UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA INSTITUTO DE QUÍMICA

Thiago Andrade Franco

"Caracterização funcional de candidatos a receptores olfativos no vetor da doença de Chagas, *Rhodnius prolixus*"

Rio de Janeiro Novembro 2018 Thiago Andrade Franco

"Caracterização funcional de candidatos a receptores olfativos no vetor da doença de Chagas, *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 Cooriendador: Walter Soares Leal Coorientadora: Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

> Rio de Janeiro Novembro 2018

Ficha catalográfica

Franco, Thiago Andrade. Caracterização funcional de candidatos a receptores olfativos no vetor da doença de Chagas, *Rhodnius prolixus* / Thiago Andrade Franco. – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2018. 155 f.:il.

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

Orientadora: Ana Claudia do Amaral Melo. Coorientador: Walter Soares Leal, Mônica Ferreira Moreira.

1. *Rhodnius prolixus*. 2. Odorant receptor. 3. Repelente. 4. RNAi. I. Melo, Ana Claudia do Amaral (Orient.) II. Leal, Walter Soares, Moreira, Mônica Ferreira. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Thiago Andrade Franco

"Caracterização funcional de candidatos a receptores olfativos no vetor da doença de Chagas, *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).

Rio de Janeiro, de 6 de novembro de 2018.

Prof. Dra. Ana Claudia do Amaral Melo Orientador (a)

> Prof. Dra. Bianca Cruz Neves IQ/UFRJ

Prof. Dr. Isabela Barbosa Ramos IBqM/UFRJ

Prof. Dr. Rafaela Vieira Bruno IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Fernando Ariel Genta IOC/FIOCRUZ

À minha esposa e minha família.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, pois sem ele nada poderíamos fazer.
- ✓ A minha esposa linda e maravilhosa por todos os domingos e feriados que trabalhou comigo no laboratório e por todo o apoio durante esta caminhada. Você foi e sempre será minha inspiração. Te amo sua linda.
- ✓ A minha família pelo carinho e principalmente pela paciência de tolerar ao longo destes anos, sem ir a algumas festas, reuniões, aniversários, casamentos e muitos eventos especiais. Pai, mãe, Teles, Taisa. Eu amo todos vocês.
- ✓ Aos meus tios e tias, primos e primas, cunhadas e cunhados, e sobrinhos por todo carinho e admiração.
- ✓ A todos os meus sobrinhos, Daniel, Ana Clara, Matheus, Caleb e Mariana. Obrigado pelo carinho de vocês.
- ✓ A todos meus amigos do LABBMOVE pelo carinho e apoio durante o meu doutorado. Por todo o companheirismo e dedicação. Pelas festas e brincadeiras. Por toda a diversão e trabalho pesado da pesquisa. Não conseguiria fazer nada sem vocês. Nathália, Daniele, Sheyla, Tiago, Thayane, Evelyn, Victor e todos os demais alunos de Iniciação científica que passaram pelo laboratório.
- ✓ Ao prof. Walter Leal por me receber em seu laboratório durante o meu estagio sanduiche.
- ✓ A todos os amigos do laboratório do Dr. Walter Leal que trabalharam comigo durante o estágio sanduiche em Davis-Ca. Dr. Pingi Xu, Xiaolan, James Lu, Kay, Fangfag, Dra. Meng.
- ✓ Ao Larry e a Dra. Linda Hall pela convivência e todos os conselhos durante minha estádia em Davis.
- ✓ A todos os meus amigos da UFRJ dos demais departamentos e cursos.
- ✓ Aos funcionários do departamento da UFRJ e da UC-Davis por todo o apoio e conselhos.
- ✓ A todos da colônia de *Rhodnius* pelo fornecimento dos insetos e toda colaboração com os experimentos. Gustavo e Lauriene, vocês são anjos para todos nós que trabalhamos com *Rhodnius*.
- ✓ A todos os professores do departamento de bioquímica que tem contribuído grandemente com meu crescimento.
- ✓ A minha orientadora Ana Claudia, pela paciência, dedicação em me orientar e ensinar para que juntos pudéssemos fazer essa tese. Pela amizade e carinho, pelos conselhos e ensinamentos.
- ✓ A professora Monica por todos os conselhos e orientações ao logo desse doutorado.

Enfim, a todos que me auxiliaram durante este período.

"Dê o primeiro passo com fé. Você não precisa ver toda a escada, apenas suba o primeiro degrau." Martin Luther King

RESUMO

O Rhodnius prolixus é um dos vetores da doença de Chagas, que é endêmica na América Latina. Estima-se que há aproximadamente 7,5 milhões de portadores da doença. A transmissão por inseto vetor é estimada em 29.925/ano. O contato triatomíneo/hospedeiro ocorre através da detecção de semioquímicos (odores) pelas sensilas das antenas no processo da olfação. A olfação envolve diferentes proteínas com destaque para os receptores olfativos (ORs). ORs são proteínas do tipo GPCRs (G-protein-coupled receptors), ancoradas a membrana dos neurônios sensoriais olfativos representando, a porta de entrada dos estímulos olfativos. Nos insetos para que um OR se torne funcional é necessária a co-expressão do correceptor olfativo, ORCO. O comportamento de um inseto, portanto, dependerá da interpretação dos odores presentes no meio ambiente. Assim, bloquear a detecção de odores emanados pelo ser humano pode contribuir para evitar a transmissão do Trypanosoma cruzi. Este estudo teve como principais objetivos (1) deorfanizar ORs de R. prolixus e (2) identificar semioquímicos fisiologicamente ativos. Através de bioinformática foram selecionados 28 candidatos a ORs dentre os 116 descritos no genoma. A seleção foi baseada na homologia das sequências de ORs descritos como funcionais em outros insetos. RNAs para os ORs candidatos foram encontrados exclusivamente nas antenas. Estes transcritos foram quantificados por técnica de PCR quantitativo e 4 receptores foram selecionados para clonagem no vetor pGEMHE, e expressão em ovócitos de Xenopus laevis. Os pares dos 4 ORx/ORCO expressos em ovócitos foram testados, por técnica de eletrofisiologia (patch clamp), usando 109 semioquímicos, individualmente e em diferentes concentrações. Destes, os compostos 2-heptanona, y-octalactona, acetofenona e 4 metilciclohexanol foram capazes de produzir a despolarização da membrana do ovócito que expressava o complexo OR80-ORCO. Os bioensaios mostraram que todos os quatro compostos fisiologicamente-ativos no patch clamp promoviam, em diferentes concentrações, ação repelente nos insetos. O álcool 4metilciclohexanol apresentou a melhor performance na ação repelente. Para confirmar a hipótese de que o OR80 estava envolvido na detecção do 4-metilciclohexanol, os insetos foram silenciados por RNA de interferência. Os insetos tratados com dsOR80 apresentaram uma redução de 77% nos níveis de transcritos, esta redução promoveu a perdar da capacidade de detecção do 4-metilciclohexanol revertendo completamente a ação repelente deste composto. Este resultado confirmou a participação do OR80 na detecção do 4 metilciclohexanol. Este trabalho apresentou a prospecção de 4 semioquímicos capazes de repelir o R. prolixus, e a participação do OR80 na detecção de um deles. Em um futuro

próximo, estes semioquímicos poderão vir a ser empregados individualmente ou em conjunto como repelentes para triatomíneos.

Palavras-chave: Rhodnius prolixus, receptor olfativo, repelente, RNAi, deorfanização

ABSTRACT

Rhodnius prolixus is one of the vectors of Chagas disease, which is endemic in Latin America. It is estimated that there are approximately 7.5 million people with the disease. Transmission by insect vector is estimated at 29,925 / year. The triatomine / host contact occurs through the detection of odors (semiochemical) by the sensilla in the antennas in the olfaction process. Olfaction involves different proteins with prominence for odorant receptors (ORs). ORs are GPCRs (G-protein-coupled receptors), anchored to the membrane of olfactory sensory neurons representing the entrance port of olfactory stimuli. In the insects for an OR to become functional, co-expression of the olfactory coreceptor, ORCO, is required. The behavior of an insect, therefore, will depend on the interpretation of the odors present in the environment. Thus, blocking the detection of odor emanating from humans may contribute to avoiding the transmission of Trypanosoma cruzi. The main objectives of this study were to (1) deorphinate ORs from R. prolixus and (2) to identify physiologically active semiochemicals. Through bioinformatics, 28 candidates for ORs were selected from among the 116 described in the genome. Selection was based on the homology of sequences of ORs described as functional in other insects. RNAs for ORs candidates were found exclusively in the antennas. These transcripts were quantified by quantitative PCR technique and four receptors were selected for cloning in the pGEMHE vector, and expression in oocytes of Xenopus laevis. The 4 pairs of the ORx/ ORCO expressed in oocytes were tested by electrophysiology (patch clamp), using 109 semiochemicals, individually and in different concentrations. Of these, the compounds 2-heptanone, y-octalactone, acetophenone and 4methylcyclohexanol were able to produce depolarization of the oocyte membrane expressing the OR80-ORCO complex. The bioassays showed that all four physiologically active compounds in the patch clamp promoted, in different concentrations, insect repellent action. The alcohol 4-methylcyclohexanol presented the best performance in the repellent action. To confirm the hypothesis that OR80 was involved in the detection of 4-methylcyclohexanol, the insects were silenced by RNA of interference. The insects treated with dsOR80 showed a 77% reduction in transcript levels, this reduction promoted the loss of the ability to detect 4methylcyclohexanol by completely reversing the repellent action of this compound. This result confirmed the participation of OR80 in the detection of 4-methylcyclohexanol. This work presented the prospection of 4 semiochemicals capable of repelling R. prolixus, and the

participation of OR80 in the detection of one of them. In the near future, these semiochemicals may be used individually or together as triatomine repellents.

Keywords: Rhodnius prolixus, odorant receptor, repellent, RNAi

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

	Distribuição mundial da doença de Chagas. Rotas de migração da
Figura 1.	América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados
	em países não endêmicos.
Figura 2.	Casa típica da região rural do semiárido nordestino, PB
Figura 3.	Sinal de Romaña em uma menina procedente de área endêmica no Brasil
Figura 4.	As duas principais formas do <i>Trypanosoma cruzi</i> em hospedeiros vertebrados: A, tripomastigota; B, amastigota
Figura 5.	Ciclo de transmissão do Trypanosoma cruzi (simplificado)
	Ciclo de vida do Rhodnius prolixus. Os diferentes estágios de
Figura 6.	desenvolvimento de Rhodnius prolixus desde o ovo, 1º ao 5º estádio de
	ninfa até ao estágio adulto estão assinalados na figura
Figura 7.	Detalhe da cabeça de Rhodnius prolixus, mostrando a localização das
	antenas, inseridas no tubérculo antenífero, situado após a metade da
	região anteocular.
	Micrografia eletrônica de varredura da antena fêmea adulta de R.
Figura 8.	prolixus. Vista ventral. Segmentos da antena: pedicelo (P), segmentos
	flagelares F1 e F2
Figura 9.	Esquema da sensila olfativa
Figura 10.	Receptores quimiossensoriais de insetos.
Figura 11 -	Representação esquemática do modelo de ligação da molécula de odor e sua inativação.
Figura 12.	Modelos do mecanismo de transdução do sinal olfativo em uma típica sensila olfatória Hipótese ionotrópica.
Figura 13.	Modelos do mecanismo de transdução do sinal olfativo em uma típica sensila olfatória Hipótese metabotrópica e Hipótese ionotrópica
Tabela 1.	Lista de primers para PCR convencional e quantitativo.
Tabela 2.	Iniciadores paras as reações de PCR da clonagem.
Figura 14.	Desenho esquemático do protocolo do bioensaio
Figura 15.	Fotografia do Bioensaio de ingestão de sangue.
Tabela 3.	Primer para síntese de dsRNA.
Figura 16.	Analise filogenética dos candidatos a receptores olfativos.

Tabela 4.	Resultado da seleção dos receptores olfativos por filogenia
Eigura 17	Análise da expressão dos ORs por PCR convencional: A OR16; B)
Figura 17.	<i>OR42</i> , C) <i>OR44</i> , D) <i>OR66-67-68</i>
Figura 18.	Análise da expressão dos ORs por PCR convencional: A) OR2, B)
	<i>OR40</i> , C) <i>OR101</i>
	Análise da expressão dos ORs de R. prolixus por PCR convencional:A)
Eigung 10	<i>OR8</i> , B) <i>OR9</i> , C) <i>OR18</i> , D) <i>OR19</i> , E) <i>OR24</i> , F) <i>OR25</i> , G) <i>OR41</i> , H)
Figura 19.	OR43, I) OR46, J) OR47, K) OR53, L) OR83, M) OR106, N) OR108,
	O) <i>OR111</i>
Eiguro 20	Expressão relativa dos ORs de R. prolixus por qPCR: A) OR16, B)
Figura 20.	<i>OR42</i> , C) <i>OR44</i> , D) <i>OR66-67-68</i>
	Expressão relativa dos ORs de R. prolixus por qPCR: A) OR2, B) OR8,
Figura 21	C) <i>OR9</i> , D) <i>OR18</i> , E) <i>OR19</i> , F) <i>OR24</i> , G) <i>OR25</i> , H) <i>OR40</i> , I) <i>OR41</i> , J)
1 iguia 21.	<i>OR43</i> , K) <i>OR46</i> , L) <i>OR47</i> , M) <i>OR53</i> , N) <i>OR83</i> , O) <i>OR101</i> , P) <i>OR106</i> ,
	Q) OR108 e R) OR111
Figure 22	Análise da expressão dos ORs de R. prolixus por PCR convencional: A)
1 Igula 22.	<i>OR1</i> , B) <i>OR3</i> , C) <i>OR74</i> , D) <i>OR80</i>
Figura 23	Expressão relativa dos ORs de R. prolixus por qPCR: A) OR1, B) OR3,
Figura 23.	C) <i>OR74</i> , D) <i>OR80</i> .
Figura 24.	Sequência consenso do OR1.
Figura 25.	Alinhamento do OR1.
Figura 26.	Predição dos domínios transmembranares do OR1.
Figure 27	Registro eletrofisiológico do receptor olfativo 1 (OR1) co-expresso com
rigula 27.	o Orco em ovócitos de Xenopus laevis.
Figura 28.	Sequência consenso do OR3.
Figura 29.	Alinhamento do OR3.
Figura 30.	Predição dos domínios transmembranares do OR3.
Figura 31	Perfil eletrofisiológico do receptor olfativo 3 (OR3) expresso em
Figura 51.	ovócitos de Xenopus laevis
Figura 32.	Sequência consenso do OR74.
Figura 33.	Alinhamento do OR74
Figura 34.	Predição dos domínios transmembranares do OR74
Figura 35.	Perfil eletrofisiológico do OR74 expresso em ovócitos de Xenopus

	laevis	
Figura 36.	Sequência consenso do OR80	94
Figura 37.	Alinhamento do OR80.	95
Figura 38.	Predição dos domínios transmembranares do OR80.	96
Figura 39.	Perfil eletrofisiológico do receptor olfativo OR80 expresso em ovócitos	07
	de Xenopus laevis	97
Figura 40.	Expressão relativa do gene OR80 nas antenas de adultos e de ninfas	00
	machos	99
Figura 41.	Velocidade média de deslocamento até o hospedeiro vertebrado na	101
	presença de semioquímicos fisiologicamente ativos.	101
Figura 42.	Resposta comportamental na presença de semioquímicos	104
	fisiologicamente ativos.	
Figura 43.	Análise da quantidade de sangue ingerido na presença dos compostos	105
	repelentes	
Figura 44.	Expressão relativa do gene do OR80 nos insetos silenciados por RNAi.	107
Figura 45.	Comportamento do Rhodnius prolixus silenciados para o OR80 na	108
	presença de diferentes compostos.	

LISTA DE ABREVIATURAS

AC-Adenilato ciclase

- AMPc monofosfato cíclico de adenosina
- BLASTp Protein Basic Local Alignment Search Tool
- cDNA- DNA complementar
- Ct (do inglês "threshold cycle)
- DAG Diacilglicerol

DC- Doença de Chagas

- DDT -Dicloro-difenil-tricloroetano
- DEET -n,n-dietil-meta-toluamida
- dsRNA- "double-stranded RNA" (RNA dupla-fita)
- EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

FA – Antena de fêmea

FL-Patas de fêmeas

- FP- Probóscides de fêmeas
- GPCRs-Receptores acoplados a proteína G (G-protein-coupled receptors)
- **GRs-Receptores** gustativos
- HEK- células embrionárias de tecido renal

High-Five

IP3 - inositol 1,4,5-trifosfato

IR3535-Etil-butil-acetil-amino-propionato

IRs-Receptores ionotrópicos

- LB- Meio Lúria-Bertani
- MA Antena de macho

mL-mililitros

ML-Patas de machos

MP-Probóscides de machos

NCBI-National Center for Biotechnology Information

NSOs-Neurônios sensoriais olfativos

OBPs-Proteínas ligadoras de odor

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

OMS-Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

ORCO- Co-receptor olfativo

ORs-Receptores olfativos

PCR-Reação em cadeia da polimerase

PKC - proteína quinase C

qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNAi-RNA de interferência

SR- Serpentine receptor ou Receptor do tipo serpentina

SSR- single sensillum recording

TMs-Proteínas transmembranares

WHO- "World Health Organization"

 $\mu g-microgram as$

 μL – microlitros

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Doença de Chagas	20
1.2.	Rhodnius prolixus	25
1.3.	Controle Vetorial	26
1.4.	Repelentes e os triatomíneos	27
1.5.	Ecologia Química do Rhodnius prolixus	29
1.6.	Sistema olfativo dos insetos	31
1.6.1.	Morfologia do sistema olfativo	31
1.6.2.	Receptores Quimiossensoriais	34
1.6.3.	Transdução do sinal olfativo -via ORs	35
1.6.4.	Receptores olfativos	36
1.6.4.1.	Estudo funcional de Receptores olfativos	41
2.	OBJETIVOS	45
2.1.	Objetivo geral	45
2.2.	Objetivos específicos	45
3.	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1.	Insetos	46
3.2.	Declaração de ética em pesquisa	46
3.3.	Triagem dos receptores olfativos	47
3.4.	Dissecção dos tecidos, extração de RNA total e síntese de cDNA	47
3.5.	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	48

SUMÁRIO

3.6.	PCR quantitativo (qPCR)	49
3.7.	Análise dos resultados de qPCR	49
3.8.	Clonagem e sequenciamento dos ORs	53
3.9.	Digestão dos plasmídeos para a síntese de cRNA	54
3.10.	Extração e precipitação de DNA por Método Fenol-Clorofórmio	56
3.11.	Síntese de cRNA	56
3.12.	Expressão heteróloga e estudo de eletrofisiológia	57
3.13.	Painel de semioquímicos	57
3.14.	Preparação dos extratos da cutícula dos insetos	57
3.15.	Bioensaio	58
3.16.	Ingestão de sangue na presença dos compostos	59
3.17.	Síntese de dsRNA	60
3.18.	Injeção dsRNA	61
3.19.	Análise estatística	62
4.	RESULTADOS	63
4.1.	Seleção dos receptores olfativos no genoma de Rhodnius prolixus	63
4.2.	Perfil geral de expressão dos receptores olfativos de R. prolixus	65
4.2.1.	ORs expressos nas antenas de machos e fêmeas	70
4.2.2.	ORs enriquecidos e/ou exclusivos de antenas de fêmeas	70
4.2.3.	ORs enriquecidos e/ou exclusivos de antenas de machos	73
4.3.	Expressão heteróloga e resposta eletrofisiológica	77
4.3.1.	Perfil de resposta eletrofisiológica do receptor olfativo 1 (OR1).	78

4.3.2.	Perfil de resposta eletrofisiológica do receptor olfativo 3 (OR3)	83
4.3.3.	Perfil de resposta eletrofisiológica do receptor olfativo 74 (O74).	83
4.3.4.	Perfil de resposta eletrofisiológica do receptor olfativo 80 (OR80).	93
4.4.	Bioensaios de ação repelente.	98
4.4.1.	Seleção dos insetos	98
4.4.2.	Avaliação do comportamento de <i>R. prolixus</i> na presença dos semioquímicos fisiologicamente ativos.	100
4.4.2.1.	Velocidade para alcançar o hospedeiro humano.	100
4.4.2.2.	Tempo de permanência na zona do hospedeiro humano	102
4.4.2.3.	Ingestão de sangue na presença dos semioquímicos fisiologicamente ativos	103
4.5.	O papel do OR80 na detecção do 4-metilciclohexanol	106
5.	DISCUSSÃO	109
5.1.	A importância da compreensão da olfação em triatomíneos	111
5.2.	Seleção dos receptores olfativos no genoma de Rhodnius prolixus	112
5.3.	Perfil de expressão dos genes ORs nos órgãos.	116
5.4.	Ecologia química reversa	118
5.5.	Bioensaio de ação repelente	120
5.6.	Papel do receptor olfativo 80 na detecção de 4-metilciclohexanol	123
5.7.	Provável aplicação dos compostos repelentes no mercado	124
6.	CONCLUSÃO	125
7.	REFERENCIAS	127
8.	ANEXOS	146
	Tabela suplementar 1. Receptores olfativos de diferentes insetos	146

Tabela suplementar 2. Lista de odorantes utilizados na eletrofisiológia

Franco, T.A., Xu, P., Brito, Nathá.F., Oliveira, D.S., Wen, X., Moreira, M.F., Unelius, C.R., Leal, W.S., Melo, A.C.A., Reverse chemical ecology-based approach leading to the accidental discovery of repellents for *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas diseases refractory to DEET, Insect Biochemistry and Molecular Biology (2018), doi: https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.004.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

Tripanossomíase americana é uma infecção parasitária humana causada pelo *Trypanosoma cruzi*, (Eucarya, Kinetoplastea, Trypanosomatidae). Esta infecção conhecida por doença de Chagas é uma homenagem ao médico sanitarista Carlos R. J. Chagas que descobriu e descreveu esta patologia (Chagas, 1909). O sanitarista identificou o inseto vetor (barbeiro, *Triatoma infestans*), o agente etiológico (o protozoário, *T. cruzi*) e descreveu a tripanossomíase americana (VINHAES & DIAS, 2000; ARGOLO et al., 2008; KROPF et al., 2005).

Semelhante as demais doenças negligenciadas, a doença de Chagas é considerada uma antropozoonose resultante das alterações antrópicas e das desigualdades socioeconômicas. Ela ocorre principalmente em regiões rurais ou mais precárias causando um grande impacto nos trabalhadores da agricultura e da pecuária em países acometidos pela doença. (VINHAES & DIAS, 2000; ARGOLO et al., 2008). A doença é endêmica em grande parte do México, América Central e América do Sul, onde estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas. A doença tornou-se mundialmente problemática devido à migração internacional em larga escala de latino-americanos para países não endêmicos, particularmente EUA, Canadá, Europa, Austrália e Japão (SCHMUNIS & YADON 2010) (Fig. 1). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention) estima que há mais de 300 mil pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, morando nos Estados Unidos, e a maioria destas pessoas foram infectadas nos países endêmicos (CDC, 2016). No Brasil, há cerca de 2,9-7,2 milhões de pessoas que vivem com doença de Chagas, causando cerca de 6.000 mortes anuais (MARTINS-MELO et al., 2014).

Os triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiro, bicudo, chupança, furão, dentre outros, são os vetores da doença de Chagas. Pertencentes à Ordem Hemiptera, são estritamente hematófagos. Hoje, existem cerca de 148 diferentes espécies conhecidas, subdivididas em 18 gêneros. Desses 18 gêneros, 3 são considerados como os mais importantes: *Panstrongylus, Rhodnius* e *Triatoma* (GALVÃO, 2015).

Os triatomíneos prosperam em condições precárias de habitação, por exemplo, construções com paredes de barro, casa de pau-a-pique, (Fig. 2), assim, em países endêmicos, as pessoas que vivem em áreas rurais correm maior risco de adquirir a infecção (SALES-JUNIOR et al, 2017; CDC, 2016).

A doença se apresenta na clínica em duas fases: aguda e crônica (WHO et al., 2018). A infecção aguda pode ocorrer em qualquer idade, embora ocorra geralmente durante os primeiros anos de vida, sendo assintomática na maioria dos casos (PEREZ-MOLINA & MOLINA, 2018) ou com sintomas leves e inespecíficos (WHO et al., 2018).



Figura 1. Distribuição mundial da doença de Chagas. Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos. Adaptado de COURA & VIÑAS, 2010.



Figura 2. Casa típica da região rural do semiárido nordestino, PB. Adaptado ARGOLO et al, 2008

Em pouco menos de cinquenta por cento das pessoas picadas por um triatomíneo infectado com o *T. cruzi*, aparece o primeiro sinal visível característico da doença que pode ser uma lesão cutânea ou um inchaço arroxeado das pálpebras de um olho, conhecido como sinal de Romaña (Fig. 3), em homenagem ao médico Cecilio Romaña que descreveu este sinal clínico permitindo assim fácil e imediata identificação de casos agudos (WHO, 2018; PEREZ-MOLINA & MOLINA, 2018; KROPF, 2005). Além deste, outros sintomas como febre, dor de cabeça, glândulas linfáticas aumentadas, palidez, dores musculares, dificuldade de respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica podem aparecer (WHO, 2018). Esta fase tem duração de 4 a 8 semanas e a parasitemia diminui substancialmente a partir de 90 dias (PEREZ-MOLINA & MOLINA, 2018).



Figura 3. Sinal de Romaña em uma menina procedente de área endêmica no Brasil. Adaptado ARGOLO et al, 2008.

Na fase crônica, os parasitas estão presentes principalmente no coração e nos músculos do sistema digestório (WHO, 2018). Esta fase é caracterizada por parasitemia flutuante, embora a maioria dos pacientes permaneça assintomático, após vários meses, podendo chegar até décadas, caracterizando assim a forma indeterminada da doença de Chagas (SALES-JUNIOR, 2017). Aproximadamente trinta por cento dos pacientes sofre de distúrbios cardíacos e aproximadamente dez por cento sofrem de distúrbios digestivos (tipicamente aumento do esôfago ou cólon) e alterações neurológicas ou mistas (WHO, 2018). O indivíduo infectado pode chegar ao quadro de óbito após anos de infecção devido a arritmias ou insuficiência cardíaca progressivas causada pela destruição do músculo cardíaco e do sistema nervoso (WHO, 2018).

A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer por diferentes vias, tais como: através de transfusões de sangue, transplantes de órgãos, acidentalmente, de forma vertical (congênita), através do aleitamento materno, oral e, excepcionalmente, por meio sexual, como já comprovada em animais experimentais (REICHE et al., 1996; DIAS, 1992). Na literatura estão relatadas duas formas de transmissão vetorial do T. cruzi, um ciclo silvestre e um ciclo doméstico. O ciclo silvestre constitui o ciclo original da tripanossomíase americana, calculase que mais de duzentas espécies, entre hospedeiros vertebrados e triatomíneos silvestres, participem deste ciclo. O T. cruzi circula entre os mamíferos silvestres através dos insetos vetores. Devido à complexidade dos inúmeros hospedeiros e vetores envolvidos no ciclo silvestre, este ainda não está bem definido. Por outro lado, o ciclo doméstico é muito bem estudado, o homem e animais sinantrópicos e triatomíneos domiciliares fazem parte deste ciclo. O ciclo doméstico se estabeleceu quando o homem passou a habitar locais os ectópicos silvestres, normalmente em fazendas e outros tipos de habitações rurais que oferecem abrigo e alimento abundante aos vetores, incluindo-se, desta forma, no ciclo epidemiológico da doença (ARGOLO et al., 2008). Além disso, as atividades antrópicas, como a destruição da vegetação pela agricultura, acarretando desequilíbrios nos ecossistemas, levaram as modificações no comportamento dos insetos vetores que passaram a ter o ser humano como única fonte alimentar (ARGOLO et al., 2008).

Os triatomíneos infectados com *T. cruzi* eliminam nas fezes uma forma celular alongada com um flagelo denominada tripomastigota metacíclico (Fig. 4A). Após a entrada no organismo do hospedeiro vertebrado, ocorre a infecção de células próximas à área da picada (Fig. 5). Dentro da célula, os parasitas assumem uma forma ovoide e sem flagelo, denominada amastigota, que se multiplica rapidamente (Fig. 4B). O grande número de parasitos promove um rompimento celular e os tripanossomatídeos adentram às correntes sanguínea e linfática. Nesse momento, os protozoários reassumem a forma flagelada, sendo denominados no vertebrado, de tripomastigotas sanguíneos. Desta forma, eles se espalham pelo organismo e infectam outras células em novos ciclos de multiplicação, causando lesões, principalmente, em tecidos musculares cardíacos e lisos (REY, 2001; ARGOLO *et al.*, 2008). O inseto é infectado ao se alimentar de hospedeiros vertebrados contendo as formas tripomastigotas sanguíneos. No barbeiro, estas formas se modificam assumindo a forma de epimastigotas, que voltam a adquirir a capacidade de multiplicação. Os epimastigotas se multiplica mintensamente na mucosa intestinal e após uma série de divisões assumem a forma tripomastigota metacíclico sendo liberadas nas fezes (ARGOLO *et al.*, 2008).



Figura 4. As duas principais formas do *T. cruzi* em hospedeiros vertebrados: A, tripomastigota (formas sanguíneas aderidas a células musculares cardíacas); B, amastigota (formas intracelulares presentes no citoplasma de células musculares cardíacas, onde se multiplicam). Adaptado de ARGOLO *et al.*, 2008



Figura 5. Ciclo de transmissão do T. cruzi (simplificado) ARGOLO et al., 2008

O impacto econômico causado pela doença de Chagas é grande, além do altíssimo custo social (ARGOLO et al., 2008). O custo com cuidados médicos é exorbitante. Somente na Colômbia, o custo anual dos cuidados médicos para todos os pacientes com Chagas foi estimado em aproximadamente US\$ 267 milhões em 2008 (WHO, 2018).

Apesar de todo esforço de pesquisa na área da doença de Chagas, e grande conhecimento adquirido, ainda não existe uma vacina e nem um tratamento que reduza os danos provocados pelo *T. cruzi* no organismo humano. Até o presente, há somente dois medicamentos utilizados para o tratamento da doença, o benzonidazol e o nifurtimox (SALES-JUNIOR et al, 2017). Os mecanismos de ação de benzonidazol e nifurtimox não são inteiramente claros. É relatado na literatura que o benzonidazol atua na redução do metabolismo do parasita, pois utiliza o NADH dependente da mitocôndria para a sua ativação como um pró-fármaco (SOBRINHO *et al.*, 2009). No entanto, experimentos realizados em camundongos por OLIVEIRA *et al.* em 2008, demonstraram que o benznidazol não elimina todos os parasitas na fase crônica da doença, mas pode impedir o avanço das formas mais grave. Assim, a redução populacional dos triatomíneos ainda se constitui a forma mais eficiente de prevenção da doença de Chagas.

1.2. Rhodnius prolixus

O *R. prolixus* é um inseto hematófago estrito pertencente ao Filo Arthropoda, Subfilo Hexápoda, Classe Insecta, ordem Hemiptera, gênero *Rhodnius*, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Ele apresenta metamorfose incompleta (hemimetábolo), após a eclosão dos ovos passa por cinco fases de ninfa até atingir a forma adulta (Fig. 6). Os adultos apresentam asas e aparelho reprodutor totalmente desenvolvido e estão aptos para a reprodução (WIGGLESWORTH, 1934).

O *R. prolixus* não possui hospedeiro preferencial, alimenta-se de qualquer vertebrado de sangue quente, sendo apontando como principal vetor da doença de Chagas no norte da América do Sul e América Central (LEHANE, 1991; LENT, 1999). O repasto sanguíneo é crucial para que o inseto possa mudar de fase de desenvolvimento (BUXTON, 1930). Além disso, o sangue funciona como fonte de nutrientes para as fêmeas iniciarem o processo de formação de ovos. A voracidade por sangue é tanta que as ninfas de quinto estádio de *R. prolixus* chegam a ingerir até 9 vezes o seu peso em sangue (FRIEND et al., 1965). Após a alimentação, os insetos podem permanecer por um longo período em jejum, podendo chegar a várias semanas. Em média 3 dias após a alimentação, os ovários das fêmeas *R. prolixus* já se

encontram repletos de ovócitos, e por volta do 5º dia inicia-se a postura. A embriogênese tem duração de 15 dias, após este período eclode a ninfa de 1º estádio (WIGGLESWORTH, 1934).

Em virtude de sua importância epidemiológica, associada ao conhecimento acumulado sobre fisiologia e bioquímica, o *R. prolixus* foi selecionado, entre os triatomíneos, para ter o genoma sequenciado. Em 2008 foram disponibilizados na plataforma VectorBase (www.vectorbase.org) as primeiras sequências. Por fim, em 2015 após anos de pesquisa com o envolvimento de diversos grupos a anotação do genoma foi concluída e disponibilizada (MESQUITA *et al.*, 2015).



Figura 6. Ciclo de vida do *R. prolixus*. Os diferentes estágios de desenvolvimento do barbeiro desde o ovo, 1° ao 5° estádio de ninfa até ao estágio adulto estão assinalados na figura. Fonte: Foto de Roberto Eizemberg.

1.3. Controle Vetorial

No Brasil, o controle de triatomíneos é feito fundamentalmente, através da aplicação de inseticidas químicos. Inicialmente, testou-se o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), entretanto seus efeitos a longo prazo eram desprezíveis (DIAS, 2011). Em 1947, foram realizados ensaios laboratoriais com um novo inseticida clorado, o gamexanne P530 ou hexaclorociclohexano (BHC), que apresentou resultados muito bons. Esses resultados foram ratificados, posteriormente, em estudos realizados na Argentina (ROMANA & ABALLOS 1948) e Uruguai (OSIMANI et al. 1950).

No ano de 1983, introduziu-se no Brasil, um programa de erradicação do principal vetor doméstico da doença de Chagas, o *Triatoma infestans*, através da pulverização de

inseticidas em locais fechados (DIAS, 2011). Este programa foi eficaz por um longo período, permitindo que no ano de 2006 o Brasil fosse oficialmente considerado livre da transmissão da doença de Chagas (DIAS, 2006). Por outro lado, com o desaparecimento do *T. infestans* outras espécies, antes consideradas de importância epidemiológica secundária, assumiram o papel na transmissão da doença (COSTA & PETERSON, 2012, DIAS 2011).

Quanto ao controle químico houve uma evolução que permitiu a seleção de inseticidas menos nocivo ao ecossistema local. Atualmente utiliza-se inseticidas como os piretróides sintéticos, que são menos tóxicos para animais domésticos e seres humanos (ARGOLO *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, vêm sendo amplamente discutido alternativas que possam substituir a utilização de inseticidas químicos no controle de vetores de doenças. Estas alternativas de controle teriam como principais vantagens: a segurança, a atuação específica no inseto e, ser inofensiva para o ecossistema. Dentre as abordagens que poderiam ser empregadas destacamse as substâncias de origem vegetal e o uso de inseticidas biológicos (MACIEL et al., 2010; MOREIRA et al., 2012). Assim, sugiram novas substâncias naturais ou sintéticas capazes de intervir em processos biológicos essenciais para a reprodução dos insetos. Por exemplo, os análogos do hormônio juvenil que interferem no sistema endócrino provocando retardo no desenvolvimento e causando a morte do inseto (DHADIALLA et al., 1998). Outro exemplo é o controle biológico através do uso de insetos que parasitam ovos de triatomíneos (BARRET, 1975). A melhoria habitacional, saneamento básico, boas condições de saúde e higiene também são alternativas para o controle populacional de vetores, pois os triatomíneos não infestam moradias de boa qualidade e em boas condições de higiene (ARGOLO et al., 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem incentivando o desenvolvimento de projetos que usem as denominadas "tecnologias verdes" para o controle de vetores de doenças. Proteínas do inseto envolvidas diretamente com a percepção do meio ambiente como, por exemplo, os receptores olfativos podem se constituir bons alvos para o controle.

1.4. Repelentes e os triatomíneos

A utilização de repelentes pode ser uma forma eficiente de diminuir o contato de insetos vetores com os seres humanos e, consequentemente, impedir a transmissão vetorial de doenças. Repelentes são definidos como uma substância química, de natureza volátil que induz artrópodes a se moverem na direção oposta à sua fonte (WHITE & MOORE 2015). Os repelentes devem ser eficazes para proteger os usuários contra os diversos insetos

hematófagos por um longo período e, principalmente, não devem provocar reações adversa ao usuário (LUPI *et al.*, 2013).

Os repelentes evoluíram a partir da queima de plantas (fumaça), de formulações de extratos de plantas (óleos essenciais) com um ou mais agentes ativos de substâncias repelentes. A fumaça oriunda da queima de plantas ainda é a forma mais utilizada para repelir mosquitos em algumas zonas rurais (LEAL, 2014). Compostos de origem vegetais tais como citronela e óleo essencial de eucalipto são amplamente utilizados como repelentes tópicos, velas que liberam compostos de origem vegetal também são utilizadas para afastar os insetos. Existem repelentes cujo princípio ativo é sintético. Os mais populares são o etil-butil-acetil-amino-propionato (IR3535) e o DEET (n,n-dietil-meta-toluamida), ambos utilizados de forma eficaz para repelir mosquitos dos gêneros *Aedes, Culex* e *Anopheles* (LUPI *et al.*, 2013).

