UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

NATHÁLIA FARO DE BRITO

PROTEÍNA LIGADORA DE ODOR 17 (RPROOBP17) DE *RHODNIUS PROLIXUS* COMO ALVO MOLECULAR PARA O CONTROLE POPULACIONAL DO VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS

Rio de Janeiro

2021

Nathália Faro de Brito

PROTEÍNA LIGADORA DE ODOR 17 (RPROOBP17) DE *RHODNIUS PROLIXUS* COMO ALVO MOLECULAR PARA O CONTROLE POPULACIONAL DO VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS

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

Orientadora: Profª. Ana Claudia do Amaral Melo

Co-orientador: Profº. Walter Soares Leal

Rio de Janeiro

2021

CIP - Catalogação na Publicação

BA447p

Brito, Nathália Faro de
Proteína ligadora de odor 17 (Rroobp17) de Rhodnius prolixus como alvo molecular para o controle populacional do vetor da doença de chagas / Nathália Faro de Brito. -- Rio de Janeiro, 2021.
162 f.

Orientadora: Ana Claudia do Amaral Melo.
Coorientador: Walter Soares Leal.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2021.

1. Proteínas ligadoras de odor. 2. Rhodnius prolixus. 3. Olfação. 4. Ecologia química reversa. 5. Atrativos/repelentes. I. Melo, Ana Claudia do Amaral, orient. II. Leal, Walter Soares, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Nathália Faro de Brito

PROTEÍNA LIGADORA DE ODOR 17 (RPROOBP17) DE *RHODNIUS PROLIXUS* COMO ALVO MOLECULAR PARA O CONTROLE POPULACIONAL DO VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ___de maio de 2021.

Ana Claudia do A. Melo

Profª. Ana Claudia do Amaral Melo
(Orientadora, Doutora, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Profº. Walter Soares Leal
(Co-orientador, Doutor, University of California at Davis - UCD)

Profª. Bianca Cruz Neves
(Doutora, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Profª. Kátia Calp Gondim
(Doutora, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Profº. Fernando Ariel Genta
(Doutor, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

Profº. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin
(Doutor, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná - UFPR)

À babãe (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À babãe, por me ensinar o que é amor incondicional. Mãe, eu não acredito que você não tá mais aqui pra ver o fim dessa etapa. E todos os outros dias também. Obrigada por caminhar comigo até onde foi possível, pelas adversidades que superamos juntas, pelas vitórias que comemoramos, por todos os pedacinhos de você que são eternos e ainda vivem comigo. Pelo maior amor do mundo.

Ao meu pai, por ter me ensinado a importância do estudo e da honestidade. Pai, obrigada por sempre investir no meu futuro. Chegar até aqui não seria possível sem o seu apoio e incentivo.

Ao Daniel, por trazer a mágica de volta. Obrigada por compartilhar seus dias comigo, por tornar a vida mais alegre e por me mostrar os sentimentos mais bonitos e sinceros. O mundo faz mais sentido agora que você tá nele.

À professora e orientadora Ana Claudia, por todos os ensinamentos, no laboratório e na vida. Ana, obrigada por me pegar pela mão na graduação e me deixar sair correndo depois. Por sempre confiar na minha capacidade, por comprar minhas ideias malucas, por lidar com meus chiliques. Essa é mais uma etapa que eu termino transbordando de admiração e carinho por você.

Ao professor Walter, pelas palavras sábias nos momentos certos.

Ao preguinho Davi, que ainda é novinho pra entender a importância que tem. Garotinho, obrigada por toda a alegria que você traz.

À Flávia, que esteve comigo no pior dos momentos, agora também participa de uma pequena vitória. Obrigada por toda a força e por ainda me deixar mais bonita!

À Sílvia, pelo apoio e carinho de sempre. Na próxima vida a gente vem parente!

Às amigas de todas as horas. Ju e Érica, pra voces eu já nem sei mais o que dizer. Os anos de amizade já falam o que nem precisa ser dito.

A todos os colegas do LABBMOVE, pelo apoio constante e pelas risadas diárias. Dani e Thiago, obrigada por colocarem minhas culturas no shaker em horários estranhos! Por todas as vezes que vocês me ajudaram na bancada. À Vitória, Gabi, Victoria, Pâmela, Vítor, Julia, Maju, Larissa, e a todos que estão chegando agora, trazendo vida nova ao grupo. Obrigada pela torcida!

Aos queridos do LABEP, pelas conversas chorosas e pelas gargalhadas sem fim. Carolixa, por me ensinar a domar o AKTA e por ser uma pessoa incrível! Léo, Bia e Bianca, pela companhia nas purificações intermináveis. Pelas madrugadas no Fundão! Gui, Carol, Luis,

Luisinho, adorei dividir as dores e as alegrias da pós-graduação com todos vocês. Virei agregada!

Às professoras Katia e Bianca, aos professores Fernando Genta e Paulo Zarbin, por gentilmente cederem parte de seus tempos para contribuir com este trabalho. Obrigada por aceitarem meu convite para a banca.

Às professoras Márcia e Mônica, por estarem sempre presentes e dispostas a ajudar. Obrigada pelas dicas.

Ao grupo do LAMMP, por abrirem seu laboratório e ajudarem na utilização dos equipamentos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos os professores, alunos e funcionários do PPGBq, obrigada.

"*Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.*"

– Marie Curie

RESUMO

BRITO, Nathália F. Proteína ligadora de odor 17 (RproOBP17) de *Rhodnius prolixus* como alvo molecular para o controle populacional do vetor da doença de Chagas. Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Maio, 2021.

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada que ainda afeta cerca de 7 milhões de pessoas em todo o mundo. Seu agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitido por insetos triatomíneos conhecidos como barbeiros, dentre os quais o *Rhodnius prolixus* é um vetor importante, principalmente na região setentrional da América do Sul e na América Central. Como não existe vacina para a doença de Chagas, o controle do vetor é o meio mais eficaz de prevenção da infecção. No entanto, o manejo de populações de vetores triatomíneos usando inseticidas químicos parece não ter sucesso. Repelentes clássicos que se mostraram úteis para proteção constra mosquitos, como o DEET, IR3535 e icaridina também se mostraram ineficazes para triatomíneos. Uma vez que é bem estabelecido que a interpretação de sinais químicos no ambiente é essencial para a sobrevivência do inseto, o mecanismo molecular associado ao sistema olfativo tornou-se uma área de interesse para pesquisas com o objetivo de desenvolver novas estratégias de controle capazes de interferir em respostas comportamentais mediadas pela olfação. Diversas proteínas participam do processo de olfação, dentre as quais destacam-se as proteínas ligadoras de odor (OBP), responsáveis pelo transporte de semioquímicos majoritariamente hidrofóbicos através da linfa sensilar até os receptores olfativos (ORs) localizados na membrana dos dendritos sensoriais, iniciando a tranducção do sinal olfativo e a resposta comportamental associada. OBPs são proteínas pequenas e solúveis secretadas na linfa sensilar por células acessórias. Como odores não chegam até os ORs sem o auxílio de uma OBP, elas podem ser usadas como alvos moleculares para triagem de novos compostos comportamentalmente ativos em insetos (atrativos ou repelentes) por meio de uma abordagem conhecida como ecologia química reversa. Para utilizar OBPs nesse tipo de estudo, é essencial focar em OBPs funcionais, ou seja, aquelas realmente envolvidas na comunicação química. Além de selecionar OBPs funcionais, protocolos de expressão e purificação capazes de produzir a proteína recombinante para análises *in vitro* também precisam ser elaborados para torná-la um alvo adequado. Portanto, o objetivo desse estudo foi utilizar a RproOBP17 como alvo molecular visando o desenvolvimento de novas estratégias de controle vetorial. Os resultados revelaram que a expressão do RproOBP17 ocorre especificamente em antenas e não depende do estado nutricional do *R. prolixus*. Utilizando análises experimentais associadas a estudos *in silico*, foi possível hipotetizar a participação dessa proteína na detecção de voláteis da glândula de Brindley, como 2-metilpropanoato de 2-feniletila, 2-feniletanol e 2-metilpropanoato de 2-metilpropila. A expressão e purificação da RproOBP17 também foi realizada com sucesso. Finalmente, a triagem *in silico* por novos compostos comportamentalmente ativos usando a OBP17 sugeriu alta afinidade de ligação por compostos como cedrol, α-humuleno, β-cariofileno e β-damascenona.

Palavras-chave: proteína ligadora de odor (OBP), *Rhodnius prolixus*, olfação, controle vetorial, comunicação química.

ABSTRACT

BRITO, Nathália F. Proteína ligadora de odor 17 (RproOBP17) de *Rhodnius prolixus* como alvo molecular para o controle populacional do vetor da doença de Chagas. Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Maio, 2021.

Chagas disease is considered a neglected tropical disease which still affects around 7 million people worldwide. Its etiological agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi*, transmitted by triatomine insects known as kissing bugs, amongst which *Rhodnius prolixus* is a major vector, especially in the Andean region of South America and in Central America. Seeing that there is no vaccine for Chagas disease, vector control has been the most effective means for preventing infection. However, population management of triatomine vectors using chemicals has been repeatedly unsuccessful. A while ago, insecticide resistance of triatomines was considered unlikely due to their long life-cycle and low genetic variability. Nonetheless, several studies have reported the resistance of different species to various insecticides, essentially the most commonly used pyrethroids. Classic repellents shown to be useful for protection against mosquito populations such as DEET, IR3535 and picaridin were also proven ineffective when dealing with triatomines. Since it is well established that interpretation of chemical signals from the environment is essential for insect survival, the molecular mechanism underlying their olfactory system has become an area of interest for research aiming to develop new strategies for vector control capable of interfering in olfaction-mediated behavioral responses. After reaching the antennae, semiochemicals penetrate the cuticle through pores in the sensilla and arrive at the aqueous environment of the sensillar lymph, rich in soluble proteins. Several proteins take part in insect olfaction, including odorant-binding proteins (OBPs), responsible for binding and transporting hydrophobic odorants across the sensillar lymph until they reach sensory dendrites and activate membrane-bound odorant receptors (ORs), initiating the transduction of the olfactory signal that will evoke a behavioral response. OBPs are small soluble proteins secreted by accessory cells into the sensillar lymph. Given that no odorant comes to ORs except through OBPs, they can be used as molecular targets for the screening of new insect behaviorally active compounds (attractants or repellents) through a reverse chemical ecology approach. In order to use OBPs as molecular targets in that kind of study, it is essential to focus on functional OBPs, namely, the ones actually involved in chemical communication. Therefore, the purpose of this study was to use OBP17 from *R. prolixus* (RproOBP17) as a molecular target aiming at the development of novel strategies for population management of this vector. Results revealed that RproOBP17 is antennae-specific and non-dependent of the insects' nutritional state. Combining experimental analysis and in *silico* studies, we were able to hypothesize a role for RproOBP17 in detecting Brindley's glands volatiles, like 2-phenylethyl 2-methylpropanoate, 2-phenylethanol, 2-methylpropyl 2-methylpropanoate. We have also been able to successfully express and purify RproOBP17. Finally, virtual screening for potential behaviorally active compounds using RproOBP17 suggested high binding affinity for ligands such as cedrol, α-humulene, β-caryophyllene and β-damascenone.

***Key-words*:** odorant-binding protein (OBP), *Rhodnius prolixus*, olfaction, vector control chemical communication.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Distribuição mundial da doença de Chagas em 2018. Número de pessoas contaminadas em países endêmicos e não endêmicos, com base em estimativas oficiais. **Fonte:** WHO, 2018. 1

Figura 2 Ciclo de transmissão do *Trypanossoma cruzi*. Esquema simplificado das diversas transformações do *T. cruzi* em seus ciclos no vetor invertebrado e no hospedeiro vertebrado. **Fonte:** ARGOLO et al., 2008. 3

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

Figura 4 Morfologia das antenas de R. prolixus. (a) Vista ventral da cabeça de *R. prolixus*. As sensilas podem ser vistas distribuídas por toda a antena. **Fonte:** Adaptado de OTALORA-LUNA, 2005. **(b)** Segmentos da antena de um triatomíneo. **Fonte:** Ilustração de OTALORA-LUNA, 2007. 14

Figura 5 Representação esquemática do mecanismo de olfação em insetos. Moléculas de odor entram pelos poros das sensilas, se ligam e são solubilizadas pelas OBPs, transportadas através da linfa sensilar e, finalmente, atingem os dendritos sensoriais, onde ativam ORs ligados à membrana. A transdução do sinal evoca uma resposta comportamental ao estímulo detectado e odores dispersos são rapidamente degradados. **Fonte:** BRITO et al., 2016. 16

Figura 6 Alinhamento representativo de OBPs de diferentes espécies. NvitOBP78 (CCD17847.1); AlinOBP13 (ACZ58084.1); BmorPBP1 (2FJY_A); BmorGOBP2 (2WC5_A); AlinOBP10 (ACZ58081.1); TcasOBP25 (EFA04747.2); LmigOBP1 (4PT1_A); AaegOBP1 (3K1E_A); CquiOBP1 (3OGN_A); AgamOBP1 (2ERB_A); RproOBP17 (VectorBase ID: RPRC000118); AlinOBP4 (ACZ58030.1); LlinLAP (AAC43033.1); AlinOBP6 (ACZ58032.1); AlucOBP5 (AEP95759.1); AlinOBP1 (ACZ58027.1); ApisOBP1 (CAR85628.1); ApisOBP8 (CAR85635.1); DmelLUSH (NP_524162.1); AmelOBP5 (3R72_A). Cisteínas conservadas estção marcadas com asterisco. Nvit – *Nasonia vitripennis;* Alin – *Adelphocoris lineolatus;* Bmor – *Bombyx mori;* Aluc – *Apolygus lucorum; Apis – Acyrthosiphon pisum; Dmel –* Drosophila melanogaster*;* Tcas –

Tribolium castaneum; Lmig – *Locusta migratoria;* Aaeg – *Aedes aegypti;* Cqui – *Culex quinquefasciatus; Agam – Anopheles gambiae;* Rpro – *Rhodnius prolixus;* Llin – *Lygus lineolaris;* Amel – *Apis mellifera*. 18

Figura 7 Estrutura tridimensional de diferentes classes de OBPs de insetos. (a) BmorPBP1, de *Bombyx mori*. OBP clássica, apresentando seis regiões de hélice interligadas por 3 pontes dissulfeto. PDB ID Code: 1DQE**. (b)** AgamOBP47, de *Anopheles gambiae*. OBP do tipo *Plus-C*, possui oito hélices conectadas por 6 pontes dissulfeto. PDB ID: 3PM2**. (c)** AmelOBP14, de *Apis mellifera*. OBP do tipo *Minus-C*, apresenta seis hélices em sua estrutura tridimensional, estabilizadas por apenas 2 pontes dissulfeto. PDB ID Code: 3S0A. 23

Figura 8 Perfil de expressão dos genes RproOBP1, RproOBP7, RproOBP11, RproOBP12, RproOBP14, RproOBP18, RproOBP20, RproOBP22, RproOBP23, RproOBP24 e RproOBP29 em diferentes tecidos de *R. prolixus*. O RNA total foi extraído de diferentes tecidos de insetos adultos machos (M) e fêmeas (F) alimentados, tratado com DNaseI e utilizado na reação de transcrição reversa para síntese do cDNA. A estimativa da abundância de transcritos das OBPs foi feita através de ensaios de PCR utilizando iniciadores específicos para cada gene. O gene ribossomal R18S (RproR18S) foi utilizado como controle da integridade do cDNA, com iniciadores específicos amplificando uma região de 104 bp. Os produtos de PCR foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % e, em seguida, corado com GelRed. N – controle negativo, A – antenas, P – probóscides, H – cabeças, L – patas. 38

