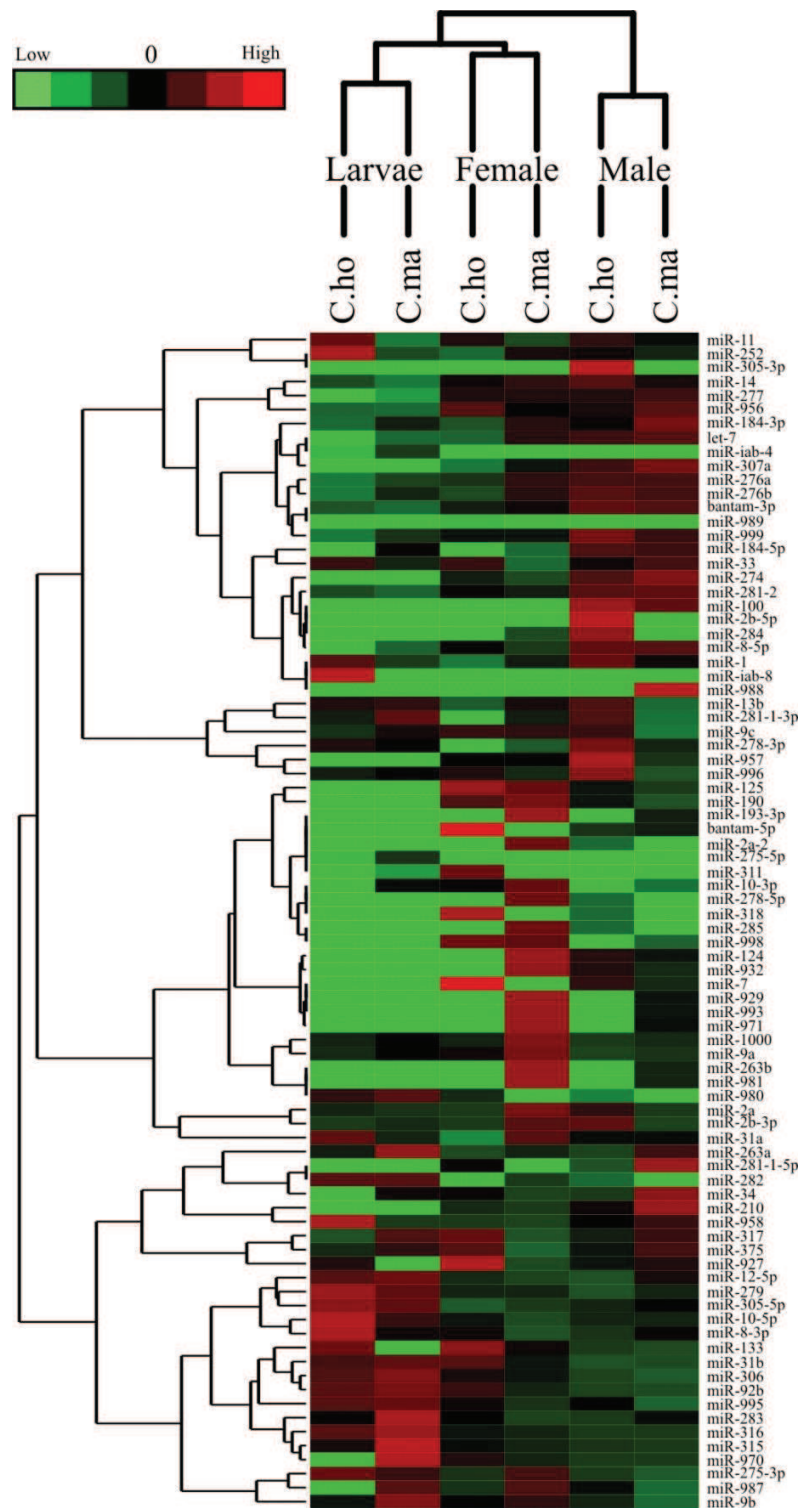


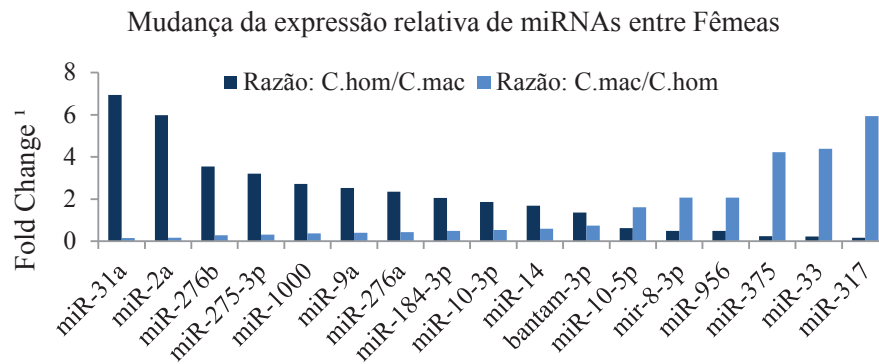
Figura 1. Clusterização hierárquica dos miRNAs identificados em larvas, fêmeas e machos de *C. hominivorax* (C.ho) e *C. macellaria* (C.ma), baseada no perfil de expressão relativa dos miRNAs em cada transcriptoma de pequenos RNAs.

Dentre os miRNAs clusterizados em fêmeas, a maior parte deles apresentaram um perfil de expressão semelhante tanto nos machos quanto nas larvas, ainda assim, a análise indicou que o perfil de expressão relativa de miRNAs em fêmeas é mais parecido com o de larvas. A clusterização também mostrou que existem mais miRNAs diferencialmente expressos do que miRNAs comumente expressos entre fêmeas.

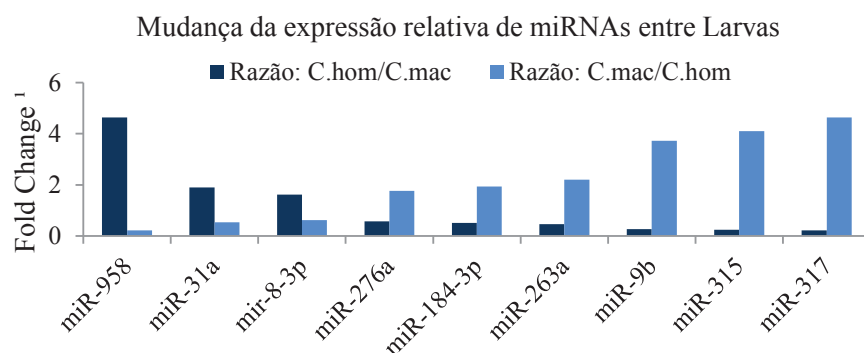
As análises baseadas no cálculo estatístico de mudanças da expressão relativa de miRNAs indicaram que 79 dos 84 miRNAs identificados são diferencialmente expressos entre *C. hominivorax* e *C. macellaria*, e entre os estágios de desenvolvimento investigados. Entre as fêmeas, foram identificados 17 miRNAs diferencialmente expressos (Figura 2.A, Tabela A2.A), dentre eles destacam-se o miR-31a, miR-2a, miR-276b, miR-1000 e miR-275, que possuem um aumento de expressão (*Fold Increase*) de 2.75 a 6.95 em *C. hominivorax*.

Já na fêmea de *C. macellaria*, os miRNAs miR-375, miR-33 e miR-317, foram os que tiveram o maior aumento de expressão relativa, apresentando valores > 4 de *Fold Change*. Na biblioteca de larva dessa mesma espécie, o miR-317 também apresentou uma maior expressão relativa, além do miR-315 (Figura 2.B, Tabela A2.B). Interessantemente, esses miRNAs fazem parte de vias de regulação de genes associados a resposta imunológica em insetos (Fullaondo & Lee, 2012; Hussain et al., 2013). Já na biblioteca de larva de *C. hominivorax*, o miRNA com maior mudança de expressão relativa foi o miR-958. Até o momento, este miRNA foi identificado apenas em espécies de *Drosophila* (Griffiths-Jones et al., 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2013).

A



B



C

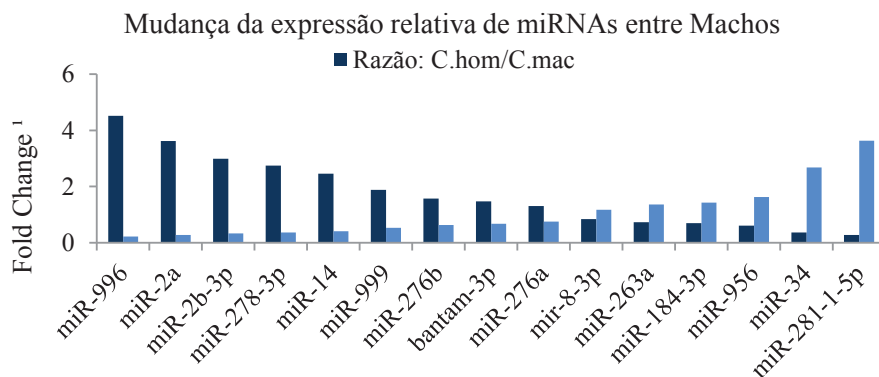


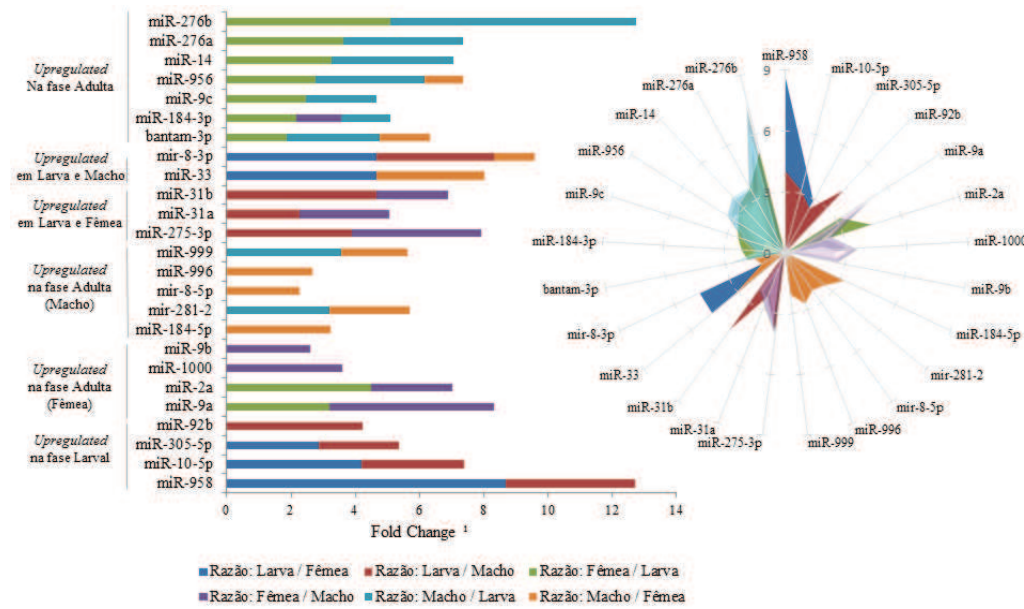
Figura 2. Comparação interespecífica da mudança da expressão relativa de miRNAs entre (A) Fêmeas, (B) Larvas e (C) Machos das espécies *C.hominivorax* e *C.macellaria*.

¹Fold Change refere-se a mudança da expressão relativa de um dado miRNA calculado pela razão entre os reads normalizados de cada biblioteca analisada. Apenas as mudanças estatisticamente significantes ($P < 3.96E-5$ e $5.9E-4$ para os testes AC/Chi2x2 e Chi, respectivamente) estão sendo mostradas.

As comparações intraespecíficas da mudança relativa de expressão de miRNAs indicaram que 25 e 29 miRNAs estão sendo diferencialmente em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, respectivamente (Figura 3, Tabela A3.A e A3.B). Em *C. hominivorax*, a maior parte dos miRNAs são diferencialmente expressos entre os estágios de desenvolvimento larval e adulto, enquanto que em *C. macellaria* a maior parte dos miRNAs são diferencialmente expressos no estágio larval e na fêmea.

Esta análise pôde indicar quais miRNAs são expressos diferentemente entre as fases de desenvolvimento das espécies, os quais provavelmente desempenham uma função específica no estágio analisado, como desenvolvimento e diferenciação sexual, enquanto os miRNAs co-expressos, entre os estágios de desenvolvimento, podem desempenhar funções importantes no desenvolvimento espécie-específico. Pouca correlação foi observada comparando os resultados obtidos por esta análise entre *C. hominivorax* e *C. macellaria*. Apenas o miR-305-5p foi encontrado *upregulated* na fase larval de ambas espécies, assim como o miR-281-2 em machos, miR-31b em larvas e fêmeas e os miR-14 e miR-956 na fase adulta. Este resultado indica que mesmo as espécies sendo filogeneticamente próximas, diferentes miRNAs estão sendo expressos nos estágios de desenvolvimento investigados dessas espécies, o que pode indicar a regulação de genes associados as suas diferenças biológicas.