O DEET é um dos ingredientes ativos mais comuns e amplamente utilizados em repelentes comerciais, podendo ser formulado como aerossóis, cremes, loções, sprays, géis e lenços de papel e em concentrações que varia de 5 a 100% (DIAZ, 2016). A maioria dos produtos comercializados com DEET estão em concentrações entre 30 e 40 % ou menores (DIAZ, 2016). Seguindo corretamente as indicações do produto, o DEET é considerado seguro para o uso. No entanto, 43 casos de toxicidade foram descritos nas últimas cinco décadas, 25 casos com envolvimento do sistema nervoso central, um caso com o sistema cardiovascular e 17 com reações cutâneas/alérgicas. Os sintomas relativos ao sistema nervoso central incluem: letargia, confusão, psicose maníaca aguda, dores de cabeça, ataxia, desorientação, encefalopatia aguda, tremores e convulsões. No sistema cardiovascular, os sintomas são bradicardia e hipotensão. Os sintomas cutâneos e alérgicos relatados incluem anafilaxia, urticária, bolhas hemorrágicas e erosões (KATZ et al., 2008). Wiles et al. (2014) relatou um caso de morte por ingestão do repelente contendo 40% de DEET de um paciente adulto do sexo masculino. Há mais 5 outras mortes relatadas na literatura relacionada a intoxicação por DEET, duas por ingestão e três por exposições dérmicas (BRIASSOULIS et al., 2001; TENENBEIN, 1987).

IR3535 é um repelente sintético desenvolvido pela empresa Merck na década de 70. Desde de sua criação o IR3535 encontra-se presente no comércio europeu e somente em 1999 chegou ao Estados Unidos. Na concentração de 20%, o IR3535 é eficaz contra os mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex* por um período de 7-10 h, mas contra os mosquitos do gênero *Anopheles* é eficiente somente por aproximadamente 4 h. Sua eficiência é comparada com a do DEET, porém ele requer frequentes aplicações a cada 6-8 h (ISLAM et al., 2017). O IR35335 está disponível no mercado através dos produtos comerciais *Pick-out* (*Vichy*), *Baby* *Clear Lotion* (J&J), Avon Bronze e *Skin So Soft* (Avon), entre outros. Este repelente causa pouca irritação nas mucosas e exibe uma toxicidade oral e dérmica mais segura do que o DEET, não existindo relatos de toxicidade por este repelente (ISLAM et al., 2017; DIAZ, 2016).

Vários grupos de pesquisas vêm buscando compostos que promovem repelência em triatomíneos e que não sejam nocivos ao meio ambiente. Zamora et al. (2015) estudou a ação repelente de diferentes componentes do óleo essencial, citronela, em 3 diferentes espécies de triatomíneos, Triatoma rubida, T. protracta, e T. recurva. Estes pesquisadores constataram que todos os componentes do óleo de citronela promoveram alguma inibição na alimentação destes insetos, variando desde uma inibição fraca provocada pelo limoneno a uma mais significativa como no caso do geraniol e citronelol. Eles também observaram que a mistura dos componentes geraniol e citronelol repelia as três espécies e que os componentes citronela e limoneno não promoviam ação repelente significativa. Moretti et al. (2013) analisaram o efeito da atividade locomotora e repelência em ninfas de primeiro estádio de R. prolixus e em T. infestans por 10 diferentes monoterpenos. Eles constataram que os monoterpenos carvacrol, eugenol e geraniol promoveram ação repelente semelhante ao DEET em ambas espécies. Por outro lado, há alguns grupos de pesquisas que tem demonstrado que os triatomíneos, de modo geral, não respondem aos repelentes sintéticos disponíveis comercialmente. Zermoglio et al. (2015) demonstraram que o DEET só tem efeito repelente sobre R. prolixus utilizando altas concentrações do produto (acima de 90%), o que torna incompatível sua utilização em seres humanos. A ineficácia destes repelentes para triatomíneo já vem sendo estudada há mais de 40 anos através de trabalhos como de DIAS & SILVA, 1969.

1.5. Ecologia Química e o Rhodnius prolixus

Ecologia química é a ciência que busca conhecer os mecanismos da comunicação químicas e interações intraespecíficas e interespecíficas através da identificação dos compostos químicos envolvidos (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013; LEAL, 2017).

Substâncias químicas específicas (semioquímicos) medeiam uma ampla gama de interações ecológicas e comportamentais entre os insetos, particularmente para comunicação intraespecífica (feromônios) e para o reconhecimento de fatores ambientais (aleloquímicos) como a detecção de alimentos (CRUZ-LÓPEZ et al., 2001).

Os insetos, assim com todos os outros animais, necessitam perceber e interpretar as informações do meio ambiente obtidas por meio dos órgãos sensoriais (JEFFERIS, 2005). Desta forma, os insetos podem executar atividades crucias para sua sobrevivência como a reprodução e a alimentação (JEFFERIS, 2005; ZWIEBEL & TAKKEN, 2004).

Os insetos, de modo geral, reconhecem um indivíduo do mesmo gênero ou de gêneros diferentes através de feromônios sexuais e/ou de agregação. Em várias espécies de lepidópteros os insetos machos reconhecem e localizam as fêmeas através dos feromônios sexuais. Alguns feromônios denominados de trilha são usados pelas formigas para demarcar o percurso para os demais membros da colônia. Também está descrito feromônio de agregação em gafanhotos (GADENNE et al., 2016). Os insetos também são capazes de reconhecer sinais químicos emitidos por organismos de outras espécies, como plantas, predadores e outras fontes de origem natural ou antropogênica (GADENNE et al., 2016).

Em triatomíneos feromônio sexuais são produzidos pelas fêmeas adultas para atrair os machos da mesma espécie (VITTA & LORENZO, 2009; CRUZ-LÓPEZ et al., 2001). Em *R. prolixus*, o macho é atraído pela fêmea (VELASQUEZ-ANTICH, 1968), e no momento do acasalamento o casal libera compostos voláteis que atraem outros machos que se agregam ao redor do casal (BALDWIN et al., 1971). As fêmeas produzem e liberam os feromônios sexuais pelas glândulas metasternais (CRESPO & MANRIQUE, 2007). Os odores oriundos destas glândulas são preferencialmente emitidos durante a escotofase (PONTES et al., 2008), e são capazes de induzir os machos a sairem de seus abrigos (PONTES, 2010), levantarem vôo (ZACHARIAS et al., 2010) e os orienta para correntes de ar associadas com odores das fêmeas, exibindo anemotaxia positiva (VITTA et al., 2009; MAY-CONCHA et al., 2013). Basicamente, estão presentes no feromônio produzido pelas glândulas metasternais substâncias como cetonas, álcoois, dioxolanos e aldeídos (MANRIQUE et al., 2006; PONTES et al., 2009, MAY-CONCHA et al., 2013).

O comportamento de agregação é comum em triatomíneos e, pode ser mediado por semioquímicos presentes nas fezes (SCHOFIELD & PATTERSON, 1997; FIGUEIRAS et al., 1994; LORENZO & LAZZARI, 1996; FIGUEIRAS & LAZZARI, 2002; VITTA et al., 2002). O comportamento de agregação está relacionado, tanto ao ato de buscar abrigos, como ao reconhecimento intraespecífico (LORENZO & LAZZARI, 1996; PIRES et al., 2002). É bem conhecido que a cutícula de *T. infestans* produz um semioquímico que promove a agregação através do contato direto inseto-inseto (FIGUEIRAS & LAZZARI, 1998). Mota et al. (2014) demonstraram que compostos voláteis presentes nas fezes dos triatomíneos (*T.*

infestans, T. brasiliensis e *Panstrongylus megistus*) são capazes de recrutar os insetos em abrigos. Basicamente, estes voláteis são ácidos graxos de cadeia curta, um diol e uma amida.

A localização do hospedeiro vertebrado para a alimentação sanguínea é uma função crucial para a sobrevivência dos triatomíneos. Esses insetos demonstram uma resposta denominada anemotática, que se caracteriza pela capacidade do inseto de se orientar quando confrontados com correntes de ar que transportam odores associados ao hospedeiro (NUNEZ 1982 & 1987; GUERENSTEIN et al., 1995; BARROZO et al., 2004). A localização do hospedeiro também é influenciada por sinais térmicos, que provocam no inseto o reflexo de extensão da probóscide que leva à localização de vasos sanguíneos sob a superfície da pele e, consequentemente, a picada para a ingestão de sangue (FERREIRA et al., 2007).

Todos esses sinais químicos (feromônios e outros demais semioquímicos) que provocam alguns comportamentos de atração ou repulsão são processados pelo sistema olfativo do inseto.

1.6. Sistema olfativo dos insetos

A olfação, modalidade sensorial que é responsável pela transdução do sinal olfativo, provoca respostas comportamentais que são críticas para o sucesso evolutivo das espécies, tais como, a localização da fonte alimentar, encontrar um local para abrigo, substratos para construção de ninhos, localizar sítios para a oviposição, assim como avaliar a presença de predadores e outros perigos ou simplesmente mover-se pelo ambiente (JEFFERIS, 2005). A informação oriunda do semioquímico é vital para os insetos, pois, o sistema olfativo possui exímia capacidade de captar e interpretar uma ampla variedade de moléculas de odor, que são emanados por diferentes fontes ambientais (HANSSON et al., 2010; HANSSON e STENSMYR, 2011; LORENZO & MELO, 2012). Moléculas de odor de todas as formas e tamanhos são detectadas pelo sistema olfativo (WICHER et al., 2009). Até o momento, ainda não há uma estimativa precisa da quantidade de moléculas de odor que participam da comunicação química de uma dada espécie de inseto (LORENZO & MELO, 2012).

Evidentemente a olfação é extremamente importante nos insetos e este fato é confirmado pela presença de estruturas complexas como as antenas, cuja a função é análoga ao nariz humano (LORENZO & MELO, 2012).

1.6.1. Morfologia do sistema olfativo

Os insetos apresentam um par de antenas localizadas em sua cabeça, inseridas em uma estrutura denominada tubérculo antenífero. No gênero *Rhodnius* as antenas estão próximo ao ápice da cabeça logo após a metade da região anteocular (Fig. 7) (OPAS, 2009). Nesta espécie as antenas são constituídas por 4 segmentos: escapo, pedicelo e dois segmentos flagelar possuindo diversos tipos de sensilas distribuídas em sua superfície (Fig. 8) (WIGGLESWORTH & GILLETT, 1934; ORTIZ et al., 2011).



Figura 7. Detalhe da cabeça de *R. prolixus*, mostrando a localização das antenas, inseridas no tubérculo antenífero, situado após a metade da região anteocular. Adaptado de OPAS, 2009.

As sensilas olfativas são pequenas estruturas quitinosas e porosas presentes na superfície das antenas (Fig. 8) (LORENZO & MELO, 2012). As sensilas são estruturas básicas usadas na percepção dos estímulos ambientais tais como químicos, mecânicos, térmicos, luminosos e até variações na umidade relativa do ar (CAREY & CARLSON, 2011). Além das antenas, as sensilas podem ser localizadas em outras estruturas, como palpos labiais e maxilares, probóscides, órgãos genitais, patas e asas (DE BRUYNE & BAKER, 2008; GUERENSTEIN & HILDEBRAND, 2008; NICHOLS & VOGT, 2008; GUIDOBALDI et al., 2014).

A morfologia das sensilas está relacionada com suas funções (CHAPMAN, 1998). As sensilas são classificadas de acordo com a modalidade sensorial em olfativas, mecanosensoriais, gustativas, e podem abrigar termo/higro receptores capazes de detectar calor e umidade (GUIDOBALDI et al., 2014).

As sensilas possuem uma cavidade distal onde se encontram os dendritos dos neurônios sensoriais olfativos (NSOs) que é preenchida por um líquido chamado linfa sensilar (LORENZO & MELO, 2012). Em cada sensila olfativa, há três células acessórias denominadas tecógena, tricógena e termógena (KEIL, 1999); estas duas últimas fornecem

proteínas e concentrações iônicas adequadas à linfa sensilar. Através dos poros presentes na parede cuticular das sensilas as moléculas de odor têm acesso à membrana do NSOs (LORENZO e MELO, 2012). Os NSOs são tipicamente bipolares com um corpo celular grande de onde se projeta um dendrito, que se estende dentro da projeção cuticular, e um axônio que se prolonga pela antena através do nervo antenal, atingindo o cérebro do inseto (ZACHARUK, 1980; ANTON & HOMBERG, 1999).



Figura 8. Micrografia eletrônica de varredura da antena fêmea adulta de *R. prolixus*. Vista ventral. Segmentos da antena: pedicelo (P), segmentos flagelares F1 e F2. Barra = 1 mm. As setas indicam os quatro tipos de sensilas: tricódea de paredes finas (TH), tricódea de paredes espessas (TK), basiconica (BA) e cerdas (BR-bristles). Barras = 50 µm. Adaptado de ORTIZ et al., 2011

Há diferentes tipos morfológicos de sensilas quimiossensoriais nos insetos, tricódea (olfativa - são multiporosas; gustativa - com um único poro na ponta), basiconica (olfativa), coeloconica (olfativa, embora possa também conter termo/higro receptores) e placodea (olfativa) (Fig. 9) (ALTNER & PRILLINGER, 1980). As sensilas olfativas podem ter uma parede única (tricódea, basicônica e placódea) ou dupla (coelocônica). A parede única pode ser grossa (tricódea) ou fina (placódea e basicônica) (GUIDOBALDI et al., 2014). *R. prolixus* apresenta inúmeras sensilas distribuídas da seguinte forma: mecanoreceptoras (caéticas), olfativas (tricóidea, basicônica e celocônica) e gustativas (tricóidea) (Fig. 8) (CHAIKA, 1980).



Figura 9. Esquema da sensila olfativa. (a) Estrutura interna da sensila olfativa. A sensila contém um ou mais NSOs, três células acessórias tecógena (Th), tricógena (Tr) e termógena (To), poros (P), cutícula (Cu), dendritos (D), célula epidérmica (E), axônio (Ax), lâmina basal (BL) e linfa sensilar (SL). (b) Tipos de sensilas quimiossensoriais. (a) sensila tricódea multiporosa (olfativa), (b) sensila tricódea uniporosa (gustativa), (c) sensila basiconica (olfativa) (d) sensila coeloconica (olfativa) e (e) placodea (olfativa). Adaptado de GUIDOBALDI et al., 2014.

1.6.2. Receptores Quimiossensoriais

Nos últimos anos, avanços significativos foram feitos na compreensão dos eventos relacionados à quimiorrecepção de insetos a nível da membrana dendrítica. Três classes de receptores envolvidos no olfato foram identificados: receptores olfativos (ORs), receptores ionotrópicos (IRs) e receptores gustativos (GRs) (Fig. 10) (GUIDOBALDI et al., 2014; WICHER, 2015).

Os receptores ionotrópicos (IRs) foram descritos inicialmente por BENTO et al. em 2009. Estes receptores fazem parte de uma família de proteínas transmembranares estruturalmente relacionadas com os receptores de glutamato presentes na região póssinápticas dos motoneurônios de insetos. Por isso, foram denominados de receptores ionotrópicos do tipo glutamato, pois apresentam evolução independente dos ORs, que é uma das características dos protostômios (RYTZ et al., 2013). Os IRs são expressos conjuntamente com um co-receptor (existem diferentes correceptores) nos NSOs (particularmente em sensilas coelocônica) em que não há expressão de ORs e/ ou Orco (SCOTT et al., 2001; COUTO et al., 2005; YAO et al., 2005; GUIDOBALDI et al., 2014). Estudos apontam que os IRs funcionam como canais iônicos dependentes de ligantes, estes canais não seletivos conduzem Na⁺ e K⁺, embora alguns também conduzam Ca²⁺. Semelhante aos ORs eles necessitam do complexo IRX e IRcoY para obter resposta ao odor. A especificidade ao odor é determinada pelo IRX (ABUIN et al., 2011; WICHER, 2015). Estudos sugerem que os IRs possuem um papel especificamente dedicados a detecção de compostos nitrogenados, ácidos graxos de cadeia curta, aldeídos e ésteres (BENTON et al., 2009; OLIVIER et al., 2010; RYTZ, CROSET & BENTON, 2013).



Figura 10. Receptores quimiossensoriais de insetos. (A) Receptores olfativos são heterómeros compostos por um co-receptor olfativo, ORCO e um OR específico para odores, OrX para odores alimentares (incluindo também odores de locais de oviposição, predadores, substâncias tóxicas, etc.) e OrY para feromônios. (B) receptores gustativos (GRs). Os receptores gustativos para percepção de dióxido de carbono formam heterodímeros de Gr1 ou Gr2 e Gr3. (C) Receptores ionotrópicos (IRs) são heterotetrameros compreendendo um co-receptor IRcoY e um receptor IRX. Ambos IRco e IRX são proteínas com 3 hélices transmembranares separadas por uma região extracelular contribuindo com o domínio de ligação ao odor (LBD-em inglês *ligand-binding domain*). P indica a região com poro. O coreceptor tem um domínio amino terminal (em inglês amino-terminal domain ATD). Adaptado de WICHER ,2015.

Receptores gustativos (GRs) estruturalmente relacionados com os ORs de insetos; são normalmente expressos nas sensilas gustativas (LORENZO & MELO, 2012) e estão envolvidos com a percepção de CO₂ (SUH et al., 2004; JONES et al., 2007; KWON et al., 2007). A percepção deste gás é possível através da dimerização de pelo menos dois receptores gustativos. Em *An. gambiae*, por exemplo, pode ser o AgGR22 ou AgGR23 e o AgGR24 (homólogos dos receptores de *Ae. Aegypti*: AeaGR1 ou AeaGR2 e AeaGR3, respectivamente) (KENT et al., 2008) que são coexpressos em um único NSO e codificam receptores funcionais como um heterodímero (LU et al., 2007).

1.6.3. Transdução do sinal olfativo via ORs

Semioquímicos (odores) presente no ambiente podem penetrar nas antenas através dos poros da parede cuticular externa das sensilas olfativas. Assim, o semioquímico entra em
contato com a linfa sensilar aquosa rica em proteínas solúveis. Estes semioquímicos, de modo geral, são moléculas hidrofóbicas e, portanto, mesmo em baixas concentrações não entram em solução. Assim, essas moléculas precisam ser solubilizadas por proteínas ligadora de odor (*odorant binding proteins* - OBPs). As OBPs transportam semioquímicos através da linfa sensilar que preenche a cavidade em torno dos dendritos e, finalmente, os odores são liberados próximos aos receptores olfativos (ORs), onde terá início a transdução do sinal olfativo (LEAL, 2012). Imediatamente após a propagação do impulso nervoso, o sistema requer uma rápida inativação das moléculas de odor para que o OR fique disponível para a detecção de novos estímulos. Na literatura, são propostos dois modelos para explicar como ocorre a inativação da molécula de odor. Um dos modelos propõe que a inativação ocorra através de uma armadilha molecular desconhecida e, o segundo modelo sugere que a inativação do odor se dá através da ação rápida de uma enzima de degradação de odor (Fig. 11) (ISHIDA & LEAL, 2005).



Figura 11. Representação esquemática do modelo de ligação da molécula de odor e sua inativação. A detecção do odor se inicia com a entrada da molécula de odor na sensila através de poros presentes na parede cuticular (1). Ocorre em seguida a ligação da molécula de odor à OBP (2). O complexo formado odor/OBP é transportado pela linfa sensilar até o OR (3). O receptor olfativo (B) conjuntamente com o co-receptor olfativo ORCO (A) ao receber a molécula de odor iniciam a transdução do sinal olfativo (4). Após a transdução de sinal, a molécula de odor é liberada do OR (5), seguido da inativação do odor por uma armadilha molecular desconhecida (6) e/ou pela ação rápida de uma enzima de degradação de odor (ODE) (7). Adaptado de LEAL (2012).

1.6.4. Receptores olfativos

O início da década de 90 foi um marco para os estudos de proteínas envolvida na olfação. Linda Buck e Richard Axel foram os primeiros a identificar e descrever um receptor de olfativo (ORs) em epitélio nasal de ratos (BUCK e AXEL, 1991). Buck e Axel (1991) propuseram que os ORs eram membros da família de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e que eram codificados por genes expressos exclusivamente nos tecidos olfativos. Pela descoberta dos receptores olfativos, Buck e Axel foram agracriados com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2004 (MOMBAERTS, 2004).

Em seguida, uma ampla gama de ORs foram identificados em várias espécies, incluindo os seres humanos (SELBIE et al., 1992; BEN-ARIE et al., 1994), peixe (NGAI et al., 1993; BYRD et al., 1996), ofídeo (LUO et al., 1994), canídeos (ISSEL-TARVER e RINE, 1996), em aves (NEF et al., 1996) e na marmota (MATARAZZO et al., 2000), revelando uma grande homologia na sequência primárias das proteínas entre os Chordata (MOMBAERTS, 1999). Estratégias baseadas em homologia dos ORs de mamíferos foram conduzidas em insetos para identificar candidato a ORs, mas sem êxito (MONTAGNE et al., 2015). Algumas tentativas de clonar ORs de abelhas com oligonucleótidos degenerados derivados de sequências de mamíferos apenas amplificaram contaminantes de vertebrados (DANT et al., 1994; MONTAGNE et al., 2015). Paralelamente, foi possível ampliar o conhecimento sobre os ORs em invertebrados a partir de estudos usando como modelo o nematóide Caenorhabditis elegans, que foi o primeiro invertebrado a possuir ORs caracterizados (MCCLINTOCK e SAMMETA, 2003). Assim, foi identificada uma nova família de ORs denominadas de SR (serpentine receptor ou receptor do tipo serpetina). Os SRs são muito divergentes quanto à composição de aminoácidos e apresentam pouca identidade quando comparados com os ORs dos vertebrados sugerindo uma origem evolucionária independente (TROEMEL et al., 1995).

A partir do projeto genoma de *D. melanogaster* e do acesso livre aos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) vários grupos de pesquisa iniciaram estudos para descrever candidatos a receptores olfativos e proteínas relacionadas ao processo de olfação em insetos (CLYNE et al., 1999; GAO e CHESS, 1999; VOSSHALL et al., 1999). Os grupos basearam-se na hipótese que nos insetos o processo de olfação ocorreria com a participação de proteínas do tipo GPCR, semelhante ao processo de olfação dos vertebrados. Utilizando diferentes algorítimos, três grupos de pesquisa conseguiram de forma independente identificar regiões que codificavam proteínas

transmembranares (TMs) no genoma de *Drosophila*. Estudos funcionais e de hibridização *in situ* revelaram, posteriormente, ser correta a hipótese. Usando esta estratégia foram identificados 19 ORs em *D. melanogaster*, chamados sequencialmente de OR1-OR19. Quando o projeto genoma foi concluído o número de ORs em *D. melanogaster* foi ampliado para 48 (ADAMS et al., 2000). Em uma análise posterior do genoma foram identificados 62 receptores olfativos codificados por 60 genes (ROBERTSON, WARR e CARLSON, 2003).

Anos mais tarde, foi demonstrado que os ORs de insetos são proteínas do tipo GPCRs que apresentam 7 domínios transmembranares, mas possuem uma topologia na membrana celular distinta das GPCRs clássicas (MONTAGNE et al., 2015; BENTON et al., 2006; BENTON et al., 2015). Diferente do que ocorre em outros organismos, nos insetos os ORs apresentam a porção amino-terminal voltada para região intracelular (BENTON et al., 2006; LUNDIN et al., 2007). Curiosamente, não apresentam homologia com os receptores olfativos acoplados a proteína G de vertebrados (WISTRAND, KALL e SONNHAMMER, 2006) e são bem divergentes entre si, apresentando menos de 10 % de identidade na sequência de aminoácidos entre os membros de uma mesma família (BENTO et al., 2015).

A quantidade de ORs varia muito entre as diferentes espécies de insetos. Nos dípteros, foram descritos 62 em *D. melanogaster* (ROBERTSON, WARR & CARLSON, 2003), 79 em *An. gambiae* (PITTS *et al.*, 2011), 131 em *Ae. aegypti* (BOHBOT *et al.*, 2007) e 177 em *Culex quiquefasciatus* (LEAL *et al.*, 2013). A variação é maior entre os lepidópteros: 10 em *Spodoptera exigua* (LIU *et al.*, 2015), 43 em *Cydia pomonella* (BENGTSSON *et al.*, 2012), 47 em *Manduca sexta* (GROBE-WILDE *et al.*, 2011), 48 no bicho da seda, *Bombyx mori*, (WANNER *et al.*, 2007 a) e 60 em *Helicoverpa armigera* (LIU *et al.*, 2014 b). *Tribolium castaneum* apresenta descrito em seu genoma 259 candidatos a ORs (ENGSONTIA *et al.*, 2008). O inseto com maior número de candidatos a receptor olfativo descrito até o momento é o himenóptero *Linepithema humile* com 367 ORs (SMITH *et al.*, 2011). No grupo dos triatomíneos *R. prolixus* apresenta 116 candidatos a ORs no genoma (MESQUITA *et al.*, 2015).

Dois tipos de receptores são co-expressos nos NSOs. Um correceptor olfativo universal, denominado Orco (VOSSHALL & HANSSON, 2011) e, um receptor olfativo propriamente dito, conferindo especificidade ao neurônio (KAUPP, 2010). Sabe-se que a funcionalidade de um OR depende da co-expressão do Orco. Esta conclusão foi obtida a partir de estudos que mostraram aumento nas respostas eletrofisiológicas em células que expressavam simultaneamente um OR e o Orco, sugerindo que o dímero é a unidade funcional que confere à célula a capacidade de resposta olfativa (SATO *et al.*, 2008; NAKAGAWA & VOSSHALL, 2009; KAUPP, 2010). Nos insetos é comum a oligomerização dos receptores para forma um par funcional. Em *D. melanogaster* os receptores gustativos GR21 e GR63, presentes nas sensilas basicônicas do tipo AB1 nas antenas, formam um dímero que responde à presença de CO₂ (GOLDMAN *et al.*, 2005; HALLEM & CARLSON, 2006; KAUPP, 2010).

O Orco faz parte de uma família de proteínas transmembranares com 7 domínios (STENGL e FUNK, 2013). Diferente dos ORs convencionais cujas sequências primárias de aminoácidos são bastante divergentes, a sequência primária do Orco é conservada entre os insetos (NAKAGAWA et al., 2012; STENGL e FUNK, 2013). Além disso, há apenas um gene que codifica o co-receptor nas espécies de insetos (OLAFSON, 2013; STENGL & FUNK, 2013). Alguns estudos propõem que a presença do Orco é necessária para a correta localização e estabilização dos ORs nas membranas dendríticas (LARSSON et al., 2004; BENTON et al., 2006; STENGL e FUNK, 2013). Alternativamente, o co-receptor poderia, também, desempenhar um papel decisivo para a ligação transiente e a transdução de sinal por meio do complexo heteromérico OR-Orco. Usando uma cepa mutante de D. melanogaster, que não expressava o Orco, foi possível verificar o papel do Orco na localização e estabilidade dos ORs na membrana dendrítica (LARSSON et al., 2004). Moscas mutantes apresentavam distorções quanto a localização dos ORs nos NSOs (LARSSON et al., 2004). Os pesquisadores também observaram que moscas silenciadas para o Orco, por RNA de interferência (RNAi), apresentaram alterações nas respostas eletrofisiológicas às moléculas de odor (LARSSON et al., 2004). Estes dados reforçam a importância da presença do correceptor para a correta detecção do odor (LARSSON et al., 2004).

Fundamentado, principalmente, por trabalhos com moscas e mariposas diferentes hipóteses para a transdução do sinal olfativo mediado por OR foram testadas e, aparentemente, mais de um mecanismo pode existir (GUIDOBALD et al., 2014). Sato et al. (2008) propuseram que o mecanismo de transdução de sinal olfativo em insetos seria do tipo ionotrópico (Fig. 12). A estimulação do OR pelo odor, conduziria a um influxo de Ca^{2+} e a um aumento da condutância de cátions não seletivos, mostrando que o processo ionotrópico de transdução do sinal é independente das vias que envolvem segundos mensageiros acoplado ao sistema de proteína G.

Wicher et al. (2008) propuseram que o Orco em si seria um canal de cátions, e que ele poderia ser ativado por duas diferentes vias: uma do tipo ionotrópica e a outra metabotrópica (Fig.13). A primeira via ionotrópica seria rápida. Nesta via a molécula de odor se ligaria ao OR específico e ocorreria a abertura imediata do canal iônico Orco. A segunda via metabotrópica seria mais lenta. Nesta a transdução do sinal olfativo ocorria pelo mecanismo do segundo mensageiro, com a ativação da cascata da proteína G e da adenilato ciclase, que geraria aumento na concentração de AMPc, provocando uma corrente iônica que levaria a fosforilação do canal ORCO via proteína quinase C (PKC) abrindo o canal.



Figura 12. Modelos do mecanismo de transdução do sinal olfativo em uma típica sensila olfatória. Após a entrada de uma molécula de odor pelo poro da cutícula sensilar, a molécula é transportada por uma OBP até um OR específico, presente na membrana dendrítica de um NSO. Normalmente, OBPs e ORs ligam-se apenas a um composto de odor específico ou um conjunto de compostos de odor. Três hipóteses têm sido propostas para a transdução do sinal olfativo: **Hipótese ionotrópica.** O complexo heteromérico OR-Orco forma um canal de cátions que se abre quando o odor se liga ao OR levando a um processo de transdução de sinal ionotrópico (Sato et al., 2008). OR + odor, conduz a um influxo de Ca²⁺ e um aumento da condutância do cátion não seletiva. Este processo ionotrópico de transdução do sinal é independente das vias envolvendo os segundos mensageiros acoplado ao sistema de proteína G (SATO et al., 2008). Adaptado de GUIDOBALDI et al., 2014

Outros estudos propõem que quando uma molécula de odor se liga ao seu OR, a ligação ativa uma proteína G que, por sua vez, ativa a fosfolipase C. A ativação destas proteínas contribuiria para o aumento da concentração de inositol trifosfato (IP3). O aumento de IP3 ativaria um canal de Ca²⁺ fazendo com que os níveis intracelulares de Ca²⁺ se elevem. O aumento de Ca²⁺ ativaria os canais de cátions dependentes deste íon levando a um aumento na concentração de diacilglicerol (DAG) que ativaria uma PKC que ativaria outros canais de cátions, incluíndo o Orco, aumentando assim sua condutância e levando a uma corrente

metabotrópica adicional (Fig. 13) (STENGL et al., 1999; STENGL & FUNK, 2013; GUIDOBALDI et al., 2014).



Figura 13. Modelos do mecanismo de transdução do sinal olfativo em uma típica sensila olfatória; 1-Cascata ionotrópica e metabotrópica (hipótese Wicher et al., 2008); 2-cascata metabotrópica (STENGL & FUNK, 2013). **1- Cascata ionotrópica e metabotrópica.** De acordo com esta hipótese o próprio Orco é o canal de cátions que é ativado por duas vias. Na primeira via (rápida, ionotrópica) o odor ativa o OR, que por sua vez ativa o canal do Orco. Na segunda via (lenta, metabotrópica) a ativação do OR resulta na ativação de uma proteína G e uma adenilato ciclase. Isto resulta em um aumento da concentração de AMPc, que provoca uma corrente iônica somente após a fosforilação do Orco via proteína quinase C (WICHER et al., 2008). **2- Hipótese metabotrópica.** A ligação do odor ao OR ativa uma proteína G e uma fosfolipase C β (PLC β). Isso resulta em um aumento de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) que aumenta as concentrações intracelulares de Ca²⁺, através da ativação rápida destes canais dependentes IP3. O influxo de Ca²⁺ resulta na abertura de canais de cátions dependentes do cátion que dá suporte a uma corrente de transdução breve. Um aumento maior de Ca²⁺ ou de longa duração juntamente com diacilglicerol ativam a proteína quinase C que ativa outros canais de cátions e assim fosforila o Orco aumentando a sua condutância (STENGL & FUNK, 2013). Adaptado de GUIDOBALDI et al., 2014

1.6.4.1. Estudo funcional de receptores olfativos

Embora muitos candidatos a ORs estejam disponíveis, a maioria não tem função definida, ou seja, seus ligantes não são conhecidos (MONTAGNE et al., 2015). Em virtude da necessidade de conhecer a função dos ORs, a comunidade científica tem desenvolvido e adaptado técnicas de expressão heteróloga, tanto *in vivo* como *in vitro*, com alta capacidade e

rendimento (MONTAGNE et al., 2015). As técnicas de expressão heteróloga *in vitro* normalmente são escolhidas devido a praticidade e a velocidade dos ensaios. Em insetos, os sistemas de expressão heteróloga mais utilizados para estudar a função dos OR são os ovócitos de *Xenopus laevis*, células embrionárias de tecido renal (HEK), células de insetos Sf9, células S2 e High-Five (KIELY et al., 2007; ANDERSON et al., 2009; CLAUDIANOS et al., 2014; HILL et al., 2015; JUNG et al., 2015; TSITOURA et al., 2010; GERMAN et al., 2013).

O sistema de expressão heteróloga em ovócito de X. laevis tem sido bastante utilizado para a expressão de proteínas olfativas (MONTAGNE et al., 2015). As características dos ovócitos como tamanho e metabolismo são vantajosas para utilização deste sistema (HATCHER-SOLIS et al., 2014). Os ovócitos são injetados com RNA complementar (cRNA), preparado in vitro a partir de um cDNA que codifica a proteína de interesse (HATCHER-SOLIS et al., 2014). No caso do estudo com ORs de insetos, são injetados uma mistura do cRNA de ORX com a mesma quantidade de cRNA do Orco. Os ovócitos injetados são aclimatizados nas condições favoráveis para seu desenvolvimento por um período de aproximadamente 3 a 7 dias, afim de que expressar heterologamente o OR e o Orco (NAKAGAWA et al., 2005). Neste sistema de expressão, normalmente é utilizado a técnica de patch-clamp que consiste em introduzir 2 eletrodos nos ovócitos injetados para aferir a corrente elétrica induzida pelos semioquímicos testados (HATCHER-SOLIS et al., 2014). A expressão em ovócito de X. laevis seguido do registro do perfil eletrofisiológico foi utilizado pela primeira vez na caracterização funcional do receptor olfativo 43a de Drosophila (WETZE et al., 2001). Mais tarde, esse protocolo tornou-se amplamente utilizado para a prospecção de moléculas atrativas ou repelentes em insetos pragas de lavouras ou vetores de doença (CAREY et al., 2010; WANG et al., 2010; LIU et al., 2013; XU et al., 2014; PELLETIER et al., 2015). XU et al. (2014) usando ensaios de expressão heteróloga, eletrofisiologia, eletroantenograma e silenciamento gênico por RNAi mostraram que os repelentes DEET, IR3535 e picaridina se ligavam especificamente ao OR136 no mosquito C. quinquefasciatus. LIU et al. (2013) ao utilizarem o sistema de expressão heteróloga em ovócitos de X. laevis conseguiram identificar dois receptores de feromônio da mariposa Spodoptera exigua, os ORs SexiOR13 e SexiOR16 que são abundantemente expressos nas antenas dos insetos machos e respondem aos componentes do feromônio sexual dessa espécie.

Outro sistema de expressão heteróloga *in vitro* bastante utilizado para o estudo funcional de ORs, é a expressão em células embrionárias HEK seguido do registro de influxo de cálcio por técnica de *calcium imaging* ou *patch-clamp* (MONTAGNE et al., 2015). A

expressão heteróloga em linhagens de celulas HEK tem demonstrado ser bastante atrativa devido a estabilidade e a capacidade de expressão dessas linhagens celulares transformadas com ORX e Orco. Além disso, este sistema possui uma alta compatibilidade com leitores de placas (MONTAGNE et al., 2015). LIU et al. (2016) ao expressarem os receptores OR10 e OR88 de *Ae. albopictus* em linhagens de celulas HEK293 demonstraram que estes receptores são responsivos aos voláteis emitidos pelos humanos, portanto, relacionados a localização do hospedeiro vertebrado. Além da expressão heteróloga em ovócitos de *Xenopus* e em celulas HEK293, outros sistemas de expressão *in vitro* são bastante utilizados: células de insetos Sf9 (KIELY et al., 2007; ANDERSON et al., 2009; CLAUDIANOS et al., 2014; HILL et al., 2015; JUNG et al., 2015), B5 (TSITOURA et al., 2010) e High-Five (TSITOURA et al., 2010; GERMAN et al., 2013).