Figura 9 Perfil de expressão dos genes *RproOBP6, RproOBP13, RproOBP17, RproOBP21, RproOBP26* e *RproOBP27*. O RNA total foi extraído de diferentes tecidos de insetos machos (M) e fêmeas (F) adultos alimentados, tratado com DNaseI e utilizado na reação de transcrição reversa para síntese do cDNA. A estimativa da abundância de transcritos das OBPs foi feita através de ensaios de PCR utilizando iniciadores específicos para cada gene. O gene ribossomal R18S (RproR18S) foi utilizado como controle da integridade do cDNA, com iniciadores específicos amplificando uma região de 104 bp. Os produtos de PCR foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%

e, em seguida corado com GelRed. N – controle negativo, A – antenas, P – probóscides, C – cabeças, L – patas. 40

Figura 10 Perfil de expressão relativa do gene codificante OBP17 em *Rhodnius prolixus*. Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de insetos adultos alimentados. Os valores de Ct obtidos foram normalizados em relação ao gene de referência *Rpro18S* e quantificados pelo método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os níveis de expressão do gene OBP17 são representados em relação ao valor obtido para a antena de macho (1,0). Os resultados estão apresentados na forma de média +/- desvio padrão para 3 determinações independentes. AM – antena de macho, AF – antena de fêmea, PM – probóscides de macho, PF – probóscides de fêmea, LM – patas de macho, LF – patas de fêmea. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando ANOVA, seguido de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05). 41

Figura 11 Análise da sequência da OBP 17 de *Rhodnius prolixus*. O peptídeo sinal predito pelo *SignalP 5.0 Server* possui 21 aminoácidos, sinalizados pela linha azul. A estrutura secundária encontrada pelo *PSIPRED 4.0* apresenta 6 α-hélices, representadas em rosa. A busca realizada com o servidor DiANNA 1.1 prevê a presença de 3 pontes dissulfeto (PD1, PD2 e PD3), representadas em violeta. 43

Figura 12 Perfil de expressão da OBP17 em *Rhodnius prolixus* em diferentes estados nutricionais. Os ensaios de qPCR foram realizandos utilizando cDNA de insetos adultos alimentados e em jejum por pelo menos 21 dias. Os valores de Ct obtidos foram normalizados em relação ao gene de referência *Rpro18S* e quantificados pelo método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os níveis de expressão do gene OBP17 são representados em relação ao valor obtido para a antena de macho em jejum (1,0). Os resultados estão apresentados na forma de média +/- desvio padrão para 3 determinações independentes. AM – antena de macho, AF – antena de fêmea, PM – probóscides de macho, PF – probóscides de fêmea, LM – patas de macho, LF – patas de fêmea. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando ANOVA, seguido de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05). No destaque, gel de agorose 1% corado com GelRed. 44

Figura 13 Análise filogenética de OBPs de insetos. A árvore foi construída utilizando o método maximum likelihood e a árvore consenso foi gerada a partir de 1000 repetições *bootstrap*. As análises foram realizadas utilizando o software *MEGA X*. A RproOBP17 está destacada pelo sublinhado em vermelho. Observa-se a formação de três clusters diferentes: OBPs associadas ao reconhecimento de feromônios, OBPs relacionadas à detecção de compostos voláteis, e um grupo de OBPs de *Rhodnius*. 47

Figura 14 Expressão relativa de transcritos do gene RproOBP17 em antenas de *R. prolixus* machos adultos, tratados com dsRNA. Os insetos foram injetados com o controle ds*β-gal* (gene não relacionado) ou com ds*OBP17*. O gene *RproR18S* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão relativa de transcritos foram comparados com dsβ-gal. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando ANOVA, seguido de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$). 51

Figura 15 - Motivos convervados em OBPs de insetos. (a) Os 10 motivos conservados com maior significância estatística foram determinados pelo software *MEME Suite*.Os blocos coloridos representam o número de cada motivo encontrado. O logo apresenta aminoácidos empilhados em cada posição da proteína. Pilhas altas indicam maior conservação da sequência na posição correspondente, e a altura de cada símbolo na pilha indica a frequência relativa de cada aminoácido naquela posição. O *E-value* indica o quanto cada motivo é estatisticamente significativo, números menores indicam maior significância. **(b)** Localização relativa de cada motivo nas sequências analisadas. Os blocos coloridos correspondem aos motivos em **(a)**. 52

Figura 16 Modelo tridimensional da RproOBP17. A estrutura foi predita utilizando o servidor *online Phyre2*. Hélices são representadas em azul, loops em rosa e pontes dissulfeto estão destacadas em violeta. A cavidade de ligação é observada na superfície construída para a proteína. As ilustrações foram elaboradas através do programa *PYMOL*. 55

Figura 17 Localização espacial dos motivos conservados entre as OBPs 17 de *R. prolixus* e 4 de *C. pallens*. (a) O modelo tridimensional da RproOBP17, em laranja, e **(b)** a estrutura cristalina da CpalOBP4, em azul, foram preparados utilizando o programa *PYMOL*. Os motivos conservados estão destacados de acordo com a cor designada para cada um, mostradas na **Figura 14**. , motivo 1

– vermelho, motivo 2 – ciano, motivo 3 – verde, motivo 4 - magenta . **(c)** Sobreposição da RproOBP17 e CpalOBP4. Os motivos repetidos apresentam posições semelhantes no espaço tridimensional.....56

Figura 18 Resíduos envolvidos na interação entre a RproOBP17 e ligantes fisiológicos. O composto 2-metilpropanoato de 2-feniletila está representado em ciano, 2-feniletanol em magenta e 2-metilpropanoato de 2-metilpropila em amarelo. Ligações de hidrogênio estão indicadas em verde e interações hidrofóbicas em violeta. Os ensaios de *docking* foram realizados utilizando os programas *Chimera* e *Autodock Vin*a. As interações foram preditas com o *software BIOVIA Discovery Studio Visualizer*. As ilustrações foram elaboradas com o *PYMOL*.....59

Figura 19 Vetor de expressão pET22b(+). O plasmídeo possui o peptídeo sinal pelB de endereçamento da expressão para o periplasma. 60

Figura 20 Gel de SDS-PAGE de diferentes condições de expressão. A expressão heteróloga da RproOBP17 foi testada em combinações diferentes de temperatura, densidade ótica e concentração de IPTG. Poço MW: padrão de peso molecular. Poços 1-9: referem-se às condições descritas na **Tabela 3**. As amostras aplicadas no gel consistiam em extratos celulares brutos após o tempo de indução (3h) e as bandas foram coradas com Comassie G-250. A seta indica as regiões de peso molecular esperadas para a OBP17 (12,8 kDa).....62

Figura 21 Cromatograma e mapeamento das frações obtidas após a primeira etapa de purificação em Hiprep DEAE FF 16/10. No cromatograma, observa-se as absorvâncias obtidas em 215 nm, 254 nm e 280 nm, além do aumento da porcentagem de B, formando o gradiente. A purificação foi realizada em gradiente de 0-500 mM de NaCl em Tris-HCl 20 mM durante 40 min, seguida por gradiente 500mM-1M de NaCl por 20 min, em fluxo de 2 mL/min. O step de 2M de NaCl foi realizado para fazer a lavagem final por 3 volumes de coluna. As frações foram coletadas em 4 mL/Fr e mapeadas por SDS-PAGE 12 %. Am – amostra; FT – flow through. O asterisco indica fração de interesse. 64

Figura 22 Cromatograma e mapeamento das frações obtidas após a segunda etapa de purificação em Mono Q 10/100 GL. No cromatograma, observa-se as absorvâncias obtidas em 215 nm, 254 nm e 280 nm, além do aumento da porcentagem de B, formando o gradiente. A purificação foi realizada em

gradiente de 0-500 mM de NaCl em Tris-HCl 20 mM, durante 45 min, seguida por steps de 5 min de 1,0 M e 1,5 M, a 3 mL/min, e de 2M para a lavagem final por 3 volumes de coluna.As frações foram coletadas em 5 mL/Fr e mapeadas por SDS-PAGE 12 %. Am – amostra; FT – flow through.O asterisco indica as frações de interesse.....65

Figura 23 Cromatograma e mapeamento das frações obtidas após a terceira etapa de purificação em Superdex-75. No cromatograma observa-se as absorvâncias obtidas em 215 nm, 254 nm e 280 nm. A purificação foi realizada em tampão NaCl 150 mM em Tris-HCl, durante 120 min, As frações foram coletadas em 1 mL/Fr e mapeadas SDS-PAGE 12 %. O asterisco indica fração de interesse. 66

Figura 24 Curva de calibração. A equação da reta é utilizada para estimar a MW de proteínas eluídas na coluna HiLoad 16/600 Superdex. 67

Figura 25 Resíduos envolvidos na interação entre a RproOBP17 e ligantes candidatos a atrativos/repelentes. O composto cedrol está representado em vermelho, α-humuleno em azul, β-cariofileno em verde e β-damascenona em magenta. Interações hidrofóbicas estão indicadas em violeta. Os ensaios de docking foram realizados utilizando os programas *Chimera* e *Autodock Vina*. As interações foram preditas com o software *BIOVIA Discovery Studio Visualizer*. As ilustrações foram elaboradas no *PYMOL*. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores. Os pares de *primers* foram utilizados nos ensaios de PCR, qPCR e RNAi..... 29

Tabela 2 Energia de ligação da RproOBP17 com componentes de feromônios em triatomíneos. A energia livre de ligação foi calculada em estudos de *docking* molecular utilizando *Chimera* e *Autodock Vina*. 58

Tabela 3 Condições de expressão testadas. Um total de nove condições de temperatura, DO_{600} e [IPTG] foram testadas. Os experimentos foram realizados em triplicata..... 61

Tabela 4 Proteínas da curva de calibração. Massa molecular de proteínas padrão e seus respectivos volumes de eluição em HiLoad 16/600 Superdex..... 67

Tabela 5 Energia de ligação da RproOBP17 com compostos candidatos a atrativos/repelentes. A energia livre de ligação dos compostos à RproOBP27 foi calculada em estudos de docking molecular utilizando *Chimera* e *Autodock Vina*..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - acetonitrila

AF - antena de fêmea

AM - antena de macho

AMPc - monofosfato cíclico de adenosina

ANS – 1-anilino-8-naftaleno-sulfonato

BLASTp - *Protein Basic Local Alignment Search Tool*

bp (base pairs) - pares de base

cDNA - ácido desoxirribonucléico complementar

CSP (*chemosensory protein*) - proteína quimiossensorial

dsRNA - RNA de dupla fita

DTT - ditiotreitol

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

GB – glândula de Brindley

GM - glândula metaesternal

GPCR *(G protein-coupled receptor)* – receptor acoplado à proteína G

IR (*ionotropic receptor*) - receptor ionotrópico

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

MW (*molecular weight*) - peso molecular

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

NSOs - neurônios sensoriais olfativos

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

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

OMS - Organização Mundial da Saúde

OR (*odorant receptor*) - receptor olfativo

ORCO (*odorant coreceptor*) - co-receptor olfativo

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

PCR - reação em cadeia da polimerase

pI - ponto isoelétrico

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa

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

RNAi - RNA de interferência

RNAm - ácido ribonucléico messageiro

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

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA

WHO *(World Health Organization)* – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 1

1.1. DOENÇA DE CHAGAS 1

1.2. *RHODNIUS PROLIXUS* 5

1.3. CONTROLE POPULACIONAL DE TRIATOMÍNEOS 7

1.4. SEMIOQUÍMICOS E ASPECTOS COMPORTAMENTAIS EM INSETOS 8

1.4.1. Busca por hospedeiros vertebrados 9

1.4.2. Encontro de parceiros sexuais 10

1.4.3. Comportamento de agregação 11

1.4.4. Localização de sítios de oviposição 12

1.4.5. Sinalização de perigo ou ameaça 12

1.5. OLFAÇÃO EM INSETOS 13

1.5.1. Antenas e sensilas olfativas 13

1.5.2. Organização molecular do sistema olfativo 14

1.5.3. Proteínas ligadoras de odor (OBPs) 17

1.5.3.1. Propriedades físico-químicas e aspectos estruturais 17

1.5.3.2. Transporte de semioquímicos 19

1.5.3.3. Outras funções de OBPs 20

1.5.3.4. Estrutura tridimensional 21

1.6. ECOLOGIA QUÍMICA REVERSA 22

2. JUSTIFICATIVA 24

3. OBJETIVOS 26

3.1. OBJETIVO GERAL 26

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26

4. MATERIAIS E MÉTODOS 27

4.1. MANUTENÇÃO DAS COLÔNIAS DE INSETOS 27

4.2. PROTOCOLO DE BIOÉTICA 27

4.3. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO CDNA 27

4.4. DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES 28

4.5. PCR CONVENCIONAL 28

4.6. PCR QUANTITATIVO (QPCR) 30
4.7. SÍNTESE DO RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAI) 30
4.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE QPCR 31
4.9. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA 31
4.10. ANÁLISE FILOGENÉTICA 32
4.11. IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS REPETIDOS 32
4.12. PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL E ESTUDOS DE *DOCKING* MOLECULAR 32
4.13. CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA OBP DE INTERESSE 33
4.14. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA OBP DE INTERESSE 33
4.15. PURIFICAÇÃO DAS OBPS RECOMBINANTES 34
4.16. SDS-PAGE 35
4.17. DIGESTÃO EM GEL 35
4.18. ESPECTROMETRIA DE MASSAS 35
4.19. BUSCA EM BANCO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 35
4.20. PAINEL DE LIGANTES 36

5. RESULTADOS 37

5.1. ESTIMATIVA DA ABUNDÂNCIA DE TRANSCRITOS DE *OBPS* POR PCR SEMI-QUANTITATIVO 37
5.2. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO TRANSCRITO *RPROOBP17* POR QPCR 39
5.3. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA E PROPRIEDADES FISICO-QUÍMICAS DA RPROOBP17 42
5.4. EXPRESSÃO TECIDO-ESPECÍFICA DO *RPROOBP17* EM ESTADOS NUTRICIONAIS DISTINTOS 42
43
5.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA 45
5.6. SILENCIAMENTO DA RPROOBP17 POR RNA DE INTERFERÊNCIA 48
5.7. IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS REPETIDOS 48
5.8. CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL DA RPROOBP17 53

5.9. ANÁLISE *IN SILICO* DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO POR COMPOSTOS FISIOLOGICAMENTE RELEVANTES 57
5.10. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA RPROOBP17 RECOMBINANTE 60
5.11. ANÁLISE *IN SILICO* DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO POR COMPOSTOS CANDIDATOS A NOVOS ATRATIVOS/REPELENTES 68
6. DISCUSSÃO 72
6.1. SELEÇÃO DE OBPS FUNCIONAIS 74
6.1.1. Varredura por PCR semi-quantitativo 75
6.1.2. Perfil de expressão do gene OBP17 em insetos adultos 76
6.2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA RPROOBP17 77
6.2.1. Sequência primária e aspectos físico-químicos da OBP17 77
6.2.2. Expressão do gene OBP17 em diferentes perfis nutricionais 78
6.2.3. Análise filogenética 79
6.2.4. Caracterização estrutural in silico da OBP17 82
6.2.5. Afinidade da OBP17 por compostos fisiologicamente relevantes para *R. prolixus* 83
6.3. PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS CANDIDATOS A ATRATIVOS/REPELENTES USANDO A RPROOBP17 COMO ALVO MOLECULAR 85
6.3.1. Produção da RproOBP17 recombinante 85
6.3.2. Identificação in silico de compostos candidatos a atrativos/repelentes 86
7. CONCLUSÕES 89
8. PERSPECTIVAS 90
9. REFERÊNCIAS 91
ANEXO I Material Suplementar 111
ANEXO II Artigo publicado 121
ANEXO III Manuscrito submetido 143

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, descrita pela primeira vez pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909, é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas na América Latina. Estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas, distribuídas em 21 países endêmicos, estejam acometidas pela doença (WHO, 2021). A **O**rganização **M**undial de **S**aúde (OMS) calcula que 75 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença de Chagas em todo o mundo. No Brasil, mais de 1,3 milhões de pessoas apresentam a doença, ocasionando aproximadamente 6 mil mortes por ano (MARTINS-MELO *et al.*, 2019). Nas últimas décadas, a doença vem se tornando um problema mundial de saúde pública. Seu padrão epidemiológico mudou de áreas rurais para, essencialmente, ambientes urbanos. Isso ocorreu principalmente devido à globalização, que traz consigo uma maior mobilidade de indivíduos infectados entre áreas endêmicas e não endêmicas e, dessa forma, a doença se espalhou para outros continentes (**Figura 1**). Êxodo rural, desmatamento e urbanização desordenada de ambientes de floresta também são fatores críticos para a disseminação da doença de Chagas (WHO, 2021).