A



B

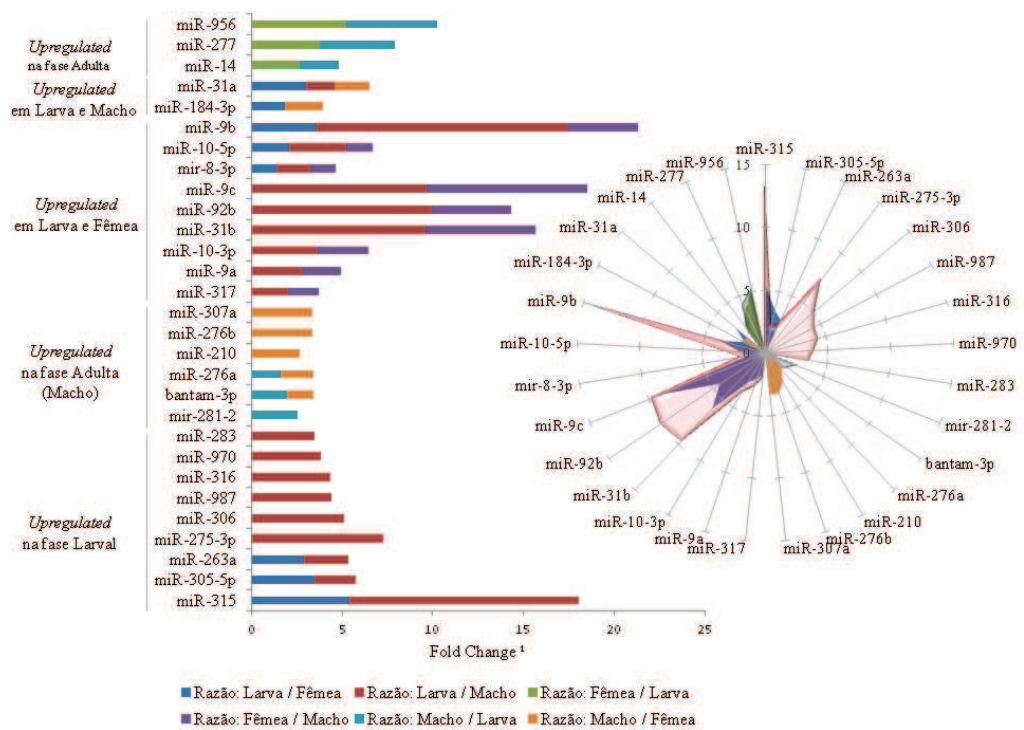


Figura 3. Comparação intraespecífica da mudança da expressão relativa de miRNAs em (A) *C. hominivorax* e (B) *C. macellaria*.

¹Fold Change refere-se a mudança da expressão relativa de um dado miRNA calculado pela razão entre os reads normalizados de cada biblioteca analisada. Apenas as mudanças estatisticamente significantes ($P < 3.96E-5$ e $5.9E-4$ para os testes AC/Chi2x2 e Chi, respectivamente) estão sendo mostradas.

3.2. Validação da expressão diferencial de miRNAs por qRT-PCR.

Para validar experimentalmente os resultados obtidos pelas comparações e análises indiretas de expressão diferencial, os miRNAs miR-8-3p, miR-275-3p e miR-1000, foram amplificados e sua expressão quantificada através da técnica de qRT-PCR. A análise mostrou que a quantificação acessada através do método $2^{-\Delta CT}$, é altamente semelhante à encontrada pela contagem dos *reads* gerados para cada biblioteca através do sequenciamento em plataforma de nova geração MiSeq- Illumina (Figura 4).

Algumas diferenças foram observadas, como os resultados de quantificação obtidos para o miR-1000 em adultos, e o miR-275-3p na amostra de macho de *C. macellaria*. Porém o padrão encontrado por ambas as análises é muito semelhante. Através do teste exato de Fisher, foi verificado que a expressão diferencial destes miRNAs entre as espécies, obtidos pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen & Livak, 2008), corroboram com os dados estatisticamente significantes obtidos através da normalização de *reads* e as análises indiretas de expressão diferencial realizadas anteriormente. Ainda assim, o miR-275-3p foi encontrado sendo diferencialmente expresso entre larvas e machos, o que não foi observado nas análises anteriores.

Avaliando o índice de correlação (R^2) entre os resultados das duas análises, foi observada uma alta correlação tanto para os miRNAs miR-8-3p e miR-275-3p ($R^2=0.98$ e 0.74 , respectivamente) quanto para os resultados globais para *C. hominivorax* e *C. macellaria* ($R^2=0.86$ e 0.93 , respectivamente).

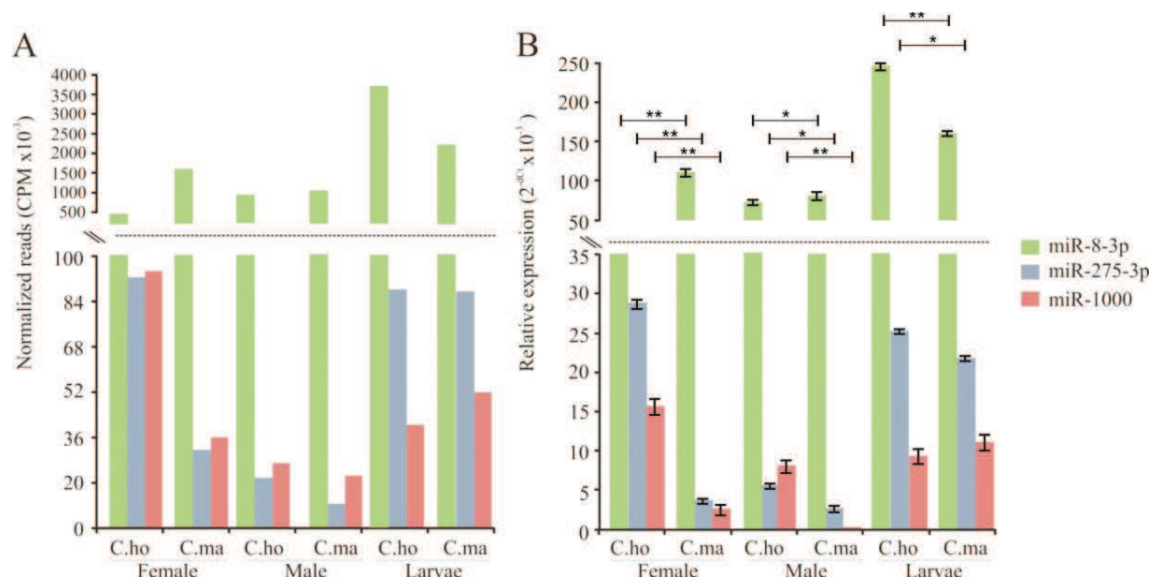


Figura 4. Comparação dos resultados de quantificação dos miRNAs miR-8-3p, miR-275-3p e miR-1000 obtidos através do (A) sequenciamento de nova geração em plataforma MiSeq-Illumina, e (B) qRT-PCR, pelo método $2^{-\Delta CT}$, em relação ao gene constitutivo U6. As barras ($\pm$) representam a variação encontrada entre as triplicatas técnicas. Os resultados estatisticamente significativos de expressão diferencial destes miRNAs obtidos pela análise de qRT-PCR, entre as espécies, foi avaliado através do teste exato de Fisher utilizando os dados obtidos pelo método $2^{-\Delta CT}$ (Schmittgen and Livak, 2008), onde * = $p < 0.05$ e ** = $p < 0.02$.

3.3. Caracterização evolutiva dos miRNAs identificados: Análise de coalescência e investigação de conservação.

Foi realizada uma caracterização evolutiva dos 84 miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, como descrito por Wheeler et al., (2009) e Barrero et al., (2011), através da análise de coalescência (Tabela B1). Essa análise revelou que a maior parte dos miRNAs dessas espécies, são altamente conservados, em relação as sequências ancestrais inferidas, desde Nephrozoa (11.45%, 641-686 MA), Arthropoda (15%, 540 MA), Hexapoda (19.88%, 488 MA) e Brachycera (28.32%, 195 MA). Após a caracterização

evolutiva, os miRNAs foram agrupados em subgrupos, de acordo com a sua ancestralidade inferida, para as análises de conservação (Figura 5).

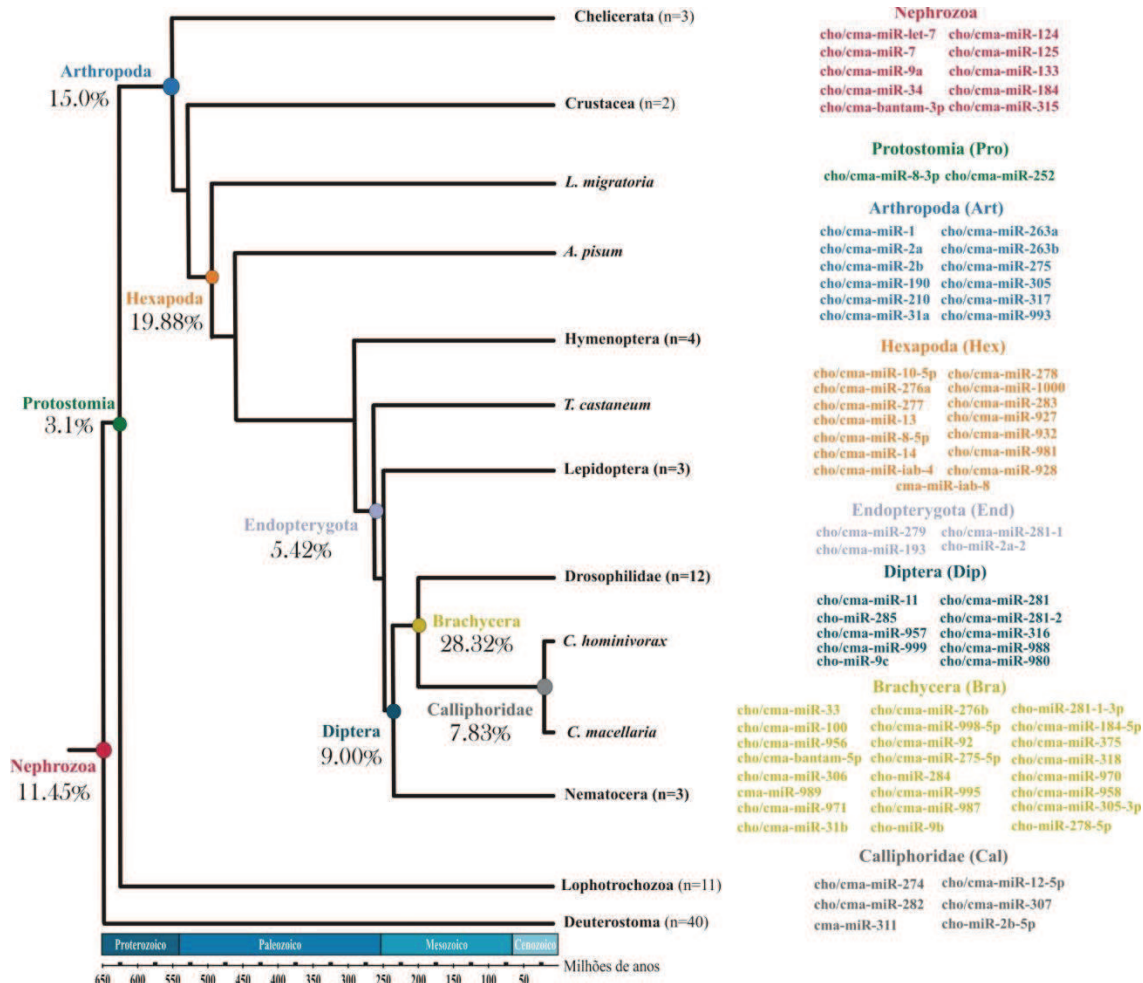


Figura 5. Caracterização evolutiva dos 84 miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*. A árvore filogenética utilizada para inferir as sequências ancestrais de cada miRNA foi adaptada de Wheeler et al., (2009) e Wiegmann et al., (2009). Os tempos de divergência utilizados constam na Sessão 2.3. Cada nó apresenta a porcentagem de miRNAs conservados desde seu ancestral correspondente. Na direita estão apresentados os subgrupos de miRNAs formados pela sua ancestralidade.

A segunda etapa da caracterização evolutiva dos miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, incluiu a verificação da conservação das sequências maduras dos miRNAs em relação a sequência ancestral mais antiga inferida. Essa análise foi realizada através da investigação do número de substituições nucleotídicas de cada subgrupo pela comparação da sequência ancestral mais recente com a mais antiga (quando foi possível determiná-la, ver Sessão 2.3.). Essa análise revelou que os miRNAs dos subgrupos mais recentes (e.g. Endopterygota, Diptera, Brachycera e Calliphoridae) são caracterizados por apresentarem mais substituições nucleotídicas, adquiridas ao longo do tempo evolutivo, em relação aos subgrupos mais antigos (Figura 6.A).

