

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

**Daniele Silva de Oliveira**

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE  
ODOR (OBPs) DE *Rhodnius prolixus*

Rio de Janeiro  
2018

**Daniele Silva de Oliveira**

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE  
ODOR (OBPs) DE *Rhodnius prolixus*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Ana Claudia do Amaral Melo  
Coorientador: Walter Soares Leal

Rio de Janeiro  
2018

O48c Oliveira, Daniele Silva de.  
Caracterização funcional de proteínas ligadoras de odor (OBPs) de *Rhodnius prolixus* / Daniele Silva de Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2018.  
149 f.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2018.

Orientador: Ana Claudia do Amaral Melo.  
Coorientador: Walter Soares Leal.

1. *Rodnius prolixus*. 2. Proteínas ligadoras de odor. 3. OBPs. 4. RNAi. 5. Fosfoproteômica. I. Melo, Ana Claudia do Amaral, orient. II. Leal, Walter Soares, coorient. III. Título.

CDD: 572

**Daniele Silva de Oliveira**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE  
ODOR (OBPs) DE *Rhodnius prolixus***

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica, Instituto de Química,  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de  
Doutor em Ciências (Bioquímica).

Aprovada em 05 de outubro de 2018.

---

Prof<sup>ª</sup>. Ana Claudia do Amaral Melo  
(Orientadora, Doutora, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

Prof<sup>º</sup>. Walter Soares Leal  
(Coorientador, Doutor, Universidade da Califórnia - Davis)

---

Prof<sup>ª</sup>. Marcia Cristina Paes  
(Doutora, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

---

Prof<sup>ª</sup>. Kátia Calp Gondim  
(Doutora, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

Prof<sup>ª</sup>. Daniele Pereira de Castro  
(Doutora, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz)

---

Prof<sup>ª</sup>. Bianca Cruz Neves  
(Doutora, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

À minha família

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas bênçãos, por me dar forças e saúde, e por permitir que eu concluísse esta tese. Aos meus pais pelo amor e cuidado. À minha mãe Dalva, pelo incentivo e orações. Ao meu pai Paulo, pelo apoio e ajuda em todas as horas. À minha irmã Jéssica pelo amor e companheirismo. Ao meu namorado Michel pelo amor, por sempre me ouvir e por estar sempre presente. À toda minha família e amigos pelo apoio e carinho.

À minha orientadora Ana Claudia por toda ajuda e orientação na realização deste trabalho. Pela confiança, paciência, amizade e carinho. Obrigada por todos os ensinamentos durante a iniciação científica, mestrado e doutorado.

Ao meu coorientador Walter Leal pela assistência. Obrigada por toda ajuda na revisão do artigo. Ao PingXi por ceder o plasmídeo  $\beta$ -Gal. À professora Mônica pelas ideias, por sempre estar presente e disposta a ajudar. À professora Márcia por me ajudar na parte de proteômica. Ao professor Fábio pelo auxílio nos experimentos de fosfoproteômica.

Aos amigos do LABBMOVE, Nathália, Evelyn, Thayane, Thaís, Thiago, Tiago e Victor pela amizade e companheirismo. À Nathália pela ajuda no *docking* e na revisão do artigo. À Sheila pela amizade.

Ao professor Masuda e sua equipe por ceder os *Rhodnius prolixus*, especialmente aos técnicos da colônia Júnior, Gustavo, Lauriene, Yasmin e Desenir por manter e alimentar os insetos. À equipe do LAMMP. À Rosane e Isabele pela amizade e por sempre estarem dispostas a ajudar. À equipe do LBBM e LABEP pela ajuda com a utilização de equipamentos. À equipe do Laboratório de Química de Proteínas - Unidade Proteômica, pela realização dos experimentos de espectrometria de massas. À Érica pela ajuda com os experimentos de fosfoproteômica e à Raquel, Natália e Clarissa pela ajuda com o *software* Proteome Discoverer.

À CAPES pela bolsa. Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo auxílio financeiro ao laboratório. À todos os fornecedores e representantes de reagentes e equipamentos do laboratório. À revista *Frontiers in Physiology*, ao editor e revisores por aceitarem o artigo do doutorado.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas dicas valiosas que contribuirão para aprimorar este trabalho. A todos os professores do Departamento de Bioquímica. À professora Bianca e ao professor Fábio pelas ideias e pelo direcionamento nos seminários de acompanhamento. A todos os alunos do Departamento de Bioquímica. A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica. À Rosângela pela amizade. Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pela ajuda no kit defesa. Obrigada a todos que contribuíram de alguma forma para a elaboração deste trabalho.

## RESUMO

OLIVEIRA, Daniele Silva de. Caracterização funcional de proteínas ligadoras de odor (OBPs) de *Rhodnius prolixus*. Rio de Janeiro, 2018. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O *Rhodnius prolixus* é um dos principais vetores da doença de Chagas. Estímulos químicos desencadeiam comportamentos essenciais para sua sobrevivência. O estudo de proteínas envolvidas na quimiorrecepção como as proteínas ligadoras de odor (OBPs), pode auxiliar no desenvolvimento de novas técnicas de controle deste vetor. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a caracterização funcional de OBPs de *R. prolixus*, utilizando ferramentas de biologia molecular e de proteômica. A primeira etapa deste estudo envolveu a análise do perfil de expressão de 17 OBPs em diferentes órgãos de insetos adultos através de PCR convencional. O PCR revelou que 11 OBPs eram expressos em todos os órgãos, e 6 mostraram-se específicos de antenas. A análise por qPCR mostrou que os genes *OBP6* e *OBP13* estavam expressos em grandes quantidades nas antenas de insetos machos e fêmeas, sugerindo que as OBPs transportem semioquímicos que induzem comportamentos comuns a ambos os sexos, como a busca do hospedeiro para alimentação sanguínea. Transcritos para os genes *OBP17* e *OBP21* foram encontrados em maiores quantidades nas antenas de insetos fêmeas, indicando que as proteínas podem estar envolvidas na detecção de feromônios de oviposição. Em contrapartida, os genes *OBP26* e *OBP27*, foram significativamente mais expressos nas antenas de insetos machos em relação às fêmeas, assinalando que as proteínas estejam envolvidas na detecção de feromônios sexuais. Para testar essa hipótese, o *OBP27* foi silenciado usando RNA de interferência e os efeitos fenotípicos deste silenciamento foram avaliados por bioensaios. Os insetos machos tratados com ds*OBP27* apresentaram mudança no comportamento de busca e identificação dos insetos fêmeas. Os insetos tratados com ds*OBP27* se moviam de forma mais lenta em direção às fêmeas e ficaram 40% menos tempo próximo à fêmea, em comparação com os insetos controle (ds *$\beta$ -gal*). A análise de *docking* mostrou que a *OBP27* se liga aos feromônios sexuais putativos produzidos pelas glândulas metasternais das fêmeas. Portanto, associando os dados de comportamento com a análise de *docking* concluímos que *OBP27* é a proteína responsável pela identificação dos feromônios. Paralelamente, foi realizada a análise do perfil de fosfoproteínas e a identificação de vias de sinalização olfativa em *R. prolixus*. Em gel 2-DE observou-se que OBPs e outras proteínas das antenas tratadas com fosfatase migravam para áreas mais básicas em SDS-PAGE, significando mudanças nos pontos isoelétricos (pIs). As proteínas foram extraídas dos géis e

tripsinizadas. Os peptídeos foram analisados por nano LC-MS/MS e identificados no programa Mascot. Cinco OBPs e 1 CSP apresentaram possíveis peptídeos fosforilados. Oito proteínas fosforiladas envolvidas nas vias de transdução de sinal olfativa de insetos também foram identificadas. Com estes dados foi possível propor um modelo do mecanismo ativo de ligação e de transporte de odores pelas OBPs através de fosforilação e defosforilação. Assim, a associação de diferentes técnicas permitiu obter conclusões consistentes sobre como ocorre o processo de olfação em *R. prolixus*. Além disso, a alteração da capacidade de identificação dos insetos fêmeas pelos machos, após silenciamento do *OBP27*, indica que podemos prospectar produtos para evitar o acasalamento e diminuir a densidade populacional deste vetor.

Palavras-chave: *Rodnius prolixus*. Proteínas ligadoras de odor. OBPs. RNAi. Fosfoproteômica.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Daniele Silva de. Caracterização funcional de proteínas ligadoras de odor (OBPs) de *Rhodnius prolixus*. Rio de Janeiro, 2018. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

*Rhodnius prolixus* is one of the main vectors of Chagas disease. Chemical stimuli trigger essential behaviors to their survival. The study of proteins involved in chemoreception as odorant binding proteins (OBPs), may help in the development of new vector control techniques. Thus, this work aimed at the functional characterization of *R. prolixus* OBPs, using molecular biology and proteomics. The first step of this study involved the analysis of 17 OBPs expression profile in different tissues of adult insects through conventional PCR. PCR revealed that 11 OBPs were expressed in all tissues, and 6 were antenna specific. The analysis by qPCR showed that *OBP6* and *OBP13* genes were expressed in large amounts in male and female insect antennae, suggesting that OBPs transport semiochemicals that induce behaviors common to both sexes, such as the host seeking for a blood feed. Transcripts for *OBP17* and *OBP21* genes were found in larger amounts in female insect antennae, indicating that the proteins may be involved in the detection of oviposition pheromones. In contrast, *OBP26* and *OBP27* genes were significantly expressed in male insect antennae, indicating that the proteins are involved in the detection of sex pheromones. To test this hypothesis, *OBP27* was silenced using RNA interference and the phenotypic effects of this silencing were evaluated by bioassays. Male insects treated with ds*OBP27* showed a change in search and identification behavior of female insects. Insects treated with ds*OBP27* moved more slowly towards females and were 40% less time close to females compared to control (ds *$\beta$ -gal*) insects. The docking analysis showed that *OBP27* binds to the putative sex pheromones produced by the female's metasternal glands. Therefore, associating the behavior data with the docking analysis we conclude that *OBP27* is the protein responsible for the identification of pheromones. In parallel, the analysis of the phosphoprotein profile and the identification of olfactory signaling pathways in *R. prolixus* were carried out. In 2-DE gel it was observed that OBPs and other proteins from the antennae treated with phosphatase migrated to more basic areas on SDS-PAGE, meaning changes in the isoelectric points (pIs). Proteins were extracted from the gels and trypsinized. The peptides were analyzed by nano LC-MS/MS and identified in the Mascot program. Five OBPs and 1 CSP showed possible phosphorylated peptides. Eight phosphorylated proteins involved in insect's olfactory signal transduction pathways were also identified. With these data it was possible to propose a model of the active OBPs

mechanism of binding and transport of odors through phosphorylation and dephosphorylation. Thus, the association of different techniques allowed obtaining consistent conclusions on how the process of *R. prolixus* olfaction occurs. In addition, the alteration of the female identification capacity by the males, after *OBP27* silencing, indicates that we can prospect products to avoid mating and decrease the population density of this vector.

Key words: *Rodnius prolixus*. Odorant binding proteins. OBPs. RNAi. Phosphoproteome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> . 1. Adaptado de TEIXEIRA et al., 2012.	21
Figura 2 - Distribuição global dos casos de doença de Chagas, baseado em estimativas oficiais, 2006-2010. Adaptado de PEREZ et al., 2015.	22
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>R. prolixus</i> . Fonte: Foto de Rodrigo Nunes da Fonseca.	24
Figura 4 - Estruturas dos feromônios mais abundantes das glândulas metasternais de fêmeas de <i>R. prolixus</i> . Adaptado de BOHMAN et al., 2018.	28
Figura 5 - Morfologia das antenas de <i>R. prolixus</i> . Ilustração de OTALORA-LUNA, 2007.	31
Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de olfação em insetos. Adaptado de BRITO et al., 2016.	33
Figura 7 - Visão anterior do cérebro de um inseto adulto mostrando as vias olfativas. Adaptado de GUIDOBALDI et al., 2014.	34
Figura 8 - Mecanismos propostos para a transdução de sinal olfativa de insetos. Adaptado de SAKURAI et al., 2014.	36
Figura 9 - Modelo tridimensional da HarmOBP7 de <i>Helicoverpa armigera</i> . Adaptado de SUN et al., 2013.	38
Figura 10 - Modelos do mecanismo de ação de OBPs de insetos. Adaptado de SUH et al., 2014.	42
Figura 11 - Dispositivo utilizado no bioensaio de detecção da fêmea. Adaptado de ZERMOGLIO et al., 2015.	50
Figura 12 - Padrão de expressão dos genes <i>RproOBP1</i> , <i>RproOBP7</i> , <i>RproOBP11</i> , <i>RproOBP12</i> , <i>RproOBP14</i> , <i>RproOBP18</i> , <i>RproOBP20</i> , <i>RproOBP22</i> , <i>RproOBP23</i> , <i>RproOBP24</i> e <i>RproOBP29</i> em diferentes órgãos de <i>R. prolixus</i> .	57
Figura 13 - Padrão de expressão dos genes <i>RproOBP6</i> , <i>RproOBP13</i> , <i>RproOBP17</i> , <i>RproOBP21</i> , <i>RproOBP26</i> e <i>RproOBP27</i> em diferentes órgãos de <i>R. prolixus</i> .	58
Figura 14 - Expressão relativa de transcritos do <i>RproOBP6</i> em antenas de <i>R. prolixus</i> .	60
Figura 15 - Expressão relativa de transcritos do <i>RproOBP13</i> em antenas de <i>R. prolixus</i> .	60
Figura 16 - Expressão relativa de transcritos do <i>RproOBP17</i> em antenas de <i>R. prolixus</i> .	61
Figura 17 - Expressão relativa de transcritos do <i>RproOBP21</i> em antenas de <i>R. prolixus</i> .	62
Figura 18 - Níveis de expressão de transcritos de OBPs nas antenas de fêmeas de <i>R. prolixus</i> . Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de fêmeas adultas e alimentadas.	63

Figura 19 - Níveis de expressão de transcritos de <i>OBPs</i> nas antenas de machos de <i>R. prolixus</i> . Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de machos adultos e alimentados.	63
Figura 20 - Expressão relativa de transcritos do <i>RproOBP26</i> em antenas de <i>R. prolixus</i> .	65
Figura 21 - Expressão relativa de transcritos do <i>RproOBP27</i> em antenas de <i>R. prolixus</i> .	65
Figura 22 - Expressão relativa de transcritos do gene <i>RproOBP27</i> em antenas de <i>R. prolixus</i> machos adultos, tratados com dsRNA.	66
Figura 23 - Taxa de sobrevivência dos <i>R. prolixus</i> machos N5 não alimentados, tratados com dsRNA (N = 20 para ds <i>OBP27</i> e N = 20 para ds <i>β-gal</i> ).	67
Figura 24 - Ingestão de sangue de <i>R. prolixus</i> injetados com ds <i>OBP27</i> e ds <i>β-gal</i> .	68
Figura 25 - Velocidade de deslocamento dos <i>R. prolixus</i> machos injetados com ds <i>OBP27</i> e ds <i>β-gal</i> , através do tubo em direção à fêmea.	70
Figura 26 - Tempo de permanência dos <i>R. prolixus</i> machos injetados próximo à fêmea.	70
Figura 27 - Modelo 3D da <i>OBP27</i> de <i>R. prolixus</i> .	72
Figura 28 - Resultado do PROCHECK do modelo 3D teórico da <i>OBP27</i> .	73
Figura 29 - Resultados do Verify3D do modelo 3D teórico da <i>OBP27</i> .	74
Figura 30 - <i>Docking</i> do modelo 3D da <i>OBP27</i> com voláteis das glândulas metasternais.	74
Figura 31 - Sequência de aminoácidos da <i>OBP27</i> .	74
Figura 32 - Eletroforese em Gel 2-DE em pH 3-10 com proteínas das antenas de machos de <i>R. prolixus</i> .	76
Figura 33 - Eletroforese em Gel 2-DE em pH 4-7 com proteínas das antenas de <i>R. prolixus</i> .	79
Figura 34 - Modelo proposto da via de transdução do sinal olfativo em <i>R. prolixus</i> .	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR, qPCR e RNAi.	46
Tabela 2 - Peptídeos fosforilados de OBPs de <i>R. prolixus</i> identificados pelo Mascot.	80
Tabela 3 - Peptídeos fosforilados de proteínas que participam da via de transdução do sinal olfativa identificados pelo <i>software</i> Mascot.	81
Tabela 4 - Peptídeos fosforilados da beta-caseína bovina identificados pelo Mascot.	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DE - eletroforese em gel bidimensional

AC - adenilato ciclase

ACN - acetonitrila

AF - antena de fêmea

AM - antena de macho

AMPC - monofosfato cíclico de adenosina

BLASTp - *Protein Basic Local Alignment Search Tool*

CAUAP - Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa

CHAPS - (3-[(3-colamidopropil)-imetilamonio]-1-propanosulfonato)

CSP (*chemosensory protein*) - proteína quimiossensorial

DAG - diacilglicerol

dsRNA - RNA de dupla fita

DDT - diclorodifeniltricloroetano

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

GB - glândulas de Brindley

GM - glândulas metasternais

GPCRs (*G-protein-coupled receptors*) - receptores acoplados à proteína G

HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)1-piperazinil]-etano sulfônico

IEF - isoeletrofocalização

IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) - cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados

IP<sub>3</sub> - inositol 1,4,5-trifosfato

IR (*ionotropic receptor*) - receptor ionotrópico

LC-MS/MS (*liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

LTQ (*Linear Trap Quadrupole*) - Armadilha de íons linear

MIP - manejo integrado de pragas

MOAC (*Metal oxide affinity chromatography*) - cromatografia de afinidade de óxido de metal

MOP (*mosquito oviposition pheromone*) - feromônio de oviposição de mosquito

MS - espectrometria de massas

NaF - fluoreto de sódio

NCBI-nr - *National Center for Biotechnology Information - non-redundant*

NSOs - neurônios sensoriais olfativos

OBP (*odorant binding protein*) - proteína ligadora de odor

ODE (*odorant degrading enzyme*) - enzima de degradação de odor

OMS - Organização Mundial da Saúde

OR (*odorant receptor*) - receptor olfativo

ORCO (*odorant coreceptor*) - coreceptor olfativo

PBP (*pheromone binding protein*) - proteína ligadora de feromônio

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pI - Ponto isoelétrico

PKA - proteína quinase A

PKC - proteína quinase C

PLC - fosfolipase C

PMSF - fenil metil sulfonil fluorido

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa

RHBP (*Rhodnius heme-binding protein*) - proteína transportadora de heme de *Rhodnius*

RNAi - RNA de interferência

RNAm - ácido ribonucléico mensageiro

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA

TFA - ácido trifluoroacético

TRP - receptor de potencial transitório

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

UniProt - *The Universal Protein Resource*

VEG - proteína da glândula de Von Ebner

WHO - *World Health Organization*

ZF - zona da fêmea

ZI - zona intermediária

ZM - zona de liberação do macho

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1.	DOENÇA DE CHAGAS	19
1.2.	<i>RHODNIUS PROLIXUS</i>	23
1.3.	CONTROLE POPULACIONAL DE TRIATOMÍNEOS	24
1.4.	ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E SEMIOQUÍMICOS	26
1.4.1.	<b>Detecção de hospedeiros vertebrados</b>	27
1.4.2.	<b>Detecção de feromônios sexuais</b>	27
1.4.3.	<b>Comportamento de agregação</b>	28
1.4.4.	<b>Localização de sítios de oviposição</b>	29
1.4.5.	<b>Feromônios de alarme</b>	30
1.5.	OLFAÇÃO EM INSETOS	31
1.5.1.	<b>Sensilas e antenas</b>	31
1.5.2.	<b>Visão geral da recepção de odores</b>	32
1.5.3.	<b>Sinalização olfativa</b>	35
1.5.4.	<b>Proteínas ligadoras de odor (OBPs)</b>	37
1.5.4.1.	Estrutura de OBPs	37
1.5.4.2.	Função das OBPs	39
1.5.4.3.	RNAi e proteínas ligadoras de odor	39
1.5.4.4.	Modelos propostos dos mecanismos de ação de OBPs de insetos	40
1.6.	IDENTIFICAÇÃO DE OBPS FOSFORILADAS POR FOSFOPROTEÔMICA	42
2.	<b>OBJETIVOS</b>	44
2.1.	OBJETIVO GERAL	44
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	45
3.1.	MANUTENÇÃO DOS INSETOS	45
3.2.	PROTOCOLO DE BIOÉTICA	45
3.3.	DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	45
3.4.	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	47
3.5.	PCR CONVENCIONAL	47
3.6.	PCR QUANTITATIVO (qPCR)	48
3.7.	RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi) - SÍNTESE DE dsRNA	48
3.8.	EFEITOS DO SILENCIAMENTO NA FISIOLOGIA DOS MACHOS	49

3.9.	BIOENSAIO DE ATRATIVIDADE	49
3.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
3.11.	ESTUDOS DE <i>DOCKING</i>	51
3.12.	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	51
3.13.	ELETROFORESE EM GEL 2-DE	52
3.14.	DIGESTÃO EM GEL	52
3.15.	ENRIQUECIMENTO DE FOSFOPEPTÍDEOS	53
3.16.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS NANO LC-ORBITRAP	53
3.17.	BUSCA EM BANCO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	54
4.	<b>RESULTADOS</b>	55
4.1.	PARTE I - RASTREAMENTO DOS GENES <i>OBPS</i> EXPRESSOS NAS ANTENAS	55
4.1.1.	<b>Perfil de expressão em diferentes órgãos - PCR convencional</b>	55
4.1.2.	<b>Abundância dos RNAs nas antenas de insetos adultos</b>	59
4.1.2.1.	Perfis dos genes expressos nas antenas dos adultos	59
4.1.2.2.	Genes encontrados enriquecidos nas antenas de insetos fêmeas	61
4.1.2.3.	Comparação dos níveis de RNAs nas antenas	62
4.1.2.4.	Genes encontrados exclusivamente nas antenas de insetos machos	64
4.2.	PAPEL DA OBP27 NO COMPORTAMENTO DOS INSETOS MACHOS	66
4.2.1.	<b>Silenciamento do <i>OBP27</i> por RNA de interferência</b>	66
4.2.2.	<b>Efeitos sobre a fisiologia dos insetos machos</b>	67
4.2.3.	<b>Perfil comportamental dos insetos machos</b>	69
4.3.	PREDIÇÃO DO MODELO 3D E IDENTIFICAÇÃO <i>IN SILICO</i> DOS LIGANTES DA OBP27	71
4.4.	PARTE II – MODELO DE FUNCIONAMENTO DAS OBPS	75
4.4.1.	<b>Mapeamento de proteínas fosforiladas</b>	75
4.4.2.	<b>Identificação de peptídeos fosforilados</b>	77
4.4.3.	<b>Enriquecimento de fosfopeptídeos</b>	83
5.	<b>DISCUSSÃO</b>	86
5.1.	PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>OBPS</i>	86
5.2.	ESTUDO FUNCIONAL DA OBP27 POR RNAi	91
5.3.	<i>DOCKING</i> DA OBP27 COM VOLÁTEIS DAS GLÂNDULAS METASTERNAIS	94
5.4.	FOSFOPROTEÔMICA	95
6.	<b>CONCLUSÕES</b>	103
7.	<b>REFERÊNCIAS</b>	105

**ANEXO A** – Artigo 1 - OLIVEIRA, D.S.; BRITO, N.F.; FRANCO, T.A.; MOREIRA, M.F.; LEAL, W.S.; MELO, A.C.A. Functional Characterization of Odorant Binding Protein 27 (RproOBP27) from *Rhodnius prolixus* antennae. *Front. Physiol.* 9:1175, 2018. 126

**ANEXO B** – Artigo 2 - OLIVEIRA, D.S.; BRITO, N.F.; NOGUEIRA, F.C.S.; MOREIRA, M.F.; LEAL, W.S.; SOARES, M.R., MELO; A.C.A. Proteomic analysis of the kissing bug *Rhodnius prolixus* antenna. *J Insect Physiol* 100, 108-118, 2017. 138

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DOENÇA DE CHAGAS

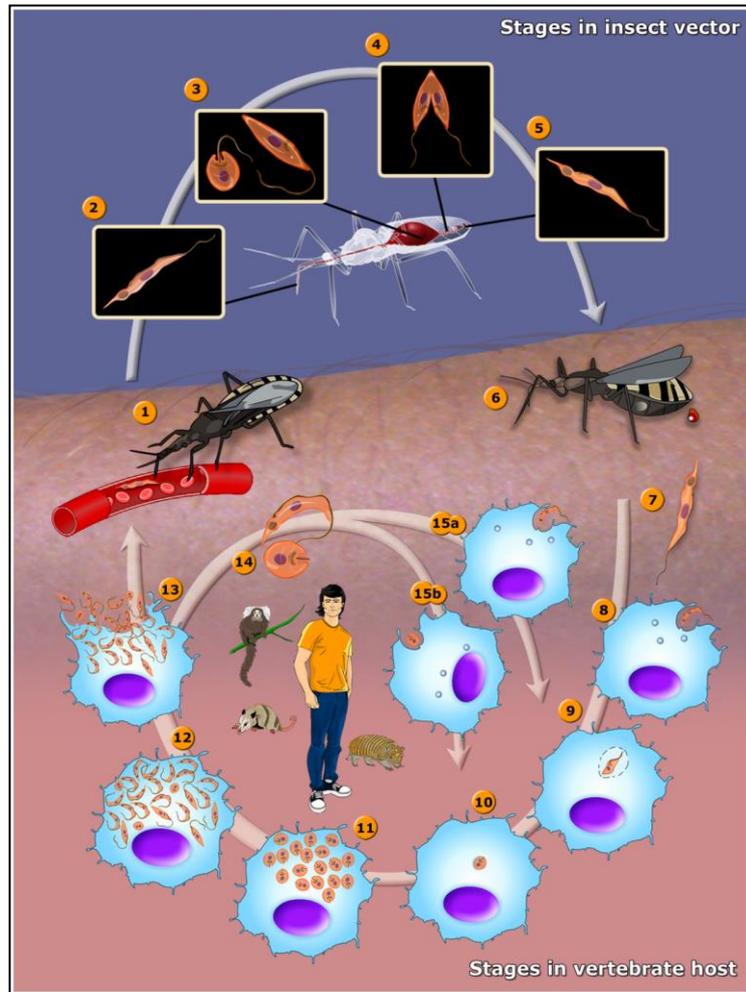
A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam acometidas pela doença em todo o mundo, principalmente na América Latina. A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que 25 milhões de indivíduos correm o risco de contrair a doença (WHO, 2018) e, aproximadamente, 22.000 morrem anualmente nas Américas em decorrência de complicações causadas pelo *T. cruzi*. No Brasil a doença de Chagas afeta mais de 1,3 milhões de pessoas (DE FUENTES-VICENTE et al, 2018). Por muitas décadas a tripanossomíase americana foi considerada estritamente rural. Atualmente, devido à globalização, ao êxodo rural, ao desmatamento e à urbanização desordenada de áreas de floresta, a doença se espalhou para regiões não endêmicas e para outros continentes (WHO, 2018).

A principal forma de transmissão do *T. cruzi* é através das fezes de insetos conhecidos popularmente por barbeiros, pertencentes à subfamília Triatominae. As fezes são depositadas próximas à região da picada durante a alimentação sanguínea. O ciclo do *T. cruzi* no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado é complexo, passando por diversas transformações. Durante a alimentação os barbeiros eliminam fezes contaminadas com tripomastigotas metacíclicos infectantes, que entram na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado através do local da picada ou acidentalmente quando o hospedeiro esfrega fezes contaminadas nas mucosas, levando à infecção (Fig. 1). Os sintomas clínicos agudos surgem 5 a 14 dias após a infecção. A doença pode ser dividida em duas fases distintas: a aguda, que pode ser assintomática ou apresentar manifestações leves e, a crônica que a longo prazo (10 a 15 anos) pode levar à morte por complicações cardíacas e/ou digestivas (GALVÃO, 2014).

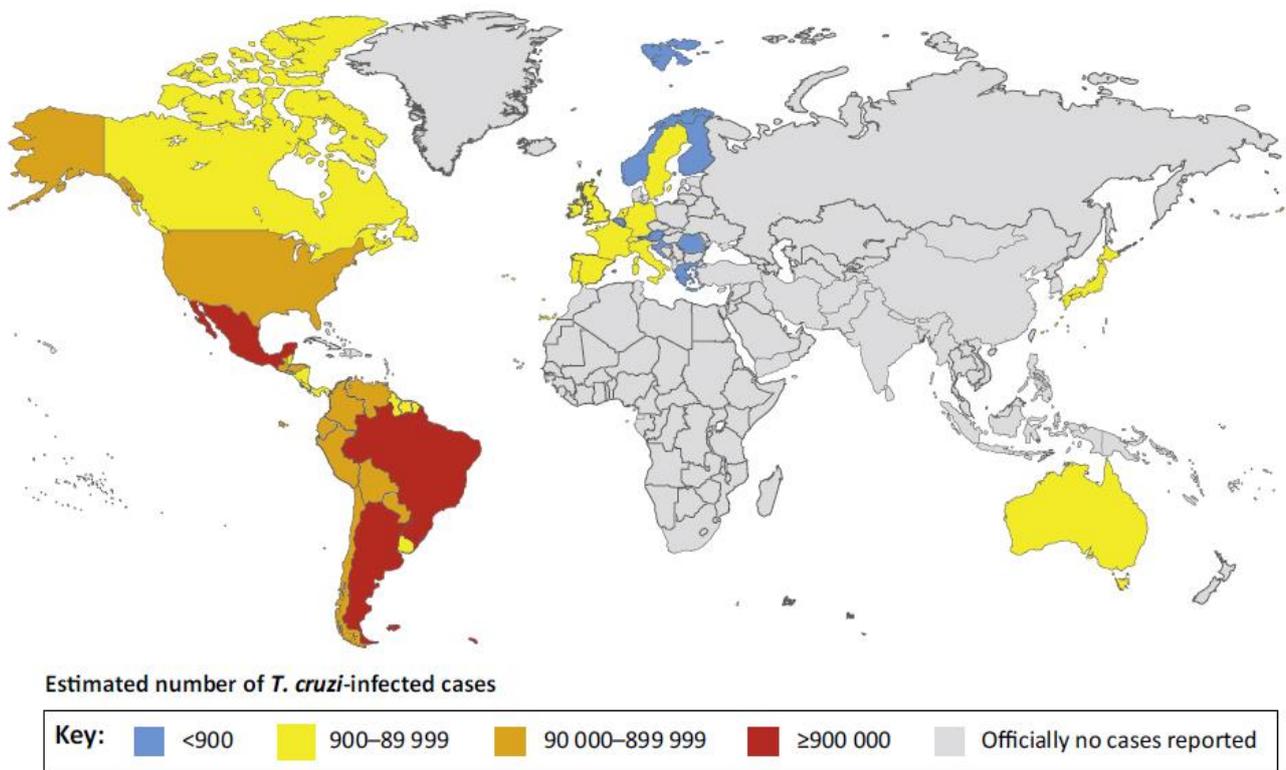
Outras formas de contrair a doença de Chagas incluem a transfusão de sangue, o transplante de órgãos e medula óssea, a transmissão congênita e, mais recentemente, a contaminação oral através de alimentos (BERN, 2015). Já foram relatados diversos casos de contaminação oral pelo consumo de açaí na Amazônia (VALENTE et al., 2006). No entanto, o inseto vetor ainda é importante para a transmissão da doença de Chagas. Estudos mostram que os barbeiros são atraídos pelo CO<sub>2</sub> produzido pelos frutos de açaí, através de fermentação espontânea em ambientes de microaerobiose (SECCADIO, 2013). Acredita-se que a

contaminação oral seja causada por fezes de triatomíneos no fruto ou por insetos inadvertidamente esmagados durante o processamento (VALENTE et al., 1999).

Embora existam outras formas de transmissão da doença, a contaminação através das fezes de triatomíneos ainda é responsável pela manutenção da tripanossomíase nas regiões endêmicas das Américas. Na natureza o ciclo biológico do protozoário entre triatomíneos e vertebrados de sangue quente ocorre naturalmente, explicando porque insetos recolhidos nas áreas endêmicas são rotineiramente encontrados infectados pelo *T. cruzi* (Fig. 2) (PEREZ et al., 2015; MINUZZI-SOUZA et al., 2016). Os diferentes meios de transmissão contribuem para um expressivo número de casos da doença de Chagas nas Américas (Fig. 2) (PEREZ et al., 2015; DE FUENTES-VICENTE et al, 2018). O benznidazol é o fármaco de escolha para o tratamento inicial. A alta frequência diária de administração do medicamento, o longo período de tratamento, aliados aos efeitos colaterais, são fatores que contribuem para o abandono da terapia. Não existe perspectiva de uma vacina a curto prazo, portanto, a principal forma de prevenção, pelo menos nas áreas endêmicas, é através do controle das populações dos triatomíneos que se faz normalmente com a utilização de inseticidas químicos (HASHIMOTO & SCHOFIELD, 2012).



**Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*.** 1. O inseto vetor (fêmea ou macho) pica um hospedeiro mamífero e ingere tripomastigotas circulantes no sangue. 2. Tripomastigotas sanguíneos. 3. Os tripomastigotas se transformam em epimastigotas e alguns esferoformas. 4. Epimastigotas se multiplicam no intestino médio. 5. Os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior. 6. O inseto vetor libera tripomastigotas metacíclicos nas fezes após se alimentar em hospedeiro mamífero. 7. Forma tripomastigota metacíclica. 8. O tripomastigota metacíclico infecta macrófagos. 9. O tripomastigota metacíclico se transforma em amastigota. 10. Amastigota é liberado do vacúolo parasitóforo. 11. Amastigotas se multiplicam no citoplasma. 12. Amastigotas se transformam em tripomastigotas. 13. Tripomastigotas rompem as células. 14. Formas amastigotas e tripomastigotas. 15 (a) Tripomastigotas e (b) amastigotas infectam macrófagos. No centro da figura, são observados os reservatórios animais mais importantes envolvidos na manutenção do parasita no ambiente doméstico e peridomiciliar. Adaptado de TEIXEIRA et al., 2012.



Trends in Parasitology

**Figura 2 - Distribuição global dos casos de doença de Chagas, baseado em estimativas oficiais, 2006-2010.** A migração global levou a um aumento da incidência da doença de Chagas em todo o mundo, dentro de regiões anteriormente consideradas não endêmicas para infecção. A propagação da doença de Chagas em todas essas áreas pode ser problemática devido à presença de vetores que podem apoiar a transmissão da doença. Adaptado de PEREZ et al., 2015.

## 1.2. *RHODNIUS PROLIXUS*

O *R. prolixus* pertence à subfamília Triatominae, ordem Hemiptera e família Reduviidae. É considerado o principal vetor da doença de Chagas na Colômbia, Venezuela e certas áreas da América Central (FITZPATRICK et al., 2008). Este inseto é o mais importante vetor do *T. cruzi* na Colômbia, pois se adaptou com sucesso aos domicílios humanos (GUHL, 1999). A preferência por se alimentar de sangue de seres humanos, a alta suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, o rápido ciclo de desenvolvimento e o curto tempo de defecação são fatores que favorecem sua capacidade vetorial (ESCANDON-VARGAS et al., 2017).

O *R. prolixus* é um inseto hemimetábolo, apresentando uma fase de ovo, cinco estádios imaturos (ninfas) e a fase adulta (Fig. 3). As ninfas são morfologicamente semelhantes aos adultos, mas apresentam mudanças graduais no tamanho, não possuem asas completas, o aparelho reprodutor não é totalmente desenvolvido e não tem maturidade sexual (Fig. 3). Existe um ligeiro dimorfismo sexual, com os machos sendo menores que as fêmeas. O desenvolvimento embrionário leva em média 14 dias (28°C), enquanto os estádios de ninfa, variam entre 3 e 4 semanas (NUNES-DA-FONSECA et al., 2016).

O inseto é hematófago durante todos os estádios de desenvolvimento, ninfas e adultos se alimentam de sangue. A alimentação sanguínea é necessária para a muda de cada um dos cinco estádios ninfais, funcionando como fonte de proteína para que o inseto complete o seu desenvolvimento e levando a um aumento significativo no tamanho do corpo (BUXTON, 1930). O sangue também é essencial para que as fêmeas produzam ovos e, conseqüentemente, para a fertilidade (VALLE et al., 1987; WHEELER, 2009).

Ao longo do século passado, o *R. prolixus* foi objeto de intensas investigações científicas que contribuíram para desvendar aspectos importantes sobre o metabolismo e a fisiologia de insetos em geral (NUNES-DA-FONSECA et al., 2016). A escolha do *R. prolixus* como modelo de estudos se reflete no fato desta espécie ser grande, de fácil manipulação e as colônias de criação serem estabelecidas e mantidas de forma fácil no laboratório, em relação a outros triatomíneos. Outro aspecto importante do uso deste inseto como modelo de estudo é a possibilidade de alimentar estes animais com dietas artificiais e/ou diretamente em vertebrados, permitindo a manipulação da homeostasia celular, o estudo de diversas rotas metabólicas e o efeito de drogas (GARCIA et al., 2012; ESCANDÓN-VARGAS et al., 2017). Em 2015, o genoma de *R. prolixus* foi finalmente disponibilizado (MESQUITA et al., 2015), assegurando a ampliação dos estudos para outras áreas do conhecimento. Estudos comportamentais puderam ser associados a genes/proteínas olfativas e seus ligantes (odores),

expandindo assim o conhecimento na área de ecologia química de triatomíneos (OLIVEIRA et al., 2017; FRANCO et al., 2016).



**Figura 3 – Ciclo de vida do *R. prolixus*.** Os diferentes estágios de desenvolvimento do *R. prolixus* desde o ovo, 1º ao 5º estágio de ninfa até ao estágio adulto estão assinalados na figura. Fonte: Foto de Rodrigo Nunes da Fonseca.

### 1.3. CONTROLE POPULACIONAL DE TRIATOMÍNEOS

Uma das formas de reduzir a incidência da doença de Chagas em áreas endêmicas é evitar o contato direto do inseto vetor com o ser humano. Atualmente, a redução da densidade populacional de insetos vetores é feita através do controle químico com o uso de inseticidas. Para os triatomíneos este controle é baseado, principalmente, na pulverização de habitações e locais de criação de animais domésticos com inseticidas. De fato, esta estratégia levou à redução da distribuição geográfica de triatomíneos e, conseqüentemente, a interrupção da transmissão da doença de Chagas em diversas áreas das regiões endêmicas (MOUGABURE-CUETO & PICOLLO, 2015).

Neste contexto, o primeiro inseticida utilizado para o controle de triatomíneos foi o organoclorado diclorodifeniltricloroetano (DDT). Apesar de poderoso no controle de populações de várias espécies de insetos, o DDT mostrou baixa eficácia contra triatomíneos e foi rapidamente descartado para o uso nestas populações. Desta forma, outros inseticidas organoclorados foram considerados candidatos alternativos, como o lindano e a dieldrina. O lindano foi usado em campanhas de controle de campo por vários anos, principalmente, na Argentina e no Brasil, enquanto a dieldrina foi introduzida na Venezuela para o controle de *R. prolixus* (DIAS et al., 2002). Inicialmente, as campanhas de controle nesses países foram bem sucedidas. No entanto, a alta estabilidade química (o agente fica muitos anos na natureza)

associada aos potenciais riscos toxicológicos e ecotoxicológicos dos inseticidas clorados, levou a rápida substituição destes agentes por compostos menos tóxicos (ZERBA, 1999).

O desenvolvimento de inseticidas piretróides como deltametrina, alfacipermetrina, betacipermetrina, entre outros, mudou drasticamente o cenário do controle de insetos. Apontados como revolucionários, os piretróides tinham a missão de controlar a população de insetos, pois tinham alta atividade inseticida, necessitavam de baixas taxas de aplicação, eram seguros do ponto de vista toxicológico, e eram rapidamente degradados no ambiente (ZERBA, 1999). No entanto, na última década, estudos mostraram que os triatomíneos conseguiram desenvolver resistência aos piretróides (MOUGABURE-CUETO & PICOLLO, 2015).

Desta forma, mudanças nas estratégias de controle devem ser aprimoradas. O manejo integrado de pragas (MIP) é um sistema utilizado atualmente para o controle racional de pragas na agricultura (ZARBIN & RODRIGUES, 2009). Este sistema preconiza a rotação de princípios ativos e uso de diferentes métodos de controle (ZARBIN & RODRIGUES, 2009).

Melhoria das habitações humanas pode ser utilizada, por exemplo, como controle físico. Casas em condições precárias são locais propícios para o estabelecimento de colônias de insetos, mantendo assim a transmissão domiciliar. Em 2000, SILVEIRA (2000) indicou que uma medida simples, como a substituição da cobertura de palha das casas infestadas por *R. prolixus* (SILVEIRA, 2000), diminuiria a incidência da doença.