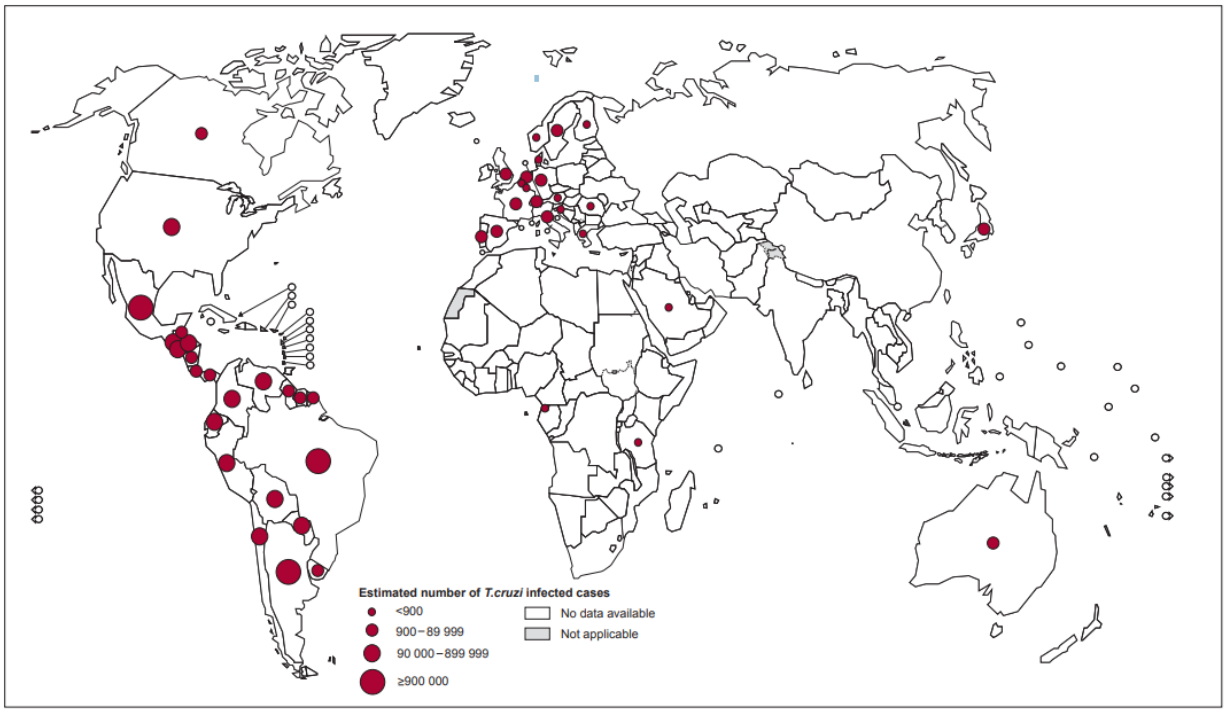


Figura 1 Distribuição mundial da doença de Chagas em 2018. Número de pessoas contaminadas em países endêmicos e não endêmicos, com base em estimativas oficiais. **Fonte:** WHO, 2018.

Também conhecida como tripanossomíase americana, a doença de Chagas consiste em uma condição clínica associada com infecção parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma* cruzi. A principal forma de transmissão é através das fezes de insetos da subfamília Triatominae conhecidos como barbeiros.

As fezes são depositadas próximas à região da picada durante a alimentação sanguínea. O ciclo do *T. cruzi* no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado é complexo, passando por diversas transformações (**Figura 2**). Durante a alimentação, os barbeiros eliminam fezes contaminadas com tripomastigotas metacíclicos infectantes que entram na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado através do local da picada, ou acidentalmente quando o hospedeiro esfrega fezes contaminadas nas mucosas, levando à infecção (**Figura 2**). Os sintomas clínicos agudos surgem de 5 a 14 dias após a infecção. A doença pode ser dividida em duas fases distintas: a aguda, que pode ser assintomática ou apresentar manifestações leves, e a crônica que, a longo prazo (10 a 15 anos), pode levar à morte por complicações cardíacas e/ou digestivas (GALVÃO, 2014).

A transmissão vetorial que envolve a picada do triatomíneo é a principal responsável pela disseminação da doença em áreas endêmicas. Entretanto, no Brasil, a polpa do açaí é atualmente o veículo mais frequente de infecção pelo *T. cruzi*, principalmente na região amazônica (DE OLIVEIRA; SOCCOL; ROGEZ, 2019). O protozoário pode sobreviver por muitas horas nesses alimentos, seja em temperatura ambiente ou refrigerado Insetos triatomíneos residem principalmente em palmeiras de piaçava, e são atraídos para os cestos de coleta de açaí por fatores como a iluminação e o CO_2 gerado pela fermentação. Senso assim, preparações artesanais do açaí podem conter o *T. cruzi* em insetos inteiros, triturados ou em suas fezes, que acabam sendo processados junto com os frutos. O comportamento desse inseto pode explicar a frequente associação de surtos agudos de doença de Chagas com alimentos contaminados em áreas empobrecidas do norte do Brasil, onde os frutos da palmeira (açaí) são um alimento básico importante e as folhas das palmeiras cobrem os telhados das habitações humanas (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2020). Outras formas de contrair a doença de Chagas incluem a transfusão de sangue, o transplante de órgãos e medula óssea, e a transmissão congênita (BERN, 2015). Nota-se que as duas principais formas de transmissão envolvem a presença do inseto triatomíneo, seja pela transmissão associada à picada ou pela contaminação de alimentos com suas fezes ou até mesmo com inseto inteiro.

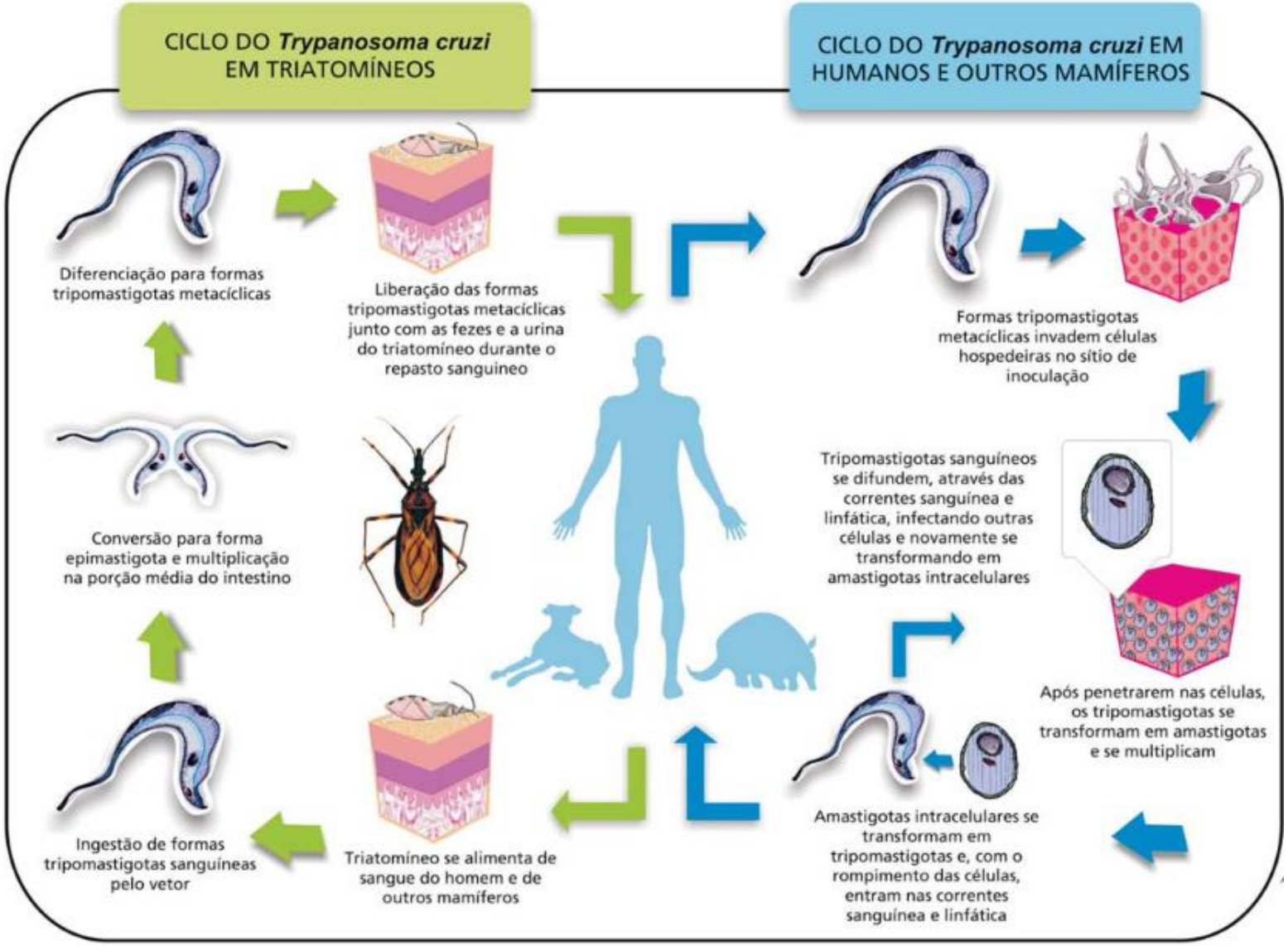


Figura 2 Ciclo de transmissão do *Trypanossoma cruzi*. Esquema simplificado das diversas transformações do *T. cruzi* em seus ciclos no vetor invertebrado e no hospedeiro vertebrado. **Fonte:** ARGOLO *et al.*, 2008.

Na natureza, o ciclo biológico do protozoário entre triatomíneos e vertebrados de sangue quente ocorre naturalmente, explicando porque insetos recolhidos nas áreas endêmicas são rotineiramente encontrados infectados pelo *T. cruzi.* Os barbeiros costumam ser encontrados em áreas rurais, vivendo alojados em frestas nas paredes e telhados ou em abrigos de animais domésticos como galinheiros e pocilgas, por exemplo. Em ambiente silvestre, são encontrados abrigados em folhas de palmeiras e buracos em troncos de árvores. No entanto, é possível que os barbeiros se aproximem de casas próximas a áreas rurais atraídos por luz, calor ou algum tipo de odor. Podem, também, ser transportados acidentalmente para dentro das casas. Assim, os barbeiros acabam por colonizar "casas de pau-a-pique", se escondendo durante o dia em frestas e buracos e/ou em telhados feitos de folhas de palma, conseguindo se adaptar facilmente a esses domicílios, pois encontram condições ideais para viver e procriar, passando a se alimentar de sangue humano e de animais domésticos (ARGOLO *et al.*, 2008).

O tratamento de pacientes chagásicos é difícil, pois os parasitas são intracelulares. Os únicos fármacos utilizados nas fases aguda e crônica são o nifurtimox e o benzonidazol, que possuem ação tripanossomicida (WHO, 2021). Ambos desencadeiam sérios efeitos colaterais (DE OLIVEIRA, 2009) e apresentam baixa eficácia, uma vez que algumas cepas desenvolveram resistência a esses fármacos. À vista disso, existe uma urgente necessidade do desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da tripanossomíase. No entanto, a complexidade da interação entre *T. cruzi* e o hospedeiro humano é uma limitação à descoberta de novos fármacos para o tratamento.

A alta frequência diária de administração do medicamento, o longo período de tratamento, aliados aos efeitos colaterais, são fatores que contribuem para o abandono da terapia. Não existe perspectiva de uma vacina a curto prazo, portanto, a principal forma de prevenção, pelo menos nas áreas endêmicas, é através do controle das populações dos triatomíneos, feito normalmente com a utilização de inseticidas químicos (HASHIMOTO; SCHOFIELD, 2012).

1.2. *RHODNIUS PROLIXUS*

Os triatomíneos, como o *R. prolixus*, são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Todos os membros desta subfamília são hematófagos, característica considerada recente em termos evolutivos (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2006).

Esse inseto é um hemimetábolo, apresentando metamorfose incompleta que passa por cinco estádios de ninfa até atingir a fase adulta (**Figura 3**).

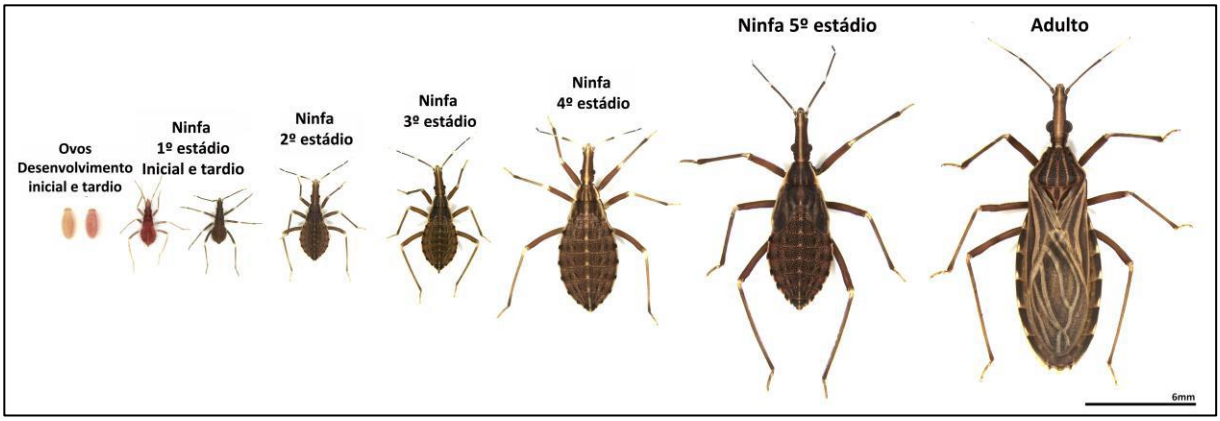


Figura 3 Fases de desenvolvimento do *Rhodnius prolixus*. Os diferentes estágios de desenvolvimento do *R. prolixus* desde o ovo, 1º ao 5º estádio de ninfa até o estágio adulto estão assinalados na figura. **Fonte:** Foto de Rodrigo Nunes da Fonseca.

Machos e fêmeas podem ser diferenciados através da presença do ovopositor nas fêmeas, estrutura pela qual os ovos são liberados. Insetos adultos se acasalam e, após se alimentar de sangue, a fêmea é capaz de colocar, em média, 40 ovos. Os ovários das fêmeas já se encontram repletos de ovócitos três dias após a alimentação, com a postura sendo iniciada por volta do quinto dia. A embriogênese dura em torno de 15 dias, período após o qual eclode a ninfa de 1º estádio. Poucos dias após o nascimento, as ninfas de 1º estádio se alimentam de sangue e passam pelo processo de ecdise, atingindo o estádio seguinte. Esse processo ocorre mais quatro vezes, quando finalmente atingem o estádio adulto.

O repasto sanguíneo é necessário para que o inseto passe de uma fase de desenvolvimento para a outra. O sangue funciona como fonte de nutrientes para que o inseto se desenvolva e para que as fêmeas produzam os ovos. O *R. prolixus* pode ingerir até cerca de 10 vezes o seu peso em sangue (OLIVEIRA *et al.*, 1995) e a qualidade e a quantidade do sangue ingerido interferem diretamente no seu desenvolvimento e na produção de ovos. Após a alimentação, estes insetos podem permanecer por um longo período em jejum, podendo chegar a várias semanas.