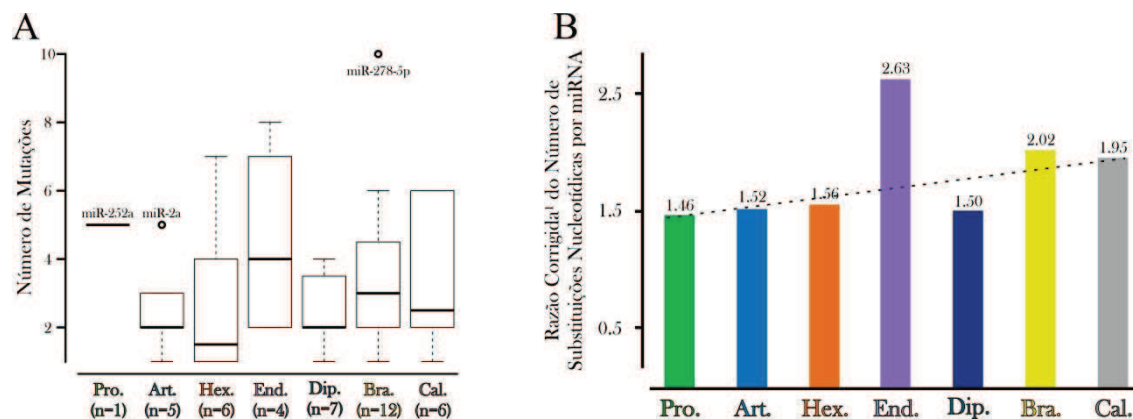


Figura 6. Verificação da conservação das sequências dos miRNAs em cada subgrupo em relação às sequências ancestrais inferidas através da análise de coalescência, mostrando (A) o número de substituições nucleotídicas observadas, e (B) as razões e tendência de substituições nucleotídicas por miRNA. A razão corrigida do número de substituições nucleotídicas por miRNAs foi calculada da seguinte maneira: (Total de substituições observadas no subgrupo / Total de substituições observadas) / (Número de miRNAs que apresentam substituições, em relação a sequência ancestral, / Número total de miRNAs identificados).

As razões entre o número observado de substituições nucleotídicas por miRNA em cada subgrupo, também demonstrou que os miRNAs conservados desde um ancestral mais recente apresentam uma maior tendência no acúmulo de substituições do que aquelas conservadas desde um ancestral mais antigo (Figura 6.B).

Para melhor caracterizar o padrão destas substituições, foram verificadas as posições em que as substituições nucleotídicas ocorreram em cada subgrupo. Esta análise revelou que a maior parte das substituições nos miRNAs de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, desde seu último ancestral comum, tendem a acumular-se na região 3' da sequência, entre as posições 19 e 24 (Figura 7).

A primeira posição nucleotídica também apresentou um grande acúmulo de substituições em 20 a 50% das sequências analisadas. Como esperado, a região *seed* (2-8 nts) apresentou raras substituições, uma vez que esta região é responsável pelo pareamento entre o miRNA e o mRNA-alvo, sendo considerada a porção mais conservada da sequência madura (Lai *et al.*, 2012). As posições da região 3' de 13 a 18nts também apresentaram poucas substituições. Esta região também é conhecidamente de grande importância para o pareamento do miRNA com seu alvo (Wheeler *et al.*, 2009), estando envolvida no processo de regulação por miRNA também conhecida como “3' compensatória” (Brennecke *et al.*, 2005; Belles *et al.*, 2012).

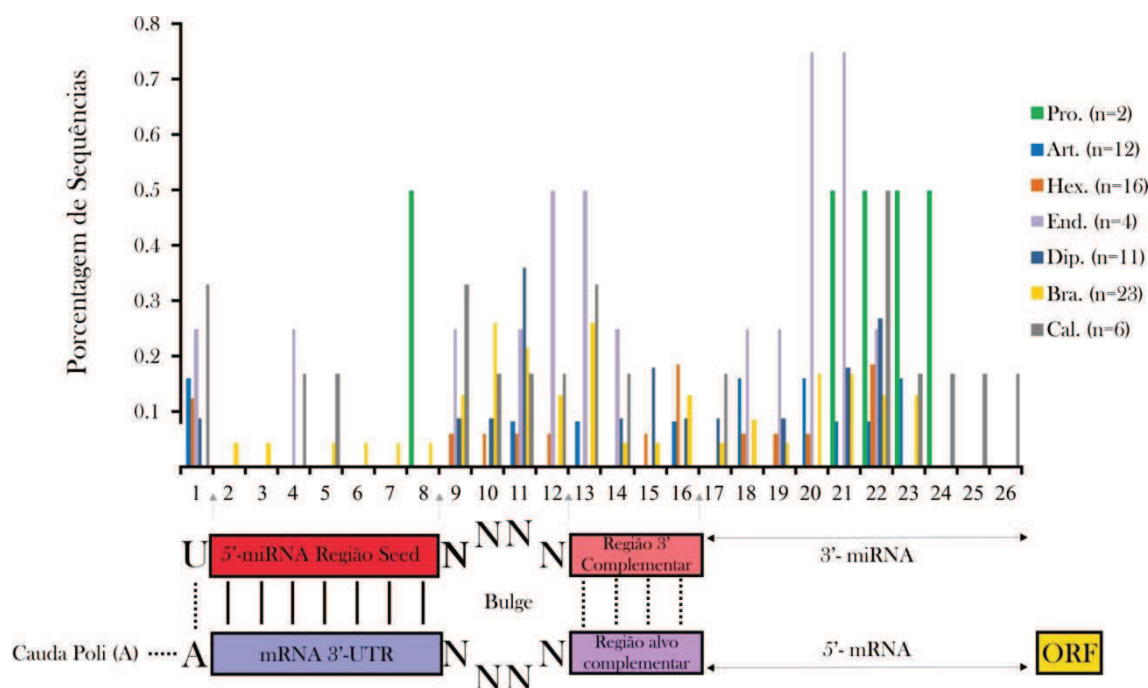


Figura 7. Verificação das posições das substituições nucleotídicas nas sequências maduras dos miRNAs em cada subgrupo em relação às sequências ancestrais inferidas através da análise de coalescência.

4. Discussão

4.1. Caracterização da expressão diferencial de miRNAs em *C. hominivorax* e *C. macellaria*.

O surgimento e evolução do hábito de parasitismo na família Calliphoridae têm sido classicamente investigado a partir de análises filogenéticas (Stevens et al., 2006; Stevens & Wallman, 2006; McDonagh & Stevens, 2011), enquanto poucos estudos analisam a expressão dos genes relacionados aos hábitos alimentares e reprodutivos da família (Cardoso, 2012; Cardoso et al., 2014), além dos genes regulatórios envolvidos nestas vias. Neste contexto, o presente estudo representa a primeira abordagem que

objetivou iniciar a identificação e caracterização de miRNAs das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, bem como da família Calliphoridae, gerando dados essenciais para futuras investigações funcionais e evolutivas nesta família. Neste capítulo, os miRNAs identificados anteriormente (Capítulo I) foram caracterizados segundo sua expressão, acessada a partir da análise indireta da expressão diferencial de miRNAs.

Os dados gerados para os miRNAs miR-8-3p, miR-275-3p e miR-1000 foram ainda validados pela técnica de qRT-PCR, a qual indicou uma alta correlação com os resultados da análise indireta da expressão diferencial. No entanto as técnicas de qRT-PCR e o sequenciamento de nova geração são diferentes quanto à amplificação de sequências. Além disso, alguns autores têm mostrado que a construção de bibliotecas de pequenos RNAs para o sequenciamento massivo pode ser enviesada (Tian et al., 2010; Jayaprakash et al., 2011). Ainda assim, apesar desta não ser a análise mais robusta para verificar a correlação entre as duas técnicas, estes resultados indicam que as análises indiretas de expressão diferencial podem ser utilizadas para estimar e obter dados preliminares da expressão dos miRNAs identificados.

Além das tecnologias de sequenciamento massivo serem as ferramentas mais utilizadas na identificação de miRNAs nas mais diversas espécies de insetos (Belles et al., 2012), os dados gerados podem auxiliar na identificação de genes diferencialmente expressos, através de análises indiretas que utilizam a contagem e normalização dos *reads* gerados (Eisen et al., 1998). Essas análises mostraram que existe um grande conjunto de miRNAs, 79 dos 84 identificados, diferencialmente expressos entre *C. hominivorax* e *C. macellaria*, assim como entre os estágios de desenvolvimento larval e adulto (macho e fêmea).

O miR-8-3p foi o mais abundante em todas as análises realizadas neste trabalho. Esse miRNA está envolvido em redes regulatórias de uma ampla gama de alvos associados à determinação do tamanho corporal e à sinalização de maturação larval via sinalização do receptor de insulina em insetos (Jin et al., 2012), crescimento via sinalização do receptor de insulina (Hyun et al., 2009) e a regulação da expressão da proteína *Atrophin* no cérebro (Karres et al., 2007). Além destas funções, Bryant et al., (2010) demonstraram que esse miRNA, assim como o miR-275, está associado a formação de células adiposas nos primeiros estágios de pupa e em fêmeas no período vitelogênico de *A. aegypti*.

Interessantemente, as análises intraespecíficas mostraram resultados diferentes para as duas espécies. Era esperado que os miRNAs diferencialmente expressos entre os estágios de desenvolvimento investigados das duas espécies fossem semelhantes, principalmente porque os miRNAs são genes indispensáveis para o desenvolvimento (Stefani & Slack, 2008; Gomez-Orte & Belles, 2009; Belles et al., 2012; Rubio et al., 2012; Zhang et al., 2012). No entanto, a análise revelou que a maior parte dos miRNAs são co-expressos entre os estágios de desenvolvimento investigados e que, em quase sua totalidade, a expressão é diferente entre as espécies, mesmo estas sendo filogeneticamente próximas. Este resultado indica que existe uma diferença nos genes que estão sendo regulados nos estágios de desenvolvimento de cada espécie, que não devem estar envolvidos apenas no desenvolvimento, mas possivelmente também com outros aspectos de sua biologia. Uma vez que os miRNAs estão envolvidos em diversas vias de regulação gênica (Filipowicz et al., 2008; Fabian et al., 2010; Sun et al., 2010), além de desempenharem funções principais entre as espécies, estes genes também podem estar envolvidos com a regulação de vias específicas de cada uma das espécies.

Ainda associados ao desenvolvimento, outro dado intrigante foi a maior expressão dos miRNAs let-7, miR-100, miR-125, miR-14 e bantam-3p na fase adulta, embora fosse esperado que estes miRNAs estivessem mais expressos na fase larval, devido ao seu papel na maturação de insetos principalmente nos estágios de pupa, nos insetos holometábolos (Belles et al., 2012; Zhang et al., 2012), e nos estágios de ninfa em insetos hemimetábolos (Orte & Belles, 2009; Rubio et al., 2012). Ainda assim, estes miRNAs estão associados a maturação da fase juvenil para a fase adulta (Caygill & Johnston, 2008), ressaltando que os indivíduos adultos, utilizados neste trabalho, foram de 24 hrs após sua emergência, estando ainda em fase de maturação. O miRNA bantam-3p está associado a divisão de células germinativas em *D.melanogaster* (Hatfield et al., 2005; Shcherbata et al., 2007) e, como já observado por outros autores, esse miRNA parece ter uma expressão relativa aos miRNAs do cluster mir-let7-100-125 (Rubio et al., 2012). Já o mir-14, que está relacionado a modulação de pulsos de hormônios ecdisteroides, responsáveis pelas “mudas” em insetos (Varghese & Cohen, 2007).

Dentre os miRNAs comumente expressos entre as espécies, o miR-998 constituiu um gene a ser investigado mais detalhadamente em fêmeas. Pouco já foi descrito sobre as possíveis funções do miR-998, mas através de uma análise utilizando o software TargetScanFly v.6.2 (targetscan.org/fly/), foi possível predizer 116 alvos conservados no genoma de *D. melanogaster*. Dentre os possíveis genes-alvos de *D. melanogaster* do miR-998, com alta conservação (8-mer) entre a região *seed* do miRNA e a região 3'-UTR do mRNA-alvo, uma grande parte possui funções neurais, como morfogênese neural (Dmel\Pkc98E), memória (Dmel\cer) e especificação espacial de órgãos sensoriais (Dmel\H).

As comparações dos miRNAs diferencialmente expressos entre *C. hominivorax* e *C. macellaria*, poderão ser utilizadas futuramente na escolha de miRNAs que possam estar envolvidos com os diferentes hábitos de parasitismo. Dentre eles, os miRNAs miR-275, miR-276b, miR-998 e miR-1000 são candidatos a serem investigados futuramente. Estes três último miRNAs são diferencialmente expresso em células neurais de *A. mellifera*, principalmente nas castas operárias e zangões (Li et al., 2012), que são responsáveis pelo forrageamento e reprodução na colmeia, respectivamente, além do desenvolvimento de órgãos sensoriais (Chen et al., 2010). Também foi demonstrado que o miR-275 possui papel fundamental no desenvolvimento dos ovos e na digestão de sangue por fêmeas de *A. aegypti* (Bryant et al., 2010). Em *A. mellifera* também foi demonstrado que o miR-275 é diferencialmente expresso em castas operárias (Liu et al., 2012), que são responsáveis pelo forrageamento. Embora seja necessária uma caracterização funcional destes miRNAs nas espécies investigadas no presente estudo, a expressão diferencial destes miRNAs entre as fêmeas de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, pode indicar sua participação nas vias sensoriais associadas a percepção e escolha de ambientes para reprodução e oviposição.

Outra importante estratégia relacionada ao parasitismo nas espécies de insetos, além da capacidade de identificar o ambiente para alimentação, reprodução e desenvolvimento, é a capacidade de sobreviverem a este meio. Neste contexto, o miR-1 parece ser um candidato a ser investigado futuramente. Este gene está associado principalmente com a diferenciação de células do músculo cardíaco (Kwon et al., 2005), mas também já foi relacionado com o estresse oxidativo causado pela ingestão de sangue em Artrópodes hematófagos (Barrero et al., 2011; Bryant et al., 2010). Como as larvas de *C. hominivorax* alimentam-se de tecidos vivos do hospedeiro, e consequentemente de sangue, pode ser que exista também nesta espécie uma correlação entre o estágio larval e

este miRNA. Este miRNA, embora não estatisticamente significativo, parece ter uma expressão diferencial entre as larvas de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, e representa um candidato a ser investigado nos outros estágios larvais não investigados, a fim de verificar sua associação com o hábito de parasitismo destas espécies.