Além dos sistemas de expressão heteróloga de ORs *in vitro*, também é muito utilizado o sitema *in vivo*, conhecido como *empty neuron* de *Drosophila*. Neste sistema, um candidato a OR é expresso no lugar do receptor DmelOR22a endógeno nas antenas da mosca da fruta. Em seguida, é verificado o registro por eletroantenograma com um painel de diferentes odores (MONTAGNE et al., 2015). CAREY et al. (2010) investigaram a função de 72 ORs do mosquito da malária *An. gambiae* através deste sistema *in vivo*. Os autores conseguiram com sucesso deofanizar receptores como o AgamOR8 que responde ao 1-octen-3-ol, composto presente no suor humano e atrativo para os mosquitos. O sistema de expressão *in vivo* já foi empregado para diversas espécies de insetos (SYED et al., 2006; CAREY et al., 2010; MONTAGNE et al., 2012; RONDEROS et al., 2014).

A técnica de RNA de interferência (RNAi) vem sendo largamente empregada para caracterização funcionais das proteínas olfativas. ZHU et al. (2013) usando ensaio de expressão heteróloga em ovócitos de *X. laevis* e eletrofisiológia demonstraram que os receptores OR37 e OR99 de *Cx. quinquefasciatus* respondiam aos compostos 4-metilfenol e 4-etilfenol. Os autores testaram a hipótese de que estes semioquímicos seriam compostos atrativos para localização de sítio de oviposição usando bioensaios. De fato, eles comprovaram que fêmeas de mosquito eram atraídas e tinham as taxas de oviposição aumentadas na presença destes compostos. Finalmente, usando o silenciamento gênico por RNAi, os autores puderam confirmar a função destes receptores. Outros autores têm utilizado a técnica de RNAi seguido de ensaios de comportamento ou de ensaios de eletrofisiologia possibilitando a identificação das funções de genes olfativos, tais como o Orco, ORs e proteínas transportadoras de odor (ENGSONTIA et al., 2008; PELLETIER et al., 2010; ZHAO et al., 2011; DONG et al., 2013; WANG et al., 2015; FRANCO et al., 2016; SUN et

al., 2016; ZHANG et al., 2017). Franco et al. (2016) demonstraram o papel essencial do Orco para a sobrevivência do *R. prolixus*, a deficiência na expressão do co-receptor provocou uma perda na capacidade do inseto de localizar o hospedeiro vertebrado. Além disso, foi verificado que os insetos silenciados para o Orco ingeriam uma menor quantidade de sangue e, consequentemente, apresentaram uma maior taxa de mortalidade e baixas taxas de ecdise e de oviposição.

A caracterização funcionalmente de receptores olfativos em insetos visa a prospecção de semioquímicos atrativos e repelentes que poderão ser empregados em armadilhas de captura e/ou como repelentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterização funcional de receptores olfativos do vetor da doença de Chagas, *Rhodnius prolixus*, visando a prospecção de semioquímicos atrativos e repelentes para este vetor.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Selecionar os ORs por homologia de sequências de proteína de ORs de outros insetos;
- ✓ Identificar os ORs expressos exclusivamente nas antenas por técnica de PCR convencional;
- ✓ Quantificar a expressão gênica dos ORs por técnica de PCR quantitativo;
- ✓ Selecionar os ORs mais abundantes em machos;
- ✓ Expressar potenciais ORs selecionados ativos em ovócitos de X. laevis;
- ✓ Identificar potenciais ligantes de ORs através de técnica de eletrofisiologia;
- Verificar se os compostos responsivos a técnica de eletrofisiologia provocam alguma resposta comportamental nos insetos em bioensaios de alimentação e comportamental de atração ou repelência;
- Confirmar o papel funcional dos receptores olfativos com seus ligantes por técnica de RNAi.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Insetos

Os insetos *R. prolixus* foram criados e mantidos, à temperatura de $26 \pm 2^{\circ}$ C com umidade variando de 70 a 75 %, no insetário do Laboratório de Bioquímica de Insetos do Instituto de Bioquímica Médica na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os insetos foram alimentados com sangue de coelho, com intervalos de 21 dias para os adultos e intervalos variados de 3 a 5 semanas para as ninfas do 1° ao 5° estádio de desenvolvimento. Após serem transportados para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Vetores/IQ, os insetos foram aclimatados em estufas mantendo as condições de temperatura e umidade. Neste estudo foram utilizados insetos machos de 5° estádio de ninfa e adultos (machos e fêmeas).

3.2. Declaração de ética em pesquisa

Todos os protocolos de cuidado e experimentação animal foram conduzidos seguindo as diretrizes do Comitê de Avaliação do Uso de Animais para Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que é baseado no Guia do Instituto Nacional de Saúde e Uso de Laboratório Animais dos EUA (ISBNo-309-05377-3). Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Avaliação do Uso de Animais para Pesquisa (CAUAP) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número de registro CEAU-UFRJ nº 1200.001568 / 2013-87, 155/13. Os técnicos dedicados a criação de animais na UFRJ eram treinados para a criação de coelhos sob rígidas diretrizes para garantir o manejo cuidadoso e consistente dos animais. Todos os protocolos envolvendo voluntário humano foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEP/HUCFF/UFRJ), e foram baseados na Resolução CNS N° 466 de 2012 e na Norma Operacional do CNS N° 001/2013 do Conselho Nacional de Saúde. O protocolo foi aprovado pelo CEP/HUCFF/UFRJ recebendo o número de registro CAAE-UFRJ nº 82075818.1.0000.5257-2/2018.

3.3. Triagem dos receptores olfativos

As sequências referentes aos genes candidatos a receptores olfativos (ORs) no genoma do R. prolixus foram obtidas a partir do banco de dados do VectorBase (https://www.vectorbase.org/organisms/rhodnius-prolixus). 116 Foram identificados candidatos ORs de *R. prolixus*, e em seguida, as sequências gênicas foram organizadas em um único arquivo no formato fasta. Paralelamente, foram selecionados aproximadamente 114 ORs de outros insetos cuja a função e o ligante eram conhecidos (Tabela suplementar 1). A triagem dos ORs, que seriam utilizados no presente estudo, foi feita baseada na análise filogenética utilizando na construção da árvore um total de 230 ORs, sendo os 114 ORs préselecionados na literatura e 116 candidatos a ORs do R. prolixus depositado na plataforma vectorBase. Para o alinhamento das sequências protéicas foi utilizado o programa Praline (http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/). A análise e a contrução da árvore filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA 7. A árvore filogenética foi gerada usando o método de Neighbor-Joining com 1000 replicatas (bootstrap). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *p*-distance e representam o número de diferenças de aminoácidos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências. No conjunto de dados finais existiam 523 posições e, desta forma, foi construida uma árvore filogenética contendo 10 ramos.

3.4. Dissecção dos tecidos, extração de RNA total e síntese de cDNA

Antenas, patas e probóscides foram dissecados com auxílio de pinças de aço inoxidável. Para a dissecção, os insetos foram anestesiados a baixa temperatura (aproximadamente 8° C). Em seguida, foram fixados através do tórax com alfinetes entomológicos em uma placa plana de isopor envolvida em papel alumínio. Após a fixação os tecidos foram coletados individualmente e separados em tubos de polipropileno acondicionados em gelo. Em seguida procedeu-se a extração do RNA.

A extração do RNA total foi realizada pelo método do TRIzol® (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA após extração foi avaliada em gel de agarose 1% em tampão TAE pH 8 (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), corado com GelRed[™] Nucleic Acid Stain (Biotium). Após a extração, o RNA foi armazenado a -80 °C até o

momento do uso. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu). A absorvância (ABS) em 260 nm foi relacionada à concentração de RNA de forma que uma unidade de ABS, em um caminho ótico de 1 cm, equivaleria a 40µg/mL. O valor de ABS a 280 nm também foi avaliada a fim de checar a existência de contaminação por proteínas. Para que o RNA possa ser considerado adequado para uso, a razão entre ABS 260 nm e 280 nm deve ter um valor de 1,8 a 2,0. O RNA foi tratado com a enzima DNAse I livre de RNAse (Fermentas Life Sciences, Portugal) e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir do RNA dos diferentes tecidos, utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit com RNase Inhibitor (Applied Biosystems). Por fim, o material foi tratado com RNase H (New England Biolabs) e armazenado a -20 °C até sua utilização.

3.5. Reação em cadeia da polimerase

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados usando o programa *Primer3*. Os parâmetros de Tm e GC % foram avaliados usando o programa *OligoAnalyzer*. A formação de estruturas secundárias indesejadas foi analisada pelos programas *Beacon Designer* e *UNAFold* (THORNTON & BASU, 2011).

Para as reações de PCR convencional foi utilizado o *kit* GoTaq®Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, cada reação continha 5 µL da mistura de reação do kit, que possui a enzima Taq DNA polimerase, 2 µL de H₂O nuclease-free, 2 µL de cDNA diluído 1:10 e 1 µL dos iniciadores específicos senso e anti-senso [5 µM] (Tabela 1). As reações foram realizadas em termociclador *Veriti® Thermal Cycler - 96 well* (Apllied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e consistiram de 45 ciclos para os ORs e 25 ciclos para o gene de referência, *R18S* (MAJEROWICZ *et al.*, 2011). As condições de reação incluiram: 95 °C/2 min, seguido pelas etapas de desnaturação a 95 °C/30 seg, anelamento a 55 °C/30 seg e a etapa de extensão a 72 °C/30 seg. A reação era finalizada a 72 °C/5 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE pH 8 (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), corado com GelRedTM Nucleic Acid Stain (*Biotium*) e as imagens digitalizadas em fotococumentador DNR MiniBIS Pro Bio-Imaging Systems (Bio America Inc. Texas, EUA).

3.6. PCR quantitativo (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas em termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), utilizando SsoAdvanced[™] Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) em um volume final de 10 µL. As concentrações finais dos oligonucleotídeos iniciadores variaram entre 400nM e 600nM, e a do cDNA 1:10. Os iniciadores apresentavam eficiência variando de 88-131%. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos qPCRs foram desenhados para amplificar uma região de ~130 bp (Tabela 1). As reações foram realizadas em triplicatas biológicas e experimentais, em placa ótica de 96 poços, nas seguintes condições: 95°C/30 seg; etapas de desnaturação a 95°C/15 seg; 50°C/15 seg e extensão a 72° C/30 seg, por 44 ciclos e, por fim, curva de dissociação, em condições padrão do aparelho.

3.7. Análise dos resultados de qPCR

Os valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos traduzem o número de ciclos necessários para produzir uma quantidade determinada de fluorescência. Estes valores foram normalizados usando como referência o gene *R18S* (MAJEROWICZ *et al.*, 2011). Os Cts normalizados foram usados para calcular o nível de expressão gênica relativa nas amostras usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os dados foram apresentados como média ± erro padrão de três experimentos independentes.

A análise estatística da expressão relativa dos ORs foi feita a partir dos valores de Ct utilizando ANOVA seguida por teste de Tukey para comparação entre todos os grupos. A diferença entre os grupos foi considerada significativa para valores com p< 0,05.

Tabela 1. Lista de primers para PCR convencional e quantitativo.

Gene	VectorBase Access #	Primer sequence (5`- 3')	Fragmento (bp)
R18S	RPRC017412-RA	For-TGTCGGTGTAACTGGCATGT	115
		Rev-TCGGCCAACAAAAGTACACA	
ORco	RPRC000476-RA	For-ATGGTAATGAGTTCGACGTA	135
		Rev-ACCATAAGTTCCTGCTTCTT	
OR1	RPRC000579-RA	For-CCGCCCAATTTCAACTACTC	92
		Rev-AGCCTCTTCACTCATTTCCA	
OR2	RPRC001689-RA	For-GCAATCCAAGAGGCAAGACC	151
		Rev- GCCGATACCAGAAACAATACTAAAGA	
OR3	RPRC000059-RA	For- CCATTTTGGATAGCATTCTCTCTGC	91
		Rev-CGATGGTAAAATAAGTGGCTGAACC	
OR8	RPRC001154-RA	For-ATTCGGTCTTCTTTCAACGCTACTT	126
		Rev- GGCACCTCCTCTCCTTCGT	
OR9	RPRC000895-RA	For-CTTTGTAGCGTTCCTCTGTTCGCCT	100
		Rev- CTGTGCCTGGTTTGTCGGTTCCT	
OR16	RPRC000420-RA	For-CCCCATACCCACATGGATTCCCTA	110
		Rev-AAGTGCCGAATATTAAGCCAACAT	
OR18	RPRC000616-RA	For- GGTCAAATTGGTTGTTGCTAGTTGG	105
		Rev-ATTAATAGCTCCATTTCCAGATGC	
OR19	RPRC000449-RA	For-TGCCTACAAATACTGCCTCAAAGAA	103
		Rev- ACTCACAAAGACTGGTACAGAAAGG	

Tabela 1. Lista de primers para PCR convencional e quantitativo.

Gene	VectorBase Access #	Primer sequence (5`- 3')	Fragmento (bp)
OR24	RPRC001980-RA	For-AGAAGCCCAACTTAGACTATCTGGT	97
		Rev- GGAGTTCGCATGTCAAGATAAATAC	
OR25	RPRC000029-RA	For- CTATGGCTCTGTCTGGTTTGTATCT	85
		Rev- ATCGGTTTGTGTGTGCTGTTTGAATG	
OR40	RPRC000229-RA	For-AAACTATTTGTAGCTGTGCTGGT	125
		Rev-GGCAGAGATGTTTCTCATATCCTT	
OR41	RPRC000146-RA	For- GCTTTCTTCTTTGTGATTGGTT	143
		Rev- TTTATGAACTCCTGTTCCCAC	
OR42	RPRC000108-RA	For-TGGCGTCCAACCAATGAATG	108
		Rev- CACCAGATGATGCCCCAAAA	
OR43	RPRC000140-RA	For- TTCCTTTGGACGGCTATCT	110
		Rev-TGCTACATTATTTGCGACGA	
OR44	RPRC001291-RA	For- GCTTTGGCGTATTCTTTCC	87
		Rev- GGCAATCTTTCATTCTGACATT	
OR46	RPRC001292-RA	For- TCGCAGTTATATTCCGTTTAGAAGA	114
		Rev- AGCCAAAGATTAGTTTCAGCCA	
OR47	RPRC000413-RA	For- CAGATACCACTGAAATACCACCAA	147
		Rev-TTGTGCCGACTAAATACGCAA	
OR53	RPRC002122-RA	For-ACTTTTTGTAGCTGGAATTATGGTG	117
		Rev- CAGTGTTCAAGATCATCAATCAAAC	

Tabela 1. Lista de primers para PCR convencional e quantitativo.

Gene	VectorBase Access #	Primer sequence (5`- 3')	Fragmento (bp)
OR66	RPRC000452-RA		
OR67	RPRC000222- RA	For-CGGAAATTCGCCAACTGAT	127
OR68	RPRC000541-RA	Rev-TCCAAAAAACATTCCATAA	157
OR74	RPRC000200-RA	For-TTTCTGGCGTAATTGTGTTTGCTAC	123
		Rev-TGCTCTTATCGTTTGCTTGTTTCTTC	
OR80	RPRC000441-RA	For-GAACCGAATCAATCACGCAAACGA	109
		Rev-CGCCAAACACTCCACAAACAAGG	
OR83	RPRC006981-RA	For- TTCAGTTTGAAGATTTTACAAGA	164
		Rev- TCACCGATGATGCCAGTGATGA	
OR101	RPRC000188-RA	For-AAACTGAAGGAAAGGAAACACT	141
		Rev- CATGCAACACATCGGCTAC	
OR106	RPRC000371-RA	For-TTGAAAGAATCCGTGAAACATCATC	126
		Rev- AAAGCCAGACAAACAGAGCATAAA	
OR108	RPRC000301-RA	For-TGGTATGGAGAACAACTACAAAGA	190
		Rev- TCAGCACATTTGAATAGGAATTGAG	
OR111	RPRC002142-RA	For- TTGGTAATGTTGACTTCGGTGG	157
		Rev- TTCTGACCCAAATATCGTGTGTATC	

3.8. Clonagem e sequenciamento dos ORs

Usando o critério de expressão majoritária nas antenas de machos, selecionamos 4 genes para expressão heteróloga: OR1 (RPRC000579-RA), OR3 (RPRC000059-RA), OR74 (RPRC000200-RA), e OR80 (RPRC000441-RA). Para estes quatro 4 genes, a sequência completa foi amplificada por PCR convencional (item 3.5). Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados e utilizado na clonagem em pGEM-T Easy. Devido a dificuldades na clonagem do ORF do OR1, este gene foi sintetizado. Em seguida, os clones (pGEM-T Easy) foram utilizados como molde na reação de PCR com primers específicos para cada OR contendo na sequência as enzimas de restrição XmaI e XbaI (Tabela 2). Os produtos de PCR purificado, foram clonados em vetor de expressão pGEMHE utilizando o In-fusion HD Cloning kit (Clontech, Mountain View, CA, EUA). Para a reação de ligação inicialmente o plasmídeo (pGEMHE) foi linearizado com as enzimas de restrição XmaI e XbaI (Tabela 2). Posteriormente, o plasmídeo linearizado e os produtos de PCR foram mensurado em nanodrop e diluído para atingir a concentração de 10 ng/ μ L para o cálculo da razão molar da reação de ligação inserto-vetor (2:1). A ligação foi feita com 1 µL do plasmídeo linearizado (pGEMHE) a 10 ng/ μ L, 0.6 μ L do produto de PCR purificado e 0.4 μ L de In-Fusion HD Enzyme Premix. A reação foi incubada a 50°C por 15 min. Células de Escherichia coli (Stellar Competent Cells) foram usadas para a propagação do plasmídeo segundo o protocolo do fabricante. 1,5 µL do plasmídeo contendo o inserto foi adicionado a um tubo contendo 20 µL de células de E. coli competentes, seguido de incubação no gelo por 30 min. Para incorporação do DNA do plasmídeo, as bactérias foram submetidas a choque térmico, por transferência para banho a 42 °C/45 seg e incubação no gelo por 2 min. Ao tubo contendo as células transformadas foi adicionado 100 µL do meio de cultura SOC. As células foram incubadas em agitador a 37 °C/1 h. Após este período, as células foram plaqueadas em meio seletivo contendo meio LB sólido com ampicilina 100 µg/mL, e as placas incubadas em estufa a 37 °C overnight. No dia seguinte, as colônias foram coletadas com a ponta de palitos de madeira estéreis e, individualmente, adicionados a tubos de polipropileno, homogeneizadas em 10 µL de H₂O nuclease-free. Em seguida, foi retirado 2 µL do homogeneizado para a reação de PCR de colônia. Para o PCR foi utilizado 5 µL de GoTaqTM Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 1 µL da mistura dos iniciadores específicos (senso e antisenso) (10 µM) (Tabela 2) e 3 µL de H₂O nuclease-free. As reações foram realizadas em termociclador Veriti® Thermal Cycler-96 well (Aplliedd Biosystems) com a seguinte programação: 95 °C/2 min, seguido pelas etapas de desnaturação a 95 °C/30 seg, anelamento a 55 °C/30 seg e a etapa de extensão a 72 °C/30 seg. A reação foi finalizada a 72°C/5 min. Ao final, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE pH 8 (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), corado com brometo de etídio e as imagens digitalizadas.

As colônias positivas foram propagadas em 2 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 µg/mL, em agitação vigorosa (220 RPM) a 37°C *overnight*. Os plasmídeos foram purificados utilizando o QIAprep Spin Miniprep Kit (QUIAGEN, Hilden, Alemanha). Todas as etapas de purificação foram realizadas de acordo com o manual do fabricante que envolve diversas etapas de homogeneização e centrifugação. Ao final, a coluna foi recolocada em um novo tubo estéril e adicionado 50 µL do tampão de eluição (EB), seguido de centrifugação por 1 min a 17000 g. Esta etapa foi repetida 2 vezes. Em seguida, os plasmídeos foram sequenciados na Davis Sequencing Facility na Universidade da Califórnia em Davis (EUA), usado o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction e o aparelho ABI PRISM DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems). Finalmente, as sequências foram analisadas utilizando o alinhamento dos clones com a sequências dos receptores olfativos disponibilizadas na base de dado da plataforma VectorBase.

3.9. Digestão dos plasmídeos para a síntese de cRNA

Os plasmídeos contendo os receptores olfativos foram linearizados com as enzimas de restrição NheI, SphI ou PstI. Para esta reação foi utilizado 70 μ L do clone dos ORs, 10 μ L do tampão 10X NEBuffer, 4 μ L da enzima de restrição (NheI, SphI ou PstI) e 16 μ L de H₂O nuclease-free. Todos os componentes foram homogeneizados via pipetagem e a reação foi incubada a 37° C *overnight*. Em seguida os plasmídeos foram purificados e precipitados pelo método do fenol-clorofórmio.

Receptor	VectorBase Access #	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')	Size (bp)
ORco	RPRC000476-RA	GATCAATTCCCCGGGACCATGCAGAA	CAAGCTTGCTCTAGAATTTCAATTGT	1422
		AGTGAAGATGCAT	ACCAGCACCA	
OR1	RPRC000579-RA	GATCAATTCCCCGGGACCATGGAAGA	CAAGCTTGCTCTAGA TTATTTAGTTGA	1230
		ATTTGCTGGGATTGATG	TGATTTCACCGAGCC	
OR3	RPRC000059-RA	GATCAATTCCCCGGGACCATGGATATC	CAAGCTTGCTCTAGATTAAGTATTTT	1323
		TTGCAAAGATTTAAAGATTTCCTCC	GAAAGCCAACAGTAGACTGAAGTAT	
OR74	RPRC000200-RA	CACCCCCGGGATGAATTTTAAAAGGCT	TCTAGACTAATCAGCTGTTTCC	1122
		TTCACCAATACA	AAGTTGC	
OR80	RPRC000441-RA	CACCCCCGGGATGGTAACGGAAAATT	TCTAGATTAATCTGTCTCCAGG	1137
		TATCTCCAGTAAAG	TTGATTATCA	

Tabela 2. Iniciadores paras as reações de PCR para clonagem. Sublinhado esta destacada as enzimas de restrição XmaI ou XbaI e em negrito o fragmento de okazaki

3.10. Extração e precipitação de DNA pelo método fenol-clorofórmio

Ao tubo contendo 100µL da amostra, foram inicialmente adicionados 100µL de fenolclorofórmio, seguida de agitação cuidadosamente em vortex e incubação por 20 min/TA. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 21.000g/15min/4°C. O sobrenadante (aproximadamente 100µL) foi coletado e, em seguida, adicionado 10 µL de acetato de sódio [3M] e homogeneizado em vortex gentilmente. 110µL de isopropanol foi adicionado ao tudo que foi incubado a -20°C/*overnight*. Ao final da incubação, o tubo foi centrifugado a 21.000 g/15 min/4°C e, imediatamente, todo o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se ao tubo 100 µL de etanol 75 % e, novamente, o tubo foi centrifugado a 21.000g/15min/4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado na posição horizontal para que todo o resíduo de etanol evaporasse. O precipitado foi ressuspendido em 5µL de H₂O nuclease-free.

3.11. Síntese de cRNA

Os plasmídeos linearizados, purificados e precipitados por fenol-clorofórmio foram utilizados como moldes para a síntese do cRNA utilizando o kit mMESSAGE mMACHINE T7 seguindo o protocolo do fabricante. Brevemente, $1,5\mu$ L do plasmídeo linearizado foi homogeneizado em 2,5 μ L de 2XNTP/CAP. Em seguida, foi adicionado 0,5 μ L de tampão (10x) e 0,5 μ L de T7 *enzyme mix*. Os tubos foram incubados por 2h/37°C. Imediatamente após o término da incubação, 0,5 μ L da enzima DNAse foi adicionado seguido de incubação por 15 min/37°C. A última etapa incluiu a adição de 8 μ L de H₂O nuclease-free, 8 μ L de cloreto de lítio seguido de incubação a -20°C/*overnight*. No dia seguinte, o tubo contendo cRNA foi centrifugado a 21.000g/15min/4°C e, imediatamente, todo o sobrenadante foi descartado e ao tubo foi adicionado 100 μ L de etanol 75 % e, novamente, centrifugado a 21.000g/15min/4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado na posição horizontal para evaporar todo o resíduo de etanol. O precipitado foi ressuspendido em 5 μ L de H₂O nuclease-free. Em seguida, o cRNA foi quantificado em nanodrop, diluído para a concentração de 200ng/ μ L e armazenado a -80°C até o momento de uso.

3.12. Expressão heteróloga e estudo de eletrofisiologia

Os cRNAs (2 ng de ORX e 2 ng de Orco) foram micro injetados em ovócito de *X. laevis* nos estágios V ou VI (EcoCyte Bioscience, Austin TX). Os ovócitos foram incubados a 18° C por 3–7 dias em Barth's (NaCl [88mM], KCl [1mM], NaHCO₃ [2,4mM], MgSO4 [0,82mM], Ca(NO₃)₂ [0,33mM], CaCl² [0,41mM], HEPES [10mM], pH 7,4) suplementado com gentamicina [10µg/mL], estreptomicina [10µg/mL] e piruvato de sódio [1,8 mM]. A corrente elétrica induzida pelos compostos químicos testados (Tabela suplementar 2) foi registrada através de 2 eletrodos pela técnica *patch clamp* usando um potencial de -80mV. Os sinais foram captados em amplificador OC-725C (Warner Instruments, Hamden, CT), nas frequências de 50 Hz a 1 kHz. A aquisição e a análise dos dados foi realizada, respectivamente, com o programa Digidata 1440A e pCLAMP 10(Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA).

3.13. Painel de semioquímicos

Os compostos utilizados no registro de eletrofisiologia foram adquiridos pelas empresas Bedoukian Research, Inc e Sigma-Aldrich. Todos os compostos estão descritos na Tabela 2 dos anexos. Além desses compostos foram utilizados os extratos da cutícula de insetos machos e fêmeas. Os compostos 1-dodecanol foi adquirido pela empresa Acros, 1-butanol pela Fisher Scientific, octadecyl acetate foi doação da empresa Bedoukian Research, Inc. Os compostos 2-metil-3-buten-2-ol, (2S)-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol e (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol, foram gentilmente cedido pelo professor Carl Rikard Unelius da Universidade de Linnaeus/Suécia.

3.14. Preparação dos extratos da cutícula dos insetos

Os insetos foram mergulhados individualmente por um período de aproximadamente 2 min em um recipiente estéril contendo 10 mL de hexano, foram utilizados aproximadamente 100 insetos de cada gênero, separadamente. Após a passagem de todos os insetos no solvente, eles foram descartados. No final da preparação foi padronizada o volume total do extrato para 10 mL cada amostra. No total foram preparadas uma amostra do extrato da cutícula de insetos machos e de insetos fêmeas.

3.15. Bioensaio

O bioensaio foi realizado de acordo com o protocolo proposto por ZERMOGLIO et al (2015). Foi utilizado um olfatômetro de tubo de poliestileno de aproximadamente 10 cm de comprimento por 2 cm diâmetro. O olfatômetro foi dividido em 3 zonas denominadas zona de fuga (ZF), zona intermediária (ZI) e zona do hospedeiro (ZH) (Figura 14).

No momento inicial do ensaio a ZF era separada das demais por um anteparo que impedia o inseto alcançar as demais zonas. Para o bioensaio foi recrutado um voluntário humano que serviu de "isca" para atrair o inseto. Cada grupo era constituído por 10 insetos testados individualmente 3 vezes. Os insetos do grupo 1 (controle-1) foram testados na presença do volutário humano que posicionava o braço a uma distância de 2 cm do olfatômetro na extremidade oposta a localização do inseto próximo a um papel de filtro seco. Os insetos do grupo 2 (hexano) foram testados na presença da isca humana e com o papel de filtro embebido com 50 µL de hexano. O grupo 3 (DEET 1%) foi constituído por insetos testados com a isca humana e o papel de filtro embebido em 50 µL de DEET 1%. Os insetos do grupo 4 foram testados individualmente e em dias diferentes na presença da isca humana e com o papel de filtro embebido em 2-heptanona, acetocenona, y-octalactona e 4metilciclohexanol nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1%. Uma tela de proteção, entre as ZH e o voluntário humano impedia o contato entre eles. Para aclimatação, cada inseto permanecia por 5 min na ZF. Após este período, o anteparo que retinha o inseto era removido. O tempo que inseto levava para alcançar a ZH era registrado por 300 segs. Quando o inseto chegava a ZH, o cronômetro era zerado e iniciado novamente para aferir o tempo de permanência. Ao final, todos os dados foram agrupados e o comportamento dos insetos nos diferentes grupos foram avaliados. O tempo de permanência médio (+/- erro padrão) foi calculado individualmente.



Figura 14. Desenho esquemático do protocolo do bioensaio. ZH = zona do hospedeiro; ZI = zona intermediária; <math>ZF = zona de fuga. Adaptado de ZERMOGLIO et al., 2015.

3.16. Ingestão de sangue na presença dos compostos

Para quantificar a massa de sangue ingerida pelos insetos, na presença dos compostos, foi utilizado o protocolo de FRANCO et al. (2016). s insetos foram divididos em 5 grupos contendo 10 insetos cada: grupo 1 – hexano; grupo 2 - semioquímicos [0,01%]; grupo 3 - semioquímicos [0,1 %]; grupo 4 – semioquímicos [1 %]; e grupo 5 - DEET (1%). Para o bioensaio foi utilizado um recipiente de vidro de formato cilíndrico de 10 cm de altura por 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 (*Oryctolagus cuniculus*) como fonte alimentar (Fig. 15).

Os insetos eram pesados 2 h antes e 2 h após a alimentação sanguínea. Posteriormente, era calculada a massa de sangue ingerida pela diferença de peso após e antes da alimentação. O tempo de 2 h após a alimentação foi escolhido baseado no estudo de RIBEIRO (1996) que mostrou que as ninfas de *R. prolixus* podem eliminar, em até 6 h, seis vezes a sua massa corporal.



Figura 15. Fotografia do bioensaio de ingestão de sangue segundo FRANCO et al. (2016).

Receptor	VectorBase Access #	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')	Size (bp)
OR80	RPRC000441-RA	TAATACGACTCACTATA	TAATACGACTCACTATA	371
		<u>GGG</u> TGTGCAAGCCCTTT	<u>GGG</u> ATACGCAGGTGGT	
		CAGTAA	GAACTCC	
Cquiβ-GAL	CPIJ003337-RA	TAATACGACTCACTATA	TAATACGACTCACTATA	492
		<u>GGG</u> AATGGTTCAGGTC	<u>GGG</u> CCGCCTCGTACAA	
		GAAAACG	AACAAGT	

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para síntese de dsRNA. Em sublinhado representa o promotor T7

3.17. Síntese de dsRNA

O dsRNA (dsOR80) foi sintetizado através da utilização dos plasmídeos pGEM-T Easy carreando o inserto do gene *OR80*. Estes plasmídeos foram usados como moldes em uma primeira reação de PCR com iniciadores específicos para o gene *OR80* que continha a sequência do promotor T7 (Tabela 3). Estas reações continham 25 μ L de GoTaqTM Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 18 μ L de H₂O nuclease-free, 5 μ L do plasmídeo e 1 μL de cada um dos iniciadores específicos (Tabela 3) [10μM]. As reações foram realizadas em termociclador Veriti® Thermal Cycler-96 well (Aplliedd Biosystems) com a seguinte programação: 95 °C/2 min, seguido pelas etapas de desnaturação a 95 °C/30 seg, anelamento a 55 °C/30 seg e a etapa de extensão a 72 °C/30 seg. A reação foi finalizada a 72 °C/5 min. Esta reação de PCR gerava um fragmento de aproximadamente 400 bp. Como controle de gene não relacionado foi utilizado dsRNA produzido a partir de um plasmídeo contendo a enzima que hidrolisa glicosídeos, β-galactosidase, do mosquito *Culex quinquefasciatus,* gentilmente cedido pelo Prof. Walter Leal da Universidade da Califórnia-Davis (XU et al, 2014).

Os produtos de PCR foram purificados seguindo o protocolo de purificação com fenolclorofórmio. Os produtos purificados foram novamente monitorados por eletroforese em gel de agarose 1% e a dosagem feita através de espectrometria em um comprimento de onda de 260 nm.

Os produtos de PCR do *OR80* e *CquiβGal*, contendo a sequência do promotor T7 ligada a região 5' foram utilizados como moldes para as reações de transcrição utilizando a enzima T7 RNA polimerase. As reações foram realizadas utilizando o kit MEGAScrip®RNAi (Ambion, Austin, EUA). Os dsRNAs foram produzidos em reações contendo 1µg de produto de PCR purificado, 2 µL do tampão de reação (10x), 2 µL de cada solução de ribonucleotídeos na concentração de 75 mM (ATP, GTP, CTP, UTP), 2 µL da enzima T7 RNA polimerase, completado o volume para 20 µL com H₂O nuclease-free. As reações foram incubadas a 37 °C/5 h. Após este período, a temperatura foi elevada para 85 °C/5 min e em seguida foram resfriadas a TA, para maximizar a formação das duplas fitas de RNA.

Do produto oriundo desta reação (dsRNA), foi retirado 1µL para verificar a especificidade e qualidade do dsRNA através de eletroforese em gel de agarose 1 %. Aos 19 µL restantes foram adicionados 31 µL de H₂O nuclease-free e o dsRNA foi purificado novamente seguindo o protocolo de purificação com fenol-clorofórmio. Após a purificação o dsRNA foi quantificado por espectrometria a 260 nm.

3.18. Injeção dsRNA

Ninfas de 5° estádio (machos) foram injetadas com 1 μ g dsRNA (dsOR80 ou dsCqui β Gal) diluído em 2 μ L de H₂O milli-Q autoclavada ou injetadas apenas com 2 μ L de H₂O milli-Q na cavidade metatoráxica. Para a injeção foi utilizada uma seringa Hamilton de 10 μ L.

3.19. Análise estatística

Os efeitos fenotípicos dos bioensaios foram avaliados utilizando ANOVA, seguido do teste de Tukey, foram consideradas diferenças estatisticamente significantes com p<0,05. A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o programa GraphPad PRISM 5.01.

Os valores de SEM (±) foram obtidos através da fórmula descrita abaixo em uma planilha do software Excel.

Fórmula =*STDEV*(*B1*:*B10*)/*SQRT*(*COUNT*(*B1*:*B10*))

4. RESULTADOS

4.1. Seleção dos receptores olfativos no genoma de R. prolixus

A análise filogenética permitiu inferir funções as proteínas candidatas a ORs de *R. prolixus* e dessa forma selecionar os ORs que seriam estudados. As sequências de nucleotídeos dos candidatos a ORs do *R. prolixus* foram obtidas no genoma deste triatomíneo disponível na plataforma Vectorbase (https://www.vectorbase.org/). Foram identificados 116 candidatos ORs de *R. prolixus* e para elucidar suas possíveis funções buscamos para comparação 114 ORs de outros insetos com funções conhecidas. A árvore filogenética foi gerada usando o método de Neighbor-Joining com 1000 replicatas (*bootstrap*). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *p-distance* e representam o número de diferenças de aminoácidos. A análise envolveu um total de 230 ORs, os 116 candidatos a ORs de *R. prolixus* e 114 ORs de diferentes espécies de insetos (Tabela suplementar 1). Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências. No conjunto de dados finais foram geradas 523 posições e, desta forma, foi construída a árvore filogenética contendo 10 ramos (Fig. 16).

No ramo 1, foram agrupados ORs responsáveis pela detecção de feromônios sexuais, voláteis de agregação e de odores atrativos de hospedeiros (Tabela 4). Neste ramo foi incluído apenas um candidato a receptor olfativo de *R. prolixus*, o OR1 (Fig. 16). O ramo 2 agrupou ORs exclusivos de *R. prolixus*, totalizando 38 receptores (Fig. 16). No ramo 3, foram agrupados receptores responsáveis pela detecção de feromônios de agregação, de atrativos de sítios de oviposição, de atrativos de hospedeiros e de moléculas repelentes. Dezoito candidatos a ORs de *R. prolixus* foram reunidos no ramo 3 (Fig. 16). No ramo 4, foram agrupados receptores de feromônio de agregação do percevejo da cama, *Cimex lectularis*, e neste ramo encontramos 4 candidatos a OR de *R. prolixus*, incluindo o OR2. Nos ramos 5, 6 e 7 foram reunidos receptores de feromônio sexual, de feromônio de agregação, atrativos de hospedeiro, feromônio de sítio de oviposição e voláteis com ação repelente. *R. prolixus* não apresentou OR no ramo 6. Apenas 2 candidatos a OR de *R. prolixus* foram encontrados, o OR14 no ramo 5 e no ramo 7, o co-receptor Orco.



Figura 16. Análise filogenética dos candidatos a receptores olfativos de *R. prolixus*. A análise filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA7 (KUMAR, STECHER & TAMURA, 2016) e o método Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987) com 1000 replicatas (*bootstrap*). As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método *p-distance* e envolveu 230 ORs. Foram obtidas 523 posições no conjunto final de dados. Ramo 1: feromônios sexuais, feromônios de agregação, atrativos do hospedeiro; Ramo 2: Função desconhecida - exclusivo de *R. prolixus*; Ramo 3: agregação de feromônios, atrativos de oviposição, atrativos do hospedeiro, repelentes; Ramo 4: feromônios de agregação; Ramo 5: Feromônio de agregação; Ramo 7: Feromônios sexuais, atrativos de oviposição, atrativos do hospedeiro, repelentes; Ramo 8: atrativos do hospedeiro, repelente, localização do local de oviposição; Ramo 9: feromônios de agregação; Ramo 10: exclusivo de *R. prolixus*. (•) indica os ORs selecionados.