As espécies do gênero *Rhodnius* apresentam preferência por áreas mais úmidas. Em países como a Venezuela e a Colômbia, o *R. prolixus* apresenta caráter silvestre, habitando principalmente copas de palmeiras. No entanto, em algumas regiões, já foram encontradas espécies bem estabelecidas no intradomicílio (SCHOFIELD, 1994). Em algumas áreas da América Central, como Guatemala, Honduras e El Salvador, este inseto apresenta hábitos quase que exclusivamente domésticos, aumentando sua importância epidemiológica.

A partir das pesquisas pioneiras de Vincent Wigglesworth iniciadas em 1930, o *R. prolixus* tornou-se a espécie de triatomíneo mais estudada no mundo. Dentre as características que tornam o *R. prolixus* um excelente modelo de estudo, é possível destacar seu tamanho, pois é um inseto relativamente grande, as fêmeas, que produzem uma grande quantidade de ovos, de modo que várias gerações podem ser obtidas. Outro aspecto importante do uso deste inseto como modelo de estudo é a possibilidade de alimentar estes animais com dietas artificiais e/ou diretamente em vertebrados, permitindo a manipulação da homeostasia celular, o estudo de diversas rotas metabólicas e o efeito de drogas (GARCIA et al., 2012; ESCANDÓN-VARGAS; MUÑOZ-ZULUAGA; SALAZAR, 2017; SILVA-OLIVEIRA et al., 2021). Ao longo do século passado, o *R. prolixus* foi objeto de intensas investigações científicas que contribuíram para desvendar aspectos importantes sobre o metabolismo e a fisiologia de insetos em geral (NUNES-DA-FONSECA *et al.*, 2016). Devido à importância epidemiológica desta espécie, associada com a enorme quantidade de informação acumulada durante anos de pesquisa, o *R. prolixus* teve seu genoma publicado em 2015 (MESQUITA *et al.*, 2015), após anos de trabalho envolvendo diversos grupos de pesquisa.

1.3. CONTROLE POPULACIONAL DE TRIATOMÍNEOS

Apesar dos recursos gastos em pesquisas, ainda não existem vacinas contra a doença de Chagas ou a perspectiva de um processo de imunização em larga escala para um futuro próximo. Em relação ao tratamento, também não existem drogas curativas: os mesmos remédios estão em uso há mais de 30 anos e sua prescrição é limitada, uma vez que somente têm efeito em casos agudos, além de gerarem uma série de efeitos colaterais indesejados (DE OLIVEIRA, 2009). Dessa forma, o controle populacional do inseto vetor constitui a estratégia mais eficaz para evitar a disseminação da doença.

A ferramenta de uso prático que as autoridades de saúde no Brasil utilizam nos programas de controle do barbeiro é a aplicação de inseticidas químicos. Esse tipo de abordagem, além de ser um método razoavelmente barato e de fácil execução, fornece uma resposta rápida na redução da população doméstica do inseto. No entanto, uma série de problemas ainda impedem a eliminação completa da transmissão vetorial da doença de Chagas, incluindo a reinfestação doméstica e peridoméstica por triatomíneos silvestres (DUMONTEIL; GOURBIÈRE, 2004; FELICIANGELI *et al.*, 2007; FITZPATRICK *et al.*, 2008; PROVECHO *et al.*, 2014), a colonização e reinfestação por triatomíneos considerados vetores secundários (WISNIVESKY-COLLI et al., 1993; VAZQUEZ-PROKOPEC et al., 2005) e o reestabelecimento de populações que não foram totalmente eliminadas pelo tratamento químico (SANCHEZ-MARTIN *et al.*, 2006). No Brasil, por exemplo, foi iniciado em 1983 um programa de controle que tinha como objetivo a erradicação do principal vetor de Chagas, o *Triatoma infestans*, através da pulverização de inseticidas em locais fechados (DIAS, 1987). E

Diversos avanços ocorreram desde os estudos pioneiros que utilizavam amplamente organoclorados, como BHC (lindano) e dieldrin, e organofosforados, como o malation. Atualmente, o combate químico ao vetor é realizado por meio de piretróides sintéticos, que são menos tóxicos para animais domésticos e humanos (ARGOLO *et al.*, 2008; SCHOFIELD & KABAYO, 2008). Esses produtos químicos possuem efeito residual de 3 a 9 meses em ambientes domésticos e são bastante eficientes contra diversos artrópodes nocivos. Embora piretróides não costumem provocar resistência em triatomíneos, casos deste tipo já foram detectados em *R. prolixus* na Venezuela em 1970 e, atualmente, entre algumas populações de *T. infestans* no sul da Bolívia e noroeste da Argentina (WHO, 2002; SCHOFIELD & KABAYO, 2008), o que demanda cuidados extras por parte das autoridades sanitárias. Além disso, piretróides geram efeitos indesejados em humanos, como irritação da pele e mucosas, e são altamente tóxicos para peixes, o que dificulta até mesmo a lavagem das bombas utilizadas

em sua aplicação, uma vez que não podem ser descartadas em locais de abastecimento de água natural (COURA & DIAS, 2009).

Como alternativas aos inseticidas químicos, várias outras técnicas estão sendo estudadas, dentre as quais estão incluídos o uso de substâncias de origem vegetal e o uso de inseticidas biológicos (MACIEL *et al.*, 2010). O controle biológico através do uso de insetos que parasitam ovos de triatomíneos também já provou ser ineficiente em condições de campo. Patógenos de insetos sofrem grandes limitações no seu uso devido às condições ambientais necessárias para sua sobrevivência e propagação (BARRET, 1975). Construção ou renovação de moradias, tais como revestimento de paredes e substituição de tetos de palha por telhas podem ser, até certo ponto, eficazes. Porém, se não houver simultaneamente uma melhoria nas condições socioeconômicas da população, estas medidas não terão resultado duradouro. Isso acontece porque os moradores logo começam a adicionar novos cômodos ou abrigos de animais, construídos de maneira precária, resultando em frestas nas paredes e tetos que logo são colonizadas pelos vetores presentes nas redondezas. As áreas infestadas pelos barbeiros são geralmente regiões muito pobres e carentes, e tudo indica que estas modificações ainda vão levar bastante tempo.

Portanto, a OMS incentiva o desenvolvimento de tecnologias verdes, ecologicamente corretas, para o combate aos vetores de doenças (WHO, 2004). Dentre as formas de controle alternativas ao inseticida químico, o estudo de moléculas envolvidas na percepção do meio ambiente pelos insetos tem recebido destaque nos últimos anos e estratégias modificadoras de comportamento estão sendo utilizadas para o manejo integrado de pragas (RODRIGUEZ-SAONA; STELINSKI, 2009; ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). Dentre estas abordagens, destaca-se o uso de armadilhas que utilizam semioquímicos, mais especificamente feromônios sexuais e voláteis de plantas hospedeiras, como ferramentas para atrair esses insetos (RODRIGUEZ-SAONA; STELINSKI, 2009). Em triatomíneos, voláteis do hospedeiro vertebrado ou de misturas feromonais poderiam ser utilizados para interferir no comportamento normal do inseto e, com isso, controlar a densidade populacional em uma determinada área (LAZZARI; LORENZO, 2009).

1.4. SEMIOQUÍMICOS E ASPECTOS COMPORTAMENTAIS EM INSETOS

A detecção de sinais químicos presentes no ambiente é um mecanismo essencial para a manutenção da vida de um inseto. Já é bem estabelecido que insetos utilizam uma grande

variedade de semiquímicos, como feromônios, voláteis de plantas e odores de animais, para encontrar uns aos outros, assim como localizar fontes de alimento, sítios de oviposição, parceiros para acasalamento e hospedeiros adequados, além de identificar predadores, entre outras funções (ZWIEBEL; TAKKEN, 2004).

Semioquímicos são pequenas moléculas hidrofóbicas envolvidas na comunicação entre seres vivos, cuja detecção gera uma resposta comportamental por parte dos organismos em questão. A detecção destes compostos ocorre através da modalidade sensorial denominada olfação. Quando os semioquímicos são mediadores de comunicação intraespecífica, ou seja, emissor e receptor do sinal químico são da mesma espécie, este semioquímico é denominado feromônio. Os feromônios são divididos, de acordo com a sua função, em feromônio de alarme, sexual, de oviposição, de atração e de agregação, entre outros (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). Quando os compostos químicos são responsáveis por mediar comportamentos de indivíduos de espécies diferentes, relação denominada de interespecífica, estas substâncias são classificadas como aleloquímicos. Os aleloquímicos podem ainda ser classificados em cairomônios, quando os compostos beneficiam o indivíduo receptor; alomônios, quando os compostos beneficiam o emissor; e sinomônios, quando os dois são beneficiados (THOMAZINI, 2009; ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

1.4.1. Busca por hospedeiros vertebrados

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

Estudos mostram que diferentes espécies de mosquitos vetores de doenças são atraídas por uma série de voláteis emanados pelo hospedeiro humano. O mosquito *Aedes aegypti,* transmissor da dengue, Zika, febre amarela e chikungunya, é atraído por voláteis como CO_2, ácido láctico e extratos etanólicos de resíduos da pele (BOSCH; GEIER; BOECKH, 2000; ZWIEBEL; TAKKEN, 2004). O vetor da malária, *Anopheles gambiae,* é atraído por ácidos carboxílicos, amônia e por compostos presentes no suor humano (KNOLS et al., 1997; BRAKS; MEIJERINK; TAKKEN, 2001). O mosquito *Culex quinquefasciatus* vetor da filariose, é

atraído por uma mistura de CO_2, acetona, 1-octen-3-ol e ácido butírico(MBOERA; TAKKEN; SAMBU, 2000).

O comportamento de busca de alimento exibido por *R. prolixus* é influenciado por vários sinais envolvendo odores, calor e umidade (GUERENSTEIN; LAZZARI, 2009). Diferentes sinais de calor são usados para localizar os hospedeiros. A pista térmica é capaz de induzir os insetos a expressar o reflexo de extensão da probóscide que leva à localização de vasos sanguíneos sob a superfície da pele e, consequentemente, à picada do hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2007). Estes insetos são atraídos por compostos emanados pelo hospedeiro, como o CO_2, um sinal importante para insetos hematófagos (GUERENSTEIN & HILDEBRAND, 2008). Diversos estudos revelaram que *R. prolixus* e outros triatomíneos também são atraídos por ácido láctico, ácido pirúvico, nonanal, ácido isobutírico, 1-octen-3-ol e amônia, todos compostos exalados pelo hospedeiro (BARROZO *et al.*, 2017).

Compreender o mecanismo olfativo pelo qual triatomíneos são capazes de encontrar hospedeiros vertebrados pode gerar maiores possibilidades para o desenvolvimento de métodos sustentáveis com o objetivo de reduzir e/ou prevenir o contato entre o inseto e o humano, diminuindo, deste modo, a transmissão vetorial da doença de Chagas.

1.4.2. Encontro de parceiros sexuais

Vários estudos vêm demonstrando que o comportamento sexual de *R. prolixus* machos envolve a participação de feromônios sexuais produzidos pelas glândulas metaesternais (GMs) localizadas no metatórax ventral de fêmeas adultas (PONTES et al., 2008; PONTES; LORENZO, 2012). Experimentos de oclusão do orifício da GM com parafina resultaram em uma diminuição significativa do número de tentativas de cópula (PONTES *et al.*, 2008), enquanto eletroantenogramas realizados com antenas de machos apresentaram respostas intensas aos compostos produzidos pela GM (VITTA *et al.*, 2009). Odores de insetos fêmeas originados de secreções da GM, quando detectados pelos insetos machos, promovem mudanças no comportamento destes. Essas mudanças incluem a saída dos abrigos, o aumento na frequência de início do voo, o aumento na orientação durante a atividade locomotora, promovendo a agregação em torno de pares e levando ao acasalamento (PONTES *et al.*, 2014). Os compostos mais abundantes encontrados nas GMs de fêmeas são, 2-butanona, 2-pentanona, (S)-2-butanol, 2-metil-3-buten-2-ol, 3-metil-2-butanol, 3-pentanol, (S)-2-pentanol, (E)-2-metil-

3-penten-2-ol, 2-metil-1-butanol e 4-metil-3-penten-2-ol (PONTES *et al.*, 2008; VITTA; LORENZO, 2009).

Feromônios sexuais são amplamente utilizados em armadilhas para atração e captura de insetos pragas, como o besouro *Tribolium castaneum*, a mariposa *Spodoptera frugiperda* e a mosca *Ceratitis capitata* (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). Um estudo recente mostrou que machos de *R. prolixus* são atraídos por uma mistura sintética de feromônios de fêmeas, o que representa uma isca promissora que pode ser utilizada em armadilhas de atração no campo (BOHMAN *et al.*, 2018). O estudo de genes/proteínas envolvidos na detecção de compostos associados ao comportamento sexual é interessante uma vez que interferir na detecção da fêmea pelo macho impediria a cópula e, consequentemente, levaria a uma diminuição da densidade populacional do inseto em uma determinada área.

1.4.3. Comportamento de agregação

Em triatomíneos, um comportamento característico mediado por semioquímicos é o de agregação. Já foi relatado para diversas espécies que a busca por abrigos, por exemplo, ocorre a partir de um sinal químico de agregação emitido por suas fezes e por componentes cuticulares (BARROZO *et al.*, 2017). Este sinal é acumulado nas proximidades dos abrigos e incluem substâncias altamente voláteis que são subprodutos comuns do metabolismo microbiano, tais como ácidos graxos de cadeia curta, um diol e uma amida (MOTA *et al.*, 2014). Feromônios de agregação também estão presentes na cutícula de triatomíneos e são capazes de promover a agregação somente através do contato direto (PIRES *et al.*, 2002; VITTA *et al.*, 2002). Respostas interespecíficas também foram observadas, voláteis oriundos da microbiota intestinal, presentes nas fezes de *R. prolixus*, são capazes de induzir o comportamento de agregação em *T. infestans*, mas o contrário não ocorre. Inclusive, o *R. prolixus* não entra em abrigos de *T. infestans*, pois não responde aos sinais de agregação do *Triatoma* (LORENZO FIGUEIRAS; LAZZARI, 2002). Mais recentemente, foi sugerido que os triatomíneos do gênero *Rhodnius* na verdade não utilizam voláteis presentes nas fezes para reconhecer o abrigo, ao contrário do que ocorre com os *Triatoma* (MOSQUERA; LORENZO, 2020).

1.4.4. Localização de sítios de oviposição

A seleção de locais adequados para as fêmeas colocarem seus ovos é um fator chave para a sobrevivência de seus imaturos (ovos, larvas ou ninfas). A determinação desses locais envolve a interpretação de uma série de diferentes sinais químicos (NAVARRO-SILVA; MARQUES; DUQUE L, 2009). Mosquitos do gênero *Culex* depositam seus ovos em água suja, rica em matéria orgânica, na qual suas formas larvais podem explorar os nutrientes para a alimentação. Fêmeas de *Culex* pôem seus ovos em grupos de mais de 100, formando estruturas chamadas "jangadas" sobre a água (SULLIVAN; LIU; SYED, 2014). Em *C. quinquefasciatus*, *C. pipiens* e *C. tarsalis*, as fêmeas grávidas são atraídas pelo feromônio de oviposição de mosquito (MOP). O MOP é produzido nas jangadas de ovos e provoca o comportamento de oviposição (SULLIVAN; LIU; SYED, 2014).

Fêmeas grávidas de *R. prolixus* possuem o comportamento de aderir seus ovos a um substrato, como penas de aves, quando ovipõem. Isso sugere que a seleção do local adequado para a oviposição está relacionada com a disponibilidade de fonte de alimento, já que as ninfas que eclodem dos ovos precisam se alimentar de sangue. Estudos indicam que odores naturais do hospedeiro, como os que são liberados pelas penas de galinhas, estimulariam o comportamento de oviposição nesta espécie (GUIDOBALDI; MAY-CONCHA; GUERENSTEIN, 2014). Sendo assim, o odor do hospedeiro também orienta o *R. prolixus* na seleção de locais para oviposição.