Ainda neste contexto, os miRNAs miR-33, miR-317 e miR-375 representam outro conjunto de miRNAs para essas investigações. Recentemente, foi descrita a participação dos miR-317 e, principalmente, do miR-375 na regulação do gene *cactos* e da proteína REL1 na espécie *A. aegypti* (Hussain et al., 2013). Estes genes estão associados à resposta imunológica antimicrobiana e antifúngica em insetos. Além destes, o miR-33 também parece estar associado à resposta imunológica em *D. melanogaster* nas vias Imd e Toll (Fullaondo & Lee, 2012), responsáveis pela resposta imunológica contra bactérias e fungos (Lemaitre & Hoffmann, 2007). A expressão diferencial destes miRNAs em *C. macellaria* é particularmente interessante pois pode indicar que os genes responsáveis pela resposta imunológica das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria* são regulados diferentemente e podem estar relacionados com a composição de microrganismos presentes nos meios de oviposição e desenvolvimento larval escolhido por estas espécies. Corroborando com esses resultados, também foi observada uma maior expressão relativa do miR-317 na larva de *C. macellaria* em relação a *C. hominivorax*, assim como do miR-315, também relacionado a resposta imune da via imd em *D. melanogaster* (Fullaondo & Lee., 2012).

Levando em consideração que esta espécie se desenvolve em tecidos necrosados ou em matéria orgânica em decomposição, é razoável pensar que sua resposta imunológica seja ativada, principalmente na fase larval. A presença de microrganismos no meio, embora necessário para seu reconhecimento pelas fêmeas, parece não ser necessária para o desenvolvimento das larvas de *C. macellaria* (Ahmad et al., 2006), embora a interação

entre califorídeos e as bactérias presentes no ambiente de desenvolvimento ainda não esteja clara (Thompson et al., 2013).

Em *Lucilia cuprina* (Lucillinae), outra espécie saprófaga da família Calliphoridae, a maior parte dos microrganismos ingeridos pelas larvas durante seu desenvolvimento (do 1º ao 3º instar) permanece no intestino médio, assim como na fase adulta, onde parecem ser combatidos pelo sistema imunológico (Mumcuoglu et al., 2001), e é exatamente onde o miR-317 é mais expresso, pelo menos em fêmeas recém alimentadas, em *A. gambiae* (Winter et al., 2007). Também foi observada uma alta expressão destes miRNAs na fase adulta, corroborando com um recente estudo onde foi demonstrado que a atividade antibacteriana em *L. cuprina* não é induzida pelo meio, mas parece ser constantemente produzida (Barnes & Gennard, 2011). Os resultados apresentados neste capítulo representam dados iniciais da expressão diferencial, mas que poderão auxiliar na escolha de miRNAs a serem investigados mais detalhadamente em trabalhos funcionais futuros, levando em consideração a escolha de ambientes para reprodução, oviposição e desenvolvimento de *C. hominivorax* e *C. macellaria*.

4.2. Caracterização evolutiva dos miRNAs de *C. hominivorax* e *C. macellaria*

A aquisição de miRNAs ao longo do tempo evolutivo, durante a divergência das espécies, têm sido bastante discutida (Wheeler et al., 2009; Kosik, 2009, 2010; Barrero et al., 2011; Zhu et al., 2012), principalmente por haver indícios de que mudanças no repertório, bem como nas sequências dos miRNAs, podem estar associadas ao aumento de complexidade fenotípica nas espécies de Metazoários (Sempere et al., 2006; Grimson et al., 2008; Heimberg et al., 2008; Peterson et al., 2009; Berezikov et al., 2011). No geral, os miRNAs são mais comumente adicionados ao genoma ao longo do tempo evolutivo da

linhagem de uma espécie do que perdidos secundariamente (Sempere et al., 2006; Sperling & Peterson, 2009), e por desempenharem um papel fundamental na regulação gênica, esses genes tornam alvos da seleção natural (Lyu et al., 2014; Zhu et al., 2012)

Lyu et al., (2014) mostraram que em *D. melanogaster* novos miRNAs surgem a cada cerca de 3-4 MA, passando por etapas onde a seleção natural pode manter ou eliminar esses genes (Lu et al., 2008), que parece ser guiada por uma co-evolução entre o miRNA e seus alvos (Kosik, 2010; Zhu et al., 2012). Sendo assim, o aumento ou mudança no repertório de miRNAs, seguido pela evolução adaptativa (e.g. um miRNA pode ser inserido em via de regulação que ele não participava ou pode se associar a novos alvos), pode ser um evento de grande importancia para a especiação das linhagens de animais.

Neste sentido, uma análise de coalescência foi realizada para os 84 miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, a fim de inferir a ancestralidade dessas sequências, como descrito por Wheeler et al., (2009) e Barrero et al., (2011). Foi observado que os miRNAs destas espécies são altamente conservadas desde Nephrozoa (641 MA), na base de bilatória, até Brachycera (195 MA). Interessantemente, a maior parte dos miRNAs mais abundantes nas bibliotecas de pequenos RNAs (ver Figura 6, Capítulo I), ou seja os mais expressos, possuem uma alta conservação com as sequências inferidas de ancestrais mais antigos. Especificamente 77% destes miRNAs são altamente conservados desde Hexapoda (~488 MA) ou de um ancestral mais antigo. Segundo Lu et al., (2008), miRNAs adquiridos de um ancestral antigo no tempo evolutivo, tendem a ser mais expressos do que miRNAs adquiridos de um ancestral mais recente, provavelmente por que estes estão em vias de regulação mais antigas e conservadas.

A análise de coalescência indicou que a maior parte dos miRNAs (cerca de 28%) possuem uma ancestralidade em Brachycera (~195 MA). Também foi verificado que existe

uma tendência no acúmulo de substituições nucleotídicas nas sequências dos miRNAs recentemente adquiridos ao longo do tempo evolutivo. Levando em consideração estes resultados, e a co-evolução dos miRNAs com seus alvos (Kosik., 2009; Zhu et al., 2012), é possível inferir que os miRNAs de *C. hominivorax* e *C. macellaria* possuem uma história evolutiva associada ao seu desenvolvimento e outros aspectos de sua biologia. Devido à alta similaridade destes genes com os descritos para as espécies de *Drosophila* (Diptera: Brachycera), é possível que futuros estudos funcionais, envolvendo miRNAs, em *C. hominivorax* e *C. macellaria* possam ter como base as vias de regulação já descritas para a espécie modelo *D. melanogaster*.

Segundo Wagner & Altenberg (1996) e Zhu et al., (2012), uma vez que os miRNAs “restringem” a expressão gênica eles participam indiretamente da modulação das variações fenotípicas das espécies. Neste sentido, as mudanças nas sequências dos miRNAs podem levar a eventos de especiação (Liu et al., 2008), e à regulação de novos genes alvos. Alguns dos dados obtidos pela caracterização evolutiva realizada neste trabalho parecem corroborar com essa hipótese. Analisando os subgrupos de miRNAs, segundo sua ancestralidade inferida, foi possível observar que as funções, nas vias de regulação, de alguns miRNAs podem estar associadas com seu surgimento ao longo do tempo evolutivo. Dentre estes, foi inferido que as sequências dos miRNAs cho/cma-miR-iab-4 e cma-miR-iab-8 são altamente conservadas desde Hexapoda, o grupo que inclui todos artrópodes com asas (mais especificamente o grupo Pterygota). Como mencionado previamente, esses miRNAs estão envolvidos na diferenciação do segmento torácico da larva que dará origem ao halteres em dípteros (Ronshaugen et al., 2005; Stark et al., 2007, 2008), e ao segundo par de asas em outros insetos (Hui et al., 2013), através da regulação direta do gene *Hox Ultrabithorax (Ubx)*, como descrito para *D. melanogaster* (Petruk et al., 2006).

Uma segunda associação é do cho-miR-2a-2. Este miRNA parece ser um dos miRNAs associados com a metamorfose na fase de pupa em *H. armigera* (Ge et al., 2013) e em *S. litura* (Gao et al., 2012), e sua sequência é altamente conservada desde seu ancestral em Endopterygota, o grupo que engloba os insetos holometábolos, ou seja, que passam pelos estágios de desenvolvimento larval, pupa e adulto.

Alguns autores têm sugerido que a evolução adaptativa dos miRNAs pode estar associada com o aumento da complexidade fenotípica em metazoários (Sempere et al., 2006), ou seja, que as mudanças na sequência madura de um miRNA ao longo do tempo evolutivo de uma linhagem podem estar associada com a diversificação de espécies e sua função nos processos biológicos da mesma, um evento denominado Diversificação Funcional (Liu et al., 2008). Neste sentido, analisando as substituições nucleotídicas que ocorreram nos miRNAs ao longo do tempo evolutivo, raras substituições foram observadas na região *seed* (2-8 nts), que representa na maior parte dos casos a principal sequência para o reconhecimento do mRNA-alvo (Brennecke et al., 2005).

A região 3'-complementar apresentou níveis moderados de substituições nucleotídicas (a maior parte presente em menos de 20% das sequências analisadas), no entanto mais do que observadas na região *seed*, como encontrado por Wheeler et al., (2009) e Barrero et al., (2011). Esta região também é reconhecidamente de grande importância para o pareamento do miRNA com seu alvo (Wheeler et al., 2009), estando envolvida no processo de regulação por miRNA também conhecida como “3’ Compensatória” (Brennecke et al., 2005; Belles et al., 2012). Uma análise mais detalhada poderá indicar se esta região pode ser determinante no reconhecimento de diferentes genes-alvos entre as espécies, estendendo-as para futuros estudos evolutivos abrangendo os miRNAs e seus alvos em *C. hominivorax* e *C. macellaria*, assim como na família Calliphoridae.

5. Referências

- Ahmad, A., Broce, A., Zurek, L., 2006. Evaluation of significance of bacteria in larval development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 43, 1129–1133.
- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., Tuschl, T., 2003. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell.*
- Barnes, K.M., Gennard, D.E., 2011. The effect of bacterially-dense environments on the development and immune defences of the blowfly *Lucilia sericata*. *Physiol. Entomol.* 36, 96–100.
- Barrero, R.A., Keeble-Gagnère, G., Zhang, B., Moolhuijzen, P., Ikeo, K., Tateno, Y., Gojobori, T., Guerrero, F.D., Lew-Tabor, A., Bellgard, M., 2011. Evolutionary conserved microRNAs are ubiquitously expressed compared to tick-specific miRNAs in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics* 12, 328.
- Behura, S.K., 2007. Insect microRNAs: Structure, function and evolution. *Insect Biochem. Mol. Biol.*
- Belles, X., Cristino, A.S., Tanaka, E.D., Rubio, M., Piulachs, M.D., 2012. Insect MicroRNAs: From Molecular Mechanisms to Biological Roles. In: *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier, pp. 30–56.
- Berezikov, E., Robine, N., Samsonova, A., Westholm, J.O., Naqvi, A., Hung, J.-H., Okamura, K., Dai, Q., Bortolamiol-Becet, D., Martin, R., Zhao, Y., Zamore, P.D., Hannon, G.J., Marra, M.A., Weng, Z., Perrimon, N., Lai, E.C., 2011. Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence. *Genome Res.* 21, 203–215.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2005. Principles of microRNA-target recognition. In: *PLoS Biology*. pp. 0404–0418.
- Bryant, B., Macdonald, W., Raikhel, A.S., 2010. microRNA miR-275 is indispensable for blood digestion and egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22391–8.

- Caygill, E.E., Johnston, L.A., 2008. Temporal Regulation of Metamorphic Processes in *Drosophila* by the *let-7* and *miR-125* Heterochronic MicroRNAs. *Curr. Biol.* 18, 943–950.
- Chen, X., Yu, X., Cai, Y., Zheng, H., Yu, D., Liu, G., Zhou, Q., Hu, S., Hu, F., 2010. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 19, 799–805.
- De Hoon, M.J.L., Imoto, S., Nolan, J., Miyano, S., 2004. Open source clustering software. *Bioinformatics* 20, 1453–1454.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14863–14868.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W., 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351–379.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–14.
- Fullaondo, A., Lee, S.Y., 2012. Identification of putative miRNA involved in *Drosophila melanogaster* immune response. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 267–73.
- Gao, L., Zuo, H., Liu, K., Li, H., Zhong, G., 2012. A New Strategy for Identification of Highly Conserved microRNAs in Non-Model Insect, *Spodoptera litura*. *Int. J. Mol. Sci.*
- Ge, X., Zhang, Y., Jiang, J., Zhong, Y., Yang, X., Li, Z., Huang, Y., Tan, A., 2013. Identification of microRNAs in *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* based on deep sequencing and homology analysis. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1–15.
- Gomez-Orte, E., Belles, X., 2009. MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolan insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21678–82.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34, D140–4.
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degnan, B.M., Rokhsar, D.S., Bartel, D.P., 2008. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 455, 1193–1197.