No ramo 8 foram agrupados OR exclusivos de culicídeos. Neste ramo, encontramos receptores responsáveis pela detecção de atrativos do hospedeiro, de repelente e de atrativos de sítio de oviposição. O ramo 9 foi representado por ORs exclusivos do hemíptero, *C. lectularis*, e de 18 candidatos a OR de *R. prolixus*. Os receptores caracterizados em *C. lectularis* são responsáveis pela detecção de feromônio de agregação. Os ramos 2 e 10 reuniram ORs exclusivos de *R. prolixus*. O ramo 2 agrupou 38 ORs, enquanto o ramo 10 reuniu 30 ORs.

Para avaliar funções na identificação de semioquímicos que desencadeiam comportamentos em *R. prolixus* foram selecionados 28 ORs pertencentes aos ramos 1, 2, 4, 9 e 10: *OR1*, *OR2*, *OR3*, *OR8*, *OR9*, *OR16*, *OR18*, *OR19*, *OR24*, *OR25*, *OR40*, *OR41*, *OR42*, *OR43*, *OR44*, *OR46*, *OR47*, *OR53*, *OR66*, *OR67*, *OR68*, *OR74*, *OR80*, *OR83*, *OR101*, *OR106*, *OR108* e *OR111* (Tabela 4).

4.2. Perfil geral de expressão dos receptores olfativos de R. prolixus

Após a seleção *in silico* iniciamos a análise da expressão dos genes usando PCRconvencional. Nos insetos, apêndices como antenas, palpos maxilares e probóscides, de modo geral, estão envolvidos na percepção de odores. Desta forma, encontrar genes candidatos a *ORs* expressos, majoritariamente, nestes tecidos indica a participação do gene no processo de olfação. Todos os 28 genes candidatos a OR selecionados na análise filogenética (Fig.16) apresentaram expressão exclusiva nas antenas (Figs. 17, 18 e 19). Portanto, a presença de transcritos unicamente nas antenas, sugere a participação destes genes no processo de olfação de *R. prolixus*.

Apesar da técnica de PCR convencional ser ótima para a triagem inicial de genes olfativos, esta não permite verificar diferenças na quantidade de transcritos em um determinado órgão. Genes ORs diferencialmente expressos nas antenas de insetos machos ou de insetos fêmeas podem indicar função específica como, por exemplo, a detecção de feromônio sexual (machos) ou a detecção de voláteis de sítio de oviposição (fêmeas). Para verificar diferenças nas expressões dos *ORs* foi utilizada a técnica de qPCR. Foram avaliados transcritos dos 28 *ORs* nas antenas, nas patas e nas probóscides.

Tabela 4.	Lista d	le recep	otores	selecion	ados	por file	ogenia.
							0

				Receptores Olf	fativos (função)				
Gene		Posição na árvore (ramo)	Função desconhecida-	Feromônio	Atrativos-sitio de	Atrativos do hospedeiro		Feromônio agregação	Repelentes
	Gene	(runio)	Exclusivo de sexual <i>R. prolixus</i>		oviposição	Vertebrado Planta			repetences
1	OR1	1		Х	Х	X	Х	Х	X
2	OR2	4						Х	
3	OR3	2	Х						
4	OR8	2	Х						
5	OR9	2	Х						
6	OR16	2	Х						
7	OR18	2	Х						
8	OR19	2	Х						
9	OR24	2	Х						
10	OR25	2	Х						
11	OR40	9						Х	
12	OR41	9						Х	
13	OR42	9						Х	
14	OR43	9						Х	
15	OR44	9						Х	
16	OR46	9						Х	
17	OR47	9						Х	
18	OR53	9						Х	
19	OR66	10	Х						
20	OR67	10	Х						
21	OR68	10	Х						
22	OR74	10	Х						
23	OR80	10	Х						
24	OR83	10	Х						
25	OR101	3			X	X		X	X
26	OR106	2	Х						
27	OR108	2	Х						
28	OR111	2	X						



Figura 17. Análise da expressão dos *ORs* por PCR convencional: A) *OR16*; B) *OR42*, C) *OR44*, D) *OR66-67-68*. O RNA total foi extraído de antenas, patas e probóscides de machos e fêmeas adultos. O RNA foi tratado com DNAse I e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa. A reação de PCR foi realizada utilizando iniciadores específicos. O gene ribosomal *R18S* foi usado como controle endógeno. MA - Antenas de machos, FA - antenas de fêmeas, ML - patas de machos, FL - patas de fêmeas, MP- probóscides de macho, FP - probóscides de fêmeas.



Figura 18. Análise da expressão dos *ORs* por PCR convencional: A) *OR2*, B) *OR40*, C) *OR101*. O RNA total foi extraído de antenas, patas e probóscides de machos e fêmeas adultos. O RNA foi tratado com DNAse I e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa. A reação de PCR foi realizada utilizando iniciadores específicos. O gene ribosomal *R18S* foi usado como controle endógeno. MA - Antenas de machos, FA - antenas de fêmeas, ML - patas de machos, FL - patas de fêmeas, MP- probóscides de macho, FP - probóscides de fêmeas.



Figura 19. Análise da expressão dos *ORs* de *R. prolixus* por PCR convencional:A) *OR8*, B) *OR9*, C) *OR18*, D) *OR19*, E) *OR24*, F) *OR25*, G) *OR41*, H) *OR43*, I) *OR46*, J) *OR47*, K) *OR53*, L) *OR83*, M) *OR106*, N) *OR108*, O) *OR111*. O RNA total foi extraído de antenas, patas e probóscides de machos e fêmeas adultos. O RNA foi tratado com DNAse I e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa. A reação de PCR foi realizada utilizando iniciadores específicos. O gene ribosomal *R18S* foi usado como controle endógeno. MA - Antenas de machos, FA - antenas de fêmeas, ML - patas de machos, FL - patas de fêmeas, MP- probóscides de macho, FP - probóscides de fêmeas.

Curiosamente, apesar de terem sido anotados no genoma como genes distintos, os genes OR66, OR67 e OR68 são, aparentemente, isoformas de um mesmo gene. Devido ao elevado grau de homologia (identidade >94%) não foi possível desenhar olinonucleotídeos iniciadores que atendessem a todos os critérios de um bom par de iniciadores (% GC, tm) e que diferenciassem estes genes entre si nos ensaios de PCR. Desta forma, neste estudo os genes OR66, OR67 e OR68 foram considerados um gene único.

4.2.1. ORs expressos nas antenas de insetos machos e de insetos fêmeas

Conforme observado previamente no PCR convencional, os genes OR16, OR42, OR44e OR66-67-68 (Fig. 17) apresentaram quantidades equivalentes de transcritos nas antenas de insetos machos e fêmeas, sem diferenças estatísticas no perfil de expressão (OR16, p=0,8261; OR42,p=0.9689 ; OR44, p=0,9856) (Fig. 20). Foram identificados poucos transcritos dos genes OR16 e OR42 nas probóscides e nas patas de fêmeas quando comparado com as antenas de insetos adultos (OR16 – (MA, FA) X FP, p<0,0001, FP X (MP, ML, FL), p=0,9999 e OR42 (MA, FA) X (MP, FP, ML, FL), p<0,0001, MP X ML X FP X FL, p=0,9967) (Fig. 20). Baseado no perfil de expressão dos genes, descritos acima, em antenas (Fig. 20) e na análise filogenética, a qual reuniu estes genes em ramos exclusivos de hemípteros (Fig. 16), podemos inferir que os genes OR16, OR42, OR44 e OR66-67-68, podem ter papel importante na detecção de voláteis relacionados com comportamentos intrínsecos do *R. prolixus* ou de hemípteros em geral.

4.2.2. ORs enriquecidos e/ou exclusivos das antenas de insetos fêmeas

A análise dos géis de agarose do material proveniente do PCR convencional revelaram que 3 genes eram expressos exclusivamente nas antenas de insetos fêmeas, (*OR2, OR40* e *OR101*) (Fig. 18). E, de fato, este perfil foi confirmado por qPCR (Fig. 21), onde foi observado poucos ou nenhum transcrito desses genes nos demais órgãos analisados (Fig. 21). Apesar de bandas, provenientes da amplificação dos genes *OR8, OR9, OR18, OR19, OR24, OR25, OR41, OR43, OR46, OR47, OR53, OR83, OR106, OR108* e *OR111* terem sido observadas, nos géis, de antenas de ambos os sexos (Fig. 19), no ensaio de qPCR, estes genes mostraram-se expressos em maior quantidades, significativamente, nas antenas de insetos fêmeas (Fig. 21). Entretanto, existi quantidades mensuráveis de RNA nas antenas de insetos machos, em todas as análises realizadas.



Figura 20. Expressão relativa dos *ORs* de *R. prolixus* por qPCR: A) *OR16*, B) *OR42*, C) *OR44*, D) *OR66-67-68*. O RNA total foi extraído de antenas, patas e probóscides de insetos machos e fêmeas adultos. O RNA foi tratado com DNAse I e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa. As reações de qPCR foram realizadas utilizando SYBR Green e iniciadores específicos para cada gene. O nível de expressão dos *ORs* nas antenas de macho (MA) foi considerado basal (ou 1). O gene ribossomal *R18S* foi usado como controle endógeno para normalizar o nível de expressão. As barras representam a média da expressão ± erro padrão de 3 experimentos independentes. MA - antenas de machos, FA - antenas de fêmeas, ML - patas de machos, FL - patas de fêmeas, MP- probóscides de macho, FP - probóscides de fêmeas. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando ANOVA seguida do teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas, p< 0,0001. *OR16:* MA X FA, p=0,8261; (MA, FA) X (MP, FP, ML, FL), p< 0,0001; MP X FP X ML X FL, p>0.9999. *OR42:* MA X FA, p=0,9689; (MA, FA) X (MP, FP, ML, FL), p<0,0001; MP X ML X FP X FL, p=0,9967. *OR44:* MA X FA, p=0,9856; (MA, FA) X (MP, FP, ML, FL), p<0,0001; MP X ML X FP X FL, p>0,9999. *OR66-67-68:* MA X FA, p=0.9999; (MA, FA) X (MP, FP, ML, FL), p<0,0001; MP X ML X FP X FL, p>0,9999.


Figura 21. Expressão relativa dos *ORs* de *R. prolixus* por qPCR: A) *OR2*, B) *OR8*, C) *OR9*, D) *OR18*, E) *OR19*, F) *OR24*, G) *OR25*, H) *OR40*, I) *OR41*, J) *OR43*, K) *OR46*, L) *OR47*, M) *OR53*, N) *OR83*, O) *OR101*, P) *OR106*, Q) *OR108* e R) *OR111*. O RNA total foi extraído de antenas, patas e probóscides de machos e fêmeas adultos. O RNA foi tratado com DNAse I e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa. As reações de qPCR foram realizadas utilizando SYBR Green e iniciadores específicos para cada gene. O nível de expressão dos ORs nas antenas de macho (MA) foi considerado basal (ou 1). O gene ribosomal *R18S* foi usado como controle endógeno para normalizar o nível de expressão. As barras representam a média da expressão ± erro padrão de 3 experimentos independentes. MA -antenas de machos, FA - antenas de fêmeas, ML - patas de machos, FL - patas de fêmeas, MP- probóscides de macho, FP - probóscides de fêmeas. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando ANOVA seguida do teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas, p< 0,0001. *OR2*: MA X FA, p= 0,0002; (MP, FP, ML, FL), p=0,3979. *OR9*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR8*: MA X FA, p= 0,0006(MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR2*4:MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p=0,9990. *OR19*: MA X FA, p=0,0066(MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR2*4:MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR43*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR44*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR46*: MA X FA, p<0,0001 (MA, MP, MP, FP, L), p>0,9999. *OR41*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR43*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR43*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR44*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR44*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR45*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR45*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL), p>0,9999. *OR45*: MA X FA, p<0,0001; (MP, FP, ML, FL)

Neste ponto, podemos observar que alguns genes são expressos principalmente nas antenas de insetos fêmeas. A quantidade de transcritos, nestas antenas, dos genes *OR2*, *OR25*, *OR43 e OR53* foi 1,5 vezes maior do que a encontrada nas antenas de insetos machos; 2,0 a 2,5 vezes maior para os genes *OR19*, *OR24* e *OR108*; 3,0 a 3,5 vezes maior para os genes *OR8*, *OR9*, *OR18* e *OR101*; 4 a 6 vezes maior para os genes *OR41*, *OR46*, *OR47* e *OR83*; 8 vezes maior para *OR106*; 10 vezes maior para o *OR111* e 70 vezes maior para o gene *OR40* (Fig. 21).

Comparando estes resultados de expressão como o perfil de distribuição dos genes na árvore filogenética, podemos observar que os genes *OR106* e *OR111* encontram-se reunidos no ramo 2 da árvore (Fig. 16). Neste ramo, estão agrupados ORs exclusivos de *R. prolixus*. Este fato, associado a grande quantidade de transcritos presentes nas antenas de insetos fêmeas, sugere que os OR106 e OR111 participem da detecção de voláteis relacionados à comportamentos peculiares de insetos fêmeas.

Nesta mesma linha de raciocínio, o gene *OR40*, que apresentou 70 vezes mais transcritos nas antenas de insetos fêmeas quando comparado a antenas de insetos machos, foi agrupado na árvore filogenética no ramo 9 (Fig. 16). Neste ramo, foi encontrado exclusivamente receptores olfativos responsáveis pela detecção de feromônio de agregação do hemíptero hematófago, *C. lectularius*. Portanto, podemos sugerir que o OR40 de *R. prolixus* tenha um papel detecção de feromônios de agregação semelhante aos ORs encontrado no percevejo de cama, *C. lectularius*.

4.2.3. ORs enriquecidos e/ou exclusivos de antenas de insetos machos

A análise dos géis de agarose do material proveniente do PCR convencional revelou que 2 genes foram expressos exclusivamente nas antenas dos insetos machos, os genes OR1 e OR3 (Fig. 22A, 22B), não sendo detectado produto de amplificação nos demais órgãos. Entretanto, a análise quantitativa mostrou a presença de transcritos do gene OR1 tanto nas antenas de insetos machos quanto de fêmeas (Fig. 23). Contudo, as antenas de insetos machos apresentaram um enriquecimento do OR1 2 vezes maior quando comparado aos transcritos nas antenas de insetos fêmeas(p<0,0001). Do mesmo modo, não houve produto de PCR amplificado de OR1, no ensaio de qPCR, em amostras de cDNA de patas e probóscides (Fig. 23).

Semelhante ao OR1, o OR3 foi detectado apenas nas antenas de insetos machos no ensaio PCR convencional (Fig. 22 B) e detectado nas antenas de machos e fêmeas quando

utilizado o qPCR (Fig. 23). A quantidade de transcritos de *OR3* foi 5 vezes maior nas antenas de insetos machos quando comparada com antenas de insetos fêmeas (Fig. 23). Além disso, pouca quantidade de transcritos do gene *OR3* foram detectadas em amostras de probóscides de insetos fêmeas e de machos e em amostras de patas de insetos machos em ensaio de qPCR (Fig.23).

Na análise filogenética, podemos observar que o OR1 foi agrupado no ramo 1, onde encontram-se diversos receptores olfativos responsáveis pela detecção de uma gama variada de voláteis em diferentes espécies (Fig. 16; Tabela 4). Por outro lado, o OR3 mostrou estar relacionado na árvore filogenética com receptores exclusivos de *R. prolixus*, agrupando-se no ramo 2 (Fig. 16). Portanto, podemos inferir que no caso do OR3 pode existir uma relação plausível deste receptor com a detecção de semioquímicos relacionados com a ecologia química da espécie *R. prolixus*.

O perfil de expressão dos genes OR74 e OR80, no PCR convencional, mostrou produto amplificado tanto nas antenas de insetos machos como nas antenas de fêmeas (Fig. 22). Os demais órgãos, não apresentaram produtos de amplificação detectáveis (Fig. 22). A quantidade de transcritos de OR74 e OR80 foi aproximadamente 5 vezes maior nas antenas de insetos machos quando comparada com antenas de fêmeas (Fig. 23). Além disso, pouca quantidade de transcritos do gene OR74 foram detectadas em amostras de patas e de probóscides de insetos machos e fêmeas, no ensaio de qPCR (Fig.23). E pouca quantidade de transcritos do gene OR80 foram detectadas em amostras de machos e fêmeas (p>0,9999) (Fig. 23).

Na análise filogenética podemos observar que os receptores OR74 e OR80 foram agrupados no ramo 10. Neste ramo, encontramos os receptores olfativos exclusivos de *R. prolixus* (Fig. 16). Comparando os resultados obtidos no qPCR para os genes *OR74* e *OR80* com a análise filogenética podemos sugerir que estes receptores participem da detecção de voláteis relacionados com a ecologia de insetos machos de *R. prolixus*, como, por exemplo, a detecção de feromônios sexuais proveniente de fêmeas.



Figura 22. Análise da expressão dos *ORs* de *R. prolixus* por PCR convencional: A) *OR1*, B) *OR3*, C) *OR74*, D) *OR80*. O RNA total foi extraído de antenas, patas e probóscides de machos e fêmeas adultos. O RNA foi tratado com DNAse I e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa. A reação de PCR foi realizada utilizando iniciadores específicos desenhados para a sequência dos ORs. O gene ribosomal *R18S* foi usado como controle endógeno. MA - antenas de machos, FA - antenas de fêmeas, ML - patas de machos, FL - patas de fêmeas, MP- probóscides de macho, FP - probóscides de fêmeas.



Figura 23. Expressão relativa dos ORs de *R. prolixus* por qPCR: A) *OR1*, B) *OR3*, C) *OR74*, D) *OR80*. O RNA total foi extraído de antenas, patas e probóscides de machos e fêmeas adultos. O RNA foi tratado com DNAse I e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa. As reações de qPCR foram realizadas utilizando SYBR Green e iniciadores específicos para cada gene. O nível de expressão dos ORs nas antenas de macho (MA) foi considerado basal (ou 1). O gene R18S foi usado como controle endógeno para normalizar o nível de expressão. As barras representam a média da expressão ± erro padrão de 3 experimentos independentes. MA -antenas de machos, FA - antenas de fêmeas, ML - patas de machos, FL - patas de fêmeas, MP- probóscides de macho, FP - probóscides de fêmeas. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando ANOVA seguida do teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas, p< 0,0001. OR1: MA X FA, p<0.0001; (MP, FP, ML, FL), p=0,9999. OR3: MA X FA, p<0.0001; (FA, MP, FP, ML, FL), p=0,9984. OR74: MA X FA, p<0.0001; (FA, MP, FP, ML, FL), p>0,9999.

4.3. Expressão heteróloga e resposta eletrofisiológica

O genoma de *R. prolixus* decreveu 116 candidatos a receptores olfativos. Na tentativa de identificar ORs envolvidos na detecção de constituintes de feromônio sexuais comparamos, através de uma análise filogenética, os ORs de *R. prolixus* com ORs de outros insetos cujos ligantes eram conhecidos. Para o estudo da análise filogenética, foram selecionados 230 genes de ORs de várias espécies de insetos, inclusive os 116 genes *ORs* de *R. prolixus* (Fig. 16); usando o critério de expressão majoritária nas antenas de machos, selecionamos 4 genes para expressão heteróloga: *OR1* (RPRC000579-RA), *OR3* (RPRC000059-RA), *OR74* (RPRC000200-RA), e *OR80* (RPRC000441-RA).

Ressaltamos que o OR1 se agrupou no ramo 1, que inclui ORs de outras espécies responsáveis pela detecção de feromônios sexuais, de atrativos de localização de sítios de oviposição, localização do hospedeiro, de agregação e de moléculas repelentes (Fig. 16). Os três demais ORs 3, 74 e 80, selecionados agruparam-se nos ramos 2 e 10, exclusivo de ORs de *R. prolixus*.

Nós consideramos que esses genes seriam candidatos a receptores de feromônios, devido a predominância de transcritos nas antenas de insetos machos. Para testar essa hipótese, a sequência completa de cada gene foi amplificada por PCR convencional e, posteriormente, os produtos de PCR foram clonados no vetor de expressão pGEMHE. Em seguida, cada gene foi co-expresso, obrigatoriamente, com o co-receptor olfativo, Orco, na membrana de ovócitos de *X. leviae*. Em seguida, cada complexo ORx•Orco foi testado contra um painel de diferentes semioquímicos e a resposta eletrofisiológica a cada um dos odorantes do painel teste foi registrada.

O painel de odorantes foi constituído por 109 semioquímicos (odores) (Tabela suplementar 2), incluindo quatro feromônios putativos sintéticos de *R. prolixus*, 2-metil-3-buten-2-ol, (2S)-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol e (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol (PONTES et al., 2008). Foram testados, também, dois agonistas do Orco: 2-{[4-ethil-5-(4-piridinil) -4H-1,2,4-triazol-3il] sulfanil} N-(4-isopropilfenil) acetamida (OCL12) e 2- (4-Etil-5- (piridin-3-il) -4H-1,2,4-triazol-3-iltio) -N- (4-etilfenil) acetamida (VUAA-1) (CHEN & LUETJE, 2012). Os semioquímicos avaliados pertenciam a diferentes classes químicas, alguns descritos na literatura como fisiologicamente ativos para dípteros como, por exemplo, o 1,3-octenol, a octanal e o nonanal.

Inicialmente, cada ovócito expressando o complexo ORx•Orco foi testado contra os agonistas do Orco, o OCL12 e o VUAA. Estes testes iniciais, com agonistas, possibilitam

determinarmos se o complexo OR•Orco foi expresso corretamente na membrana do ovócito de *X. leviae*. Quando um ovócito está expressando adequadamente o complexo ORx•Orco, os agonistas do Orco, OCL12 e VUAA promovem correntes elétricas induzidas maiores comparadas às correntes elétricas induzidas em ovócitos que expressam somente o Orco. Baseado nas respostas obtidas pelo estímulo dos agonistas do Orco é possível inferir se um receptor olfativo não responde a um determinado semioquímico do painel teste ou se o receptor não está adequadamente expresso com o Orco.

4.3.1. Perfil de resposta eletrofisiológica do OR1

O gene *OR1* (RPRC000579-RA) codifica uma proteína com 409 aminoácidos (Fig. 24). Devido a dificuldades na clonagem do ORF do *OR1*, este gene foi sintetizado e posteriormente subclonado em vetor de expressão pGEMHE. As sequências consenso dos clones foram comparadas com a sequência, RPRC000579-RA, depositada na plataforma VectorBase, confirmando 100% de identidade (Fig. 25). A presença de sete domínios transmembranares e a topologia invertida da proteína foi determinada usado a ferramenta Octopus (http://octopus.cbr.su.se/) (Fig. 26).

O complexo OR1•Orco expresso na membrana dos ovócitos de *X. leviae* apresentou uma forte resposta ao agonista do Orco, OCL12, mostrando que o conjunto, recetor e co-receptor estava corretamente expresso na membrana do ovócito (Fig. 27B). Em seguida, os semioquímicos do painel foram aplicados a membrana dos ovócitos e as respostas registradas. O complexo OR1•Orco não respondeu a nenhum dos constituintes do feromônio sexual de *R. prolixus* (Fig. 27A). Entretanto, estes ovócitos apresentaram moderada resposta aos compostos: 3-metil-1-butanol, metil butirato, (Z)-3-hexenil acetato, pentanal, 1-pentanol, 2,3-butanodiona, 2-undecanona, e mentona (Fig. 27A). O perfil de resposta a diferentes compostos sugeriu que o OR1 é um receptor olfativo não específico, podendo se ligar e identificar diferentes semioquímicos.

atggaagaatttgctgggattgatgttaagtatttcaaggttataggcctatggcagctt MEEFAGIDVKYFKVIGLWOL L M P S R N G K Y A V V L S A F I G T I ttcacggtacatatcagcatacaaatgattaacacttttctcggtggttatgatttttcc F T V H I S I Q M I N T F L G G Y D F s aaatttactgaaaaactatcagtaaatctgacctgttttgaatcagctataaaaatttta K F T E K L S V N L T C F E S A I K I L tattattgttggaatcgtaacaatttgatgaatttaatttcattgtttcgtaaaaattta YYCWN RNN LMNLISLFRKNL ctaatttgctcaacacatgagccagaaaagtctaggaaaattctaacaaattcagcccga LICSTHEPEKSRKILTNSA R tttgtgaatttgtgcactaaaagttttgtatatatgatattctgcacagttggcgtatgg F V N L C T K S F V Y M I F C T V G V W aattctttgccaattttgcgctgcctaattagcgatgattgtgaatcatggcatataatg N S L P I L R C L I S D D C E S W H I M ccgtcctggtatccgttcaacactaaacaaataccaatgaacatcattgtctacagtttt P S W Y P F N T K O I P M N I I V Y S F E F L I M S Y C A A L L Y T V N C L F S gcgctggcgctcacagtggccgcccaatttcaactactcggcgttagttttgccaccatc A L A L T V A A Q F Q L L G V S F A T I gaaagacatgctgacgattatgtggccaaactggaaatgagtgaagaggctgaactggaa E R H A D D Y V A K L E M S E E A E L E aaaaagaaacatatgtacaggcttttgagggaatgtctgaaggatcatcaaactttgtta K K K H M Y R L L R E C L K D H Q T L L agattcaccaaagctttagaagaaatgtataatccaatgtttctatttcaaatgttaaca R F T K A L E E M Y N P M F L F Q M L T agcacttttacaatctgtttggttcttttacaattaaacgtacatttagcctcaagtgaa S T F T I C L V L L Q L N V H L A S S E gatctaccaatagctatggcttgtaaatttattatgtatctattgttcggatctatggag D L P I A M A C K F I M Y L L F G S M E LLVYSWGGQIVFDQSGAVHW aatatgtatgaaagtggttggaccgaaggatctttacaatttagaaaatcactggtgttc N M Y E S G W T E G S L Q F R K S L V F gctatggcaagaagttacacgcctgctactctaactgctggaaaattttacaacgttaat A M A R S Y T P A T L T A G K F Y N V N cttaactcttttactcaggtgatgaaagcatcatattcatattttacatttctacatgga LNSFTQVMKASYSYFTFLHG tctggctcggtgaaatcatcaactaaataa SGSVKSSTK

Figura 24. Sequência consenso do *OR1* de *R. prolixus*. Sequência consenso obtida a partir dos clones (pGEMHE) utilizados na síntese do cRNA.

	MEEFAGIDVKYFKVIGLWQLLMPSRNGKYAVVLSAFIGTIFTVHISIQMINTFLGGYDFS ************************************
Exp. OR1	KFTEKLSVNLTCFESAIKILYYCWNRNNLMNLISLFRKNLLICSTHEPEKSRKILTNSAR KFTEKLSVNLTCFESAIKILYYCWNRNNLMNLISLFRKNLLICSTHEPEKSRKILTNSAR ************************************
Exp. OR1	FVNLCTKSFVYMIFCTVGVWNSLPILRCLISDDCESWHIMPSWYPFNTKQIPMNIIVYSF FVNLCTKSFVYMIFCTVGVWNSLPILRCLISDDCESWHIMPSWYPFNTKQIPMNIIVYSF ************************************
Exp. OR1	EFLIMSYCAALLYTVNCLFSALALTVAAQFQLLGVSFATIERHADDYVAKLEMSEEAELE EFLIMSYCAALLYTVNCLFSALALTVAAQFQLLGVSFATIERHADDYVAKLEMSEEAELE *********************************
Exp. OR1	KKKHMYRLLRECLKDHQTLLRFTKALEEMYNPMFLFQMLTSTFTICLVLLQLNVHLASSE KKKHMYRLLRECLKDHQTLLRFTKALEEMYNPMFLFQMLTSTFTICLVLLQLNVHLASSE ***********************************
Exp. OR1	DLPIAMACKFIMYLLFGSMELLVYSWGGQIVFDQSGAVHWNMYESGWTEGSLQFRKSLVF DLPIAMACKFIMYLLFGSMELLVYSWGGQIVFDQSGAVHWNMYESGWTEGSLQFRKSLVF ************************************
Exp. OR1	AMARSYTPATLTAGKFYNVNLNSFTQVMKASYSYFTFLHGSGSVKSSTK- AMARSYTPATLTAGKFYNVNLNSFTQVMKASYSYFTFLHGSGSVKSSTK- ************************************

_

Figura 25. Alinhamento do *OR1* de *R. prolixus*. A sequência de nucleotídeo consenso do *OR1* oriunda do sequenciamento (clones) foi traduzida para sequência proteica na plataforma <u>https://web.expasy.org/translate/</u> e, posteriormente, alinhada com a sequência proteica depositada por LATORRE-ESTIVALIS et al. (2017), usando a ferramenta de alinhamento crustalW (<u>https://www.genome.ip/tools-bin/clustalw</u>).



Figura 26. Predição dos domínios transmembranares do OR1 de *R. prolixus*. A sequência de nucleotídeos consenso do *OR1* oriunda dos clones (pGEMHE) foram traduzida através da plataforma Expasy <u>https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa</u>. Os domínios transmembranares foram avaliados através da ferramenta Octopus disponível em <u>http://octopus.cbr.su.se/</u>.



Figura 27. Registro eletrofisiológico do receptor olfativo 1 (OR1) co-expresso com o Orco em ovócitos de *Xenopus laevis*. Ovócitos co-expressando OR1•Orco foram desafiados com uma série de compostos químicos em diferentes concentrações. (A) Representação gráfica (linha continua) da resposta provocada no OR1•Orco quando estimulados com os 4 feromônios (em vermelho) e com os 109 odores do painel teste. (B) Representação gráfica (linha continua) da resposta provocada pelo agonista do Orco OCL12.

4.3.2. Perfil de resposta eletrofisiológica do receptor olfativo 3 (OR3)

O gene *OR3* (RPRC000059-RA) codifica uma proteína com 440 aminoácidos (Fig. 28). Esse receptor foi clonado em vetor pGEM-T Easy e subclonado em vetor de expressão pGEMHE. As sequências consenso dos clones foram comparadas com a sequência, RPRC000059-RA, depositada no VectorBase, confirmando 100 % de identidade (Fig. 29). A presença de sete domínios transmembranares e a topologia invertida da proteína foram confirmados usando a ferramenta Octopus (<u>http://octopus.cbr.su.se/</u>) (Fig. 30).

O complexo OR3•Orco não foi ativado por nenhum dos 109 odorantes do painel (Fig. 31A), e também não foi capaz de se ligar a nenhum dos feromônios putativos de *R. prolixus*. Isso sugere que o OR3 não é um receptor de feromônio sexual para os constituintes de feromônios testados. Considerando que o compexo OR3•Orco apresentou uma resposta moderada ao OCL12 (Fig. 31B), concluímos que o ligante do OR3 não fazia parte do universo de voláteis testados. Podemos especular que se ampliarmos o número de compostos, do painel teste, teremos chances de encontrar o ligante chave deste receptor.

4.3.3. Perfil de resposta eletrofisiológica do receptor olfativo 74 (OR74)

O gene *OR74* (RPRC000200-RA) codifica uma proteína com 373 aminoácidos, com N-terminal incompleto (Fig. 32). A perda do N-terminal não influenciou na função do receptor, visto que, a topologia dos ORs de insetos na membrana dos neurônios sensoriais olfativos é invertida, o sítio de ligação ao odor está localizado na porção C-terminal da proteína. De qualquer maneira, para minimizar qualquer efeito sobre a falta do N-terminal, foi introduzida a trinca ATG na sequência dos oligonucleotídeos senso. Assim, o *OR74* foi clonado em vetor pGEM-T Easy e subclonado em vetor de expressão pGEMHE. As sequências consensos dos clones foram comparadas com a sequência, RPRC000200-RA, depositada no VectorBase, confirmando 100 % de identidade (Fig. 33). Esta proteína apresentou seis domínios transmembranares determinados pela ferramenta Octopus (http://octopus.cbr.su.se/) (Fig. 34).

O complexo OR74•Orco apresentou resposta moderada ao agonista do Orco, OCL12 (Fig. 35B), indicando que o receptor estava corretamente expresso na membrana do ovócito. Entretanto, este receptor não apresentou resposta aos feromônios testados e nem a nenhum dos 109 semioquímicos do painel (Fig. 35A). Logo, podemos supor que o ligante chave para este receptor não estava presente entre os compostos testados no registro eletrofisiológico. É provável que se aumentarmos o número de ligantes do nosso painel teste possamos encontrar o semioquímico específico do OR74.

atggatatcttgcaaagatttaaagatttcctccgtgaatatgatcgagataatgatgaa M D I L Q R F K D F L R E Y D R D N D Е gttgtggataaaacaatcttcgatgagtttaactatttatataggataactttttttat V V D K T I F D E F N Y L Y R I T F F Y ccaaatttgaaaaacaatgaaaattattggtctacaaattgttcttttcatattttatata P N L K T M K I I G L Q I V L F I F Y Ι agtttcattttgttacaaattttctttacatttatgggagccatattttctgatggagat S F I L L Q I F F T F M G A I F S D G D ttctttttgatggcacattctctgcatattagctttatatattcgttaatgccagtgttg F F L M A H S L H I S F I Y S L M P V L actttcacggcaatcactctacgctctcatctatctaatattcaaaattattggaaac T F T A I T L R S H L S N I F K I I G N ggattttataaatacgatgaagttacatccaaagaggaaattcaaatcaaattgaagtat G F Y K Y D E V T S K E E I Q I K L K Y tttaaaatcaaaagaaatttgaaaattggttttcctttacttgcttttgtcgctatgtta F K I K R N L K I G F P L L A F V A M L ttggctgttacagcaatcccattatcaaatgaatactttggattggatgattcagtcatg LAVTAIPLSNEYFGLDDSVM I N K K G V N L W L P L N G W Y P F D S agcgagggtttaccattttggatagcattctctctgcaaataatatccatgatttttgtt SEGLPFWIAFSLQIISMIFV gtaattatatatgtagcaggttcagccacttattttaccatcgttttacatgttattgct V I I Y V A G S A T Y F T I V L H V I A caataccatattcttatatggagtatacgtaatataactaaaagagcaatggttaattat Q Y H I L I W S I R N I T K R A M V N Y ttgaaaattaaaccatatctgcagggtaaaaatagaagcaggcctaatttcgaggatatg L K I K P Y L Q G K N R S R P N F E D M gaattccaaaaacagatggtgttctgtttgaaacaaaatatacaacattatcaacaaatt E F Q K Q M V F C L K Q N I Q H Y Q Q I atcagggtcgttaatctgtatgcagaagtgttaaaagtgactggatttttggtatttctc I R V V N L Y A E V L K V T G F L V F L tgcattactttcattatcgccctttctgcatttataatagtaacgggaacagcaagacca CI T F I I A L S A F I I V T G T A R Ρ ggaattgtatgtctcacatttggtattgcaacagtagaagtaggctatatgacagcccct G I V C L T F G I A T V E V G Y M T A tgtatgcttggacaaatgataatcgatttgaatgagcaactcggttttgaactatacaat C M L G Q M I I D L N E Q L G F E L Y N acaccctggtaccgttgctctaaagatttcaaacaatgtttgaacattacccaagctagg T P W Y R C S K D F K Q C L N I T Q A R attgggtatggcgtcacaataagaacactgtttaattacgcaatggatatggacacctat I G Y G V T I R T L F N Y A M D M D T Y tgtaaaatggtgaacgcttcttattcatacttcagtctactgttggctttcaaaaatact C K M V N A S Y S Y F S L L L A F К Ν taa

Figura 28. Sequência consenso do *OR3*. Sequência consenso obtida a partir dos clones (pGEMHE) utilizados na síntese do cRNA.