Além disso, estratégias de controle sustentáveis devem ser incentivadas. Com isso diminuiríamos o impacto do uso de inseticidas para o meio ambiente, refletindo diretamente na melhoria da saúde das populações humanas rurais. Uma alternativa aos inseticidas químicos é o uso do controle biológico ou estratégias modificadoras de comportamento dos insetos, como complemento ao controle químico ou para substituí-lo totalmente. Uma estratégia de controle biológico que tem recebido atenção nos últimos anos é o uso do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no controle de triatomíneos. Várias cepas foram avaliadas contra diferentes espécies de triatomíneos, *Triatoma infestans*, *T. sordida*, *R. prolixus*, *Meccus pallidipennis* (LUZ et al. 1999, 2004; PEDRINI et al., 2009; FORLANI et al., 2011; ZUMAQUERO-RIOS et al., 2014). Esta abordagem já foi aplicada no desenvolvimento de armadilha de atração. Uma formulação em pó do fungo, combinado com feromônios de agregação estão presentes nas armadilhas. Os triatomíneos são atraídos pelo feromônio para a armadilha e ao mesmo tempo são infectados com o fungo, *B. bassiana*. A infecção causada pelo fungo leva a morte dos insetos (PEDRINI et al., 2009; FORLANI et al., 2015).

As estratégias modificadoras de comportamento são amplamente utilizadas no MIP (RODRIGUEZ-SAONA & STELINSKI, 2009; ZARBIN & RODRIGUES, 2009). Dentre estas abordagens se destacam o uso de armadilhas que utilizam semioquímicos, especificamente feromônios sexuais e voláteis de plantas hospedeiras, como ferramentas para atrair e manipular o comportamento destes insetos (RODRIGUEZ-SAONA & STELINSKI, 2009). Em triatomíneos, o uso de voláteis do hospedeiro vertebrado ou feromônios sexuais emanados pelas fêmeas, pode ser utilizado para interferir no comportamento normal do inseto e com isso controlar a densidade populacional em uma determinada área (LAZZARI & LORENZO, 2009).

#### 1.4. ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E SEMIOQUÍMICOS

Os insetos exercem suas relações ecológicas com o ambiente e com os outros organismos de várias maneiras, sendo uma das mais importantes a comunicação por meio de compostos químicos (semioquímicos). A detecção destes compostos ocorre através da modalidade sensorial denominada olfação. O processamento dos semioquímicos leva a uma reação comportamental específica. Quando os compostos são mediadores de comunicação intraespecífica, ou seja, emissor e receptor do sinal químico são da mesma espécie, este semioquímico é denominado feromônio. Os feromônios são divididos de acordo com a sua função em, feromônio de alarme, sexual, de oviposição, de atração e agregação, entre outros (ZARBIN & RODRIGUES, 2009). Quando os compostos químicos intermedeiam comportamentos de indivíduos de espécies diferentes, relação denominada de interespecífica, estas substâncias são classificadas de aleloquímicos. Os aleloquímicos podem ainda ser classificados em cairomônios, quando os compostos beneficiam o indivíduo receptor; alomônios, quando os compostos beneficiam o emissor; e sinomônios quando os dois são beneficiados (THOMAZINI, 2009; ZARBIN & RODRIGUES, 2009).

Assim como os demais insetos, o *R. prolixus* depende da olfação para sua sobrevivência, pois a utiliza na detecção de sinais químicos do hospedeiro para a busca de alimento, na detecção de feromônios sexuais para atrair o parceiro para a cópula, na percepção de feromônios de agregação, na localização de sítios de oviposição e em comportamentos de alarme (LORENZO FIGUEIRAS & LAZZARI, 2002; VITTA et al., 2002; GUERENSTEIN & LAZZARI, 2009; PONTES, 2010).

#### 1.4.1. Detecção de hospedeiros vertebrados

Insetos vetores de doenças utilizam pistas olfativas e de calor que evocam comportamentos que estão envolvidos no estabelecimento de sua capacidade vetorial. Dentre estes, a propensão para selecionar seres humanos para a alimentação sanguínea é indiscutivelmente o mais importante desses comportamentos, na medida em que contribui significativamente para a capacidade de transmitir patógenos (ZWIEBEL & TAKKEN, 2004).

Estudos mostram que diferentes espécies de mosquitos vetores de doenças são atraídas por uma série de voláteis emanados pelo hospedeiro humano. O mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue, Zika, febre amarela e chikungunya, é atraído por voláteis como CO<sub>2</sub>, ácido láctico e extratos etanólicos de resíduos da pele (GEIER et al., 1996; ZWIEBEL & TAKKEN, 2004). O vetor da malária, *Anopheles gambiae*, é atraído por ácidos carboxílicos, amônia e por compostos presentes no suor humano (KNOLS et al., 1997; BRAKS et al., 2001). O mosquito *Culex quinquefasciatus* vetor da filariose, é atraído por uma mistura de CO<sub>2</sub>, acetona, 1-octen-3-ol e ácido butírico (MBOERA et al., 2000).

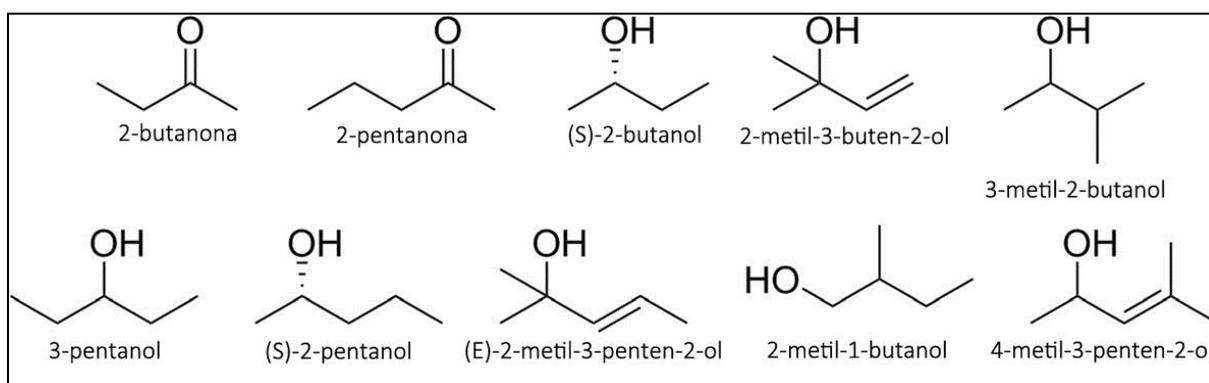
Sinais olfativos, pistas térmicas, sentidos higrícos (detecção de umidade do ambiente), e visuais desempenham papéis importantes na orientação de *R. prolixus* para a detecção de hospedeiros vertebrados (BARROZO et al., 2017). Odores são particularmente relevantes, pois estão envolvidos na busca do hospedeiro para alimentação. Diversos estudos revelaram que *R. prolixus* e outros triatomíneos são atraídos por compostos exalados pelo hospedeiro como, CO<sub>2</sub>, ácido láctico, ácido pirúvico, nonanal, ácido isobutírico, 1-octen-3-ol e amônia (BARROZO et al., 2017). Este fato sugere que existe uma maquinaria complexa de sinalização celular envolvida no processamento de detecção de odores nesta espécie. Certamente, estudar e compreender o processo de olfação em *R. prolixus* pode gerar oportunidades para desenvolver métodos sustentáveis a fim de reduzir e/ou prevenir o contato entre o inseto e o ser humano, diminuindo, desse modo, a transmissão vetorial da doença de Chagas.

#### 1.4.2. Detecção de feromônios sexuais

Vários estudos vêm demonstrando que o comportamento sexual de *R. prolixus* machos envolve a participação de feromônios sexuais produzidos pelas glândulas metasternais (GMs) localizadas no metatórax ventral de fêmeas adultas (PONTES et al., 2008, 2014; BOHMAN

et al., 2018). Odores de insetos fêmeas originados de secreções da GM, quando detectados pelos insetos machos, promovem mudanças no comportamento destes. Essas mudanças incluem a saída dos abrigos, o aumento na frequência de início do voo, o aumento na orientação durante a atividade locomotora, promovendo a agregação em torno de pares e levando ao acasalamento (PONTES et al., 2014; BOHMAN et al., 2018). Os compostos mais abundantes encontrados nas GMs de fêmeas são: 2-butanona, 2-pentanona, (S)-2-butanol, 2-metil-3-buten-2-ol, 3-metil-2-butanol, 3-pentanol, (S)-2-pentanol, (E)-2-metil-3-penten-2-ol, 2-metil-1-butanol e 4-metil-3-penten-2-ol (Fig. 4) (PONTES et al., 2008; VITTA et al., 2009).

Feromônios sexuais são amplamente utilizados em armadilhas para atração e captura de insetos pragas, como o besouro *Tribolium castaneum*, a mariposa *Spodoptera frugiperda* e a mosca *Ceratitis capitata* (TREMATERRA, 1997; ZARBIN & RODRIGUES, 2009). Um estudo recente mostrou que machos de *R. prolixus* são atraídos por uma mistura sintética de feromônios de fêmeas, sendo uma isca promissora que pode ser utilizada em armadilhas de atração no campo (BOHMAN et al., 2018). Sendo assim, seria relevante estudar genes/proteínas envolvidas na detecção destes feromônios sexuais em *R. prolixus*, através da identificação dos seus ligantes. A verificação do comportamento destes insetos diante do silenciamento destes genes também é importante, pois interferir na detecção da fêmea pelo macho impediria a cópula e, conseqüentemente, levaria a diminuição do número de insetos em determinada área.



**Figura 4 - Estruturas dos feromônios mais abundantes das glândulas metasternais de fêmeas de *R. prolixus*.** Adaptado de BOHMAN et al., 2018.

### 1.4.3. Comportamento de agregação

Os triatomíneos passam a maior parte de suas vidas escondidos em abrigos escuros e estreitos. O comportamento de agregação dentro desses micro-ambientes é induzido por sinais

emitidos por suas fezes e por componentes cuticulares deixados no substrato do abrigo (BARROZO et al., 2017).

Voláteis presentes nas fezes de várias espécies de triatomíneos (*T. infestans*, *T. brasiliensis* e *Panstrongylus megistus*) são capazes de atrair insetos para os abrigos, imitando o efeito de agregação. Estes compostos incluem substâncias altamente voláteis que são subprodutos comuns do metabolismo microbiano, tais como ácidos graxos de cadeia curta, um diol e uma amida (MOTA et al., 2014). Em *R. prolixus* foi relatada a agregação induzida por substâncias presentes em suas fezes (SCHOFIELD & PATTERSON, 1977). Além disso, respostas interespecíficas também foram observadas, voláteis oriundos da microbiota intestinal, presentes nas fezes de *R. prolixus*, são capazes de induzir o comportamento de agregação em *T. infestans* (LORENZO FIGUEIRAS & LAZZARI, 2002), o contrário não ocorre.

A cutícula de *T. infestans* produz uma substância química que impregna superfícies e provoca o comportamento de agregação entre os indivíduos desta espécie. Este sinal constitui uma marca de agregação que permanece em lugares anteriormente ocupados, denominado *footprint* (LORENZO FIGUEIRAS & LAZZARI, 1998). Aparentemente, *R. prolixus* não exhibe resposta a sinais químicos emitidos de sua própria cutícula (LORENZO FIGUEIRAS & LAZZARI, 2002). Além disso, o *R. prolixus* não entra em abrigos de *T. infestans*, pois não responde aos sinais de agregação do *Triatoma*. Essa diferença entre as espécies pode estar relacionada com os seus tipos de habitats e hospedeiros. O *R. prolixus* vive em palmeiras, associado a ninhos de aves, e o uso deste sinal pode ser menos importante na orientação para refúgios, pois a proteção é relativamente próxima à fonte de alimento. Ao contrário do *T. infestans*, que vive em habitats domésticos e os seus possíveis abrigos estão presentes nas paredes e tetos, ou seja, os insetos devem deslocar-se para encontrar um hospedeiro e retornar a um local protegido, tornando o refúgio relativamente longe da fonte de alimento (LORENZO FIGUEIRAS & LAZZARI, 1998).

#### **1.4.4. Localização de sítios de oviposição**

A seleção pelas fêmeas de locais adequados para depositarem seus ovos é um fator chave para a sobrevivência de seus imaturos (ovos, larvas ou ninfas). A determinação do local adequado para oviposição envolve a interpretação de uma série de mensagens químicas e olfativas (NAVARRO-SILVA et al., 2009).

Mosquitos do gênero *Culex* depositam seus ovos em água suja, rica em matéria orgânica, na qual suas formas larvais exploram os nutrientes para alimentação. Fêmeas do mosquito *Culex* colocam seus ovos em grupos de mais de 100 ovos, formando estruturas chamadas “jangadas” que flutuam na superfície da água (SULLIVAN et al., 2014). As fêmeas grávidas de *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens* e *Cx. tarsalis* são atraídas para os sítios de oviposição pelo feromônio de oviposição de mosquito (MOP). O MOP é produzido nas jangadas de ovos induzindo, nas fêmeas grávidas, o comportamento de oviposição (BRUNO & LAURENCE, 1979; LAURENCE & PICKETT, 1982; SULLIVAN et al., 2014).

As fêmeas de *R. prolixus* possuem o comportamento de ovipor e aderir seus ovos a um substrato como as penas de aves, sugerindo que a seleção de um local adequado para a oviposição está relacionada à disponibilidade de uma fonte de alimento. As ninfas de triatomíneos que eclodem dos ovos necessitam se alimentar de sangue. Estudos mostraram que odores naturais do hospedeiro, como aqueles liberados pelas penas de galinhas, estimulariam o comportamento de oviposição nesta espécie (SCHILMAN et al., 1996; GUIDOBALDI & GUERENSTEIN, 2015). Portanto, o odor do hospedeiro orienta o *R. prolixus* na busca de locais adequados para a oviposição (GUIDOBALDI & GUERENSTEIN, 2015).

#### **1.4.5. Feromônios de alarme**

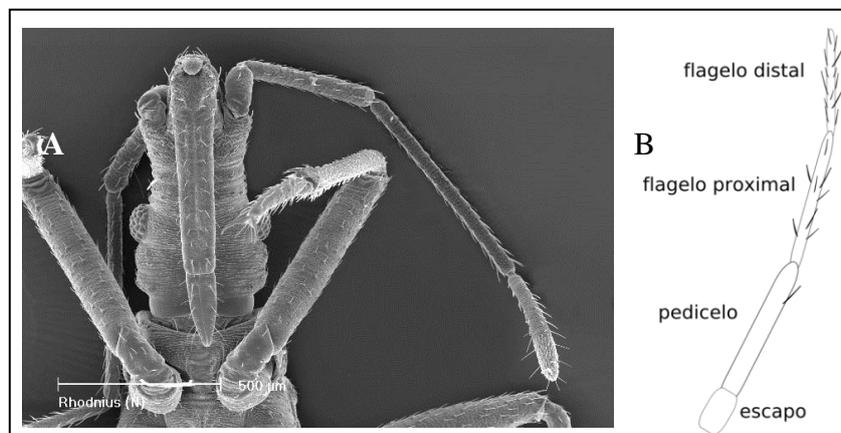
Insetos adultos perturbados mecanicamente liberam um odor pungente que funciona como um feromônio de alarme (BARRETT, 1976; KÄLIN & BARRET, 1975; WARD, 1981; MANRIQUE et al., 2006). Em *R. prolixus* este odor é produzido por um par de glândulas situadas no metatórax dorsolateral, denominadas glândulas de Brindley (GBs) (PATTENDEN & STADDON, 1972; PONTES, 2010), que estão presentes exclusivamente em insetos adultos. O feromônio de alarme de triatomíneos é uma mistura complexa de voláteis que varia de acordo com as espécies (GUERENSTEIN & GUERIN, 2004). O ácido isobutírico é o principal componente do feromônio de alarme em todas as espécies estudadas que possuem as GBs funcionais, esta substância teria função de defesa, agindo contra possíveis predadores (SCHOFIELD, 1979). Outros ácidos carboxílicos de cadeia curta, como ácido butírico e 2-metil-butírico também são encontrados em secreções das GBs (BARROZO et al., 2017).

## 1.5. OLFAÇÃO EM INSETOS

### 1.5.1. Sensilas e antenas

O sistema sensorial de insetos é composto por um grande número de pequenas estruturas quitinosas denominadas sensilas, onde se localizam os neurônios sensoriais olfativos (NSOs) (GUIDOBALDI et al., 2014). As sensilas olfativas estão localizadas na superfície de antenas e palpos maxilares, enquanto as sensilas gustativas estão localizadas nas peças bucais (palpos labiais e probóscides, um apêndice tubular sugador de alimentos), pernas e asas (DE BRUYNE & BAKER, 2008; GUERENSTEIN & HILDEBRAND, 2008; NICHOLS & VOGT, 2008; SPARKS et al., 2015), mas também é possível encontrá-las em outras partes do corpo de algumas espécies de insetos (CATALÁ, 1995). As sensilas abrigam os neurônios sensoriais olfativos (NSOs). Várias células epidérmicas especializadas (células acessórias) embainham os neurônios nas sensilas (LORENZO & MELO, 2012).

Em triatomíneos a olfação ocorre nas antenas, o principal órgão sensorial responsável pela detecção de moléculas químicas presentes no ar. As antenas de *R. prolixus* se localizam próximas ao ápice da cabeça, inseridas no tubérculo antenífero. São divididas em três segmentos: escapo, pedicelo, e dois flagelômeros, flagelo proximal e flagelo distal (Fig. 5). As sensilas olfativas são encontradas apenas nos flagelômeros distais e proximais e, dependendo da espécie, também no pedicelo (BARROZO et al., 2017). As sensilas possuem múltiplos poros e o interior da antena é preenchido pela linfa sensilar. Três tipos de sensilas olfativas foram descritas no flagelo de diferentes espécies de triatomíneos: basicônicas (paredes finas), tricóides (paredes grossas) e caéticas (parede dupla) (WIGGLESWORTH & GILLET, 1934; CATALÁ, 1994; MAY-CONCHA et al., 2016).



**Figura 5 – Morfologia das antenas de *R. prolixus*.** (A) Vista ventral da cabeça de *R. prolixus*. As sensilas podem ser vistas distribuídas por toda a antena. Adaptado de OTALORA-LUNA, 2005. (B) Segmentos da antena de um triatomíneo. Ilustração de OTALORA-LUNA, 2007. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antena-triatomine.PNG>.

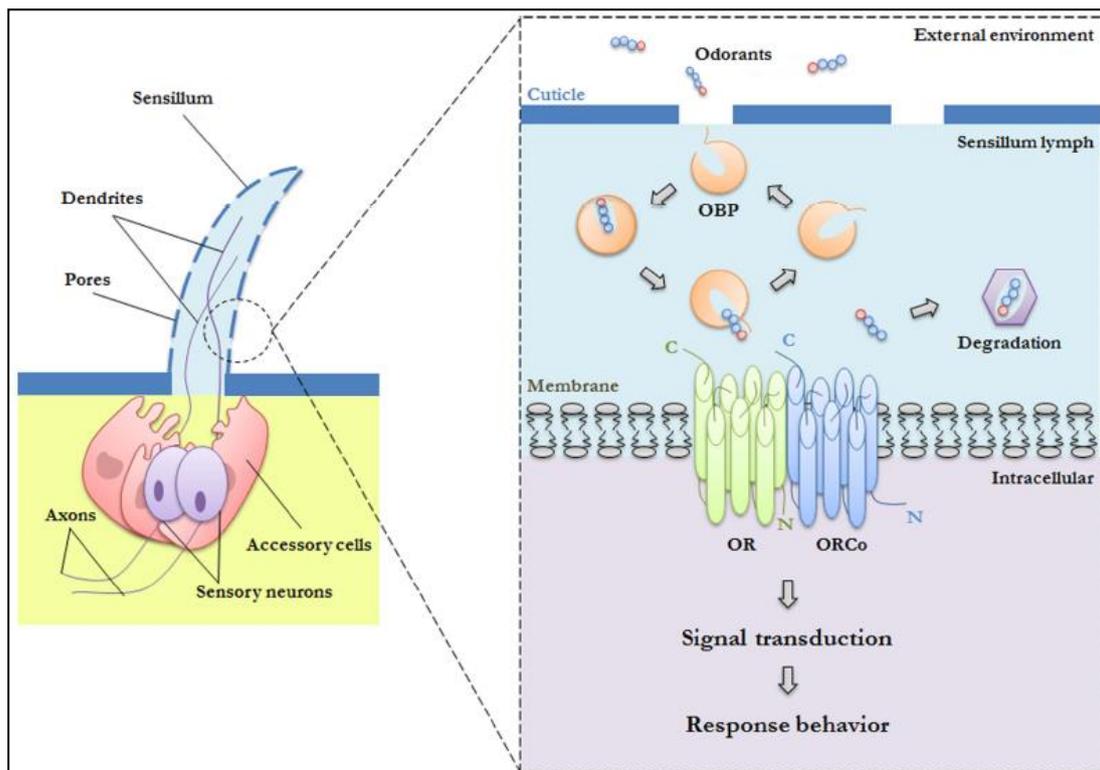
### 1.5.2. Visão geral da recepção de odores

A sinalização olfativa envolve uma série de proteínas, que incluem proteínas ligadoras de odor (OBPs), proteínas quimiossensoriais (CSPs), receptores olfativos (ORs), receptores ionotrópicos (IRs) e enzimas degradadoras de odor (ODEs). A olfação se inicia quando moléculas de odor presentes no ambiente externo entram pelos poros das sensilas (Fig. 6). As moléculas de odor são geralmente hidrofóbicas, e quando atingem o interior aquoso das sensilas precisam ser solubilizadas e transportadas do ambiente externo até a membrana quimiossensível dos NSOs. Esta tarefa é realizada por pequenas proteínas solúveis, encontradas em alta concentração na linfa sensilar, as OBPs e as CSPs. Estas proteínas transportam semioquímicos através da linfa sensilar até os ORs presentes na membrana dos NSOs (Fig. 6) (BRITO et al., 2016; PELOSI et al., 2018).

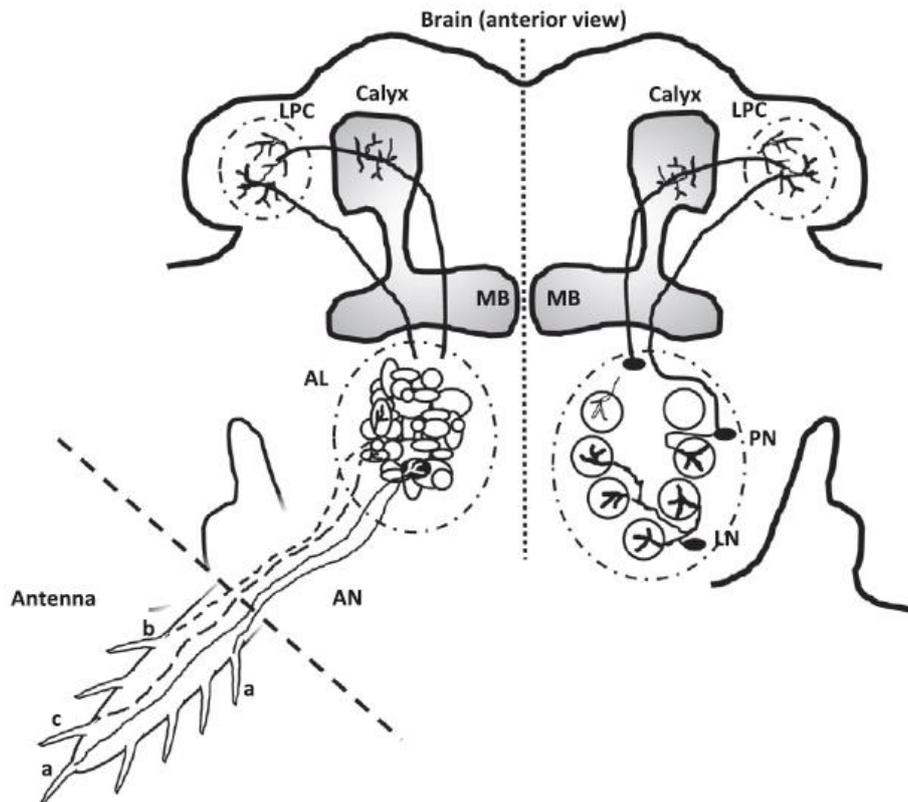
Os ORs de insetos são proteínas com sete domínios transmembranares, mas em contraste com as proteínas GPCR (receptores acoplados à proteína G) de vertebrados, sua topologia é invertida, com o N-terminal intracelular e o C-terminal extracelular (CAREY & CARLSON, 2011; WICHER, 2014). Os ORs funcionam como um complexo heteromérico formado por um OR responsável pela ligação ao composto químico (OR-X), e um coreceptor olfativo (Orco) obrigatório (BENTON et al., 2006). A sequência primária de aminoácidos do Orco é conservada entre as diferentes espécies de insetos apresentando em torno de 94% de similaridade (STENGL & FUNK, 2013). Em contraste, ORs convencionais apresentam pouca ou nenhuma similaridade em suas sequências primárias, comparando os diferentes ORs dentro de uma mesma espécie ou entre espécies diferentes. Isso reflete a especificidade de cada receptor ao seu ligante e a sua função em diferentes espécies de insetos (CAREY & CARLSON, 2011). Curiosamente, o Orco é expresso na maioria dos NSOs, enquanto os ORs são expressos apenas em subconjuntos específicos de NSOs (NAKAGAWA et al., 2005; CAREY & CARLSON, 2011). Acredita-se que o complexo OR•Orco atue em conjunto para formar um canal iônico não seletivo, dependente de ligante (SPARKS et al., 2015) responsável pela transdução do sinal olfativo (Fig. 6).

A ligação do odor ao OR desencadeia o início da sinalização olfativa (Fig. 6). A informação periférica, formada pela apresentação do odor pela OBP ao complexo OR•Orco é propagada pelo axônio do NSO, chegando à região glomerular do lobo antenal. Em seguida, neurônios de segunda ordem, presentes no lobo antenal, propagam a informação até uma região denominada de corpo de cogumelo, onde finalmente a informação é processada (Fig. 7) (GUIDOBALDI et al., 2014). Após a transdução do sinal olfativo, o complexo OBP-

odor é degradado por ODEs ou por mecanismos rápidos de inativação ainda não identificados que podem ocorrer antes da degradação (Fig. 6) (ISHIDA & LEAL, 2005; LEAL, 2012; SAKURAI et al., 2014).



**Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de olfação em insetos.** Uma vez que moléculas de odor entram pelos poros das sensilas, se ligam e são solubilizados pelas OBPs, transportados através da linfa sensilar e finalmente atingem os dendritos sensoriais, onde ativam ORs ligados à membrana. A transdução do sinal evoca uma resposta comportamental ao estímulo detectado e odores dispersos são rapidamente degradados. Adaptado de BRITO et al., 2016.



**Figura 7 - Visão anterior do cérebro de um inseto adulto mostrando as vias olfativas.** Esquerda: os neurônios sensoriais olfativos (NSOs) estão localizados dentro das sensilas nas antenas e peças bucais (não mostradas). Os axônios dos NSOs projetam, via nervo da antena (AN), para glomérulos esféricos no lobo antenal (AL), onde fazem sinapse com interneurônios (LNs) e neurônios de projeção (PNs). NSOs expressando o mesmo receptor olfativo projeta-se para o mesmo glomérulo (por exemplo, neurônios a) enquanto NSOs que expressam outros receptores projeta-se para outros glomérulos (por exemplo, neurônios b, c). Direita: LNs e PNs projetam a partir de corpos celulares localizados em um dos vários aglomerados de células do lado de fora da massa glomerular. Os LNs são multiglomerulares e limitados ao AL. PNs são uni ou multi-glomerulares e projetam-se para fora, para o protocerebrum lateral (LPC) e corpos de cogumelo (MB). Adaptado de GUIDOBALDI et al., 2014.

### 1.5.3. Sinalização olfativa

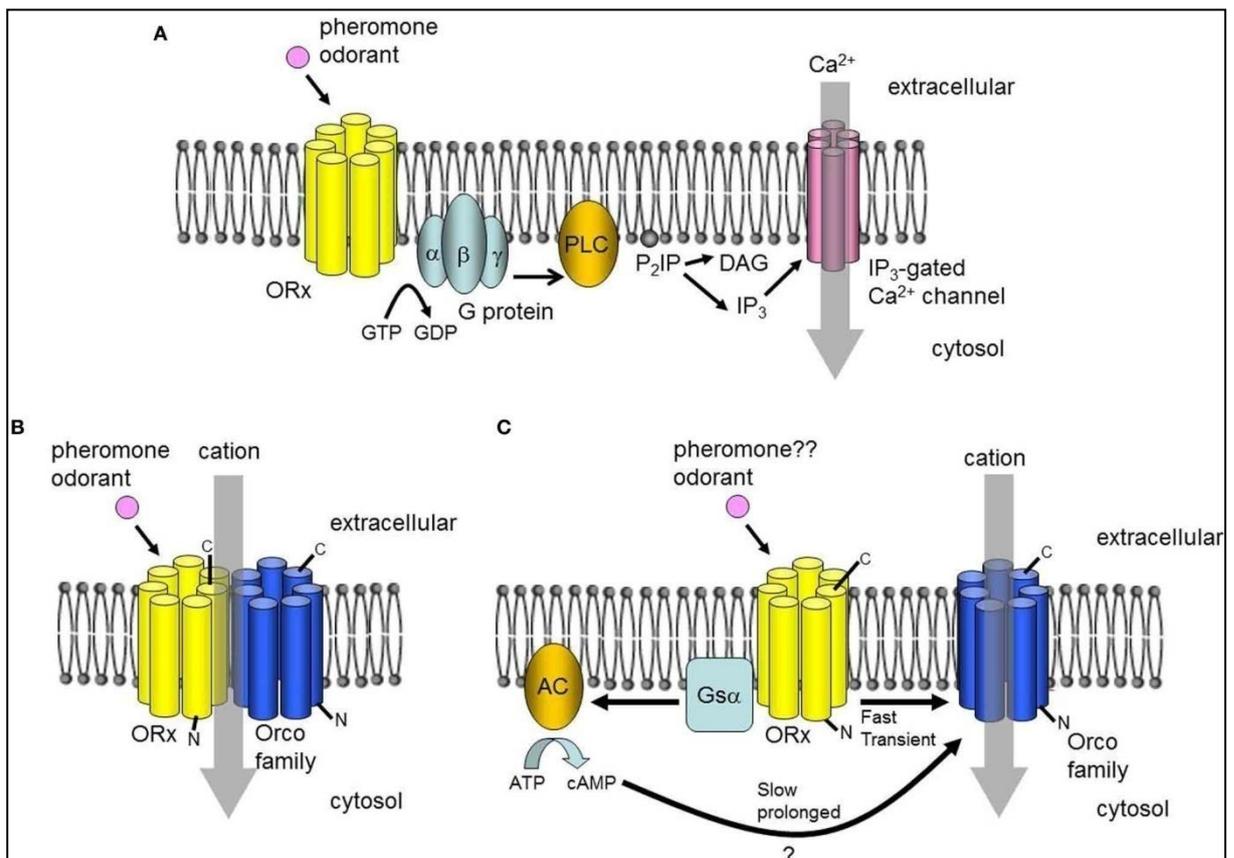
Após a ligação do semioquímico ao complexo heteromérico OR•Orco, inicia-se a via de transdução do sinal olfativo, na qual a informação química da molécula de odor é convertida em sinais elétricos nos NSOs. Diversos estudos mostram que a sinalização olfativa em insetos pode ocorrer por diferentes mecanismos.

No modelo clássico o OR funciona como uma GPCR, com ativação de uma cascata mediada por segundo mensageiro. A estimulação do OR por um odor ativa uma proteína G que por sua vez ativa a fosfolipase C (PLC), que leva a um aumento de inositol trifosfato (IP3) e DAG (diacilglicerol). O aumento de IP3 ativa um canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de IP3 fazendo com que os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentem, ativando canais de cátions dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  que conduz a uma corrente de transdução (Fig. 8A) (STENGL & FUNK, 2013; SAKURAI et al., 2014).

Em um modelo alternativo, o OR formaria um complexo heteromérico com o Orco, gerando um canal iônico induzido pela ligação do OR ao odor. O canal formado conduziria a um influxo de cátions, levando à transdução do sinal olfativo (Fig. 8B) (SAKURAI et al., 2014; SPARKS et al., 2015). Neste modelo não há evidências de participação da cascata mediada por proteína G e nem de segundos mensageiros (SMART et al., 2008).

Outro modelo sugere que o Orco em si seria um canal de cátions e que este canal seria ativado por duas vias diferentes. Na primeira via (rápida, ionotrópica) o odor ativaria o OR, que por sua vez ativaria diretamente o canal do Orco. Na segunda via (lenta, metabotrópica) a ativação do OR resultaria na ativação de uma cascata envolvendo uma proteína G e uma adenilato ciclase (AC). Esta ativação resultaria em um aumento da concentração de AMPc, que provocaria a ativação do Orco (Fig. 8C) (WICHER et al., 2008; SAKURAI et al., 2014).

A fosforilação do Orco por uma proteína quinase C (PKC), ativada por segundos mensageiros, poderia melhorar a resposta a odores, sugerindo que o sistema de segundo mensageiro modularia as respostas a odores através da fosforilação do Orco (WICHER et al., 2011). Estudos adicionais são necessários para construir um consenso sobre o papel das vias envolvendo cascatas mediadas por proteína G e segundo mensageiro na recepção de odores em insetos.



**Figura 8 - Mecanismos propostos para a transdução de sinal olfativa de insetos.** (A) Modelo clássico da transdução olfativa de insetos que envolve uma proteína G mediada pelo caminho PLC-IP<sub>3</sub> (B) Modelo alternativo em que o receptor olfativo (OR) forma um canal de cátions heteromérico não-seletivo com uma proteína da família Orco, que é ativado pela ligação do odor. (C) Modelo alternativo postulando duas vias, ambas dependem da função de canal de cátions do Orco. A via ionotrópica envolve a ativação direta do Orco por um OR ativado por um ligante, induzindo um influxo de cátion rápido, porém transitório. A via metabotrópica é acoplada à proteína G e induz uma corrente de cátions lenta, porém prolongada. Adaptado de SAKURAI et al., 2014.

#### 1.5.4. Proteínas ligadoras de odor (OBPs)

As OBPs são uma família multigênica de proteínas hidrofílicas com características ácidas. São o elemento mais importante do sistema olfativo de um inseto, pois realizam o primeiro contato entre os odores do meio exterior com o interior das sensilas, transportando as moléculas de odor até os NSOs (WOJTASEK et al., 1999; BREZOLIN et al., 2018). As OBPs são sintetizadas pelas células acessórias e são secretadas na linfa sensilar (BRITO et al., 2016).

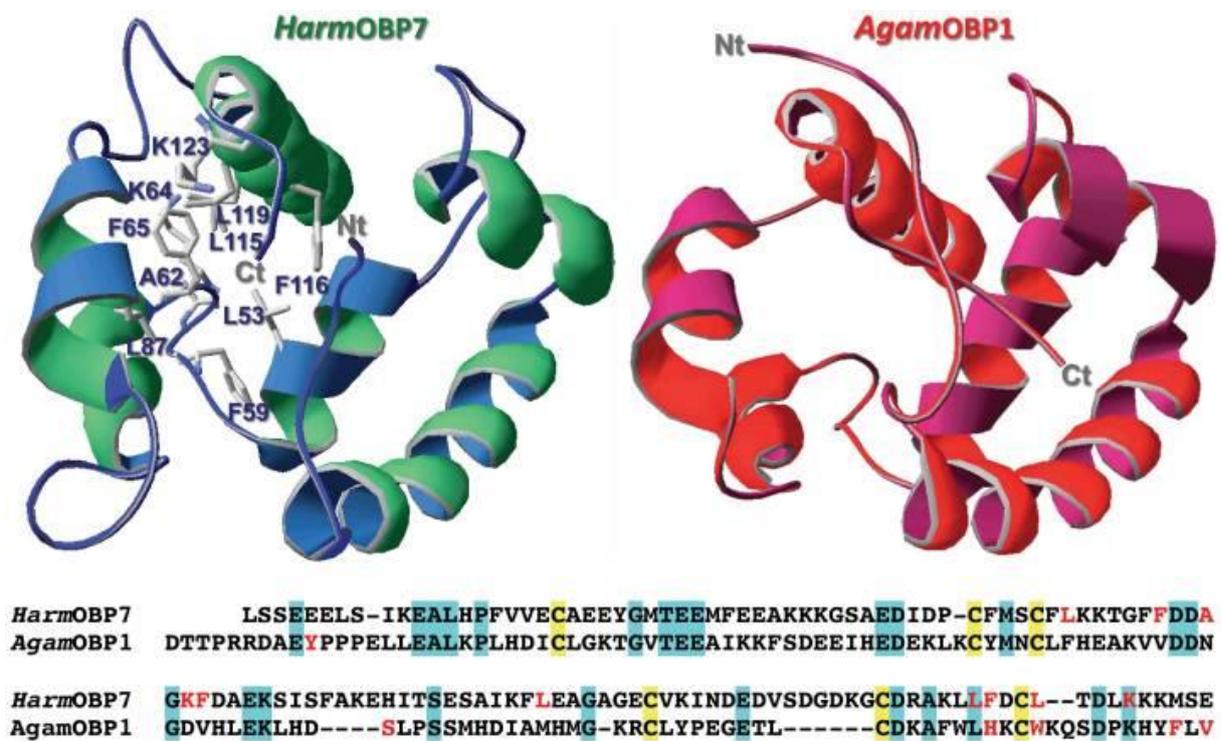
##### 1.5.4.1. Estrutura de OBPs

As OBPs de insetos são proteínas pequenas, com peso molecular entre 14-30 kDa (130-140 resíduos) (PELOSI et al., 2006; LEAL, 2012). OBPs são extremamente divergentes em suas sequências de aminoácidos entre membros da mesma espécie, bem como entre espécies diferentes, com até menos de 10% de similaridade (PELOSI et al., 2014).

A Figura 9 apresenta o modelo da estrutura tridimensional de duas OBPs clássicas de insetos: HarmOBP7 de *Helicoverpa armigera*, que foi construído sobre a estrutura cristalina da OBP1 de *An. gambiae* (SUN et al., 2013). As OBPs clássicas possuem um padrão de 6 cisteínas conservadas em sua sequência de aminoácidos (Fig. 9) e são formadas por 6  $\alpha$ -hélices ligadas por 3 pontes dissulfeto em um padrão específico C1-X25-30-C2-X3-C3-X36-42-C4-X8-14-C5-X8-C6 (XU et al., 2003), montadas em uma estrutura compacta (Fig. 9) (PELOSI et al., 2014).

Além disso, OBPs com variados números de cisteínas tem sido relatadas em diferentes espécies de insetos: *Minus C* OBPs (menos de seis cisteínas), *Plus C* OBPs (oito cisteínas e uma prolina conservada), OBPs atípicas (nove a dez cisteínas) e dímeros de OBPs (dois domínios de OBPs fusionados) (XU et al., 2005; PELOSI et al., 2006; VIEIRA et al., 2012). As OBPs podem ser divididas em duas subfamílias: proteínas ligadoras de feromônios (*pheromone binding proteins* - PBPs) e OBPs gerais (LEAL et al., 1995).

OBPs possuem afinidade por odores, geralmente hidrofóbicos, que se acoplam ao interior hidrofóbico da proteína denominado *binding pocket* (Fig. 9) (VOGT & RIDDIFORD, 1981; PELOSI et al., 2006; SUN et al., 2013). Diferentes estudos mostraram que o *binding pocket* possui um grande número de resíduos hidrofóbicos envolvidos na interação com ligantes específicos (Fig. 9) (SUN et al., 2013; ISHIDA et al., 2014; PELOSI et al., 2014; PELOSI et al., 2018).



**Figura 9 - Modelo tridimensional da HarmOBP7 de *H. armigera*.** O modelo foi construído sobre a estrutura cristalina da OBP1 de *An. gambiae* (acc. 3 n7 hB). No alinhamento das duas proteínas, as cisteínas são destacadas em amarelo, resíduos comuns em azul claro. Resíduos que fazem parte do *binding pocket* estão em fonte vermelha e são rotulados no modelo da HarmOBP7. Três resíduos de fenilalanina e quatro de leucina estão dentro do *binding pocket*, de acordo com a afinidade desta proteína para compostos hidrofóbicos. Adaptado de SUN et al., 2013.

#### 1.5.4.2. Função das OBPs

Estudos recentes indicam que as OBPs são importantes no reconhecimento de moléculas olfativas e podem detectar e distinguir diversos odores específicos, como feromônios ou moléculas de odor do hospedeiro (XU et al., 2005; BIESSMANN et al., 2010; HE et al., 2011; PELLETIER et al., 2010). Com base em análises de PCR quantitativo, estudos mostraram que genes de *OBPs* são expressos majoritariamente nas antenas (GU et al., 2011a; HE et al., 2011; YUAN et al., 2015). No entanto, algumas OBPs também são expressas em outros órgãos, como pernas, cabeças, órgãos gustativos e intestino, o que sugere que estas proteínas podem estar associadas com outras funções além do transporte de odores (KITABAYASHI et al., 1998; SHANBHAG et al., 2001; JEONG et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014). Dessa forma, as OBPs expressas exclusivamente em órgãos olfativos, como as antenas, por exemplo, são consideradas OBPs verdadeiras, cuja principal função é o transporte de moléculas de odor (LEAL, 2006).

O genoma de *R. prolixus* descreveu 27 genes candidatos a OBPs (MESQUITA et al., 2015). Em seguida, o mapeamento proteômico das antenas de adultos identificou 17 OBPs (OLIVEIRA et al., 2017). Portanto, dos 27 genes OBPs candidatos, pelo menos 17 podem estar sendo transcritos nas antenas, sugerindo que estas proteínas transportem odores. No entanto, as funções e os ligantes específicos das OBPs de *R. prolixus* ainda não são conhecidos.