1.4.5. Sinalização de perigo ou ameaça

Insetos adultos perturbados mecanicamente liberam um odor pungente que funciona como um feromônio de alarme (MANRIQUE *et al.*, 2006). Em triatomíneos, este odor é produzido por um par de glândulas situadas no metatórax dorsolateral, denominadas glândulas de Brindley (GBs) (ROJAS et al., 2002; MAY-CONCHA et al., 2015). As GBs são encontradas apenas em insetos adultos. O feromônio de alarme de triatomíneos é uma mistura complexa de voláteis que parece variar de acordo com as espécies (GUERENSTEIN; GUERIN, 2004). O ácido isobutírico é o principal componente do feromônio de alarme nas espécies que possuem GBs funcionais, mas outros compostos como 2-metilpropan-1-ol, 2-metilpropanoato de 2-metilpropila, e propanoato de 2-metilpropila e 2-feniletanol também foram encontrados (ROJAS et al., 2002; MANRIQUE et al., 2006).

1.5. OLFAÇÃO EM INSETOS

1.5.1. Antenas e sensilas olfativas

As antenas são órgãos dedicados, fundamentalmente, à detecção de estímulos olfativos, mecânicos, térmicos ou hídricos. A superfície da antena é repleta de sensilas, delicadas estruturas cuticulares em forma de "cerdas que possuem poros (**Figura 4a**). Além das antenas, os insetos também podem detectar odores mediante sensilas presentes nos palpos maxilares ou labiais (SCHNEIDER, 1964; HANSSON; STENSMYR, 2011).

As antenas estão localizadas na cabeça dos insetos, inseridas em uma estrutura denominada tubérculo antenífero, e são divididas em três segmentos: escapo, pedicelo, e dois flagelômeros, flagelo proximal e flagelo distal (**Figura 4b**). Já as sensilas, de acordo com sua modalidade sensorial, são classificadas em olfativas, gustativas, mecanosensoriais, e também podem abrigar termo/higro receptores, capazes de detectar calor e umidade (GUIDOBALDI; MAY-CONCHA; GUERENSTEIN, 2014). Esses órgãos sensoriais são distribuídos em outros tecidos além das antenas, estando localizados também em peças bucais (palpos labiais e maxilares, e probóscide, um apêndice tubular sugador de alimentos), órgãos genitais, patas e asas (DE BRUYNE; BAKER, 2008; NICHOLS; VOGT, 2008). As sensilas possuem múltiplos poros e o interior da antena é preenchido pela linfa sensilar. Três tipos de sensilas olfativas foram descritas no flagelo de diferentes espécies de triatomíneos: basicônicas (paredes finas), tricóides (paredes grossas) e caéticas (parede dupla) (WIGGLESWORTH; GILLETT, 1934; GUIDOBALDI; MAY-CONCHA; GUERENSTEIN, 2014).

Protegidos no interior das sensilas olfativas, são encontrados os neurônios sensoriais olfativos (NSOs), responsáveis pela transdução do sinal olfativo (LORENZO; MELO, 2012). Células epidérmicas especializadas (células acessórias) embainham os neurônios nas sensilas (LORENZO; MELO, 2012) e fornecem proteínas e concentrações iônicas adequadas à linfa sensilar. Enquanto os dendritos dos NSOs se estendem para o espaço repleto de linfa da sensila, o axônio projeta-se para o primeiro centro de processamento da informação olfativa no cérebro, o lobo antenal (ANTON; HOMBERG, 1999).

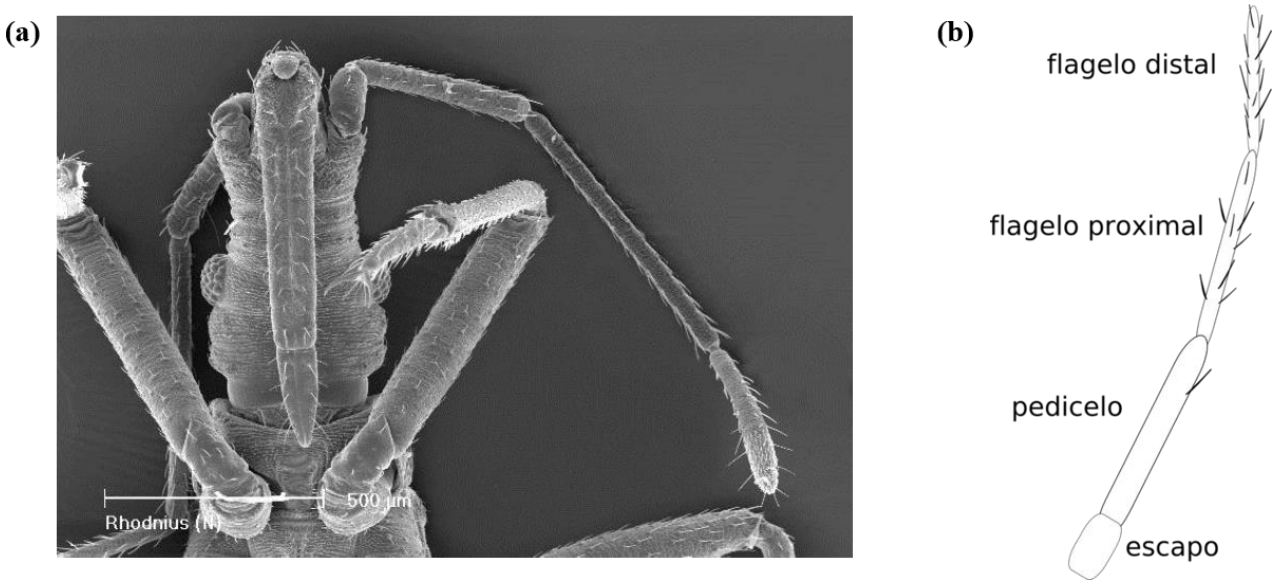


Figura 4 Morfologia das antenas de *R. prolixus*. (a) Vista ventral da cabeça de *R. prolixus*. As sensilas podem ser vistas distribuídas por toda a antena. **Fonte:** Adaptado de OTALORA-LUNA, 2005. **(b)** Segmentos da antena de um triatomíneo. **Fonte:** Ilustração de OTALORA-LUNA, 2007.

1.5.2. Organização molecular do sistema olfativo

Ao encontrarem a antena, semioquímicos presentes no meio ambiente podem penetrar no interior da sensila olfativa através dos poros presentes na superfície e chegar à linfa sensilar aquosa, rica em proteínas solúveis. Proteínas ligadoras de odor (OBPs), receptores olfativos (ORs), receptores ionotrópicos (IRs), proteínas da membrana de neurônios sensoriais (SNMPs) e enzimas degradadoras de odor (ODEs) constituem as principais proteínas do sistema olfativo periférico envolvidas no processo de recepção de moléculas de odor (LEAL, 2013; BRITO; MOREIRA; MELO, 2016).

As proteínas ligadoras de odor (OBPs) representam o elo entre o ambiente externo e os receptores olfativos (ORs) no interior das antenas (LEAL, 2005). Semioquímicos são ligados por OBPs e transportados através da camada aquosa de linfa sensilar, ficando então protegidos da ação de enzimas degradadoras de odor (ODEs). Quando o complexo OBP-odor se aproxima do receptor olfativo, a redução no pH local induz uma mudança conformacional na OBP que promove a liberação do odor para o seu OR específico. Em seguida, ocorre a transdução do sinal olfativo (**Figura 5**).

Em relação ao modo de ação das OBPs, duas hipóteses não necessariamente excludentes, se destacam: embora existam evidências, em mariposas e, principalmente, em mosquitos, de que OBPs funcionem como carreadoras passivas (WOJTASEK; LEAL, 1999;

SANDLER et al., 2000; HORST et al., 2001; DAMBERGER et al., 2007) e o ligante seja responsável por ativar o OR de forma independente, em alguns casos essas proteínas parecem desempenhar um papel mais direto, no qual a formação de um complexo específico OBP-odor é necessária para a ativação do receptor (XU et al., 2005; LAUGHLIN et al., 2008).

Ao contrário das OBPs, que são solúveis, os genes da *SNMP* codificam uma proteína transmembranar que representa uma subclasse da família do gene *CD36* de insetos (NICHOLS; VOGT, 2008). Uma série de estudos sustenta o papel das proteínas SNMPs na comunicação química baseada em feromônios. A SNMP1, de *Drosophila melanogaster* , por exemplo, é essencial para a detecção do feromônio sexual Z11-18OAc em sensilas do tipo T1 (KO; PARK, 2008; BENTON et al., 2009) nesta espécie; também em mariposas, foi observado que as proteínas SNMP1s estão associadas com neurônios detectores de feromônios sexuais nas antenas (ROGERS et al., 2001; FORSTNER et al., 2008).

Os receptores olfativos são proteínas com sete domínios transmembranares que, no entanto, não são homólogos aos receptores do tipo GPCRs de vertebrados. Os ORs de insetos adotam uma topologia de membrana inversa às GPCRs clássicas, com a porção amino-terminal voltada para região intracelular (BUCK; AXEL, 1991; LEAL, 2013; BRITO; MOREIRA; MELO, 2016). Esses ORs fazem parte de um complexo heteromérico constituído de duas subunidades: um OR convencional e um co-receptor olfativo, denominado ORCO, que possui a sequência primária conservada entre diferentes espécies de insetos (VOSSHALL; HANSSON, 2011). As moléculas se ligam especificamente somente ao OR, assim, o ORCO não está diretamente envolvido no reconhecimento do odor (LARSSON et al., 2004; GUIDOBALDI; MAY-CONCHA; GUERENSTEIN, 2014). O complexo heteromérico OR-ORCO forma um canal iônico induzido pela ligação do odor ao OR (SATO *et al.*, 2008; WICHER *et al.*, 2009).

Os receptores ionotrópicos (IRs) estão relacionados com receptores ionotrópicos de glutamato, embora as duas famílias sejam divergentes, uma vez que os IRs não possuem resíduos importantes para ligação ao glutamato. Os IRs são expressos em neurônios sensoriais olfativos que não expressam ORs ou ORCO, juntamente com um co-receptor e, ao contrário dos ORs, existem diferentes co-receptores para IRs (RYTZ; CROSET; BENTON, 2013). Embora as propriedades funcionais de IRs ainda não tenham sido estudadas em sistemas de expressão heteróloga, a sua localização e características estruturais sugerem que sejam receptores quimiossensoriais que podem funcionar como canais iônicos ativados por ligantes (BENTON *et al.*, 2009).

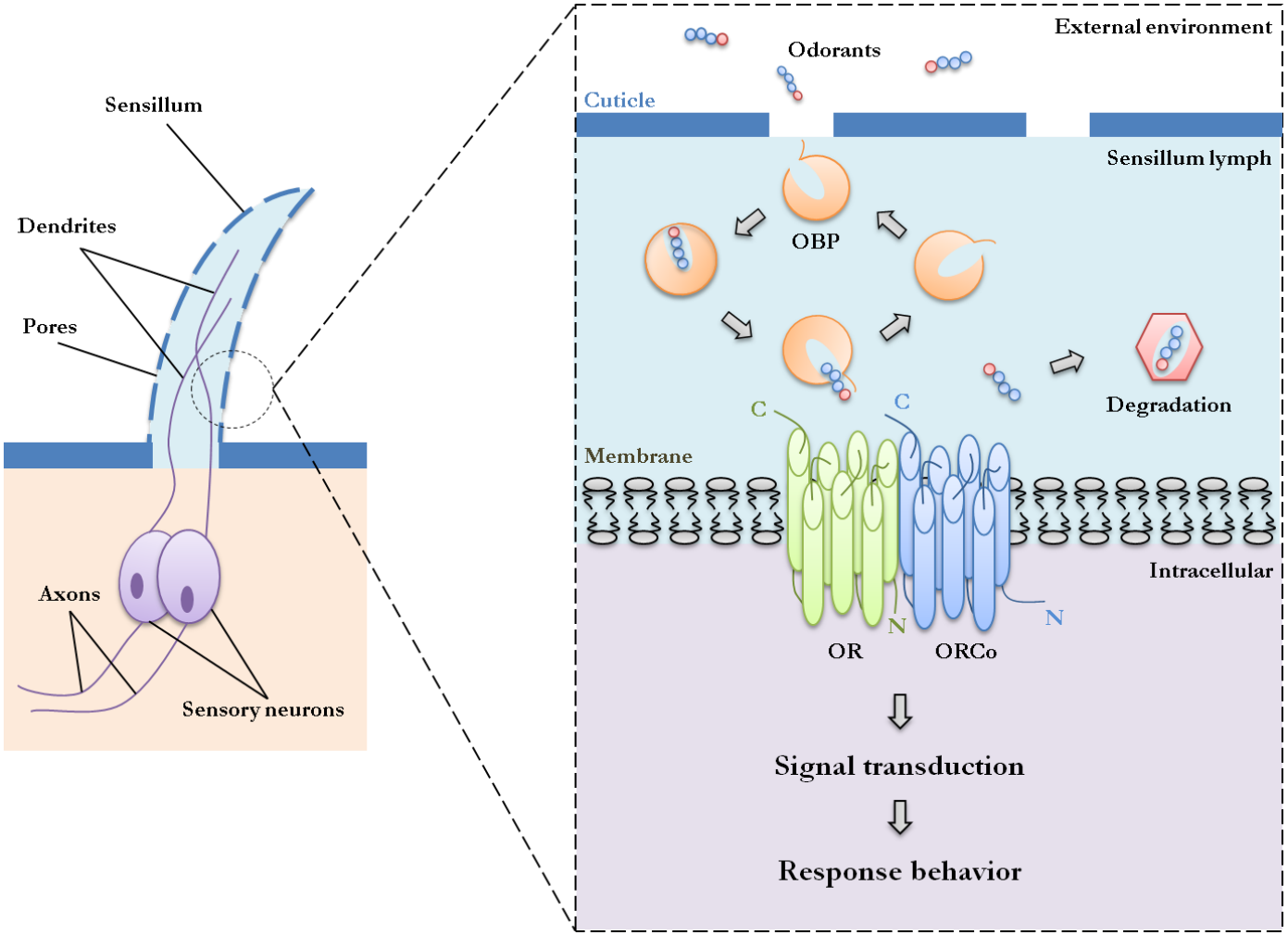


Figura 5 Representação esquemática do mecanismo de olfação em insetos. Moléculas de odor entram pelos poros das sensilas, se ligam e são solubilizadas pelas OBPs, transportadas através da linfa sensilar e, finalmente, atingem os dendritos sensoriais, onde ativam ORs ligados à membrana. A transdução do sinal evoca uma resposta comportamental ao estímulo detectado e odores dispersos são rapidamente degradados. **Fonte:** BRITO *et al.*, 2016.

Para insetos em que a navegação é guiada por semioquímicos, a cinética do sistema olfativo requer que moléculas de odor “errantes” sejam inativadas rapidamente, na escala de milisegundos (ISHIDA; LEAL, 2005). Existem, atualmente, duas hipóteses que tentam explicar como o sinal olfativo é finalizado. A primeira delas sugere que as enzimas degradadoras de odor (ODEs) participem da degradação dessas moléculas de forma tão rápida que resultam na finalização da incitação (ISHIDA; LEAL, 2005, 2008). A segunda hipótese defende a existência de mecanismos ainda desconhecidos (KAISSLING, 2009) responsáveis pelo fim do estímulo.

1.5.3. Proteínas ligadoras de odor (OBPs)

1.5.3.1. Propriedades físico-químicas e aspectos estruturais

As OBPs de insetos são proteínas pequenas, apresentando um número médio de 130-150 resíduos de aminoácidos (VIEIRA; ROZAS, 2011; LEAL, 2013)e cerca de 13-17 kDa. Estas proteínas são expressas com um peptídeo sinal que é removido durante o processamento e não é mais encontrado na proteína madura. De modo geral, as OBPs apresentam características ácidas, embora já tenha sido discutido que, em dípteros, essas proteínas possuam uma faixa maior de ponto isoelétrico, podendo estar carregadas positiva ou negativamente no pH fisiológico da antena (~ 6,5) (WOJTASEK; LEAL, 1999; ZHOU et al., 2008).