Exp. OR3	MDILQRFKDFLREYDRDNDEVVDKTIFDEFNYLYRITFFYPNLKTMKIIGLQIVLFIFYI MDILQRFKDFLREYDRDNDEVVDKTIFDEFNYLYRITFFYPNLKTMKIIGLQIVLFIFYI **********************************
Exp. OR3	SFILLQIFFTFMGAIFSDGDFFLMAHSLHISFIYSLMPVLTFTAITLRSHLSNIFKIIGN SFILLQIFFTFMGAIFSDGDFFLMAHSLHISFIYSLMPVLTFTAITLRSHLSNIFKIIGN ***********************************
Exp. OR3	GFYKYDEVTSKEEIQIKLKYFKIKRNLKIGFPLLAFVAMLLAVTAIPLSNEYFGLDDSVM GFYKYDEVTSKEEIQIKLKYFKIKRNLKIGFPLLAFVAMLLAVTAIPLSNEYFGLDDSVM ************************************
Exp. OR3	INKKGVNLWLPLNGWYPFDSSEGLPFWIAFSLQIISMIFVVIIYVAGSATYFTIVLHVIA INKKGVNLWLPLNGWYPFDSSEGLPFWIAFSLQIISMIFVVIIYVAGSATYFTIVLHVIA ************************************
Exp. OR3	QYHILIWSIRNITKRAMVNYLKIKPYLQGKNRSRPNFEDMEFQKQMVFCLKQNIQHYQQI QYHILIWSIRNITKRAMVNYLKIKPYLQGKNRSRPNFEDMEFQKQMVFCLKQNIQHYQQI ***********************************
Exp. OR3	IRVVNLYAEVLKVTGFLVFLCITFIIALSAFIIVTGTARPGIVCLTFGIATVEVGYMTAP IRVVNLYAEVLKVTGFLVFLCITFIIALSAFIIVTGTARPGIVCLTFGIATVEVGYMTAP ************************************
Exp. OR3	CMLGQMIIDLNEQLGFELYNTPWYRCSKDFKQCLNITQARIGYGVTIRTLFNYAMDMDTY CMLGQMIIDLNEQLGFELYNTPWYRCSKDFKQCLNITQARIGYGVTIRTLFNYAMDMDTY ************************************
Exp. OR3	CKMVNASYSYFSLLLAFKNT- CKMVNASYSYFSLLLAFKNT- ************

Figura 29. Alinhamento do *OR3*. A sequência de nucleotídeo consenso do *OR3* oriunda do sequenciamento (clones) foi traduzida para sequência proteica na plataforma <u>https://web.expasy.org/translate/</u> e, posteriormente, alinhada com a sequência proteica depositada por LATORRE-ESTIVALIS et al., 2017, usando a ferramenta de alinhamento crustalW (<u>https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw</u>).



Figura 30. Predição dos domínios transmembranares do OR3. A sequência de nucleotídeos consenso do OR3 oriunda dos clones (pGEMHE) foram traduzida através da plataforma Expasy <u>https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa</u>. Os domínios transmembranares foram obtidos através da ferramenta Octopus disponível em <u>http://octopus.cbr.su.se/</u>.



Figura 31. Perfil eletrofisiológico do receptor olfativo 3 (OR3) expresso em ovócitos de *Xenopus laevis*. O ovócito co-expressando OR3•ORco foi desafiado com uma série de compostos químicos em diferentes concentrações. (A) Representação gráfica (linha continua) da resposta provocada pela expressão de OR3•ORco quando estimulados com os 4 feromônios (em vermelho) e os 109 odores do painel teste. (B) Representação gráfica (linha continua) da resposta provocada pelo agonista do Orco OCL12.

M N F K R L S P I Q L I Y Y L L T R C G ctattgaatgaagatggccgcccatggactgtgatcatcgccacttaccattccatcatg L L N E D G R P W T V I I A T Y H S ΙM ctgatattggtgggtcttcttacagtcgcaaaagtttataagaaattggatgatataaac LILVGLLTVAKVYKKLDDI N gagtttatactaccactcatgctgtgggcaatgatcatccatatatctggaaaattcttt I L P L M L W A M I I H I S G K F F E F tatttactaaaaaatcagaggaaattacgtagcttactagatcgattggaacaactacgc Y L L K N Q R K L R S L L D R L E Q L R caggaagagctcggtgattctgtctacgctgaacatttcatcaaggccgacaagattaat Q E E L G D S V Y A E H F I K A D K I N aaaactatactctactatcttaatctgaacattcacttggttccggtaatttctaccggg K T I L Y Y L N L N I H L V P V I S T G ttcaacgttttgcacgattgtctgtctacatctgaaactccatctttaatgatgccgata FNVLHDCLSTSETPSLMMP Ι tggattccttgggagcaccagaaatcttggccttacgctgcagcggttatcgctaccaca W I P W E H Q K S W P Y A A A V I A T T ataatggcattttctggcgtaattgtgtttgctacgttatattccctgctagtaacaatc I M A F S G V I V F A T L Y S L L V Т Ι accttgcaactgtcagcgttggtacaagtgttgcaagctaaaatggagaagaaacaagca T L Q L S A L V Q V L Q A K M E K K Q A aacgataagagcattttccgcctgcacattaatgttttacaagtactgcaacagcttaac N D K S I F R L H I N V L Q V L Q Q L Ν gacctattatctggccaatattgtctagaaatattgctatcatcattacagccctgtgga D L L S G O Y C L E I L L S S L O P C G ttctgctacatgctgataaagtatttgaaaagtggagattcaagatgggtggactgtttg F C Y M L I K Y L K S G D S R W V D C L tataaagttttcgtctcactgttcgcaacatcattcctgtgcgcctgcggtgaggagatt V F V S L F A T S F L C A C G E E K Т Y aattctcaggtggagtacttacatcaaagtgcgtacagaggttcctggtatgaagaacag N S Q V E Y L H Q S A Y R G S W Y E E Q cctgctgcaaggaaagacttgataattttaataactataacatctagaccacttcaattc PAARKDLIILITITS R P L Q F cagtacaaaggattggttacgttcaacttacgacgtttggctacggtaattcaaggattc Q Y K G L V T F N L R R L A T V I Q G F tactcgtacacaacaatgttgagcaacttggaaacagctgattag SYTTMLSNLETAD-

Figura 32. Sequência consenso do *OR74*. Sequência consenso obtida a partir dos clones (pGEMHE) utilizados na síntese do cRNA.

Exp. OR74NTE	MNFKRLSPIQLIYYLLTRCGLLNEDGRPWTVIIATYHSIMLILVGLLTVAKVYKKLDDIN -NFKRLSPIQLIYYLLTRCGLLNEDGRPWTVIIATYHSIMLILVGLLTVAKVYKKLDDIN ***********************************
Exp. OR74NTE	EFILPLMLWAMIIHISGKFFYLLKNQRKLRSLLDRLEQLRQEELGDSVYAEHFIKADKIN EFILPLMLWAMIIHISGKFFYLLKNQRKLRSLLDRLEQLRQEELGDSVYAEHFIKADKIN ************************************
Exp. OR74NTE	KTILYYLNLNIHLVPVISTGFNVLHDCLSTSETPSLMMPIWIPWEHQKSWPYAAAVIATT KTILYYLNLNIHLVPVISTGFNVLHDCLSTSETPSLMMPIWIPWEHQKSWPYAAAVIATT ***********************************
Exp. OR74NTE	IMAFSGVIVFATLYSLLVTITLQLSALVQVLQAKMEKKQANDKSIFRLHINVLQVLQQLN IMAFSGVIVFATLYSLLVTITLQLSALVQVLQAKMEKKQANDKSIFRLHINVLQVLQQLN **********************************
Exp. OR74NTE	DLLSGQYCLEILLSSLQPCGFCYMLIKYLKSGDSRWVDCLYKVFVSLFATSFLCACGEEI DLLSGQYCLEILLSSLQPCGFCYMLIKYLKSGDSRWVDCLYKVFVSLFATSFLCACGEEI ***********************************
Exp. OR74NTE	NSQVEYLHQSAYRGSWYEEQPAARKDLIILITITSRPLQFQYKGLVTFNLRRLATVIQGF NSQVEYLHQSAYRGSWYEEQPAARKDLIILITITSRPLQFQYKGLVTFNLRRLATVIQGF ************************************
Exp. OR74NTE	YSYTTMLSNLETAD- YSYTTMLSNLETAD- ********

Figura 33. Alinhamento do receptor olfativo 74. A sequência de nucleotídeo consenso do *OR74* oriunda do sequenciamento (clones) foi traduzida para sequência proteica na plataforma <u>https://web.expasy.org/translate/</u> e, posteriormente, alinhada com a sequência proteica depositada por LATORRE-ESTIVALIS et al., 2017, usando a ferramenta de alinhamento crustalW (<u>https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw</u>).



Figura 34. Predição dos domínios transmembranares do OR74. A sequência de nucleotídeos consenso do *OR74* oriunda dos clones (pGEMHE) foram traduzida através da plataforma Expasy <u>https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa</u>. A presença dos domínios transmembranares foi realizada através da ferramenta Octopus disponível em <u>http://octopus.cbr.su.se/</u>.



Figura 35. Perfil eletrofisiológico do OR74 expresso em ovócitos de *Xenopus laevis*. O ovócito co-expressando OR74•ORco foi desafiado com uma série de compostos químicos em diferentes concentrações. (A) Representação gráfica (linha continua) da resposta provocada pela expressão de OR74•ORco quando estimulados com os 4 feromônios (em vermelho) e os 109 odores do painel teste. (B) Representação gráfica (linha continua) da resposta provocada pelo agonista do ORco OCL12.

4.3.4. Perfil de resposta eletrofisiológica do receptor olfativo 80 (OR80)

O gene *OR80* (RPRC000441-RA) codifica uma proteína com 470 aminoácidos (Fig. 36). Recentemente, o gene foi corrigido com o acréscimo de 9 nucleotídeos, passando a codificar uma proteína com 473 aminoácidos (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2017). Este estudo foi finalizado antes da correção do gene. A falta de 9 nucleotídenos na região N-terminal não alterou a função da proteína, pois esses aminoácidos não participam do sítio de ligação do semioquímico. Ainda assim, para minimizar qualquer efeito sobre essa falta do N-terminal, foi introduzido no oligonucleotídeo senso a trinca ATG semelhante ao que foi feito para o OR74. Posteriormente, este receptor foi clonado no vetor pGEM-T Easy e subclonado em vetor de expressão pGEMHE, as sequências consenso dos clones foram comparadas com a sequência, , depositada por LATORRE-ESTIVALIS et al. (2017), confirmando 100 % de identidade (Fig. 37). A presença de sete domínios transmembranares foi confirmada através da ferramenta Octopus (http://octopus.cbr.su.se/) (Fig. 38).

O complexo OR80•Orco expresso na membrana dos ovócitos de X. leviae não respondeu a nenhum dos constituintes dos feromônios sexuais testados: 2-metil-3-buten-2-ol, (2S) -pentanol, (3E) -2-metil-3- penten-2-ol e (2R / 2S) -4-metil-3-penten-2-ol. Entretanto, o complexo apresentou respostas robustas e dose-dependentes para os compostos: 2-heptanona, γ -octalactona, acetofenona e 4-MHC (Fig. 39). Apesar, destes compostos apresentarem estruturas químicas diferentes (3 cetonas e 1 álcool) todos os 4 semioquímicos promoveram respostas (Fig. 39A). Estes resultados sugerem que o OR80 é capaz de reconhecer diferentes classes de semioquímicos. A análise dose/resposta mostrou que a ligação foi específica, pois houve um aumento da corrente de despolarização na membrana do ovócito associada ao aumento da concentração do ligante. Dentre os ligantes chaves do OR80, a 2-heptanona foi a que promoveu maior resposta (Fig. 39), com concentrações variando de 10⁻⁶ a 10⁻³ M. As correntes elétricas foram efetivas, a partir da concentração de 10⁻⁵ M correspondendo a 25 nA. A heptanona, na concentração mais alta (10^{-3} M) , promoveu uma resposta bastante acentuada com valores próximos a 175 nA (Fig. 39 B). A γ-octalactona alcançou o pico de resposta em torno de 150 nA para a concentração de 10⁻³ M (Fig. 39 B). Diferente das demais cetonas, a acetofenona promoveu a despolarização da membrana do ovócito com menor intensidade, aproximadamente 115 nA na concentração maior (10⁻³M) (Fig. 39 B). Por último, o composto alcoólico 4-metilciclohexanol (4-MCH) promoveu a resposta menos intensa, de aproximadamente 100 nA na concentração maior (10⁻³ M) (Fig. 39 B). Estes resultados sugerem que os semioquímicos fisiologicamente ativos no patch-clamp poderiam induzir uma resposta comportamental em R. prolixus.

atggtaacggaaaatttatctccagtaaagcaatgttaccgcgcaatcagattcagtggt M V T E N L S P V K O C Y R A I R FSG ctactagctgatactaataatgcatggtatatgatattctcagtctatcatatggttatg L L A D T N N A W Y M I F S V Y H M V M I N Y I G V A A V L E I L L K E R N L L gattttgtgcaagccctttcagtaatagtgatctacgtgcatgacattgttaaagctgtg D F V O A L S V I V I Y V H D I V K A V aacatcttcactcaccagaagggcgtcaaacaattacttaacaggctggaagaattcatt I F T H Q K G V K Q L L N R L E E N F Т caggaaactgcaaaaatgaaccgaatcaatcacgcaaacgatcttttcgcgagacattc Q E T A K N E P N Q S R K R S F R E Т F ISIYIKILIWLPSLSLVCG v tttggcgattatatgactggctttgtcaaaccgcatttaccttaccaaatctggattcca F G D Y M T G F V K P H L P Y Q I W I P tggagtttaaaagaattctggccttacatggccggaatggtattcgtgacaatgctggag W S L K E F W P Y M A G M V F V T M L E ttcaccacctgcgtatactacatgtccttcacagtaatcaattttactttctcaaatgag F T T C V Y Y M S F T V I N F T F S N E ttatcctcaagtttgagaaggctacaagaacgcctggagaccaagggaccggccgataaa L S S S L R R L O E R L E T K G P A D K actgtctatgaacatcataatgcaattatacagttattactggattacaatcagttattt T V Y E H H N A I I Q L L L D Y N Q L F tctggacctctgtacgttgaaactttaatgtcttctttaatgccttgtggatttttctac S G P L Y V E T L M S S L M P C G F F Y ctgtttattaagattgttaagagtttcgatccactcgcttttgagcttattttaaaagcg L F I K I V K S F D P L A F E L I L K A attatgtgcgcaggcgcaccatatgttgtttgctcgtgtgttggacaagaaatcagtgat I M C A G A P Y V V C S C V G O E I S D cagatggagcaactgcacaggagcgcctacgccagtaattggtgtgaagagccgccgaga Q M E Q L H R S A Y A S N W C E E P P R atccgaaaaaatctgcttactttgatgatcatcactaccaaacgtattgacttaaattac I R K N L L T L M I I T T K R I D L N Y aggaaattcgtgtcattcaatcatgtttgcttggcaacggtattgcaaggtatttacacc R K F V S F N H V C L A T V L Q G I Y Т tacctgatgctgataatcaacctggagacagattaa YLMLIINLETD

Exp.	MVTENI SPVKOCYRATRESGI I ADTNNAWYMTESVYHMVMTNYTGVAAVI ETI I KER
ORSOFX	

Exp.	LLDEVOALSVIVIYVHDIVKAVNIETHOKGVKOLLNRLEEEIOETAKNEPNOSRKRSER
OR80FX	

Exn.	TETSTYTKTI TWI PSI SI VCGVEGDYMTGEVKPHI PYOTWTPWSI KEEWPYMAGMVEVT
ORSOFX	TETSTYTKTI TWI PSI SI VCGVEGDYMTGEVKPHI PYOTWTPWSI KEEWPYMAGMVEVT

Exp.	LEFTTCVYYMSETVINETESNELSSSLRRLOERLETKGPADKTVYEHHNAIIOLLLDYN
OR80FX	LEETTCVYYMSETVINETESNELSSSLRRLOERLETKGPADKTVYEHHNATIOLLIDYN

Exp.	LFSGPLYVETLMSSLMPCGFFYLFIKIVKSFDPLAFELILKAIMCAGAPYVVCSCVGQE
OR80FX	LFSGPLYVETLMSSLMPCGFFYLFIKIVKSFDPLAFELILKAIMCAGAPYVVCSCVGOE

Exp.	SDQMEQLHRSAYASNWCEEPPRIRKNLLTLMIITTKRIDLNYRKFVSFNHVCLATVLQG
OR80FX	SDOMEOLHRSAYASNWCEEPPRIRKNLLTLMIITTKRIDLNYRKFVSFNHVCLATVLOG

Exp.	YTYLMLIINLETD-
OR80FX	YTYLMLIINLETD-

Figura 37. Alinhamento do *OR80*. A sequência de nucleotídeo consenso do *OR80* oriunda do sequenciamento (clones) foi traduzida para sequência proteica na plataforma (<u>https://web.expasy.org/translate/</u>) e, posteriormente, alinhada com a sequência proteica depositada por LATORRE-ESTIVALIS et al., 2017, usando a ferramenta de alinhamento crustalW (<u>https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw</u>).



Figura 38. Predição dos domínios transmembranares do OR80. A sequência de nucleotídeos consenso do *OR80* oriunda dos clones (pGEMHE) foram traduzida através da plataforma Expasy <u>https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa</u>, posteriormente a presença dos domínios transmembranares foi realizada usando a ferramenta Octopus disponível em <u>http://octopus.cbr.su.se/</u>.



Figura 39. Perfil eletrofisiológico do receptor olfativo OR80 expresso em ovócitos de *Xenopus laevis*. O ovócito co-expressando OR80•ORco foi desafiado com uma série de compostos químicos em diferentes concentrações incluindo feromônios. O OR80•Orco apresentou resposta eletrofisiológica dose-dependente para os compostos 4-metilciclohexanol, acetofenona, 2-heptanona e γ -octalactona. **A**) Representação gráfica da resposta obtida pelo complexo OR80•Orco quando estimulados com 2-heptanona, γ -octalactona, acetofenona e 4-metilciclohexanol. **B**) Curva dose resposta com concentrações variando em 10⁻⁶ a 10⁻³ M.

4.4. Bioensaios de ação repelente

4.4.1. Seleção dos insetos

Em função dos quatros semioquímicos, 4-metilciclohexanol, acetofenona, 2heptanona e γ -octalactona, promoverem correntes elétricas robustas, no complexo OR80•ORco expresso nos ovócitos de *X. leviae*, acreditamos quem estes compostos possam ter um papel importante na ecologia química do *R. prolixus*. Considerando que este triatomíneo se alimenta de sangue em todas as etapas de seu ciclo de vida, seria importante avaliar se os quatros semioquímicos selecionados, pelo ensaio de *patchclamp*, poderiam interferir no repasto sanguíneo.

Outro dado importante que foi considerado é que pelo menos um dos odorantes, a γ -octalactona, é um conhecido repelente de mosquitos (BEDOUKIAN, 2013; XU et al., 2014). Assim, usando um protocolo adaptado de ZERMOGLIO et al. (2015) também testamos a hipótese de que os compostos funcionariam como repelentes para *R*. *prolixus*.

A capacidade dos insetos ingerirem sangue na presença dos quatros odorantes foi avaliada. Desta forma, optamos por usar nos ensaios de localização e alimentação sanguínea utilizando insetos machos, em jejum, no 5° estádio de ninfa (N5-M), estes insetos são muitos vorazes por sangue, chegando a ingerir até 10 vezes o próprio peso em massa de sangue. A análise quantitativa do peso dos insetos foi feita antes e após a alimentação sanguínea. Inicialmente, verificamos o perfil de expressão do *OR80* nos diferentes órgãos de N5-M. E, de fato, a análise por qPCR mostrou a presença abundante do transcrito do gene *OR80* nas antenas das N5-M, não havendo diferenças estatísticas nas quantidades de transcritos nas antenas de machos adultos e ninfas de 5 estádio (p=0,3332) (Fig. 40A), demonstrando que a opção de realizar os bioensaios com N5-M era adequada. Além disso, foram encontrados transcritos do gene *OR80* em probóscides de insetos machos adultos (Fig. 23) e de N5-M, e nao foram encontrados transcritos de *OR80* em patas de ninfas (controle negativo) (Fig. 40B). Comparando os dois tecidos, as antenas apresentaram expressão majoritária do *OR80* (p=0,0008), indicando ser o principal sítio de síntese deste receptor (Fig.40 B).



Figura 40. Expressão relativa do gene *OR80* nas antenas de adultos e de ninfas machos. (**A**) Comparação dos níveis de transcritos do OR80 nas antenas adultos e ninfas machos de 5° estádio (N5-M). (**B**) Perfil quantitativo da expressão de OR80 nas antenas, probóscides, e patas de N5-M. O RNA total foi extraído de antenas, patas e probóscides. O RNA foi tratado com DNAse I e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa. As reações de qPCR foram realizadas utilizando SYBR Green e iniciadores específicos para cada gene. O gene *R18S* foi usado como controle endógeno para normalizar o nível de expressão. As barras representam a média da expressão \pm erro padrão de 3 experimentos independentes. Em (**A**) a análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student, após a análise de variâncias com o teste F (Snedecor), adultos x ninfas, p=0,3332. Em (**B**) a análise estatística entre os grupos foi feita utilizando ANOVA seguida do teste de Tukey. Antenas X probóscides e/ou patas, p=0,0008; probóscides X patas, p=0,0111. Um asterisco indica que há diferenças significativa entre os grupos analisados p<0,05. Três asteriscos indicam que não existe diferenças significativas entre os grupos analisados p>0,05.

4.4.2. Avaliação do comportamento de *R. prolixus* na presença dos semioquímicos fisiologicamente ativos

4.4.2.1. Velocidade para alcançar o hospedeiro humano

Na avaliação do perfil comportamental foram observados dois parâmetros: (1) a velocidade com que o inseto se locomovia até alcançar o hospedeiro humano, que estava posicionada na extremidade oposta a zona de liberação do inseto e, (2) o tempo de permanência do inseto próximo ao hospedeiro humano. Nos ensaios de ação repelente, a isca, é o hospedeiro humano e foi avaliado o tempo que o inseto levou para a alcançar a isca, sendo calculada a velocidade média do deslocamento.

Foi registrado, também, o comportamento dos insetos na presença de DEET, que apesar de ser eficiente para repelir mosquitos, sabe-se que não tem ação repelente contra *R. prolixus* (controle negativo).

A velocidade média do deslocamento até o hospedeiro vertebrado nos grupos controles dos insetos: hospedeiro humano (sem odores), com o DEET (1%) e com solvente hexano. Os insetos dos grupos controles (hexano, hospedeiro e DEET) percorriam a trajetória até o hospedeiro vertebrado a uma velocidade média de 0,1488 \pm 0,0247 cm/seg, 0,1976 \pm 0,0447 cm/seg e 0,2938 \pm 0,0741, respectivamente (hexano X DEET, p=0.3899; hexano X hospedeiro, p>0.9999, hospedeiro X DEET, p=9433) (Fig. 41).

Curiosamente, quando os insetos eram expostos ao composto 2-heptanona faziam o percurso até o hospedeiro com uma velocidade média de $0,0781\pm0,0187$ cm/seg, demonstrando assim uma redução de 3,7 vezes em relação aos insetos que ficaram expostos ao DEET (p=0,0203). Os insetos expostos a acetofenona faziam o percurso com uma velocidade média de $0,0692\pm0,0142$ cm/seg, ou seja, uma redução de 4,2 vezes na velocidade média em relação aos insetos expostos ao DEET (p=0,0130).

Na presença de 4-MCH, os insetos moviam-se com a velocidade média de $0,1101\pm0,0425$ cm/seg (Fig. 41). Já na presença de γ -octalactona, os insetos moviam-se com a velocidade média de $0,1876 \pm 0,0558$ cm/seg (Fig. 41), não apresentando diferenças na velocidade média de deslocamento em relação aos grupos controles (DEET X 4-MCH, p=0,0905 e DEET X γ -octalactona, p=0,8723).



Figura 41. Velocidade média de deslocamento até o hospedeiro vertebrado na presença de semioquímicos fisiologicamente ativos. Ninfas de 5° estádio machos em jejum foram testados individualmente quanto à capacidade de encontrar o hospedeiro humano na presença de hexano, DEET, 2-heptanona, γ -octalactona, acetofenona e 4-metilcilohexanol. O tempo que o inseto necessitava para chegar até o hospedeiro humano (zona do hospedeiro) foi aferido. Em seguida, foi calculada a velocidade média do percurso. A barra representa a média do tempo de residência do inseto próximo ao hospedeiro, \pm erro padrão para cada indivíduo testado individualmente (N=10), em triplicata experimental. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. O asterisco indica diferenças estatisticamente significantes (p<0,05). DEET X 2-heptanona, p=0,0161. DEET X acetofenona, p=0,0105.

4.4.2.2. Tempo de permanência na zona do hospedeiro humano

Nos ensaios de ação repelente foi utilizado o hospedeiro humano como isca, e foi avaliado a capacidade dos insetos de encontar e permanecer próximo a isca. Os insetos foram testados ao limite máximo de 300 segundos. Para os insetos, que não conseguiam alcançar a isca neste périodo, foi considerado que o composto repeliu totalmente o inseto. Os grupos controles foram constituídos por insetos testados com o hospedeiro humano (sem odores), com o DEET (1%) e com solvente hexano.

O tempo de permanência dos insetos na zona do hospedeiro na presença da isca (sem odores) foi, aproximadamente, $257\pm9,96$ s (Fig. 42). Esse comportamento não foi alterado quando as ninfas estavam na presença de hexano ou de DEET, hexano = $246,4\pm15,3$ s e DEET = $243,3\pm15,42$, (hexano X DEET, p>0,9999; hexano X hospedeiro, p=0.9997, hospedeiro X DEET, p=9987) (Fig. 42).

O tempo de permanência dos insetos na zona do hospedeiro diminuiu significativamente na presença dos quatros compostos: 2-heptatona, γ -octalactona, acetofenona e 4-MCH (todos a 1% v/v, p<0.0001) (Fig.42), observando assim, uma nítida alteração no comportamento dos insetos na presença dos semioquímicos.

Na presença de 2-heptanona a 1% v/v, os insetos permaneciam em média 2,5 vezes menos tempo cerca de 95 \pm 29,65 s na zona do hospedeiro quando comparados aos insetos controles (p=0,0003) (Fig. 42). A 2-heptanona também repeliu os insetos na concentração de 0,1% v/v, nesta concentração, os insetos permaneciam próximo a isca por 153 \pm 28,8 s (p<0,0001) (Fig.42).

A acetofenona também alterou o comportamento das ninfas, o tempo de permanência próximo ao hospedeiro foi reduzido em 3,4 vezes, os insetos mantiveramse em média $72 \pm 23,54$ s próximo ao hospedeiro (p<0,0001) (Fig.42). A acetofenona foi eficaz somente na concentração 1% v/v.

Na presença da γ -octalactona, as ninfas permaneciam em torno de 60 ± 20,18 s próximos ao hospedeiro, reduzindo assim, o tempo de permanência em 4,1 vezes (p<0,0001) (Fig. 42). A γ -octalactona também repeliu os insetos em dose de 0,01% v/v, nesta concentração, o tempo de residência das ninfas foi de 78,9±17,4 s (p<0,0001) (Fig. 42).

O 4-MCH foi o composto mais eficaz, promovendo uma mudança de comportamento acentuada nas 3 concentrações testadas (0,01, 0,1 e 1% v/v). Na presença de 4-MCH, os insetos permaneceram $44,1\pm13,9$ s próximos a hospedeiro

utilizando a concentação de 1% v/v. Assim, o 4-MCH promoveu uma redução de 5,5 vezes no tempo de permanência das ninfas próximas ao hospedeiro humano (p<0,0001) (Fig. 42). Em doses menores deste composto, o tempo de residência das ninfas na zona do hospedeiro foi menor do que o tempo dos insetos dos grupos controles: 4-MCH 0,1% $v/v = 39.5\pm11.1$ s, e 4-MCH 0,01% $v/v = 67.9\pm17.3$ s.

4.2.2.3. Ingestão de sangue na presença dos semioquímicos fisiologicamente ativos

Testamos a hipótese de os compostos repelentes afetarem a habilidade dos insetos se alimentarem com sangue. A ingestão de sangue foi alterada na presença de cada um dos quatro compostos repelentes (2-heptanona, γ -octalactona, acetofenona ou 4-metilciclohexanol), nesta condição as ninfas não conseguiram ingerir sangue (p<0.0001; N=10 cada grupo) (Fig. 43). A ingestão de sangue não foi afetada quando os insetos estavam na presença de DEET ou de hexano (test t não pareado, N=10, p=0.5484) (Fig. 43).

Os insetos dos grupos DEET e hexano (controles) ingeriam em média 136±16,1 mg de sangue enquanto os insetos na presença dos repelentes na concentração de 1% v/v consumiram uma massa de sangue menor que 1 mg. A quantidade de sangue ingerida não aumentou significativamente quando 2-heptanona, acetofenona, γ -octalactona ou 4-MCH foram testados em dose menores (0,1 e 0,01%). Foi observado um ligeiro aumento da massa de sangue ingerido quando a γ -octalactona foi testada na concentração de 0,1% v/v, a massa ingerida foi de 6,55±4.14 mg enquanto na concentração de 0,01% v/v, a massa foi de 17,5±7,7 mg; p<0,0001 para todos os casos) (Fig. 43). De modo geral, os insetos que conseguiram fazer o repasto sanguíneo, ingeriram uma massa de sangue 8 vezes menor que os insetos dos grupos controles, o que demonstra uma redução considerável na capacidade de ingestão de sangue, na presença dos quatro compostos repelentes.



Figura 42. Resposta comportamental na presença de semioquímicos fisiologicamente ativos. Ninfas de 5° estádio machos em jejum foram testados, individualmente, quanto à capacidade de encontrar e permanecer próximas ao hospedeiro humano na presença de hexano, DEET (grupos controles) 2-heptanona, γ -octalactona, acetofenona e 4-metilcilohexanol (grupos experimentais). O tempo que o inseto permanecia próximo ao hospedeiro humano (zona do hospedeiro) foi aferido. Os insetos foram testados até o limite de 300 s para chegar a isca. E até 300 s, tempo de permanência próximo a isca. A barra representa a média do tempo de residência do inseto próximo ao hospedeiro, ± erro padrão para cada indivíduo testado individualmente (N=10), em triplicata experimental. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05). DEET X 2-Heptanona, p=0,0003; DEETX γ -Octalactona, p<0,0001; DEET X Acetofenona, p<0,0001; DEET X 4MCH, p<0,00.



Figura 43. Análise da quantidade de sangue ingerido na presença dos compostos repelentes. Neste bioensaio foram utilizados 5 grupos de insetos (N=10) para cada condição avaliada (2-heptanona, γ -octalactonana, acetofenona e 4-metilciclohexanol 1%; controles: hexano e DEET 1%). Os insetos eram pesados, individualmente, 2 h antes e após o experimento. Em seguida, era calculada a massa de sangue ingerida por cada inseto. A barra representa a massa de sangue ingerida ± erro padrão. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando ANOVA seguida do teste de Tukey. Lestras diferentes indicam que há diferença estatística, p<0,0001. Hexano X DEET, p= 0,0584; DEET X 2-Heptanona, p<0,0001; DEET X γ -Octalactona, p<0,0001; DEET X Acetofenona, p<0,0001; DEET X 4MCH, p<0,0001.

4.5. O Papel do OR80 na detecção do 4-metilciclohexanol

Em seguida, avaliamos se a redução dos transcritos do *OR80* por RNAi poderia afetar a resposta dos insetos aos repelentes. Ninfas machos de 5° estádio foram injetadas na região do tórax com dsOR80, água ou dsβ-GAL conforme protocolo pré-estabelecido em nosso laboratório (OLIVEIRA et al., 2018). Os níveis de transcritos para *OR80* nas antenas dos insetos foram medidos 2 dias após a injeção. A expressão relativa do gene *OR80* foi reduzida em 77% nos insetos injetados com dsOR80 comparados aos insetos dos grupos controles (p<0,0001) (Fig. 44).

Além disso, nós testamos se os insetos expressando o novo fenótipo poderiam responder ao odorante mais ativo dos quatro repelentes, o 4-MCH. As ninfas injetadas com água foram repelidas pelo 4-MCH, mas não pelo DEET ou pelo hexano (Fig. 45). Elas permaneceram em média $225,2 \pm 14,35$ s na presença do hexano, $243 \pm 14,64$ s na presenca do DEET e $72 \pm 22,10$ s na presenca do 4-MCH (Fig. 45).

As ninfas injetadas com ds β -GAL comportaram-se normalmente sendo repelidas pelo 4-MCH, mas não pelo DEET e hexano (Fig. 44). Sendo o tempo de residência das ninfas na zona do hospedeiro de 248,0 ± 16,08 s na presença do hexano, 234,0 ± 20,41 s na presença do DEET e 55,0 ± 16,08 s na presença do 4-MCH (Fig. 45).

A resposta das ninfas silenciadas para o *OR80*, na presença do 4-MCH, não foram repelidas. Assim, como na presença do DEET ou do hexano (controles) (Fig. 45). O tempo de residência das ninfas silenciadas para o *OR80*, na zona do hospedeiro, foi de 233,9 \pm 12,05 s na presença do hexano, 240,3 \pm 11,87 s na presença do DEET e 200,0 \pm 21,58 s na presença do 4-MCH (Fig. 45). Sugerindo fortemente que o OR80 participa da percepção de atividade repelente do composto 4-MCH.



Figura 44. Expressão relativa do gene *OR80* nos insetos tratados com RNAi. O RNA foi tratado com DNAse I e utilizado na síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa. As reações de qPCR foram realizadas utilizando SYBR Green e iniciadores específicos para cada gene. O nível de expressão do *OR80* nas antenas de insetos injetados com H₂O foi considerado basal (ou 1). O gene *R18S* foi usado como controle endógeno para normalizar o nível de expressão. As barras representam a média da expressão \pm erro padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando ANOVA seguida do teste de Tukey. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,0001).


Figura 45. Comportamento do *R. prolixus* silenciados para o *OR80* na presença de diferentes compostos. Os grupos foram composto por insetos injetados com H₂O, injetados com ds β Gal e injetados com dsOR80. Os insetos foram injetados no 5° estádio. Sete dias após a injeção os insetos foram testados individualmente quanto à capacidade de encontrar o hospedeiro na presença de 4-MCH (1% v/v). O tempo de percurso até o hospedeiro (máximo de 300 s) e o tempo que o inseto permanecia próximo ao hospedeiro (máximo de 300 s) foram aferidos. A barra representa a média do tempo de permanência do inseto próximo ao hospedeiro ± erro padrão para cada indivíduo testado independentemente (N=10), em triplicata experimental. A análise estatística entre os grupos foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey. Astericos indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05).

5. DISCUSSÃO

A interpretação correta dos sinais químicos presentes no meio ambiente a partir dos órgãos sensoriais tem sido objeto de vários estudos (BARGMANN, 2006; ANDERSON *et al.*, 2009; BODIN, VINAUGER & LAZZARI, 2009; BILLETER *et al.*, 2012). Nos insetos, a olfação é a modalidade sensorial responsável pela interpretação do meio ambiente. Após a detecção de odores o inseto pode iniciar uma série de comportamentos pertinentes à sua sobrevivência, como por exemplo, a busca de fontes alimentares, de parceiros sexuais, de sítios de oviposição, de abrigos, pode avaliar a presença de predadores, entre outros aspectos comportamentais importantes para a sua sobrevivência.

A olfação envolve uma série ordenada de fenômenos celulares que tem início, na maioria das espécies, nas antenas. Estas estruturas são recobertas por pequenas unidades morfofuncionais porosas denominadas sensilas olfativas. As sensilas abrigam uma série de estruturas que em conjunto são responsáveis pela propagação do impulso nervoso olfativo. Fazem parte deste conjunto os neurônios sensoriais olfativos (NSOs), as células acessórias e diversas proteínas envolvidas no processo de transdução do sinal olfativo (JEFFERIS, 2005).

Estudos relacionados com os processos celulares que envolvem a detecção do odor pelos insetos, principalmente, naquelas espécies prejudiciais à economia, como pragas de lavoura e prejudiciais à saúde humana ou animal como vetores de doenças, tem crescido muito nos últimos anos. Neste cenário, vale ressaltar a contribuição gerada pelos estudos realizados em *D. melanogater*. Apesar desta espécie não ser prejudicial ao ser humano é um dos modelos experimentais mais estudados no quesito olfação. Todos os conhecimentos gerados através deste modelo vêm ajudando a esclarecer de forma contundente muitos aspectos importantes da transdução do sinal olfativo em insetos (BARGMANN, 2006; BENTON, 2008; 2009). Estudos clássicos iniciados nas décadas de 80 (STOCKER *et al.*, 1983; STOCKER e GENDRE, 1988; MCKENNA *et al.*, 1989) em associação com as técnicas de eletrofisiologia e biologia molecular permitiram confirmar algumas hipóteses referentes à propagação do sinal olfativo em insetos (HEKMAT-SCAFE & CARLSON, 1996; HEKMAT-SCAFE, STEINBRECHT & CARLSON, 1997; VOSSHALL *et al.*, 1989).