A caracterização das funções das OBPs é feita por diferentes metodologias. Por exemplo, a identificação dos ligantes é baseada em expressão heteróloga e ensaios de *binding* utilizando sondas fluorescentes (HE et al., 2010; GU et al., 2011b; YIN et al., 2015). Estudos também utilizam a técnica de RNAi para silenciar OBPs e detectar os seus ligantes por eletroantenograma ou ensaios comportamentais (PELLETIER et al., 2010; HE et al., 2011).

#### 1.5.4.3. RNAi e proteínas ligadoras de odor

A técnica de RNA de interferência (RNAi) pode ser utilizada para analisar o papel das OBPs na detecção de moléculas de odor. A inativação de genes por deleção genética ou por bloqueio da tradução de seus transcritos (silenciamento) constitui uma estratégia extremamente importante tanto para atribuir função aos genes como para mapear a inter-relação dos diferentes componentes das vias regulatórias intracelulares. Esta técnica consiste no silenciamento gênico pós-transcricional atuando sobre o RNA mensageiro (RNAm),

iniciado pela introdução de RNA dupla-fita (dsRNA) em uma célula (FIRE et al., 1998). Após ser introduzido no organismo, a molécula de dsRNA é reconhecida e clivada pelo complexo enzimático *Dicer* para produzir pequenos fragmentos de RNA (*small interfering RNAs* - siRNAs). Estes interagem com o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, de forma que a fita antisenso do duplex guia o complexo até o RNAm alvo. Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o referido RNAm, degradando-o e, conseqüentemente, ocorre o silenciamento (MARTINEZ et al., 2002).

A técnica de RNAi foi utilizada com sucesso em diversos estudos para interferir no processo de olfação de insetos e identificar funções de OBPs na discriminação de odores (BIESSMANN et al., 2010; PELLETIER et al., 2010; HE et al., 2011; SWARUP et al., 2011; DENG et al., 2013; LI et al., 2016; SHORTER et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Estes estudos verificaram os efeitos fenotípicos do silenciamento medindo as respostas eletrofisiológicas das antenas a determinados semioquímicos para, desta forma, identificar os ligantes das OBPs (BIESSMANN et al., 2010; PELLETIER et al., 2010; ZHANG et al., 2016). Além da identificação dos ligantes é importante observar os impactos que o silenciamento pode causar no comportamento do inseto. Nesse contexto, diversos estudos verificaram os efeitos comportamentais desencadeados pelo silenciamento de OBPs utilizando ensaios comportamentais (HE et al., 2011; SWARUP et al., 2011; DENG et al., 2013; LI et al., 2016; SHORTER et al., 2016).

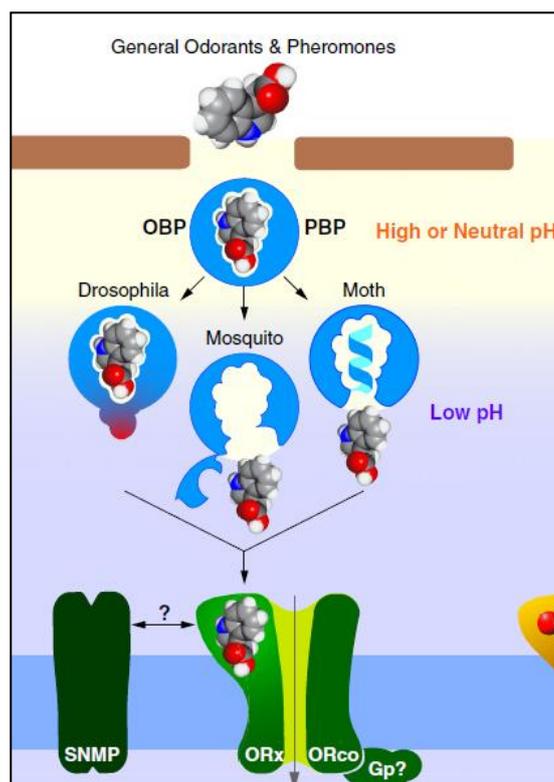
#### 1.5.4.4. Modelos propostos dos mecanismos de ação de OBPs de insetos

As OBPs se ligam a diferentes classes de odores específicos que induzem diferentes respostas comportamentais. Os odores são moléculas voláteis de diversas naturezas químicas, como por exemplo, compostos aromáticos heterocíclicos: indol (feromônio de oviposição em mosquitos - BIESSMANN et al., 2010); álcoois: bombicol (feromônio sexual de bicho-da-seda - KAISLING & KASANG, 1978); aminas: 3-metilindol (feromônio de oviposição em mosquitos - PELLETIER et al., 2010); aldeídos: nonanal (feromônio de oviposição em mosquitos; odor do hospedeiro - PELLETIER et al., 2010; LEAL et al., 2017).

Os odores se ligam às proteínas transportadoras, com alta afinidade, de maneira reversível e com vários graus de especificidade através de pelo menos três modos distintos de ação, porém estes mecanismos não são conclusivos (Fig. 10) (PELOSI et al., 2006; SPARKS et al., 2015; BRITO et al., 2016). Na mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, o complexo

OBP-odor pode provocar diretamente a ativação do OR (Fig. 10) (XU et al., 2005; LAUGHLIN et al., 2008). Este modelo é controverso e foi contestado por um estudo recente (GOMEZ-DIAZ et al., 2013). Em mariposas, as OBPs dependem de uma  $\alpha$ -hélice ativada por pH para ejetar o odor do *binding pocket* (Fig. 10) (WOJTASEK et al., 1999; HORST et al., 2001). Em um terceiro mecanismo, descrito em mosquitos, as OBPs se ligam aos odores em pH neutro ou elevado e o ligante é coberto por um "loop" do C-terminal que atua como uma "tampa" (Fig. 10) (WOGULIS et al., 2006). A superfície da membrana em torno do receptor olfativo é descrita como carregada negativamente, o que induz a uma diminuição do pH em torno desta região (KEIL, 1999). Quando o complexo OBP-odor atinge a membrana do dendrito do NSO, onde o pH está mais baixo, a OBP muda de conformação, levando a extremidade C-terminal a se afastar da cavidade de ligação e, portanto, "a abertura da tampa", liberando o odor que em seguida se liga ao OR e, assim, desencadeia-se uma cascata de sinalização que resulta na transdução do sinal químico (Fig. 10) (LEAL 2005; PELOSI et al., 2006; LEAL 2013; GUIDOBALDI et al., 2014; MANOHARAN et al., 2014; SUH et al., 2014).

Diante do exposto, pode-se concluir que o modo de ação de OBPs ainda é uma questão em debate e apresenta características específicas dependendo da espécie. Outro mecanismo discutido em animais é a fosforilação de OBPs. A fosforilação pode servir como um interruptor molecular para o controle da ligação e a liberação de odores.



**Figura 10 – Modelos do mecanismo de ação de OBPs de insetos.** Na mosca-da-fruta, *D. melanogaster*, o complexo OBP-odor ativa diretamente o receptor olfativo. Em mosquitos, a molécula de odor é coberta por um “loop” do C-terminal que atua como uma “tampa”. Quando este complexo chega à região perto do neurônio, a OBP muda de conformação induzida pela queda do pH e dessa forma libera o odor. Já as OBPs de mariposas dependem de uma  $\alpha$ -hélice ativada por pH baixo para ejetar o odor. Adaptado de SUH et al., 2014.

## 1.6. IDENTIFICAÇÃO DE OBPS FOSFORILADAS POR FOSFOPROTEÔMICA

A fosforilação é uma modificação pós-traducional envolvida em diversos mecanismos regulatórios em células eucarióticas, tais como regulação da expressão de genes, divisão celular, transdução de sinal, metabolismo, diferenciação e apoptose, que são regulados pela interação de proteínas quinases e fosfatases. A fosforilação de serina, treonina e tirosina permite a modificação de determinadas funções das proteínas. A identificação de fosfoproteínas pode ser realizada por diversas tecnologias. A espectrometria de massas (MS) de fosopeptídeos, obtidos a partir da digestão trípica de proteínas, tornou-se uma ferramenta poderosa para caracterização de fosfoproteínas, por ser um método sensível e por permitir a identificação de sítios de fosforilação específicos (TICHY et al., 2011; LIU et al., 2014; SOLARI et al., 2015).

Apesar da espectrometria de massas de fosfopeptídeos ser uma técnica extremamente sensível e permitir a detecção de fosfopeptídeos presentes em baixos níveis, a identificação de

fosfopeptídeos ainda é uma tarefa difícil, pois estão presentes em baixa abundância e suas isoformas não fosforiladas estão presentes em quantidades muito maiores dentro da célula. Além disso, devido aos fosfatos serem carregados negativamente, a ionização durante a MS é insuficiente e com isso as espécies fosforiladas são pouco detectadas (FÍLA & HONYS, 2012; BELTRAN & CUTILLAS, 2012).

Dessa forma, para aumentar o número de fosfoproteínas identificadas por MS é preciso realizar o enriquecimento dos fosfopeptídeos. O enriquecimento consiste em remover proteínas ou peptídeos não fosforilados das amostras, para enriquecer as isoformas fosforiladas antes da MS. Uma infinidade de técnicas de enriquecimento de fosfoproteínas tem surgido nos últimos anos e têm sido fundamentais para o desenvolvimento e sucesso da fosfoproteômica (DUNN et al., 2010; BELTRAN & CUTILLAS, 2012). Estas técnicas podem ser divididas em dois grupos: aqueles que executam o enriquecimento no nível de proteína, ou seja, que é feita com a proteína inteira e aqueles que enriquecem fosfopeptídeos após a digestão de proteínas com proteases. A maioria das estratégias de enriquecimento são baseadas em modificações químicas, cromatografia de afinidade para capturar peptídeos e proteínas contendo grupos fosfato carregados negativamente em uma matriz carregada positivamente, ou por imunoprecipitação utilizando anticorpos específicos para fosforilação (DUNN et al., 2010; LEITNER et al., 2011; BELTRAN & CUTILLAS, 2012).

Há um número limitado de relatos que descrevem modificações pós-traducionais de OBPs (NAGNAN-LE MEILLOUR et al., 2009; BRIMAU et al., 2010; RAJKUMAR et al., 2010, 2011). Estudos em mamíferos baseados em espectrometria de massas mostraram a presença de fosforilação em OBPs recombinantes, identificadas na mucosa nasal de suínos (NAGNAN-LE MEILLOUR et al., 2009; BRIMAU et al., 2010) e na glândula prepucial de ratos (RAJKUMAR et al., 2011). Além disso, ensaios de ligação com feromônios mostraram que existem diferenças na especificidade de ligação de OBPs recombinantes quando sofrem fosforilação, sugerindo que esta modificação pode ter um papel na determinação da especificidade de ligação de OBPs a moléculas de odor (BRIMAU et al., 2010). Em insetos, foi identificada uma forma fosforilada da GP-9, uma proteína ligadora de feromônio nas antenas da formiga-de-fogo, *Solenopsis invicta* (LEAL & ISHIDA, 2008).

Estes estudos indicam que a fosforilação pode atuar como um mecanismo de regulação de OBPs, ativando ou desativando estas proteínas. Além disso, a fosforilação pode estar envolvida no aumento da especificidade das OBPs a odores ou na interação das OBPs com ORs. Embora OBPs fosforiladas tenham sido identificadas em diferentes organismos, não há um modelo descrito na literatura do mecanismo de ação de OBPs por fosforilação.

Não existem relatos na literatura sobre a caracterização de OBPs de *R. prolixus*. Dessa forma, é necessário que as proteínas olfativas deste inseto sejam estudadas, pois os sistemas sensoriais desencadeiam comportamentos essenciais para sua sobrevivência. Além disso, este inseto é um importante vetor da doença de Chagas. Diante da alta morbidade e mortalidade da doença de Chagas, da ausência de vacina contra esta doença e da ineficácia e toxicidade de inseticidas químicos, é preciso que seja feito o controle deste vetor de forma mais eficaz. A investigação das funções de proteínas olfativas de *R. prolixus*, pode levar ao desenvolvimento de atrativos e repelentes eficazes e práticos para manipular o comportamento deste inseto e que possam, portanto, diminuir o contato do inseto com o hospedeiro humano e assim prevenir a transmissão da doença de Chagas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi a caracterização molecular, funcional e estrutural da OBP27 e a fosfoproteômica das antenas do vetor da doença de Chagas, *R. prolixus*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise da expressão do RNAm das 17 OBPs identificadas no proteoma das antenas de *R. prolixus*, em diferentes órgãos de insetos machos e fêmeas adultos.
- Silenciamento do gene *OBP27* por RNA de interferência.
- Verificação do fenótipo do silenciamento através de bioensaios de atratividade.
- Predição do modelo 3D e projeção *in silico* da função da OBP27.
- Identificação de proteínas fosforiladas envolvidas nas vias de sinalização olfativa nas antenas de *R. prolixus*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MANUTENÇÃO DOS INSETOS

Os insetos *R. prolixus* foram criados no Laboratório de Bioquímica de Insetos do Instituto de Bioquímica Médica na Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde eram mantidos a 28°C e 70-75% de umidade relativa, sob fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro. Neste trabalho foram utilizados machos e fêmeas adultos, e machos ninfas de 5º estágio (N5). A alimentação sanguínea dos insetos foi feita diretamente na orelha de coelhos, em intervalos regulares de 21 dias para os adultos e intervalos variados de 3 a 5 semanas para as ninfas do primeiro ao quinto estágio de desenvolvimento. O RNA de machos e fêmeas adultos foi extraído 3 dias após a alimentação. Nos experimentos de silenciamento, machos N5 não alimentados, foram injetados com dsRNA (*dsOBP27* ou *ds $\beta$ -gal*) e foram alimentados com sangue de coelho sete dias após o tratamento. Foram aguardados 21 dias até a completa ecdise das ninfas. Após a muda, os machos adultos e virgens foram utilizados nos bioensaios.

#### 3.2. PROTOCOLO DE BIOÉTICA

Todos os protocolos de cuidado e experimentação animal foram conduzidos seguindo as diretrizes da Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CAUAP), baseados no Guia do Instituto Nacional de Saúde e Uso de Animais de Laboratório (ISBNo-309-05377-3). Os protocolos foram aprovados pela CAUAP, sob o número de registro CEAU-UFRJ#1200.001568/2013-87, 155/13. Os coelhos foram criados por técnicos da UFRJ, sob-rígidas diretrizes para garantir o manejo cuidadoso e consistente dos animais.

#### 3.3. DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

As sequências dos 17 genes *OBPs* selecionados para este estudo foram obtidas no banco de dados do genoma de *R. prolixus* (<https://www.vectorbase.org/organisms/rhodnius-prolixus>). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando a ferramenta OligoPerfect™ Designer – Thermo Fisher Scientific e estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR, qPCR e RNAi.**

Nome do gene /VectorBase ID	Primer	Sequência	Tm °C	Tamanho do amplicon (bp)
<i>RproOBP1</i> RPRC010284	Senso	CCGCCACACAAAGCCCTG	63,1	149
	Antisenso	GACACATTCCAGCAAACACCTT		
<i>RproOBP6</i> RPRC004413	Senso	GCACAAATGAAACAGGCGATGAA	63,1	147
	Antisenso	GCCATAATACAGCCTAAGTAGCA		
<i>RproOBP7</i> RPRC000311	Senso	AAAGAAATGCCAACAACCTTTCCA	60,8	138
	Antisenso	GCTGCTCCAATCATCAATCCA		
<i>RproOBP11</i> RPRC004408	Senso	GCAGCACTAAGCACCATTATC	60,0	141
	Antisenso	AATCTACTCTCCCATCAACGAG		
<i>RproOBP12</i> RPRC000492	Senso	ATGGCAAACCATGTGTAGAGG	60,9	135
	Antisenso	CCAATTCTCCTTCTTCTTTAGCTTTC		
<i>RproOBP13</i> RPRC000177	Senso	GGAGTGCCATAGAGGAAGTG	59,8	149
	Antisenso	GTAACAAGAATATAGAGCGAACCC		
<i>RproOBP14</i> RPRC004407	Senso	CTAAACTAGCAGAGCTTGAGGCA	62,8	137
	Antisenso	GCAGCCGAGTACACACTTGA		
<i>RproOBP17</i> RPRC000118	Senso	TGGAGCTTTGATTGAACCTTGT	60,7	126
	Antisenso	GCTTCAGCATCTAATTCACCATC		
<i>RproOBP18</i> RPRC001924	Senso	CAGTGTGACATGGCTTCTA	59,8	150
	Antisenso	GGTCTGGTAACTCCGATCTTT		
<i>RproOBP20</i> RPRC007008	Senso	ATAGCGACAACGCCGAAG	59,9	150
	Antisenso	CCAGTCCAATCTCTTTAGCCT		
<i>RproOBP21</i> RPRC001925	Senso	TCCAGAACTGTGCAATACCTT	60,6	141
	Antisenso	TCACCATCATCTGACAACATACC		
<i>RproOBP22</i> RPRC000115	Senso	GGCATCCCAAATGAGAGGTT	60,6	148
	Antisenso	CAGGCAACGGTACACTTTCA		
<i>RproOBP23</i> RPRC000174	Senso	AAAGACGCCAGCCACAA	62,0	158
	Antisenso	GCCATAGAATAACCAAGTTCACAGA		
<i>RproOBP24</i> RPRC009905	Senso	GCTCTAGCTGTTGCTTCAGACC	63,6	121
	Antisenso	CAAGTTCGCATTATTATCCATCTCC		
<i>RproOBP26</i> RPRC000182	Senso	TGGGAGAGGTTAAGAGAAAGCTAC	62,1	123
	Antisenso	CTCTTGATAACTTGGATGGAAACGAA		
<i>RproOBP27</i> RPRC009914	Senso	TTCAAGAAATTAAGGGCTTAACAAA	59,0	146
	Antisenso	GCCGTCGTTATCGGGTAT		
<i>RproOBP29</i> RPRC005254	Senso	ACTGGGCACGCAATACTC	59,5	155
	Antisenso	CCGCAACCTCTCCATACATA		
<i>RproOBP27</i> silenciamento	Senso*	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAAAGGGCTTAACAAAAAGGAA</u>	58,2	207
	Antisenso*	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTTCCAGCATAACATCCCAAT</u>		
<i>CquiB-gal</i> (XU et al., 2014)	Senso*	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAATGGTTCAGGTCGAAAACG</u>	56	500
	Antisenso*	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCCGCCTCGTACAAAACAAGT</u>		
<i>RproR18S</i> (MAJEROWICZ et al., 2011)	Senso	TCGGCCAACAAAAGTACACA	53,4	104
	Antisenso	TGTCGGTGTAACTGGCATGT		

\*As sequências sublinhadas correspondem à sequência do promotor T7.

### 3.4. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Foram dissecados diferentes órgãos em triplicatas biológicas: antenas, probóscides, pernas e cabeças (sem antenas e probóscides) de 30 fêmeas e 30 machos adultos, 3 dias após a alimentação com sangue. Os órgãos foram dissecados utilizando uma pinça. Posteriormente, os órgãos foram separados e colocados diretamente em tubo de polipropileno, seguido de congelamento em nitrogênio líquido e triturados com o auxílio de um bastão de plástico. O RNA total foi extraído utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%. As concentrações de RNA foram determinadas a 260 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu Inc., Kyoto, Japão). Os RNAs foram tratados com DNase I livre de RNase (Fermentas International Inc., Burlington, Canadá). O cDNA foi sintetizado a partir de RNA extraído dos órgãos utilizando o *kit* High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, USA) e *random primers*.

### 3.5. PCR CONVENCIONAL

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando o *kit* GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA). Foram utilizados iniciadores específicos para cada gene (Tabela 1). O gene ribossomal *R18S* de *R. prolixus* foi utilizado como gene de referência (MAJEROWICZ et al., 2011). As reações foram realizadas em termociclador Veriti® Thermal Cycler - 96 well (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e consistiram de 35 ciclos para *OBPs* e 25 ciclos para o *R18S*, nas seguintes condições: 94 °C por 3 min, seguido pelas etapas de desnaturação a 94 °C por 30 seg, anelamento de acordo com o oligonucleotídeo iniciador (Tabela 1) por 30 seg e a etapa de extensão a 72 °C por 1 min e 30 seg, finalmente seguido de 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) em tampão TAE pH 8 (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Os géis foram fotografados em fotodocumentador DNR MiniBIS Pro Bio-Imaging Systems (Bio America Inc. Texas, EUA). As imagens foram digitalizadas e tratadas em Adobe Photoshop.

### 3.6. PCR QUANTITATIVO (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas em termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando Power SYBR® Green PCR Master Kit (Applied Biosystems). A concentração final dos oligonucleotídeos utilizados foi de 400 nM para *R18S* e 600 nM para *OBPs*. As reações foram realizadas em três replicatas biológicas e três replicatas técnicas para cada amostra, em placa ótica de 48 poços, com o seguinte ciclo inicial de 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min; seguido pelas etapas de desnaturação a 94 °C por 15 seg, a 60 °C por 15 seg e extensão a 72 °C durante 1 min, por 40 ciclos; seguidas por curva de dissociação, em condições padrões do aparelho. O gene *R18S* foi utilizado como referência para a normalização dos valores de Ct (*threshold cycle*). A expressão relativa dos genes de *OBPs* nos diferentes órgãos foi determinada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A comparação dos níveis de expressão entre os genes de *OBPs* nas antenas foi realizada pelo método Miner (ZHAO & FERNALD, 2005). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes em triplicatas biológicas.

### 3.7. RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi) - SÍNTESE DE dsRNA

O dsRNA (RNA de dupla fita) foi sintetizado utilizando fragmentos de produto de PCR que codificam o gene *OBP27* (tamanho 146 pb). Os fragmentos foram amplificados por PCR, utilizando cDNA de antenas de machos adultos, alimentados com sangue. As seguintes condições foram usadas para amplificação: ciclo inicial de 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 seg para desnaturação, 59 °C por 30 seg para anelamento, 72 °C por 1 min e 30 seg para extensão, e 72 °C durante 10 min. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a síntese de dsRNA estão listados na Tabela 1. Os iniciadores continham uma sequência de ligação da T7 RNA polimerase, necessária para a síntese do dsRNA. Para confirmar a especificidade do silenciamento do *OBP27*, foi utilizado dsRNA do gene da proteína  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) de *Cx. quinquefasciatus* (XU et al., 2014). O gene da  $\beta$ -gal clonado em pGEM-T (Promega) foi amplificado por PCR, usando primers com promotor T7 sob as seguintes condições: ciclo inicial de 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 seg para desnaturação, 56 °C por 30 seg para anelamento, 72 °C por 1 min e 30 seg para extensão, e 72 °C por 10 min. O produto de PCR gerado foi usado como molde para a síntese de ds $\beta$ -gal, que foi usado como controle no ensaio de silenciamento. Os produtos de PCR foram utilizados como molde para as reações de transcrição utilizando a enzima T7 RNA

polimerase do *kit* MEGAScriptRNAi (Ambion, Austin, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a síntese *in vitro*, todos os dsRNAs foram purificados usando fenol-clorofórmio (1:1), quantificados usando espectrofotômetro a 260 nm e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™. Para os ensaios de RNAi foi utilizado o protocolo descrito por FRANCO et al. (2016). Brevemente, foi injetado 1 µL de dsRNA (1 µg/µL H<sub>2</sub>O livre de RNase) na cavidade metatorácica de machos N5 (N=20 para cada tratamento de dsRNA), usando uma seringa Hamilton de 10 µL.

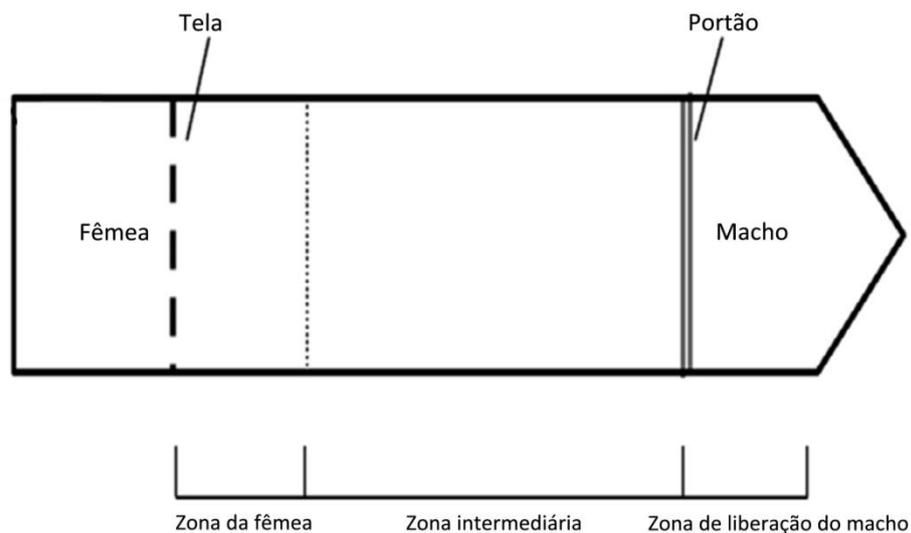
### 3.8. EFEITOS DO SILENCIAMENTO NA FISIOLOGIA DOS MACHOS

Para verificar se o silenciamento afetaria a ecdise dos insetos silenciados, foram utilizados machos N5 em jejum. Após 7 dias da injeção do dsRNA, os insetos foram alimentados com sangue e mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade. Os insetos foram monitorados durante 21 dias até a ecdise. O processo de ecdise completa foi checado nos insetos tratados com ds*OBP27* e controle. A mortalidade foi acompanhada do 1º ao 20º dia após a injeção do dsRNA. O número de N5 sobreviventes foi registrado nesse período. O efeito da injeção do dsRNA na ingestão de sangue foi verificado conforme descrito por Franco et al. (2016). Os machos N5s tratados com ds*OBP27* e ds*β-gal* foram pesados duas horas antes e duas horas após a alimentação em coelhos. Para a alimentação foi utilizado um frasco de vidro de formato cilíndrico de 20 cm de altura e 6 cm de diâmetro, contendo em seu interior um papel filtro de mesmo tamanho e uma tela de filó na extremidade aberta do vidro. Em contato com a tela de filó havia um coelho como fonte alimentar. A alimentação era feita durante 30 min. A massa de sangue ingerida (mg) foi calculada pela diferença de peso, duas horas após e duas horas antes da alimentação. Após a ecdise, os adultos resultantes tratados com dsRNA, foram alimentados com sangue de coelho e cada inseto dos diferentes grupos foi usado individualmente nos bioensaios.

### 3.9. BIOENSAIO DE ATRATIVIDADE

Machos injetados com dsRNA no estágio N5 foram utilizados nos bioensaios. Os grupos de insetos consistiram em 20 insetos para cada condição: N=20-ds*OBP27*; N=20-ds*β-gal*. Os bioensaios foram realizados usando machos adultos 7 dias após a alimentação sanguínea. O protocolo utilizado foi o proposto por Zermoglio et al. (2015) com modificações. Neste ensaio foi utilizado um tubo de poliestireno (tubo falcon) de

aproximadamente 10 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro. Para facilitar a interpretação dos resultados o tubo foi dividido em três zonas: zona da fêmea (ZF), zona intermediária (ZI) e zona de liberação do macho (ZM) (Fig. 11). ZM e ZI eram divididas por um anteparo de papel de filtro que servia como “portão”. Na extremidade oposta (aberta do tubo) havia uma tela de proteção que mantinha uma fêmea adulta alimentada, aprisionada atrás da tela. Na primeira etapa do ensaio um macho era posicionado na ZM. O inseto permanecia aprisionado na ZM para aclimatação por 5 min. Após este período o portão era aberto, permitindo que o inseto acessasse todas as zonas. O tempo de deslocamento do macho através do tubo em direção à fêmea era aferido usando um cronômetro digital num período máximo de 300 seg. Quando o macho alcançava a ZF o cronômetro era zerado e iniciado novamente. Assim, o tempo de permanência de cada macho junto à fêmea era aferido. Cada inseto, dos diferentes grupos: *dsOBP27* e *dsβ-gal*, foi testado individualmente em três replicatas técnicas.



**Figura 11 - Dispositivo utilizado no bioensaio de detecção da fêmea.** Um tubo de poliestireno (10 x 2 cm) dividido em três zonas: zona da fêmea (ZF), zona intermediária (ZI) e zona de liberação do macho (ZM). Um portão divide o ZM de ZI. Uma tela protetora foi usada para separar a fêmea de ZM e ZI. Uma fêmea adulta era colocada atrás da tela de proteção aprisionada ao tubo. Um macho era colocado na ZM, após 300 seg o portão era aberto. Adaptado de ZERMOGLIO et al., 2015.

### 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos qPCRs e dos bioensaios foi realizada pelo teste t seguido do teste de Mann Whitney (*software* GraphPad PRISM 6.00, San Diego, CA, Estados Unidos). A análise de qPCRs foi feita usando três réplicas biológicas e técnicas para cada gene. Os bioensaios foram realizados de forma independente em três replicatas técnicas. A análise

estatística da comparação da expressão dos diferentes genes *OBPs* foi feita utilizando ANOVA, seguido do teste de Tukey, no programa GraphPad PRISM 6.00. As barras representam o erro padrão de três repetições, asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.11. ESTUDOS DE *DOCKING*

Estruturas 3D ainda não foram caracterizadas para OBPs de *R. prolixus*, dessa forma, a sequência primária da OBP27 madura foi usada para construir um modelo 3D para estudos de *docking in silico*. A modelagem tridimensional foi desenvolvida utilizando o programa online de modelagem de proteínas PHYRE2 (KELLEY et al., 2015). A qualidade estereoquímica e a precisão do modelo predito foram avaliadas usando o *software* PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1996) e Verify3D (EISENBERG et al., 1997). Os compostos mais abundantes identificados como voláteis emitidos pelas GMs de insetos fêmeas e relatados como capazes de modular a orientação de machos (PONTES et al., 2008, 2014), foram selecionados para os estudos de *docking*: 2-metil-3-buten-2-ol, (S)-2-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol e (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol. Nós utilizamos o princípio termodinâmico de que compostos ligam-se fortemente ao sítio ativo de uma proteína quando a energia livre de ligação do processo é baixa (DU et al., 2016). Portanto, esse parâmetro foi usado para estimar afinidades dos compostos das GMs à OBP27. As estruturas tridimensionais dos compostos foram obtidas a partir do banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (KIM et al., 2016). O *docking* molecular com a OBP27 e cada um dos ligantes selecionados foi realizado 100 vezes utilizando o programa Docking Server (BIKADI & HAZAI, 2009) e o *scoring function* da energia livre de ligação foi considerado para estimar a afinidade de ligação.

### 3.12. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para o mapeamento de proteínas fosforiladas e identificação de fosfopeptídeos, foram dissecadas no total 180 machos e 60 fêmeas. Na análise do perfil de fosfoproteínas por gel 2-DE e MS, foram dissecadas antenas de 60 machos e 60 fêmeas. Todos os insetos eram adultos e estavam alimentados em sua 3ª alimentação sanguínea. Para o mapeamento de fosfoproteínas utilizando fosfatase (adaptado de YAMAGATA et al., 2002), as antenas dos machos foram separadas em dois grupos, controle (60 machos) e tratado com fosfatase (60 machos). As antenas foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido. As proteínas

solúveis foram extraídas com tampão contendo HEPES 25 mM pH 7,4, EDTA 2,5 mM, PMSF 0,33 mM, NaF 50 mM, coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, P-8340) e inibidores de fosfatase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, P5726 e P0044). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 g durante 10 min a 4 °C, para a remoção do material não solúvel. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado reconstituído no mesmo tampão e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi recolhido e reunido com a primeira extração. As proteínas das antenas do grupo tratado foram extraídas como descrito acima, porém sem os inibidores de fosfatase. A concentração total de proteínas foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Foi obtido, aproximadamente, 100 µg de proteínas solúveis em cada amostra. As proteínas do grupo tratado foram defosforiladas com 10U da fosfatase alcalina rAPid alkaline phosphatase (Roche).

### 3.13. ELETROFORESE EM GEL 2-DE

As proteínas (100 µg) de cada amostra foram ressuspendidas em 125 µL de solução de reidratação (ureia 8 M, CHAPS 2%, anfólitos Bio-Lyte® 3/10 0,2% (p/v), DTT 50 mM, azul de bromofenol 0,002%). A primeira dimensão foi efetuada em tiras de 7 cm (pH 3-10 e 4-7) no sistema Protean IEF Cell (BioRad). A temperatura foi mantida a 20°C. Após a focalização isoeétrica, cada tira foi equilibrada durante 10 min em 1,5 mL de Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 20% v/v, SDS 2% p/v, azul de bromofenol 0,002%, DTT 2% (p/v), seguido por um segundo passo de incubação na mesma solução tampão, exceto o DTT que foi substituído por iodoacetamida 0,01 M. As tiras foram lavadas em tampão de corrida Tris-Glicina (Tris 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3), transferidas para um SDS-PAGE 15% e cobertas com agarose 0,5% (p/v) contendo azul de bromofenol, em tampão de corrida (Tris-Glicina, pH 8,3). A segunda dimensão foi realizada no sistema Mini-PROTEAN III (BioRad, Hercules, CA, EUA) em 200 W por 40 min. Os géis foram corados com *Coomassie blue* G250 (Sigma-Aldrich). As imagens foram digitalizadas em fotodocumentador e tratadas em Adobe Photoshop.

### 3.14. DIGESTÃO EM GEL

Os *spots* de baixa massa molecular do gel 2-DE foram cortados em pedaços pequenos de aproximadamente 2 × 2 mm. Em seguida, foram descorados com bicarbonato de amônio

25 mM em ACN 50%, durante a noite, à temperatura ambiente (TA). Os pedaços de gel foram lavados com bicarbonato de amônio 25 mM por 10 min em TA para remover o excesso de reagente. Finalmente, os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila 100% durante 10 min e secos completamente em sistema de centrifugação a vácuo (*SpeedVac*). As amostras foram reidratadas em aproximadamente 10 µL de tampão de digestão contendo tripsina (*Sequencing Grade Modified* – Promega) a uma concentração final de 10 ng/mL em 25 mM de bicarbonato de amônio, durante 20 h, a 37 °C. Após a incubação, foi adicionado ácido fórmico puro para interromper a digestão e o líquido de cada pedaço de gel foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 500 µL. Os peptídeos foram extraídos dos pedaços de gel três vezes por incubação com acetonitrila 50% durante 15 min. As soluções de extração foram reunidas e desidratadas em *SpeedVac*. Em seguida, cada amostra foi solubilizada em 10 µL de água deionizada. Os peptídeos (10 µL) foram purificados e dessalinizados em ponteiras com resina C18 (*ZipTip*, Millipore) e eluídos com 50% de ACN. Em seguida, foram liofilizados e reconstituídos em 0,1% de ácido fórmico.

### 3.15. ENRIQUECIMENTO DE FOSFOPEPTÍDEOS

As proteínas das antenas de machos (N=180) de *R. prolixus* foram extraídas como descrito anteriormente. Beta-caseína do leite bovino (C3400 Sigma) foi utilizada como padrão de identificação de fosfopeptídeos. O padrão foi testado nas concentrações de 25 µg e 100 µg. As proteínas foram digeridas diretamente em solução com tripsina (Promega) em uma razão tripsina/proteína de 1/50 durante 16 horas a 37 °C. Os peptídeos foram purificados em resinas Poros 20 R2 (C-18). Os fosfopeptídeos foram enriquecidos utilizando *tips* contendo TiO<sub>2</sub> (Glygen NuTips - Columbia, MD, USA). Resumidamente, as amostras secas foram reconstituídas no tampão de ligação contendo ACN 80%, 1 M de ácido glicólico, TFA 5%. As amostras foram passadas 50x no *tip* para ligação dos fosfopeptídeos. Os peptídeos fosforilados foram eluídos com NH<sub>4</sub>OH 1% e acidificados com TFA 1%. Posteriormente, os fosfopeptídeos foram purificados em OligoR3 (Applied Biosystems) para a dessalinização após o enriquecimento. As amostras foram secas a vácuo em *SpeedVac*.

### 3.16. ESPECTROMETRIA DE MASSAS NANO LC-ORBITRAP

Aproximadamente 5 µg de cada amostra de peptídeo purificado em *ZipTip* C18, obtida da digestão tríptica em gel, foi injetada em um nanofluxo LC (Nano-LC Easy II,

Thermo Fisher Scientific) ligado a uma espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), do Laboratório de Química de Proteínas - Unidade Proteômica, Departamento de Bioquímica, IQ-UFRJ. A pré-coluna (Resina ReproSIL-Pur C18-AQ, esferas de 5 µm de diâmetro, 2 cm de comprimento, 200 µm DI, Dr. Maisch GmbH, Alemanha) e a coluna analítica (Resina ReproSIL Gold C18 esferas de 3 µm de diâmetro, 12 cm de comprimento, ponta de sílica de 75 µm DI, Dr. Maisch GmbH, Alemanha) foram empacotadas *in house*. Os peptídeos foram fracionados utilizando um gradiente durante 50 min começando com 95% da fase A (95% de água, 5% de ACN, 0,1% de ácido fórmico) até 40% da fase B (85% de ACN, 15% de água, 0,1% de ácido acético) por 42 min; 40 a 90% da fase B por 4 min, e mantidos a 90% da fase B por mais 4 min (totalizando 50 min em um fluxo de 200 nL/min). A varredura completa dos espectros foram adquiridos no Orbitrap com um controle automático de ganho (AGC) de  $10^{e6}$  íons e um tempo máximo de preenchimento de 500 ms. Os espectros foram obtidos com resolução de 60.000 em *m/z* 400, seguido de fragmentação CID (35% de energia de colisão normalizada) dos 6 íons mais intensos, analisados no ITMS com uma dinâmica de exclusão de 90 seg e um limite de intensidade de 1000. Cada uma das três replicatas biológicas foram analisadas em duplicata (replicatas técnicas).

### 3.17. BUSCA EM BANCO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os espectros MS/MS foram analisados no *software* Mascot v2.3.02 (licenciado para o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - Campinas, SP, Brasil) utilizando um banco de dados de peptídeos preditos do genoma de *R. prolixus* (*R. prolixus*-CDC\_PEPTIDES\_RproC1.1.fa.gz), disponível no VectorBase (<http://www.vectorbase.org>). Para a identificação dos fosfopeptídeos da caseína bovina foi utilizado o banco de dados *Bos taurus*, também disponível no Mascot. Os parâmetros de busca foram os seguintes: a perda de um sítio de clivagem, hidrólise por tripsina,  $\pm 15$  ppm de tolerância de massa para peptídeo precursor e  $\pm 0,6$  Da para fragmentos de íon, ESI-TRAP como instrumento utilizado, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação das metioninas, acetilação do N-terminal, fosforilação de serinas, treoninas e tirosinas como modificações variáveis e espectro de massa MS/MS monoisotópico. Os critérios para a identificação positiva incluíram a pontuação mínima de confiabilidade fornecida pelo Mascot e o percentual de cobertura da sequência. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ . O FDR (*False Discovery Rate*) foi determinado utilizando uma busca automática do banco de

dados *decoy* do Mascot. Os peptídeos foram identificados em 1% de FDR pela abordagem de filtragem Mascot-Percolator. As sequências das proteínas obtidas pelo Mascot foram correlacionadas com o banco de dados NCBI-nr pelo BLASTp para anotação e verificação. A identificação de sítios de fosforilação de quinases específicas foi realizada no sistema de predição GPS (*Group-based Prediction System* v2.0 <http://gps.biocuckoo.org/online.php>) (XUE et al., 2008). Os fosfopeptídeos enriquecidos com TiO<sub>2</sub> das antenas de macho foram analisados no *software* Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific), utilizando o banco de dados de peptídeos preditos do genoma de *R. prolixus* (Rhodnius-prolixus-CDC\_PEPTIDES\_RproC3.3.fa.gz), disponível no VectorBase (<http://www.vectorbase.org>). Foram utilizados os parâmetros de busca padrão do *software*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PARTE I - RASTREAMENTO DOS GENES *OBPs* EXPRESSOS NAS ANTENAS

#### 4.1.1. Perfil de expressão em diferentes órgãos - PCR convencional

Proteína ligadora de odor (OBP) é uma denominação genérica dada a pequenas proteínas solúveis que transportam moléculas hidrofóbicas em geral. Quando a proteína transporta feromônio, recebe a denominação de proteína transportadora de feromônio (PBP). Nos insetos acredita-se que OBPs expressas exclusivamente em antenas, probóscides e palpos maxilares (órgãos olfativos) tenham como função principal o transporte de semioquímicos envolvidos com a olfação. Portanto, a primeira etapa deste estudo foi avaliar o perfil de expressão dos genes *OBPs* em órgãos olfativos e não olfativos. Nesta situação particular, é aceito que *OBPs* expressos em órgãos não olfativos geram proteínas que apresentam função de transportar moléculas em geral. Nos triatomíneos as antenas são consideradas os órgãos primários responsáveis pela olfação. Assim, encontrar *OBPs* expressos exclusivamente neste órgão é um forte indício da participação desta proteína no mecanismo de identificação e transporte de semioquímicos relacionados com a olfação.