- Hatfield, S.D., Shcherbata, H.R., Fischer, K.A., Nakahara, K., Carthew, R.W., Ruohola-Baker, H., 2005. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 435, 974–978.
- Heimberg, A.M., Sempere, L.F., Moy, V.N., Donoghue, P.C.J., Peterson, K.J., 2008. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2946–2950.
- Hui, J.H.L., Marco, A., Hunt, S., Melling, J., Griffiths-Jones, S., Ronshaugen, M., 2013. Structure, evolution and function of the bi-directionally transcribed iab-4/iab-8 microRNA locus in arthropods. *Nucleic Acids Res.* 41, 3352–61.
- Hussain, M., Frentiu, F.D., Moreira, L. a, O'Neill, S.L., Asgari, S., 2011. Wolbachia uses host microRNAs to manipulate host gene expression and facilitate colonization of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9250–5.
- Hussain, M., Walker, T., O'Neill, S.L., Asgari, S., 2013. Blood meal induced microRNA regulates development and immune associated genes in the Dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 146–152.
- Hyun, S., Lee, J.H., Jin, H., Nam, J., Namkoong, B., Lee, G., Chung, J., Kim, V.N., 2009. Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and Its Target USH/FOG2 Control Growth by Regulating PI3K. *Cell* 139, 1096–1108.
- Jin, H., Kim, V.N., Hyun, S., 2012. Conserved microRNA miR-8 controls body size in response to steroid signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.*
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. *Mamm. protein Metab.* Vol. III (1969), pp. 21-132 III, 21–132.
- Karres, J.S., Hilgers, V., Carrera, I., Treisman, J., Cohen, S.M., 2007. The Conserved microRNA MiR-8 Tunes Atrophia Levels to Prevent Neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell* 131, 136–145.
- Koichiro Tamura^{1, 2}, Daniel Peterson², Nicholas Peterson², Glen Stecher², Masatoshi Nei³ and Sudhir Kumar^{2, 4*}, 2011. MEGA 5. *Mol. Biol. Evol.*
- Kosik, K.S., 2009. MicroRNAs tell an evo-devo story. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 754–759.
- Kosik, K.S., 2010. MicroRNAs and cellular phenotypy. *Cell.*
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2013. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 1–6.

- Kwon, C., Han, Z., Olson, E.N., Srivastava, D., 2005. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18986–18991.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697–743.
- Li, L., Liu, F., Li, W., Li, Z., Pan, J., Yan, L., Zhang, S., Huang, Z.Y., Su, S., 2012. Differences in microRNAs and their expressions between foraging and dancing honey bees, *Apis mellifera* L. *J. Insect Physiol.* 58, 1438–1443.
- Liu, F., Peng, W., Li, Z., Li, W., Li, L., Pan, J., Zhang, S., Miao, Y., Chen, S., Su, S., 2012. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *Insect Mol. Biol.* 21, 297–303.
- Liu, N., Okamura, K., Tyler, D.M., Phillips, M.D., Chung, W.-J., Lai, E.C., 2008. The evolution and functional diversification of animal microRNA genes. *Cell Res.* 18, 985–996.
- Lu, J., Fu, Y., Kumar, S., Shen, Y., Zeng, K., Xu, A., Carthew, R., Wu, C.-I., 2008. Adaptive evolution of newly emerged micro-RNA genes in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 25, 929–38.
- Lyu, Y., Shen, Y., Li, H., Chen, Y., Guo, L., Zhao, Y., Hungate, E., Shi, S., Wu, C.-I., Tang, T., 2014. New MicroRNAs in *Drosophila*—Birth, Death and Cycles of Adaptive Evolution. *PLoS Genet.* 10, e1004096.
- McDonagh, L.M., Stevens, J.R., 2011. The molecular systematics of blowflies and screw worm flies (Diptera: Calliphoridae) using 28S rRNA, COX1 and EF-1 α : insights into the evolution of dipteran parasitism. *Parasitology* 138, 1760–77.
- Mumcuoglu, K.Y., Miller, J., Mumcuoglu, M., Friger, M., 2001. Destruction of Bacteria in the Digestive Tract of the Maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Destruction of Bacteria in the Digestive Tract of the Maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae)* 38, 161–166.
- Peterson, K.J., Cotton, J.A., Gehling, J.G., Pisani, D., 2008. The Ediacaran emergence of bilaterians: congruence between the genetic and the geological fossil records. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 1435–1443.

- Peterson, K.J., Dietrich, M.R., McPeck, M. a, 2009. MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *Bioessays* 31, 736–47.
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Kambic, R.E., 2005. Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crustaceans and maxillopods are not monophyletic. *Proc. Biol. Sci.* 272, 395–401.
- Romualdi, C., Bortoluzzi, S., D'Alessi, F., Danieli, G.A., 2003. IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiol. Genomics* 12, 159–162.
- Ronshaugen, M., Biemar, F., Piel, J., Levine, M., Lai, E.C., 2005. The *Drosophila* microRNA *iab-4* causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. *Genes Dev.* 19, 2947–2952.
- Rubio, M., de Horna, A., Belles, X., 2012. MicroRNAs in metamorphic and non-metamorphic transitions in hemimetabolan insect metamorphosis. *BMC Genomics* 13, 386.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Sempere, L.F., Cole, C.N., McPeck, M.A., Peterson, K.J., 2006. The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 306, 575–588.
- Shcherbata, H.R., Ward, E.J., Fischer, K.A., Yu, J.Y., Reynolds, S.H., Chen, C.H., Xu, P., Hay, B.A., Ruohola-Baker, H., 2007. Stage-Specific Differences in the Requirements for Germline Stem Cell Maintenance in the *Drosophila* Ovary. *Cell Stem Cell* 1, 698–709.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*
- Sokol, N.S., Xu, P., Jan, Y.-N., Ambros, V., 2008. *Drosophila* *let-7* microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis. *Genes Dev.* 22, 1591–1596.

- Sperling, E.A., Peterson, K.J., 2009. microRNAs and metazoan phylogeny: big trees from little genes. In: Telford MJ, L.D. (Ed.), *Animal Evolution—genomes, Trees ...*. Oxford Univ Press, Oxford, pp. 157–210.
- Stark, A., Bushati, N., Jan, C.H., Kheradpour, P., Hodges, E., Brennecke, J., Bartel, D.P., Cohen, S.M., Kellis, M., 2008. A single Hox locus in *Drosophila* produces functional microRNAs from opposite DNA strands. *Genes Dev.* 22, 8–13.
- Stark, A., Kheradpour, P., Parts, L., Brennecke, J., Hodges, E., Hannon, G.J., Kellis, M., 2007. Systematic discovery and characterization of fly microRNAs using 12 *Drosophila* genomes 1865–1879.
- Stefani, G., Slack, F.J., 2008. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 219–30.
- Stevens, J.R., Wallman, J.F., 2006. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part I): phylogenetic analyses. *Trends Parasitol.* 22, 129–36.
- Stevens, J.R., Wallman, J.F., Otranto, D., Wall, R., Pape, T., 2006. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part II): biological and life-history studies. *Trends Parasitol.* 22, 181–8.
- Sun, W., Julie Li, Y.-S., Huang, H.-D., Shyy, J.Y.-J., Chien, S., 2010. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 12, 1–27.
- Thompson, C.R., Brogan, R.S., Scheifele, L.Z., Rivers, D.B., 2013. Bacterial Interactions with Necrophagous Flies. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 799-809.
- Varghese, J., Cohen, S.M., 2007. microRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.* 21, 2277–2282.
- Wagner, G.P.A.L., 1996. Perspective: Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution* 50, 967–976.
- Wheeler, B.M., Heimberg, A.M., Moy, V.N., Sperling, E. a, Holstein, T.W., Heber, S., Peterson, K.J., 2009. The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol. Dev.* 11, 50–68.

- Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Kim, J.-W., Cassel, B.K., Bertone, M. a, Winterton, S.L., Yeates, D.K., 2009. Single-copy nuclear genes resolve the phylogeny of the holometabolous insects. *BMC Biol.* 7, 34.
- Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.-W., Lambkin, C., Bertone, M. a, Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Pape, T., Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S.N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G.E., Thompson, F.C., Grimaldi, D. a, Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K., 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5690–5.
- Winter, F., Edaye, S., Hüttenhofer, A., Brunel, C., 2007. *Anopheles gambiae* miRNAs as actors of defence reaction against *Plasmodium* invasion. *Nucleic Acids Res.* 35, 6953–6962.
- Yang, Z., Kumar, S., Nei, M., 1995. A new method of inference of ancestral nucleotide and amino acid sequences. *Genetics* 141, 1641–1650.
- Zhang, X., Zheng, Y., Jagadeeswaran, G., Ren, R., Sunkar, R., Jiang, H., 2012. Identification and developmental profiling of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 381–95.
- Zhu, Y., Skogerbø, G., Ning, Q., Wang, Z., Li, B., Yang, S., Sun, H., Li, Y., 2012. Evolutionary relationships between miRNA genes and their activity. *BMC Genomics* 13, 718.

Capítulo II

Anexo A

A1. Normalização dos miRNAs evolutivamente conservados identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria* utilizada nas análises indiretas de expressão diferencial.

miRNA-ID	Reads normalizados ¹					
	C. hominivorax			C. macellaria		
	Larva	Fêmea	Macho	Larva	Fêmea	Macho
bantam-3p	415.9	780.3	1207.4	415.6	573.2	821.8
bantam-5p	0	0	10.9	0	36.3	10.0
let-7	0	52.1	50.0	37.1	28.7	43.2
miR-1	55.8	31.3	60.9	37.1	19.1	29.3
miR-100	0	0	16.3	0	0	11.6
miR-1000	38.0	93.8	26.1	55.7	34.4	23.1
miR-10-3p	0	181.7	0	126.2	97.4	34.7
miR-10-5p	753.2	178.7	238.2	597.4	288.5	190.4
miR-11	58.3	43.2	48.10	55.7	49.7	34.7
miR-124	0	23.8	17.4	0	0	12.3
miR-125	0	29.8	20.7	0	28.7	14.6
miR-12-5p	40.6	25.3	22.8	55.7	28.7	24.7
miR-133	38.0	28.3	17.4	0	38.2	12.3
miR-13b	27.9	26.8	28.3	37.1	19.1	12.3
miR-14	139.5	454.2	531.9	100.2	267.5	215.8
miR-184-3p	339.8	731.2	521.0	660.5	355.4	749.3
miR-184-5p	0	17.9	57.7	55.7	0	40.9
miR-190	0	38.7	20.7	0	28.7	12.3
miR-193-3p	0	38.7	0	0	0	19.3
miR-210	0	20.8	36.10	0	26.7	71.7
miR-252	58.3	40.2	34.8	37.1	24.8	22.4
miR-263a	299.3	262.1	203.4	653.1	227.4	278.3
miR-263b	0	25.3	0	0	0	11.6
miR-274	0	26.8	48.10	0	34.4	44.7
miR-275-3p	88.8	92.3	22.8	89.1	28.7	12.3
miR-275-5p	32.10	0	0	51.9	0	0
miR-276a	253.6	921.8	943.1	448.10	391.7	716.2
miR-276b	27.9	142.10	213.2	81.6	40.1	135.7
miR-277	0	265.1	232.8	59.4	223.5	247.5
miR-278-3p	32.10	14.9	44.6	37.1	0	16.2
miR-278-5p	0	26.8	13.1	0	0	0

Tabela A1. Continuação

miRNA-ID	Reads normalizados ¹					
	C. hominivorax			C. macellaria		
	Larva	Fêmea	Macho	Larva	Fêmea	Macho
miR-279	55.8	29.8	22.8	63.1	30.6	21.6
miR-281-1-3p	32.10	29.8	40.2	59.4	0	14.6
miR-281-1-5p	0	0	17.4	0	36.3	63.2
mir-281-2	86.2	111.7	277.4	85.3	145.2	219.7
miR-282	40.6	16.4	10.9	55.7	0	0
miR-283	40.6	26.8	26.1	89.1	36.3	25.4
miR-284	0	14.9	14.1	0	0	0
miR-285	0	32.8	19.6	0	0	0
miR-2a	53.3	239.8	94.6	55.7	40.1	26.10
miR-2a-2	0	34.3	14.1	0	0	0
miR-2b-3p	53.3	108.7	94.6	70.5	47.8	31.6
miR-2b-5p	0	0	18.5	0	0	0
miR-305-3p	0	0	20.7	0	0	0
miR-305-5p	154.7	53.6	62.0	178.1	51.6	60.9
miR-306	38.0	25.3	17.4	59.4	28.7	11.6
miR-307a	0	62.5	98.10	0	32.5	109.5
miR-311	0	0	0	59.4	126.1	0
miR-315	40.6	22.3	18.5	166.10	30.6	13.1
miR-316	43.1	25.3	20.7	70.5	28.7	16.2
miR-317	43.1	28.3	57.7	200.4	168.1	99.4
miR-318	0	0	10.9	0	80.2	0
miR-31a	890.2	1088.6	390.5	474.10	156.7	306.8
miR-31b	65.9	31.3	14.1	111.3	70.7	11.6
miR-33	215.6	46.2	155.6	152.1	202.5	183.5
miR-34	0	25.3	26.1	63.1	43.9	70.2
miR-375	32.10	14.9	31.5	70.5	63.0	46.3
miR-7	0	0	20.7	0	28.7	13.1
mir-8-3p	4133.9	887.6	1130.2	2541.7	1830.3	1342.1
mir-8-5p	0	43.2	97.9	55.7	64.10	72.5
miR-927	38.0	22.3	28.3	0	53.5	26.2
miR-929	0	23.8	0	0	0	12.3
miR-92b	73.5	26.8	17.4	122.4	53.5	12.3
miR-932	0	25.3	17.4	0	0	11.6
miR-956	532.6	1474.3	1800.3	582.6	3037.8	2934.8
miR-957	0	29.8	42.4	0	28.7	17.7
miR-958	258.7	29.8	64.2	55.7	42.0	87.9