O estudo da função dos receptores olfativos de insetos vetores tem possibilitado a sondagem de moléculas que podem ser utilizadas em armadilhas de capturas e/ou na criação de produtos repelentes. Um exemplo é o trabalho de CAREY et al. (2010) que ao caracterizar funcionalmente os ORs de *An. gambiae*, verificaram que alguns voláteis, presentes no suor humano, como por exemplo, o 1,3 octenol e o 2,3 butanodiona eram capazes de promover a

despolarização dos receptores AgamOR8 e AgamOR5, respectivamente, atraindo o mosquito para próximo do ser humano. Além disso, foi observado que o AgamOR65 era capaz de detectar o 2-etilfenol, que é encontrado na urina de muitos animais. SCIALO et al. (2012) ao expressar o receptor OR2 de Aedes albopictus, em células embrionárias humana HEK293, seguido dos registros: de influxo de cálcio (Ca²⁺ Imaging Measurement) e de eletrofisiologia unitário (SSR-single sensillum recording), em moscas transgênicas (UAS-AalbOR2), demonstraram que o OR2 respondia ao indol, que é um composto atrativo para a localização de sítio de oviposição em mosquito. ZHU et al. (2013) usando ensaio de expressão heteróloga em ovócitos de X. laevis e registro eletrofisiológico mostraram que os receptores OR37 e OR99 de Cx. quinquefasciatus respondiam aos compostos 4-metilfenol e 4-etilfenol, respectivamente. Em seguida, estes autores testaram a hipótese de que estes semioquímicos seriam compostos atrativos para localização de sítio de oviposição. De fato, eles comprovaram que fêmeas de Cx. quinquefasciatus eram atraídas e tinham as taxas de oviposição aumentadas na presença destes compostos fenólicos. E, por fim, usando o silenciamento gênico por técnica de RNAi, os autores puderam confirmar a função dos receptores CquiOR37 e CquiOR99 para localização de sítio de oviposição. MCBRIDE et al. (2014) trabalhando com cepas domésticas e selvagens de Ae. aegypti observaram que as fêmeas, da cepa doméstica, tinham preferência maior pelo odor humano quando comparado ao odor de animais. Esta preferência pelo hospedeiro humano é devido a dois fatores: o aumento da expressão e a grande sensibilidade do receptor AaegOR4 aos semioquímicos presentes em níveis elevados no suor humano. Recentemente, ZHANG et al. (2016) estudando o receptor olfativo OR46 de Apolygus lucorum conseguiram fazer a prospecção de voláteis de plantas que estão relacionados ao comportamento que o hemíptero apresenta para localizar as plantas hospedeiras. Em 2017, LIU e colaboradores, usando SSR e expressão heteróloga deorfanizaram 15 ORs do percevejo de cama, C. lectularius, descrevendo os receptores responsáveis pela identificação dos componentes do feromônio de agregação nesta espécie.

Apesar da maioria dos trabalhos disponíveis na literatura descreverem moléculas atrativas, sejam elas componentes de feromônios sexuais, de agregação, de localização de sítio de oviposição e de localização do hospedeiro, autores como XU et al. (2014) e PELLETIER et al. (2015) conseguiram fazer a prospecção de moléculas repelentes. Moléculas com atividade repelente poderão vir a ser utilizadas no desenvolvimento de produtos específicos para evitar o contato do ser humano com mosquitos e piolhos. A identificação do OR responsável pelo reconhecimento de repelentes pelo mosquito Cx.

quinquefasciatus foi possível usando técnica de expressão heteróloga, registro eletrofisiológico, eletroantenograma e silenciamento gênico por RNAi. Os repelentes DEET, IR3535 e picaridina se ligam especificamente ao OR136 do mosquito *Cx. quinquefasciatus* (XU et al., 2014) que responde a estas moléculas se afastando da fonte de odor. Usando uma abordagem semelhante de estudo foi possível identificar moléculas com atividade repelente para o piolho humano (*Pediculus humanus humanus*) (PELLETIER et al., 2015). Os compostos testados, 2,3-dimetil-fenol, 1-fenil-etanol e 4-metilciclohexanol, foram capazes de promover a despolarização do complexo PhumOR2•ORco expresso nas membranas de ovócitos de *X. leviae*. Os piolhos testados na presença do 2,3-dimetil-fenol, 1-fenil-etanol e 4-metilciclohexanol apresentaram comportamento de fuga, condizente com a ação repelente dos compostos.

5.1. A importância da compreensão da olfação em triatomíneos

O *R. prolixus* é um dos vetores da doença de Chagas na América Central e na América do Sul. Diferente dos dípteros, onde apenas as fêmeas se alimentam de sangue, os triatomíneos se alimentam de sangue em todas as fases de seu desenvolvimento, portanto, estão aptos a transmitir a doença de Chagas em qualquer momento de seu ciclo de vida. Além disso, estes insetos não possuem um hospedeiro preferencial, alimentando-se de qualquer vertebrado de sangue quente, ingerindo grandes volumes de sangue (LEHANE, 1991; LENT, 1999). Após a alimentação, os triatomíneos podem permanecer por um longo período em jejum, podendo chegar a várias semanas (LEHANE, 1991; LENT, 1999). Além do disso, estes insetos costumam se esconder em locais de difícil acesso para aplicação de inseticidas, tais como, frestas ou buracos das residências, galinheiros, entre pedaços de madeiras, telhados, folhas de palma ou de piaçava (ARGOLO et al., 2008). Todos estes fatores contribuem para o sucesso da transmissão vetorial da doença de Chagas.

O comportamento de busca pelo alimento exibido pelos triatomíneos é influenciado por vários sinais envolvendo odores, calor e umidade (GUERENSTEIN & LAZZARI, 2009). O CO₂, emanado pelo hospedeiro vertebrado, tem papel crucial na localização da fonte alimentar pelo *R. prolixus* (GUERENSTEIN & HILDEBRAND, 2008). A olfação induz comportamentos essenciais para a sobrevivência do inseto (LORENZO & MELO, 2012). Desta forma, ao sentir os odores emitidos pelos hospedeiros, os insetos são atraídos e se deslocam em direção ao vertebrado para realizar o repasto sanguíneo.

Ainda são raros os trabalhos que tratam dos eventos moleculares envolvendo a olfação de triatomíneos. A grande maioria dos estudos, na área de ecologia química, abordam exclusivamente os aspectos comportamentais apresentados pelos insetos. Odores presentes nas fezes, por exemplo, induzem o comportamento de agregação característico da espécie *R. prolixus* (FIGUEIRAS & LAZZARI, 2002). Feromônios produzidos pelas glândulas metaesternais de insetos fêmeas promovem a saída dos insetos machos dos abrigos e a aglutinação destes próximos a um casal no momento da cópula (PONTES et al., 2014).

O cenário de olfação começou a mudar com a publicação do genoma de *R. prolixus* em 2015 (MESQUITA et al., 2015). O primeiro estudo correlacionando o comportamento do inseto e proteínas olfativas foi disponibilizado no ano seguinte (FRANCO et al., 2016). Neste estudo, os autores mostraram a participação ativa e a importância do co-receptor olfativo (Orco) no comportamento de *R. prolixus*. Insetos silenciados para o Orco por RNAi apresentaram comportamento alterado, dificuldades de localizar o hospedeiro e de ingerir sangue. Estes insetos apresentaram taxas menores de oviposição, tempo maior de ecdise e altas taxas de mortalidade. Todas estas alterações biológicas foram decorrentes da incapacidade do inseto de detectar o hospedeiro vertebrado e se alimentar com sangue.

Apesar a técnica de RNAi ser promissora para o controle populacional de insetos, essa estratégia esbarra em uma questão prática. O dsRNA tem que ser injetado no triatomíneo, impossibilitando, em um primeiro momento, o controle dos insetos em larga escala.

A identificação de candidatos a ORs no genoma de *R. prolixus* (MESQUITA et al., 2015), abriu novas frentes para entender como esta espécie interpreta os sinais químicos presentes no ambiente, permitindo fazer prospecção de moléculas alvos que poderão ser utilizadas na criação de armadilhas de capturas ou que apresentem atividade repelente.

5.2. Seleção dos receptores olfativos no genoma de R. prolixus

Uma grande quantidade de receptores olfativos foi identificada em Diptera, Himenoptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera e Blattodea através do sequenciamento completo dos genomas de algumas espécies. O número total de candidatos a ORs varia muito entre as diferentes espécies de insetos. A mariposa *Spodoptera exigua* e o piolho *P. humanus humanus, por exemplo,* apresentam descritos no genoma apenas 10 candidatos a ORs (KIRKNESS et al., 2010; LIU et al., 2015). Enquanto a formiga *L. humile* tem 367 candidatos a ORs no genoma (SMITH *et al.,* 2011). Esta variação na quantidade de genes que expressam receptores olfativos parece estar ligada ao tipo de ecótipo em que cada espécie vive e da complexidade das interações intra e interespecíficas.

R. prolixus é um triatomíneo que vive, a maior parte de sua vida em abrigos escuros e estreitos e próximo a sua fonte de alimento; não requerendo, portanto, comportamentos muito complexos para sobrevivência, diferente do que ocorre com as espécies de mosquitos. Apesar disso, *R. prolixus* possui quase a mesma quantidade de candidatos a ORs (116 ORs) (MESQUITA *et al.*, 2015) que o mosquito *Ae. aegyptii*, que tem 131 genes candidatos a ORs (BOHBOT et al., 2007).

O principal vector da malária na África, o mosquito *An. gambiae*, tem apenas 79 genes candidatos a ORs descritos no genoma (HILL el at., 2002). Portanto, é provável que a maioria dos genes candidatos a ORs de *R. prolixus* não originem receptores funcionais. Isso parece ser comum em *R. prolixus*. Por exemplo, dos 27 genes candidatos a proteínas ligadoras de odor (OBPs) anotados no genoma (MESQUITA et al., 2015), apenas 63% originam proteínas funcionais nas antenas (OLIVEIRA et al., 2017) e, deste total, em torno de 35% destas OBPs teriam função de transportar odores (OLIVEIRA et al., 2018).

No presente estudo, criamos critérios empíricos para a seleção dos genes: (1) a relação filogenética dos *ORs* de *R. prolixus* com *ORs* funcionais de outros insetos; (2) presença de transcrito do *OR* exclusivamente nas antenas. Baseado nestes dois critérios foram selecionados 28 genes candidatos a receptores olfativos para o presente estudo (Figs.16, 17, 18, 19 e 22). A seguir discutiremos quais as implicações e os avanços para a área de comunicação química de triatomíneos a partir dos resultados obtidos.

A análise filogenética, além de possibilitar a seleção dos 28 genes candidatos a ORs, permitiu antever funções teóricas de como os ORs de *R. prolixus* eram agrupados, por exemplo, com ORs responsáveis pela identificação de moléculas de feromônios: sexuais; de agregação; de moléculas envolvidas na localização do hospedeiro; de moléculas de localização de sítios de oviposição e de moléculas repelentes. Desta forma, foi possível verificar que o OR1 estava presente no mesmo ramo do ClecOR42, ramo 1 (Fig. 16). O ClecOR42 é um receptor responsável pela detecção dos compostos benzaldeído e álcool benzílico componentes do feromônio de agregação do percevejo da cama, *C. lectularius* (LIU et al., 2017). No ramo 1 ainda identificamos os receptores AaegOR8 de *Ae. aegypti* (JUNG et al., 2015) e o AgamOR8 de *An. gambiae* (CAREY et al., 2010). Estes receptores são responsáveis pela percepção do 1-octen-3-ol, volátil presente no suor humano. O mosquito quando detecta o 1-octen-3-ol é atraído pelo hospedeiro humano (KLINE et al., 2007). Outro importante receptor encontrado no ramo 1 foi o OR11 da abelha *Apis melifera*. O AmelOR11

é responsável pela identificação e interpretação de 9-oxodecenóico (9-ODA), conhecido como "substância da rainha". O 9-ODA é produzido pelas glândulas mandibulares e é o composto responsável por atrair zangões a longa distância (WANNER et al., 2007b). Não é de todo impossível supor que o OR1 apresente função semelhante a dos ORs agrupados no ramo 1. A participação do OR1 na percepção de componentes do feromônio sexual tal como ocorre com o AmelOR11 das abelhas, ou a participação na detecção de feromônio de agregação, semelhante ao ClecOR42 do percevejo de cama; ou até mesmo com a percepção de odores emitidos pelo hospedeiro semelhante a função dos ORs AaegOR8 e AgamOR8 é intrigante e será explorada neste estudo.

Dois ramos da árvore agruparam receptores exclusivos de R. prolixus (Fig. 16). Isso é muito interessante, pois aponta para uma função de identificação de voláteis relacionados com comportamentos intraespecíficos. Um total de 16 ORs (3, 8, 9, 16, 18, 19, 24, 25, 66, 67, 68, 74, 80, 83, 106, 108 e 111) agrupados nos ramos 2 e 10 foram selecionados para investigar o perfil de expressão gênica. Comportamentos intraespecíficos são comuns em qualquer espécie e estão relacionados, na maioria dos casos, com a identificação de feromônios. Em triatomíneos voláteis produzidos pelas glândulas metaesternais de insetos fêmeas induzem nos insetos machos os comportamentos de deixar o abrigo e procurar um parceiro sexual (VITTA & LORENZO, 2009; PONTES, 2010). Nas espécies R. prolixus e T. infestans voláteis emanados pelos insetos fêmeas induzem o acasalamento (CRESPO & MANRIQUE, 2007; PONTES et al., 2008). Curiosamente, os machos podem tentar copular com outros machos e, esta tendência é aumentada de maneira substancial na presença de sinais químicos emitidos pela fêmea (MANRIQUE & LORENZO, 2012). O comportamento de agregação é muito comum em diferentes espécies de triatomíneos. Este comportamento é mediado por semioquímicos presentes nas fezes (SCHOFIELD & PATTERSON, 1977; FIGUEIRAS et al., 1994; LORENZO & LAZZARI 1996; VITTA et al., 2002). Este sinal de agregação está relacionado, basicamente, ao comportamento de procura por abrigos e, no reconhecimento intraespecífico dos indivíduos durante a noite (LORENZO & LAZZARI, 1996; PIRES et al., 2002). Feromônios de agregação também estão presentes na cutícula de triatomíneos e são capazes de promover a agregação somente através do contato direto inseto-inseto (FIGUEIRAS & LAZZARI, 1998; PIRES et al., 2002; VITTA et al., 2002). Assim, é possível sugerir que os receptores agrupados no ramo exclusivo de R. prolixus (OR3, OR8, OR9, OR16, OR18, OR19, OR24, OR25, OR66, OR67, OR68, OR74, OR80, OR83, OR106, OR108 e OR111) possam estar envolvidos na detecção de feromônios sexual ou de agregação.

Em R. prolixus a postura de ovos é estimulada pela detecção de sinais químicos do ambiente (GUIDOBALDI & GUERENSTEIN, 2015). Os insetos fêmeas realizam a postura dos ovos numa distribuição espacial bem particular quando estão na presença de penas de galinhas. GUIDOBALDI & GUERENSTEIN (2015) observaram que os voláteis produzidos pelo hospedeiro vertebrado desempenham um papel crucial no comportamento de oviposição das fêmeas de triatomíneos. O odor do hospedeiro estimula a oviposição e orienta a distribuição dos ovos (GUIDOBALDI & GUERENSTEIN, 2015). Este fato condiz com o comportamento de triatomíneos que vivem em abrigos próximos ao hospedeiro, garantindo que as ninfas, após a eclosão do ovo, tenham acesso a uma refeição sanguínea quase que imediatamente. Portanto, é possível especular que um ou vários ORs identificados neste estudo, participem efetivamente da detecção de voláteis indutores de oviposição. Assim, na análise da árvore filogenética foi possível identificar que o OR101 foi reunido ao ramo 3. O ramo 3 agrupou receptores olfativos responsáveis pela detecção de voláteis que indicam sítios de oviposição, localização do hospedeiro e feromônio de agregação (Fig. 16). Neste ramo está presente o OR35 da vespa parasita Anastatus japonicus. Esta vespa é inimiga natural e usada no controle do percevejo praga Tessaratoma papillosa. O AjapOR35 é responsável pela identificação do β-cariofileno e (E)-a-farneseno. Estes voláteis são produzidos pelas plantas hospedeiras, naturalmente infestadas por T. paillosa. A vespa reconhece os voláteis das plantas e, assim, encontra os percevejos para o processo de oviposição (WANG et al., 2017). É possível, que semelhante ao AjapOR35, o OR101 esteja envolvido na localização de moléculas de sítio de oviposição. Essa suposição é reforçada pela expressão majoritária do gene OR101 nas antenas de insetos fêmeas (Fig. 21).

No ramo 4, foram encontrados receptores olfativos exclusivos do percevejo da cama *C. lectularius* destinados a detecção dos componentes de feromônios de agregação nesta espécie. Neste ramo foram reunidos os receptores OR2, OR103, OR104 e OR105 de *R. prolixus* (Fig. 16). Os receptores OR40, OR41, OR42, OR43, OR44, OR46, OR47 e OR53 agruparam-se no ramo 9 que também contém receptores exclusivos dos componentes do feromônio de agregação do percevejo da cama (Fig. 16). O perfil de distribuição dos ORs de *R. prolixus* na árvore filogenética nos induz a conjecturar que semelhante aos receptores do percevejo da cama, os receptores olfativos de *R. prolixus* reunidos nos ramos 2 e 9 podem estar, também, envolvidos com a percepção de componentes do feromônio de agregação, visto que, *R. prolixus* também apresenta o comportamento de agregação.

5.3. Perfil de expressão dos genes ORs nos órgãos

A publicação do genoma de R. prolixus (MESQUITA et al., 2015) ajudou a expandir os estudos sobre proteínas quimiossensoriais. Estudos envolvendo o transcriptoma das antenas (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2017) e o estudo funcional do Orco (FRANCO et al., 2016), revelaram que o padrão de expressão dos ORs e a função do co-receptor olfativo no comportamento de R. prolixus seguem o mesmo perfil descritos para os demais insetos. Transcritos dos ORs, receptores ionotrópicos (IRs) e receptores gustativos (GRs) estão presentes em abundância nas antenas de R. prolixus (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2016). A diminuição dos transcritos para o co-receptor olfativo (Orco) nas antenas provocam mudanças comportamentais importantes e diretamente ligadas a capacidade dos insetos se alimentarem (FRANCO et al., 2016). Os 28 ORs selecionados para este estudo apresentaram transcritos exclusivamente nas antenas (Figs. 17, 18, 19 e 22), isto sugere a participação desses receptores na detecção de voláteis comportamentalmente ativos. Estudos que abordam a função dos ORs, têm mostrado uma forte correlação entre o local que o gene do OR é expresso e sua função no desencadeamento de um comportamento. Assim, genes expressos majoritariamente e/ou preferencialmente em tecidos olfativos tem papel importante na ecologia química e comportamental daquela espécie. Na maioria dos insetos os tecidos olfativos são representados pelas antenas e pelos palpos maxilares. Em triatomíneos temos assumido que as antenas representam o principal órgão responsável pela transdução do sinal olfativo.

Alguns genes estudados aqui apresentaram quantidades equivalentes de transcritos nas antenas de insetos machos e fêmeas como, por exemplo, *OR16, OR42, OR44* e *OR66-67-68* (Fig.17; Fig. 20). *ORs* expressos nas antenas de machos e fêmeas, via de regra, estão envolvidos na detecção de voláteis que induzem comportamentos gerais como, a localização da fonte de alimento, ou a fuga de predadores. Considerando que triatomíneos se alimentam exclusivamente de sangue em todos os estágios de desenvolvimento (ALDANA, LIZANO e VALDERRAMA, 2001; SALERNO *et al.*, 2002; ARGOLO *et al*, 2008) podemos supor que estes receptores estejam envolvidos na busca pelo hospedeiro vertebrado para a alimentação sanguínea. No mosquito *An. gambiae*, onde apenas as fêmeas são hematófagas, o receptor AgamOR1 é responsável pela detecção do 4-metilfenol, um dos 300 compostos presentes no suor humano (HALLEM et al., 2004) indicando para as fêmeas a localização exata do alimento. Em *R. prolixus* também foram identificados genes exclusivamente expressos nas antenas de insetos machos e de fêmeas. Os genes *OR1* e *OR3* apresentaram transcritos apenas nas antenas de insetos machos (Fig. 22; Fig. 23), portanto é razoável supor que estes dois receptores estejam envolvidos em algum aspecto comportamental apresentado pelos machos como, por exemplo, a detecção de moléculas de feromônios. Por outro lado, ao associarmos os resultados do qPCR com os resultados obtido no estudo de filogenia, esbarramos em um impasse. A análise filogenética nos mostrou que o OR1 foi agrupado no ramo 1. Este ramo contém receptores olfativos de várias espécies que são responsáveis por diferentes funções na ecologia química das espécies (Fig. 16). Em contraposto, o OR3 agrupou-se no ramo 3 que contém exclusivamente receptores olfativos do *R. prolixus* (Fig. 16). É provável que o OR1 participe da identificação de moléculas gerais, não necessariamente ligadas a um comportamento peculiar de insetos machos, mas sim, na detecção de voláteis envolvidos em diferentes aspectos da ecologia destes insetos. Contudo, o *OR3* pode ser um alvo interessante devido sua expressão particular nas antenas de insetos machos e seu agrupamento no ramo exclusivo de *R. prolixus*.

Os genes *OR2, OR40* e *OR101* apresentaram transcritos exclusivamente e/ou enriquecido nas antenas de insetos fêmeas (Fig. 19; Fig. 21). Este fato nos permite pressupor que estes ORs tenham relação com a percepção de voláteis que indicam sítios de oviposição. Suportando esta hipótese, a análise filogenética agrupou os receptores OR2 e OR40 em ramos contento exclusivamente receptores olfativos do *R. prolixus* e receptores dos componentes do feromônio de agregação do percevejo da cama, *C. lectularius* (Fig. 16). Já o OR101 foi agrupado no ramo 3 que contém receptores responsáveis pela detecção de uma variada gama de semioquímicos de diferentes espécies, dentre eles o AlucOR46 do hemíptero fitófago *Apolygus lucorum* (Fig. 16) (ZHANG et al., 2016). O AlucOR46 é responsável pela detecção de 6 voláteis de planta, (S)-(-) -Limoneno, (R)-(+)-Limoneno, (E)-2-Hexenal, (E)-3-Hexenol, 1-Heptanol e (1R)-(-)-Mirtenol. Assim como OR101 o AlucOR46 é expresso majoritariamente nas antenas de insetos fêmeas (ZHANG et al., 2016). O AlucOR46 participa ativamente na localização de plantas hospedeiras, comportamento essencial para a sobrevivência das fêmeas.

Perfil diferente foi observado quando avaliados os transcritos para os genes *OR8*, *OR9*, *OR18*, *OR19*, *OR24*, *OR25*, *OR41*, *OR43*, *OR46*, *OR47*, *OR53*, *OR74*, *OR80*, *OR83*, *OR106*, *OR108 e OR111*. Enquanto na análise por PCR convencional houve expressão dos genes *OR8*, *OR9*, *OR18*, *OR19*, *OR24*, *OR25*, *OR41*, *OR43*, *OR46*, *OR47*, *OR53*, *OR83*, *OR106*, *OR108 e OR111* tanto nas antenas de insetos machos como nas de fêmeas (Fig. 19), na quantificação dos transcritos por qPCR observamos que as antenas de fêmeas apresentam uma quantidade relativa maior destes transcritos (Fig. 21). Assim, podemos sugerir que estes receptores estejam envolvidos em uma função específica dos insetos fêmeas. De maneira análoga, quando avaliado o perfil de expressão dos genes *OR74 e OR80* observamos que as antenas de insetos machos apresentaram até 7x mais transcritos em comparação com as antenas de insetos fêmeas (Fig. 22; Fig. 23). Este achado sugere que os receptores OR74 e OR80 tenham uma função específica no comportamento dos insetos machos.

Comparando o transcriptoma das antenas de R. prolixus (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2017) com os dados apresentados aqui, observamos algumas contradições. A análise estatística do transcriptoma usando o pacote edgeR mostrou aumento significativo da expressão dos genes OR18, OR33, OR40, OR54 e OR58 nas antenas de insetos fêmeas, e dos genes Orco, OR39, OR46, OR62, OR84 e OR109 nas antenas dos insetos machos (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2017). Nossos resultados de qPCR confirmaram a presença majoritária de transcritos para os genes OR18 e OR40 nas antenas de insetos fêmeas. Entretanto, transcritos para o gene OR46 foram encontrados em maior quantidade nas antenas de insetos fêmeas (Fig. 21), diferente do observado no transcriptoma das antenas (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2017). Além disso, contrário ao mostrado no transcriptoma (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2017), o Orco não se mostrou expresso diferencialmente nas antenas de insetos machos, dado esse já observado anteriormente por nosso grupo (FRANCO et al., 2016). Discrepâncias entre dados de RNA-Seq e qPCR são comuns. LEAL e colaboradores (2013) validaram os dados de RNA-Seq do transcriptoma das antenas do mosquito Cx. quinquefasciatus com qPCR para os 5 principais genes expressos neste órgão. Estes autores encontraram perfis de expressão iguais quando compararam as duas técnicas. Entretanto, em trabalho recente, o mesmo grupo concluiu que o sexto colocado no rank de ORs com maior abundância de transcritos nas antenas de Cx. quinquefasciatus no RNA-Seq (LEAL et al., 2013), era na verdade o gene com maior abundância de transcritos nas antenas de Cx. quinquefasciatus (CHOO et al., 2018).

5.4. Ecologia química reversa

Estudos de eletrofisiologia conjuntamente com técnicas de biologia molecular têm permitido a identificação dos ligantes (voláteis) ao seu OR específico. Atualmente, muitos estudos utilizam a abordagem de ecologia química reversa (EQR) na investigação de semioquímicos envolvidos em respostas comportamentais mediadas pela olfação,

deorfanizando os ORs (CAREY et al., 2010; WANG et al., 2010; LIU et al., 2013; XU et al., 2014; PELLETIER et al., 2015). O termo deorfanização se aplica em EQR a identificação dos ligantes específicos de um OR.

No universo inicial de 116 ORs em R. prolixus (MESQUITA et al., 2015) foi reduzido para 28 ORs baseado na análise filogenética e no perfil de expressão majoritário nas antenas. A expressão exuberante de 4 ORs nas antenas de insetos machos (Fig. 23) nos levou a cogitar a hipótese de que estes receptores estariam envolvidos na detecção de feromônios sexuais. Testar essa hipótese seria relativamente simples, pois é sabido que as fêmeas de R. prolixus produzem nas glândulas metaesternais (GM) voláteis que induzem o comportamento sexual nos insetos machos (PONTES et al., 2008). Os principais voláteis produzidos pelas GM incluem o 2-butanona, 2-pentanona, (S)-2-butanol, 2-metil-3-buten-2-ol, 3-metil-2-butanol, 3pentanol, (S)-2-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol, 2-metil-1-butanol e (2R/2S)-4-metil-3penten-2-ol (PONTES et al., 2008; VITTA et al., 2009). Destes, pelo menos quatro (2-metil-3-buten-2-ol, (S)-2-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol, (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol) são fisiologicamente ativos, induzindo o comportamento de busca e localização das fêmeas pelos insetos machos (OLIVEIRA et al., 2018). Os OR1, OR3, OR74 e OR80 exclusivos de antenas de insetos machos foram expressos no sistema de ovócitos de X. leviae e testados por ensaio de patch-clamp contra um painel de 109 compostos químicos incluindo os 4 feromônios ativos. Apesar de serem expressos de forma majoritária nas antenas de insetos machos nenhum dos 4 receptores testados responderam aos feromônios (Fig. 27; Fig. 31; Fig. 35; Fig. 39). Portanto, a nossa hipótese inicial de que os OR1, OR3, OR74 e OR80 estariam envolvidos na detecção de voláteis emitidos pelos insetos fêmeas não se mostrou verdadeira. Restava, então, tentar encontrar um ligante para estes receptores entre os outros 105 compostos químicos de nosso painel teste. Destes apenas o complexo OR80•Orco respondeu, de maneira dose dependente, aos voláteis 4-metilciclohexanol (4MCH), acetofenona, yoctalactona e 2-heptanona (Fig. 39). A grande questão por trás dos ensaios de expressão heteróloga e de eletrofisiologia é a extrapolação dos efeitos in vitro para a ação in vivo. Este problema é facilmente contornado pela análise comportamental dos insetos na presença do composto químico em bioensaios de atração ou de ação repelente. Usando essa mesma abordagem foi possível identificar os ligantes específicos (2,3-dimetil-fenol, 1-fenil-etanol e 4-metilciclohexanol) do receptor olfativo 2 de P. humanus (PhumOR2) (PELLETIER et at., 2015). Nos ensaios comportamentais estes compostos mostraram ser capazes de repelir os insetos (PELLETIER et al., 2015). Outro exemplo bem empregado da EQR foi a identificação do ligante para o OR32 de Cx. quinquefasciatus (CHOO et al., 2018). Os ensaios de patch*clamp* mostraram que o acetaldeído se ligava especificamente ao receptor CquiOR32 (CHOO et al., 2018). As fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* quando desafiadas na presença de acetaldeído eram atraídas pelo composto. Além disso, em concentrações adequadas o acetaldeído promovia um aumento das taxas de oviposição (CHOO et al., 2018).

5.5. Bioensaio de ação repelente

Os repelentes DEET, IR3535 e picaridina são largamente utilizados para prevenir interações entre o ser humano e os mosquitos (LUPI et al., 2013). Apesar do DEET ser considerado o repelente padrão ouro para os mosquitos, ele não é eficaz contra os barbeiros (ZERMOGLIO et al., 2015). A ação repelente do DEET só é atingida para *R. prolixus* em concentrações muito elevadas, inviabilizando qualquer uso do DEET para este fim (ZERMOGLIO et al., 2015). Outros repelentes disponíveis no mercado, como a piperidina e icaridina, também não são eficazes na proteção contra os barbeiros (ZERMOGLIO et al., 2015). Nessas circunstâncias, o único meio de evitar o contato direto entre os triatomíneos e o ser humano seria através da utilização de matérias impregnados com piretróides (KROEGER et al., 2003), cujo uso regular não é recomendado devido sua alta toxidade para os seres humanos e para o ecossistema. Portanto, deparamos com a necessidade de descobrir novos compostos não tóxicos que possam ser utilizados como repelentes para os barbeiros.

O bioensaio empregado aqui testou a possibilidade dos compostos ativos fisiologicamente no *patch-clamp* apresentarem ação repelente. Uma pista importante que nos levou a testar a ação repelente dos compostos era que, pelo menos, um dos odorantes ativos no *patch-clamp*, a γ -octalactona, é um conhecido repelente usado para mosquitos (BEDOUKIAN, 2013; XU et al., 2014). Além disso, sabíamos que o 4-MCH era capaz de repelir o piolho humano (PELLETIER et al., 2015). Portanto, era plausível que a γ -octalactona, o 4-MCH, juntamente com a 2-heptatona, e a acetofenona poderiam repelir o *R. prolixus*. Esta possibilidade era interessante, visto que, o *R. prolixus* não responde aos repelentes de insetos mais comuns disponibilizados no mercado (ZERMOGLIO et al., 2015). Logo, estar diante de moléculas repelentes poderia abrir novas possibilidades de desenvolvimento de produtos para evitar o contato do vetor da doença de Chagas com o ser humano. Os ensaios que testam a ação repelente de um composto pressupõem a presença de uma isca para atrair o inseto. Entre a isca e o inseto é aplicada, em concentrações conhecidas, o semioquímico a ser testado. Para aferir nossa hipótese utilizamos o bioensaio proposto por ZERMOGLIO et al. (2015). Neste ensaio um tubo Falcon é dividido em diferentes zonas (Fig.

14), e o inseto é colocado em uma extremidade do tubo e a isca na extremidade oposta. O tempo que o inseto demora para percorrer o tubo, até alcançar a isca, e o tempo que o inseto permanecer na zona do hospedeiro, na presença e na ausência dos compostos químicos, é aferido. Portanto, é possível comparando o comportamento dos insetos nos grupos controles determinar se um composto pode ter ação de atrair ou de repelir o inseto. Desta forma, foi relativamente simples provar a hipótese de que os compostos fisiologicamente ativos na eletrofisiologia (4-MCH, acetofenona, γ -octalactona e 2-heptanona) eram ecologicamente ativos para o R. prolixus. As antenas de ninfas de 5º estádio machos e de insetos machos adultos apresentam quantidades equivalentes de transcritos para o gene OR80 (Fig. 40). Portanto, é provável que o receptor esteja presente em quantidades iguais nos NSOs dos estádios de ninfas e machos adultos. (Fig. 40). Dessa forma, o 5º estádio de ninfas machos foram utilizadas nos bioensaios. Todos os semioquímicos, 4-MCH, acetofenona, γ-octalactona e 2-heptanona, se mostraram ecologicamente ativos, sendo capazes, dependendo da concentração testada, de repelir as ninfas com maior ou menor intensidade (Fig. 42). O álcool, 4-MCH, foi o que apresentou maior potencial de atividade, em todas as concentrações usadas (0,01, 0,1 e 1% v/v). Os insetos testados contra 4-MCH permaneciam até 6 vezes menos tempo próximos ao hospedeiro humano comparados as ninfas dos grupos controles (Fig. 42). Outro achado importante foi que os compostos, não apenas repeliam as ninfas, mas além disso, alteravam a capacidade dos insetos se alimentarem sobre o hospedeiro vertebrado. A capacidade de ingestão de sangue foi praticamente abolida na presença dos 4 compostos. No bioensaio de ingestão de sangue os insetos eram depositados no fundo de um frasco de vidro e, para alcançar o vertebrado, deveriam percorrer um papel de filtro de aproximadamente 10 cm (FRANCO el al., 2016). O comportamento de busca e obtenção do alimento e, portanto, a voracidade por sangue estava reforçada pelo jejum de 21 dias. Os semioquímicos ecologicamente ativos eram aplicados diretamente no papel de filtro na extremidade próxima ao hospedeiro vertebrado. Todos os compostos alteraram o comportamento alimentar, pois foram capazes de impedir que os insetos ingerissem sangue (Fig. 43). O 4-MCH foi o semioquímico que provocou ação mais intensa, abolindo totalmente a capacidade de alimentação dos insetos (Fig. 43). Na presença dos 4 semioquímicos, independente da concentração testada, os insetos não eram capazes de permanecer próximos ao hospedeiro vertebrado tempo suficiente para realizar o repasto sanguíneo, muitos se quer conseguiam se aproximar do vertebrado. Apesar dos 4 semioquímicos terem provocado correntes elétricas de intensidades diferentes no patch-clamp (Fig. 39), quando testados no bioensaio todos os

compostos foram capazes de promover modificação no comportamento de *R. prolixus* (Fig. 42; Fig. 43).

O semioquímico 2-heptanona, é um conhecido volátil secretado por plantas e que apresenta ação repelente que visa proteger as plantas de herbivoria de pragas agrícolas (LU et al., 2014). Aliás, as abelhas secretam 2-heptanona de suas glândulas mandibulares quando picam. Não está clara a função da 2-heptanona no comportamento das abelhas, existem algumas hipóteses que envolvem atuar como um feromônio de alarme ou como um marcador químico. Sabe-se que a 2-heptatona age como um anestésico em pequenos artrópodes, como algumas larvas de mariposa e ácaros, que são paralisados após uma picada de abelha (PAPACHRISTOFOROU et al., 2012).

A γ -octalactona é uma lactona inicialmente isolada da fruta *Mangifera indica* conhecida popularmente como manga (JAYANTHI et al., 2012). Tem odor característico de coco. Atua atraindo insetos com a mosca da fruta *Bactrocera dorsalis*, cujas fêmeas aumentam a taxa de oviposição quando detectam a γ -octalactona (KAMALA JAYANTHI et al., 2014; PAGADALA DAMODARAM et al., 2014). Já o seu isômero δ -octalactona, tem ação repelente para a mosca hematófaga *Glossina morsitans*. Esta mosca é um grande problema para os criadores de gado bovino, pois atacam o rebanho causando perda consideráveis para os criadores. Entretanto, algumas espécies da família Bovidae mostram-se refratárias a *G. morsitans*, isso ocorre porque as espécies refratárias produzem e exalam a δ -octalactona, repelindo as moscas e se protegendo dos ataques (MWANGI et al., 2008).

Na década de 80, a acetofenona foi descrita por KOHNLE et al., 1987 como componente do feromônio de agregação do besouro *Taphrorychus bicolor*. Plantas produzem acetofenona naturalmente para repelir insetos pragas. Algumas plantas hospedeiras produzem acetofenona para repelir seus predadores como os besouros pragas de pinheiros, *Dendroctonus frontalis* e *D. brevicomis* (ERBILGIN et al., 2007; SULLIVAN, 2005). ERBILGIN et al. (2007) observaram que armadilhas contendo feromônio de agregação e acetofenona reduziam a captura do besouro *D. brevicomis*, entretanto não reduziam a captura do predador do besouro, o *Temnochila chlorodia*. Assim, os autores concluíram que a acetofenona disponível no ambiente pode fazer parte das interações intra e interespecíficas entre espécies simpátrica de besouros, sugerindo um possível uso desse semioquímico para o controle dessas espécies (ERBILGIN et al., 2007). Em mosquitos a acetofenona age como atrativo. A acetofenona é um dos voláteis florais produzidos pelas flores de *Silene otites* que

tem a propriedade de atrair mosquitos da espécie *Culex pipiens pipiens* (JHUMUR et al., 2007).