De acordo com o número de aminoácidos presentes em suas estruturas primárias, as OBPs são classificadas como de cadeia longa (~160 resíduos), cadeia média (~120 resíduos) e cadeia curta (~100 resíduos). As sequências primárias desse tipo de protéina são bastante divergentes e a identidade entre aminoácidos de OBPs da mesma espécie pode ser menor que 10%. As OBPs apresentam forma globular e geralmente são compostas por seis domínios α-hélice organizados em uma estrutura compacta e estável (SANDLER *et al.*, 2000). Já foi demonstrado que seis cisteínas conservadas encontram-se pareadas em três pontes de sulfeto interligadas, arranjo que confere grande estabilidade à estrutura tridimensional da proteína. (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016). Este padrão de cisteínas e pontes dissulfeto tornou-se a assinatura de OBPs clássicas de diferentes ordens de insetos e é utilizado para o assinalamento de uma proteína na família das OBPs (BRIAND et al., 2001; PELOSI et al., 2006; BRITO; MOREIRA; MELO, 2016) (**Figura 6**). .

```
NvitOBP78     ------------SPRPGGRGGGSMFSRESVKKCMAEMDIK------R-EDIKT---------LKQNNDPKLSCLNACAMTKEEIMDE-AGNIDADKLIKATLEIVQKK---KPDINV-EE
AlinOBP13     -------------LVSGHRALDGILPQANQDECREESNFR---GELN-DDV------------GRNVTQELKCFAACSLMKLGIMNEKDGTVNMTRLD----ELIASH---TPGKDAADV
BmorPBP1      ----------SQEVMKNLS----LNFGKALDECKKEVGKMTLTDAIN-EDFYN-----FWKEGYEIKNRETGCAIMCLSTKLNMLDP-EGNLHHGNAM----EFAKKH---GADETMAQQ
BmorGOBP2     ----------TAEVMSHVT----AHFGKTLEECREESGL---SVDIL-DEFKH-----FWSDDFDVVHRELGCAIICMSNKFSLMDD-DVRMHHVNMD----EYIKSF---PNGQVLAEK
AlinOBP10     ------QELPPPGDVKNKTVVFKNSFLRSAKYCSSIYETS------T-LAIMA------LLMSEKSDDQNGKCFLNCMLQRYRLMSQ-DGSYNKDKFKPFLE---------YIPDSKFLQS
TcasOBP25     -------KVDIPPDLQAEIDGY-------YDICYKQIGLT------K-DDLKA------YKIGD--RDPKIMCFMKCVFVEAKWMDE-NENLQYDYIKNTI-----------HHSI-RHI
LmigOBP1      ----MDVNMKLTGRIMDAAKEV-------DHTCRSSTGVP------R-DMLHR------YAEGQTVDDDDFKCYLKCIMVEFNSLSD-DGVFVLEEELENV-----------PPEI-KEE
AaegOBP1      DVTPRRDAEYPPPEFLEAMKPL-------REICIKKTGVT------E-EAIIE------FSDGKVHEDENLKCYMNCLFHEAKVVDD-TGHVHLEKLHDAL-----------PDSM-HDI
CquiOBP1      -VTPRRDAEYPPPELLEALKPL-------HDICAKKTGVT------D-EAIIE------FSDGKIHEDEKLKCYMNCLFHEAKVVDD-NGDVHLEKLHDSL-----------PNSM-HDI
AgamOBP1      DTTPRRDAEYPPPELLEALKPL-------HDICLGKTGVT------E-EAIKK------FSDEEIHEDEKLKCYMNCLFHEAKVVDD-NGDVHLEKLHDSL-----------PSSM-HDI
RproOBP17     -------AVELSDDMKEMAKML-------HDQCIDESGVN------G-ALIEP------CAKGDFSEDGNLKCYFKCIFANMGALSD-DGELDAEAFESIL-----------PPDL-HDP
AlinOBP4      --------GELPEEMKEMAQGL-------HDSCVEETGVD------N-GLIAP------CAKGNFADDAKLRCYFKCVFGNLGVISD-EGELDAEAFGSIL-----------PDSM-QEL
LlinLAP       --------GELPEEMREMAQGL-------HDGCVEETGVD------N-GLIGP------CAKGNFADDQKLKCYFKCVFGNLGVISD-EGELDAEAFGSIL-----------PDNM-QEL
AlinOBP6      ---------------KELTDEQKEQIFAEIKNCMESTKLT------D-EEFESI-----MAKKELPTSIEGKCFTKCLMEKMEYL-E-EGGKINVIAVQAGM-----EENMEKESE-ITK
AlucOBP5      -----------------ITKEYHDRAVAAKDACLKKHPSI------KESDVQ-----EFLKKHKLPETDDGKCMIACYMEEMNLM-A-DGKINVEEAKKTNSDKYDGEPD-----N-KEL
AlinOBP1      ------------------DEQTNAMVAKAFNKCREEFPIS------D-DEIGGV-----REKTTIPESHNAKCLMACMLREGKML-R-DGKYEKENALIMADVLN-K----DDPAS-ADK
ApisOBP1      -----------------ESDQVPINSSAAVESCLLETNMT------R-DEFEDMLTSPNARELTILKSHAHKCMFGCVMRKNHIV-N-DGVVSKEVLSKYVLNFY-GRPDYKRRLI-IKD
ApisOBP8      --------------ENNQQNGPSDRSATIFQSCIAETKLS------G-DALKG------FRSMSIPKTQAEKCMMGCLMRKVNVI-N-KGKFSVEEATKVAQKYY-GTNE----AM-MKK
DmelLUSH      ----------------MTMEQFLTSLDMIRSGCAPKFKLK------T-EDLDRLR----VGDFNFPPSQDLMCYTKCVSLMAGTVNK-KGEFNAPKALAQLPHL-------VPPEM-MEM
AmelOBP5      --------------MSMSADQVEKLAKNMRKSCLQKIAIT------E-ELVDGMR----RGE--FPDDHDLQCYTTCIMKLLRTF-K-NGNFDFDMIVKQLEIT-------MPPEE-VVI
                                                 *                                          *   *

NvitOBP78     L-ETAMLSCIEKAK--EVEDKCMKAKTLVVCSHEYWKA-NVKGNPSSAGGEEE---------
AlinOBP13     FKTTVVEPCMKEVK--KSTDYCEYSYQLIACGMSKVP-------------------------
BmorPBP1      L-IDIVHGCEKSTP--ANDDLCIWTLGVATCFKAEIHKLNWAPSMDVAVGEIL--AEV----
BmorGOBP2     M-VKLIHNCEKQFD--TETDDCTRVVKVAACFKEDSRKEGIAPEVAMVEAVIE--KY-----
AlinOBP10     I-RGNLKNCISEKD----PDPCEKASKFIKCFYTRARNKGEIGA-SKEVIPAD--GF-----
TcasOBP25     T-LPELENCGKKAE----GDKCEKSFSFFNCMNKAEPEDWVLIQ------------------
LmigOBP1      G-HRVVHSCKHINH----DEACETAYQIHQCYKQSDPELYSLVVRAFDATIGD---------
AaegOBP1      A-LHMGKRCLYPEG----ENLCEKAFWLHKCWKESDPKHYFLI-------------------
CquiOBP1      A-MHMGKRCLYPEG----ENLCEKAFWLHKCWKQADPKHYFLV-------------------
AgamOBP1      A-MHMGKRCLYPEG----ETLCDKAFWLHKCWKQSDPKHYFLV-------------------
RproOBP17     L-SKMINSCKDAKG----ANACEVAFNFNKCLYNADPEHFLVI-------------------
AlinOBP4      L--PTIKSCGGTTG----SDPCDLAMNFNKCLQKADPVNFLVI-------------------
LlinLAP       L--PTIRGCAGTTG----ADPCELAMNFNKCLQKVDPVNFMVI-------------------
AlinOBP6      A-KEVIQQCADSVPP---EDSCEYAYGISQCMYNKMKEAGISGS------------------
AlucOBP5      A-DKLIDHCSSQVSP-DGMSKCEYAYQFSKCGLEYGMKNGLTPPKMYEEQRR----------
AlinOBP1      A-KQLVETCAGKVGTDAGGDECEFAYKMAVCAAEEAKKLGVRPPDF----------------
ApisOBP1      V-EHIVDVCAKKVADESETDECELAATLVTCIVLEANKAGLVDDPARQI-------------
ApisOBP8      A-KDLIDVCAKKAQ--STIEECALAGIVTTCIVEEAQKAGLSGGPGSRSRRTVSPKFRRDAM
DmelLUSH      S-RKSVEACRDTHK--QFKESCERVYQTAKCFSENADGQFMWP-------------------
AmelOBP5      G-KEIVAVCRNEE---YTGDDCQKTYQYVQCHYKQNPEKFFFP-------------------
                   *          *       *
```

Figura 6 Alinhamento representativo de OBPs de diferentes espécies. NvitOBP78 (CCD17847.1); AlinOBP13 (ACZ58084.1); BmorPBP1 (2FJY_A); BmorGOBP2 (2WC5_A); AlinOBP10 (ACZ58081.1); TcasOBP25 (EFA04747.2); LmigOBP1 (4PT1_A); AaegOBP1 (3K1E_A); CquiOBP1 (3OGN_A); AgamOBP1 (2ERB_A); RproOBP17 (VectorBase ID: RPRC000118); AlinOBP4 (ACZ58030.1); LlinLAP (AAC43033.1); AlinOBP6 (ACZ58032.1); AlucOBP5 (AEP95759.1); AlinOBP1 (ACZ58027.1); ApisOBP1 (CAR85628.1); ApisOBP8 (CAR85635.1); DmelLUSH (NP_524162.1); AmelOBP5 (3R72_A). Cisteínas conservadas estção marcadas com asterisco. Nvit – *Nasonia vitripennis*; Alin – *Adelphocoris lineolatus*; Bmor – *Bombyx mori*; Aluc – *Apolygus lucorum*; Apis – *Acyrthosiphon pisum*; Dmel – *Drosophila melanogaster*; Tcas – *Tribolium castaneum*; Lmig – *Locusta migratoria*; Aaeg – *Aedes aegypti*; Cqui – *Culex quinquefasciatus*; Agam – *Anopheles gambiae*; Rpro – *Rhodnius prolixus*; Llin – *Lygus lineolaris*; Amel – *Apis mellifera*.

Com base em suas sequências de aminoácidos, as OBPs inicialmente descritas em Lepidoptera foram divididas em cinco classes: PBPs (proteínas ligadoras de feromônio), GOBP1 (proteína ligadora de odor geral tipo 1), GOBP2 (proteínas ligadoras de odor geral tipo 2), ABP1s (proteínas ligadoras de antena tipo 1) e ABP2s (proteínas ligadoras de antena tipo 2), previamente conhecidas como ABPX (proteínas ligadoras de antena) (KRIEGER et al., 1996; GONG et al., 2009). No entanto, como essa classificação não era bem definida para outras ordens de insetos, as OBPs passaram a ser categorizadas de acordo com o padrão de cisteínas conservadas em suas sequências primárias. As chamadas OBPs clássicas possuem seis cisteínas conservadas, enquanto as do tipo *C-minus* apresentam apenas quatro ou cinco. A OBP14 de *Apis mellifera* foi a primeira OBP desse tipo a ter sua estrutura determinada em um estudo que demonstrou a presença de apenas duas pontes dissulfeto (SPINELLI *et al.*, 2012). O tipo *plus-C* se distingue pela presença de pelo menos duas cisteínas adicionais e uma prolina conservada após a sexta cisteína (XU; ZWIEBEL; SMITH, 2003; ZHOU *et al.*, 2004b). A estrutura cristalina da AgamOBP47, uma OBP do tipo *plus-C* de *A. gambiae* revelou, a existência de seis pontes dissulfeto (LAGARDE *et al.*, 2011), assim como a AgamOBP48 (TSITSANOU *et al.*, 2013). A família conhecida como OBPs diméricas, descritas em *Drosophila* (HEKMAT-SCAFE et al., 2002; ZHOU et al., 2004b), parece ser formada por dois motivos clássicos de seis cisteínas combinados (ZHOU et al., 2004a). Finalmente, o grupo das OBPs atípicas foi inicialmente descrito como apresentando um domínio clássico na região N-terminal e um prolongamento pouco caracterizado na região C-terminal. Depois, foi demonstrado que as OBPs atípicas, que haviam sido identificadas apenas em mosquitos (XU; ZWIEBEL; SMITH, 2003; ZHOU *et al.*, 2008), na verdade apresentavam dois domínios homólogos aos das OBPs clássicas, e foram renomeadas OBPs de dois domínios e consideradas como parte da família das OBPs diméricas (VIEIRA; ROZAS, 2011).

1.5.3.2. Transporte de semioquímicos

A função das OBPs no transporte de moléculas químicas nas antenas de insetos foi descrita pela primeira vez em lepitópteros, utilizando antenas de machos de *Antheraea polyphemus* (VOGT; RIDDIFORD, 1981). Posteriormente, foi demonstrado que a resposta eletrofisiológica de células gustativas era totalmente abolida na presença do anticorpo anti-OBP em *Phormia regina* (OZAKI *et al.*, 1995), o que sugeria uma participação efetiva dessas proteínas no transporte de moléculas. Finalmente, a participação de OBPs na apresentação de odores aos NSOs foi confirmada através de mutações em *D. melanogaster* (KIM; REPP; SMITH, 1998),

onde a deleção da região codificante da OBP LUSH produziu mutantes que apresentavam defeitos no mecanismo de detecção de compostos alcoólicos observado em insetos não mutantes.

Embora a afinidade de ligação de OBPs por diferentes semioquímicos tenha sido demonstrada para várias espécies desde 1981, a comprovação de que OBPs são essenciais para o funcionamento do sistema olfativo só foram obtidas recentemente. Experimentos de *knockdown* demonstraram que a proteína DmelOBP76a, ou LUSH, é necessária para o processo de olfação em *D. melanogaster* (XU et al., 2005; LAUGHLIN et al., 2008). Em outro estudo, quando feromônios foram solubilizados com OBPs, o *threshold* das respostas eletrofisiológicas de ORs correspondentes foi reduzido em até três ordens de magnitude em relação a quando solubilizados em DMSO (GROSSE-WILDE et al., 2006, 2007; FORSTNER; BREER; KRIEGER, 2009). Resultados similares foram obtidos *in vivo* quando o receptor de *bombykol* de *Bombyx mori*, BmorOR1, foi expresso utilizando o sistema de *"empty neurons"* (neurônios vazios, mutantes que não apresentam resposta a odores) de *D. melanogaster*. A sensibilidade ao *bombykol* foi aumentada de forma significativa quando BmorOR1 foi co-expresso com a OBP equivalente, BmorPBP1 (SYED *et al.*, 2010). Além disso, resultados obtidos em ensaios comportamentais com mutantes de *Drosophila sechellia* (MATSUO *et al.*, 2007; SWARUP; WILLIAMS; ANHOLT, 2011) e afídios (QIAO et al., 2009; SWARUP; WILLIAMS; ANHOLT, 2011; SUN et al., 2012b) também confirmaram que as OBPs estão, de fato, envolvidas no processo de reconhecimento e transporte de semioquímicos. Resultados de um estudo envolvendo diferentes combinações de proteínas ligadoras de feromônios (PBPs) e ORs de *Chilo suppressalis* indicaram que tais PBPs são necessárias no processo de olfação e que a sensibilidade de detecção de feromônios pelos ORs é aumentada em até quatro ordens de grandeza na presença de PBPs. Este estudo mostrou que a combinação certa entre OBP e OR é necessária para a detecção de um odor específico com alta sensibilidade (CHANG *et al.*, 2015).

1.5.3.3. Outras funções de OBPs

Embora o papel fundamental de OBPs no processo de olfação seja reforçado por estudos que mostram que grande parte dessas proteínas são expressas especificamente em antenas (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016), conforme a lista de membros identificados na família das OBPs cresce, torna-se mais claro que nem todas as OBPs são encontradas em órgãos sensoriais, indicando que essas proteínas podem apresentar outras funções que não o transporte de odores.