Estudo prévio realizado por Oliveira e colaboradores (2017) identificaram 17 OBPs nas antenas de *R. prolixus* adultos. A presença de proteínas maduras nas antenas indicou que 63% dos genes candidatos a OBPs preditos no genoma, transcreviam proteínas funcionais nas antenas. Apesar de robusta e consistente, a análise proteômica não descartou a hipótese dessas proteínas apresentarem transcritos em outros órgãos e, portanto, terem funções gerais de transporte. Assim, partindo da premissa que para ser considerada uma proteína ligadora de

odor, a OBP deveria ser transcrita exclusivamente nas antenas, iniciamos este estudo pela triagem dos RNAs nos diferentes órgãos de insetos adultos usando PCR semiquantitativo: antenas, probóscides, pernas e cabeças (sem os apêndices).

Os experimentos de PCR foram realizados utilizando iniciadores específicos para determinar a distribuição de *OBPs* nos órgãos. Quantidades iguais de cDNA (1 µg) foram usadas nas reações de PCR. O gene *R18S* foi utilizado como controle interno. Este gene se mostrou constitutivamente expresso em todos os órgãos, sendo amplificado nas reações de PCR um produto de 104 bp, confirmando assim a integridade de todas as amostras de RNAs (Fig. 12; Fig. 13).

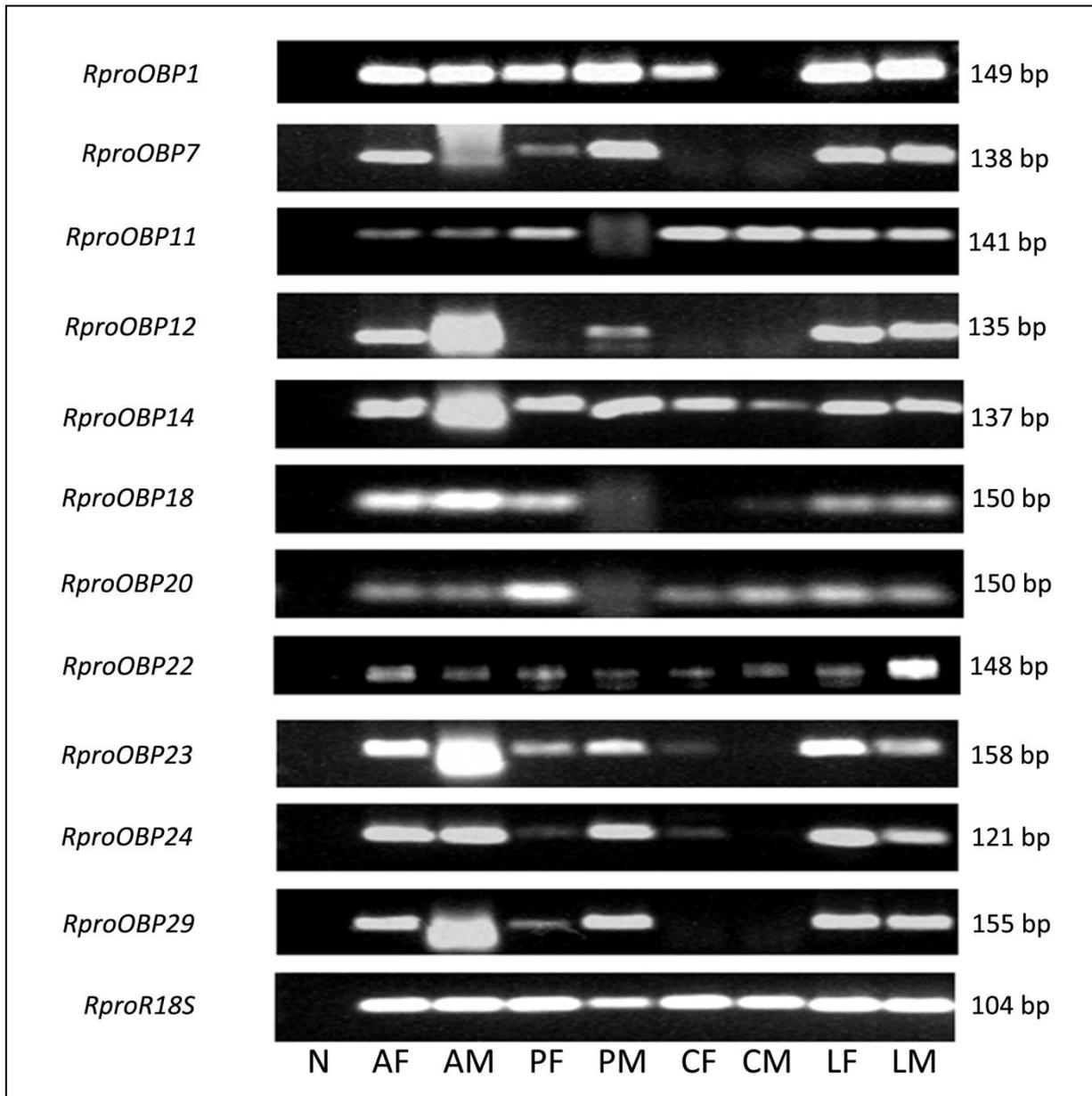
Os resultados do PCR mostraram a presença de transcritos para 11 *OBPs*, (*OBP1*, *OBP7*, *OBP11*, *OBP12*, *OBP14*, *OBP18*, *OBP20*, *OBP22*, *OBP23*, *OBP24* e *OBP29*) (Fig. 12) expressos nos órgãos analisados: antenas (órgão olfativo), probóscides, pernas e cabeças sem os apêndices (órgãos não olfativos). A presença de transcritos nos vários órgãos sugere uma função geral de transportes para estas *OBPs*. Os genes *OBP11*, *OBP14*, *OBP20* e *OBP22* foram encontrados expressos nos 4 órgãos testados (Fig. 12). Foi observado, também, variações no perfil de expressão. Transcritos para os genes *OBP7*, *OBP12* e *OBP29* estavam ausentes em ambas as cabeças, este resultado está de acordo com o esperado, pois as cabeças estavam sem os apêndices (antenas e probóscides) (Fig. 12). Os genes *OBP1*, *OBP23* e *OBP24* não foram expressos apenas nas cabeças de machos. Enquanto, o gene *OBP18* não foi detectado apenas nas cabeças de fêmeas (Fig. 12). Por fim, transcritos para o *OBP12* não foram detectados nas probóscides de fêmeas (Fig. 12).

Em contrapartida, 4 genes, *OBP6*, *OBP13*, *OBP17* e *OBP21*, foram detectados exclusivamente e/ou principalmente nas antenas dos insetos adultos. Estes achados sugerem um possível papel destas *OBPs* no transporte de semioquímicos envolvidos com a olfação (Fig. 13). Apesar de majoritariamente expressos nas antenas, transcritos para os genes *OBP13* e *OBP21* foram, também, detectados nas probóscides e pernas. A banda, de cerca de 141bp identificada nos géis, é, provavelmente, resultante da amplificação de produtos de PCR não específicos (Fig. 13).

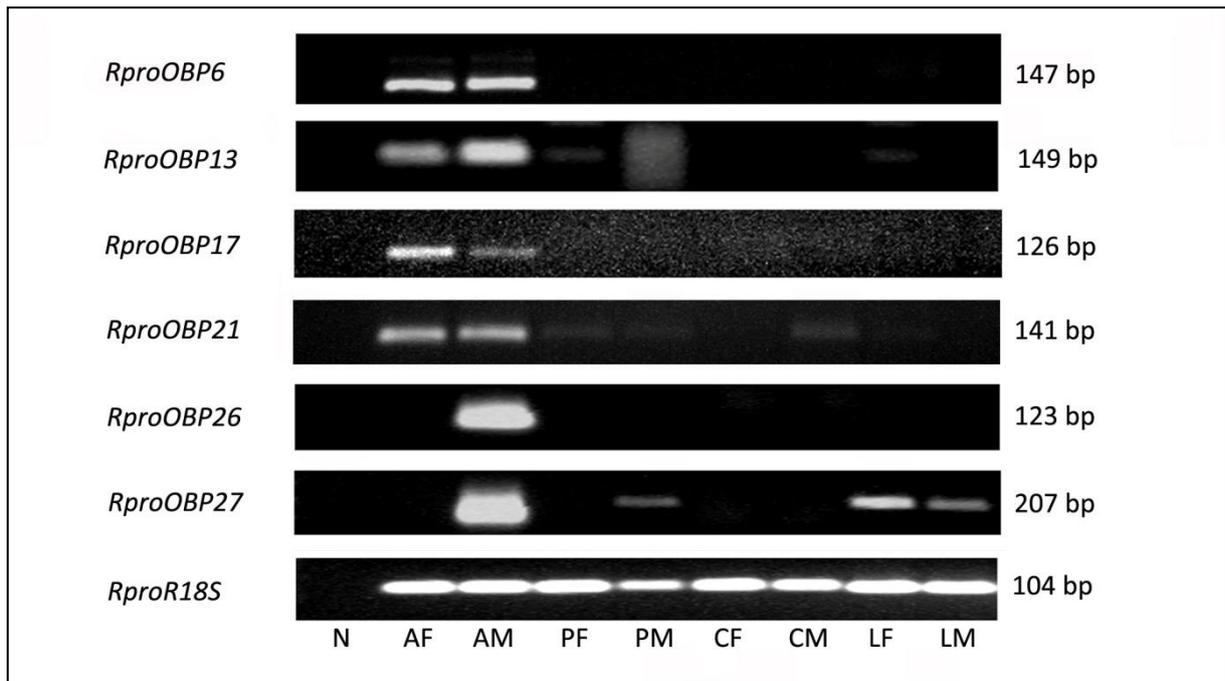
Dos 17 genes de *OBPs*, 88% foram expressos nas antenas de ambos os adultos (Fig. 12; Fig. 13). No entanto, transcritos para os genes, *OBP26* e *OBP27*, foram observados exclusivamente nas antenas de insetos machos. Nenhum produto de PCR foi detectado nas antenas de fêmeas (Fig. 13). Apesar de nos géis terem sido detectadas bandas fracas para o *OBP27* em probóscides de insetos machos e pernas de insetos fêmeas, a intensidade da banda

originada das antenas indicam a presença majoritária de RNA da OBP27 neste órgão (Fig. 13).

Desta forma, ao final da triagem tínhamos identificado alguns genes com expressão majoritária nas antenas, que seriam fortes candidatos a transcrever OBPs com papel importante na comunicação química de *R. prolixus*.



**Figura 12 - Padrão de expressão dos genes *RproOBP1*, *RproOBP7*, *RproOBP11*, *RproOBP12*, *RproOBP14*, *RproOBP18*, *RproOBP20*, *RproOBP22*, *RproOBP23*, *RproOBP24* e *RproOBP29* em diferentes órgãos de *R. prolixus*. Gel de agarose 1% com produto da reação de PCR, utilizando cDNAs de insetos adultos e alimentados. N - controle negativo; AF - antena de fêmea; AM - antena de macho; PF - probóscide de fêmea; PM - probóscide de macho; CF - cabeça de fêmea; CM - cabeça de macho; LF - perna de fêmea; LM - perna de macho. *RproR18S* - Ribossomal 18S usado como gene controle para verificar a integridade do RNA.**



**Figura 13 - Padrão de expressão dos genes *RproOBP6*, *RproOBP13*, *RproOBP17*, *RproOBP21*, *RproOBP26* e *RproOBP27* em diferentes órgãos de *R. prolixus*.** Gel de agarose 1% com produto da reação de PCR, utilizando cDNAs de insetos adultos e alimentados. N - controle negativo; AF - antena de fêmea; AM - antena de macho; PF - probóscide de fêmea; PM - probóscide de macho; CF - cabeça de fêmea; CM - cabeça de macho; LF - perna de fêmea; LM - perna de macho. *RproR18S* - Ribossomal 18S usado como gene controle para verificar a integridade do RNA.

#### 4.1.2. Abundância dos RNAs nas antenas de insetos adultos

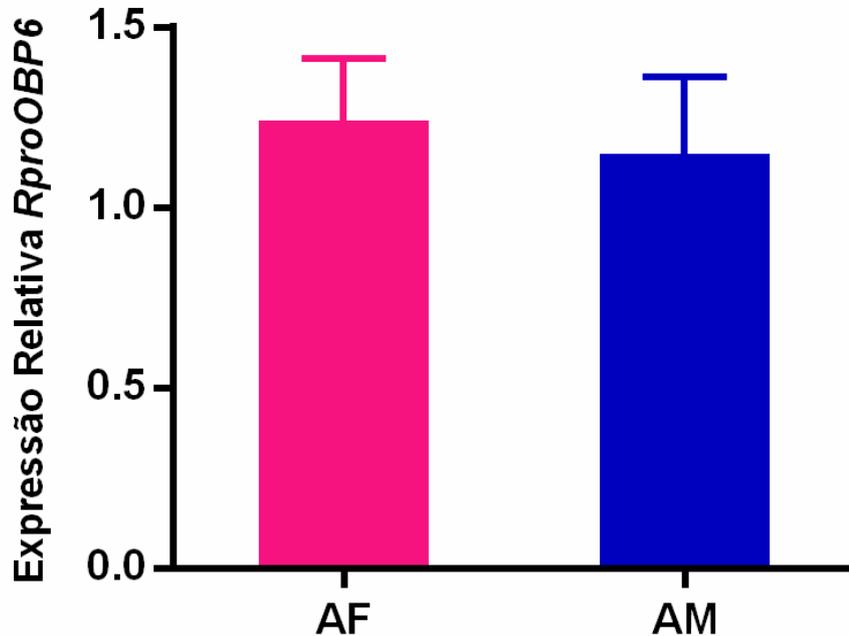
Além da expressão exclusiva nas antenas, genes *OBPs* podem apresentar variações na abundância dos transcritos, sendo encontrados em maior ou menor quantidade neste órgão. Encontrar RNAs em quantidades elevadas nas antenas pode indicar a participação dessa proteína no transporte de semioquímicos específicos para aquele momento de vida do inseto como, por exemplo, proteínas que transportam feromônios em machos adultos. Apoiados na hipótese que encontrar genes *OBPs* expressos exclusivamente nas antenas de insetos machos ou nas antenas de insetos fêmeas poderia indicar a função daquela proteína na comunicação química de *R. prolixus*, partimos para a avaliação quantitativa dos transcritos usando o método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A eficiência da amplificação do gene de referência e dos genes alvos variou de  $\cong 92\%$  a  $\cong 96\%$  dentro, portanto, do intervalo aceitável do método.

Foram investigados RNAs extraídos das antenas, pernas, probóscides e cabeças (sem os apêndices). Os resultados obtidos no qPCR mostraram que os genes *OBP6*, *OBP13*, *OBP17*, *OBP21*, *OBP26* e *OBP27* são, de fato, expressos em abundância nas antenas (Fig. 14 à Fig. 21). Não foram identificados quaisquer transcritos nos ensaios de qPCRs nas probóscides, pernas e cabeças, dessa forma podemos concluir que as bandas observadas no PCR semiquantitativo não eram específicas (Fig. 13). Como não houve produto detectável nestes órgãos, as figuras que apresentam os perfis de expressão por qPCR, de cada um dos genes, exibem apenas os resultados obtidos nas antenas dos insetos adultos. Em todos os órgãos foi confirmada a presença de *amplicons* para o gene controle (*R18S*).

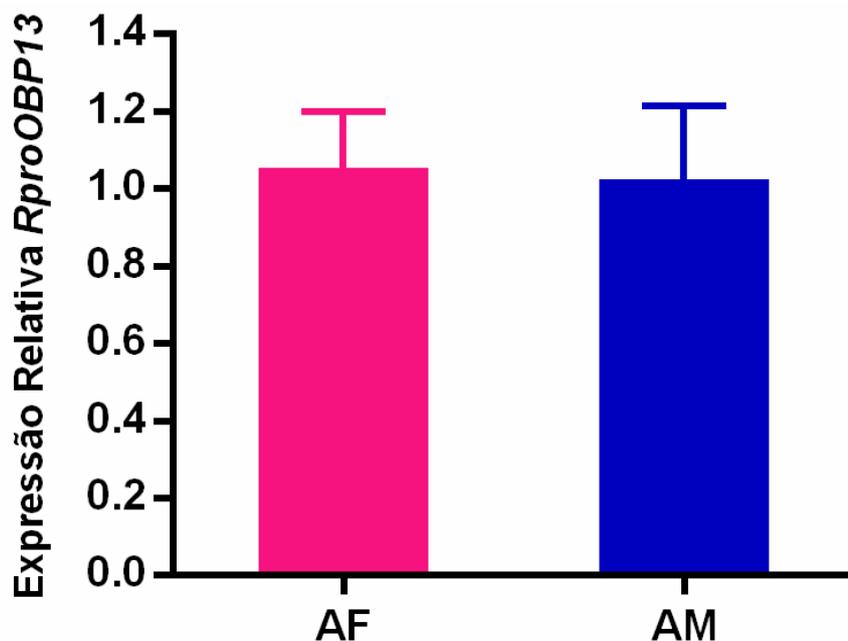
##### 4.1.2.1. Perfis dos genes expressos nas antenas dos adultos

A análise quantitativa confirmou, como observado no PCR semiquantitativo (Fig. 13), que os genes *OBP6* e *OBP13* apresentam transcritos em quantidades iguais nas antenas de insetos machos e fêmeas ( $p > 0,05$ ) (Fig. 14; Fig. 15). As bandas fracas observadas no gel do PCR semiquantitativo para o gene *OBP13* nas probóscides de insetos machos e fêmeas, e nas pernas de insetos fêmeas (Fig. 13), eram produtos de amplificação não específicos. Como não houve diferenças na quantidade de RNAs é possível que a concentração destas proteínas circulantes nas antenas seja equivalente nos insetos adultos. Isso pode indicar um envolvimento das proteínas, *OBP6* e *OBP13*, no transporte de semioquímicos que

modularem comportamentos semelhantes nos insetos adultos como, por exemplo, a identificação de voláteis do hospedeiro vertebrado para a busca da alimentação sanguínea.



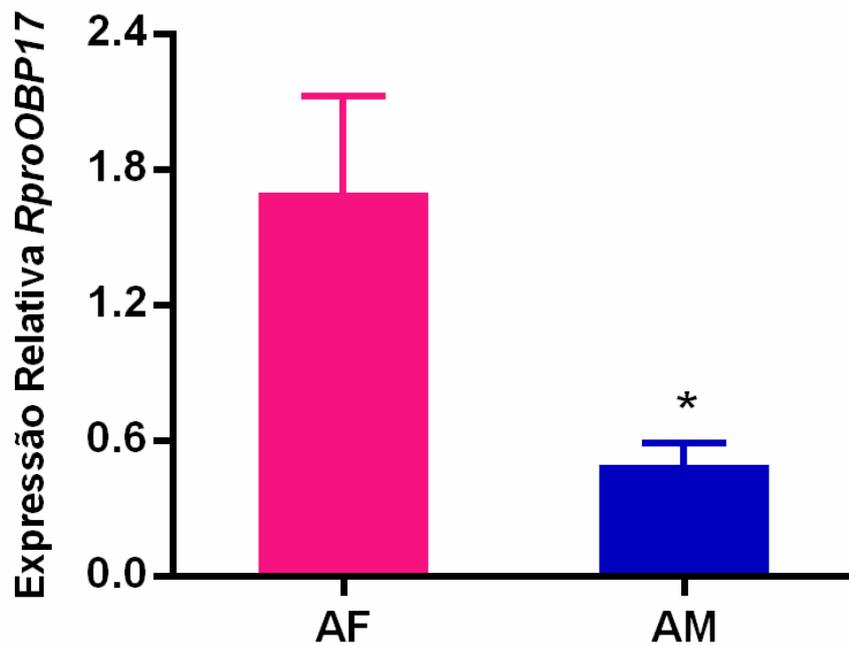
**Figura 14** - Expressão relativa de transcritos do gene *RproOBP6* em antenas de *R. prolixus*. Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de fêmeas e machos adultos e alimentados. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas biológicas e três replicatas técnicas para cada amostra. O gene *RproR18S* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão relativa dos transcritos do gene *OBP6* foram comparados em relação à antena de fêmea. AF – antena de fêmea; AM – antena de macho.



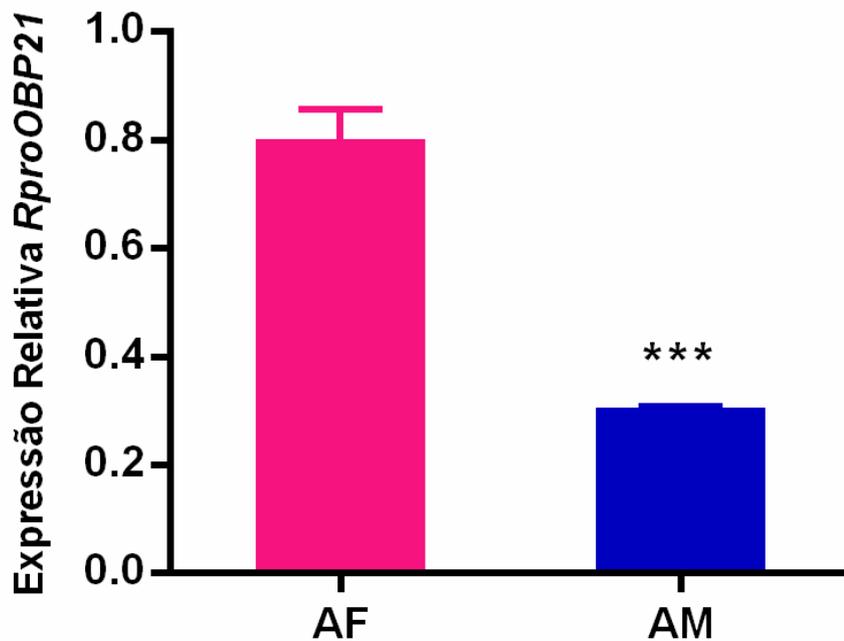
**Figura 15** - Expressão relativa de transcritos do gene *RproOBP13* em antenas de *R. prolixus*. Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de fêmeas e machos adultos e alimentados. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas biológicas e três replicatas técnicas para cada amostra. O gene *RproR18S* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão relativa dos transcritos do gene *OBP13* foram comparados em relação à antena de fêmea. AF – antena de fêmea; AM – antena de macho.

#### 4.1.2.2. Genes encontrados enriquecidos nas antenas de insetos fêmeas

Os genes *OBP17* e *OBP21* foram expressos em níveis mais altos em antenas de insetos fêmeas (Fig. 16; Fig. 17). Em termos quantitativos as antenas de insetos fêmeas apresentaram 3 e 2 vezes mais transcritos para os genes *OBP17* e *OBP21*, respectivamente ( $p < 0,05$ ); (Fig. 16; Fig. 17). O significado biológico para essa diferença não está claro e precisa ser melhor investigado. Um possível papel das proteínas OBP17 e OBP21 na detecção de voláteis responsáveis por comportamentos característicos de insetos fêmeas, como a detecção de voláteis dos sítios de oviposição, não pode ser descartado. Além disso, as bandas fracas observadas no gel do PCR semiquantitativo para o gene *OBP21* (Fig. 13) em probóscides e pernas não eram específicas, pois não foram detectados transcritos nestes órgãos no ensaio de qPCR.



**Figura 16 - Expressão relativa de transcritos do gene *RproOBP17* em antenas de *R. prolixus*.** Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de fêmeas e machos adultos e alimentados. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas biológicas e três replicatas técnicas para cada amostra. A análise estatística foi realizada pelo teste t seguido do teste de Mann Whitney; \* =  $p < 0,05$ . O gene *RproR18S* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão relativa dos transcritos do gene *OBP17* foram comparados em relação à antena de fêmea. AF – antena de fêmea; AM – antena de macho.

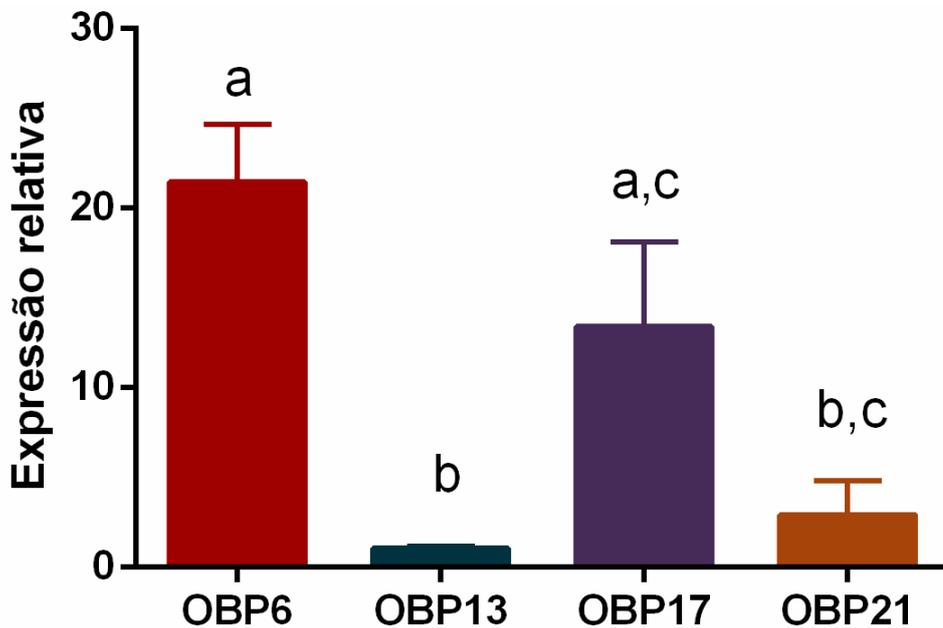


**Figura 17 - Expressão relativa de transcritos do gene *RproOBP21* em antenas de *R. prolixus*.** Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de fêmeas e machos adultos e alimentados. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas biológicas e três replicatas técnicas para cada amostra. A análise estatística foi realizada pelo teste t seguido do teste de Mann Whitney; \*\*\* =  $p < 0,05$ . O gene *RproR18S* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão relativa dos transcritos do gene *OBP21* foram comparados em relação à antena de fêmea. AF – antena de fêmea; AM – antena de macho.

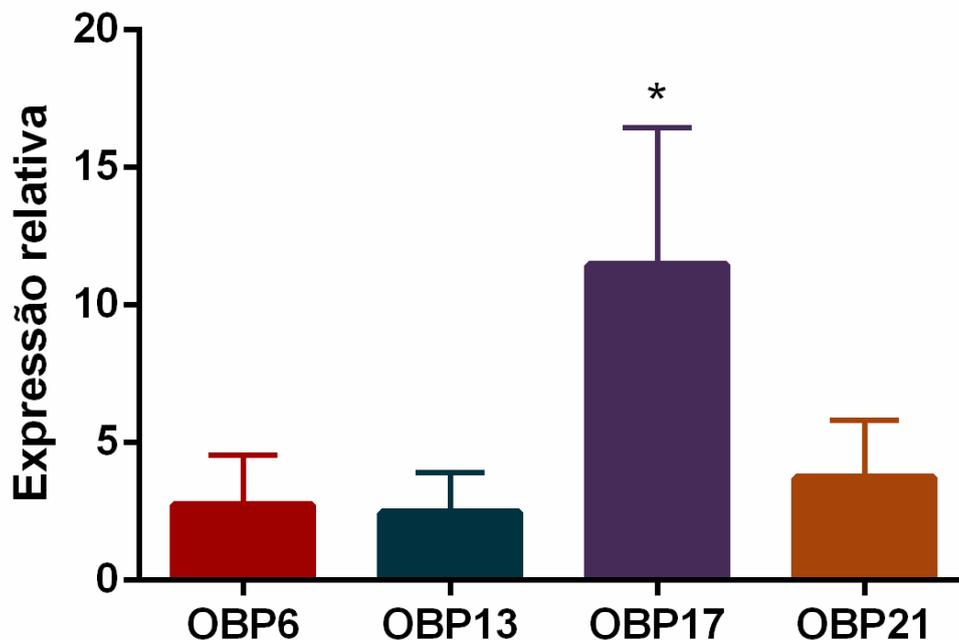
#### 4.1.2.3. Comparação dos níveis de RNAs nas antenas

Utilizando a quantificação dos RNAs foi possível determinar o perfil de distribuição de cada gene nas antenas. Os níveis de RNAs das antenas foram comparados usando o método de Miner (ZHAO & FERNALD, 2005). As antenas de insetos fêmeas apresentaram maior quantidade de RNAs para os genes *OBP6* e *OBP17* (Fig. 18) ( $p < 0,05$ ), confirmando as bandas fortes observadas nas antenas de fêmeas para estes *OBPs* no PCR semiquantitativo (Fig. 13). Enquanto, os níveis de *amplicons* para os genes *OBP13* e *OBP21* mostraram-se relativamente menores (Fig. 18), como observado no PCR semiquantitativo (Fig. 13). Em contrapartida, nas antenas de insetos machos não houve flutuação na quantidade de RNA para os genes *OBP6*, *OBP13* e *OBP21* (Fig. 19). O gene com maior quantidade relativa de *amplicons* foi o gene *OBP17* (Fig. 19) ( $p < 0,05$ ). No entanto, este perfil não está de acordo com o observado no PCR semiquantitativo, pois o *OBP17* possui a banda mais fraca nas antenas de macho (Fig. 13). As variações nos níveis de transcritos podem estar relacionadas às possíveis demandas por uma determinada OBP. Essa hipótese é baseada nos diferentes comportamentos que os insetos apresentam na fase adulta. A resposta comportamental a um determinado composto químico depende da identificação deste volátil no meio ambiente e

que, em última análise, depende da presença e/ou combinação de OBPs específicas circulando na linfa sensilar das antenas que farão o transporte do odor até o receptor olfativo específico.



**Figura 19 - Níveis de expressão de transcritos de OBPs nas antenas de fêmeas de *R. prolixus*.** Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de fêmeas adultas e alimentadas. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas biológicas e três replicatas técnicas para cada amostra e as letras diferentes (a, b, c) acima de cada barra, denotam diferenças significativas (ANOVA seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

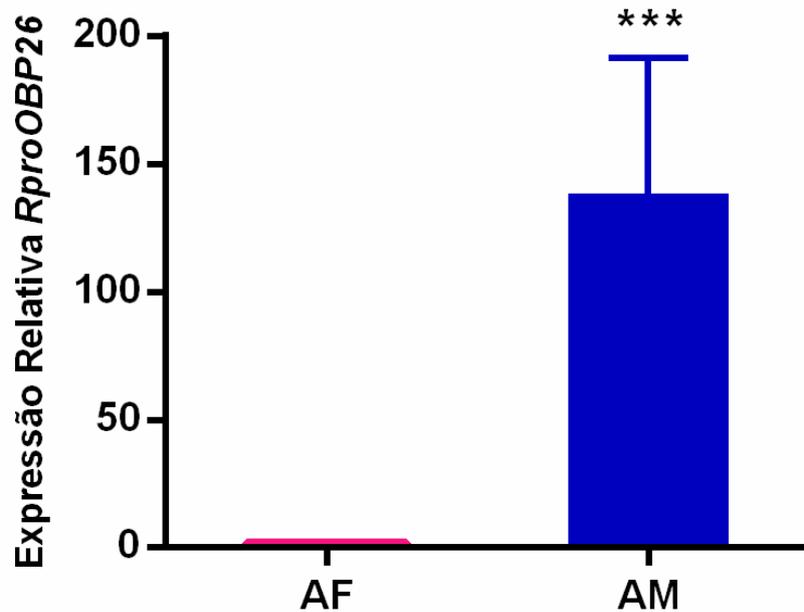


**Figura 18 - Níveis de expressão de transcritos de OBPs nas antenas de machos de *R. prolixus*.** Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de machos adultos e alimentados. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas biológicas e três replicatas técnicas para cada amostra (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). O asterisco representa diferença significativa do *OBP17* em relação aos outros genes *OBPs* ( $p < 0,05$ ).

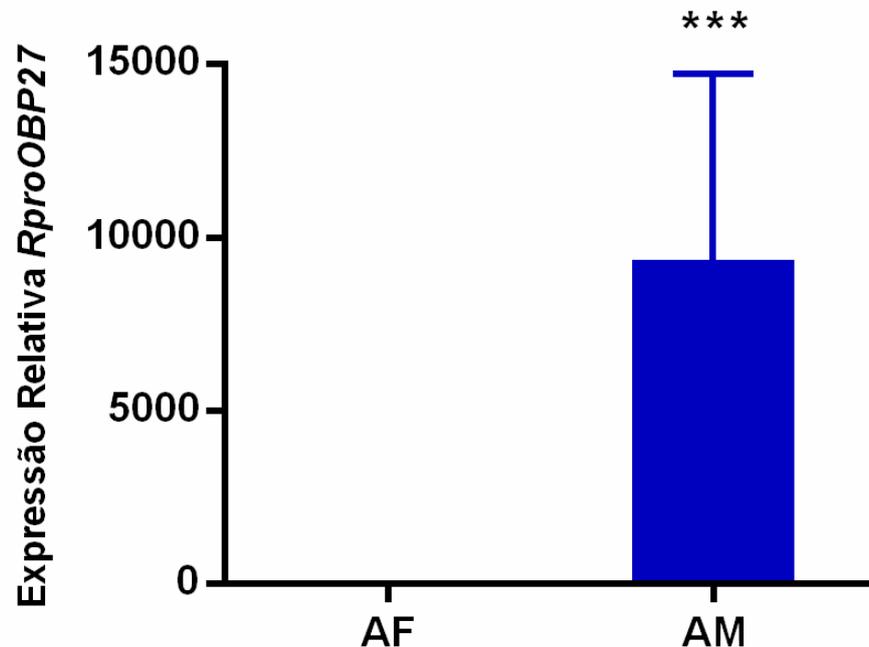
#### 4.1.2.4. Genes encontrados exclusivamente nas antenas de insetos machos

Transcritos para os genes *OBP26* (Fig. 20) e *OBP27* (Fig. 21) foram encontrados em abundância nas antenas de insetos machos, apontando para um possível envolvimento dessas proteínas na detecção de voláteis que induzem o comportamento de acasalamento. Os resultados dos ensaios de qPCR confirmaram o padrão de expressão observado no PCR semiquantitativo para estes genes (Fig. 13). As bandas fracas observadas para o *OBP27* em probóscides e pernas (Fig. 13), não eram específicas, pois não foram detectados transcritos em outros órgãos no qPCR. Apesar de pequena quantidade de transcritos para o gene *OBP26* ter sido detectado nas antenas de insetos fêmeas (*fold*=1,02), este gene mostrou ser predominantemente expresso nas antenas de insetos machos (*fold*=138,31) (Fig. 20), o que representa um nível de expressão 135x maior (Fig. 20,  $p=0,004$ ).

Surpreendentemente, o gene *OBP27* apresentou quantidades de transcritos na faixa de 12.000x nas antenas de insetos machos ( $p=0,004$ ) (Fig. 21). Gene de OBPs expressos exclusivamente nas antenas de insetos machos, de modo geral, estão associados a proteínas envolvidas na detecção de ferômonio sexual. Portanto, a *OBP27* se torna um alvo interessante para estudos relacionados ao comportamento de insetos machos. Para testar a hipótese da participação da *OBP27* na detecção de voláteis emanados pelos insetos fêmeas, foi utilizada a técnica de RNAi associada a análise fenotípica comportamental. Entre os dois genes exclusivos de antenas de insetos machos, o *OBP27* foi escolhido para prosseguir com o estudo funcional por duas razões: (1) quantidade exuberante de transcritos nas antenas de machos (>12.000x) e, (2) estudo prévio mostrou a superexpressão do gene *OBP26* no intestino (RIBEIRO et al., 2014), o que descartaria, em tese, a participação dessa proteína no transporte de odores, porém no presente estudo, não descartamos a possibilidade da *OBP26* transportar moléculas de odor. Entretanto, a presença abundante de transcritos deste gene nos intestinos sugere que a *OBP26* tenha uma função mais complexa e de difícil definição, envolvendo a integração dos órgãos olfativos e digestório e a identificação de uma variedade de semioquímicos e outras moléculas.



**Figura 20** - Expressão relativa de transcritos do gene *RproOBP26* em antenas de *R. prolixus*. Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de fêmeas e machos adultos e alimentados. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas biológicas e três replicatas técnicas para cada amostra. A análise estatística foi realizada pelo teste t seguido do teste de Mann Whitney; \*\*\*  $p=0,004$ . O gene *RproR18S* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão relativa dos transcritos do gene *OBP26* foram comparados em relação à antena de fêmea. AF – antena de fêmea; AM – antena de macho.



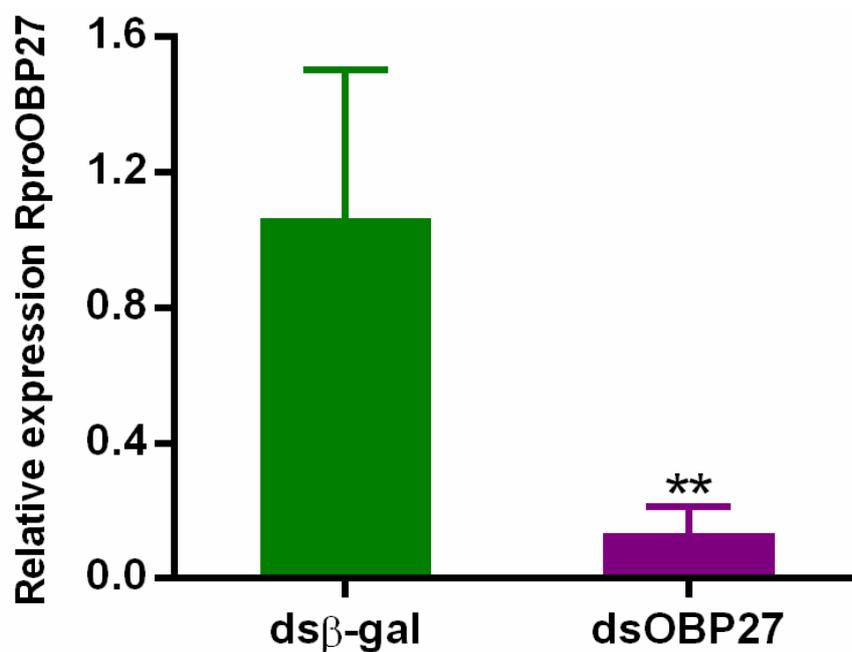
**Figura 21** - Expressão relativa de transcritos do gene *RproOBP27* em antenas de *R. prolixus*. Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de antenas de fêmeas e machos adultos e alimentados. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas biológicas e três replicatas técnicas para cada amostra. A análise estatística foi realizada pelo teste t seguido do teste de Mann Whitney; \*\*\*  $p=0,004$ . O gene *RproR18S* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão relativa dos transcritos do gene *OBP7* foram comparados em relação à antena de fêmea. AF – antena de fêmea; AM – antena de macho.

## 4.2. PAPEL DA OBP27 NO COMPORTAMENTO DOS INSETOS MACHOS

### 4.2.1. Silenciamento do *OBP27* por RNA de interferência

A técnica de RNAi foi utilizada para reduzir as quantidades relativas de RNAs do gene *OBP27* nas antenas de insetos machos. Os insetos tratados com dsRNA foram utilizados nos bioensaios, com o intuito de avaliar como a redução da expressão da proteína afetaria o comportamento deste grupo. Insetos injetados com *dsβ-gal* foram utilizados como controle. A hipótese a ser testada incluía se a redução na expressão do gene *OBP27*, exuberante nas antenas de machos (Fig. 21), afetaria a capacidade dos insetos machos detectarem insetos fêmeas. A hipótese se mostrando verdadeira indicaria que a *OBP27* é uma proteína transportadora de feromônio (PBP) e participaria diretamente no comportamento sexual de *R. prolixus*.

Os níveis de transcritos foram avaliados por qPCR. O gene *R18S* foi utilizado como referência para calcular a expressão relativa. A análise dos resultados do qPCR mostrou uma redução significativa, na faixa dos 88%, nos níveis de transcrição do gene *OBP27* nos insetos tratados com *dsOBP27*, em comparação aos níveis de transcritos no grupo controle (*fold dsβ-gal*=1,06; *fold dsOBP27*=0,13; *p*=0,0016) (Fig. 22). Portanto, estimamos que na linfa sensilar dos insetos tratados com *dsOBP27* existiria menos proteína madura circulante.



**Figura 22 - Expressão relativa de transcritos do gene *RproOBP27* em antenas de *R. prolixus* machos adultos, tratados com dsRNA.** Os insetos foram injetados com o controle *dsβ-gal* (gene não relacionado) ou com *dsOBP27*. O gene *RproR18S* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão relativa de transcritos foram comparados com *dsβ-gal*. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas técnicas. A análise estatística foi realizada pelo teste t seguido pelo teste de Mann Whitney. Os asteriscos representam diferenças significativas (*p* < 0,05).

#### 4.2.2. Efeitos sobre a fisiologia dos insetos machos

Foram avaliados importantes aspectos para a fisiologia dos insetos machos: a ecdise, a taxa de sobrevivência e a capacidade de ingestão de sangue. Todos os insetos dos grupos tratado com ds*OBP27* e com ds*β-gal* realizaram a ecdise normalmente. Isto indica que o silenciamento do *OBP27* não afetou a ecdise dos insetos.