Assim como em *R. prolixus*, o 4-MCH tem ação repelente contra o piolho do corpo humano, *P. humanus* (PELLETIER et al., 2015). Estes semioquímicos interferem diretamente no contato entre o inseto e o hospedeiro, diminuindo, consequentemente, as chances de ingestão de sangue (PELLETIER et al., 2015). Já em dípteros, COLLINS & BLACKWELL (2002) demonstraram que o 4-MCH era capaz de atrair insetos fêmeas de duas espécies de *Toxorhynchites*, a *T. moctezuma* e a *T. amboinensis*, estimulando a oviposição. Fêmeas de *Aedes triseriatus* também são atraídas e estimuladas a ovipor na presença de 4-MCH (BENTLEY et al, 1982). Diferente do observado para *Toxorhynchites* e *A. triseriatus*, o 4-MCH não age como um composto atrativo para o mosquito *An. gambiae*. Ocorre exatamente o contrário, na presença do 4-MCH as fêmeas de *An. gambiae* depositam menor quantidade de ovos (RINKER et al., 2013). Alguns estudos mostraram claramente que insetos de espécies distintas podem apresentar respostas comportamentais diferentes a um mesmo semioquímico, o que deve estar relacionado, basicamente, ao papel desse odor na adaptação a diferentes ambientes ecológicos (GHANINIA et al., 2007).

5.6. Papel do receptor olfativo 80 na detecção de 4-metilciclohexanol

A capacidade de detecção e associação de odores e o comportamento de *R. prolixus* já foi amplamente demonstrada (MILNE, 2009 ORTIZ & MOLINA, 2010; VINAUGER et al., 2012; REISENMAN, 2014; GUIDOBALDI & GUERENSTEIN, 2013, 2015), mas não são conhecidos os mecanismos moleculares que participam do processo olfativo em triatomíneos.

A redução de cerca de 77% dos transcritos do gene *OR80* por RNAi (Fig. 44) nas antenas afetou a capacidade de detecção do 4-MCH e, consequentemente, o comportamento de *R. prolixus* quando confrontado com o 4-MCH (Fig. 45). Este resultado suporta a hipótese de que o OR80 tem um papel crucial na detecção desse semioquímico. Apesar dos efeitos fenotípicos do silenciamento do OR80, não terem sido analisado para os outros 3 semioquímicos identificados no presente estudo, os resultados da eletrofisiologia (Fig. 39) sugerem a participação do OR80 na identificação e processamento destes odores *in vivo* (Fig. 42).

Vimos no ensaio de *patch-clamp* que o receptor OR80 se liga a compostos com estruturas químicas distintas, e que na presença destes compostos os insetos apresentam as mesmas respostas comportamentais. Baseado em seu espectro de ligantes, podemos concluir

que o OR80 é um receptor do tipo generalista (BOHBOT & DICKENS, 2012), pois reconhece diferente compostos químicos.

5.7. Provável aplicação dos compostos repelentes no mercado

Nos últimos anos, os repelentes de insetos têm se tornado bastante populares, evitando assim o uso de inseticidas que muitas vezes são tóxicos para o meio ambiente e para o ser humano. Vários trabalhos vêm demonstrando com elegância a atividade de diferentes compostos como repelentes (MWANGI et al., 2008; MULLER et al., 2008, 2009; CLOYD et al., 2011; LU et al., 2014; GONZALEZ et al., 2015). Apesar de seguros, problemas de intoxicação (por composto químico específico presente nos repelentes) podem ser encontrados. Alguns relatos apontam para intoxicações e até morte pelo uso do repelente padrão ouro no mercado, o DEET, (KATZ et al., 2008; WILES et al., 2014; BRIASSOULIS et al., 2001; TENENBEIN, 1987).

A toxicidade dos compostos utilizados como repelentes naturais recém descobertos muitas vezes é desconhecida, e este desconhecimento impossibilita a criação de repelentes comerciais para aplicação em seres humanos. Assim, produtos como difusores de vara, difusores eletrônicos e velas aromáticas podem ser a solução para evitar a intoxicação por contato. Velas e difusores contendo os compostos geraniol, linalol e citronela como princípio ativo são capazes de repelir o mosquito da dengue, *Ae. aegypti* (MULLER et al., 2008, 2009). Adiante devemos testar se os semioquímicos identificados no presente trabalho, 4-MCH, acetofenona, γ -octalactona e 2-heptanona, são capazes de repelir outros triatomíneos, como *Triatoma infestans, Pastrongylus megistus* entre outras espécies. Seria extraordinário se todos os triatomíneos fossem sensíveis aos compostos repelentes identificados no presente estudo. Assim poderíamos desenvolver um produto, relativamente de baixo custo, como velas e difusores impregnados com a combinação de dois ou mais semioquímicos (4-MCH, acetofenona, γ -octalactona e 2-heptanona) para serem distribuídos nas áreas endêmicas de Doenças de Chagas, protegendo as residências e abrigos dos animais destes vetores.

6. CONCLUSÃO

- Foram selecionados 28 candidatos a *ORs* de *R. prolixus* por homologia com outros *ORs* de outros insetos cuja a função está descrita;
- Os 28 candidatos a ORs foram expressos nas antenas de *R. prolixus*;
- OR1, OR3 apresentaram transcritos somente nas antenas de insetos machos;
- OR2, OR40, e OR101 apresentaram transcritos apenas nas antenas de fêmeas;
- OR9, OR18, OR19, OR24, OR25, OR41, OR43, OR46, OR47, OR53, OR83, OR106, OR108, e
 OR111 apresentaram transcritos nas antenas de ambos os gêneros (PCR convencional), porém em maior quantidade nas antenas de insetos fêmeas (qPCR);
- *OR74*, e *OR80* demonstraram transcritos nas antenas de ambos gêneros (PCR convencional), mas em maior quantidade nas antenas de insetos machos (qPCR);
- *OR16, OR42, OR44, OR66, OR67 e OR68* apresentaram quantidades equivalentes de transcritos nas antenas de ambos os gêneros;
- Os receptores, OR1, OR3, OR74 e OR80 de *R. prolixus* foram clonados em pGEMHE e expressados em ovócitos de *Xenopus laevis*
- Todos os 4 ORs deofanizados não demonstraram resposta aos componentes do feromônio sexual do *R. prolixus*;
- OR1 demonstrou resposta eletrofisiológica para os compostos: 1-pentanol, 1-haxanol, 1heptanol, 2-butoxetanol e 3-metil-1-butanol;
- OR80 demonstrou resposta eletrofisiológica dose dependente para os compostos: 4metilciclohexanol, acetofenona, γ-octalactona e 2-heptanona;
- OR80 é expresso tanto em ninfas quanto em adultos;
- Os compostos 4-metilciclohexanol, acetofenona, γ-octalactona e 2-heptanona foram capazes de repelir os insetos;
- O composto 4-metilciclohexanol apresentou maior potencial de ação repelente comparado aos demais compostos testados;
- Os compostos 4-metilciclohexanol, acetofenona, γ-octalactona e 2-heptanona aboliram a capacidade de ingestão de sangue dos insetos;
- A técnica de RNAi foi eficaz no silenciamento do OR80;
- Os insetos silenciados para o OR80 não foram repelidos pelo composto 4-metilciclohexanol;
- OR80 participa na identificação e reconhecimento do 4-metilciclohexanol;

 Os compostos 4-metilciclohexanol, acetofenona, γ-octalactona e 2-heptanona mostraram-se promissores para a prospecção de um produto repelente para os *R. prolixus;*

7. REFERENCIAS

ABUIN, L.; BARGETON, B.; ULBRICH, M.H.; ISACOFF, E.Y.; KELLENBERGER, S.; BENTON, R. Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. Neuron, v. 69, n. 1, p. 44-60, 2011.

ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, v. 287, n. 5461, p. 2185-95, 2000.

ALDANA, E.; LIZANO, E.; VALDERRAMA, A. Effect of human blood feeding on the fecundity, fertility and biological cycle of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). Rev Biol Trop, v. 49, no. 2, p. 689-91, 2001.

ALTNER, H.; PRILLINGER, L. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo- and hygroreceptors and its functional significance. Int Rev Cytol, 67: 69–139, 1980.

ANDERSON, A.R.; WANNER, K.W.; TROWELL, S.C.; WARR, C.G.; JAQUIN-JOLY, E.; ZAGATTI, P.; ROBERTSON, H.; NEWCOMB, R.D. Molecular basis of female-specific odorant responses in *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology v. 39, p. 189–197, 2009.

ANDERSSON, M.N.; CORCORAN, J.A.; ZHANG, D.D.; HILLBUR, Y.; NEWCOMB, R.D.; LOFSTEDT, C. A Sex pheromone receptor in the Hessian fly *Mayetiola destructor* (Diptera, Cecidomyiidae). Front. Cell. Neurosci. v. 10, p. 212, 2016.

ANTON, S.; HOMBERG, U. Antennal lobe structures. In: Hansson, B.S. (Ed.), Insect Olfaction. Springer, Heidelberg, New York, 97–124, 1999

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COST, J. Ação comemorativa do centenário de descoberta da doença de Chagas: Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milenio, 67, 2008.

BALDWIN, W.F.; KNIGHT, A.G.; LYNN, K.R A sex pheromone in the insect *Rhodnius* prolixus (Hemiptera: Reduviidae). Can Entomol, 103 (1): 18-22, 1971.

BARGMANN, C. I. Comparative chemosensation from receptors to ecology. Nature, v. 444, no. 7117, p. 295-301, 2006.

BARRET, T.V. Parasites and predators of Triatominae. In: New Approaches in American Tripanosomiasis Research. PAHO Sci Publ, 318: 24-30, 1975.

BARROZO, R.B.; MINOLI, S.A.; LAZZARI, C.R. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). J Insect Physiol, 50: 249-254, 2004.

BEDOUKIAN, R. H. Control and repellency of mosquitoes. (Google Patents). 488, 2013.

BEN-ARIE, N.; LANCET, D.; TAYLOR, C.; KHEN, M.; WALKER, N.; LEDBETTER, D.H.; CARROZZO, R.; PATEL, K.; SHEER, D.; LEHRACH, H.; NORTH, M. A. Olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17: possible duplication of an ancestral receptor repertoire. Hum Mol Genet, v. 3, n. 2, p. 229-35, 1994.

BENGTSSON, J.M.; TRONA, F.; MONTAGNE, N.; ANFORA, G.; IGNELL, R.; WITZGALL, P.; JACQUIN-JOLY, E. Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis. Plos One. e31620, 2012.

BENTLEY, M. D.; MCDANIEL, I.N.; DAVIS, E.E. Studies of 4-methylcyclohexanol: an *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) oviposition attractant. J Med Entomol. v 14;19(5), p. 589-92, 1982.

BENTON, R. Chemical sensing in Drosophila. Curr Opin Neurobiol, v. 18, no. 4, p. 357-63, 2008.

BENTON, R. Multigene family evolution: perspectives from insect chemoreceptors. Trends Ecol. Evol. v.30, p.590–600, 2015.

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.

BENTON, R.; VANNICE, K.S.; GOMEZ-DIAZ, C.; VOSSHALL, L.B. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in Drosophila. Cell, v. 136, n. 1, p. 149-62, 2009.

BILLETER, J. C.; JAGADEESH, S.; STEPEK, N.; AZANCHI, R.; LEVINE, J. D. *Drosophila melanogaster* females change mating behaviour and offspring production based on social context. Proc Biol Sci, v. 279, no. 1737, p. 2417-25, 2012.

BODIN, A.; VINAUGER, C.; LAZZARI, C. R. Behavioural and physiological state dependency of host seeking in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. J Exp Biol, v. 212, no. Pt 15, p. 2386-93, 2009.

BOHBOT, J. D.; DICKENS, J. C. Selectivity of odorant receptors in insects. Front Cell Neurosci v.6, p.29, 2012.

BOHBOT, J.; PITTS, R.J.; KWON, H.W.; RUTZLER, M; ROBERTSON, H.M.; ZWIEBEL, L.J Molecular characterization of the *Aedes aegypti* odorant receptor gene family. J. Insect Mol. Biol. v.16, p.525–37, 2007.

BRIASSOULIS, G. Toxic encephalopathy associated with use of DEET insect repellents: a case analysis of its toxicity in children. Hum Exp Toxicol. V.20, p. 8–14, 2001.

BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell, v. 65, n. 1, p. 175-87, 1991.

BUXTON, P. A. The biology of a blood-sucking bug, Rhodnius. Progr. Biophs. Mol. Biol, v. 53, p. 33-69, 1930.

BYRD, C. A.; JONES, J.T.; QUATTRO, J.M.; ROGERS, M.E.; BRUNJES, P.C.; VOGT, R.G. Ontogeny of odorant receptor gene expression in zebrafish, *Danio rerio*. J Neurobiol, v. 29, n. 4, p. 445-58, 1996.

CAO, S.; LIU, Y.; GUO, M.; WANG, G A conserved odorant receptor tuned to floral volatiles in three heliothinae species. PLoS ONE v.11, e0155029–e0155029, 2016.

CAREY, A.F.; CARLSON, J. R. Insect olfaction from model systems to disease control. Proc Natl Acad Sci USA. v.108, p.12987–12995, 2011.

CAREY, A.F.; WANG, G.; SU, C.Y.; ZWIEBEL, L.J.; CARLSON, J.R. Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Nature. V. 464 p.66-72, 2010.

Centers for Disease Control and Prevention, 2016. American Trypanosomiasis (also known as CD). Available at: <u>http://www</u>. cdc.gov/parasites/chagas/. Accessed June 27, 2016.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e ciclo evolutivo do Schizotripanum cruzi, N. Gen, N. sp., o agente etiolóco de nova entidade mõrbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Crus, v.1, p. 159-218, 1909.

CHAIKA, S. [Ultrastructure of the antennal sensillae of the bug, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae)]. Parazitologiia, v. 14, n. 6, p. 486-92, 1980.

CHANG, D.; NIANG, C.; HUANG, L.Q.; WANG, C.Z. Design of larval chemical attractants based on odorant response spectra of odorant receptors in the cotton bollworm Insect Biochemistry and Molecular Biology v. 84, p.48-62, 2017. A.

CHANG, H.; LIU, Y.; AI, D.; JIANG, X.; DONG, S.; WANG, G. A Pheromone Antagonist Regulates Optimal Mating Time in the Moth *Helicoverpa armigera*. Current Biology v. 27, p.1610–1615, 2017. B.

CHAPMAN, R. F. The insects: structure and function. Cambridge: Cambridge University Press, 770, 1998.

CHEN, S. & LUETJE, C. W. Identification of new agonists and antagonists of the insect odorant receptor co-receptor subunit. PLoS One 7(5) : e36784, 2012.

CHOO, Y.M.; XU, P.; HWANG, J.K.; ZENG, F.; TAN, K.; BHAGAVATHY, G.; CHAUHANB, K.R.; LEAL, W.S. Reverse chemical ecology approach for the identification of an oviposition attractant for *Culex quinquefasciatus*. PNAS. v. 115, n.4, p. 714-719, 2018.

CLAUDIANOS, C.; LIM, J.; YOUNG, M.; YAN, S.; CRISTINO, A.S.; NEWCOMB, R.D.; GUNASEKARAN, N.; REINHARD, J. Odor memories regulate olfactory receptor expression in the sensory periphery European Journal of Neuroscience, p. 1–13, 2014.

CLOYD, R. A.; MARLEY, K. A.; LARSON, R. A.; DICKINSON, A.; ARIELI, B. Repellency of Naturally Occurring Volatile Alcohols to Fungus Gnat *Bradysia* sp. nr. *coprophila* (Diptera: Sciaridae) Adults Under Laboratory Conditions. J Econ Entomol. v.104, no. 5, p. 1633-9, 2011.

CLYNE, P. J. Warr, C.G.; Freeman, M.R.; Lessing, D.; Kim, J. and Carlson, J.R. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in Drosophila. Neuron, v. 22, n. 2, p. 327-38, 1999.

COLLINS, L. E.; BLACKWELL, A. Olfactory Cues for Oviposition Behavior in *Toxorhynchites moctezuma* and *Toxorhynchites amboinensis* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. v. 39, no. 1, p. 121-6, 2002.

CORCORAN, J.A.; JORDAN, M.D.; CARRAHER, C.; NEWCOMB, R.D A novel method to study insect olfactory receptor function using HEK293 cells. Insect Biochemistry and Molecular Biology v.54, p.22-32, 2014.

COSTA, J. and PETERSON, A.T. Ecological niche modeling as a tool for understanding distributions and interactions of vectors, hosts, and etiologic agents of Chagas disease. Adv Exp Med Biol. 2012.

COURA, J.R & ViÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature, 465(n7301_supp), S6–S7. doi:10.1038/nature09221,2010.

COUTO, A.; ALENIUS, M.; DICKSON, B. J. Molecular, anatomical, and functional organization of the Drosophila olfactory system. Curr. Biol. v.15, p.1535–1547, 2005.

CRESPO, J. G.; MANRIQUE, G. Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: role of Brindley's and metasternal glands. J. Insect Physiol. v. 53, no. 7, p. 708–714, 2007.

CRUZ-LOPEZ, L.; MALO, E. A.; ROJAS, J.C.; MORGAN, E. D. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. Med Vet Entomol, v. 15, n. 4, p. 351-7, 2001.

DANTY, E.; CORNUET, J.M.; MASSON, C. Honeybees have putative olfactory receptor proteins similar to those of vertebrates. C R Acad Sci Paris v. 317 p.1073–1079, 1994.

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

DHADIALLA, T. S; CARLSON, G. R.; LE, D.P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annu. Rev. Entomol. V.43, p.545-569, 1998.

DIAS, J. C. P. A Doença de Chagas e seu Controle na América Latina. Uma Análise de Possibilidades. Cad. Saúde Públ., Rio de Janeiro, v.9, no. 2, p. 201-209,1992.

DIAS, J.C. The beginning of Chagas disease control (homage to Dr. Emmanuel Dias, the pioneer of Chagas disease control, in the year of his birth centenary). Rev Soc Bras Med Trop. 2011.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. Cad Saúde Públ, v.22, no.10, p. 2020-2021, 2006.

DIAS, J.C.P; SILVA, J.C. Sobre alguns aspectos da profilaxia defensiva em doença de Chagas. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo v.11, p. 236-244, 1969.

DIAZ, J. H. Chemical and plant-based insect repellents: efficacy, safety, and toxicity. Wilderness Environ Med. v. 27, p.153–163, 2016.

DONG, X.; ZHONG, G.; HU, M.; YI, X.; ZHAO, H; WANG, H. Molecular cloning and functional identification of an insect odorant receptor gene in *Spodoptera litura* (F.) for the botanical insecticide rhodojaponin III Journal of Insect Physiology v. 59 p. 26–32, 2013.

ENGSONTIA, P.; SANDERSON, A. P.; COBB, M.; WALDEN, K. K.; ROBERTSON, H. M.; BROWN, S. The red flour beetle's large nose: an expanded odorant receptor gene family in *Tribolium castaneum*. Insect Biochem Mol Biol, v. 38, n. 4, p. 387-97, 2008.

ERBILGIN, N.; GILLETTE, N. E.; MORI, S. R.; STEIN, J. D.; OWEN, D. R.; WOOD, D. L. Acetophenone as an anti-attractant for the western pine beetle, *Dendroctonus Brevicomis LeConte* (Coleoptera: Scolytidae). J Chem Ecol v.33 no. 4, p.817, 2007.

FERREIRA, R.A.; LAZZARI, C.R.; LORENZO, M.G.; PEREIRA, M.H. Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? PLoS One, 2, e 932, 2007.

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

FIGUEIRAS, A.N.L. & LAZZARI, C. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. Physiol Entomol, v.23, p.33-37, 1998.

FIGUEIRAS, A.N.L.; KENIGSTEN, A.; LAZZARI, C.R. Aggregation in haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. J Insect Physiol. v.40, p.312-316, 1994.

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 Bioch. Mol. Biol, v.69, p. 82-90, 2016.

FRIEND, W.G.; CHOY, C.T.; CARTWRIGHT, E. The effect of nutrient in take on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stal. Can. J. Zool. 43, 891–904, 1965.

FUJII, T.; FUJII, T.; NAMIKIC, S.; ABED, H.; SAKURAI, T.; OHNUMA, A.; KANZAKI, R.; KATSUMA, S.; ISHIKAWA, Y.; SHIMADA, T. Sex-linked transcription factor involved in a shift of sex-pheromone preference in the silkmoth *Bombyx mori*. PNAS v. 108, n. 44, p. 180038-180043, 2011.

GADENNE, C.; BARROZO, R. B.; ANTON, S. Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell? Annu. Rev. Entomol. v.61, p.317–333, 2016.

GALVÃO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Sociedade Brasileira de Zoologia, Curitiba, 2015.

GAO, Q.; CHESS, A. Identification of candidate Drosophila olfactory receptors from genomic DNA sequence. Genomics, v. 60, n. 1, p. 31-9, 1999.

GERMAN, P. F.; VAN DER POEL, S.; CARRAHER, C.; KRALICEK, A. V.; NEWCOMB, R. D. Insights into subunit interactions within the insect olfactory receptor complex using FRET. Insect Biochem Mol Biol. v.43, no.2, p.138–145, 2013.

GHANINIA, M.; IGNELL, R.; HANSSON, B. S. Functional classification and central nervous projections of olfactory receptor neurons housed in antennal trichoid sensilla of female yellow fever mosquitoes, *Aedes aegypti*. Eur J Neurosci. v. 26(6), p.1611-23, 2007.

GOLDMAN, A.L.; VAN DER GOES VAN NATERS, W.; LESSING, D.; WARR, C.G.; CARLSON, J.R. Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. Neuron, v. 45, n. 5, p. 661-6, 2005.

GONZALEZ, P. V.; GONZALEZ AUDINO, P. A.; MASUH, H. M. Behavioral Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae to Synthetic and Natural Attractants and Repellents J Med Entomol. v. 52, no. 6, p.1315-21, 2015.

GROBE-WILDE, E.; STIEBER, R.; FORSTNER, M.; KRIEGER, J.; WICHER, D.; HANSSON, B. Sex-specific odorant receptors of the tobacco hornworm *Manduca sexta* Front Cell Neurosci. v. 4, p.1-7, 2010.

GUERENSTEIN, P.G.; HILDEBRAND, J.G. Roles and effects of environmental carbon dioxide in insect life. Ann Rev Entomol, v.5, p. 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.

GUERENSTEIN, P.G; LORENZO, M.G.; NÚÑEZ, J.A.; LAZZARI, C.R. Baker's yeast, an attractant for baiting traps for Chagas' disease vectors. Experientia, v.51, no.8, p.834-837, 1995.

GUIDOBALDI, F.; GUERENSTEIN, P. G. Evaluation of a CO2 -free commercial mosquito attractant to capture triatomines in the laboratory. J Vector Ecol. v.38, no. 2, p. 245-50, 2013.

GUIDOBALDI, F.; GUERENSTEIN, P. G. Oviposition in the blood sucking insect *Rhodnius prolixus* is modulated by host odors. Parasites & Vectors, v. 8, p. 265, 2015.

GUIDOBALDI, F.; MAY-CONCHA, I.J.; GUERENSTEIN, P.G. Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. J Physiol, 2014.

HA, T.S & SMITH, D.P. A Pheromone Receptor Mediates 11-cis-Vaccenyl Acetate-Induced Responses in Drosophila. The Journal of Neuroscience v.26, n. 34, p. 8727–8733, 2006.

HALLEM, E. A.; CARLSON, J. R. Coding of odors by a receptor repertoire. Cell, v. 125, n. 1, p. 143-60, 2006.

HALLEM, E. A.; NICOLE FOX, A.; ZWIEBEL, L. J.; CARLSON, J. R. Olfaction: mosquito receptor for human-sweat odorant. Nature. v.15;427(6971), p. 212-3, 2004.

HANSSON, B. S. & STENSMYR, M. C. Evolution of insect olfaction. Neuron, v.72 no.5, p.698-711, 2011.

HANSSON, B. S.; KNADEN, M.; SACHSE, S.; STENSMYR, M.C.; WICHER, D. Towards plant-odor-related olfactory neuroethology in Drosophila. Chemoecology, v. 20, n. 2, p. 51-61, 2010.

HATCHER-SOLIS, C.; FRIBOURG, M.; SPYRIDAKI, K.; YOUNKIN, J.; ELLAITHY, A.; XIANG, G.; LIAPAKIS, G.; GONZALEZ-MAESO, J.; ZHANG, H.; CUI, M.; LOGOTHETIS, D. E. G protein-coupled receptor signaling to Kir channels in *Xenopus oocytes*. Curr Pharm Biotechnol v.15, p.987–995, 2014.

HEKMAT-SCAFE, D. S.; CARLSON, J. R. Genetic and molecular studies of olfaction in Drosophila. Ciba Found Symp, v. 200, p. 285-96; discussion 296-301, 1996.

HEKMAT-SCAFE, D. S.; STEINBRECHT, R. A.; CARLSON, J. R. Coexpression of two odorant-binding protein homologs in Drosophila: implications for olfactory coding. J Neurosci, v. 17, no. 5, p. 1616-24, 1997.

HILL, C. A.; FOX, A. N.; PITTS, R.J.; KENT, L. B.; TAN, P. L.; CHRYSTAL, M. A.; CRAVCHIK, A.; COLLINS, F. H.; ROBERTSON, H. M.; ZWIEBEL, L. J. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. Science. v. 4;298(5591), p. 176-8, 2002.

HILL, S.R.; MAJEED, S.; IGNELL, R. Molecular basis for odorant receptor tuning: a short C-terminal sequence is necessary and sufficient for selectivity of mosquito Or8. Insect Molecular Biology v. 24, n. 4, p.491–501, 2015.

HUGHES, D.T.; PELLETIER, J.; LUETIE, C.W.; LEAL, W.S Odorant Receptor from the Southern House Mosquito Narrowly Tuned to the Oviposition Attractant Skatole. J Chem Ecol v.36, p.797–800, 2010.

ISHIDA, Y.; LEAL, W. S. Rapid inactivation of a moth pheromone. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 102, no. 39, p. 14075-9, 2005.

ISLAM, J.; ZAMAN, K.; DUARAH, S.; RAJU, P. S.; CHATTOPADHYAY, P. Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries, Acta Trop. v.167, p. 216-230, 2017.

ISSEL-TARVER, L.; RINE, J. Organization and expression of canine olfactory receptor genes. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 93, n. 20, p. 10897-902, 1996.

JAYANTHI, P. D.; WOODCOCK, C. M.; CAULFIELD, J.; BIRKETT, M. A.; BRUCE, T. J. Isolation and Identification of Host Cues from Mango, *Mangifera indica*, That Attract Gravid Female Oriental Fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. J Chem Ecol.v.4, p. 361-9, 2012.

JEFFERIS, G. S. Insect olfaction: a map of smell in the brain. Curr Biol, v. 15, n. 17, p. 668-70, 2005.

JHUMUR, U. S.; DOTTERL, S.; JURGENS, A. Electrophysiological and behavioural responses of mosquitoes to volatiles of *Silene otites* (Caryophyllaceae). Arthropod-Plant Interactions v.1, p. 245-254, 2007.

JIANG, X.J.; GUO, H.; DI, C.; YU, S.; ZHU, L.; HUANG, L.Q.; WANG, C.Z Sequence similarity and functional comparisons of pheromone receptor orthologs in two closely related Helicoverpa species. Insect Biochemistry and Molecular Biology v.48, p. 63-74, 2014.

JONES, W. D.; CAYIRLIOGLU, P.; KADOW, I. G.; VOSSHALL, L. B.; Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in Drosophila. Nature v.445, p.86–90, 2007.

JUNG, J.W.; BAECK, S.; PERUMALSAMY, H.; HANSSON, B.S.; AHN, Y.J.; KWON, H.W. A novel olfactory pathway is essential for fast and efficient blood-feeding in mosquitoes. Sci. Rep. v. 5, p.3444, 2015.

KAMALA JAYANTHI, P. D.; KEMPRAJ, V.; AURADE, R. M.; VENKATARAMANAPPA, R. K.; NANDAGOPAL, B.; VERGHESE, A.; BRUCE, T. J. Specific Volatile Compounds from Mango Elicit Oviposition in Gravid *Bactrocera dorsalis* Females. J Chem Ecol. v. 40, no. 3, p. 259-66, 2014.

KATZ, T.M.; MILLER, J.H.; HEBERT, A. A. Insect repellents: historical perspectives and new developments. J Am Acad Dermatol v.58, p.865–871, 2008.

KAUPP, U. B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. Nat Rev Neurosci, v. 11, n. 3, p. 188-200, 2010.

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

KENT, L. B.; WALDEN, K. K. O.; ROBERTSON, H. M. The Gr family of candidate gustatory and olfactory receptors in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Chem. Senses v.33, p.79–93, 2008.

KIELY, A.; AUTHIER, A.; KRALICEK, A. V.; WARR, C. G.; NEWCOMB, R. D. Functional analysis of a *Drosophila melanogaster* olfactory receptor expressed in Sf9 cells. J Neurosci Methods. v.159, no. 2, p.189–194, 2007.

KIRKNESS, E. F. et al. Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. Proc Natl Acad Sci USA. v. 107, no. 27, p.12168-73, 2010.

KLINE, D. L.; ALLAN, S. A.; BERNIER, U. R.; WELCH, C. H. Evaluation of the enantiomers of 1-octen-3-ol and 1-octyn-3-ol as attractants for mosquitoes associated with a freshwater swamp in Florida, U.S.A. Med Vet Entomol.v.21, no.4, p.323-31, 2007.

KOHNLE, U.; MUSSONG, M.; DUBBEL, V.; FRANCKE, W. Acetophenone in the aggregation of the beech bark beetle, *Taphrorychus bicolor* (Col., Scolytidae). J. Appl. Entomol. v.103, p.249-252, 1987.

KROEGER, A.; VILLEGAS, E.; ORDONEZ-GONZALES, J.; PABON, E.; SCORZA, J. V. Prevention of the transmission of Chagas' disease with pyrethroid-impregnated materials. Am J Trop Med Hyg v.68, no. 3, p. 307-311, 2003.

KROPF, S. P. Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil (1943-1962). Tempo: Revista do Departamento de História da UFF, Niterói, v.10, n.19, p.107-124, 2005.

KWON, J. Y.; DAHANUKAR, A.; WEISS, L. A.; CARLSON, J. R. The molecular basis of CO2 reception in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.104, p.13526-13531, 2007.

LARSSON, M. C.; DOMINGOS, A. I.; JONES, W. D.; CHIAPPE, M. E.; AMREIN, H.; VOSSHALL, L. B. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. Neuron, v. 43, n. 5, p. 703-14, 2004.

LATORRE-ESTIVALIS, J. M.; DE OLIVEIRA, E. S.; BEIRAL ESTEVES, B.; SANTOS GUIMARAES, L.; NEVES RAMOS, M.; LORENZO, M. G. Patterns of expression of

odorant receptor genes in a Chagas disease vector. Insect Biochemistry and Molecular Biology v.69, p. 71-81, 2016.

LATORRE-ESTIVALIS, J. M.; ROBERTSON, H.M.; WALDEN, K. K.; RUIZ, J.; GONCALVES, L. O.; GUARNERI, A. A.; LORENZO, M. G. The molecular sensory machinery of a Chagas disease vector: expression changes through imaginal moult and sexually dimorphic features. Sci Rep.v7, p.40049, 2017.

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, W. S. Reverse chemical ecology at the service of conservation biology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.114, p.12094–12096, 2017.

LEAL, W. S.; CHOO, Y. M.; XU, P.; DA SILVA, C. S.; UEIRA-VIEIRA, C. Differential expression of olfactory genes in the southern house mosquito and insights into unique odorant receptor gene isoforms. Proc Natl Acad Sci U S A. v.110, no.46, p.18704-9, 2013.

LEAL, W.S. The enigmatic reception of DEET — the gold standard of insect repellents Curr Opin Insect Sci., v. 6, p. 93-98, 2014.

LEHANE, M. J. Biology of blood-sucking insects Harper Collin Academic, 1991.

LENT, H. Evolução dos conhecimentos sobre vetores da doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 94, p. 89-92, 1999.

LIN, X.; ZHANG, Q.; WU, Z.; DU, Y. Identification and Differential Expression of a Candidate Sex Pheromone Receptor in Natural Populations of *Spodoptera litura*. PLOS ONE v.10, no. 6, e0131407, 2015.

LIU, A.Y.; XU, W.; PAPANICOLAOU, A.; DONG, S.L.; ANDERSON, A. Identification and characterization of three chemosensory receptor families in the cotton bollworm *Helicoverpa armígera*. BMC Genomics. v.15, p. 597, 2014. a

LIU, C.; LIU, Y.; WALKER, W.B.; DONG, S.; WANG, G. Identification and functional characterization of sex pheromone receptors in beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). Insect Biochemistry and Molecular Biology v. 43, p.747-754, 2013.

LIU, C.; LUI, Y.; GUO, M.; CAO, D.; DONG, S.; WANG, G. Narrow tuning of an odorant receptor to plant volatiles in *Spodoptera exigua* (Hübner). Insect Mol Biol, v. 23 no. 4, p. 487–496, 2014. b

LIU, F & LIU, N. Human Odorant Reception in the Common Bed Bug, *Cimex lectularius*. Scientific Reports v.5 p.15558, 2015.

LIU, F.; XIONG, C.; LIU, N. Chemoreception to aggregation pheromones in the common bed bug, *Cimex lectularius* Insect Biochemistry and Molecular Biology v.82, p.62-73, 2017.

LIU, H.; LIU, T.; XIE, L.; WANG, X.; DENG, Y.; CHEN, C.H.; JAMES, A.A.; CHEN, X.G. Functional analysis of Orco and odorant receptors in odor recognition in *Aedes albopictus*. Parasites & Vectors v.9, p.363, 2016.

LIU, N.Y.; ZHANG, T.; YE, Z.F.; LI, F.; DONG, S.L. Identification and Characterization of Candidate Chemosensory Gene Families from *Spodoptera exigua* Developmental Transcriptomes. Int. J. Biol. Sci. v. 11, n. 9, p.1036-1048, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, v. 25, no. 4, p. 402-8, 2001.

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.

LORENZO, M.G. & LAZZARI, C.R. The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. J Insect Physiol, v.42, p. 903-907, 1996.

LU, J.; LI, J.; JU, H.; LIU, X.; ERB, M.; WANG, X.; LOU, Y. Contrasting effects of ethylene biosynthesis on induced plant resistance against a chewing and a piercing-sucking herbivore in rice. Mol Plant v.7 no.11, p. 1670-1682, 2014.

LU, T.; QIU, Y. T.; WANG, G.; KWON, J. Y.; RUTZLER, M.; KWON, H.; PITTS, R. J.; VAN LOON, J. J. A.; CARLSON, J. R.; ZWIEBEL, L. J. Odor coding in the maxillary palp of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. Curr. Biol. v.17, p.1533–1544, 2007.

LUNDIN, C.; KALL, L.; KREHER, S.A.; KAPP, K.; SONNHAMMER, E.L.; CARLSON, J. R.; HEIJNE, G.V.; NILSSON, I Membrane topology of the Drosophila OR83b odorant receptor. FEBS Lett, v. 581, n. 29, p. 5601-4, 2007.

LUO, Y; LU, S.; CHEN, P.; WANG, D.; HALPERN, M. Identification of chemoattractant receptors and G-proteins in the vomeronasal system of garter snakes. J Biol Chem, v. 269, n. 24, p. 16867-77, 1994.

LUPI, E.; HATZ, C.; SCHLAGENHAUF, P. The efficacy of repellents against Aedes, Anopheles, Culex and Ixodes spp. - a literature review. Travel Med Infect Dis., v. 11, n. 6, p. 374-411, 2013.

MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; AMÓRA, S.S.A. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. Rev bras plantas med, v.12, 2010.

MAJEROWICZ, D.; ALVES-BEZERRA, M.; LOGULLO, R.; FONSECA-DE-SOUZA, A.L.; MEYER-FERNANDES, J.R.; BRAZ, G. R.; GONDIM, K. C. 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.

MANRIQUE, G. & LORENZO, M. The sexual beahaviour of Chagas' disease vectors: chemical signals mediating communication between male and female triatomine bugs. Psyche, v. 2012, p. 1–8, 2012.

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. v.32, p.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 doublestranded RNA on molting and oogenesis in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. Insect Biochem Mol Biol 51, 110 (2014).

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M. S.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. Tropical Med Int Health. v.19, p. 943–957, 2014.

MATARAZZO, V.; TIRARD, A.; RENUCCI, M.; BOTTO, J.M.; BEL, M.C.; CLAVERIE, J. M.; BELAICH, A.; CLEMENT, J. L. Identification of odorant receptors from the *Alpine marmot* (Marmota marmota). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), v. 46, n. 7, p. 1249-58, 2000.

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, v.27, p.165–174, 2013.

MCBRIDE, C.S.; BAIER, F.; OMONDI, A.B.; SPITZER, S.A.; LUTOMIAH, J.; SANG, R.; IGNELL, R.; VOSSHALL, L.B. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. Nature v. 515, p.222-227, 2014.

MCCLINTOCK, T. S.; SAMMETA, N. Trafficking prerogatives of olfactory receptors. Neuroreport, v. 14, no. 12, p. 1547-52, 2003.

MCKENNA, M.; MONTE, P.; HELFAND, S. L.; WOODARD, C.; CARLSON, J. A simple chemosensory response in Drosophila and the isolation of acj mutants in which it is affected. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 86, no. 20, p. 8118-22, 1989.