É pouco provável que todas as OBPs previstas no genoma de um inseto sejam, de fato, proteínas envolvidas no transporte de odores. Em *D. melanogaster*, por exemplo, foram descritos 51 genes pertencentes à família das OBPs, no entanto, somente alguns destes genes são expressos especificamente em órgãos sensoriais de adultos (GALINDO; SMITH, 2001). Em 20 genes previstos para OBPs em mosquitos do gênero *Anopheles*, pesquisadores encontraram 3 genes expressos em todos os tecidos do inseto e outros 3 que eram expressos em níveis muito baixos ou não apresentavam expressão alguma nos insetos adultos (LI *et al.*, 2005).

Proteínas olfativas e não-olfativas da família de genes *OBPs* apresentam as mesmas características estruturais. A estrutura rica em α-hélice com uma cavidade de ligação sugere que essas proteínas sejam capazes de encapsular moléculas de odor hidrofóbicas, transportando-os através de ambientes aquosos. Por esse motivo, algumas correntes de pesquisa sugerem que essas proteínas sejam chamadas de "encapsulinas", fazendo referência à habilidade de encapsular pequenos ligantes que possuem em comum. O nome "OBP" deveria ser restrito para proteínas olfativas dessa família, uma vez que é possível que um grande número de genes anotados em genomas de insetos como *OBPs* sejam apenas "encapsulinas" (LEAL, 2006a).

1.5.3.4. Estrutura tridimensional

A BmorPBP1 de *B mori* foi primeira OBP a ter sua estrutura determinada, tanto na forma livre quanto complexada com seu ligante, *bombykol*. A estrutura cristalina do complexo BmorPBP1-*bombykol*, crescida em pH 8,2 foi inicialmente determinada por cristalografia de raios-X. Neste complexo, a BmorPPBP1 consiste em uma estrutura compacta formada por seis α-hélices interligadas por três pontes dissulfeto que envolvem completamente o ligante (**Figura 6a**). Uma vez que o *bombykol* encontra-se protegido em um *binding pocket* hidrofóbico, seu transporte pode ser realizado através de ambientes hidrofílicos (SANDLER *et al.*, 2000).

Posteriormente, as estruturas tridimensionais de OBPs clássicas de insetos que se alimentam de sangue, como *A. gambiae*, *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* também foram resolvidas e, até o momento, todas as estruturas conhecidas dessa classe de OBPs seguem o padrão de seis hélices estabilizadas por três pontes dissulfeto (WOGULIS et al., 2006; MAO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2014) (**Figura 7a**). Em *A. gambiae*, a determinação da estrutura de uma OBP do tipo *Plus-C*, AgamOBP47, por cristalografia de raios-X, revelou a existência de um arranjo formado por oito α-hélices conectadas por seis pontes dissulfeto, formadas pelas oito cisteínas conservadas presentes em OBPs desta classe (LAGARDE *et al.*, 2011) (**Figura**

7b). Por outro lado, a estrutura da AmelOBP14, uma OBP *Minus-C* de *A. mellifera*, também determinada por cristalografia de raios-X, apresenta um *core* formado por seis α-hélices ligadas por apenas duas pontes dissulfeto, devido ao número reduzido de cisteínas nas OBPs deste tipo (SPINELLI *et al.*, 2011) (**Figura 7c**).

1.6. ECOLOGIA QUÍMICA REVERSA

A ecologia química reversa é um conceito relativamente novo na investigação de compostos comportamentalmente relevantes, baseada na afinidade de ligação de proteínas olfativas por ligantes candidatos a atrativos/repelentes. Esse tipo de abordagem é capaz de reduzir o número de compostos candidatos a serem testados de acordo com sua afinidade por proteínas olfativas, fornecendo uma alternativa aos bioensaios convencionais nos quais varreduras por tentativa e erro demandam muito tempo e apresentam alto custo (LEAL et al., 2005, 2008; LEAL, 2006b; FRANCO et al., 2018). Essa estratégia foi usada com sucesso pela primeira vez no desenvolvimento de melhores atrativos para o lepidóptero *Amyelois transitella* (LEAL et al., 2005). Mais tarde, um estudo combinando ecologia química reversa e convencional, utilizando a CquiOBP1 como alvo molecular para ensaios de ligação, foi capaz de identificar ligantes que contribuíram para o desenvolvimento do atrativo de oviposição para *C. quinquefasciatus* que é atualmente comercializado (LEAL *et al.*, 2008).

O conceito de ecologia química reversa foi recentemente atualizado de modo que métodos computacionais estão começando a ser incorporados ao processo, com o objetivo de reduzir ainda mais o número de compostos candidatos e, assim, acelerar a identificação de novos semioquímicos. A combinação de *docking* molecular e dinâmica molecular mostrou-se bem-sucedida na predição de compostos comportamentalmente ativos para a peste agrícola *Bactrocera dorsalis* (KAMALA *et al.*, 2014). A afinidade da proteína olfativa por diferentes ligantes pode ser estimada *in silico*. Em seguida, as afinidades de ligação são investigadas *in vitro* através de diferentes técnicas, como fluorescência, calorimetria e RMN. Finalmente, através de bioensaios e testes de campo, é possível verificar se existe resposta comportamental dos insetos à presença dos ligantes de maior afinidade *in vivo*. (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016; BRITO et al., 2020).

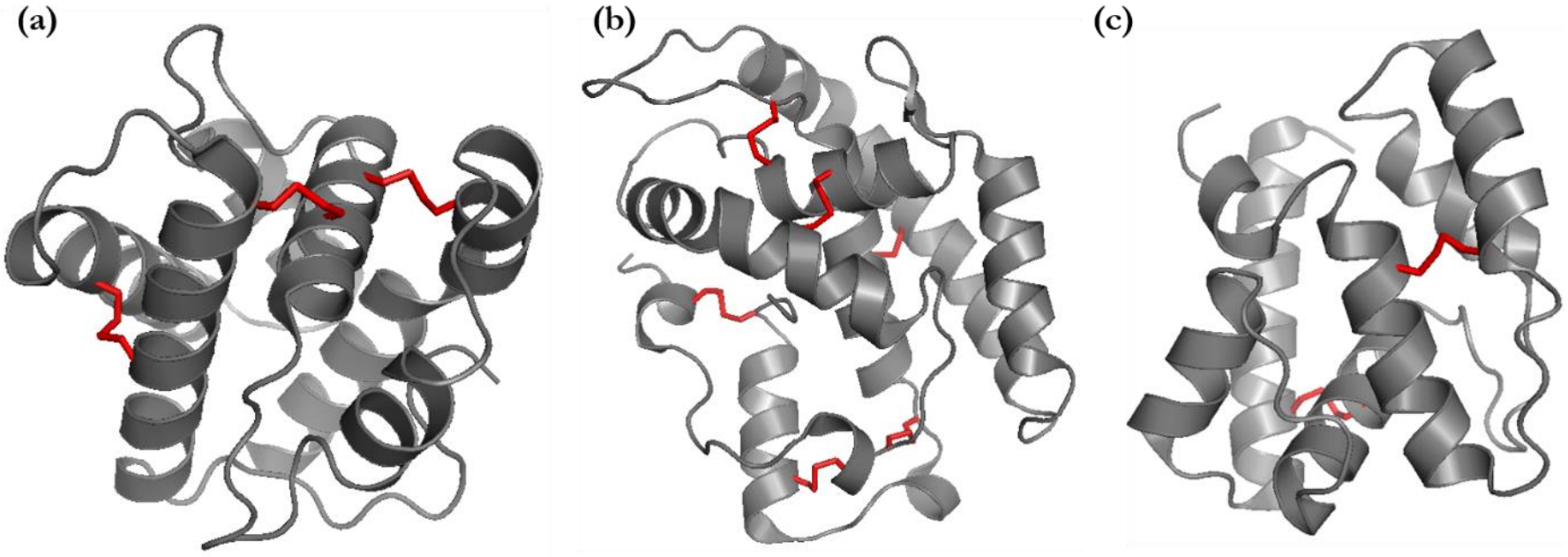


Figura 7 Estrutura tridimensional de diferentes classes de OBPs de insetos. (a) BmorPBP1, de *Bombyx mori*. OBP clássica, apresentando seis regiões de hélice interligadas por 3 pontes dissulfeto. PDB ID Code: 1DQE**. (b)** AgamOBP47, de *Anopheles gambiae*. OBP do tipo *Plus-C*, possui oito hélices conectadas por 6 pontes dissulfeto. PDB ID: 3PM2**. (c)** AmelOBP14, de *Apis mellifera*. OBP do tipo *Minus-C*, apresenta seis hélices em sua estrutura tridimensional, estabilizadas por apenas 2 pontes dissulfeto. PDB ID Code: 3S0A.

2. JUSTIFICATIVA

Recentemente, fatores como a globalização, a urbanização não planejada e mudanças climáticas estão exercendo um forte impacto na disseminação de doenças causadas por vetores, de modo que algumas delas, como a doença de Chagas, além da forte presença na América Latina, estão surgindo em países onde eram até então desconhecidas. Já foi reportado que a doença de Chagas está emergindo na Europa (ANTINORI *et al.*, 2017, 2019) e nos Estados Unidos (FORSYTH *et al.*, 2021; VALDEZ TAH, 2021). O impacto econômico causado pela doença é grande, além do custo social altíssimo. Um grande número de pessoas em idade produtiva morre prematuramente ou se torna incapacitada por sequelas deixadas pela infecção. O custo de pacientes crônicos com doença de Chagas também atinge cifras alarmantes: estima-se que o custo de assistência para um paciente crônico ao longo de 50 anos fique em torno de US$459.739 (BARTSCH et al., 2018).

Na ausência de vacinas, a transmissão do patógeno é evitada através do controle populacional dos insetos vetores, realizada basicamente por meio de inseticidas. Embora essa possa ser uma abordagem eficiente e de resposta rápida, ela ainda apresenta uma série de problemas, como o fato de ser prejudicial para a saúde humana, nociva ao meio ambiente e também para outras espécies. Além disso, insetos costumam adquirir resistência ao inseticida rapidamente, o que gera a necessidade do desenvolvimento constante de novos produtos químicos muito mais tóxicos (MOREIRA; MANSUR; FIGUEIRA-MANSUR, 2012). Nesse contexto, formas alternativas de controle vetorial tornam-se necessárias nos dias atuais. Uma abordagem que se mostra bastante promissora é o estudo de moléculas envolvidas no processo de comunicação química como alvo. Ao interferir no funcionamento desse sistema, apenas o inseto em questão seria afetado, minimizando danos causados para outras espécies e/ou para o meio ambiente, além de superar o fenômeno de resistência ao inseticida.

Uma vez que não há como uma molécula de odor chegar aos ORs sem o auxílio de OBPs, essas proteínas podem ser utilizadas como alvos para a varredura de novos compostos comportamentalmente ativos (atrativos ou repelentes) em uma abordagem similar à utilizada no estudo da interação droga-receptor.

Embora a busca por atrativos/repelentes com base na interação molecular entre compostos candidatos e OBPs não substitua completamente estudos de campo e bioensaios comportamentais, um grande número de compostos pode ser eliminado caso não apresentem afinidade de ligação por OBPs. Desde que alvos moleculares apropriados sejam selecionados

para o estudo, essa estratégia pode reduzir significativamente a lista de compostos-teste para avaliações de campo mais aprofundadas, consequentemente diminuindo o tempo e custo de pesquisas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi a identificação de novos compostos comportamentalmente ativos (atrativos ou repelentes) para o inseto vetor *Rhodnius prolixus* através de uma abordagem por ecologia química reversa, utilizando proteínas ligadoras de odor como alvos moleculares.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleção de OBPs funcionais para o estudo
    - Avaliação da abundância de transcritos codificantes de OBPs em tecidos sensoriais e não sensoriais por PCR semi-quantitativo;
    - Quantificação de transcritos codificantes de OBPs selecionadas por PCR quantitativo em tecidos sensoriais e não sensoriais.
- Caracterização funcional das OBPs selecionadas
    - Análise da sequência primária e propriedades físico-químicas;
    - Avaliação da abundância de transcritos codificantes em diferentes estados nutricionais do inseto;
    - Análise filogenética;
    - Silenciamento do gene *RproOBP17* por RNAi;
    - Identificação de motivos conservados;
    - Predição do modelo tridimensional;
    - Realização de ensaios de *docking* molecular com ligantes já descritos como capazes de causar resposta comportamental em *R. prolixus*.
- Prospecção de novos compostos comportamentalmente ativos utilizando a OBP como alvo molecular
    - Elaboração de protocolos para a expressão heteróloga e purificação das OBPs;
    - Realização de ensaios de *docking* molecular contra um painel de ligantes candidatos;
    - Identificação de compostos de maior afinidade pela OBP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MANUTENÇÃO DAS COLÔNIAS DE INSETOS

Os insetos *R. prolixus* foram criados no Instituto de Bioquímica Médica na Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde eram mantidos a 28°C e 75-85% de umidade relativa, sob fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro. Neste trabalho foram utilizados machos e fêmeas adultos. A alimentação sanguínea dos insetos foi feita diretamente na orelha de coelhos, em intervalos regulares de 21 dias para os adultos e intervalos variados de 3 a 5 semanas para as ninfas do primeiro ao quinto estádio de desenvolvimento. O RNA de machos e fêmeas adultos alimentados foi extraído 3 dias após a alimentação.

4.2. PROTOCOLO DE BIOÉTICA

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

4.3. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO cDNA

Diferentes tecidos (antenas, probóscides, patas e cabeças sem os apêndices) foram dissecados de 30 fêmeas e 30 machos adultos, 3 dias após a alimentação com sangue ou em jejum de 21 dias. Os tecidos foram dissecados em triplicata biológica utilizando uma pinça. Os tecidos foram separados e colocados diretamente em tubo de polipropileno, congelados com nitrogênio líquido e triturados com o auxílio de um bastão de homogeneização. A extração do RNA total foi feita utilizando o reagente TRIzol® (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA 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 Inc.*, Fremont, CA, EUA). A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro UV-1800 (*Shimadzu Inc.*, Kyoto, Japão). A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA

extraído de diferentes tecidos utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA) e *random primers*. O cDNA foi armazenado a -20 ºC até o momento do uso.

4.4. DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

As sequências dos 17 genes *OBPs* selecionados para este estudo foram obtidas no banco do genoma de *R. prolixus* (https://www.vectorbase.org/organisms/rhodnius-prolixus). Os pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando a ferramenta *OligoAnalyzer* (https://www.idtdna.com/calc/analyzer). As sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na varredura inicial por PCR convencional e em ensaios de PCR quantitativo foram desenhadas de modo a amplificar uma região de ~100 bp. A formação de estruturas secundárias indesejadas foi verificada através dos softwares *Beacon Designer* e *UNAFold* (THORNTON; BASU, 2011). Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados em reações de PCR convencional para amplificação de *OBPs* de interesse foram construídos de modo a flanquear o gene inteiro da proteína madura, ou seja, sem o peptídeo sinal. A região correspondente ao peptídeo sinal foi detectada e removida com o auxílio do *SignalP 4.1 Server* (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/) (PETERSEN *et al.*, 2011) e sítios de restrição para as endonucleases NcoI e XhoI foram inseridos nas regiões terminais das sequências, além de alguns pares de bases extras para assegurar a eficiência das enzimas de restrição (FEENEY; MURPHY; LOPILATO, 2014). Os oligonucleotídeos iniciadores usados estão listados na **Tabela 1**.