Os bioensaios subsequentes estavam diretamente ligados a disponibilidade de insetos tratados com dsRNA. A possibilidade de mortalidade foi avaliada, visto que, os insetos foram injetados com dsRNA no 5° estágio e utilizados nos bioensaios no estágio adulto. Portanto, com um intervalo de tempo relativamente longo, intercalado por uma alimentação sanguínea, seguida de ecdise e outra alimentação. Assim, caso fosse detectada taxas altas de mortalidade o protocolo de injeção deveria ser revisto. A taxa de sobrevivência foi monitorada do 1° até o 20° dia, após a injeção do dsRNA. Os insetos apresentaram boa tolerância ao tratamento, obtendo taxa de sobrevivência entre 70 e 95% (Fig. 23), portanto, a injeção de ds*β-gal* e ds*OBP27* não afetava de forma significativa o tempo de vida dos insetos. A mortalidade na faixa de 5-30% permitiu obter número suficiente de insetos adultos para os bioensaios.

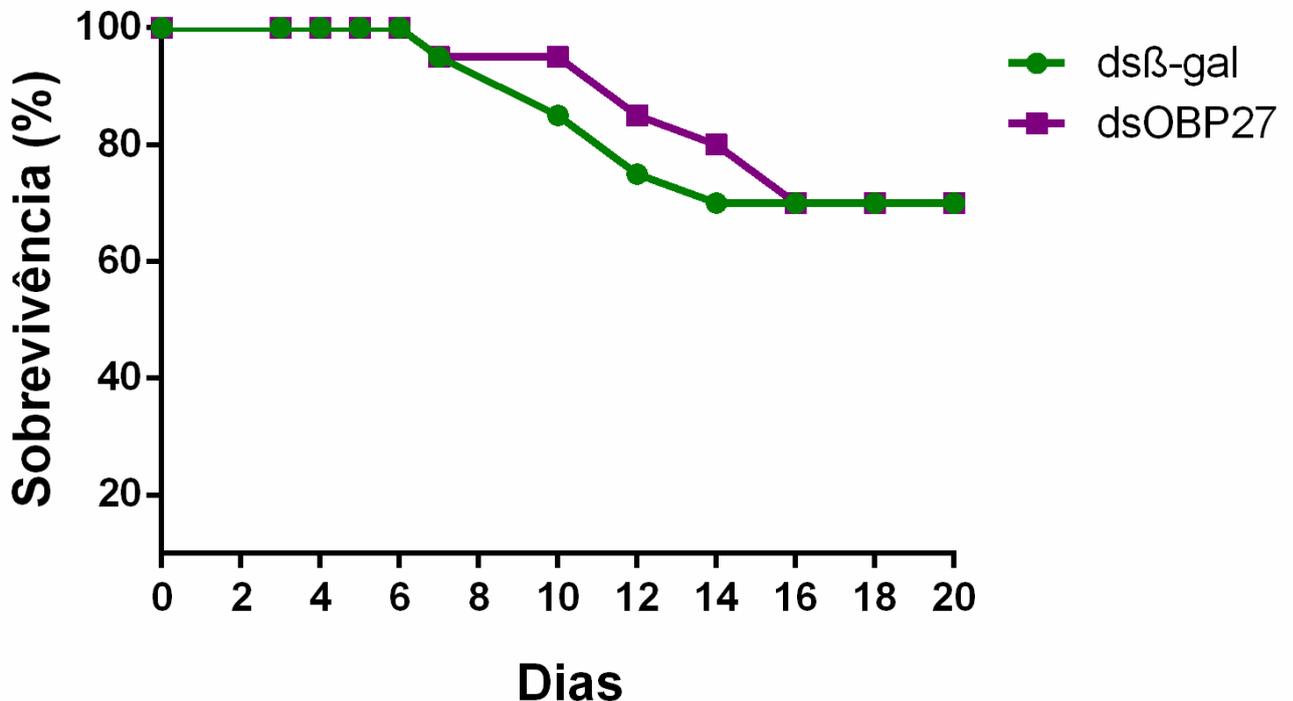
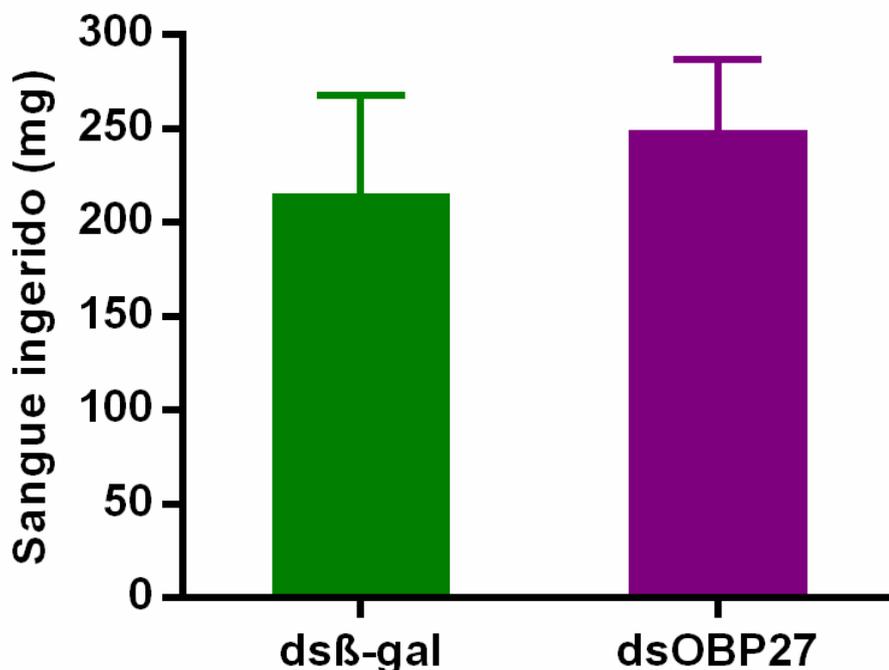


Figura 23 - Taxa de sobrevivência dos *R. prolixus* machos N5 não alimentados, tratados com dsRNA (N = 20 para ds*OBP27* e N = 20 para ds*β-gal*). A sobrevivência dos insetos foi acompanhada do 1° ao 20° dia após a injeção do dsRNA.

Outro parâmetro relevante analisado foi a capacidade de ingestão de sangue. A possibilidade da proteína OBP27 estar relacionada com o transporte de voláteis do hospedeiro foi testada. Se essa hipótese se mostrasse verdadeira a redução na expressão do gene pelo RNAi poderia afetar a capacidade do inseto de detectar o hospedeiro e, conseqüentemente, de se alimentar de sangue. Entretanto, apesar dos insetos tratados com ds*OBP27* apresentarem uma quantidade bem menor de OBP27 circulante na linfa sensilar, este fato não afetou a capacidade dos insetos silenciados com ds*OBP27* identificar o hospedeiro, iniciar e completar o repasto sanguíneo (Fig. 24). Insetos dos dois grupos se alimentaram regularmente de sangue. Os insetos do grupo ds*β-gal* (controle) ingeriram em média  $215,8 \pm 23,14$  mg de sangue (N=5). Enquanto, os insetos tratados com ds*OBP27* ingeriram um volume um pouco maior de  $249,1 \pm 16,85$  mg de sangue (N=5). Apesar da diferença na quantidade absoluta de sangue ingerido, não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos ( $p=0,4206$ ). Este resultado mostrou que a OBP27 não tem envolvimento direto com a detecção de voláteis emanados pelo hospedeiro vertebrado. Portanto, apresentar ou não níveis normais de OBP27 madura na linfa sensilar não afeta a capacidade dos insetos tratados com dsRNA de encontrar o hospedeiro e ingerirem sangue.

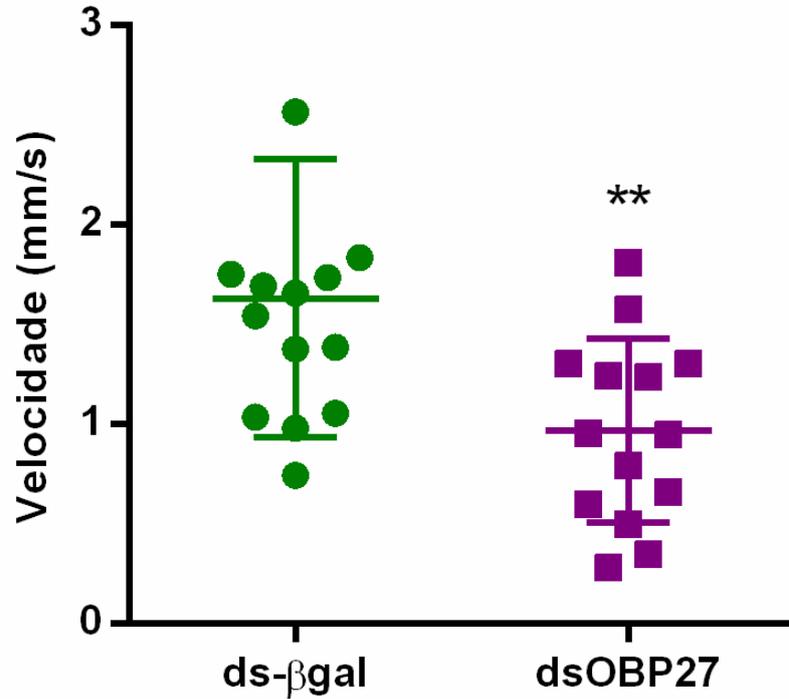


**Figura 24 - Ingestão de sangue de *R. prolixus* injetados com ds*OBP27* e ds*β-gal*.** Os machos N5 foram pesados duas horas antes e duas horas após a alimentação sanguínea. A massa ingerida (mg) foi calculada pela diferença de peso após e antes a alimentação.

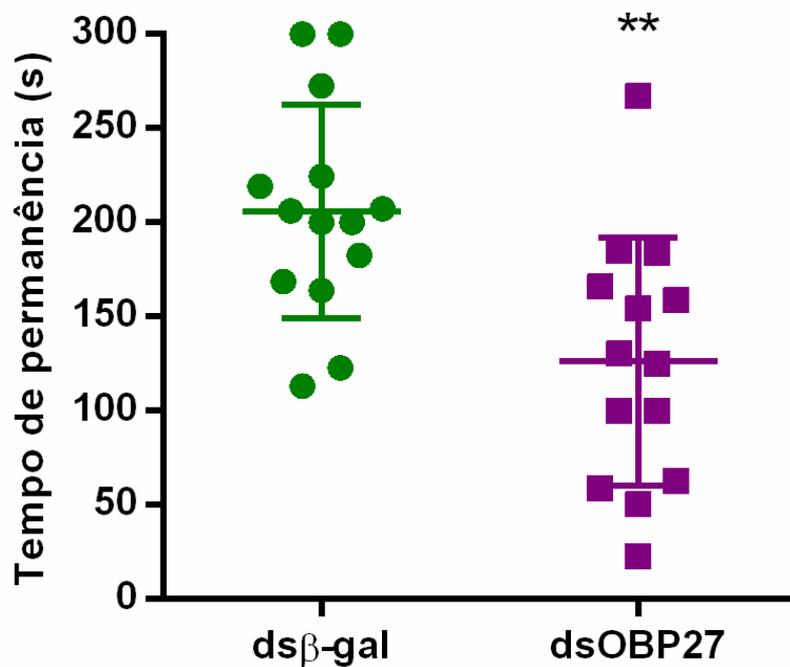
### 4.2.3. Perfil comportamental dos insetos machos

Excluindo a hipótese do envolvimento da OBP27 na detecção do hospedeiro, partimos para testar a possibilidade de essa proteína estar relacionada com a detecção de voláteis emanados pelas fêmeas. Nesta análise foi utilizado o protocolo de ZERMOGLIO et al., 2015, com algumas modificações, sendo avaliada a capacidade dos insetos dos grupos ds*OBP27* e ds*β-gal* detectarem fêmeas presentes no ambiente. Para isso, utilizamos como parâmetro o tempo de deslocamento de cada inseto macho para percorrer um tubo de aproximadamente 10 cm e alcançar um inseto fêmea aprisionado na extremidade oposta do tubo. Os ensaios foram registrados num período de tempo limite de 300 s. Para facilitar a interpretação dos resultados o tubo foi dividido em 3 zonas: ZF (zona da fêmea), ZI (zona intermediária), e ZM (zona de liberação do macho). Cada grupo foi constituído por insetos alimentados, sendo cada inseto testado individualmente em triplicata técnica. Visivelmente, os insetos tratados com ds*OBP27* apresentaram comportamento distinto do apresentado pelos insetos do grupo controle. A velocidade de deslocamento até as fêmeas ficou comprometida. Os insetos tratados com ds*OBP27* se moviam de forma lenta em direção a ZF, com uma velocidade média de  $0,96 \pm 0,12$  mm/s (N=14, p=0,0065) (Fig. 25). Em contraste, os insetos tratados com ds*β-gal* foram muito mais ativos e quase duas vezes mais rápidos. Estes insetos se descolaram em direção a fêmea com uma velocidade média de  $1,63 \pm 0,19$  mm/s (N=14, p=0,0065) (Fig. 25).

Outra importante mudança comportamental observada, foi que os insetos tratados com ds*OBP27* permaneceram na ZF por um período de tempo significativamente menor ( $126,1 \pm 17,6$  s, p=0,002), quando comparados ao grupo controle ds*β-gal* ( $205,9 \pm 15,2$  s, p=0,002) (Fig. 26). Estes dados indicaram que os insetos ds*OBP27* tinham pouco ou nenhum interesse pelas fêmeas. Além disso, os insetos com reduzida quantidade de OBP27 circulante nas antenas, não apresentaram o comportamento de cópula. Os insetos machos do grupo ds*β-gal*, assim que alcançavam a ZF, tentavam atravessar a tela de proteção, possivelmente, para tentar copular com os insetos fêmeas.



**Figura 25 - Velocidade de deslocamento dos *R. prolixus* machos injetados com dsOBP27 e dsβgal, através do tubo em direção à fêmea.** As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas técnicas. A análise estatística foi realizada pelo teste t seguido pelo teste de Mann Whitney. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 26 - Tempo de permanência dos *R. prolixus* machos injetados próximo à fêmea.** O tempo que os machos injetados com dsOBP27 e dsβgal permaneceram próximo a fêmea foi registrado durante um tempo limite máximo de 300 s. As barras de erro representam o erro padrão da média de três replicatas técnicas. A análise estatística foi realizada pelo teste t seguido pelo teste de Mann Whitney. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

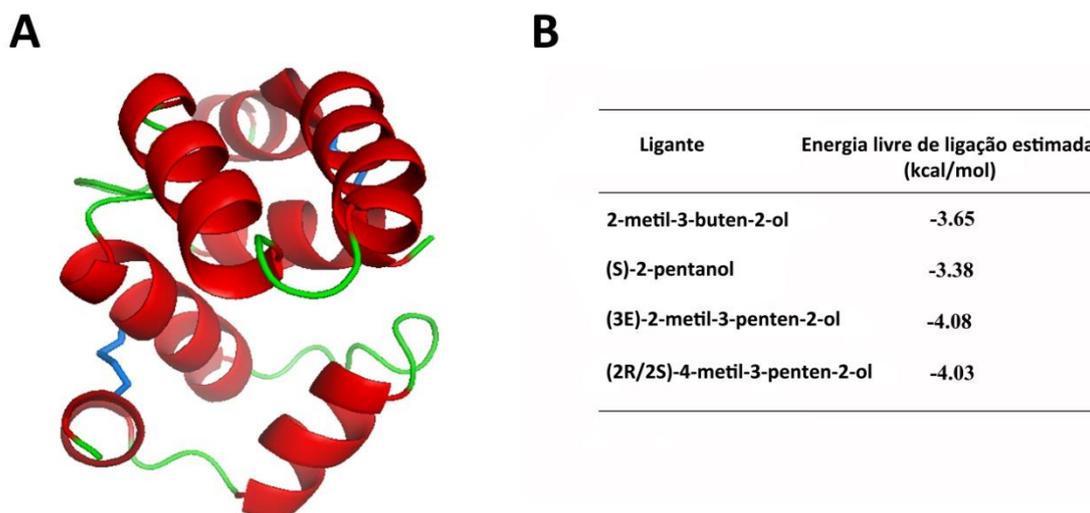
#### 4.3. PREDIÇÃO DO MODELO 3D E IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DOS LIGANTES DA OBP27

Os resultados obtidos nos bioensaios indicaram claramente a participação da OBP27 na detecção de voláteis emanados pelas fêmeas. Para testar a capacidade de ligação da OBP27 a voláteis produzidos pelas GMs das fêmeas, utilizamos ensaios *in silico*. Doze supostos modelos 3D foram obtidos para a OBP27 usando o programa Phyre2. Estes modelos incluíram PBP1 de *Antheraea polyphemus* [PDB#2JPO; confiança (C) = 99.4; % i.d. = 18]; PBP1 de *Amylois transitella* (PDB#4INW; C = 99.4; % i.d. = 18); PBP1 de *Bombyx mori* (PDB#1DQE; C = 99.3; % i.d. = 15), OBP2 (PDB#2WCL; C = 99.3; % i.d. = 22), PBP de *Leucophaea maderae* (PDB#1OW4; C = 99.1; % i.d. = 10); OBP5 de *Apis mellifera* (PDB#3R72; C = 99.1; % i.d. = 12); OBP4 de *An. gambiae* (PDB#3Q8I; C = 99.0; % i.d. = 17); OBP14 de *A. mellifera* (PDB#3S0B; C = 98.9; % i.d. = 10), OBP (PDB#1R5R; C = 98.9; % i.d. = 14), OBP56a de *Phormia regina* (PDB#5DIC; C = 98.9; % i.d. = 14); OBP20 de *An. gambiae* (PDB#3BV1; C = 98.8; % i.d. = 16) e OBP1 de *Locusta migratoria* (PDB#4PT1; C = 98.8; % i.d. = 16).

Todos os modelos foram testados usando PROCHECK e Verify 3D. O melhor modelo para a OBP27 de *R. prolixus* (Fig. 27A) foi obtido utilizando a estrutura cristalina da OBP20 de *An. gambiae* (AgamOBP20, PDB#3VB1). O modelo teórico da OBP27 foi usado nos estudos de *docking*. Este modelo foi o que melhor satisfaz os critérios exigidos pelo PROCHECK e Verify 3D para a validação de um bom modelo (Fig. 28; Fig. 29). As afinidades de ligação da OBP27 *in silico* foram testadas contra quatro principais voláteis produzidos pelas GMs de fêmeas: 2-metil-3-buten-2-ol, (S)-2-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol e (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol (PONTES et al., 2008). Termodinamicamente, os ligantes se acoplam fortemente ao sítio ativo de uma proteína quando a energia livre de ligação do processo é baixa. Portanto, esse parâmetro foi usado para estimar as afinidades de ligação dos compostos 2-metil-3-buten-2-ol, (S)-2-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol e (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol à OBP27. Os valores negativos obtidos sugeriram interações favoráveis com todos os 4 ligantes testados (Fig. 27B). Sendo mais conservadores, e utilizando um valor de *cut-off* mais restrito (-4.00), os resultados ainda assim indicaram que a OBP27 era capaz de se ligar ao (3E)-2-metil-3-penten-2-ol e (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol. A análise *in silico*, reforçou os dados descritos na literatura, que apontam que ambos os compostos, ((3E)-2-metil-3-penten-2-ol e (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol), evocam um comportamento específico de insetos machos, que é a orientação do voo modulada por

voláteis emitidos pelos insetos fêmeas. O *docking* do modelo 3D da OBP27 com os voláteis (3E)-2-metil-3-penten-2-ol e (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol está apresentado na Fig. 30. Os resíduos do *binding pocket* da OBP27 que interagem com (3E)-2-metil-3-penten-2-ol incluem aminoácidos hidrofóbicos (TYR56, ILE63, PRO64, TYR136 e ALA139) e hidrofílicos (LYS140 e LYS143) (Fig. 30). Os resíduos que interagem com (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol também incluem aminoácidos hidrofóbicos (TYR56, ILE63, PRO64, TYR136) e hidrofílicos (LYS140 e LYS143) (Fig. 30).

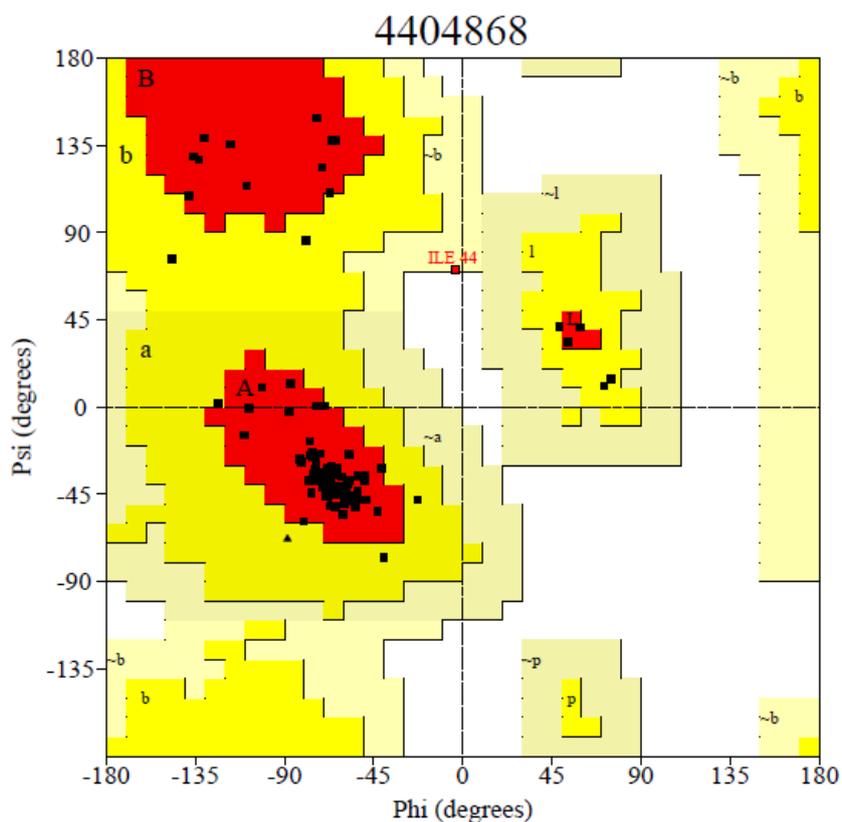
A análise da sequência primária da OBP27 (Fig. 31) revelou tratar-se de uma OBP do tipo *Minus C* (menos de seis cisteínas). O modelo 3D proposto para a OBP27 revelou que a proteína é formada por 5  $\alpha$ -hélices localizadas nas seguintes regiões da estrutura primária:  $\alpha$ -hélice 1: 3 a 32;  $\alpha$ -hélice 2: 39 a 52;  $\alpha$ -hélice 3: 62 a 72;  $\alpha$ -hélice 4: 75 a 90;  $\alpha$ -hélice 5: 98 a 112. A OBP27 possui duas pontes dissulfeto (Fig. 27A) e apresenta 153 resíduos, sendo 28 ácidos, 24 básicos, 75 polares e 78 apolares. A OBP27 é uma proteína com características ácidas, pI em torno de 5,4, e peso molecular de 17,83 kDa.



**Figura 27 - Modelo 3D da OBP27 de *R. prolixus*.** As  $\alpha$ -Hélices são mostradas em vermelho, *loops* em verde e ligações dissulfeto são destacadas em azul. A modelagem 3D foi desenvolvida usando a estrutura cristalina de OBP20 de *An. gambiae* (PDB#3VB1) como modelo, pelo programa online PHYRE2 e validado usando PROCHECK e Verify3D.

PROCHECK

## Ramachandran Plot



**Figura 28 - Resultado do PROCHECK do modelo 3D teórico da OBP27.** Diagrama de Ramachandran do modelo selecionado: 89,8% de resíduos em regiões favoráveis (A, B, L); 9,2% de resíduos em regiões adicionais permitidas (a, b, l, p); 1% de resíduos em regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p); 0% de resíduos em regiões não permitidas. Número de resíduos não-glicina e não-prolina: 98. Número de resíduos finais (excluindo Gly e Pro): 2. Número de resíduos de glicina (mostradas como triângulos): 4. Número de resíduos de prolina: 1. Número total de resíduos: 105. A área do gráfico é dividida em quatro regiões: mais favorecida (vermelha), adicionalmente permitida (amarela), generosamente permitida (amarelo claro) e não permitida (branca).

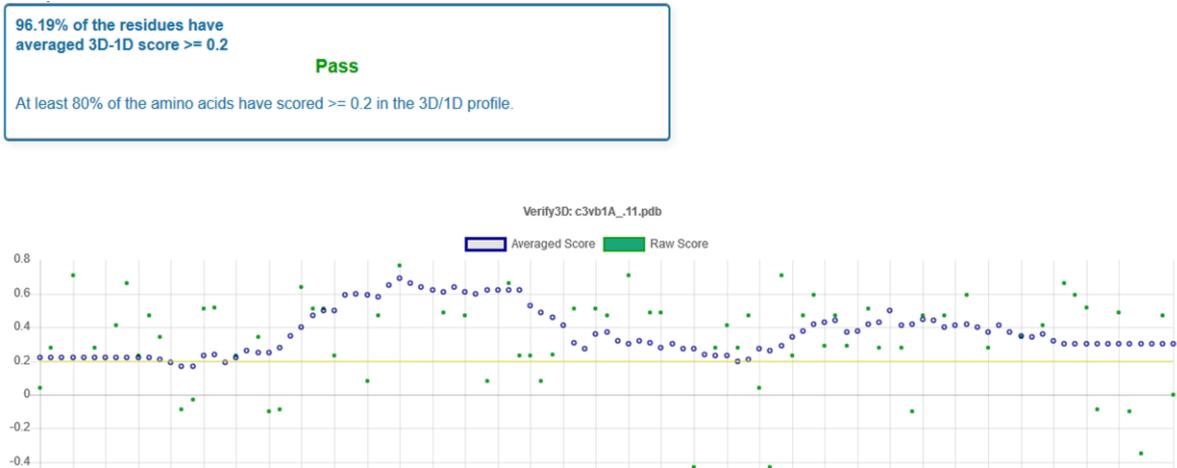


Figura 29 - Resultados do Verify3D do modelo 3D teórico da OBP27.

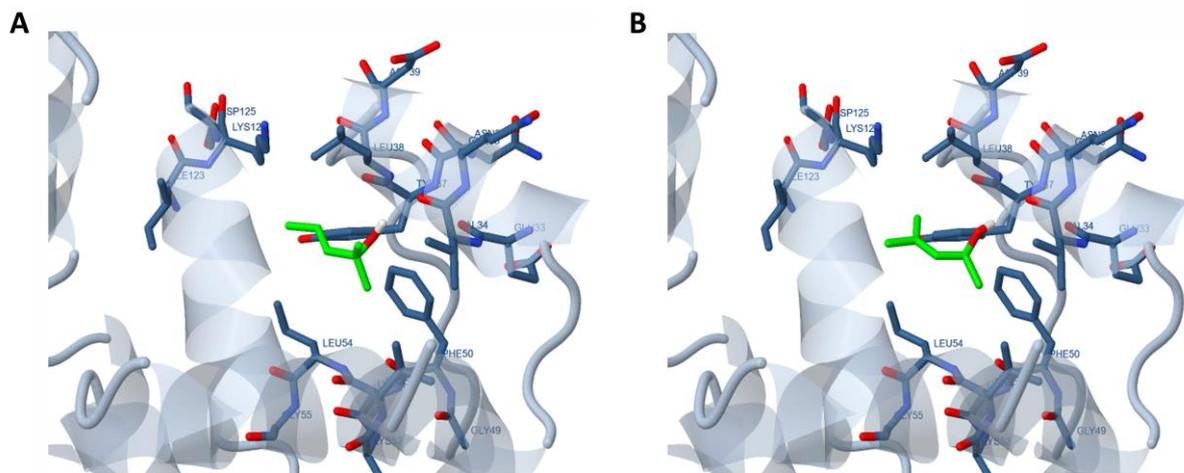


Figura 30 - Docking do modelo 3D da OBP27 com voláteis das glândulas metasternais. (A) OBP27 acoplada com (3E)-2-metil-3-penten-2-ol. (B) OBP27 acoplada com (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol. Os resíduos que fazem parte do *binding pocket* são mostrados como bastão.

### >RproOBP27

**MHLFGYILVGLAVVDLVLSIQEIKGLNKKEIQELELRSLIECRVEYN**  
**VDKSEVQNYLDMDKVIPDNDGFKKVLGCYAGKMTFVDDTRINW**  
**DKVRLAAEIYHENEKEYRDKSLKLIDECCKKLSYEGLSHNEVSYV**  
**VAKCIKDGIVQRGIKW**

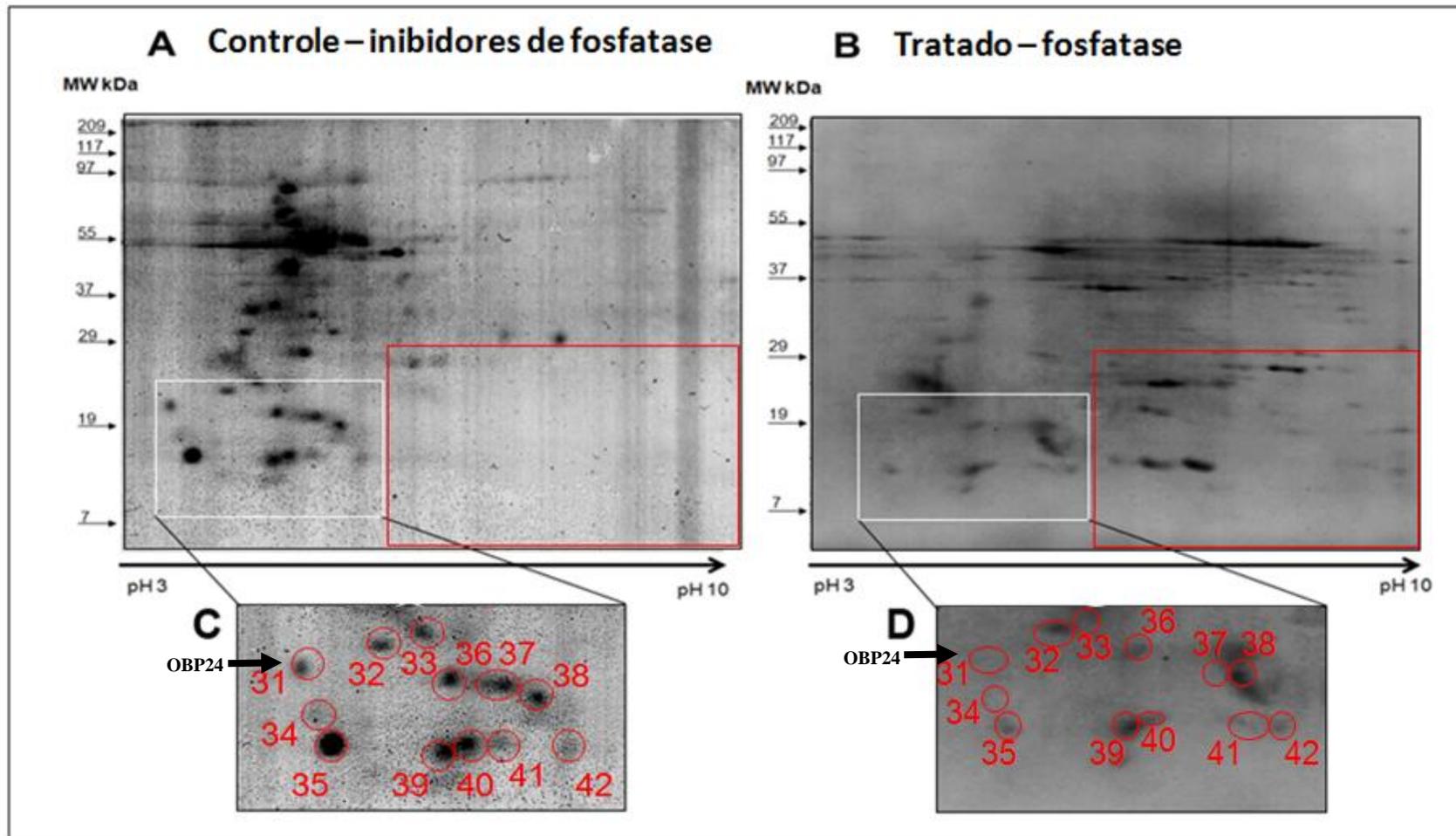
Figura 31 - Sequência de aminoácidos da OBP27. O peptídeo sinal está destacado em vermelho.

#### 4.4. PARTE II – MODELO DE FUNCIONAMENTO DAS OBPS

##### 4.4.1. Mapeamento de proteínas fosforiladas

Existe na literatura uma lacuna sobre o mecanismo de ligação dos semioquímicos a sua OBP específica. Algumas OBPs mostram-se promíscuas ligando-se a diferentes moléculas, outras são mais específicas. Os mecanismos envolvidos neste processo ainda não estão bem estabelecidos. Uma das hipóteses sugere que o processo de ligação odor-OBP seria regulado por fosforilação/defosforilação. Para testar essa hipótese antenas de insetos machos foram dissecadas e as proteínas extraídas e separadas em dois grupos: um extrato proteico foi tratado com fosfatase alcalina (grupo-tratado) e, o outro extrato não foi tratado com fosfatase (grupo-controle). No grupo-controle as proteínas foram extraídas com inibidores de fosfatase. As proteínas dos dois grupos foram então submetidas separadamente à eletroforese em gel 2-DE em pH 3-10 (Fig. 32).

Comparando-se o gel do grupo-controle com o gel contendo as proteínas tratadas com fosfatase, observou-se que houve uma mudança na migração das proteínas. As proteínas defosforiladas migraram para áreas mais básicas do gel. Esta mudança na migração pode ter ocorrido devido à mudança do pI das proteínas, provocada pela perda do grupo fosfato após tratamento com fosfatase (Fig. 32 - A, B). As OBPs são na maioria proteínas ácidas e de baixo peso molecular, logo, durante a focalização isoeletrica seguida de SDS-PAGE, essas proteínas migram para regiões ácidas e de baixo peso molecular no gel. Dessa forma, é possível observar que na área ácida do gel contendo os extratos de proteínas tratados com fosfatase, alguns *spots* estão apagados (*spots* 32, 33, 35, 36, 38, 39, 40) e outros desapareceram (*spots* 31, 34, 37) (Fig. 32 - C, D). Esta mudança no perfil de migração e o desaparecimento de *spots* no gel sugerem que houve defosforilação (Fig. 32 - C, D). Nota-se nitidamente, comparando os géis (Fig. 32C), que as proteínas presentes no *spot* 41, por exemplo, mudaram para uma região mais básica no gel-tratado (Fig. 32D), sugerindo mudança no pI. A variação no padrão de migração em SDS-PAGE das proteínas das antenas tratadas com fosfatase alcalina indica que as OBP de *R. prolixus* podem estar fosforiladas.



**Figura 32 - Eletroforese em Gel 2-DE em pH 3-10 com proteínas das antenas de machos de *R. prolixus*.** (A) Gel 2-DE controle com proteínas extraídas com tampão HEPES e inibidores de fosfatase. (B) Gel 2-DE com proteínas extraídas com tampão HEPES e tratadas com fosfatase alcalina. A região ácida do gel controle (A) está ampliada em (C). A região ácida do gel tratado (B) está ampliada em (D). A OBP24 do spot 31 está indicada no gel com uma seta preta. Esta OBP possui um possível peptídeo fosforilado, mostrado na Tabela 2. A Tabela suplementar Gel 2-DE pH 3-10, com as proteínas totais identificadas neste gel está disponível em: <https://goo.gl/34Eb6J>.

#### 4.4.2. Identificação de peptídeos fosforilados

Inicialmente, os peptídeos fosforilados foram identificados por nano LC-MS/MS, analisando extratos de proteínas das antenas de insetos machos não tratadas com fosfatase alcalina e de baixo peso no gel-2DE em pH de 3-10 (Fig. 32A). Em seguida, para ampliar a identificação de fosfopeptídeos e verificar diferenças nos perfis de proteínas entre as antenas de insetos machos e fêmeas, os extratos proteicos foram separados usando uma faixa mais restrita de pH (4-7). Para isso, antenas de ambos os sexos foram dissecadas, as proteínas extraídas e submetidas à eletroforese em gel-2DE em pH de 4-7, separadamente (Fig. 33). Os *spots* marcados em vermelho (Fig. 33) foram cortados, tripsinizados e analisados por nano LC-MS/MS. Os fosfopeptídeos foram identificados usando o *software* Mascot, utilizando os parâmetros de busca fosforilação de serinas, treoninas e tirosinas como modificações variáveis. As tabelas suplementares com as listas de proteínas e seus respectivos peptídeos identificados nas análises estão disponíveis em: <https://goo.gl/34Eb6J>.

Foram identificados peptídeos fosforilados teóricos e seus sítios de fosforilação em 5 OBPs e 1 CSP (Tabela 2). A OBP24 indicada no *spot* 31 da Fig. 32C desapareceu do gel após a defosforilação com fosfatase (Fig. 32D). E, de fato, a OBP24 foi identificada na forma fosforilada no *spot* 31 do gel controle (Fig. 32C), indicando que esta proteína possui um peptídeo fosforilado. Além da identificação de OBPs, também foram identificadas quinases e fosfatases. OBPs são expressas na linfa sensilar, ou seja, no meio extracelular, e para serem fosforiladas, é necessário a presença de quinases neste meio. O proteoma das antenas de *R. prolixus* identificou algumas quinases, porém somente a quinase tyrosine-protein kinase Src64B (RPRC010134-PA), identificada anteriormente por nosso grupo (OLIVEIRA, 2014), possui localização subcelular no meio intracelular, na membrana plasmática e no meio extracelular, ou é secretada neste meio (<https://www.uniprot.org>). Portanto, é provável que esta ecto-quinase fosforile OBPs presentes na linfa sensilar. A tyrosine-protein kinase Src64B foi encontrada nas antenas de insetos machos no *spot* 8 do gel 2-DE em pH 4-7. Além desta quinase, também foram identificadas no mesmo *spot* as seguintes OBPs: OBP6, OBP11, OBP12, OBP18 e OBP24. Isso mostra que em eletroforese em gel 2-DE, OBPs co-migram com quinases. Uma isoforma da OBP11 foi encontrada na forma fosforilada no *spot* 20, que está localizado em uma área mais ácida do mesmo gel (Tabela 2). Além disso, a tyrosine-protein kinase Src64B é uma proteína que fosforila resíduos de tirosina e o peptídeo fosforilado identificado para a OBP11 apresentou a fosforilação neste resíduo, “R.GYLVDGRVDFDK.L + Phospho (Y)”.

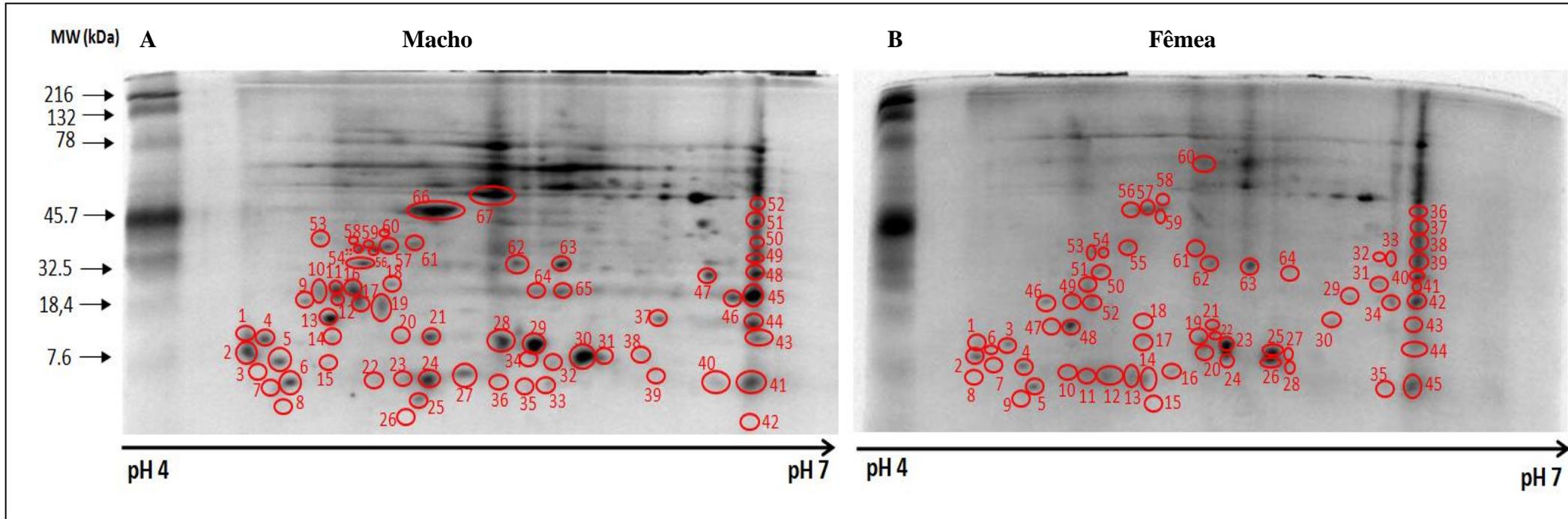
Para verificar se as OBPs identificadas no mesmo *spot* da quinase possuíam sítios de fosforilação para essa enzima, foi utilizado o sistema de predição GPS, que identifica sítios de fosforilação teóricos de quinases específicas. Assim, foram identificados sítios de fosforilação em 3 OBPs que co-migraram com a Src64B no gel: OBP11: CEVAYQAYSCAFTRP; OBP12: KEEGELAYYELTNCFV; OBP24: YKEELRAT, IMQCVVKYEREVGIA. Esta predição indica que OBPs de *R. prolixus* podem sofrer fosforilação pela tyrosine-protein kinase Src64B.