Tabela A1. Continuação

miRNA-ID	Reads normalizados ¹					
	C. hominivorax			C. macellaria		
	Larva	Fêmea	Macho	Larva	Fêmea	Macho
miR-970	0	23.8	19.6	59.4	28.7	15.4
miR-971	0	22.3	0	0	0	11.6
miR-980	43.1	0	16.3	63.1	28.7	0
miR-981	0	25.3	0	0	0	11.6
miR-987	0	67.0	39.2	81.6	36.3	18.5
miR-988	0	0	0	0	0	11.6
miR-989	0	0	0	0	40.1	0
miR-993	0	23.8	0	0	0	12.3
miR-995	45.7	25.3	30.5	63.1	34.4	14.6
miR-996	40.6	31.3	83.8	59.4	47.8	18.5
miR-998	0	23.8	0	0	21.0	8.5
miR-999	35.5	61.1	126.2	66.8	59.2	67.1
miR-9a	71.0	227.8	44.6	115.0	89.8	41.6
miR-9b	45.7	84.9	32.6	170.7	47.8	12.3
miR-9c	55.8	137.0	122.9	126.2	116.5	13.1
miR-iab-4	38.0	0	0	59.4	0	0
miR-iab-8	0	0	0	0	0	11.6

¹ A normalização dos *reads* de cada miRNA em cada uma das bibliotecas de pequenos RNAs foi realizada como descrito na Sessão 2.1, Capítulo II. Os dados utilizados na normalização foram os apresentados na Tabela 2, Capítulo I, sendo o número de *reads* utilizado para as normalizações nas bibliotecas de *C. hominivorax*: Larva=3.943; Fêmea=6.715; Macho=9.193, e nas bibliotecas de *C. macellaria*: Larva=2.695; Fêmea=5.234; Macho=12.972. A escala dos resultado da normalização é de 4×10^{-4} .

Tabela A2. Análise interespecífica da expressão diferencial de miRNAs nos estágios de desenvolvimento (A) larval, e adulto (B) fêmea e (C) macho, das espécies *C. hominivorax* (C.hom) e *C. macellaria* (C.mac).

A

miRNA	Reads ¹		Fold Change ²	
	C.hom	C.mac	C.hom	C.mac
miR-31a	1088,6	156,7	6,94	0,1439464
miR-2a	239,8	40,1	5,98	0,1672227
miR-276b	142,1	40,1	3,54	0,2821956
miR-275-3p	92,3	28,7	3,21	0,3109426
miR-1000	93,8	34,4	2,72	0,3667377
miR-9a	227,8	89,8	2,53	0,3942054
miR-276a	921,8	391,7	2,35	0,4249295
miR-184-3p	731,2	355,4	2,05	0,4860503
miR-10-3p	181,7	97,4	1,86	0,5360484
miR-14	454,2	267,5	1,69	0,5889476
bantam-3p	780,3	573,2	1,36	0,7345893
miR-10-5p	178,7	288,5	0,6194107	1,61
mir-8-3p	887,6	1830,3	0,4849478	2,06
miR-956	1474,3	3037,8	0,4853183	2,06
miR-375	14,9	63	0,2365079	4,22
miR-33	46,2	202,5	0,2281481	4,38
miR-317	28,3	168,1	0,1683522	5,93

B

miRNA	Reads ¹		Fold Change ²	
	C.hom	C.mac	C.hom	C.mac
miR-958	258,7	55,7	4,64	0,2153073
miR-31a	890,2	474,1	1,9	0,5325769
mir-8-3p	4133,9	2541,7	1,62	0,6148431
miR-276a	253,6	448,1	0,5659451	1,76
miR-184-3p	339,8	660,5	0,5144587	1,94
miR-263a	299,3	653,1	0,4582759	2,2
miR-9b	45,7	170,7	0,2677211	3,73
miR-315	40,6	166,1	0,2444311	4,1
miR-317	43,1	200,4	0,2150699	4,64

Tabela A2. Continuação

C

miRNA	Reads ¹		Fold Change ²	
	C.hom	C.mac	C.hom	C.mac
miR-996	83,8	18,5	4,52	0,2207637
miR-2a	94,6	26,1	3,62	0,2758985
miR-2b-3p	94,6	31,6	2,99	0,3340381
miR-278-3p	44,6	16,2	2,75	0,3632287
miR-14	531,9	215,8	2,46	0,4057154
miR-999	126,2	67,1	1,88	0,5316957
miR-276b	213,2	135,7	1,57	0,6364916
bantam-3p	1207,4	821,8	1,47	0,6806361
miR-276a	943,1	716,2	1,31	0,7594105
mir-8-3p	1130,2	1342,1	0,8421131	1,18
miR-263a	203,4	278,3	0,730866	1,36
miR-184-3p	521	749,3	0,6953156	1,43
miR-956	1800,3	2934,8	0,6134319	1,63
miR-34	26,1	70,2	0,3717949	2,68
miR-281-1-5p	17,4	63,2	0,2753165	3,63

¹ O número de *reads* de um miRNA normalizado pelo total de *reads* mapeados no genoma de *D.melanogaster* e no banco miRBase v.20 (Griffiths-Jones et al., 2008) x10E-4.

² *Fold Change* refere-se a mudança da expressão relativa de um dado miRNA calculado pela razão entre os *reads* normalizados de cada biblioteca analisada. O aumento da expressão relativa entre miRNAs (*Fold Increase*) está mostrado em negrito.

Apenas as mudanças estatisticamente significantes ($P < 3.96E-5$ e $5.9E-4$ para os testes AC/Chi2x2 e Chi, respectivamente) estão sendo mostradas.

Tabela A3. Análise intraespecífica da expressão diferencial de miRNAs nos estágios de desenvolvimento larval e adulto (fêmea e macho), das espécies (A) *C. hominivorax* e (B) *C. macellaria*.

A

miRNA	Reads ¹			Fold Change ²						Valores-P		
	Larva	Fêmea	Macho	Larv./Fêm.	Larv./Mac.	Fêm./Larv.	Fêm./Mac.	Mac./Larv.	Mac./Fêm.	Larv./Fêm.	Larv./Mac.	Fêm./Mac.
miR-958	258,7	29,8	64,2	8,68	4,02	0,11	0	0,24	0	0.000000	0.000000	0.000321
miR-10-5p	753,2	178,7	238,2	4,21	3,16	0,23	0	0,31	0	0.000000	0.000000	0.000716
miR-305-5p	154,7	53,6	62	2,88	2,49	0,34	0	0,4	0	0.000000	0.000000	0.028240
miR-92b	73,5	26,8	17,4	0	4,22	0	0	0,23	0	0.000124	0.000000	0.026052
miR-9a	71	227,8	44,6	0,31	0	3,2	5,1	0	0,19	0.000000	0.005165	0.000000
miR-2a	53,3	239,8	94,6	0,22	0	4,49	2,53	0	0,39	0.000000	0.001278	0.000000
miR-1000	38	93,8	26,1	0	0	0	3,59	0	0,27	0.000123	0.020800	0.000000
miR-9b	45,7	84,9	32,6	0	0	0	2,6	0	0,38	0.002185	0.019215	0.000003
miR-184-5p	0	17,9	57,7	nd	nd	nd	0,31	nd	3,22	0.001447	0.000000	0.000013
mir-281-2	86,2	111,7	277,4	0	0,31	0	0,4	3,21	2,48	0.013577	0.000000	0.000000
mir-8-5p	0	43,2	97,9	nd	nd	nd	0,44	nd	2,26	0.000001	0.000000	0.000009
miR-996	40,6	31,3	83,8	0	0	0	0,37	0	2,67	0.035902	0.000576	0.000003
miR-999	35,5	61,1	126,2	0,58	0,28	0	0,48	3,55	2,06	0.008616	0.000000	0.000005
miR-275-3p	88,8	92,3	22,8	0	3,89	0	4,04	0,25	0,24	0.030578	0.000000	0.000000
miR-31a	890,2	1088,6	390,5	0	2,27	0	2,78	0,43	0,35	0.000071	0.000000	0.000000
miR-31b	65,9	31,3	14,1	0	4,67	0	2,21	0,21	0,45	0.001681	0.000001	0.004275
miR-33	215,6	46,2	155,6	4,66	0	0,21	0,3	0	3,36	0.000000	0.001047	0.000000
mir-8-3p	4133,9	887,6	1130,2	4,65	3,65	0,21	0,8	0,27	1,27	0.000000	0.000000	0.000000
bantam-3p	415,9	780,3	1207,4	0,53	0,34	1,87	0,64	2,9	1,54	0.000000	0.000000	0.000000
miR-184-3p	339,8	731,2	521	0,46	0,65	2,15	1,4	1,53	0,71	0.000000	0.000000	0.000000
miR-9c	55,8	137	122,9	0,4	0,45	2,45	0	2,2	0	0.000007	0.000031	0.017545
miR-956	532,6	1474,3	1800,3	0,36	0,29	2,76	0,81	3,38	1,22	0.000000	0.000000	0.000000
miR-14	139,5	454,2	531,9	0,3	0,26	3,25	0	3,81	0	0.000000	0.000000	0.001149
miR-276a	253,6	921,8	943,1	0,27	0,26	3,63	0	3,71	0	0.000000	0.000000	0.008063
miR-276b	27,9	142,1	213,2	0,2	0,13	5,09	0	7,64	0	0.000000	0.000000	0.000099

Tabela A3. Continuação.

B

miRNA	Reads ¹			Fold Change ²						Valores-P		
	Larva	Fêmea	Macho	Larv./Fêm.	Larv./Mac.	Fêm./Larv.	Fêm./Mac.	Mac./Larv.	Mac./Fêm.	Larv./Fêm.	Larv./Mac.	Fêm./Mac.
miR-263a	653,1	227,4	278,3	2,87	2,46	0,34	0	0,42	0	0.000000	0.000000	0.001831
miR-275-3p	89,1	28,7	12,3	0	7,24	0	0	0,13	0	0.000095	0.000000	0.002887
miR-283	89,1	36,3	25,4	0	3,5	0	0	0,28	0	0.000575	0.000001	0.015754
miR-305-5p	178,1	51,6	60,9	3,45	2,29	0,28	0	0,34	0	0.000000	0.000000	0.019169
miR-306	59,4	28,7	11,6	0	5,12	0	0	0,19	0	0.006381	0.000002	0.002091
miR-315	166,1	30,6	13,1	5,42	12,6	0,18	0	0,078	0	0.000000	0.000000	0.002296
miR-316	70,5	28,7	16,2	0	4,35	0	0	0,22	0	0.001547	0.000001	0.009823
miR-970	59,4	28,7	15,4	0	3,85	0	0	0,25	0	0.006381	0.000017	0.008042
miR-987	81,6	36,3	18,5	0	4,41	0	0	0,22	0	0.001521	0.000000	0.003489
bantam-3p	415,6	573,2	821,8	0	0,5	0	0,69	1,97	1,43	0.000182	0.000000	0.000000
miR-210	0	26,7	71,7	nd	nd	nd	0,37	nd	2,68	0.001014	0.000000	0.000019
miR-276a	448,1	391,7	716,2	0	0,62	0	0,54	1,59	1,82	0.007707	0.000000	0.000000
miR-281-2	85,3	145,2	219,7	0	0,38	0	0	2,57	0	0.002114	0.000000	0.000057
miR-276b	81,6	40,1	135,7	0	0	0	0,29	0	3,38	0.002850	0.000870	0.000000
miR-307a	0	32,5	109,5	nd	nd	nd	0,29	nd	3,36	0.000292	0.000000	0.000000
miR-10-3p	126,2	97,4	34,7	0	3,63	0	2,8	0,27	0,35	0.015356	0.000000	0.000000
miR-10-5p	597,4	288,5	190,4	2,07	3,13	0,48	1,51	0,31	0,65	0.000000	0.000000	0.000005
miR-317	200,4	168,1	99,4	0	2,01	0	1,7	0,49	0,59	0.014088	0.000003	0.000016
miR-31b	111,3	70,7	11,6	0	9,59	0	6,09	0,104	0,16	0.006264	0.000000	0.000000
miR-8-3p	2541,7	1830,3	1342,1	1,38	1,89	0,72	1,36	0,52	0,73	0.000000	0.000000	0.000000
miR-92b	122,4	53,5	12,3	0	9,95	0	4,34	0,1	0,22	0.000198	0.000000	0.000000
miR-9a	115	89,8	41,6	0	2,76	0	2,15	0,36	0,46	0.017829	0.000002	0.000018
miR-9b	170,7	47,8	12,3	3,57	13,87	0,28	3,88	0,07	0,25	0.000000	0.000000	0.000004
miR-9c	126,2	116,5	13,1	0	9,63	0	8,89	0,1	0,11	0.027032	0.000000	0.000000
miR-184-3p	660,5	355,4	749,3	1,85	0	0,53	0,47	0	2,1	0.000000	0.001630	0.000000
miR-31a	474,1	156,7	306,8	3,02	1,54	0,33	0,51	0,64	1,95	0.000000	0.000001	0.000000
miR-14	100,2	267,5	215,8	0,37	0,46	2,66	0	2,15	0	0.000000	0.000002	0.001463
miR-277	59,4	223,5	247,5	0,26	0,24	3,76	0	4,16	0	0.000000	0.000000	0.007892
miR-956	582,6	3037,8	2934,8	0,2	0,19	5,2	0	5,03	0	0.000000	0.000000	0.001762

¹ O número de *reads* de um miRNA normalizado pelo total de *reads* mapeados no genoma de *D.melanogaster* e no banco miRBase v.20 (Griffiths-Jones et al., 2008) x10E-4.