MESQUITA et al., Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. PNAS, v. 112, n. 48, p. 14936–14941, 2015.

MILNE, M. A.; ROSS, E. J.; SONENSHINE, D. E.; KIRSCH, P. Attraction of *Triatoma dimidiata* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) to combinations of host cues tested at two distances. J. Med. Entomol. v. 46, no. 5, p. 1062-73, 2009.

MITCHELL, R.F.; HUGHES, D.T.; LUETJE, C.W.; MILLAR, J. G.; SORIANO-AGATON, F.; HANKS, L.M.; ROBERTSON, H.M. Sequencing and characterizing odorant receptors of the cerambycid beetle *Megacyllene caryae* Insect Biochem Mol Biol. v. 42, n.7, p. 499–505, 2012.

MOMBAERTS, P Love at first smell—the 2004 Nobel Prize in Physiology or Medicine. N Engl J Med. v. 351(25), p.2579–2580, 2004.

MOMBAERTS, P. Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. Annu Rev Neurosci, v. 22, p. 487-509, 1999.

MONTAGNE, N.; CHERTEMPS, T.; BRIGAUD, I.; FRANCOIS, A.; FRANCOIES, M. C.; DE FOUCHIER, A.; LUCAS, P.; LARSSON, M. C.; JACQUIN-JOLY, E. Functional

characterization of a sex pheromone receptor in the pest moth *Spodoptera littoralis* by heterologous expression in Drosophila. Eur J Neurosci. v.36, no.5, p.2588–2596, 2012.

MONTAGNE, N.; DE FOUCHIER, A.; NEWCOMB, R. D.; JACQUIN-JOLY, E. Advances in the identification and characterization of olfactory receptors in insects. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. v.130, p.55–80, 2015.

MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: SILVA-NETO, M. A. (Ed.). Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, v.1, 2012.

MORETTI, A. N.; ZERBA, E.N.; ALZOGARAY, R. A. Behavioral and Toxicological Responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to 10 Monoterpene Alcohols. Journal of Medical Entomology. v. 50, no. 5, p.1046–1054, 2013.

MOTA, T.; VITTA, A. C. R.; 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 Negl Trop Dis v. 8, e2677, 2014.

MULLER, G. C.; JUNNILA, A.; BUTLER, J.; KRAVCHENKO, V. D.; REVAY, E. E.; SCHLEIN, Y. Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. J Vector Ecol. v. 34, no.1, p.2-8, 2009.

MULLER, G. C.; JUNNILA, A.; KRAVCHENKO, V. D.; REVAY, E. E.; BUTLER, J.; SCHLEIN, Y. Indoor protection against mosquito and sand fly bites: a comparison between citronella, linalool, and geraniol candles. J Am Mosq Control Assoc. v.24, no. 1, p.150-3, 2008.

MWANG, M. T.; GIKONYO, N. K.; NDIEGE, I. O. Repellent properties of delta-octalactone against the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. J Insect Sci 8, 1,2008.

MWANGI, M.T.; GIKONYO, N.K.; NDIEGE, I.O. Repellent properties of delta-octalactone against the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. J Insect Sci v.8, p.1, 2008.

NAKAGAWA, T.; PELLEGRINO, M.; SATO, K.; VOSSHALL, L.B.; TOUHARA, K. Amino acid residues contributing to function of the heteromeric insect olfactory receptor complex. PLoS One, v. 7, n. 3, p. e32372, 2012.

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

NAKAGAWA, T.; VOSSHALL, L. B. Controversy and consensus: noncanonical signaling mechanisms in the insect olfactory system. Curr Opin Neurobiol, v. 19, no. 3, p. 284-92, 2009.

NEF, S.; ALLAMAN, I.; FIUMELLI, H.; DE CASTRO, E.; NEF, P. Olfaction in birds: differential embryonic expression of nine putative odorant receptor genes in the avian olfactory system. Mech Dev, v. 55, no. 1, p. 6577, 1996.

NGAI, J.; DOWLING, M. M.; BUCK, L.; AXEL, R.; CHESS, A. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. Cell, v. 72, no. 5, p. 657-66, 1993.

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, v.38, p. 398–415, 2008.

NUNEZ, J. A. Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). Bull Ent Res v.72, p.252–262, 1982.

NUNEZ, J.A. Behaviour of Triatominae bugs. In: Brenner RR, Stoka AM, editores. Chagas` disease Vectors, vol II Anatomic and Physiological aspects. CRC Press, p 1-30, 1987.

OLAFSON, P. U. Molecular characterization and immunolocalization of the olfactory coreceptor Orco from two blood-feeding muscid flies, the stable fly (*Stomoxys calcitrans, L.*) and the horn fly (*Haematobia irritans irritans*, L.). Insect Mol Biol, 2013.

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. v. 23, n. 9, p.1175., 2018.

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. v. 100, p. 108-118, 2017.

OLIVEIRA, M.F.; DIAS, A.T.N.; PONTES, V.M.O.; JUNIOR, A.S.S.; COELHO, H.L.L.; COELHO, I.C.B. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. v.37, no 3, p. 209-228, 2008.

OLIVIER, V. MONSEMPES, C.; FRANCOIS, M. C.; POIVET, E.; JACQUIN-JOLY, E. Candidate chemosensory ionotropic receptors in a Lepidoptera. Insect Mol Biol, v. 20, no. 2, p. 189-99, 2010.

OPAS. Estudo dos triatomíneos. Organização Pan-Americana da Saúde. Módulo III, 2009.

ORTIZ, M. I.; MOLINA, J. Preliminary evidence of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Triatominae) attraction to human skin odor extracts. Acta Trop. v. 113, no. 2, p. 174-9, 2010.

ORTIZ, M.I; SUÁREZ-RIVILLAS, A.; MOLINA, J. Behavioural responses to human skin extracts and antennal phenotypes of sylvatic first filial generation and long rearing laboratory colony *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.106, no. 4, p.461-466, 2011.

OSIMANI, J.; VERESSIMO, S.; BAYCE CARBONELL, P. La profilaxis de la enfermedad de Chagas en el Uruguay por medio del gamexano. Experiencias realizadas y plan de lucha contra el *T. infestans*. Bol Sanit Panamer v.29, p.1125-1134, 1950.

PAGADALA DAMODARAM, K. J.; KEMPRAJ, V.; AURADE, R. M.; VENKATARAMANAPPA, R. K.; NANDAGOPAL, B.; VERGHESE, A.; BRUCE, T. Oviposition site-selection by *Bactrocera dorsalis* is mediated through an innate recognition template tuned to γ-octalactone. Plos One. v. 9, no. 1, e85764, 2014.

PAPACHRISTOFOROU, A.; KAGIAVA, A.; PAPAEFTHIMIOU, C.; TERMENTZI, A.; FOKIALAKIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L.; WATKINS, M.; ARNOLD, G.; THEOPHILIDIS, G. The bite of the honeybee: 2-heptanone secreted from honeybee mandibles during a bite acts as a local anaesthetic in insects and mammals. PLoS One v.7, no. 10, e47432, 2012.

PELLETIER, J.; HUGHES, D.T.; LUETJE, C.W.; LEAL, W.S An odorant receptor from the southern house mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus* sensitive to oviposition attractants. PLOS One., v. 5, no. 4, p. 1-8, 2010.

PELLETIER, J.; XU, P.; YOON, K.S.; CLARK, J.M.; LEAL, W.S. Odorant receptor-based discovery of natural repellents of human lice. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 66, p. 103-109, 2015.

PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. Lancet. v.391, p.82–94, 2018.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; MARTINS, C. B. C.; PELLEGRINO, A. C.; ZARBIN, P. H. G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. Quim. Nova. v. 36, no. 9, p.1395-1405, 2013.

PIRES, H.H.R.; LORENZO, M.G.; DIOTAIUTI, L.; LAZZARI, C.R.; LORENZO FIGUEIRAS, A.N. Aggregation behaviour in *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*: inter and intraspecific responses. Acta Trop, v.81, no.1, p. 47-52, 2002.

PITTS, R.J.; RINKER, D.C.; JONES, P.L.; ROKAS, A.; ZWIEBEL, L. J. Transcriptome profiling of chemosensory appendages in the malaria vector *Anopheles gambiae* reveals tissue- and sex-specific signatures of odor coding. BMC Genomics. v. 12, p. 271, 2011.

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, v. 34, no. 4, p. 450–457, 2008.

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, v. 28, p. 257-263, 2014.

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

REICHE, E.M.V.; INOUYE, M.M.Z.; BONAMETTI, A.M.; JANKEVICIUS, J.V. Doença de Chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. Jornal de Pediatria, v.72, no. 3, p.125-132, 1996.

REISENMAN, C. E. Hunger is the best spice: effect of starvation in the antennal responses of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol. v. 71, p. 8-13, 2014.

REY, L. Parasitologia. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, J. M. Salivary thiol oxidase activity of *Rhodnius prolixus*. Insect Biochem Mol Biol, v. 26, no. 8-9, p. 899-905, 1996.

RINKER, D. C.; PITTS, R. J.; ZHOU, X.; SUH, E.; ROKAS, A.; ZWIEBEL, L. J. Blood meal-induced changes to antennal transcriptome profiles reveal shifts in odor sensitivities in *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A v.110, no. 20, p. 8260–8265.,2013.

ROBERTSON, H. M.; WARR, C. G.; CARLSON, J. R. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 100 Suppl 2, p. 14537-42, 2003.

ROMANA, C.; ABALOS, J. Acción del Gammexane sobre los triatomideos: control domiciliário. Anales del Instituto de Medicina Regional de Tucumán. v.2, p.95-106, 1948.

RONDEROS, D. S.; LIN, C. C.; POTTER, C. J.; SMITH, D. P. Farnesol-detecting olfactory neurons in Drosophila. J Neurosci. v.34, no. 11, p.3959–3968, 2014.

RYTZ, R.; CROSET, V.; BENTON, R. Ionotropic Receptors (IRs): Chemosensory ionotropic glutamate receptors in Drosophila and beyond. Insect Biochem Mol Biol, v. 43, no. 9, p. 888-97, 2013.

SALERMO, A. P.; DANSA-PETRETSKI, M.; SILVA-NETO, M. A.; COELHO, H. S.; MASUDA, H. *Rhodnius prolixus* vitellin is composed of three different populations: comparison with vitellogenin. Insect Biochem Mol Biol, v. 32, n. 7, p. 709-17, 2002.

SALES-JUNIOR, P.A.; MOLINA, I.; FONSECA MURTA, S.M.; SANCHEZ-MONTALVA, A.; SALVADOR, F.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C.M. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. Am J Trop Med Hyg. v.97, no. 5, p.1289-1303,2017.

SATO, K.; PELLEGRINO, M.; NAKAGAWA, T.; VOSSHAL, L.B.; TOUHARA, K. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. Nature, v. 452, no. 7190, p. 1002-6, 2008.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem Acta Trop, v.115, p. 14-21, 2010.

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

SCIALO, F.; HANSSON, B. S.; GIORDANO, E.; POLITO, C. L.; DIGILIO, F. A. Molecular and functional characterization of the odorant receptor 2 (OR2) in the tiger mosquito *Aedes albopictus*. PLoS One. 2012.

SCOTT, K.; BRADY, R. J. R.; CRAVCHIK, A.; MOROZOV, P.; RZHETSKY, A.; ZUKER, C.; AXEL, R. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in Drosophila. Cell v.104, p. 661–673, 2001.

SELBIE, L. A. TOWNSEND-NICHOLSON, A.; LISMAA, T. P.; SHINE, J. Novel G protein-coupled receptors: a gene family of putative human olfactory receptor sequences. Brain Res Mol Brain Res, v. 13, no. 1-2, p. 159-63, 1992.

SMITH, C. D. et al. Draft genome of the globally widespread and invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). Proc Natl Acad Sci U S A, v. 108, no. 14, p. 5673-8, 2011.

SOBRINHO, J.L.S.; FONTES, D.A.F.; LYRA, M.AM.; SOARES, M.F.L.R.; NETO, P.J.R. Chagas disease: 100 years from its discovery Rev. Bras. Farm., v. 90, no. 4, p.283-289, 2009.

STENGL, M.; FUNK, N. W. The role of the coreceptor Orco in insect olfactory transduction. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2013.

STENGL, M.; ZIEGELBERGER, G.; BOEKHOFF, I.; KRIEGER, J. Perireceptor events and transduction mechanisms in insect olfaction. In: Hansson, B.S. (Ed.), Insect Olfaction. Springer-Verlag, Berlin, p. 49–66, 1999.

STOCKER, R. F.; SINGH, R. N.; SCHORDERET, M.; SIDDIQI, O. Projection patterns of different types of antennal sensilla in the antennal glomeruli of *Drosophila melanogaster*. Cell Tissue Res, v. 232, no. 2, p. 237-48, 1983.

STOCKER, R. F.; GENDRE, N. Peripheral and central nervous effects of lozenge3: a Drosophila mutant lacking basiconic antennal sensilla. Dev Biol, v. 127, no. 1, p. 12-24, 1988.

SUH, G. S.; WONG, A. M.; HERGARDEN, A. C.; WANG, J. W.; SIMON, A. F.; BENZER, S.; AXEL, R.; ANDERSON, D.J. A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in Drosophila. Nature v.431, p.854–859, 2004.

SULLIVAN, B. T. Electrophysiological and Behavioral Responses of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae) to Volatiles Isolated from Conspecifics. J Econ Entomol. v. 98, no. 6, p. 2067-78, 2005.

SUN, X.; ZENG, F-F.; YAN, M-J.; ZHANG, A.; LU, Z-X.; WANG, M-Q Interactions of two odorant-binding proteins influence insect chemoreception. Insect Molecular Biology. v. 25, n. 6, p. 712-723, 2016.

SYED, Z.; ISHIDA, Y.; TAYLOR, K.; KIMBRELL, D. A.; LEAL, W. S. Pheromone reception in fruit flies expressing a moth's odorant receptor. Proc Natl Acad Sci USA. v.103, no. 44, p.16538–16543. 2006.

TENENBEIN, M. Severe toxic reactions and death following the ingestion of diethyltoluamide-containing insect repellents. JAMA v. 258, p.1509–11, 1987.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. Biochem Mol Biol Educ. v.39, no.2, p.145-54, 2011.

TROEMEL, E. R.; CHOU, J. H.; DWYER, N. D.; COLBERT, H. A.; BARGMANN, C. I. Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. Cell, v. 83, no. 2, p. 207-18, 1995.

TSITOURA, P.; ANDRONOPOULOU, E.; TSIKOU, D.; AGALOU, A.; PAPAKONSTANTINOU, M. P.; KOTZIA, G. A.; LABROPOULOU, V.; SWEVERS, L.; GEORGOUSSI, Z.; LATROU, K. Expression and membrane topology of *Anopheles gambiae* odorant receptors in lepidopteron insect cells. PLoS One. v. 5, no. 11, e15428, 2010.

VELAZQUEZ-ANTICH, A. Atracción por olor en ninfas y adultos de *Rhodnius prolixus*. Rev Inst Med Trop Parasitol v.10, p.242-246, 1968.

VINAUGER, C.; PEREIRA, M. H.; LAZZARI, C. R. Learned host preference in a Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus*. Acta Trop 122 v.1, p.24, 2012.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. Doença de Chagas no Brasil. Cad Saude Publica, v. 16 Suppl 2, p. 7-12, 2000.

VITTA, A.C.R. & LORENZO, M.G. Copulation and Mate Guarding Behavior in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol, v.46, no.4, p.789-795, 2009.

VITTA, A.C.R.; 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. Journal of Chemical Ecology v.35, i.10, p. 1212-1221, 2009.

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: Reduvviidae), a Chagas disease vector. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97, p. 865-867, 2002.

VOSSHALL, L. B.; AMREIN, H.; MOROZOV, P. S.; RZHETSKY, A.; AXEL, R. A spatial map of olfactory receptor expression in the Drosophila antenna. Cell, v. 96, no. 5, p. 725-36, 1999.

VOSSHALL, L. B.; HANSSON, B. S. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. Chem Senses, v. 36, no. 6, p. 497-8, 2011.

WANG, G.; CAREY, A. F.; CARLSON, J. R.; ZWIEBEL, L. J. Molecular basis of odor coding in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010.

WANG, G.; VASQUEZ, G.M.; SCHAL, C.; ZWIEBEL, L.J.; GOULD, F. Functional characterization of pheromone receptors in the tobacco budworm *Heliothis virescens*. Insect Mol Biol., v. 20, no. 1, p. 125-133, 2011

WANG, Y.; CHEN, Q.; GUO, J.; LI, J.; WANG, J.; WEN, M.; ZHAO, H. REN, B. Molecular basis of peripheral olfactory sensing during oviposition in the behavior of the parasitic wasp *Anastatus japonicus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology v.89, p.58-70, 2017.

WANG, Z.; YANG, P.; CHEN, D.; JIANG, F.; LI, Y.; WANG, X.; KANG, L. Identification and functional analysis of olfactory receptor family reveal unusual characteristics of the olfactory system in the *Migratory locust*. Cell. Mol. Life. Sci. v. 72, p. 4429-4443, 2015.

WANNER, K.W.; ANDERSON, A.R.; TROWELL, S.C.; THEILMANN, D.A.; ROBERTSON, H.M. NEWCOMB, R.D. Female-biased expression of odourant receptor genes in the adult antennae of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Mol Biol, v. 16, n. 1, p. 107-19, 2007. a

WANNER, K.W.; NICHOLS, A.S.; WALDEN, K.K.O.; BROCKMANN, A.; LUETJE, C.W.; ROBERTSON, H.M. A honey bee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2decenoic acid. PNAS v.104, n.36, p.14383-14388, 2007. b

WETZEL, C. H.; BEHRENDT, H.J.; GISSELMANN, G.; STORKUHL, K. F.; HOVEMANN, B.; HATT, H. Functional expression and characterization of a Drosophila odorant receptor in a heterologous cell system. Proc Natl Acad Sci USA. v.98, no.16, p.9377–9380, 2001.
WHITE, G. B.; MOORE, S. J. Terminology of insect repellents, 2nd Ed. In: Debboun et al. (Eds.), Insect Repellents Handbook 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, London, New York, pp. 3–30, 2015.

WICHER, D.; SCHAFER, R.; BAUERNFEIND, R.; STENSMYR, M. C.; HELLER, R.; HEINEMANN, S. H.; HANSSON, B. S. Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclicnucleotide-activated cation channels. Nature, v. 452, n. 7190, p. 1007-11, 2008

WICHER, D.; SCHAFER, 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. Olfactory signaling in insects. Prog Mol Biol Transl Sci. v. 130, p.37-54, 2015.

WIGGLESWORTH, V. B.; GILLETT, J. D. The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host. J. exp. Biol. v.11, no. 2, p.120–39, 1934.

WILES, D.; YEE, J.; CASTILLO, U.; RUSSELL, J.; SPILLER, H.; CASAVANT, M. A lethal case of DEET toxicity due to intentional ingestion. J Anal Toxicol, v.38, p.696–698, 2014.

WISTRAND, M.; KALL, L.; SONNHAMMER, E. L. A general model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs. Protein Sci, v. 15, n. 3, p. 509-21, 2006.

WIGGLESWORTH, V. B. Physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and metamorphosis. Quart. J. Micr. Sci. v.76, p. 269–318, 1934.

World Health Organization (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). Update 1 fevereiro de 2018. http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis).

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, v.111, no.46, p. 16592–16597, 2014.

XU, P.; CHOO, Y.M.; PELLETIER, J.; SUJIMOTO, F.R.; HUGHES, D.T.; ZHU, F.; ATUNGULU, E.; CORNEL, A.J.; LUETJE, C.W.; LEAL, W.S Silent, generic and plant kairomone sensitive odorant receptors from the Southern house mosquito. Journal of Insect Physiology v.59, p.961–966, 2013.

XU, P.; GARCZYNSKI, S. F.; ATUNGULU, E.; SYED, Z.; CHOO, Y.M.; VIDAL, D.M.; ZITELLI, C.H.L.; LEAL, W.S. Moth Sex Pheromone Receptors and Deceitful Parapheromones Plos One., v. 7, e.41653 2012. a

XU, P.; HOOPER, A.M.; PICKETT, J.A LEAL, W.S. Specificity Determinants of the Silkworm Moth Sex Pheromone. Plos One., v. 7, n. 9, p. 1, 2012. b

XU, P.; ZHU, F.; BUSS, G.K.; LEAL, W.S. 1-Octen-3-ol – the attractant that repels [version 1; referees: 4 approved] F1000 Research 2015, 4:156 Last updated: 12 OCT 2015. a

XU, W.; PAPANICOLAOU, A.; LIU, N.Y.; DONG, S.L.; ANDERSON, A. Chemosensory receptor genes in the Oriental tobacco budworm *Helicoverpa assulta*. Insect Molecular Biology v.24, no. 2, p. 253–263, 2015. b

YAN, S.W.; ZHANG, J.; LIU, Y.; LI, G.Q.; WANG, G.R An olfactory receptor from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur) mainly tuned to volatiles from flowering host plants Journal of Insect Physiology v.79, p.36–41, 2015.

YAO, C. A.; IGNELL, R.; CARLSON, J. R. Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the Drosophila antenna. J. Neurosci. v.25, p.8359–8367, 2005.

ZACHARIAS, C. A.; PONTES, G. B.; LORENZO, M. G.; MANRIQUE, G. Flight initiation by male *Rhodnius prolixus* is promoted by female odors. J Chem Ecol v.36, p. 449-451, 2010.

ZACHARUK, R. Y. Ultrastructure and Function of Insect Chemosensilla. Annual Review of Entomology, v. 25, p. 27-47, 1980.

ZAMORA, D.; KLOTZ, S.; MEISTER, E.; SCHMIDT, J. Repellency of the components of the essential oil, citronella, to *Triatoma rubida*, *Triatoma protracta*, and *Triatoma recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J Med Entomol. v.52, p. 719–21, 2015.

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, J.; LIU, C.C.; YAN, S.W.; LIU, Y.; GUO, M.B.; DONG, S.L.; WANG, G.R. An odorant receptor from the common cutworm (*Spodoptera litura*) exclusively tuned to the important plant volatile cis-3-Hexenyl acetate Insect Molecular Biology v.22, no. 4, p. 424–432, 2013.

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 v.24, p.789–797, 2017.

ZHANG, Z.; ZHANG, M.; YAN, S.; WANG, G.; LIU, Y. A Female-Biased Odorant Receptor from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) Tuned to Some Plant Odors Int. J. Mol. Sci. v.17, p. 1165, 2016.

ZHAO, Y. Y.; LIU, F.; YANG, G.; YOU, M.S. PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management. Insect Mol Biol, v. 20, no. 1, p. 97-104, 2010.

ZHU, F.; XU, P.; BORBOSA, R.M.R.; CHOO, Y.M.; LEAL, W.S. RNAi-based Demonstration of Direct Link between Specific Odorant Receptors and Mosquito Oviposition Behavior Insect Biochem Mol Biol. v.43, no.10, p.916–923, 2013.

ZWIEBEL, L.J. & TAKKEN, W. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. Insect Biochem Mol Biol, 34: 645-52, 2004.

8. Anexo

Tabela suplementar 1. Receptores olfativos de diferentes insetos

Receptor	olfativo/receptor	Número de acesso (GenBank)	Espécie	Ordem	Semioquímico	Referência
DmelOR67d		Q9VT92.3	Drosophila melanogaster	Diptera	11-cis-vaccenyl acetate (VA),	Ha & Smith, 2006
AmelOR11		NP_001229891.1	Apis mellifera	Diptera	9-oxo-decenoic acid	Wanner et al., 2007
CquiOR10		ADF42902	Culex quinquefasciatus	Diptera	Skatole oviposition attractants.	Hughes et al., 2010
AgamOR1, AgamOR4, AgamOR6, AgamOR9, AgamOR11, AgamOR13, AgamOR15, AgamOR18, AgamOR21, AgamOR26	AgamOR2, AgamOR5, AgamOR8, AgamOR10, AgamOR12, AgamOR14, AgamOR16, AgamOR20, AgamOR25, AgamOR27	AGAP009519, AGAP011468, AGAP011467, AGAP006167, AGAP00912, AGAP009520, AGAP009520, AGAP011631, AGAP009412, AGAP009396, AGAP009408	Anopheles	Diptera	oviposition attractants, host	Wang et al., 2010; Carey et al.,
AgamOR28, AgamOR30, AgamOR30, AgamOR36, AgamOR39, AgamOR46, AgamOR50, AgamOR56, AgamOR65, A	AgamOR29, AgamOR31, AgamOR35, AgamOR38, AgamOR41, AgamOR48, AgamOR53, AgamOR57, AgamOR75	AGAP009398, AGAP009394, AGAP009410, AGAP009413, AGAP009411, AGAP003054, AGAP002722, AGAP002640, AGAP002639, AGAP004354, AGAP004355,	gambiae		attractants	2010

	AGAP004356,				
	AGAP004357,				
	AGAP009111,				
	AGAP008894,				
	AGAP009391,				
	AGAP009392,				
	AGAP009390,				
	AGAP009412,				
	AGAP006666,				
	AGAP000226,				
	AGAP001012,				
	AGAP004971,				
	AGAP004974,				
	AGAP002125,				
	AGAP009413.				
	AGAP002045				
CquiOR2	ADF42901.1	Culex	Diptera	Indole oviposition attractants.	Pelletier et al., 2010
-		quinquefasciatus	•	-	
AalbOP2	AEX65778	Andre albonictus	Diptera	Indole (-)-menthone	Sciolo et al. 2012
Aalookz	ALAOJIIO	Aedes dibopicius	Diptera	oviposition attractants.	
	AHF71329.1,	Cular			
CquiOR37, CquiOR99	AHF71330.1 Culex	Culex	Diptera	4-Methylphenol 4-Ethylphenol	Zhu et al., 2013
		quinquejasciatus	-		
	1 0 0 0 0 0 1	C I		1-hexanol,3-octyn-1-ol, 2-	
CquiOR1, CquiOR44,	AGS08021,	Culex	Distant	phenoxyethanol, benzaldehyde,	X
CquiOR73,	AGS08023,	quinquefasciatus	Diptera	octyl acetate, 5-methylphenol,	Xu et al., 2013
•	AG\$08022,			eugenol	
G :00126	AIO10899.1	Culex	D: /	DEPT	X (1 2014
CquiOR136		quinquefasciatus	Diptera	DEEI	Xu et al., 2014
	AHJ37465.1	<u> </u>	Di		
AmelOR151, AmelOR11	NP 001229891.1	Apıs mellifera	Diptera	Linaloo, 9-oxo-decenoic acid	Claudianos et al., 2014
AaegOR4	NP_001345122.1	Aedes aegypti	Diptera	Sulcatone	McBride et al., 2014
~			A		

AaegOR8, AaegOR49	NP_001345386.1, DAA80391.1	Aedes aegypti	Diptera	1-octen-3-ol ,cyclohexanol,2-ethyl- 1-hexanol, cyclohexanone ,benzyl alcohol, 4-methyl phenol	Jung et al., 2015
CquiOr114b1, CquiOr114b1 e CquiOR118b	ALV83718.1, ALV83719.1 e ALV83717.1	Culex quinquefasciatus	Diptera	(R)-1-octen-3-ol, (R)-1-octnyl-3-ol e 3-octano	Xu et al., 2015
CquiOR113 e CquiOR118	XP_001864496.1 EDS40287.1	Culex quinquefasciatus	Diptera	1-octen-3-ol	Hill, Majeed and Ignell, 2015
AalbOR10, AalbOR88	AALF007898, XP_019542428	Aedes albopictus	Diptera	1-octen-3-ol, índole, methyindole, DEET	Liu et al., 2016
MdesOR115	AOT85631.1	Mayetiola destructor	Diptera	2S,8E,10E)-8,10-tridecadien-2-yl acetate	Anderson et al., 2016
CquiOR36	AUO26706.1	Culex quinquefasciatus	Diptera	acetaldehyde	Choo et al., 2018
BmorOR19, BmorOR45, BmorOR47	DAA06001.1 ABK27854.1 ABK27846.1	Bombyx mori	Lepidoptera	Linalool, benzoic acid, benzaldehyde e 2-phenylethanol	Anderson et al., 2009
HvirOR6, HvirOR13, HvirOR14 e HvirOR16	CAD31948, CAG38114, CAG38115 e CAG38117	Heliothis virescens	Lepidoptera	Z9-14:ald, Z11-16:OH, Z11-16:Ac	Wang et al., 2011
BmorOR3	NP_001036925	Bombyx mori	Lepidoptera	Bombykal, Bombykol	Fujii et al., 2011
BmorOR1	BAD69584	Bombyx mori	Lepidoptera	Bombykal, Bombykol	Xu et al., 2012 a
AtraOR1, AtraOR3	AFP54146.1, AFP54147.1	Amyelois transitella	Lepidoptera	Z9Z11-14OFor, Z11Z13- 16Ald,Z11-16Ald	Xu et al, 2012 b
SlituOR12	ABQ84982	Spodoptera litura	Lepidoptera	cis-Hexenyl acetate	Zhang et al., 2013
SexiOR13 e SexiOR16	AGH58122, AGH58121	Spodoptera exigua	Lepidoptera	(Z,E)-9,12-tetradecadienyl acetate (Z9,E12-14:OAc), (Z)-9- tetradecenol (Z9-14:OH), Z9- tetradecenyl acetate (Z9-14:OAc), (Z,E)-9,12-tetradecadienol (Z9,E12-	Liu et al., 2013

				14:OH) e Z11-hexadecenol (Z11- 16:OH)	
SexiOR3	JF747606	Spodoptera exigua	Lepidoptera	E-β-farnesene, Farnesol, Neraniol, Geraniol e Octyl Acetate	Liu et al., 2014 a
HarmOR13	AIG51861.1	Helicoverpa armigera	Lepidoptera	Z11-16: Ald	Liu et al.,2014 b
HarmOR6, HarmOR14b, HassOR6, HassOR13 e HassOR16	AGK90000.1 AGK90005.1 AGK90014.1 AJD81551.1 AJD81554.1	Helicoverpa armigera Helicoverpa assulta	Lepidoptera	Z9-16:OH, Z9-14:ald, Z11-16:ald	Jiang et al., 2014
EposOR3	ACJ12929.2	Epiphyas postvittana	Lepidoptera	geranyl acetate	Corcoran et al., 2014
SlituOR3	AEY84943.2	Spodoptera litura	Lepidoptera	Z9E11-14:OAc e Z9E12-14:OAc	Lin et al., 2015
HassOR13	AJD81551.1	Helicoverpa assulta	Lepidoptera	Z9-16: Ald	Xu et al., 2015 b
HarmOR12, HassOR12 e HvirOR12	AND95945.1, AND95946.1 e CAG38113.1	Helicoverpa armigera Helicoverpa assulta Heliothis virescens	Lepidoptera	β-Citronellol, Geraniol, 3,7- Dimethyl-3-octanol, (–)-Linalool, Linalool e trans-2-Hexenyl acetate	Cao et al., 2016
HarmOR16	AIG51864.1	Helicoverpa armigera	Lepidoptera	Z11-16:OH	Chang et al., 2017 a
HarmOR12, HarmOR31, HarmOR41, HarmOR42, HarmOR50, HarmOR52 e HarmOR60	AIG51860.1, AIG51879.1, AIG51887.1, AIG51888.1, AIG51896.1, AIG51898.1 e AIG51906.1	Helicoverpa armigera	Lepidoptera	Citral, Myrcene,cis-Jasmone, 1- Pentanol, (+)-Borneol e cis-3- Hexen-1-ol	Chang et al., 2017 b
PhumOR2	PHUM225140	Pediculus humanus humanus	Phthiraptera	4-methylcyclohexano, 2,3- dimethylphenol e 1-phenylethanol	Pelletier et al., 2015

AjapOR10, AjapOR27,AjapOR11, AjapOR29, AjapOR33, AjapOR35	SRR4034898	Anastatus japonicus	b-Caryophyllene, Undecar Farnesene (þ)-Aromadend Cis-3-Hexen-ol, 2-Ethyl- ol, Ethyl Acetate Caryophyllene		Wang et al., 2017
AlucOR28, AlucOR30	AKS44362, AKS44363	Apolygus lucorum	Hemiptera (E)-2-Hexenyl acetate, (Z)-3- Hexenyl acetate, Butyl acrylate, Butyl butyrate, Butyl propionate, (1S)-(-)-Verbenone		Yan et al., 2015
ClecOR1, ClecOR2	XP_014261972.1, XP_014249919.1	Cimex lectularius	Hemiptera	Octanal, Nonanal, Decanal	Liu & Liu, 2015
AlucOR46	ANE06404.1	Apolygus lucorum	Hemiptera	(S)-(-)-Limonene, (R)-(+)- Limonene, (E)-2-Hexenal, (E)-3-Hexenol, 1-Heptanol and (1R)-(-)-Myrtenol.	Zhang et al., 2016
ClecOR1, ClecOR5, ClecOR9b, ClecOR11 ClecOR12, ClecOR15, ClecOR17, ClecOR19, ClecOR20, ClecOR21, ClecOR36, ClecOR37, ClecOR42, ClecOR46, ClecOR47	CLEC025216, CLEC025334, CLEC025315, CLEC025049, CLEC025026, CLEC025092, CLEC025092, CLEC025132, CLEC025382, CLEC025330, CLEC025330, CLEC025280, CLEC025376, CLEC025158, CLEC025296	Cimex lectularius	Hemiptera	2-Hexanone (E)-2-hexenal Benzyl alcohol Sulcatone Benzaldehyde dimethyl disulfide dimethyl trisulfide nonalnal decanal (R)- (+)-limonene (S)- (-)limonene	Liu, Xiong and Liu, 2017
McarOR3, McarOR5, McarOR20		Megacyllene caryae	Coleoptera	(S)-2-methyl-1-butanol, (2S,3R)- 2,3-hexanediol e 2-phenylethanol	Mitchell et al., 2012

			C	
Ordem Composto		Ordem	Composto	
1	(3 <i>E</i>)-2-methyl-3-penten-2-ol	57	(E)-2-hexenal	
2	(2S/2R)-4-methyl-3-penten-2-ol	58	(Z)-8-undecenal	
3	(S)-(+)-2-pentanol	59	(E)-2-heptenal	
4	2-methyl-3-buten-2-ol	60	(E)-2-nonenal	
5	1-butanol	61	2-butanone	
6	1-pentanol	62	2-heptanone	
7	1-hexanol	63	Geranyl acetone	
8	1-heptanol	64	6-methyl-5-hepten-2-one	
9	1-octanol	65	(-)-menthone	
10	1-nonanol	66	Fenchone	
11	2,3-butanediol	67	Cyclohexanone	
12	2-butoxyethanol	68	Acetophenone	
13	3-methyl-1-butanol	69	Phenol	
14	2-hexen-1-ol	70	2-methylphenol	
15	3-hexen-1-ol	71	3-methylphenol	
16	1-hexen-3-ol	72	4-methylphenol	
17	1-heptene-3-ol	73	4-ethylphenol	
18	3-octanol	74	3,5-dimethylphenol	
19	1-octen-3-ol	75	2,3-dimethylphenol	
20	2-octanol	76	Guaiacol	
21	2-butanol	77	2-tridecanone	
22	2-nonen-1-ol	78	2-methoxy-4-propylphenol	
23	4-methylcyclohexanol	79	2-phenoxyethanol	
24	1-hexadecanol	80	(+/-)- limonene	
25	Menthyl acetate	81	Linalyl acetate	
26	Methyl acetate	82	α-humulene	
27	Ethyl acetate	83	Linalool oxide	
28	Propyl acetate	84	Geraniol	
29	Butyl acetate	85	Nerol	
30	Pentyl acetate	86	Thymol	
31	Hexyl acetate	87	(+/-)-linalool	
32	Heptyl acetate	88	Eucalyptol	
33	Octyl acetate	89	Citral	
34	Nonyl acetate	90	Eugenol	
35	Decyl acetate	91	α-pinene	
36	Ethyl 3-hydroxybutanoate	92	Ocimene	
37	(<i>E</i>)-2-hexenyl acetate	93	(±)-citronellal	
38	(Z)-3-hexenyl acetate	94	Índole	
39	α-terpinene	95	3-methylindole	

Tabela suplementar 2. Lista de odorantes utilizados na eletrofisiológia

40	γ-terpinene		96	3-pentanol
41	Ethyl lactate		97	3-methyl-2-butanol
42	Methyl salicylate		98	3-methyl-2-buten-1-ol
43	Geranyl acetate		99	γ-valerolactone
44	Octadecyl acetate		100	γ-hexalactone
45	Acetaldehyde		101	γ-octalactone
46	Propanal		102	γ-decalactone
47	Butanal		103	α-phellandrene
48	Pentanal		104	Nerolidol
49	Hexanal		105	γ-dodecalactone
50	(E)-2-methyl-2-butenal		106	2,4-dimethylphenol
51	Heptanal		107	2,5-dimethylphenol
52	Octanal		108	2,6-dimethylphenol
53	Nonanal		109	3,4-dimethylphenol
54	Decanal			
55	Undecanal			
56	1-dodecanal			