Além disso, foram identificadas 3 fosfatases no gel 2-DE em pH 4-7 nas antenas de insetos fêmeas: phosphoserine phosphatase (RPRC003241-PA, spot 39), prostatic acid phosphatase-like (RPRC012000-PA, spot 55) e serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform isoform X1 (RPRC007500-PA, spot 57) (Fig. 33). A fosfatase prostatic acid phosphatase-like (RPRC012000-PA) possui localização subcelular no meio extracelular ou é secretada (<https://www.uniprot.org>), podendo estar envolvida na defosforilação de OBPs na linfa sensilar.

Foram identificados peptídeos fosforilados em proteínas que participam da via de transdução do sinal olfativa nos insetos (Tabela 3). Dois receptores olfativos: OR12 (RPRC000376-PA) e OR79 (RPRC000202-PA); um receptor gustativo: GR20 (RPRC000451-PA) e, dois receptores de potencial transitório (TRPs): transient receptor potential channel pyrexia-like (RPRC001596-PA) e transient receptor potential-gamma (RPRC000350-PA), todos identificados na forma fosforilada (Tabela 3). Também foram identificadas proteínas envolvidas nas vias metabotrópicas mediadas por segundo mensageiros como a diacylglycerol kinase eta-like (DAGK, RPRC015094-PA) e a calmodulin (RPRC007515-PA).

Para entender melhor o papel de cada uma destas proteínas nas antenas de *R. prolixus*, foi construído um modelo da transdução do sinal olfativo (Fig. 34). A Figura 34 apresenta o esquema de uma sensila, mostrando o modelo proposto para o *R. prolixus*. As proteínas envolvidas na transdução do sinal olfativo identificadas neste estudo (Tabela 3) estão indicadas na figura (Fig. 34). As vias metabotrópicas, ionotrópicas e a regulação via fosforilação/defosforilação estão todas representadas no modelo (Fig. 34).

Os *scores* obtidos *in silico* dos fosfopeptídeos identificados foram baixos, indicando que há maior probabilidade destes peptídeos terem sido identificados ao acaso. Dessa forma, para refinar estes resultados partimos para o enriquecimento dos fosfopeptídeos presentes nas antenas.



**Figura 33 - Eletroforese em Gel 2-DE em pH 4-7 com proteínas das antenas de *R. prolixus*.** (A) Gel 2-DE com proteínas extraídas das antenas de macho. (B) Gel 2-DE com proteínas extraídas das antenas de fêmea. A tabela suplementar Gel 2-DE pH 4-7a, com as proteínas totais identificadas neste gel está disponível em: <https://goo.gl/34Eb6J>.

**Tabela 2 - Peptídeos fosforilados de OBPs de *R. prolixus* identificados pelo software Mascot. F – fêmea; M – macho.**

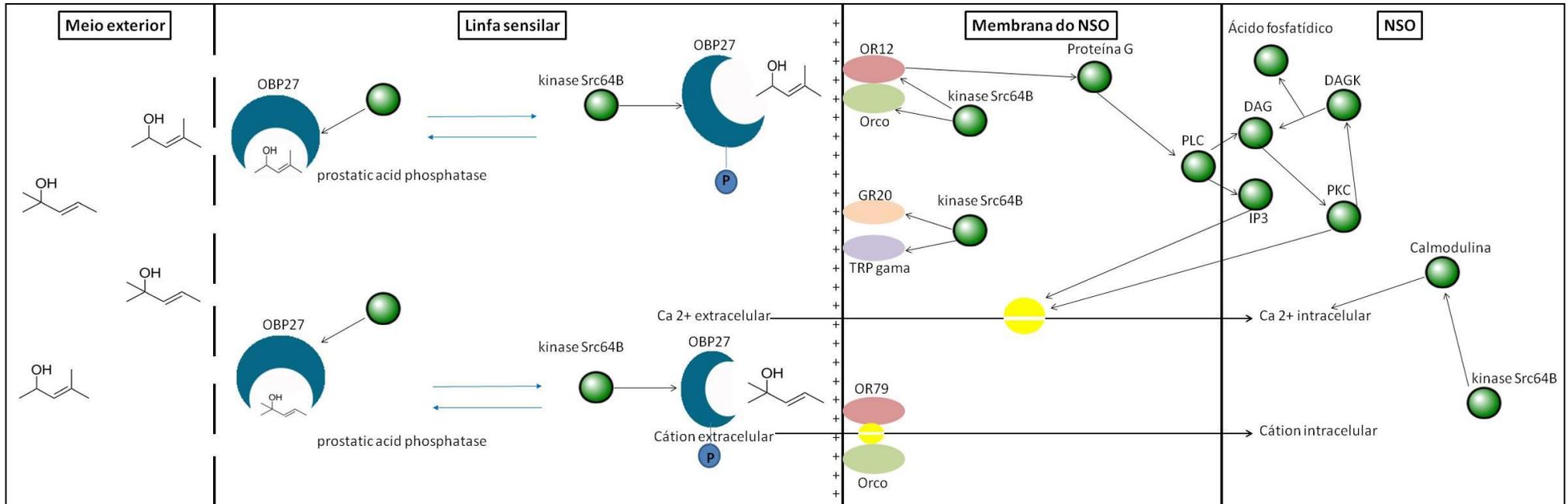
Proteína	Gel/nº do spot	Classificação	Sequência do peptídeo e sítio de fosforilação (sublinhado)
<b>OBP11</b>	4-7/M35	OBP clássica	K.CFL <u>S</u> CYLKER.G + Phospho (ST)
<b>OBP11</b>	4-7/M20*	OBP clássica	R.G <u>Y</u> LVDGRVDFDK.L + Phospho (Y)
<b>OBP26</b>	4-7/F46	OBP clássica	K.DNKEDLE <u>T</u> ALK.I + Acetyl (N-term); Phospho (ST)
<b>CSP11</b>	4-7/M24	CSP	K.AT <u>Y</u> KHALNK.F + Phospho (Y)
<b>OBP12</b>	3-10/F19*	OBP clássica	K.LMDF <u>S</u> RVPSAEAK.R + Phospho (ST)
<b>OBP12</b>	4-7/F52*	OBP clássica	K.VD <u>S</u> TGGGETVKK.A + Phospho (ST)
<b>OBP24</b>	3-10/M31	OBP clássica	K.IALAVAS <u>D</u> LMK.N + Oxidation (M); Phospho (ST)
<b>OBP27</b>	4-7/F56*	<i>Minus C</i> OBP	K.VRLAAE <u>I</u> HENEK.E + Phospho (Y)

\*Fosfopeptídeos identificados no estudo proteômico das antenas de macho e fêmea de *R. prolixus* realizado anteriormente por nosso grupo.

**Tabela 3 - Peptídeos fosforilados de proteínas que participam da via de transdução do sinal olfativa identificados pelo *software* Mascot. F – fêmea; M – macho.**

Gel/nº do spot	VectorBase ID	Proteína	Sequência do peptídeo e sítio de fosforilação (sublinhado)
4-7/M19	RPRC015094-PA	diacylglycerol kinase eta isoform X1	R. <u>S</u> KITQFASY <u>V</u> VEK.N + Phospho (Y)
4-7/M21*	RPRC015094-PA	diacylglycerol kinase eta-like	K. <u>V</u> SFYFSS <u>R</u> RK.L + Acetyl (N-term); Phospho (ST)  R. <u>S</u> KITQFASY <u>V</u> VEK.N + Acetyl (N-term); Phospho (ST)
4-7/F2	RPRC007515-PA	calmodulin	M.A <u>D</u> QL <u>T</u> EEQIAEFK.E + Phospho (ST)
4-7/M9 4-7/M19	RPRC000376-PA	OR12	K. <u>Y</u> ILVITVGS <u>G</u> VAMVA <u>V</u> SGFLALS LAD <u>R</u> PGLLGLFIM <u>C</u> GQAISNILSVC YL <u>G</u> ELVSD <u>M</u> NNQLNFEL <u>Y</u> SVNWY CY <u>T</u> K.K + Acetyl (N-term); 2 Oxidation (M); Phospho (ST); Phospho (Y)  K. <u>Y</u> ILVITVGS <u>G</u> VAMVA <u>V</u> SGFLALS LAD <u>R</u> PGLLGLFIM <u>C</u> GQAISNILSVC YL <u>G</u> ELVSD <u>M</u> NNQLNFEL <u>Y</u> SVNWY CY <u>T</u> K.K + Acetyl (N-term); Phospho (ST); 2 Oxidation (M); Phospho (Y)
4-7/M17	RPRC000202-PA	OR79	R. <u>S</u> VFLAIYHTIMVNYVGMASAAAL IIG <u>E</u> QSLVDFVQVL <u>G</u> VT <u>M</u> IYINNVV K.A + Acetyl (N-term); Oxidation (M); 2 Phospho (ST)  K.L <u>T</u> PYW <u>P</u> YFAG <u>M</u> AFD <u>A</u> MLM <u>V</u> TM SQ <u>Y</u> Y <u>M</u> S <u>F</u> T <u>T</u> LLFA <u>F</u> T <u>T</u> ELNACVR.V + 3 Oxidation (M); 2 Phospho (Y); 6 Phospho (ST)  K.L <u>T</u> PYW <u>P</u> YFAG <u>M</u> AFD <u>A</u> MLM <u>V</u> TM <u>S</u> Q <u>Y</u> Y <u>M</u> S <u>F</u> T <u>T</u> LLFA <u>F</u> T <u>T</u> ELNACVR.V + Acetyl (N-term); 2 Oxidation (M); 4 Phospho (Y); 5 Phospho (ST)
4-7/F56	RPRC000451-PA	gustatory receptor GR20	K. <u>T</u> QLE <u>S</u> VIKIFVNFK.N + Acetyl (N-term); Phospho (ST)
4-7/M28	RPRC001596-PA	transient receptor potential channel pyrexia-like	K.LQRIDSNV <u>S</u> LLAQDM <u>N</u> ELK.L + Phospho (ST); Oxidation (M)
4-7/M60	RPRC000350-PA	transient receptor potential-gamma	R. <u>I</u> HAY <u>R</u> ALAS <u>P</u> SLIAL <u>S</u> SK.D + Acetyl (N-term); Phospho (ST); Phospho (Y)

\*Fosfopeptídeos identificados no estudo proteômico das antenas de macho e fêmea de *R. prolixus* realizado anteriormente por nosso grupo.



**Figura 34 - Modelo proposto da via de transdução do sinal olfativo em *R. prolixus*.** As proteínas envolvidas na transdução do sinal olfativo de insetos estão indicadas na figura. Dentre estas, as seguintes proteínas foram identificadas neste estudo: kinase Src64B (RPRC010134-PA), OBP27 (RPRC009914-PA), prostatic acid phosphatase (RPRC012000-PA), OR12 (RPRC000376-PA), OR79 (RPRC000202-PA), GR20 (RPRC000451-PA), TRP gama (RPRC000350-PA), DAGK - diacylglycerol kinase eta-like (RPRC015094-PA) e calmodulina (RPRC007515-PA).

#### 4.4.3. Enriquecimento de fosfopeptídeos

O enriquecimento dos fosfopeptídeos foi obtido utilizando *tips* contendo uma resina de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). Em seguida, foi realizada a identificação das proteínas fosforiladas por espectrometria de massas.

Inicialmente, utilizou-se beta-caseína do leite bovino para a padronização da identificação de fosfopeptídeos pelo método TiO<sub>2</sub>. Os fosfopeptídeos foram identificados no *software* Mascot, utilizando os parâmetros de busca fosforilação de serinas, treoninas e tirosinas como modificações variáveis. Com este método foi possível identificar 4 peptídeos fosforilados e 10 sítios de fosforilação na beta-caseína bovina (Tabela 4), indicando que este método pode ser utilizado para a identificação de fosfopeptídeos.

**Tabela 4 - Peptídeos fosforilados da beta-caseína bovina identificados pelo *software* Mascot.**

Concentração de beta-caseína	Sequência do peptídeo e sítio de fosforilação (sublinhado)
25 µg	K.FQSEEQQTEDELQDK.I + Phospho (ST)
25 µg	K.IHPFAQTQSLVYFPFGPIHNSLPQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK.V + Acetyl (N-term); 2 Phospho (ST); Oxidation (M)
100 µg	K.FQSEEQQTEDELQDK.I + Phospho (ST)
100 µg	K.YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK.V + 2 Oxidation (M); 2 Phospho (ST)
100 µg	-.RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR.I + 2 Phospho (ST)
100 µg	-.RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR.I + 3 Phospho (ST)

Após a padronização, o enriquecimento de fosfopeptídeos foi realizado nas proteínas das antenas de insetos machos de *R. prolixus*. Os fosfopeptídeos foram identificados no *software* Proteome Discoverer. Nesta análise foi possível identificar apenas 7 fosfoproteínas (Tabela 5). Indicando que esta metodologia precisa de um refinamento maior para padronizar as amostras de antenas de *R. prolixus*. Por ser uma amostra complexa, que possui uma mistura de diferentes proteínas, o enriquecimento levou à identificação de poucas fosfoproteínas nas antenas, devido a uma limitação da técnica ou à quantidade de proteínas utilizadas na metodologia.

Apesar disso, foram identificadas duas proteínas de citoesqueleto na forma fosforilada: tubulina (Tubulin alpha chain (Fragment), RPRC014377-PA) e dineína (dynein intermediate chain 3, ciliary-like, RPRC004415-PA). Foi identificada a chaperona dnaJ fosforilada (dnaJ homolog subfamily C member 13, RPRC007871-PA) e uma ferritina fosforilada (FerHCH:

ferritin HCH, RPRC013830-PA). Uma proteína ribossomal das mitocôndrias (mRpL11: 39S ribosomal protein L11, mitochondrial, RPRC007804-PA), uma subunidade regulatória da fosfatase 6 (serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A-like, RPRC004548-PA) e uma proteína não caracterizada (Uncharacterized protein, RPRC007967-PA) foram identificadas na forma fosforilada. Os fosfopeptídeos encontrados nestas proteínas estão indicados na Tabela 5.

Ademais, esta análise permitiu a identificação da forma não fosforilada da OBP26 (OBP26, RPRC000182-PA - DNKEDLETALK). Na análise por eletroforese em gel 2-DE (Tabela 2) esta proteína havia sido encontrada na forma fosforilada, este resultado indica que a separação das amostras por gel 2-DE melhora a resolução da identificação de fosfopeptídeos.

**Tabela 5 - Peptídeos fosforilados das antenas de macho de *R. prolixus* identificados pelo software Proteome Discoverer.**

VectorBase ID	Proteína	Sequência do peptídeo fosforilado
RPRC007871-PA	dnaJ homolog subfamily C member 13	IIPVGLLNLYLNSTDVAPSTGEDPEWTIRDNLKLAQDHASK + 2xPhospho [Y9; T26]
RPRC007967-PA	Uncharacterized protein (Fragment)	QLICLTTLVLSVYGAQTSYPFQNQMVTAVQPQPTDVCK + 2xPhospho [Y13; T34]; 2xCarbamidomethyl [C4; C37]; 1xOxidation [M25]
RPRC014377-PA	Tubulin alpha chain (Fragment)	LADQCSSLQGLFIFHSFGGGTGSFGFTSLLLERLSIDYGKK + 2xPhospho [T21; T26]; 1xCarbamidomethyl [C5]
RPRC004415-PA	dynein intermediate chain 3, ciliary-like	NPNPKWQNAIGVTSYCFEPNLPTKFLVGTATGMVIEGK + 2xPhospho [T23; T29]; 1xCarbamidomethyl [C16]
RPRC013830-PA	FerHCH: ferritin HCH	LMKYLNKR + 1xPhospho [Y4]
RPRC007804-PA	mRpL11: 39S ribosomal protein L11, mitochondrial	KDITAQQKK + 1xPhospho [T4]
RPRC004548-PA	serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A-like	GNTPLHIASSK + 1xPhospho [S10]

## 5. DISCUSSÃO

A comunicação química é uma das formas mais antigas de interação entre os seres vivos e a natureza (WYATT, 2014; TOMBERLIN et al., 2016). Os insetos, por exemplo, apresentam um refinado sistema olfativo destinado a detecção de sinais químicos do meio ambiente. Semioquímicos (odores) promovem comportamentos específicos os quais permitem que os insetos obtenham alimento, encontrem seu parceiro sexual, encontrem abrigo e fujam de predadores. O primeiro contato entre o meio ambiente e a maquinaria olfativa ocorre quando o odor penetra através dos poros das sensilas das antenas e é solubilizado por proteínas ligadoras de odor (OBPs). Estas proteínas estão presentes em altas concentrações na linfa sensilar (BRITO et al., 2016). Em seguida, as OBPs entregam o odor ao complexo ORs•Orco ou IRs•IRcoreceptor específicos presentes nas membranas dos NSOs. Finalmente, proteínas degradadoras de odor e/ou outro mecanismo não determinado ainda removem o semioquímico, dessensibilizando os receptores e deixando-os disponíveis para novas rodadas de sinalização (LEAL, 2012). Todo esse processo tem como resultado uma resposta comportamental que é essencial para a vida de um inseto. Dessa maneira, bloquear o primeiro contato (odor+OBP) pode impedir os comportamentos de sobrevivência daquela população. Em se tratando de insetos transmissores de doenças isso refletiria imediatamente na densidade populacional daquela espécie. Portanto, levando-se em consideração que nas áreas endêmicas a transmissão vetorial tem papel determinante no número de casos de doença de Chagas, impedir que os barbeiros se reproduzam pode ser um fator chave para reduzir a transmissão. Estudos relacionados com o mecanismo de olfação em *R. prolixus* tornaram-se factíveis a partir da publicação do genoma em 2015 (MESQUITA et al., 2015). Nesta ocasião, foram anotados diversos genes candidatos a desempenhar papéis importantes na detecção e identificação de semioquímicos. A seguir apresentaremos uma compilação de dados que sugerem a participação da OBP27 no comportamento de *R. prolixus* e a identificação de proteínas fosforiladas que participam da sinalização olfativa.

### 5.1. PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES *OBPS*

OBPs são proteínas descritas como transportadoras de feromônios e odores gerais nas antenas e órgãos sensoriais de insetos (VOGT & RIDDIFORD, 1981). Apesar do nome proteínas transportadoras de odor, as OBPs podem transportar outras moléculas não odoríferas. Portanto, para que uma proteína seja considerada transportadora de

odor/feromônio ela deve ser expressa exclusivamente em órgãos olfativos sendo, dessa forma, denominadas OBPs funcionais (LEAL et al., 2006).

Embora no genoma tenham sido anotados 27 genes candidatos a OBPs em *R. prolixus* (MESQUITA et al., 2015), apenas 17 (63%) foram encontrados expressos nas antenas de adultos (OLIVEIRA et al., 2017). Este achado sugere que diversos genes incluídos na família das OBPs, provavelmente não estão diretamente envolvidos no transporte de moléculas quimiossensorias, o que é relativamente frequente nos insetos (PELOSI et al., 2018). Na mariposa *S. exigua* foram identificados 11 genes putativos que codificam *OBPs*, todos altamente expressos nas antenas (ZHU et al., 2013). Nesta espécie 6 *OBPs* são expressos igualmente em antenas de insetos machos e fêmeas, 4 *OBPs* são mais expressos em antenas de insetos fêmeas e 1 *OBP* é expresso especificamente em machos (ZHU et al., 2013). Em *S. litura*, 17 genes de *OBPs/PBPs* são exclusivos ou principalmente expressos nas antenas (GU et al., 2015). Dentre estes, 7 genes *OBPs* possuem o mesmo perfil de expressão nas antenas dos adultos, 3 *PBPs* são mais expressos em antenas de machos e 7 *OBPs* são altamente expressos em antenas de fêmeas (GU et al., 2015). No hemíptero fitófago, *Adelphocoris lineolatus* foram encontrados 14 genes de *OBPs* nas antenas de adultos, sendo 5 *OBPs* expressos em ambos os sexos, 5 *OBPs* foram expressos principalmente em antenas de insetos machos e 4 *OBPs* foram mais expressos em antenas de insetos fêmeas (GU et al., 2011a).

Especificamente em *R. prolixus* onze genes *OBPs* encontraram-se expressos, além das antenas, nas probóscides, pernas e cabeças (*OBP1*, *OBP7*, *OBP11*, *OBP12*, *OBP14*, *OBP18*, *OBP20*, *OBP22*, *OBP23*, *OBP24* e *OBP29*) (Fig. 12). A presença de transcritos em órgãos não olfativos indica que estas proteínas podem transportar moléculas não relacionadas diretamente com a olfação. Aliás, dos onze genes *OBPs* encontrados distribuídos em órgãos olfativos (antenas) e não olfativos (probóscide, perna e cabeça) (Fig. 12), quatro haviam sido descritos anteriormente no transcriptoma de intestino do *R. prolixus*: *OBP1*, *OBP11*, *OBP14*, e *OBP24* (RIBEIRO et al., 2014). Isso mostra que é provável que estas proteínas, apesar de apresentarem transcritos nas antenas, não estarem relacionadas com o transporte de odores. Um exemplo típico deste caso é o gene *OBP11*, que foi encontrado expresso em todos os órgãos analisados. A *OBP11* é, na verdade, a proteína transportadora de heme de *R. prolixus* (*Rhodnius* heme-binding protein - RHBP) que é sintetizada majoritariamente no corpo gorduroso e secretada para a hemolinfa. A principal função da RHBP é o transporte de radicais heme gerados a partir da digestão do sangue, protegendo as células intestinais do estresse oxidativo (DANSA-PETRETSKI et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1995). É muito intrigante encontrar transcritos para a RHBP nas antenas e o papel desta proteína neste órgão

deve ser investigado com atenção. Apesar de não existir nenhuma evidência mostrando que a RHBP transporta odores, esta proteína apresenta a assinatura da família das OBPs (pfam01395). Nesta família estão incluídas as proteínas ligadoras de feromônio (PBP) e as proteínas ligadoras de odor gerais (GOBP) (VOGT et al., 1981).

Nos insetos é comum encontrar transcritos para *OBPs* em grandes quantidades, não apenas nas antenas, mas, também, em outros órgãos como pernas, cabeças e órgãos envolvidos na gustação. Isso indica que esses *OBPs* participam de outras funções celulares, além da detecção de odor (SHANBHAG et al., 2001; JEONG et al., 2013; YUAN et al., 2015; XUE et al., 2016). Algumas OBPs, por exemplo, são importantes na solubilização de lipídios e outros componentes da dieta, sendo essenciais na absorção de nutrientes (SANCHEZ-GRACIA et al., 2009; PELOSI et al., 2018). Em triatomíneos, *OBPs* expressos nas glândulas salivares, sugerem a participação dessas proteínas na percepção de moléculas gustativas (RIBEIRO et al., 2004; ASSUMPCÃO et al., 2008; SANTIAGO et al., 2016). Dessa forma, podemos especular que os genes *OBPs* de *R. prolixus* que encontramos nas probóscides, pernas e cabeças podem estar envolvidos no transporte de moléculas hidrofóbicas relacionadas com funções não olfativas.

Além dos genes encontrados distribuídos em todos os órgãos, seis *OBPs* foram expressos exclusivamente nas antenas (*OBP6*, *OBP13*, *OBP17*, *OBP21*, *OBP26*, e *OBP27*) (Fig. 13). Nos insetos, genes *OBPs* expressos especificamente nas antenas originam proteínas envolvidas na detecção de diferentes semioquímicos que participam do processo de olfação (SCHULTZE et al., 2012; SUN et al., 2014).

Apesar de excelente para uma triagem inicial, o PCR semi-quantitativo não é usado para avaliar diferenças quantitativas nos perfis dos transcritos. Dessa forma, para identificar genes *OBPs* diferencialmente expressos entre as antenas dos insetos machos e fêmeas, os níveis de RNAm dos seis *OBPs* foram quantificados por qPCR. A mesma quantidade de transcritos para os genes, *OBP6* e *OBP13*, foram detectadas nas antenas de ambos os sexos (*OBP6* p=0.3799; *OBP13* p=0.5345) (Fig. 14; Fig. 15). Portanto, pode-se assumir que as proteínas transportem odores semelhantes. Ambos, insetos machos e fêmeas se alimentam de sangue. Portanto, os adultos devem ser capazes de detectar voláteis específicos emitidos pelo hospedeiro vertebrado e, com isso, adquirir a refeição sanguínea (OTALORA-LUNA et al., 2004; ESCANDON-VARGAS et al., 2017). Encontrar *OBPs* com expressão semelhante nas antenas de ambos os sexos é comum em insetos. Em *A. lineolatus*, os genes para as *OBP2*, *OBP7*, *OBP8*, *OBP9* e *OBP10*, tem o mesmo perfil de expressão nas antenas dos adultos (GU et al., 2011a). Na mariposa, *S. exigua* os genes *OBP1*, *OBP5*, *OBP6*, *OBP8*, *OBP9* e *OBP11*

(ZHU et al., 2013) apresentam a mesma quantidade de transcritos nas antenas de insetos machos e fêmeas. Em outra espécie de mariposa, *S. litura*, as antenas de adultos apresentam mesmo perfil de expressão para os genes *OBP1*, *OBP3*, *OBP4*, *OBP5*, *OBP6*, *OBP7* e *OBP15* (GU et al., 2015).

Em contrapartida, os genes *OBP17* e *OBP21* foram quantitativamente mais expressos nas antenas de fêmeas (*OBP17*  $p=0.0336$ ; *OBP21*  $p=0.0002$ ). Encontrar genes de OBPs predominantemente expressos nas antenas de fêmeas sugere a participação dessas proteínas na detecção de odores envolvidos em comportamentos peculiares das fêmeas, como a detecção de feromônios de oviposição (Fig. 16; Fig. 17). A detecção de voláteis de sítios de oviposição é essencial para a reprodução de uma determinada espécie, e é observado em insetos hematófagos. No mosquito *Cx. quinquefasciatus*, OBPs expressos exclusivamente nas antenas de fêmeas estão relacionados com a detecção de feromônios de oviposição. O escatol, é transportado pela *OBP2*, e o feromônio de oviposição do mosquito (MOP) transportados pelas *OBP1* e *OBP5*. Os genes *OBP1*, *OBP2*, e *OBP5* não são expressos nas antenas de insetos machos. Estes genes tem função específica nos insetos fêmeas (PELLETIER et al., 2010; YIN et al., 2015). Dessa forma, não podemos descartar a possibilidade dos genes *OBP17* e *OBP21* serem candidatos a detecção e transporte de voláteis dos sítios oviposição em *R. prolixus*.

A variação na quantidade de transcritos presentes em cada antena também foi avaliada. Nas antenas de insetos fêmeas os genes *OBP6* e *OBP17* tiveram os maiores níveis de expressão (Fig. 18), enquanto o gene *OBP17* foi o mais expresso nas antenas de insetos machos (Fig. 19). Perfis de expressão diferenciais de OBPs também foram observados em outras espécies, como nos hemípteros *A. lineolatus*, *Nilaparvata lugens* e *Apolygus lucorum* (GU et al., 2011a; HE et al., 2011; YUAN et al., 2015), suportando a hipótese que essas proteínas apresentem funções diferentes em insetos machos e fêmeas. Curiosamente, RNAs para os genes *OBP6*, *OBP17* e *OBP26* também foram detectados no transcriptoma do intestino de *R. prolixus* (RIBEIRO et al., 2014). Dada a complexidade do processamento das informações químicas por um inseto, sejam relacionadas aos sistemas olfativo ou digestório, não é possível inferir o significado da presença de RNAs de OBPs tanto nas antenas como nos intestinos. Não é de todo absurdo acreditar que exista uma correlação entre os dois sistemas e que as proteínas atuem em conjunto no processo de sinalização da disponibilidade de alimento.

Embora transcritos para o gene *OBP26* tenham sido encontrados em grandes quantidades nas antenas de insetos machos (Fig. 20), este gene também foi relatado expresso em altos níveis no intestino médio de *R. prolixus* (denominado RP-3726) (RIBEIRO et al.,

2014). Assim, não podemos descartar a possibilidade de dupla função para a OBP26, transporte de moléculas no intestino, bem como de semioquímicos nas antenas. Curiosamente, apesar da quantidade de transcritos do gene *OBP26* nas antenas de fêmeas ser 135x menor que o expresso nos machos (Fig. 20,  $p=0.004$ ), a proteína OBP26 encontra-se circulante na hemolinfa sensilar de ambos os adultos (OLIVEIRA et al., 2017). É provável, que a proteína encontrada por OLIVEIRA et al. (2017) no proteoma das antenas de insetos fêmeas seja sintetizada também nos intestinos (RIBEIRO et al., 2014). Embora apenas um gene candidato a *OBP26* tenha sido anotado no genoma (MESQUITA et al., 2015), não podemos descartar a possibilidade do mesmo sofrer *splicing* alternativo e produzir proteínas com funções diferentes como observado em outras espécies de insetos (FORÊT & MALESZKA, 2006; HULL et al., 2014).

*OBPs* expressos exclusivamente nas antenas de insetos machos estão, na maior parte das vezes, relacionados com proteínas que detectam feromônio (HE et al., 2010; BOHBOT & VOGT, 2005). No presente estudo também foram encontrados transcritos exclusivos nas antenas de machos, os genes *OBP26* e *OBP27* (*OBP26*,  $p= 0.004$ ; *OBP27*,  $p= 0.004$ ) (Fig. 20; Fig. 21). Estes achados indicam que estes genes podem traduzir proteínas ligadoras de feromônio (PBPs), que estariam envolvidas em comportamentos específicos de machos, como a detecção de feromônios sexuais. Apesar da maioria dos trabalhos que relacionam *PBPs* expressos nas antenas de insetos machos com a detecção de feromônio (MAO et al., 2016; ZHANG et al., 2018) terem sido publicados em modelos de insetos pragas (não hematófagos), um gene *OBP* encontrado nas antenas de insetos machos de *A. aegypti* também foi apontado como transportador de feromônio (BOHBOT & VOGT, 2005). O padrão de expressão do gene *OBP10* nas antenas e nas asas de mosquitos machos adultos indica a participação dessa proteína na detecção de feromônios sexuais em *A. aegypti* (BOHBOT & VOGT, 2005).

Em insetos a comunicação química via feromônio é uma das principais formas de identificação intraespecífica, e as *OBPs* participam deste mecanismo (BOHBOT & VOGT, 2005; HE et al., 2010). As *OBPs*, PBP1 e GOBP2, expressas especificamente nas antenas de insetos machos no bicho-da-seda, *B. mori*, se ligam ao principal componente do feromônio sexual deste inseto, o bombicol [(10E, 12Z)-hexadecadien-1-ol] e aos seus análogos (HE et al., 2010). A PBP1 de *B. mori* transporta, também, outro componente do feromônio, o bombical [(10E, 12Z) -hexadecadienal] (HE et al., 2010). Na mariposa, *Chilo suppressalis*, as proteínas PBP1 e PBP3 expressas nas antenas de insetos machos reconhecem os três componentes principais do feromônio sexual desta espécie, (Z)-11-hexadecenal (Z11-16: Ald), (Z)-9-hexadecenal (Z9-16: Ald) e (Z)-13-octadecenal (Z13-18: Ald) (CHANG et al.

2015). Portanto, estes estudos comprovam que OBPs expressas exclusivamente nas antenas de insetos machos tem papel crucial no comportamento sexual nas diferentes espécies de insetos.

Apenas 22% dos candidatos a OBPs preditos no genoma de *R. prolixus* foram expressos majoritariamente nas antenas. Este número parece condizente com trabalhos prévios que relatam uma variação entre 8-45% dos genes de *OBPs* candidatos nos genomas serem expressos exclusivamente nas antenas. No lepidóptero *S. exíqua*, por exemplo, 45% dos *OBPs* candidatos do genoma foram específicos das antenas (ZHU et al., 2013). Na abelha *A. melífera*, 42% dos *OBPs* preditos foram identificados somente nas antenas (FORÊT & MALESZKA, 2006). Enquanto, apenas 8% dos genes *OBPs* do genoma de *B. mori*, que possui anotado 45 candidatos, foram encontrados nas antenas (GONG et al., 2009). Esta variação revela que a maioria dos genes candidatos a OBPs não produzem proteínas funcionais nas antenas. Isso certamente tem implicação direta para o sistema de sinalização da olfação. Insetos com poucas OBPs circulante na linfa sensilar devem utilizar diferentes mecanismos para identificar os vários sinais químicos presentes na natureza, como a combinação de diferentes OBPs. Não podemos descartar, também, a possibilidade das OBPs sofrerem modificações pós-translacionais como fosforilação e defosforilação.

## 5.2. ESTUDO FUNCIONAL DA OBP27 POR RNAi

O gene *OBP27* se mostrou exclusivo das antenas de insetos machos, indicando que a proteína pode estar relacionada com a detecção de voláteis liberados pelos insetos fêmeas. Assim, para investigar esta hipótese o gene *OBP27* foi silenciado por RNA de interferência (RNAi).

A técnica de RNAi é amplamente utilizada para investigar funções de genes em insetos (BIESSMANN et al., 2010; PELLETIER et al., 2010; HE et al., 2011; SWARUP et al., 2011; DENG et al., 2013; LI et al., 2016; SHORTER et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Em *R. prolixus* essa técnica foi aplicada com sucesso para o silenciamento do coreceptor olfativo (*Orco*) (FRANCO et al., 2016) e para o silenciamento da quitina sintase (MANSUR et al., 2014). A técnica de RNAi também contribuiu para identificação de ligantes específicos das OBPs e para verificar os efeitos fenotípicos comportamentais desencadeados pelo silenciamento (CHEN et al., 2008; BIESSMANN et al., 2010; PELLETIER et al., 2010; HE et al., 2011; SWARUP et al., 2011; DENG et al., 2013; REBIJITH et al., 2016; SHORTER et al., 2016; LI et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Algumas evidências mostram que silenciar

genes olfativos pode ser usado como estratégia para o controle de insetos. Indivíduos submetidos ao tratamento com dsRNA apresentam modificação no comportamento que influencia diretamente na sobrevivência dos mesmos (HE et al., 2011; FRANCO et al., 2016; LI et al., 2016; DONG *et al.*, 2017).

Dos dois genes *OBPs* encontrados nas antenas de machos, selecionamos o gene *OBP27* para os estudos funcionais. O gene *OBP26*, aparentemente, apresenta múltiplos papéis na fisiologia de *R. prolixus*, pois está expresso em grandes quantidades também no intestino (RIBEIRO et al., 2014). Portanto, a avaliação das funções do gene *OBP27* poderia gerar um perfil funcional muito mais claro do que aquele do gene *OBP26*.

Machos adultos tratados com ds*OBP27* tiveram uma redução de 88% na quantidade dos transcritos para o gene *OBP27* (Fig. 22), representando uma drástica diminuição na quantidade de proteína circulante nas antenas. Com a redução da expressão do gene podemos deduzir que os insetos possuíam uma diminuição de *OBP27* circulante na linfa sensilar.

Os efeitos fenotípicos iniciais do silenciamento foram verificados através da avaliação de três parâmetros importantes para a fisiologia de um triatomíneo, a ecdise, a sobrevivência e a capacidade de ingerir sangue. No primeiro caso, era preciso verificar se a *OBP27* teria alguma relação com o processo de ecdise. No segundo caso, a sobrevivência dos grupos era importante porque precisávamos de um número adequado de insetos para realizar os bioensaios. No terceiro, queríamos verificar se a *OBP27* estaria ou não relacionada com a detecção de voláteis do hospedeiro ou ingestão de sangue.

O silenciamento do *OBP27* não afetou a ecdise dos insetos. Tanto os insetos tratados com ds*OBP27*, como os insetos controle (ds *$\beta$ -gal*) realizaram a ecdise normalmente. O silenciamento do Orco de *R. prolixus* levou à diminuição da ecdise dos insetos, indicando que a diminuição da expressão do coreceptor afetou o desenvolvimento dos insetos (FRANCO et al., 2016).

O silenciamento também não afetou a sobrevivência dos insetos (Fig. 23). A capacidade de ingerir sangue também não foi afetada (Fig. 24). Todos os grupos fizeram o repasto sanguíneo normalmente, ambos os grupos, controle e ds*OBP27*, ingeriram quase a mesma quantidade de sangue,  $p=0,4206$ , indicando que a *OBP27* não está relacionada com o reconhecimento de voláteis emanados pelo hospedeiro (fonte alimentar) (Fig. 24). Esse perfil parece ser frequente em outros insetos. Os efeitos fenotípicos do silenciamento de *OBPs* não afetaram a sobrevivência e nem a alimentação de *An. gambiae* (BIESSMANN et al., 2010). Portanto, os resultados obtidos aqui estão de acordo com o observado para outro hematófago. De maneira diferente, a redução na expressão Orco de *R. prolixus*, afetou diretamente a

capacidade do inseto de realizar a alimentação sanguínea (FRANCO et al., 2016). O Orco, diferente das OBPs, é uma proteína transmembranar expressa nos NSOs e de importância vital para o correto posicionamento e funcionamento dos ORs (BENTON et al., 2006). No hemíptero fitófago, *N. lugens*, a redução da expressão do gene *OBP3*, por RNAi, reduziu a capacidade de detecção de voláteis da planta hospedeira, levando a diminuição da busca pelo alimento e a um aumento da taxa de mortalidade atribuída à interrupção do transporte de hormônio juvenil realizado por esta OBP (HE et al., 2011).

Descartada a possibilidade do envolvimento da OBP27 com voláteis do hospedeiro, seguimos para a avaliação da capacidade dos insetos machos silenciados detectarem os insetos fêmeas. Em triatomíneos, feromônios sexuais são produzidos por fêmeas adultas pelas glândulas metasternais (GMs) (VITTA et al, 2009; MAY-CONCHA et al., 2013). Os feromônios desencadeiam reações comportamentais no sexo oposto, podendo atraí-lo de longas ou curtas distâncias, levando à aproximação, reconhecimento e contato entre machos e fêmeas (VITTA, 2009). Estudo recente mostrou que os insetos machos adultos de *R. prolixus* são atraídos por sinais sexuais químicos emitidos pelas fêmeas. Estes voláteis (feromônios) estimulam tanto a saída dos insetos machos dos abrigos artificiais, como a atividade locomotora (PONTES, 2010). Portanto, é possível inferir que existem OBPs nas antenas dos insetos machos envolvidas diretamente como o transporte e apresentação desses voláteis ao NSO.

Dessa forma, para imputar uma função à OBP27, foi utilizado o bioensaio de atratividade proposto por ZERMOGLIO et al., 2015 (modificado). Assim, seria possível determinar se o silenciamento, com consequente redução dos níveis de OBP27, afetaria a capacidade de reconhecimento dos insetos fêmeas pelos machos. Insetos injetados com *dsβ-gal* (controle) e, portanto, com quantidades regulares de OBP27 circulante na linfa sensilar, foram capazes de detectar e se locomover rapidamente em direção a fêmea (Fig. 25). Insetos injetados com *dsOBP27* e que tinham uma menor concentração de OBP27 na hemolinfa foram mais lentos (Fig. 25). A diferença na mobilidade entre os grupos mostrou ser estatisticamente significativa ( $p=0,0065$ ).

Além disso, insetos machos tratados com *dsOBP27* quando comparados aos insetos do grupo controle, permaneciam 40% menos tempo próximos aos insetos fêmeas (Fig. 26,  $p=0,002$ ). Os insetos do grupo *dsOBP27* apresentaram um comportamento bem peculiar. O macho-*dsOBP27* ao se aproximar da fêmea, retornava rapidamente para a zona intermediária (ZI) do tubo, ou para a zona de liberação do macho (ZM), extremidade oposta à fêmea. Este comportamento indicava que os machos-*dsOBP27* tinham pouco ou nenhum interesse pelas

fêmeas. Em contraste, insetos do grupo *dsβ-gal* (controle) permaneciam um tempo mais longo na zona da fêmea (ZF) (Fig. 26). Apesar de existir uma barreira física (tela de proteção), impedindo o contato direto entre o macho e a fêmea, os insetos dos grupos *dsβ-gal*, tentavam repetidas vezes transpor esta barreira, provavelmente para realizar a cópula. Com base nesta clara diferença comportamental, podemos inferir que a proteína OBP27 de *R. prolixus* está envolvida na recepção de semioquímicos relacionados à busca pela fêmea para o acasalamento.

Em 2010 Pontes (PONTES, 2010) mostrou que odores produzidos pelas GMs das fêmeas promoviam mudanças comportamentais em insetos machos, principalmente nos mecanismos que mediavam o comportamento sexual, como o início do voo, a orientação anemotática, observada durante a marcha, e o comportamento de agregação durante a cópula. Portanto, é razoável supor que os insetos tratados com *dsOBP27* tenham a capacidade de detecção dos sinais químicos produzidos pelas GMs diminuída. Isso explicaria porque o grupo que expressou menor quantidade de OBP27 permaneceu menos tempo próximo à fêmea (Fig. 26) e, não exibiu o comportamento de cópula como os insetos do grupo controle.