² *Fold Change* refere-se a mudança da expressão relativa de um dado miRNA calculado pela razão entre os *reads* normalizados de cada biblioteca analisada. O aumento da expressão relativa entre miRNAs (*Fold Increase*) está mostrado em negrito.

As mudanças estatisticamente significantes ($P < 3.96E-5$ e $5.9E-4$ para os testes AC/Chi2x2 e Chi, respectivamente) estão sendo mostradas em negrito (*Fold Change*) e nas caixas em amarelo (Valores-P).

Capítulo II

Anexo B

Tabela B1. Resultado da caracterização evolutiva dos miRNAs: miR-252, miR-2a-3p, miR-iab-4, miR-193-3p, miR-980 e miR-275-3p das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, conservados desde sua sequência ancestral em Protostomia, Arthropoda, Hexapoda, Endoptrygota, Diptera, Brachycera e Calliphoridae, respectivamente.

miRNA-ID ¹	Sequência do miRNA	Espécies
cel-miR-252-5p	AUAAGUAGUAGUGCCGCAGGUAA	<i>C. elegans</i>
lgi-miR-252a	CUAAGUACUGGUGCCGCGGA	<i>L. gigantea</i>
api-miR-252a	CUAAGUACUAGUGCCGCGGAG	<i>A. pisum</i>
nvi-miR-252	CUAAGUACUAGUGCCGCAGGAG	<i>N. vitripennis</i>
tca-miR-252a-5p	CUAAGUACUAGUGCCGCAGG	<i>T. castaneum</i>
mse-miR-252	CUAAGUACUAGUGCCGCAGGAG	<i>M. sexta</i>
cqu-miR-252-5p	CUAAGUACUAGUGCCGCAGGAG	<i>C. quinquefasciatus</i>
dme-miR-252-5p	CUAAGUACUAGUGCCGCAGGAG	<i>D. melanogaster</i>
cho-miR-252	CUAAGUACUAGUGCCGCAGGAG	<i>C. hominivorax</i>
cma-miR-252	CUAAGUACUAGUGCCGCAGGAG	<i>C. macellaria</i>
Ancestral-seq	CUAAGUACUAGUGCCGCAGGAG	"Protostomia ancestor"
Ancestral-seq	CUAAGUAGUAGUGCCGCAGGUAA	"Nephrozoa ancestor"
sme-miR-2a	UAUCACAGCCCGCUUGAACGCU	<i>S. mediterranea</i>
cte-miR-2a	UAUCACAGCCCGCUUUGUUGACU	<i>C. teleta</i>
cho-miR-2a	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGC	<i>C. hominivorax</i>
cma-miR-2a	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGC	<i>C. macellaria</i>
isc-miR-2a	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGC	<i>I. scapularis</i>
dpu-miR-2a	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGC	<i>D. pulex</i>
dme-miR-2a	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGC	<i>D. melanogaster</i>
api-miR-2a	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGCG	<i>A. mellifera</i>
Ancestral-seq	UAUCACAGCCAGCUUUGAUGAGC	"Arthropoda ancestor"
Ancestral-seq	UAUCACAGCCCGGUUUGUUAAGU	"Lophotrochozoa ancestor"
isc-miR-iab-4	UCGUUAUACUGAGUGUAUCCUGA	<i>I. scapularis</i>
tca-miR-iab-4-5p	ACGUUAUACUGAAUGUAUCCUGA	<i>T. castaneum</i>
dps-miR-iab-4-5p	ACGUUAUACUGAAUGUAUCCUGA	<i>D. pseudoobscura</i>
cma-miR-iab-4	ACGUUAUACUGAAUGUAUCCUGA	<i>C. macellaria</i>
cho-miR-iab-4	ACGUUAUACUGAAUGUAUCCUGA	<i>C. hominivorax</i>
Ancestor-seq	ACGUUAUACUGAAUGUAUCCUGA	"Hexapoda ancestor"
Ancestor-seq	UCGUUAUACUGAGUGUAUCCUGA	"Arthropoda Ancestor"

Tabela B1. Continuação

miRNA-ID ¹	Sequência do miRNA	Espécies
bta-miR-193b	AACUGGCC CAC AAAGUCCC GC UUU	<i>B. taurus</i>
xtr-miR-193	AACUGGCC CGC AAAGUCCC GC UUC	<i>X. tropicalis</i>
hsa-miR-193b-3p	AACUGGCC CU AAAGUCCC GC U	<i>H. sapiens</i>
mse-miR-193	UACUGGCCU GC UAAGUCCCA AG	<i>M. sexta</i>
dps-miR-193-3p	UACUGGCCUACUAAGUCCCAAC	<i>D. pseudoobscura</i>
cma-miR-193-3p	UACUGGCCUACUAAGUCCCAAC	<i>C. macellaria</i>
cho-miR-193-3p	UACUGGCCUACUAAGUCCCA	<i>C. hominivorax</i>
Ancestor-seq	UACUGGCCUACUAAGUCCCAAC	"Endopterygota ancestor"
Ancestor-seq	AACUGGCC CAC AAAGUCCC GC U	"Nephrozoa ancestor"
tca-miR-980-3p	CAGCUGCCUU U UGAAGGGCU AU	<i>T. castaneum</i>
dps-miR-980	UAGCUGCCUUGUGAAGGGCUU	<i>D. pseudoobscura</i>
dme-miR-980-3p	UAGCUGCCUUGUGAAGGGCUUA	<i>D. melanogaster</i>
cma-miR-980	UAGCUGCCUUGUGAAGGGCUU	<i>C. macellaria</i>
cho-miR-980	UAGCUGCCUUGUGAAGGGCUU	<i>C. hominivorax</i>
Ancestor-seq	UAGCUGCCUUGUGAAGGGCUUA	"Diptera Ancestor"
Ancestor-seq	CAGCUGCCUU U UGAAGGGCU AU	"Hexapoda Ancestor"
bmo-miR-275-5p	CGCGCUA CUCCG GC CC AGG ACU	<i>B. mori</i>
aae-miR-275-5p	CGCGCUA AGCAG GA ACCG AG AC	<i>A. aegypti</i>
dme-miR-275-5p	CGCGCUAAUCAG UG ACCGGGGCU	<i>D. melanogaster</i>
cma-miR-275-5p	CGCGCUAAUCAGAGACCGGGGCU	<i>C. macellaria</i>
cho-miR-275-5p	CGCGCUAAUCAGAGACCGGGGCU	<i>C. hominivorax</i>
Ancestor-seq	CGCGCUAAUCAGAGACCGGGGCU	"Brachycera ancestor"
Ancestor-seq	CGCGCUA CUCCG GC ACCG AGG ACU	"Hexapoda ancestor"
dpu-miR-12-5p	UGAGUAUUACA U CAGGUACUGGU	<i>D. pulex</i>
isc-miR-12-5p	UGAGUAUUACA U CAGGUACUGGU	<i>I. scapularis</i>
dme-miR-12-5p	UGAGUAUUACA U CAGGUACUGGU	<i>D. melanogaster</i>
cho-miR-12-5p	AGAGUAUUACA U AGGUACUGGU	<i>C. hominivorax</i>
cma-miR-12-5p	AGAGUAUUACA U AGGUACUGGU	<i>C. macellaria</i>
Ancestor-seq	AGAGUAUUACA U AGGUACUGGU	"Calliphoridae ancestor"
Ancestor-seq	UGAGUAUUACA U CAGGUACUGGU	"Arthropoda ancestor"

¹ Nomenclatura dos miRNAs utilizados segundo o banco de dados miRBase V.20 (Griffiths-Jones et al., 2008).

As sequências ancestrais foram inferidas através da análise de coalescência como proposto por Wheeler et al., (2009) e Barrero et al., (2010). Os nucleotídeos em vermelho representam as substituições observadas entre a sequência inferida do ancestral mais recente (em negrito) e a sequência inferida do ancestral mais antigo (em azul) do dado miRNA. Esta análise foi realizada para todos os 84 miRNAs identificados anteriormente. Para mais detalhes ver Sessão 2.3, Capítulo II.

Conclusões

Conclusões

Nesta dissertação foram apresentados os primeiros resultados da identificação (Capítulo I) e caracterização (Capítulo II) inicial de miRNAs das espécies *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*, fornecendo a base para futuros estudos funcionais e evolutivos, envolvendo miRNAs, a cerca da biologia e hábitos destas espécies, assim como para outras espécies da família Calliphoridae. Ao todo foram identificados 84 miRNAs evolutivamente conservados através da busca por homologia no genoma de *D. melanogaster* e nos acessos públicos de miRNAs. Destes, 80 e 78 miRNAs foram identificados nos transcriptomas de pequenos RNAs de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, respectivamente. Uma vez conhecidos, essas sequências podem ser utilizadas na identificação de miRNAs em outros estágios de desenvolvimento destas espécies não analisadas neste trabalho (como ovo, larvas de primeiro e segundo *instar*, pupa, fêmeas grávidas), assim como em tecidos específicos (como probóscide, ovários, intestino, órgãos sensoriais).

Foi observado que a maior parte dos miRNAs identificados são compartilhados entre as bibliotecas analisadas, indicando uma possível expressão ubíqua destes genes nas espécies e nos estágios de desenvolvimento investigados (fase adulta, macho e fêmea, e larval, terceiro instar). Ainda assim, apesar da maior parte dos miRNAs identificados nas espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria* serem ubiquamente expressos, eles apresentam diferentes quantidades relativas nos estágios de desenvolvimento investigados, provavelmente devido a expressão diferencial destes genes.

Também foi investigada a presença de pre-miRNAs nos dados parciais do genoma de *C. hominivorax* e nos dados de transcriptomas de *C. hominivorax* e *C. macellaria*. Mesmo estes dados não sendo enriquecidos para pequenos ncRNAs., foi possível prever a

estrutura em grampo de 10 pre-miRNAs evolutivamente conservados, a partir dos miRNAs maduros identificados anteriormente, e 6 pre-miRNAs ainda não descritos na literatura. Estas sequências apresentaram uma alta similaridade com os pre-miRNAs ortólogos descritos para *D. melanogaster* e *D. pseudoobscura*, indicando uma conservação destas sequências ao longo do tempo evolutivo.

As análises indiretas de expressão diferencial dos miRNAs evolutivamente conservados, indicou que 79 dos 84 miRNAs identificados apresentam expressão diferencial entre as espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria* e os estágios de desenvolvimento investigados. Através de uma clusterização hierárquica, foi possível observar que existe uma baixa variedade de miRNAs diferencialmente expressos no estágio larval de ambas as espécies, enquanto que os adultos (machos e fêmeas) apresentam uma ampla variedade de miRNAs diferencialmente expressos. Essas análises iniciais serão de suma importância na escolha de miRNAs de interesse, e nas comparações entre outros estágios de desenvolvimento, que serão investigados em projetos futuros.

A fim de validar os resultados obtidos pelas análises indiretas de expressão diferencial, três miRNAs foram escolhidos e suas expressões relativas ($2^{-\Delta C_t}$) obtidas por qRT-PCR. Os resultados corroboram com os dados obtidos pelo sequenciamento de nova geração em plataforma MiSeq-Illumina, indicando que o uso da contagem de *reads* normalizados (RPM) pode ser utilizada para estimar e obter dados preliminares da expressão diferencial de miRNAs.

Através das análises indiretas de expressão diferencial e da clusterização hierárquica foi possível separar conjuntos específicos de miRNAs diferencialmente expressos nos estágios de desenvolvimento investigados de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, potencializando a seleção de miRNAs candidatos associados ao

desenvolvimento e a outros aspectos da biologia das espécies que poderão ser investigados futuramente. Dentre estes, destacam-se os miRNAs miR-8, miR-275, miR-958 e miR-1000 em *C. hominivorax*, e os miRNAs miR-33, miR-317, miR-375 em *C. macellaria*.

A caracterização evolutiva dos miRNAs, feita através das análises de coalescência, indicou que a maior parte dos miRNAs identificados em *C. hominivorax* e *C. macellaria* são conservados desde Arthropoda (15%), Hexapoda (19,8%) e Brachycera (28,32%), a cerca de 540, 488 e 195 milhões de anos atrás, respectivamente. Também foi observado que há uma tendência no acúmulo de mutações em miRNAs recentemente “adquiridos” no tempo evolutivo, como descrito por outros autores, o que pode estar relacionado com a função regulatória destes genes no genoma e/ou a diversificação das espécies, como o caso do miR-iab-4 e miR-iab-8 (origem estimada em Hexapoda, 488 MA) e o miR-2a-2 (origem estimada em Endopterygota, 265 MA).

Por último, foi verificado que a maior parte das substituições nucleotídicas nos miRNAs de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, que ocorreram ao longo do tempo evolutivo, foram enviesadas na região 3' dos miRNAs (21-26 nts) e no *bulge* (9-13 nts) formado na associação entre o miRNA e o mRNA alvo. Enquanto raras mutações foram observadas na região *seed* (2-8 nts) convencionalmente definida como a região determinante na identificação do mRNA alvo. Também foram observadas poucas mutações associadas à região 3' complementar do miRNA (14-19 nts), também responsável pela complementaridade entre o miRNA e o mRNA alvo além de estar associada as regulações do tipo “canônica” e “3' compensatória”.

Referências

- Aboobaker, A.A., Tomancak, P., Patel, N., Rubin, G.M., Lai, E.C., 2005. *Drosophila* microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18017–18022.
- Adams, T.S., 1979. The reproductive physiology of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). III. Mating. *J. Med. Entomol.* 15, 488–493.
- Barrero, R.A., Keeble-Gagnère, G., Zhang, B., Moolhuijzen, P., Ikeo, K., Tateno, Y., Gojobori, T., Guerrero, F.D., Lew-Tabor, A., Bellgard, M., 2011. Evolutionary conserved microRNAs are ubiquitously expressed compared to tick-specific miRNAs in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics* 12, 328.
- Baumhover, A.H., Graham, A.J., Bitter, B.A., Hopkins, D.E., New, W.D., Dudley, F.H., Bushland, R.C., 1955. Screw-Worm Control Through Release of Sterilized Flies. *J. Econ. Entomol.* 48, 462–466.
- Belles, X., Cristino, A.S., Tanaka, E.D., Rubio, M., Piulachs, M.D., 2012. Insect MicroRNAs: From Molecular Mechanisms to Biological Roles. In: *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier, pp. 30–56.
- Bertone, M.A., Wiegmann, B.M., 2009. True Flies (Diptera). In: *The Timetree of Life*.
- Blagoderov, V., Grimaldi, D.A., Fraser, N.C., 2007. How Time Flies for Flies : Diverse Diptera from the Triassic of Virginia and Early Radiation of the Order 24112.
- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2005. Principles of microRNA-target recognition. In: *PLoS Biology*. pp. 0404–0418.
- Bryant, B., Macdonald, W., Raikhel, A.S., 2010. microRNA miR-275 is indispensable for blood digestion and egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22391–8.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957–1966.
- Campbell, L.I., Rota-Stabelli, O., Edgecombe, G.D., Marchioro, T., Longhorn, S.J., Telford, M.J., Philippe, H., Rebecchi, L., Peterson, K.J., Pisani, D., 2011. MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15920–4.
- Campo-Paysaa, F., Sémon, M., Cameron, R.A., Peterson, K.J., Schubert, M., 2011. microRNA complements in deuterostomes: origin and evolution of microRNAs. *Evol. Dev.* 13, 15–27.
- Cardoso, G.A., 2012. Expressão de genes relacionados ao hábito alimentar na família Calliphoridae. Tese apresentada ao Instituto de Biologia para Obtenção de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na Área de Genética Animal e Evolução. Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).
- Cardoso, G.A., Mاتيولli, C.C., Azeredo-Espin, A.M.L., Torres, T.T., 2014. Selection and validation of reference genes for functional studies in the Calliphoridae Family. *J. Insect. Sci.* 14: 1-15.

- Carvalho, R.A., Azeredo-Espin, A.M.L., Torres, T.T., 2010. Deep sequencing of New World screw-worm transcripts to discover genes involved in insecticide resistance. *BMC Genomics* 11, 695.
- Caspi, A., Moffitt, T.E., 2006. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 583-590.
- Chekulaeva, M., Filipowicz, W., 2009. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*
- Cristino, A.S., Tanaka, E.D., Rubio, M., Piulachs, M.-D., Belles, X., 2011. Deep sequencing of organ- and stage-specific microRNAs in the evolutionarily basal insect *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *PLoS One* 6, e19350.
- De Azeredo-Espin, A.M.L., Lessinger, A.C., 2006. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genetica* 126, 111–31.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W., 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351–379.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–14.
- Frank, J.H., 2007. *Evolution of the Insects*. Florida Entomol.
- Fresia, P., Lyra, M.L., Coronado, A., De Azeredo-Espin, A.M.L., 2011. Genetic structure and demographic history of new world screwworm across its current geographic range. *J. Med. Entomol.* 48, 280–290.
- Fullaondo, A., Lee, S.Y., 2012. Identification of putative miRNA involved in *Drosophila melanogaster* immune response. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 267–73.
- Gomez-Orte, E., Belles, X., 2009. MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolan insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21678–82.
- Greenberg, J.K., Xia, J., Zhou, X., Thatcher, S.R., Gu, X., Ament, S. a, Newman, T.C., Green, P.J., Zhang, W., Robinson, G.E., Ben-Shahar, Y., 2012. Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. *Genes. Brain. Behav.* 11, 660–70.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34, D140–4.
- Gunaratne, P.H., Lin, Y.-C., Benham, A.L., Drnevich, J., Coarfa, C., Tennakoon, J.B., Creighton, C.J., Kim, J.H., Milosavljevic, A., Watson, M., Griffiths-Jones, S., Clayton, D.F., 2011. Song exposure regulates known and novel microRNAs in the zebra finch auditory forebrain. *BMC Genomics* 12, 277.
- Junqueira, A.C.M., 2008. *Evolução Molecular do Genoma Mitocondrial da Família Calliphoridae (Diptera: Brachycera)*. Tese apresentada ao Instituto de Biologia para Obtenção de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na Área de Genética Animal e Evolução. Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).
- Kim, V.N., 2004. MicroRNA precursors in motion: Exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.*
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2013. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 1–6.

- Kutty, S.N., Pape, T., Wiegmann, B.M., Meier, R., 2010. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Syst. Entomol.* 35, 614–635.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–8.
- Lai, E.C., Tam, B., Rubin, G.M., 2005. Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev.* 19, 1067–80.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858–62.
- Lee, I., Ajay, S.S., Yook, J.I., Kim, H.S., Hong, S.H., Kim, N.H., Dhanasekaran, S.M., Chinnaiyan, A.M., Athey, B.D., 2009. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res.* 19, 1175–1183.
- Lee, R.C., Ambros, V., 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862–864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.
- Lessinger, a C., Martins Junqueira, a C., Lemos, T. a, Kemper, E.L., da Silva, F.R., Vettore, a L., Arruda, P., Azeredo-Espin, a M., 2000. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Mol. Biol.* 9, 521–9.
- Li, L., Liu, F., Li, W., Li, Z., Pan, J., Yan, L., Zhang, S., Huang, Z.Y., Su, S., 2012. Differences in microRNAs and their expressions between foraging and dancing honey bees, *Apis mellifera* L. *J. Insect Physiol.* 58, 1438–1443.
- Liu, F., Peng, W., Li, Z., Li, W., Li, L., Pan, J., Zhang, S., Miao, Y., Chen, S., Su, S., 2012. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *Insect Mol. Biol.* 21, 297–303.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.
- Lyra, M.L., Klaczko, L.B., Azeredo-Espin, A.M.L., 2009. Complex patterns of genetic variability in populations of the New World screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Med. Vet. Entomol.* 23 Suppl 1, 32–42.
- Marinho, M.A.T., Junqueira, A.C.M., Azeredo-Espin, A.M.L., 2011. Evaluation of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) as a molecular marker for phylogenetic inference using sequence and secondary structure information in blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Genetica* 139, 1189–207.
- Marinho, M.A.T., Junqueira, A.C.M., Paulo, D.F., Esposito, M.C., Villet, M.H., Azeredo-Espin, A.M.L., 2012. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: Insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Mol. Phylogenet. Evol.* 65, 840–854.
- McDonagh, L.M., Stevens, J.R., 2011. The molecular systematics of blowflies and screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) using 28S rRNA, COX1 and EF-1 α : insights into the evolution of dipteran parasitism. *Parasitology* 138, 1760–77.

- Mortensen, R.D., Serra, M., Steitz, J.A., Vasudevan, S., 2011. Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8281–8286.
- Nirmala, X., Hypsa, V., Zurovec, M., 2001. Molecular phylogeny of Calyptratae (Diptera: Brachycera): the evolution of 18S and 16S ribosomal rDNAs in higher dipterans and their use in phylogenetic inference. *Insect Mol. Biol.* 10, 475–85.
- Pape, T., Bickel, D., Meier, R., 2009. *Diptera Diversity: Status, Challenges and Tools* 2009.
- Pasquinelli, A.E., 2012. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.*
- Pasquinelli, A.E., Hunter, S., Bracht, J., 2005. MicroRNAs: a developing story. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 200–5.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruvkun, G., 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89.
- Pauli, A., Rinn, J.L., Schier, A.F., 2011. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 12, 136–49.
- Peterson, K.J., Dietrich, M.R., McPeck, M. a, 2009. MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *Bioessays* 31, 736–47.
- Price, N., Cartwright, R. a, Sabath, N., Graur, D., Azevedo, R.B.R., 2011. Neutral evolution of robustness in *Drosophila* microRNA precursors. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2115–23.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.
- Rognes, K., 1997. The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera : Oestroidea) are Not a Monophyletic Group 1 68.
- Rota-Stabelli, O., Campbell, L., Brinkmann, H., Edgecombe, G.D., Longhorn, S.J., Peterson, K.J., Pisani, D., Philippe, H., Telford, M.J., 2011. A congruent solution to arthropod phylogeny: phylogenomics, microRNAs and morphology support monophyletic Mandibulata. *Proc. Biol. Sci.* 278, 298–306.
- Rottiers, V., Nääär, A.M., 2012. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Ryazansky, S.S., Gvozdev, V. a, Berezhikov, E., 2011. Evidence for post-transcriptional regulation of clustered microRNAs in *Drosophila*. *BMC Genomics* 12, 371.
- Schnall-Levin, M., Zhao, Y., Perrimon, N., Berger, B., 2010. Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15751–15756.
- Seggerson, K., Tang, L., Moss, E.G., 2002. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev. Biol.* 243, 215–225.
- Sempere, L.F., Cole, C.N., McPeck, M.A., Peterson, K.J., 2006. The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 306, 575–588.
- Singh, B., Wells, J.D., 2011. Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) is monophyletic: a molecular systematic analysis. *Syst. Entomol.* 36, 415–420.

- Singh, B., Wells, J.D., 2013. Molecular systematics of the Calliphoridae (Diptera: Oestroidea): evidence from one mitochondrial and three nuclear genes. *J. Med. Entomol.* 50, 15–23.
- Sperling, E. a, Pisani, D., Peterson, K.J., 2011. Molecular paleobiological insights into the origin of the Brachiopoda. *Evol. Dev.* 13, 290–303.
- Sperling, E.A., Peterson, K.J., 2004. C H A P T E R 15 MicroRNAs and metazoan phylogeny : big trees from little genes.
- Sperling, E.A., Peterson, K.J., 2009. microRNAs and metazoan phylogeny: big trees from little genes. In: Telford MJ, L.D. (Ed.), *Animal Evolution—genomes, Trees* Oxford Univ Press, Oxford, pp. 157–210.
- Stefani, G., Slack, F.J., 2008. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 219–30.
- Stevens, J.R., Wallman, J.F., 2006. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part I): phylogenetic analyses. *Trends Parasitol.* 22, 129–36.
- Stevens, J.R., Wallman, J.F., Otranto, D., Wall, R., Pape, T., 2006. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part II): biological and life-history studies. *Trends Parasitol.* 22, 181–8.
- Sun, W., Julie Li, Y.-S., Huang, H.-D., Shyy, J.Y.-J., Chien, S., 2010. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 12, 1–27.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., Rigoutsos, I., 2008. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455, 1124–1128.
- Torres, T.T., Azeredo-Espin, A.M.L., 2009. Population genetics of New World screwworm from the Caribbean: insights from microsatellite data. *Med. Vet. Entomol.* 23 Suppl 1, 23–31.
- Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931–1934.
- Wheeler, B.M., Heimberg, A.M., Moy, V.N., Sperling, E. a, Holstein, T.W., Heber, S., Peterson, K.J., 2009. The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol. Dev.* 11, 50–68.
- Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.-W., Lambkin, C., Bertone, M. a, Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Pape, T., Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S.N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G.E., Thompson, F.C., Grimaldi, D. a, Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K., 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5690–5.
- Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11, 228–234.
- Wu, W., Ren, Q., Li, C., Wang, Y., Sang, M., Zhang, Y., Li, B., 2013. Characterization and comparative profiling of MicroRNAs in a sexual dimorphism insect, *Eupolyphaga sinensis* Walker. *PLoS One* 8, e59016.

- Wu, X., Wang, Z., Zhang, F., Shi, Y., Zeng, Z., 2014. Mating flight causes genome-wide transcriptional changes in sexually mature honeybee queens. *J. Asia. Pac. Entomol.* 17, 37–43.
- Xie, S., Zhang, Y., Qu, L., Xu, H., 2013. A Helm model for microRNA regulation in cell fate decision and conversion. *Sci. China. Life Sci.* 56, 897–906.
- Xu, C., Lu, Y., Pan, Z., Chu, W., Luo, X., Lin, H., Xiao, J., Shan, H., Wang, Z., Yang, B., 2011. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* 124, 3187.
- Yang, M., Wei, Y., Jiang, F., Wang, Y., Guo, X., He, J., Kang, L., 2014. MicroRNA-133 inhibits behavioral aggregation by controlling dopamine synthesis in locusts. *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.1004206.
- Yeates, D.K., Wiegmann, B.M., 1999. CONGRUENCE AND CONTROVERSY : Toward a Higher-Level Phylogeny of Diptera. *Annu. Rev. Entomol.* 397–428.
- Zumpt., 1965. Myiasis in man and animals in the Old World. Butterworths, Londres.