Sabe-se que as OBPs estão diretamente envolvidas na transdução do sinal de feromônios (VOSSHALL & STENSMYR, 2005). *D. melanogaster* mutantes, que não expressam *OBP76a* (conhecida como LUSH) não respondem ao 11-cis-vacenil acetato, um feromônio de agregação produzido pelos insetos machos e que atrai tantos machos quanto fêmeas (XU et al., 2005). Hemípteros apresentam o mesmo padrão. Em *A. lineolatus*, a redução da expressão da OBP4 diminui as respostas eletrofisiológicas aos feromônios sexuais (ZHANG et al., 2016). Nesta espécie, outra OBP, a OBP1, apresenta maior expressão nas antenas de insetos machos e tem alta afinidade de ligação pelos dois componentes putativos de feromônios (GU et al., 2011b).

### 5.3. DOCKING DA OBP27 COM VOLÁTEIS DAS GLÂNDULAS METASTERNAIS

Para confirmar a hipótese da participação da OBP27 na detecção de feromônios produzidos pelas GMs das fêmeas, foi feita uma análise *in silico*. Compostos voláteis emitidos pelas GMs de *R. prolixus* são conhecidos por modular a orientação de machos e aumentar a tentativa de cópula (PONTES et al., 2014). Dos 12 compostos identificados nas GMs, quatro são considerados feromônios sexuais putativos: 2-metil-3-buten-2-ol, (S)-2-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol e (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol (PONTES et al., 2008).

O modelo obtido para a OBP27 (Fig. 27A) foi validado pelos *softwares* PROCHECK e Verify 3D, indicando ser um bom modelo (Fig. 28; Fig. 29). Os valores negativos de energia livre de ligação do *docking* (Fig. 27) indicaram interações favoráveis com os quatro candidatos a ferômonio. Uma análise mais restritiva dos resultados de *docking* mostrou que valores iguais a -4 são esperados quando encontramos ligantes específicos (alta afinidade de ligação) para uma determinada proteína (JAYANTHI et al., 2014). Mesmo usando o critério mais restritivo (valores de -4) para estimar o potencial de ligação, a interação da OBP27 com o 2-metil-3-penten-2-ol e o (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol (Fig. 30), ainda assim atenderam aos critérios de alta afinidade de ligação (Fig. 30). Estes resultados sustentam ainda mais nossa hipótese de que a OBP27 é uma transportadora de semioquímicos derivados de fêmeas, portanto uma proteína ligadora de feromônio (PBP). A maioria dos resíduos do *binding pocket* da OBP27 que interagem com os voláteis da GM são hidrofóbicos. Esses resíduos interagem com moléculas de odor, que são geralmente hidrofóbicas. No entanto, resíduos hidrofílicos também foram identificados no *binding pocket*, e estes podem ser responsáveis pela formação de pontes de hidrogênio com grupos funcionais de alguns ligantes (Fig. 30). Este mesmo padrão também foi observado no *binding pocket* de modelos 3D de OBPs de outros insetos, como a OBP1 de *A. lineolatus* (GU et al., 2011b) e a OBP20 do mosquito *An. gambiae* (ZIEMBA et al., 2012).

OBPs clássicas são caracterizadas pela presença de 6 alfas hélices conectadas por 3 pontes dissulfeto com padrão específico C1-X25-30-C2-X3-C3-X36-42-C4-X8-14-C5-X8-C6 (XU et al., 2003). A OBP27 apresenta 5 cisteínas em sua sequência primária (Fig. 31) e, dessa forma, foi classificada como uma OBP do tipo *Minus C*. Apesar do padrão *Minus C* da OBP27, com 5 alfas hélices e 2 pontes dissulfeto, a funcionalidade não está comprometida. Este padrão se repete em outros insetos. A OBP14 de *A. mellifera*, assim como a OBP27 de *R. prolixus* é caracterizada por fazer apenas duas pontes dissulfeto, ao contrário das três pontes típicas das OBPs clássicas (SPINELLI et al., 2012).

#### 5.4. FOSFOPROTEÔMICA

A análise proteômica dos géis-2DE das antenas de adultos mostrou que as OBPs se repetiam em diferentes *spots*, sugerindo que modificações pós-traducionais poderiam ser responsáveis pela modificação do perfil de migração. Uma possibilidade seria as proteínas estarem presentes nas antenas nas formas fosforiladas e defosforiladas (OLIVEIRA et al., 2017).

Dessa forma, para verificar se as OBPs de *R. prolixus* estariam fosforiladas, foi realizado o mapeamento das fosfoproteínas das antenas. Inicialmente, verificou-se que as proteínas tratadas com fosfatase sofriam mudanças no perfil de migração em gel-2DE. Essa mudança estaria ligada à perda do grupamento fosfato que alteraria os pIs das proteínas, indicando que OBPs de *R. prolixus* estariam fosforiladas (Fig. 32). Para confirmar esta hipótese, foi realizada a identificação de peptídeos fosforilados nas antenas de insetos machos e fêmeas, utilizando eletroforese em gel 2-DE em pH de 4-7 (Fig. 33), seguido de nano LC-MS/MS e identificação dos fosfopeptídeos utilizando Mascot.

Na análise fosfoproteômica foram identificadas diversas proteínas fosforiladas envolvidas no mecanismo de sinalização olfativa de insetos (LEAL, 2012; GUIDOBALDI et al., 2014; SAKURAI et al., 2014). Para entender melhor o papel destas proteínas nas antenas de *R. prolixus*, foi construído um modelo da transdução do sinal olfativo (Fig. 34). Proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal metabotrópicas e ionotrópicas foram identificadas na forma fosforilada e defosforilada (Tabela 3), indicando que assim como ocorre em outras espécies de insetos (WICHER et al., 2011; SAKURAI et al., 2014; SUH et al., 2014), a regulação do processo de olfação está presente nas antenas de *R. prolixus*.

Cinco OBPs e uma CSP com prováveis peptídeos fosforilados (Tabela 2) foram identificadas nas antenas de *R. prolixus*. As OBPs são proteínas transportadoras de moléculas de odor através das sensilas olfativas (PELOSI et al., 2018) (Fig. 34). Quando o complexo odor+OBP atinge a região próxima aos NSOs, a OBP libera o odor e este se liga ao OR específico (BRITO et al., 2016) (Fig. 34). Não existe um consenso sobre o mecanismo de liberação dos odores pelas OBPs. Diferentes hipóteses sugerem que a liberação do odor ocorre por uma mudança de conformação na OBP induzida por uma diminuição do pH, que leva à ejeção do odor por uma  $\alpha$ -hélice ou pela abertura de um "loop" do C-terminal que atua como uma "tampa" na proteína (HORST et al., 2001; XU et al., 2005; WOGULIS et al., 2006; SUH et al., 2014). Outra hipótese sugere o envolvimento do mecanismo de fosforilação-defosforilação para a liberação do odor pelas OBPs.

De fato, OBPs fosforiladas foram identificadas em alguns mamíferos e em um inseto (LEAL & ISHIDA, 2008; NAGNAN-LE MEILLOUR et al., 2009; BRIMAU et al., 2010; RAJKUMAR et al., 2010, 2011; BOUCLON et al., 2017). Na mucosa respiratória de suínos, por exemplo, existe uma OBP e uma proteína envolvida na recepção gustativa (proteína da glândula de Von Ebner, VEG) ambas fosforiladas (NAGNAN-LE MEILLOUR et al., 2009). Na saliva de búfalos foi identificada uma OBP com diferentes modificações como, glicosilação, hidroxilação, ubiquitinação e di-hidroxilação (RAJKUMAR et al., 2010). Além

disso, na glândula prepucial de ratos existem 3 isoformas de OBPs, todas fosforiladas (RAJKUMAR et al., 2011). Estudos sobre a participação de OBPs fosforiladas no processo de reconhecimento de odores em insetos são raros. Em 2008, Leal e Ishida (LEAL & ISHIDA, 2008) isolaram a proteína ligadora de feromônio *GP-9* das antenas da formiga *S. invicta* e identificaram por MS que esta proteína existe na forma fosforilada e defosforilada. Portanto, o presente estudo é o primeiro relato da identificação de modificação pós-traducional em OBPs nas antenas de hemípteros. Embora OBPs fosforiladas tenham sido identificadas em diferentes organismos, ainda não há um modelo do mecanismo de fosforilação para essas proteínas. É possível que o processo de ligação e liberação de odores pelas OBPs nas antenas de *R. prolixus* ocorra pelo mecanismo de fosforilação/defosforilação. Essa hipótese se baseia nos resultados apresentados aqui que relatam a identificação de 5 OBPs e 1 CSP na forma fosforilada (Tabela 2). Estas proteínas existem na hemolinfa sensilar na forma defosforilada (OLIVEIRA et al., 2017). Até o presente, apenas um estudo mostrou que a fosforilação altera as propriedades de ligação das isoformas de OBPs recombinantes de suíno a diferentes ligantes, sugerindo que a especificidade de ligação é determinada por fosforilação (BRIMAU et al., 2010). Diante do universo grande de semioquímicos que participam da ecologia química de *R. prolixus* e do número reduzido de transcritos para OBPs (22%) nas antenas é provável que o mecanismo de fosforilação/defosforilação de OBPs aumente a especificidade e a seletividade dessas proteínas a diferentes moléculas químicas.

As OBPs são sintetizadas por células acessórias e secretadas para a linfa sensilar, ou seja, para o meio extracelular. Portanto, as OBPs não são fosforiladas ou defosforiladas por quinases ou fosfatases citoplasmáticas. Estudos mostram que diversas quinases e fosfatases são expressas no meio extracelular de diferentes tipos celulares de vertebrados, sendo denominadas ecto-quinases e ecto-fosfatases. Essas enzimas fosforilam e defosforilam proteínas na superfície das células e proteínas solúveis presentes nesse meio (PASS & FISHELSON, 1995; NATH et al., 2008). Nas antenas de insetos não há nenhum relato da presença de ecto-quinases e/ou ecto-fosfatases na linfa sensilar. Entretanto, identificamos uma quinase (tyrosine-protein kinase Src64B (RPRC010134-PA)) que possui localização subcelular no meio extracelular ou é secretada para este meio (<https://www.uniprot.org>), que pode estar circulando na hemolinfa sensilar e ser responsável pela fosforilação de OBPs nas antenas de *R. prolixus*. A Src64B co-migrou com cinco OBPs (OBP6, OBP11, OBP12, OBP18 e OBP24) nos géis 2-DE. Além disso, sítios teóricos específicos de fosforilação para a Src64B foram identificados em 3 destas OBPs (OBP11, OBP12 e OBP24), sugerindo a participação desta quinase no processo de fosforilação. Também foram identificadas 3

fosfatases (phosphoserine phosphatase (RPRC003241-PA), prostatic acid phosphatase-like (RPRC012000-PA) e serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform isoform X1 (RPRC007500-PA). A fosfatase prostatic acid phosphatase-like (RPRC012000-PA) possui localização subcelular no meio extracelular ou é secretada (<https://www.uniprot.org>), ou seja, pode estar presente na linfa sensilar. Assim, não descartamos a possibilidade desta fosfatase participar do processo de defosforilação das OBPs na linfa sensilar. A presença de quinases e fosfatases no meio extracelular reforça a hipótese que o processo de fosforilação e defosforilação de OBPs ocorra nas antenas de *R. prolixus* (Fig. 34). Como a fosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina permitem a modificação de determinadas funções das proteínas, as implicações que a fosforilação exerceria sobre as funções das OBPs nas antenas de *R. prolixus* precisam ser melhor investigadas.

Neste trabalho, propomos um possível mecanismo de ação de OBPs de *R. prolixus* por fosforilação/defosforilação (Fig. 34). Tomemos como exemplo a OBP27 que foi encontrada na forma fosforilada e defosforilada. Quando a OBP27 está próxima aos poros da sensila, ela se encontra em um ambiente básico (FAN et al., 2011). OBPs sem o fosfato se encontram na forma básica, como observamos no gel 2-DE (Fig. 32B). Então, a fosfatase prostatic acid phosphatase-like (RPRC012000-PA) estaria defosforilando a OBP27 e levando à ligação da OBP ao odor (Fig. 34).

A membrana do NSO em repouso apresenta-se com carga elétrica positiva do lado externo (voltado para fora da célula) e negativa do lado interno (em contato com o citoplasma da célula), ou seja, está polarizada. Quando um estímulo químico chega ao neurônio, pode ocorrer a alteração da permeabilidade da membrana, permitindo grande entrada de sódio na célula e pequena saída de potássio dela. Com isso, ocorre uma inversão das cargas ao redor dessa membrana, que fica despolarizada gerando um potencial de ação (KRUEGER-BECK et al., 2011). Quando a OBP27 se aproxima da membrana dos NSOs (onde se encontram os ORs), ela encontra um ambiente ácido, pois esta região é descrita como carregada negativamente quando há despolarização da membrana do NSO (KEIL, 1999). Dessa forma, como OBPs estão em um estado ácido quando estão fosforiladas, a tyrosine-protein kinase Src64B (RPRC010134-PA) estaria fosforilando a OBP27 e induzindo a liberação do odor da OBP (Fig. 34).

Existem diferentes hipóteses que tentam explicar como ocorre a transdução do sinal olfativo nas antenas de insetos (SATO et al., 2008; WICHER et al., 2009; GETAHUN et al., 2013). A via ionotrópica (SATO et al., 2008), na qual o complexo heteromérico OR•Orco

forma o canal de cátions ativado pela ligação do odor, parece ocorrer nas antenas de *R. prolixus* (Fig. 34). Dois receptores olfativos foram encontrados na forma fosforilada (OR12 - RPRC000376-PA e OR79 - RPRC000202-PA) (Tabela 3), indicando que a regulação do mecanismo de sinalização olfativa por fosforilação, como encontrado em outras espécies de insetos (MEDLER & BRUCH, 1999; ZUFALL & ZUFALL, 2000; WICHER et al., 2011), está presente em *R. prolixus* (Fig. 34). Estudos mostram que a fosforilação de receptores olfativos estimulados por ligantes é um mecanismo regulador de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e é essencial para finalizar a transdução de sinal (ZUFALL & ZUFALL, 2000). O neurônio olfativo ativado deve retornar para o estado estacionário num processo conhecido como dessensibilização. Os ORs podem ser fosforilados após ligação do odor por proteínas quinases tais como, proteína quinase A (PKA), resultando na dessensibilização de ORs, ou seja, “desligando” a cascata de sinalização (MEDLER & BRUCH, 1999; ZUFALL & ZUFALL, 2000). Em insetos tem sido descrito que a fosforilação do Orco, leva ao aumento da resposta a odores, regulando dessa forma, a sensibilidade do receptor (SARGSYAN et al., 2011; WICHER et al., 2011; GETAHUN et al., 2013, 2016).

O receptor gustativo GR20 (RPRC000451-PA) foi também identificado na forma fosforilada (Tabela 3) nas antenas (Fig. 34). Receptores gustativos também são descritos como GPCRs e são identificados em antenas de alguns insetos, indicando que a antena de *R. prolixus* além da função olfativa, também pode ter função gustativa (MONTELL, 2009; JACQUIN-JOLY et al., 2012).

A via metabotrópica mediada por segundo mensageiro (WICHER et al., 2009; GETAHUN et al., 2013) também é representada na Figura 34. Neste trabalho foram identificadas proteínas fosforiladas envolvidas nas vias metabotrópicas: diacylglycerol kinase eta-like (DAGK, RPRC015094-PA) e calmodulin (RPRC007515-PA) (STENGL & FUNK, 2013) (Tabela 3) (Fig. 34). Nesta via a estimulação do OR por um odor ativa uma proteína G que por sua vez ativa a PLC, que leva a um aumento de inositol trifosfato (IP3) e DAG (diacylglicerol) (Fig. 34). O aumento de IP3 ativa um canal de  $Ca^{2+}$  (STENGL & FUNK, 2013; SAKURAI et al., 2014) (Fig. 34). Um aumento de DAG ativa a PKC, que ativa canais de cálcio (Fig. 34). Foi identificada uma quinase DAGK (diacylglycerol kinase eta-like - RPRC015094-PA) fosforilada. A DAGK atua como reguladora da transdução de sinal reduzindo o nível endógeno de diacylglicerol em uma reação de fosforilação que produz ácido fosfatídico (Fig. 34) (CHOUQUET et al., 2008). Quando a DAGK é fosforilada pela PKC, sua atividade aumenta (YAMAGUCHI et al., 2006). Já a calmodulina é uma proteína regulatória da concentração de cálcio intracelular (Fig. 34). A fosforilação de calmodulina em

resíduos de serina/treonina pela caseína quinase II diminui a sua capacidade para ativar a proteína quinase II dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CAMKII) (SACKS et al., 1995).

Os receptores de potencial transitório (TRPs) são um grupo de canais catiônicos permeáveis a  $\text{Ca}^{2+}$  que funcionam como sensores celulares de vários estímulos internos e externos. Diversos estudos mostram que TRPs são regulados por fosforilação (YAO et al., 2005; VOOLSTRA et al., 2013). Foram identificados 2 TRPs fosforilados nas antenas de *R. prolixus* (transient receptor potential channel pyrexia-like (RPRC001596-PA) e transient receptor potential-gamma (RPRC000350-PA) (Fig. 34), indicando que as antenas são órgãos em que a resposta a diferentes estímulos como temperatura e umidade, também estão ativos e são regulados.

O enriquecimento de fosfopeptídeos é uma técnica muito utilizada para a identificação eficiente de fosfoproteínas. Atualmente, uma das técnicas mais utilizada é baseada na afinidade de fosfopeptídeos com espécies inorgânicas. Nestas técnicas, peptídeos ou proteínas fosforiladas podem ser purificados de misturas explorando a afinidade dos grupos fosfato, que são carregados negativamente, com certas espécies químicas ligadas a matrizes de afinidade sólidas. Esses reagentes de afinidade podem ser usados como a fase sólida de cromatografia líquida (THINGHOLM et al., 2009; BELTRAN & CUTILLAS, 2012).

Dentre estas técnicas se destacam a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (*Immobilized metal affinity chromatography* - IMAC) e a cromatografia de afinidade de óxido de metal (*Metal oxide affinity chromatography* - MOAC). Na IMAC podem ser utilizados diversos metais como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ga}^{2+}$ , porém o mais utilizado e que possui mais afinidade e sensibilidade com fosfopeptídeos é o ferro. Esta técnica possui algumas limitações, como a diminuição da especificidade pela ligação concomitante de grupos carboxilas ao material IMAC levando à co-purificação de peptídeos ácidos juntamente com fosfopeptídeos. Uma solução para este problema é o ajuste do pH. Em matrizes imobilizadas com  $\text{Fe}^{3+}$  o pH deve ser ajustado entre 2.5 e 3.5 (BELTRAN & CUTILLAS, 2012).

Na MOAC a interação é baseada na afinidade do oxigênio no grupo fosfato com os átomos de metal. Dióxido de zircônio ( $\text{ZrO}_2$ ) e dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) podem ser utilizados, sendo o  $\text{TiO}_2$  o mais usado. A MOAC também possui a limitação de diminuição da especificidade pela ligação concomitante de grupos carboxilas. Adição de ácidos orgânicos aos solventes de ligação minimizam a ligação de grupos carboxilas ao  $\text{TiO}_2$ , aumentando a especificidade para fosfopeptídeos. Comparando-se IMAC com MOAC, o MOAC  $\text{TiO}_2$  é mais seletivo e sensível do que IMAC  $\text{Fe}^{3+}$ . Estas técnicas de enriquecimento podem ser feitas

tanto em colunas cromatográficas como também em microcolunas, *tips*, grânulos e nanopartículas (GATES et al., 2010; BELTRAN & CUTILLAS, 2012).

Para refinar os resultados encontrados anteriormente, foi realizado o enriquecimento dos fosfopeptídeos utilizando *tips* contendo TiO<sub>2</sub>. Inicialmente foi utilizada beta-caseína bovina como padrão para otimização da metodologia. A análise permitiu a identificação de 4 peptídeos fosforilados e 10 sítios de fosforilação na caseína (Tabela 4). Seis dos sítios de fosforilação identificados estão de acordo com os sítios descritos na literatura (-RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR.I e K.FQSEEQQTTEDELQDK.I) (BINGHAM et al., 1988; LI et al., 2012). Esta análise indicou que a nossa metodologia era eficiente e poderia ser utilizada para a identificação de fosfopeptídeos nas amostras de antenas de *R. prolixus*.

Entretanto, apenas 7 fosfoproteínas (Tabela 5) foram identificadas nas antenas de insetos machos. Levando-se em consideração que as antenas apresentam toda a maquinaria proteica para a sinalização olfativa, ORs, IRs, OBPs (LEAL, 2012; STENGL & FUNK, 2013) e que *R. prolixus* possui 581 proteínas expressas nas antenas (OLIVEIRA et al., 2017) é difícil acreditar que estes resultados reflitam a real quantidade de fosfoproteínas nas antenas. Em seres humanos, por exemplo, 75% das proteínas podem sofrer fosforilação (OLSEN et al., 2010). Extrapolando essa estimativa para *R. prolixus* poderíamos supor que, pelo menos, 436 proteínas poderiam estar fosforiladas em algum momento nas antenas. Entretanto, a modificação de uma proteína por fosforilação é transitória e, via de regra, a isoforma defosforilada é encontrada em maiores concentrações nas células (BELTRAN & CUTILLAS, 2012). Portanto, a técnica de enriquecimento dos fosfopeptídeos usando *tips* contendo TiO<sub>2</sub>, que funcionou muito bem no caso de uma amostra de caseína purificada, não foi eficiente quando aplicada a uma amostra mais complexa, como as antenas. Muitos fatores podem ter contribuído para a falha na identificação dos fosfopeptídeos, dentre eles, a baixa concentração das isoformas fosforiladas nas antenas deve ser considerada.

De qualquer maneira, apesar da baixa eficiência dos *tips* TiO<sub>2</sub>, as fosfoproteínas identificadas indicam que a técnica pode ser aprimorada. Excetuando-se a identificação de uma proteína sem função caracterizada (Uncharacterized protein (Fragment) - RPRC007967-PA), as demais fosfoproteínas tem papel importante nos órgãos sensoriais e suas funções são reguladas pelo mecanismo de fosforilação.

Dentre as proteínas fosforiladas encontramos uma isoforma de tubulina (tubulin alpha chain (Fragment), RPRC014377-PA). As tubulinas são uma família de proteínas estruturais que formam microtúbulos em organismos eucarióticos. Nos insetos elas fazem parte dos componentes fundamentais do citoesqueleto de dendritos e axônios dos NSOs

(NIELSEN et al., 2010). O processo de fosforilação de tubulinas está envolvido na regulação da estabilidade de microtúbulos e na formação de axônios (SAKAKIBARA et al., 2013). Outra proteína estrutural identificada fosforilada foi a dineína (dynein intermediate chain 3, ciliary-like - RPRC004415-PA). A dineína é uma proteína motora de citoesqueleto envolvida no transporte axonal nos neurônios de insetos (PILLING et al., 2006). A regulação da motilidade das dineínas nas células ocorre por fosforilação (GAO et al., 2015). A chaperonina, dnaJ (dnaJ homolog subfamily C member, 13 - RPRC007871-PA), foi encontrada fosforilada nas antenas. A dnaJ é expressa em uma ampla gama de terminais sinápticos de *D. melanogaster* e sua fosforilação implica na mudança de conformação da proteína (EBERLE et al., 1998; PATEL et al., 2016). Chaperoninas membros da família dnaJ são importantes para a liberação de neurotransmissores nas fendas sinápticas e na prevenção de neuro degenerações (ZINSMAIER, 2010). Uma isoforma de ferritina foi identificada fosforilada, a FerHCH: ferritin HCH - RPRC013830-PA, nas antenas. A ferritina é uma proteína de reserva e transporte de ferro encontrada em abundância nas antenas de *R. prolixus* (OLIVEIRA et al., 2017). As ferritinas de insetos são proteínas secretadas (STRICKLER-DINGLASAN et al., 2006) e envolvidas em diferentes funções, incluindo a defesa imune (GEISER et al., 2015). A maioria das ferritinas de insetos são proteínas grandes (400-600 kDa) apresentando 2 subunidades pesadas (21-36 kDa), frequentemente glicosiladas encontradas no retículo endoplasmático e circulando na hemolinfa. O mecanismo de fosforilação é responsável pela regulação das funções da ferritina (BEAZLEY et al., 2009). A identificação de uma isoforma de ferritina fosforilada nas antenas de *R. prolixus* sugere que essa proteína tenha papel ativo nas antenas. Encontramos também uma proteína ribossomal das mitocôndrias fosforilada, a mRpL11: 39S ribosomal protein L11, mitochondrial - RPRC007804-PA. A fosforilação de proteínas ribossomais está envolvida nos mecanismos de regulação da síntese de proteínas mitocondriais (MILLER et al., 2009). O enriquecimento de fosfopeptídeos também permitiu a identificação de uma subunidade regulatória da fosfatase 6 fosforilada (serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A-like, RPRC004548-PA). Estudos indicam que a fosforilação desta subunidade regula a atividade de fosfatases (KWIEK et al., 2006). Apenas uma OBP, a OBP26 (odorant binding protein 26, RPRC000182-PA), foi identificada no fosfoproteoma, entretanto, na forma não fosforilada. Esta proteína foi identificada na análise por eletroforese em gel 2-DE (Tabela 2) na forma fosforilada. Aparentemente a separação das amostras por gel 2-DE melhora a resolução da identificação de fosfopeptídeos. Os resultados do fosfoproteoma não permitiram confirmar a hipótese da regulação da função das OBPs por fosforilação, ainda assim, a presença de OBPs

fosforiladas nos géis 2-DE não descarta totalmente essa possibilidade. Uma solução para aumentar as chances de encontrar OBPs fosforiladas nas antenas de *R. prolixus* seria a combinação, como sugerido por Herrera e colaboradores (HERRERA et al., 2017), da eletroforese em gel 2-DE, seguida do enriquecimento dos fosfopeptídeos utilizando os *tips* contendo TiO<sub>2</sub>.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo utilizou ferramentas de biologia molecular, proteômica e bioensaio para realizar a caracterização funcional de OBPs, expressas nas antenas do vetor da doença de Chagas, *R. prolixus*, permitindo as seguintes conclusões:

- Identificação do perfil de expressão de 17 *OBPs* em diferentes órgãos de machos e fêmeas adultos, por PCR semiquantitativo e qPCR:
  - Foram identificados 11 *OBPs* classificadas como transportadoras gerais por serem encontradas em diferentes órgãos (*OBP1*, *OBP7*, *OBP11*, *OBP12*, *OBP14*, *OBP18*, *OBP20*, *OBP22*, *OBP23*, *OBP24* e *OBP29*).
  - Foram identificados 6 *OBPs* possivelmente funcionais (*OBP6*, *OBP13*, *OBP17*, *OBP21*, *OBP26* e *OBP27*), devido a presença exclusiva nas antenas.
  - *OBP6* e *OBP13* foram expressos nas antenas de ambos os sexos.
  - *OBP17* e *OBP21* foram mais expressos nas antenas de fêmeas.
  - *OBP26* e *OBP27* foram expressos exclusivamente nas antenas de machos.
  - *OBP6* e *OBP17* foram os genes mais expressos nas antenas de fêmeas e *OBP17* foi o mais expresso nas antenas de machos.
- Silenciamento do *OBP27* por RNA de interferência:
  - Redução de 88% da expressão do gene *OBP27*.
  - O silenciamento do *OBP27* não afetou a sobrevivência dos machos silenciados.
  - O silenciamento do *OBP27* não afetou a ingestão de sangue dos machos silenciados.
  - Os insetos tratados com ds*OBP27* se moveram de forma mais lenta em direção às fêmeas em comparação com os insetos controle (ds*β-gal*).
  - Machos adultos injetados com o ds*OBP27* ficaram 40% menos tempo próximo à fêmea.
  - Os machos tratados com ds*OBP27* não apresentaram o comportamento de tentativa de cópula.

- A proteína OBP27 é funcional nas antenas de machos.
- Predição do modelo 3D e projeção *in silico* da função da OBP27:
  - O modelo 3D teórico da OBP27 foi validado como um bom modelo.
  - A OBP27 possui afinidade por 2 voláteis produzidos pelas glândulas metasternais das fêmeas, o (3E)-2-metil-3-penten-2-ol, e o (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol.
  - Os resíduos de aminoácidos que fazem parte do *binding pocket* da OBP27 que interagem com os voláteis das GMs foram identificados.
- Identificação de proteínas fosforiladas nas antenas de *R. prolixus*:
  - Proteínas de baixo peso molecular das antenas de *R. prolixus* migram para áreas mais básicas do gel 2-DE quando tratadas com fosfatase, indicando que as OBPs podem estar fosforiladas.
  - Foram identificados por eletroforese em gel 2-DE e MS possíveis peptídeos candidatos fosforilados e seus sítios de fosforilação em 5 OBPs e 1 CSP.
  - Foram identificadas 4 fosfatases e 1 quinase.
  - Oito proteínas fosforiladas envolvidas nas vias de transdução de sinal olfativa de insetos foram identificadas.
  - Foi construído um modelo do mecanismo ativo de ligação e de transporte de odores pelas OBPs através de fosforilação e defosforilação.
  - A otimização do enriquecimento de fosfopeptídeos permitiu a identificação de 10 sítios de fosforilação na beta-caseína bovina.
  - O enriquecimento de fosfopeptídeos permitiu a identificação de 7 fosfoproteínas nas antenas de macho de *R. prolixus*, incluindo, tubulina (tubulin alpha chain (Fragment), RPRC014377-PA), dineína (dynein intermediate chain 3, ciliary-like, RPRC004415-PA), dnaJ (dnaJ homolog subfamily C member 13, RPRC007871-PA), ferritina (FerHCH: ferritin HCH, RPRC013830-PA), proteína ribossomal das mitocôndrias (mRpL11: 39S ribosomal protein L11, mitochondrial, RPRC007804-PA), subunidade regulatória da fosfatase 6 (serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A-like, RPRC004548-PA) e proteína não caracterizada (Uncharacterized protein, RPRC007967-PA).
  - Identificação da forma não fosforilada da OBP26 (odorant binding protein 26, RPRC000182-PA).

## 7. REFERÊNCIAS

- ASSUMPCÃO, T.C.; FRANCISCHETTI, I.M.; ANDERSEN, J.F.; SCHWARZ, A.; SANTANA, J.M.; RIBEIRO, J.M. **An insight into the sialome of the bloodsucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease.** *Insect Biochem Mol Biol* 38(2): 213-232, 2008.
- BARRETT, T.V. **Parasites and predators of Triatominae.** Scientific publications. Pan-American Health Organisation 318, 24–30, 1976.
- BARROZO, R.B.; REISENMAN, C.E.; GUERENSTEIN, P.; LAZZARI, C.R.; LORENZO, M.G. **An inside look at the sensory biology of triatomines.** *Journal of Insect Physiology*, 97:3-19, 2017.
- BEAZLEY, K.E; NURMINSKAYA, M.; LINSENMAYER, T.F. **Phosphorylation Regulates the Ferritoid–Ferritin Interaction and Nuclear Transport.** *J Cell Biochem.* 1; 107(3): 528–536, 2009.
- BELTRAN, L.; CUTILLAS, P.R. **Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics.** *Amino Acids* 43, 1009–1024, 2012.
- BENTON, R.; SACHSE, S.; MICHNICK, S.W.; VOSSHALL, L.B. **Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo.** *PLoS Biol.* 4:240–257, 2006.
- BERN, C. **Chagas' Disease.** *New England Journal of Medicine*, 373(5):456, July 30, 2015.
- BIESSMANN, H.; ANDRONOPOULOU, E.; BIESSMANN, M.R.; DOURIS, V.; DIMITRATOS, S.D.; et al. **The *Anopheles gambiae* Odorant Binding Protein 1 (AgamOBP1) Mediates Indole Recognition in the Antennae of Female Mosquitoes.** *PLoS ONE* 5(3): e9471, 2010.
- BIKADI, Z.; HAZAI, E. **Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock.** *J. Cheminform.* 1:15, 2009.
- BINGHAM, E.W.; PARRIS, N.; FARRELL, JR. H.M. **Phosphorylation of/3-Casein and a-Lactalbumin by Casein Kinase from Lactating Bovine Mammary Gland.** *J Dairy Sci* 71:324-336, 1988.
- BOHBOT, J.; VOGT, R.G. **Antennal expressed genes of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti* L.); characterization of odorant-binding protein 10 and takeout.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 961–979, 2005.

BOHMAN, B.; WEINSTEIN, A.M.; UNELIUS, C.R.; LORENZO, M.G. **Attraction of *Rhodnius prolixus* males to a synthetic female-pheromone blend.** Parasites & vectors, 11:418, 2018.

BOUCLON, J.; LE DANVIC, C.; GUETTIER, E.; BRAY, F.; TOKARSKI, C.; ROLANDO, C.; NAGNAN-LE MEILLOUR, P. **Identification of Post-translational Modifications on Odorant-Binding Protein Isoforms from Pig Olfactory Secretome by High-Resolution Mass Spectrometry: O- $\beta$ -N-acetylglucosaminylation and Phosphorylation.** Front. Ecol. Evol. 5:142, 2017.

BRADFORD, M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding.** Anal Biochem 72:248–254.

BRAKS, M.A.H.; MEIJERINK, J.; TAKKEN, W. **The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae* to two components of human sweat, ammonia and l-lactic acid.** Physiol. Entomol.; 26:142–148, 2001.

BREZOLIN, A.N.; MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D.K.; DE CEZARO, A.M.; RIGO, A.A.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; BLASSIOLI-MORAES, M.C.; BORGES, M. **Tools for detecting insect semiochemicals: a review.** Anal Bioanal Chem. 410(17):4091-4108, 2018.

BRIMAU, F.; CORNARD, J.P.; LE DANVIC, C.; LAGANT, P.; VERGOTEN, G.; GREBERT, D.; PAJOT, E.; NAGNAN-LE MEILLOUR, P. **Binding specificity of recombinant odorant-binding protein isoforms is driven by phosphorylation.** J Chem Ecol.; 36(8):801-13, 2010.

BRITO, N.F.; MOREIRA, M.F.; MELO, A.C.A. **A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception.** Journal of Insect Physiology, 2016.

BRUNO, D.W.; LAURENCE, B.R. **Influence of the apical droplet of *Culex pipiens fatigans* (Diptera; Culicidae) egg rafts on oviposition of *Culex pipiens fatigans* (Diptera; Culicidae).** J. Med. Entomol. 16, 300–305, 1979.

BUXTON, P.A. **The biology of a blood sucking bug *Rhodnius prolixus*.** Trans R Entomol Soc Lond. 78: 227-236, 1930.

CAREY, A.F.; CARLSON, J.R. **Insect olfaction from model system to disease control.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108 (32), 12987–12995, 2011.

CATALÁ, S. **The cave organ of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) under scanning electron microscopy.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 89, 275-277, 1994.

CATALÁ, S. **Los patrones de las sensilla.** In: Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatoma. Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, pp. 59–62, 1995.

CHANG, H.; LIU, Y.; YANG, T.; PELOSI, P.; DONG, S.A; WANGB, G. **Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in *Chilo suppressalis***. Sci. Rep. 5, 13093, 2015.

CHEN, X.G.; MATHUR, G.; JAMES, A.A. **Gene expression studies in mosquitoes**. Adv. Genet. 64, 19–50, 2008.

CHOUQUET, B.; BOZZOLAN, F.; SOLVAR, M.; DUPORTETS, L.; JACQUIN-JOLY, E.; LUCAS, P.; DEBERNARD, S. **Molecular cloning and expression patterns of a putative olfactory diacylglycerol kinase from the noctuid moth *Spodoptera littoralis***. Insect Molecular Biology 17 (5), 485–493, 2008.

DANSA-PETRETSKI, M.; RIBEIRO, J.M.; ATELLA, G.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. **Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation**. J. Biol. Chem. 270, 10893–10896, 1995.

DE BRUYNE, M.; BAKER, T.C. **Odor detection in insects: volatile codes**. J. Chem. Ecol. 34, 882–897, 2008.

DE FUENTES-VICENTE J.A.; GUTIÉRREZ-CABRERA A.E.; FLORES-VILLEGAS A.L.; LOWENBERGER C.; BENELLI G.; SALAZAR-SCHETTINO P.M.; CÓRDOBA-AGUILAR A. **What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions**. Acta Tropica, 183:23-31 2018.

DENG, Y.; YAN, H.; GU, J.; XU, J.; WU, K., et al. **Molecular and Functional Characterization of Odorant-Binding Protein Genes in an Invasive Vector Mosquito, *Aedes albopictus***. PLoS ONE 8(7): e68836, 2013.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. **The impact of Chagas disease control in Latin America – a review**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 603–612, 2002.

DONG, K.; SUN, L.; LIU, J.-T.; GU, S.-H.; ZHOU, J.-J.; YANG, R.-N.; ZHANG, Y.-J. **RNAi-Induced Electrophysiological and Behavioral Changes Reveal two Pheromone Binding Proteins of *Helicoverpa armigera* Involved in the Perception of the Main Sex Pheromone Component Z11–16:Ald**. Journal of Chemical Ecology, 43(2), 207–214, 2017.

DU, X.; LI, Y.; XIA, Y.L.; AI, S.M.; LIANG, J.; SANG, P., et al. **Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods**. Int. J. Mol. Sci. 17:E144, 2016.

DUNN, J.D.; REID, G.E.; BRUENING, M.L. **Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry**. Mass Spectrom Rev 29(1):29–54, 2010.

EBERLE, K.K.; ZINSMAIER, K.E.; BUCHNER, S.; GRUHN, M.; JENNI, M.; ARNOLD, C.; LEIBOLD, C.; REISCH, D.; WALTER, N.; HAFEN, E.; HOFBAUER, A.; PFLUGFELDER, G.O.; BUCHNER, E. **Wide distribution of the cysteine string proteins in *Drosophila* tissues revealed by targeted mutagenesis.** *Cell Tissue Res.* 294:203-217, 1998.

EISENBERG, D.; LUTHY, R.; BOWIE, J.U. **VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles.** *Methods Enzymol.* 277, 396–404, 1997.

ESCANDON-VARGAS, K.; MUNOZ-ZULUAGA, C.A.; SALAZAR, L. **Blood-feeding of *Rhodnius prolixus*.** *Biomédica* [online]. vol.37, n.3, 2017.

FAN, J.; FRANCIS, F.; LIU, Y.; CHEN, J.L.; CHENG, D.F. **An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception.** *Genet. Mol. Res.* 10 (4): 3056-3069, 2011.

FÍLA, J.; HONYNS, D. **Enrichment techniques employed in phosphoproteomics.** *Amino Acids*, 43(3):1025-47, 2012.

FIRE, A. **RNA-triggered gene silencing.** *Trends Genet.* 15, 358–363, 1999.

FITZPATRICK, S.; FELICIANGELI M.D.; SANCHEZ-MARTIN, M.J.; MONTEIRO, F.A., MILES, M.A. **Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses.** *PLoS Negl Trop Dis.*, 2(4):e210, 2008.

FORLANI, L.; PEDRINI, N.; JUÁREZ, M.P. **Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*.** *Res. Rep. Trop. Med.* 2, 135–140, 2011.

FORLANI, L.; PEDRINI, N.; GIROTTI, J.R.; MIJAILOVSKY, S.J.; CARDOZO, R.M.; GENTILE, A.G.; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, C.M.; RABINOVICH, J.E.; JUÁREZ, M.P. **Biological Control of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* with the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Combined with an Aggregation Cue: Field, Laboratory and Mathematical Modeling Assessment.** *PLoS Negl Trop Dis.* 13;9(5):e0003778, 2015.

FORÊT, S.; MALESZKA, R. **Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*).** *Genome Research* 16, 1404–1413, 2006.

FRANCO, T.A.; OLIVEIRA, D.S.; MOREIRA, M.F.; LEAL, W.S.; MELO, A.C. **Silencing the odorant receptor co-receptor RproOrco affects the physiology and behavior of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*.** *Insect Biochem Mol Biol.*; 69:82-90, Feb 2016.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil [online]**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6, 2014.

GAO, F.J.; HEBBAR, S.; GAO, X.A.; ALEXANDER, M.; PANDEY, J.P.; WALLA, M.D.; COTHAM, W.E.; KING, S.J.; DEANNA, S. **GSK- 3 $\beta$  Phosphorylation of Cytoplasmic Dynein Reduces Ndel1 Binding to Intermediate Chains and Alters Dynein Motility**. *Traffic.*; 16(9): 941–961, 2015.

GARCIA, E.S.; CASTRO, D.P.; FIGUEIREDO, M.B.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P. **O Sistema Neuroendócrino de Insetos**. In: MOLECULAR, I. N. D. C. E. T. E. E. (Ed.). *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. Rio de Janeiro, v.1, 2012.

GATES, M.B.; TOMER, K.B.; DETERDING, L.J. **Comparison of Metal and Metal Oxide Media for Phosphopeptide Enrichment Prior to Mass Spectrometric Analyses**. *J Am Soc Mass Spectrom*, 21, 1649–1659, 2010.

GEIER, M.; SASS, H.; BOECKH, J. **A search for components in human body odour that attract females of *Aedes aegypti***. *Ciba Found Symp.*; 200:132–144, 1996.

GEISER, D.L.; CONLEY, Z.R.; ELLIOTT, J.L.; MAYO, J.J.; WINZERLING, J.J. **Characterization of *Anopheles gambiae* (African Malaria Mosquito) Ferritin and the Effect of Iron on Intracellular Localization in Mosquito Cells**. *Journal of Insect Science.*;15(1):68, 2015.

GETAHUN, M.N.; OLSSON, S.B.; LAVISTA-LLANOS, S.; HANSSON, B.S.; WICHER, D. **Insect odorant response sensitivity is tuned by metabotropically autoregulated olfactory receptors**. *PLoS One* 8, e58889, 2013.

GETAHUN, M. N.; THOMA, M.; LAVISTA LLANOS, S.; KEESEY, I.; FANDINO, R.A.; KNADEN, M., et al. **Intracellular regulation of the insect chemoreceptor complex impacts odour localization in flying insects**. *Journal of Experimental Biology*, 219, 3428–3438, 2016.

GOMEZ-DIAZ, C.; REINA, J.H.; CAMBILLAU, C.; BENTON, R. **Ligands for pheromone-sensing neurons are not conformationally activated odorant binding proteins**. *PLoS Biol.*; 11:e1001546, 2013.

GONG, D.P.; ZHANG, H.J.; ZHAO, P.; XIA, Q.Y.; XIANG, Z.H. **The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori***. *BMC Genomics*. 10, 332, 2009.

GU, S.H.; WANG, S.P.; ZHANG, X.Y.; WU, K.M.; GUO, Y.Y.; ZHOU, J.J., et al. **Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze)**. *Insect Biochem Mol Biol.*; 41: 254–263, 2011a.

GU, S.H.; WANG, W.X.; WANG, G.R.; ZHANG, X.Y.; GUO, Y.Y.; ZHANG, Z.; et al. **Functional characterization and immunolocalization of odorant binding protein 1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (GOEZE)**. Arch. Insect Biochem. Physiol. 77, 81–99, 2011b.

GU, S-H.; ZHOU, J-J.; GAO, S.; WANG, D-H.; LI, X-C.; GUO, Y-Y.; ZHANG, Y-J. **Identification and comparative expression analysis of odorant binding protein genes in the tobacco cutworm *Spodoptera litura***. Scientific Reports volume 5, Article number: 13800, 2015.

GUERENSTEIN, P.G.; GUERIN, P. **A comparison of volatiles emitted by adults of three triatomine species**. Entomol Exp Appl, 111, 151-155, 2004.

GUERENSTEIN, P.G.; HILDEBRAND, J.G. **Roles and effects of environmental carbon dioxide in insect life**. Ann. Rev. Entomol. 53, 161–178, 2008.

GUERENSTEIN, P.G.; LAZZARI, C.R. **Host-seeking: How triatomines acquire and make use of information to find blood**. Acta Trop 110, 148-158, 2009.

GUHL, F. **Current status of the control of Chagas disease in Colombia**. Medicina (B. Aires).; 59(Suppl.2):103-16, 1999.

GUIDOBALDI, F.; MAY-CONCHA, I.J.; GUERENSTEIN, P.G. **Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects**. Journal of Physiology – Article in press. Paris, 2014.

GUIDOBALDI, F.; GUERENSTEIN, P.G. **Oviposition in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* is modulated by host odors**. Parasite Vector, 8, 265, 2015.

HASHIMOTO, K.; SCHOFIELD, C.J. **Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America**. Parasit Vectors, 5: 45, 2012.

HERRERA, Y.; CONTRERAS, S.; HERNÁNDEZ, M.; ÁLVAREZ, L.; MORA, Y.; ENCARNACIÓN-GUEVARA, S. **Displacers improve the selectivity of phosphopeptide enrichment by metal oxide affinity chromatography**. Bol Med Hosp Infant Mex.; 74(3):200-207, 2017.

HE, X.; TZOTZOS, G.; WOODCOCK, C.; PICKETT, J.A.; HOOPER, T.; FIELD, L.M.; ZHOU, J.J. **Binding of the general odorant binding protein of *Bombyx mori* BmorGOBP2 to the moth sex pheromone components**. Journal of Chemical Ecology 36, 1293–1305, 2010.

HE, P.; ZHANG, J.; LIU, N.-Y.; ZHANG, Y.-N.; YANG, K., et al. **Distinct Expression Profiles and Different Functions of Odorant Binding Proteins in *Nilaparvata lugens* Sta<sup>o</sup>**. PLoS ONE 6(12): e28921, 2011.

HORST, R.; DAMBERGER, F.; LUGINBUHL, P.; GUNTERT, P.; PENG, G.; NIKONOVA, L.; LEAL, W.S.; WUTHRICH, K. **NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14374–14379, 2001.

HULL, J.J.; PERERA, O.P.; SNODGRASS, G.L. **Cloning and expression profiling of odorant-binding proteins in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris***. Insect Mol. Biol. 23, 78–97, 2014.

ISHIDA, Y.; LEAL, W.S. **Rapid inactivation of a moth pheromone**. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 14075–14079, 2005.

ISHIDA, Y.; TSUCHIYA, W.; FUJII, T.; FUJIMOTO, Z.; MIYAZAWA, M.; ISHIBASHI, J.; et al. **Niemann-Pick type C2 protein mediating chemical communication in the worker ant**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 3847–3852, 2014.

JACQUIN-JOLY, E.; LEGEAI, F.; MONTAGNÉ, N.; MONSEMPES, C.; FRANÇOIS, M.C.; POULAIN, J.; GAVORY, F.; WALKER III, W.B.; HANSSON, B.S.; LARSSON, M.C. **Candidate chemosensory Genes in Female Antennae of the Noctuid Moth *Spodoptera littoralis***. Int J Biol Sci; 8(7):1036–1050, 2012.

JAYANTHI, K.P.; KEMPRAJ, V.; AURADE, R.M.; ROY, T.K.; SHIVASHANKARA, K.S.; VERGHESE, A. **Computational reverse chemical ecology: virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis***. BMC Genomics 15:209, 2014.

JEONG, Y.T.; SHIM, J.; OH, S.R.; YOON, H.I.; KIM, C.H.; MOON, S.J., et al. **An odorant-binding protein required for suppression of sweet taste by bitter chemicals**. Neuron.; 79: 725–737, 2013.

KAISSLING, K.-E.; KASANG, G. **A new pheromone of the silkworm moth *Bombyx mori***. Naturwissenschaften 65, 382–384, 1978.

KÄLIN, M.; BARRETT, F.M. **Observations on the anatomy, histology, release-site, and function of Brindley's glands in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus***. Ann Entomol Soc Am, 68, 126–134, 1975.

KEIL, T.A. **Morphology and development of the peripheral olfactory organs**. In: Hansson, B.S. (Ed.), Insect Olfaction. Springer, Berlin, pp. 5–47, 1999.

KELLEY, L.A.; MEZULIS, S.; YATES, C.M.; WASS, M.N.; STERNBERG, M.J. **The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.** Nat. Protoc. 10, 845–858, 2015.

KIM, S.; THIESSEN, P.A.; BOLTON, E.E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A., et al. **PubChem substance and compound databases.** Nucleic Acids Res. 4, D1202–D1213, 2016.

KITABAYASHI, A.N.; ARAI, T.; KUBO, T.; NATORI, S. **Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach).** Insect Biochem Mol Biol 28, 785-790, 1998.

KNOLS, B.G.J.; VAN LOON, J.J.A.; CORK, A.; ROBINSON, R.D.; ADAM, W.; MEIJERINK, J.; DE JONG, R.; TAKKEN, W. **Behavioral and electrophysiological responses of the female malaria mosquito *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: culicidae) to Limburger cheese volatiles.** Bull. Entomol. Res.; 87:151–159, 1997.

KRUEGER-BECK, E.; Scheeren, E.M.; Nogueira-Neto, G.N.; Button, V.L.S.N.; Neves, E.B.; Nohama, P. **Potencial de ação: do estímulo à adaptação neural.** Fisioter. mov. (Impr.) [online]. vol.24, n.3, pp.535-547. ISSN 1980-5918, 2011.

KWIEK, N.C.; THACKER, D.F.; DATTO, M.B.; MEGOSH, H.B.; HAYSTEAD, T.A.J. **PITK, a PP1 targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP K.** Cellular Signalling 18, 1769–1778, 2006.

LASKOWSKI, R.A.; RULLMANN, J.A.; MACARTHUR, M.W.; KAPTEIN, R.; THORNTON, J.M. **AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR.** J. Biomol. NMR 8, 477–486, 1996.

LAUGHLIN, J.D.; HA, T.S.; JONES, D.N.; SMITH D.P. **Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein.** Cell.; 133:1255–1265, 2008.

LAURENCE, B.R.; PICKETT, J.A. **Erythro-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the major component of a mosquito oviposition attractant pheromone.** J. Chem. Soc., Chem. Commun., 59–60, 1982.

LAZZARI, C.R.; LORENZO, M.G. **Exploiting triatomine behaviour: alternative perspectives for their control.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 65-70, 2009.

LEAL, W.; SHI, X.; LIANG, D.; SCHAL, C.; MEINWALD, J.S. **Application of chiral gas chromatography with electroantennographic detection to the determination of the stereochemistry of a cockroach sex pheromone.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1995.

LEAL, W.S. **Pheromone reception.** Top Curr Chem 240: 1-36, 2005.

LEAL, W.S. **Molecular-Based Chemical Propecting of Mosquito Attractants and Repellents.** In: Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses, edited by M. Debboun; S.P. Frances and D. Strickman, p. 229-44, CRC Press, 2006.

LEAL, W.S.; ISHIDA, Y. **GP-9s Are Ubiquitous Proteins Unlikely Involved in Olfactory Mediation of Social Organization in the Red Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta*.** PLoS ONE 3(11): e3762, 2008.

LEAL, W. S. **Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes.** Annu Rev Entomol, v. 58, p. 373-91, 2012.

LEAL, H.M.; HWANG, J.K.; TAN, K.; LEAL, W.S. **Attraction of *Culex* mosquitoes to aldehydes from human emanations.** Scientific Reports volume 7, Article number: 17965, 2017.

LEITNER, A.; STURM, M.; LINDNER, W. **Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review.** Anal Chim Acta 703:19–30, 2011.

LI, S-S.; WANG, J-Q., WEI, H-Y.; YANG, Y-X.; BU, D-P.; ZHANG, L-Y.; ZHOU, L-Y. **Identification of Bovine Casein Phosphorylation Using Titanium Dioxide Enrichment in Combination with Nano Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry.** Journal of Integrative Agriculture, 11(3): 439-445, 2012.

LI, J.; ZHANG, L.; WANG, X. **An odorant-binding protein involved in perception of host plant odorants in locust *Locusta migratoria*.** Arch Insect Biochem Physiol.; 91(4):221-9, Apr 2016.

LIU, Y.; CHANCE, M.R. **Integrating phosphoproteomics in systems biology.** Comput Struct Biotechnol J. Jul; 10(17): 90–97, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** Methods, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LORENZO FIGUEIRAS, A.N.; LAZZARI, C.R. **Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor.** Physiol Entomol 23: 33-37, 1998.

LORENZO FIGUEIRAS, A.N.; LAZZARI C. **Aggregation behaviour and interspecific responses in *Rhodnius prolixus*.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 97: 569-571, 2002.

LORENZO, M.G.; MELO, A.C.A. **Olfação e Comportamento**. In: MOLECULAR, I. N. D. C. E. T. E. E. (Ed.). *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. Rio de Janeiro, v.1, 2012.

LUZ, C.; SILVA, I.; MAGALHÃES, B.; CORDEIRO, C.T.; TIGANO, M. **Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: preliminary assays on formulation and application in the field**. *An. Soc. Entomol. Bras.* 28, 101–110, 1999.

LUZ, C.; ROCHA, L.F.N.; NERY, G.V.; MAGALHÃES, B.P.; TIGANO, M.S. **Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 211–218, 2004.

MAJEROWICZ, D. et al. **Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)**. *Insect Mol Biol*, v. 20, n. 6, p. 713-22, 2011.

MANOHARAN, M.; FUCHS, P.F.; SOWDHAMINI, R.; OFFMANN, B. **Insights on pH-dependent conformational changes of mosquito odorant binding proteins by molecular dynamics simulations**. *J Biomol Struct Dyn*; 32(11):1742-51, 2014.

MANRIQUE, G.; VITTA, A.C.; FERREIRA, R.A.; ZANI, C.L.; UNELIUS, C.R.; LAZZARI, C.R.; DIOTAIUTI, L.; LORENZO, M.G. **Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity, and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults**. *J Chem Ecol*, 32, 2035-2052, 2006.

MANSUR, J.F.; ALVARENGA, E.S.; FIGUEIRA-MANSUR, J.; FRANCO, T.A.; RAMOS, I.B.; MASUDA, H.; MELO, A.C.; MOREIRA, M.F. **Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus***. *Insect Biochem Mol Biol.*; 51:110-21, 2014.

MAO, A.; ZHOU, J.; BIN MAO; ZHENG, Y.; WANG, Y.; LI, D.; AI, H. **Sex pheromone recognition and characterization of three pheromone-binding proteins in the legume pod borer, *Maruca vitrata* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae)**. *Scientific Reports*, 6, 34484, 2016.

MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LÜHRMANN, R.; TUSCHL, T. **Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi**. *Cell*. 6;110(5):563-74, 2002.

MAY-CONCHA, I.; ROJAS, J.C.; CRUZ-LOPEZ, L.; MILLAR, J.G.; RAMSEY, J.M. **Volatile compounds emitted by *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioural evaluation**. *Med. Vet. Entomol.* 27, 165–174, 2013.

MAY-CONCHA, I.J.; GUERENSTEIN, P.G.; RAMSEY, J.M.; ROJAS-LEÓN, J.; CATALÁ, S. **Differences in the antennal phenotype of three Mexican haplogroups of the *Triatoma dimidiata* complex, vectors of Chagas disease.** *Infect Gen Evol*, 40, 73–79, 2016.

MBOERA, L.E.; TAKKEN, W.; SAMBU, E.Z. **The response of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: culicidae) to traps baited with carbon dioxide, 1-octen-3-ol, acetone, butyric acid and human foot odour in Tanzania.** *Bull. Entomol. Res.*; 90:155–159, 2000.

MEDLER, K.F.; BRUCH, R.C. **Protein kinase Cbeta and delta selectively phosphorylate odorant and metabotropic glutamate receptors.** *Chem Senses*. 1999 Jun;24(3):295-9.

MESQUITA, R.D.; VIONETTE-AMARAL, R.J.; LOWENBERGER, C.; RIVERA-POMAR, R.; MONTEIRO, F.A.; MINX, P., et al. **Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A*; 113(10): E1415–E1416, 2015.

MILLER, J.L.; CIMEN, H.; KOC, H.; KOC, E.C. **Phosphorylated proteins of the mammalian mitochondrial ribosome: implications in protein synthesis.** *J Proteome Res.*; 8(10): 4789–4798, 2009.

MINUZZI-SOUZA, T.T.C.; NITZ, N.; KNOX, M.B.; REIS, F.; HAGSTROM, L.; AUGUSTO CUBA CUBA, C.; Hecht, M.M.; GURGEL-GONÇALVES, R. **Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo.** *Parasites & Vectors*, v. 9, p. 1-6, 2016.

MONTELL, C. **A Taste of the *Drosophila* Gustatory Receptors.** *Curr Opin Neurobiol*. August ; 19(4): 345–353, 2009.

MOTA, T.; VITTA, A.C.; LORENZO FIGUEIRAS, A.N.; BAREZANI, C.P.; ZANI, C.L.; LAZZARI, C.R.; DIOTAIUTI, L.; JEFFARES, L.; BOHMAN, B.; LORENZO, M.G. **A multi-species bait for chagas disease vectors.** *PLoS Neglect Trop D*, 8, e2677, 2014.

MOUGABURE-CUETO, G.; PICOLLO, M.I. **Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management.** *Acta Tropica*, 149, (70), (2015).

NAGNAN-LE MEILLOUR, P.; LE DANVIC, C.; BRIMAU, F.; CHEMINEAU, P.; MICHALSKI, J.C. **Phosphorylation of native porcine olfactory binding proteins.** *J Chem Ecol.*;35(7):752-60, 2009.

NAVARRO-SILVA, M.A.; MARQUES, F.A.; DUQUE, J.E. **Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae.** *Rev. Bras. Entomol.* 53, 1–6, 2009.

NAKAGAWA, T.; SAKURAI, T.; NISHIOKA, T.; TOUHARA, K. **Insect sex- pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors.** *Science* 307, 1638–1642, 2005.

NATH, D.; MAITIB, A.; MAJUMDER, G.C. **Cell surface phosphorylation by a novel ecto-protein kinase: A key regulator of cellular functions in spermatozoa.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 153–165, 2008.

NICHOLS, Z.; VOGT, R.G. **The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum*.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1658 38, 398–415, 2008.

NIELSEN, M.G.; GADAGKAR, S.R.; GUTZWILLER, L. **Tubulin evolution in insects: gene duplication and subfunctionalization provide specialized isoforms in a functionally constrained gene family.** *BMC Evolutionary Biology*, 10:113, 2010.

NUNES-DA-FONSECA, R.; BERNI, M.; TOBIAS-SANTOS, V.; PANE, A.; ARAUJO, H.M. ***Rhodnius prolixus*: From classical physiology to modern developmental biology.** *Genesis*. 2017 May;55(5). Epub 2017.

OLIVEIRA, P.L.; KAWOOYA, J.; RIBEIRO, J.M.C.; MEYER, T.; POORMAM, R.; ALVES, E.W.; WALKER, F.A.; MACHADO, E.A.; NUSSENZVEIG, R.H.; PADOVAN, G.J.; MASUDA, H. **A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*.** *J Biol Chem* 270:10897–10901, 1995.

OLIVEIRA, D.S. **Caracterização de proteínas solúveis envolvidas na olfação de *Rhodnius prolixus*.** Dissertação IQ-UFRJ. Rio de Janeiro, 2014.

OLIVEIRA, D.S.; BRITO, N.F.; NOGUEIRA, F.C.S.; MOREIRA, M.F.; LEAL, W.S.; SOARES, M.R., MELO; A.C.A. **Proteomic analysis of the kissing bug *Rhodnius prolixus* antenna.** *J Insect Physiol* 100, 108-118, 2017.

OLSEN, J.V.; VERMEULEN, M.; SANTAMARIA, A.; KUMAR, C.; MILLER, M.L.; JENSEN, L.J.; GNAD, F.; COX, J.; JENSEN, T.S.; NIGG, E.A.; BRUNAK, S.; MANN, M. **Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis.** *Sci Signal.* 12;3(104):ra3, 2010.

OTALORA-LUNA, F.; PERRET, J.L.; GUERIN, P.M. **Appetence behaviours of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* on a servosphere in response to the host metabolites carbon dioxide and ammonia.** *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 190, 847–854, 2004.

OTALORA-LUNA, F. **Triatominae morfologia.** Disponível em: <http://triatominae.tripod.com/morfologia.htm>. 2005.

OTALORA-LUNA, F. **Triatominae morfología.** Disponible em: <http://triatominae.tripod.com/morfologia.htm>. 2007.

PAAS, Y.; Z. FISHELSON. **Shedding of tyrosine and serine/threonine ecto-protein kinases from human leukemic cells.** Archives of Biochemistry and Biophysics 316: 780-788, 1995.

PATEL, P.; PRESCOTT, G.R.; BURGOYNE, R.D.; LIAN, L-Y.; MORGAN, A. **Phosphorylation of Cysteine String Protein Triggers a Major Conformational Switch.** Structure 24, 1380–1386, 2016.

PATTENDEN, G.; STADDON, B.W. **Identification of isobutyric acid from Brindley's gland in *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae).** Ann Entomol Soc Am, 65, 1240-1241, 1972.

PEDRINI, N.; MIJAILOVSKY, S.J.; GIROTTI, J.R.; STARIOLO, R.; CARDOZO, R.M.; GENTILE, A.; JUÁREZ, M.P. **Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi.** PloS Negl. Trop. Dis. 3, e434, 2009.

PELOSI, P.; ZHOU, J.J.; BAN, L.P.; CALVELLO, M. **Soluble proteins in insect chemical communication.** Cell Mol Life Sci, v. 63, n. 14, p. 1658-76, Jul 2006.

PELOSI, P.; IOVINELLA, I.; FELICOLI, A.; DANI, F.R. **Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods.** Front Physiol. 5:320, 2014.

PELOSI, P.; IOVINELLA, I.; ZHU, J.; WANG, G.; DANI, F.R. **Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects Biol. Rev., pp. 000–000. 1, 2018.**

PELLETIER, J.; GUIDOLIN, A.; SYED, Z.; CORNEL, A.J.; LEAL, W.S. **Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants.** J Chem Ecol 36:245–248, 2010.

PEREZ, C.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. **Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health.** Trends in Parasitology, Vol. 31, No. 11, 2015.

PILLING, A.D.; HORIUCHI, D.; LIVELY, C.M.; SAXTON, W.M. **Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons.** Mol Biol Cell 17, 2057-2068, 2006.

PONTES, G.B.; BOHMAN, B.; UNELIUS, C.R.; LORENZO, M.G. **Metasternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug. *Rhodnius prolixus*.** J. Chem. Ecol. 34, 450–457, 2008.

PONTES, G.B. **Comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae)**. Tese CPqRR-Fiocruz. Belo Horizonte, 2010.

PONTES, G.; ZACHARIAS, C.A.; MANRIQUE, G.; LORENZO, M.G. **Female odours promote the activation of sheltered kissing bug *Rhodnius prolixus* males and modulate their orientation**. *Med. Vet. Entomol.* 28, 257–263, 2014.

RAJKUMAR, R.; KARTHIKEYAN, K.; ARCHUNAN, G.; HUANG, P.H.; CHEN, Y.W. **Using mass spectrometry to detect buffalo salivary odorant-binding protein and its post-translational modifications**. *Rapid Commun Mass Spectrum* 24: 3248-3254, 2010.

RAJKUMAR, R.; ILAYARAJA, R.; ALAGENDRAN, S.; ARCHUNAN, G.; MURALIDHARAN, A.R.; et al. **Characterization of Rat Odorant Binding Protein Variants and its Post-Translational Modifications (PTMs): LC-MS/MS analyses of Protein Eluted from 2D-Polyacrylamide Gel Electrophoresis**. *J Proteomics Bioinform* 4: 210-217, 2011.

REBIJITH, K.B.; ASOKAN, R.; HANDE, H.R.; KUMAR, N.K.; KRISHNA, V.; VINUTHA, J., et al. **RNA interference of odorant-binding protein 2 (OBP2) of the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Glover), resulted in altered electrophysiological responses**. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178, 251–266, 2016.

RIBEIRO, J.M.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M.A.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; VALENZUELA, J.G. **Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus***. *Insect Biochem Mol Biol.* 34(1):61–79, 2004.

RIBEIRO, J.M.C.; GENTA, F.A.; SORGINE, M.H.F.; LOGULLO, R.; MESQUITA R.D.; PAIVA-SILVA, G.O., et al. **An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus***. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1): e2594, 2014.

RODRIGUEZ-SAONA, C.; STELINSKI, L.L. **Behavior-modifying strategies in IPM. Integrated Pest Management: Innovation – Development Process Theory and Practice** (ed. by R Peshin & AK Dhawan), pp. 261–311. Springer, New York, NY, USA, 2009.

SACKS, D.B.; MAZUS, B.; JOYAL, J.L. **The activity of calmodulin is altered by phosphorylation: modulation of calmodulin function by the site of phosphate incorporation**. *Biochem J.*; 312(Pt 1):197–204, 1995.

SANCHEZ-GRACIA, A.; VIEIRA, F.G.; ROZAS, J. **Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects**. *Heredity* 103, 208–216, 2009.

SAKAKIBARA, A.; ANDO, R.; SAPIR, T.; TANAKA, T. **Microtubule dynamics in neuronal morphogenesis**. *Open Biol.*; 3(7): 130061, 2013.

SAKURAI, T.; NAMIKI, S.; KANZAKI, R. **Molecular and neural mechanisms of sex pheromone reception and processing in the silkworm *Bombyx mori***. *Front. Physiol.* 5, 1–20, 2014.

SANTIAGO, P.B.; ASSUMPÇÃO, T.C.F.; ARAÚJO, C.ND.; BASTOS, I.M.D.; NEVES, D.; SILVA, I.GD., et al. **A Deep Insight into the Sialome of *Rhodnius neglectus*, a Vector of Chagas Disease**. *PLoS Negl Trop Dis* 10 (4): e0004581, 2016.

SARGSYAN, V.; GETAHUN, M.N.; LAVISTA LLANOS, S.; OLSSON, S.B.; HANSSON, B.S., et al. **Phosphorylation via PKC regulates the function of the *Drosophila* odorant coreceptor**. *Front Cell Neurosci* 5: 5, 2011.

SATO, K.; PELLEGRINO, M.; NAKAGAWA, T.; NAKAGAWA, T.; VOSHALL, L.B.; TOUHARA, K. **Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels**. *Nature* 452, 1002–1007, 2008.

SCHILMAN, P.E.; NÚÑEZ, J.; LAZZARI, C.R. **Attributes of oviposition substrates affect fecundity in *Rhodnius prolixus***. *J Insect Physiol*, 42, 837-841, 1996.

SCHOFIELD, C.J.; PATTERSON, J.W. **Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae)**. *J Med Entomol*, 13: 727-734, 1977.

SCHOFIELD, C.J. **The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A review**. *Bull Entomol Res*, 69:363-379, 1979.

SCHULTZE, A.; SCHYMURA, D.; FORSTNER, M.; KRIEGER, J. **Expression pattern of a 'Plus-C' class odorant binding protein in the antenna of the malaria vector *Anopheles gambiae***. *Insect Mol. Biol.* 21, 187–195, 2012.

SECCADIO, L.L. **Fatores de possível influência comportamental em triatomíneos durante a pós-colheita de frutos da palmeira *Euterpe oleracea***. Dissertação - Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará. BELÉM, 2013.

SHANBHAG, S.R.; PARK, S.K.; PIKIELNY, C.W.; STEINBRECHT, R.A. **Gustatory organs of *Drosophila melanogaster*: fine structure and expression of the putative odorant-binding protein PBPRP2**. *Cell Tissue Res.*; 304: 423–437, 2001.

SHORTER, J.R.; DEMBECK, L.M.; EVERETT, L.J.; MOROZOVA, T.V.; ARYA, G.H.; TURLAPATI, L.; ST ARMOUR, G.E.; SCHAL, C.; MACKAY, T.F.; ANHOLT, R.R. **Obp56h Modulates Mating Behavior in *Drosophila melanogaster***. *G3 (Bethesda)*. 13;6(10):3335-3342, Oct 2016.

SILVEIRA, A.C. **Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas**. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 16(Sup. 2):35-42, 2000.

SMART, R.; KIELY, A.; BEALE, M.; VARGAS, E.; CARRAHER, C.; KRALICEK, A.V., et al. ***Drosophila* odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins.** *InsectBiochem.Mol. Biol.* 38, 770–780, 2008.

SOLARI, F.A.; DELL'AICA, M.; SICKMANN, A.; ZAHEDI, R.P. **Why phosphoproteomics is still a challenge.** *Mol Biosyst.* Jun;11(6):1487-93, 2015.

SPARKS, J.T.; BOHBOT, J.D.; DICKENS, J.C. **Chapter Four-Olfactory Disruption: Toward Controlling Important Insect Vectors of Disease.** In: *Progress in molecular biology and translational science.* Elsevier, 130, 81-108, 2015.

SPINELLI, S.; LAGARDE, A.; IOVINELLA, I.; LEGRAND, P.; TEGONI, M.; PELOSI, P.; CAMBILLAU, C. **Crystal structure of *Apis mellifera* OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules.** *Insect Biochem Mol Biol.*; 42(1):41-50, 2012.

STENGL, M.; FUNK, N.W. **The role of the coreceptor ORCO in insect olfactory transduction.** *J. Comp. Physiol. A.* 199, 897–909, 2013.

STRICKLER-DINGLASAN, P.M.; GUZ, N.; ATTARDO, G.; AKSOY, S. **Molecular characterization of iron binding proteins from *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae).** *Insect Biochem Molec* 36: 921–933, 2006.

SUH, E.; BOHBOT, J.D.; ZWIEBEL, L.J. **Peripheral olfactory signaling in insects.** *Current Opinion in Insect Science*, 6:86–92, 2014.

SULLIVAN, G.A.; LIU, C.; SYED, Z. **Oviposition signals and their neuroethological correlates in the *Culex pipiens* complex.** *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 735–743, 2014.

SUN, Y-L; HUANG, L-Q; PELOSI, P.; WANG, C-Z. **A Lysine at the C-Terminus of an Odorant-Binding Protein is Involved in Binding Aldehyde Pheromone Components in Two *Helicoverpa* Species.** *PLoS ONE* 8(1): e55132, 2013.

SUN, L.; XIAO, H. J.; GU, S.H.; ZHOU, J.J.; GUO, Y.Y.; LIU, Z.W., et al. **The antenna-specific odorant-binding protein AlinOBP13 of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* is expressed specifically in basiconic sensilla and has high binding affinity to terpenoids.** *Insect Mol. Biol.* 23, 417–434, 2014.

SWARUP, S.; WILLIAMS, T.I.; ANHOLT, R.R. **Functional dissection of Odorant binding protein genes in *Drosophila melanogaster*.** *Genes Brain Behav* 10: 648–657, 2011.

TEIXEIRA, D.E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P.H.; DE SOUZA, W. **Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease.** PLoS Negl Trop Dis 6(8): e1749, 2012.

TICHY, A.; SALOVSKA, B.; REHULKA, P.; KLIMENTOVA, J.; VAVROVA, J.; STULIK, J.; HERNYCHOVA, L. **Phosphoproteomics: searching for a needle in a haystack.** J Proteomics. Nov 18;74(12):2786-97, 2011.

THINGHOLM, T.E.; JENSEN, O.N.; LARSEN, M.R. **Analytical strategies for phosphoproteomics.** Proteomics, 9, 1451–1468, 2009.

THOMAZINI, M. J. **A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas.** In: GONCALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. de (Ed.). Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2009. cap. 17, p. 338-354.

TOMBERLIN, J.K.; CRIPPEN, T.L.; WU, G.; GRIFFIN, A.S.; WOOD, T.K.; KILNER, R. M. **Indole: an evolutionarily conserved influencer of behavior across kingdoms.** Bioessays 39:1600203, 2016.

TREMATERRA, P. **Integrated Pest Management of stored-product insects: practical utilization of pheromones.** Anzeiger Für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz, 70(3), 41–44, 1997.

VALENTE, S.A.; VALENTE, V.C.; PINTO, A.Y. **Epidemiologia e transmissão oral da doença de Chagas na Amazônia brasileira.** In: Informe de la consulta técnica em epidemiologia, prevencion y manejo de la transmision de la enfermedad de chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA). Washington: Organizacion Panamericana de La Salud/Organizacion Mundial de La Salud; p. 21–6, 2006.

VALENTE, S.A.; VALENTE, V.C.; FRAIHA NETO, H. **Transmissão da doença de Chagas: como estamos?** Rev Soc Bras Med Trop; 32(Suppl II):51–5 10, 1999.

VALLE, D., LIMA GOMES, J., GOLDENBERG, S., & GARCIA, E. ***Rhodnius prolixus* vitellogenesis: Dependence upon a blood source.** Journal of Insect Physiology, 33, 249–254, 1987.

VIEIRA, F.G.; FORÊT, S.; HE, X.; ROZAS, J.; FIELD, L.M.; ZHOU, J.-J. **Unique Features of Odorant-Binding Proteins of the Parasitoid Wasp *Nasonia vitripennis* Revealed by Genome Annotation and Comparative Analyses.** PLoS ONE 7(8): e43034, 2012.

VITTA, A.C.R.; FIGUEIRAS, N.A.; LAZZARI, C.R.; DIOTAIUTI, L.; LORENZO, M.G. **Aggregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector.** Mem Inst Oswaldo Cruz; 97: 865-867, 2002.

VITTA, A.C.R. **Comportamento Sexual de *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae: Triatominae)**. Tese CPqRR-Fiocruz. Belo Horizonte, 2009.

VITTA, A.C.; BOHMAN, B.; UNELIUS, C.R.; LORENZO, M.G. **Behavioral and electrophysiological responses of *Triatoma brasiliensis* males to volatiles produced in the metasternal glands of females**. J Chem Ecol 35, 1212-1221, 2009.

VOGT, R.G.; RIDDIFORD, L.M. **Pheromone binding and inactivation by moth antennae**. Nature. 293:161–163, 1981.

VOOLSTRA, O.; BARTELS, J-P.; OBEREGELSBACHER, C.; PFANNSTIEL, J.; HUBER. A. **Phosphorylation of the *Drosophila* Transient Receptor Potential Ion Channel Is Regulated by the Phototransduction Cascade and Involves Several Protein Kinases and Phosphatases**. PLoS ONE 8(9): e73787, 2013.

VOSSHALL, L.B.; STENSMYR, M.C. **Wake Up and Smell the Pheromones**. Neuron, volume 45, issue 2, P179-181, 2005.

WARD, J.P. **A comparison of the behavioural responses of the haematophagous bug, *Triatoma infestans*, to synthetic homologues of two naturally occurring chemicals (n- and iso-butyric acid)**. Physiol Entomol, 6, 325-329, 1981.

WHEELER, D.E. **Reproduction, Female: Hormonal Control of**. In Encyclopedia of Insects (Second Edition), 882-885, 2009.

WICHER, D.; SCHÄFER, R.; BAUERNFEIND, R.; STENSMYR, M.C.; HELLER, R.; HEINEMANN, H.; HANSSON, B.S. ***Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclicnucleotide-activated cation channels**. Nature 452, 1007–1012., 2008.

WICHER, D.; SCHAFFER, R.; BAUERNFEIND, R.; STENSMYR, M.C.; HELLER, R.; HEINEMANN, S.H.; HANSSON, B.S. **dOr83b - receptor or ion channel?** Ann N Y Acad Sci 1170, 164-167, 2009.

WICHER, D.; HANSSON, B.S.; OLSSON, S.B.; LLANOS, S.L.; GETAHUN, M.N.; SARGSYAN, V. **Phosphorylation via PKC regulates the function of the *Drosophila* odorant co-receptor**. Front.Cell.Neurosci. 5:5, 2011.

WICHER, D. **Olfactory signaling in insects**. Prog Mol Biol Transl Sci., 2014.

WIGGLESWORTH, V.; GILLETT, J. **The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host**. J Exp Biol, 11, 120-139, 1934.

WHO - World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis) - fact sheet** (Updated in February 2018). Wkly Epidemiol Rec 340, 2018.

WOGULIS, M.; MORGAN, T.; ISHIDA, Y.; LEAL, W.S.; WILSON, D.K. **The crystal structure of an odorant binding protein from *Anopheles gambiae*: Evidence for a common ligand release mechanism.** Biochemical and Biophysical Research Communications 339, 157–164, 2006.

WOJTASEK, H.; LEAL, W.S. **Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes.** J Biol Chem.; 274:30950–30956, 1999.

WYATT, T.D. **“Introduction to chemical signaling in vertebrates and invertebrates,”** in Neurobiology of Chemical Communication, ed. C. Mucignat-Caretta (Baton Rouge: CRC Press), 2014.

XU, P.X.; ZWIEBEL, L.J.; SMITH D.P. **Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*.** Insect Mol Biol.; 12(6):549-60, 2003.

XU, P.; ATKINSON, R.; JONES, D.N.; SMITH, D.P. ***Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons.** Neuron.; 45:193–200, 2005.

XU, P.; CHOO, Y-M.; DE LA ROSA, A.; LEAL, W.S. **Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate.** Proc Natl Acad Sci U S A. 18;111(46):16592-7, Nov 2014.

XUE, Y.; REN, J.; GAO, X.; JIN, C.; WEN, L.; YAO, X. **GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy.** Mol Cell Proteomics. 7: 1598-1608, 2008.

XUE, W.; FAN, J.; ZHANG, Y.; XU, Q.; HAN, Z.; SUN, J., et al. **Identification and Expression Analysis of Candidate Odorant-Binding Protein and Chemosensory Protein Genes by Antennal Transcriptome of *Sitobion avenae*.** PLoS ONE 11(8):e0161839, 2016.

YAMAGATA, A.; KRISTENSEN, D.B.; TAKEDA, Y.; MIYAMOTO, Y.; OKADA, K.; INAMATSU, M.; YOSHIZATO, K. **Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase.** Proteomics. Sep;2(9):1267-76, 2002.

YAMAGUCHI, Y.; SHIRAI, Y.; MATSUBARA, T.; SANSE, K.; KURIYAMA, M.; OSHIRO, N.; YOSHINO, K.; YONEZAWA, K.; ONO, Y.; SAITO, N. **Phosphorylation and up-regulation of diacylglycerol kinase gamma via its interaction with protein kinase C gamma.** J Biol Chem. Oct 20;281(42):31627-37, 2006.

YAO, X.; KWAN, H.Y.; HUANG, Y. **Regulation of TRP channels by phosphorylation.** *Neurosignals.*;14(6):273-80, 2005.

YIN, J.; CHOO, Y.M.; DUAN, H.; LEAL, W.S. **Selectivity of odorant-binding proteins from the southern house mosquito tested against physiologically relevant ligands.** *Front. Physiol.* 6:56, 2015.

YUAN, H.B.; DING, Y.X.; G.U, S.H.; SUN, L.; ZHU, X.Q.; LIU, H.W., et al. **Molecular characterization and expression profiling of odorant-binding proteins in *Apolygus lucorum*.** *PLoS ONE.*; 10(10): e0140562, 2015.

ZARBIN, P.H.G.; RODRIGUES, M.A.C.M. **Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil.** *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 722-731, 2009.

ZERBA, E.N. **Past and present of Chagas vector control and future needs.** WHO Position paper, WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/99.1, 1999.

ZERMOGLIO, P.F.; MARTIN-HERROU, H.; BIGNON, Y.; LAZZARI, C.R. ***Rhodnius prolixus* smells repellents: Behavioural evidence and test of present and potential compounds inducing repellency in Chagas disease vectors.** *J Insect Physiol.* v. 81, p. 137-144, 2015.

ZHANG, X.Y.; ZHU, X.Q.; GU, S.H.; ZHOU, Y.L.; WANG, S.Y.; ZHANG, Y.J.; GUO, Y.Y. **Silencing of odorant binding protein gene *AlinOBP4* by RNAi induces declining electrophysiological responses of *Adelphocoris lineolatus* to six semiochemicals.** *Insect Science*; 00, 1–9, 2016.

ZHANG, G.; CHEN, J.; YU, H.; TIAN, X.; WU, J. **Molecular and Functional Characterization of pheromone binding protein 1 from the Oriental Fruit Moth, *Grapholita molesta* (Busck).** *Scientific Reports* volume 8, Article number: 2276, 2018.

ZHAO, S.; FERNALD, R.D. **Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction.** *J. Comput. Biol.* Oct; 12(8):1045-62, 2005.

ZHU, J.Y.; ZHANG, L.F.; ZE, S.Z.; WANG, D.W.; YANG, B. **Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*.** *J Insect Physiol.* 59(7):722-8, Jul 2013.

ZIEMBA, B.P.; MURPHY, E.J.; EDLIN, H.T.; JONES, D.N. **A novel mechanism of ligand binding and release in the odorant binding protein 20 from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.** *Protein Sci.*; 22(1):11-21, 2012.

ZINSMAIER, K.E. **Cysteine-string protein's neuroprotective role.** *J Neurogenet.*; 24(3):120-32, 2010.

ZUFALL, F.; LEINDERS-ZUFALL, T. **The cellular and molecular basis of odor adaptation.** Chem Senses.; 25:473–481, 2000.

ZUMAQUERO-RIOS, J.L.; LÓPEZ-TLACOMULCO, J.J.; ROJAS, G.R.; SANSINENEA, E. **Lethal effects of a Mexican *Beauveria bassiana* (Balsamo) strain against *Meccus pallidipennis* (Stal).** Braz. J. Microbiol. 45, 551–557, 2014.

ZWIEBEL, L.J.; TAKKENB, W. **Olfactory regulation of mosquito–host interactions.** Insect Biochem Mol Biol. 34(7): 645–652, 2004.

**ANEXO A – Artigo 1 - OLIVEIRA, D.S.; BRITO, N.F.; FRANCO, T.A.; MOREIRA, M.F.; LEAL, W.S.; MELO, A.C.A. Functional Characterization of Odorant Binding Protein 27 (RproOBP27) from *Rhodnius prolixus* antennae. Front. Physiol. 9:1175, 2018.**

**ANEXO B – Artigo 2 - OLIVEIRA, D.S.; BRITO, N.F.; NOGUEIRA, F.C.S.; MOREIRA, M.F.; LEAL, W.S.; SOARES, M.R., MELO; A.C.A. Proteomic analysis of the kissing bug *Rhodnius prolixus* antenna. J Insect Physiol 100, 108-118, 2017.**