4.5. PCR CONVENCIONAL

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando a enzima *HotStart-IT FideliTaq DNA Polymerase* (*Affymetrix*, Santa Clara, CA, EUA). Foram utilizados iniciadores específicos para cada gene (**Tabela 1**).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores. Os pares de *primers* foram utilizados nos ensaios de PCR, qPCR e RNAi

Nome do gene VectorBase ID	Iniciador	Sequência	Tm (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
RproOBP1 RPRC010284	Senso	5'- CCGCCACACAAAGCCCTG -3'	63	149
	Anti-senso	5'- GACACATTCCAGCAAACACCTT -3'		
RproOBP6 RPRC004413	Senso	5'- GCACAAATGAAACAGGCGATGAA -3'	63	147
	Anti-senso	5'- GCCCATAATACAGCCTAAGTAGCA -3'		
RproOBP7 RPRC000311	Senso	5'- AAAGAAATGCCAACAACTTTCCA -3'	60	138
	Anti-senso	5'- GCTGCTCCAATCATCAATCCA -3'		
RproOBP11 RPRC004408	Senso	5'- GCAGCACTAAGCACCATTTATC -3'	59	141
	Anti-senso	5'- AATCTACTCTCCCATCAACGAG -3'		
RproOBP12 RPRC000492	Senso	5'- ATGGCAAACCATGTGTAGAGG -3'	61	135
	Anti-senso	5'- CCAATTCTCCTTCTTCTTTAGCTTTC -3'		
RproOBP13 RPRC000177	Senso	5'- GGAGTGCCATAGAGGAAGTG -3'	60	149
	Anti-senso	5'- GTAACAAGAATATAGAGCGAACCC -3'		
RproOBP14 RPRC004407	Senso	5'- CTAAACTAGCAGAGCTTGAGGCA -3'	63	137
	Anti-senso	5'- GCAGCCGAGTACACACTTGA -3'		
RproOBP17 RPRC000118	Senso	5'- TGGAGCTTTGATTGAACCTTGT -3'	60	126
	Anti-senso	5'- GCTTCAGCATCTAATTCACCATC -3'		
RproOBP17 RPRC000118 expressão recombinante	Senso	5'- CACTCCATGGTAGAATTA -3'	56	382
	Anti-senso	5'- TATATTCTCGAGTCAGATCACCAAAAAG -3'		
RproOBP18 RPRC001924	Senso	5'- CAGTGCTGACATGGCTTCTA -3'	59	150
	Anti-senso	5'- GGTCTGGTAACTCCGATCTTT -3'		
RproOBP20 RPRC007008	Senso	5'- ATAGCGACAACGCCGAAG -3'	59	150
	Anti-senso	5'- CCAGTCCAATCTCTTTAGCCT -3'		
RproOBP21 RPRC001925	Senso	5'- TCCAGAAACTGTGCAATACCTT -3'	60	141
	Anti-senso	5'- TCACCATCATCTGACAACATACC -3'		
RproOBP22 RPRC000115	Senso	5'- GGCATCCCAAATGAGAGGTT -3'	60	148
	Anti-senso	5'- CAGGCAACGGTACACTTTCA -3'		
RproOBP23 RPRC000174	Senso	5'- AAAGACGCCCAGCCACAA -3'	61	158
	Anti-senso	5'- GCCATAGAATAACCAAGTTCACAGA -3'		
RproOBP24 RPRC009905	Senso	5'- GCTCTAGCTGTTGCTTCAGACC -3'	63	121
	Anti-senso	5'- CAAGTTCGCATTCATTATCCATCTTCC -3'		
RproOBP26 RPRC000182	Senso	5'- TGGGAGAGGTTAAGAGAAAGCTAC -3'	62	123
	Anti-senso	5'- CTCTTGATAACTTGGATGGAAACGAA -3'		
RproOBP27 RPRC009914	Senso	5'- TTCAAGAAATTAAAGGGCTTAACAAA -3'	59	146
	Anti-senso	5'- GCCGTCGTTATCGGGTAT -3'		
RproOBP17 silenciamento	Senso*	5'- TAATACGACTCACTATAGGGTGATCAACAGCTGCAAAGATG- 3'	55	113
	Anti-senso*	5'- TAATACGACTCACTATAGGGGAGTGCTCAGGATCTGCGTTA -3'		
Cquiβ-gal silenciamento	Senso*	5'- TAATACGACTCACTATAGGGAATGGTTCAGGTCGAAAACG -3'	56	500
	Anti-senso*	5'- TAATACGACTCACTATAGGGCCGCCTCGTACAAAACAAGT -3'		
Rpro18S	Senso	5'- TCGGCCAACAAAAGTACACA -3'	56	104
	Anti-senso	5'- TGTCGGTGTAACTGGCATGT -3'		

*As sequências sublinhadas correspondem à sequência do promotor T7.

O gene ribossomal *R18S* de *R. prolixus* foi utilizado como referência (MAJEROWICZ *et al.*, 2011). As reações foram realizadas em termociclador *Veriti® Thermal Cycler - 96 well* (*Apllied Biosystems*) e consistiram de 35 ciclos para *OBPs* e 25 ciclos para o *R18S*, nas seguintes condições: 94 ºC por 3 min, seguido pelas etapas de desnaturação a 94 ºC por 30 seg, anelamento de acordo com o oligonucleotídeo iniciador por 30 seg e a etapa de extensão a 72 ºC por 1 min e 30 seg, finalmente seguido de 72 ºC por 10 min. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ (*Biotium Inc.*) em tampão TAE pH 8 (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Os géis foram fotografados em fotodocumentador DNR MiniBIS Pro Bio-Imaging Systems (*Bio America Inc.*, Miami, Flórida, EUA). As imagens foram digitalizadas e tratadas com *Adobe Photoshop* (*Adobe Inc*, San José, CA, EUA).

4.6. PCR QUANTITATIVO (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas em termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*) usando *Power SYBR® Green PCR Master Kit* (*Applied Biosystems*). A concentração final dos oligonucleotídeos utilizados foi de 400 nM para *R18S* e 600 nM para *OBPs*. As reações foram realizadas em triplicata biológica e triplicata técnica para cada amostra, com 35 ciclos em placa ótica de 48 poços, nas seguintes condições: 50 ºC por 2 min; 95 ºC por 10 min; etapas de desnaturação a 94 ºC por 15 seg; 50 ºC por 15 seg e extensão a 72 ºC por 1 min, e, por fim, foi realizada uma curva de dissociação, em condições padrão do aparelho. O gene *RproR18S* foi utilizado como referência (MAJEROWICZ *et al.*, 2011) para a normalização dos valores de Ct (*threshold cycle*). A expressão relativa dos genes de *OBPs* nos diferentes órgãos foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

4.7. SÍNTESE DO dsRNA

O dsRNA (RNA de dupla fita) foi sintetizado utilizando um fragmento do gene que codifica a *OBP17*, flanqueado por sítios da sequência do promotor T7 (*OBP17_T7*, tamanho 113 pb). O fragmento *OBP17_T7* foi obtido através de PCR, utilizando cDNA de antenas de machos adultos, alimentados com sangue, e iniciadores específicos. As seguintes condições foram utilizadas: ciclo inicial de 94 ºC por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 ºC por 30 seg para desnaturação, 55 ºC por 30 seg para anelamento, 72 ºC por 1 min e 30 seg para extensão,

e 72 ºC durante 10 min. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a síntese de dsRNA estão listados na **Tabela 1**. Para confirmar a especificidade do silenciamento do *OBP17*, foi utilizado o dsRNA do gene da proteína β-galactosidase (β-gal) de *C. quinquefasciatus* (XU *et al.*, 2014). O fragmento *β-gal_T7* foi produzido da seguinte forma*:* o gene da *β-gal*, armazenado em vetor *pGEM®-T Easy* (*Promega*, Madison, WI, EUA), foi amplificado por PCR, usando *primers* específicos contendo a sequência do promotor T7, sob as seguintes condições: ciclo inicial de 94 ºC por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 ºC por 30 seg para desnaturação, 56 ºC por 30 seg para anelamento, 72 ºC por 1 min e 30 seg para extensão, e 72 ºC por 10 min. Os produtos de PCR *OBP17_T7* e *β-gal_T7* foram utilizados como molde para as reações de transcrição utilizando a enzima T7 RNA polimerase com o *MEGAscript® RNAi kit* (*Ambion*, Austin, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Após a síntese *in vitro*, os dsRNAs foram purificados por extração com fenol-clorofórmio (1:1), quantificados usando espectrofotômetro a 260 nm, e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ (*Biotium Inc.*). Para os ensaios de RNAi, o protocolo descrito por FRANCO et al. (2016) foi utilizado. Brevemente, foi injetado 1 µL de dsRNA (1 µg/µL H2O livre de RNase) na cavidade metatorácica de machos N5 (N=20 para cada tratamento de dsRNA), usando uma seringa Hamilton de 10 µL.

4.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE qPCR

A análise estatística da expressão relativa de *OBPs* foi feita a partir dos valores de Ct normalizados utilizando ANOVA, seguido por teste de Tukey, no programa *GraphPad Prism 8* (San Diego, CA, Estados Unidos). A diferença entre os grupos foi considerada significativa para valores $p < 0{,}05$. A análise de qPCRs foi feita usando três réplicas biológicas e três réplicas técnicas para cada gene. As barras representam o erro padrão de três repetições e letras indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0{,}05$).

4.9. CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO*

O peso molecular teórico (MW), ponto isoelétrico (pI) e hidrofobicidade foram calculados utilizando o programa *ProtParam* (https://web.expasy.org/protparam/). Domínios conservados foram analisados com o *NCBI Conserved Domain Database* (CDD) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/). O *SignalP 4.1 Server* (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/) (PETERSEN *et al.*, 2011) foi utilizado para a

predição do peptídeo sinal. A estrutura secundária da proteína madura foi prevista usando o *PSIPRED 4.0* (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) (MCGUFFIN; BRYSON; JONES, 2000). A previsão de ligações dissulfeto foi realizada através do *DiANNA 1.1 web server* (http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/) (FERRÈ; CLOTE, 2005).

4.10. ANÁLISE FILOGENÉTICA

A ferramenta *online BLASTp* foi usada para realizar uma busca por homologia limitada a classe Insecta (taxid:50557) nas sequências de proteínas não redundantes do *GenBank* (nr) no banco de dados do *NCBI* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). O *SignalP 4.1 Server* (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/) (PETERSEN *et al.*, 2011) foi utilizado para a predição do peptídeo sinal. O alinhamento múltiplo de sequências foi feito utilizando o *PRALINE* (https://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/) (SIMOSSIS; HERINGA, 2005). Uma árvore filogenética incluindo as sequências maduras das RproOBPs e OBPs de outros insetos com função e/ou ligante descritos foi construída com o programa *MEGA-X* pelo método da máxima verossimilhança, com 1000 repetições *bootstrap* (TAMURA et al., 2011; KUMAR et al., 2018). As sequências utilizadas na análise filogenética estão listadas no Material Suplementar. A ilustração da árvore filogenética foi elaborada utilizando a ferramenta *online iTOL: Interactive Tree of Life* (https://itol.embl.de/).

4.11. IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS REPETIDOS

A busca por padrões de motivos repetidos entre a RproOBP17 e OBPs de outros insetos com informações estruturais elucidadas foi realizada através do servidor *online MEME 5.3.3* (http://meme-suite.org/) (BAILEY *et al.*, 2006, 2015) com os seguintes parâmetros: *minimum width* = 6; *maximum width* = 15; *maximum number of motifs find* = 10. As sequências utilizadas na busca por motivos repetidos estão listadas no Material Suplementar.

4.12. PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL E ESTUDOS DE *DOCKING* MOLECULAR

O modelo tridimensional foi desenvolvido com o programa *online* de *threading* de proteínas *PHYRE2* (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index) (KELLEY

et al., 2015). A qualidade estereoquímica e precisão do modelo predito foram avaliadas utilizando os *softwares PROCHECK* (https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/) (LASKOWSKI *et al.*, 1993) e *Verify3D* (https://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/) (EINSENBERG; LUTHY; BOWEI, 1997). Com base no princípio termodinâmico de que compostos se ligam fortemente ao sítio ativo de uma proteína quando a energia livre de ligação (ΔG) do processo é baixa (DU *et al.*, 2016), esse parâmetro foi utilizado para estimar a afinidade de ligação de diferentes compostos à RproOBP17. Os valores de ΔG foram calculados pelo *software AutoDock Vina* e visualizados usando o *Chimera 1.14*. As estruturas tridimensionais dos compostos foram obtidas a partir do banco de dados *PubChem* (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) (KIM *et al.*, 2016). As interações proteína-ligante foram identificadas pelo programa *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* (San Diego, CA, EUA) e as ilustrações foram elaboradas com o *PyMOL* (https://www.pymol.org).

4.13. CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA OBP DE INTERESSE

A sequência codificante da RproOBP17 foi amplificada por PCR, utilizando cDNA de antenas como molde, oligonucleotídeos iniciadores específicos e HotStart-IT® *FideliTaq™ DNA Polymeras*e (*Affymetrix*). O produto de PCR obtido foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE pH 8 (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), corado com GelRed™ Nucleic Acid Stain (*Biotium*). O produto de PCR com tamanho esperado foi purificado utilizando *QIAquick Gel Extraction Kit* (*QIAGEN*, Düsseldorf, Alemanha) e clonados em vetor *pGEM®-T Easy* (*Promega*). As colônias positivas foram purificadas com *QIAprep Spin* Miniprep *Kit* (*QIAGEN*) e o plasmídeo purificado foi submetido a sequenciamento de Sanger em *ABI 3130 Genetic Analyzer®* (*Applied Biosystems*).

4.14. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA OBP DE INTERESSE

Insertos apresentando a sequência codificante da OBP de interesse foram subclonados em vetor de expressão pET22b(+) (*Novagen*, Grupo Merck, Darmstadt, Alemanha), que permite a expressão periplasmática de OBPs corretamente enoveladas (WOJTASEK & LEAL, 1999). Células BL21(DE3) quimiocompetentes foram transformadas com as construções plasmidiais e os testes para diferentes condições de expressão (1: $DO_{600} > 1$; T = 37 ºC, [IPTG] = 1 mM; 2: $DO_{600} = 0,3$; T = 37 ºC, [IPTG] = 1 mM; 3: $DO_{600} > 1$; T = 18 ºC, [IPTG] = 1 mM;

4: DO_{600} = 0,3; T = 18 ºC, [IPTG] = 1 mM; 5: DO_{600} > 1; T = 37 ºC, [IPTG] = 0,1 mM; 6: DO_{600} = 0,3; T = 37 ºC, [IPTG] = 0,1 mM; 7: DO_{600} > 1; T = 18 ºC, [IPTG] = 0,1 mM; 8: DO_{600} = 0,3; T = 18 ºC, [IPTG] = 0,1 mM; 9: DO_{600} = 0,6; T = 37 ºC, [IPTG] = 0,5 mM) foram realizados em triplicata. A expressão da proteína recombinante foi realizada em meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL nas condições $DO_{600} \approx 0,6$, T = 28 ºC, com indução por IPTG 0,5 mM durante 3 h. A verificação da expressão foi realizada por SDS-PAGE 12 %. Proteínas da fração periplasmática foram extraídas com Tris-HCl 10 mM pH 6,5 por três ciclos de *freeze-and-thaw* (LEAL, 2000).

4.15. PURIFICAÇÃO DAS OBPS RECOMBINANTES

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por FPLC em equipamento *AKTA Explorer* (*GE Healthcare*, Chigago, IL, EUA) através de etapas de troca iônica e gel filtração. A primeira etapa de troca iônica foi realizada em coluna DEAE FF 16/10 (*GE* Health Care), utilizando um gradiente de 0-500 mM de NaCl em Tris-HCl 20 pH 6,5 mM durante 40 min, seguida por gradiente 500 mM-1M de NaCl pH 6,5 por 20 min. A segunda etapa foi feita com a coluna MonoQ 10/100 GL (*GE Health Care*) em gradiente de 0-500 mM de NaCl em Tris-HCl 20 mM pH pH 6,5, durante 45 min, seguida por *steps* de 5 min de 1,0 M e 1,5 M. A etapa de gel filtração foi realizada com coluna HiLoad 16/600 Superdex 75 (*GE Healthcare*) pré-equilibrada com NaCl 150mM e Tris-HCl 20mM pH 6,5. Os cromatogramas foram construídos com o auxílio do programa *GraphPad Prism 8* e os picos obtidos foram mapeados por SDS-PAGE 12 %.

4.16. SDS-PAGE

Ensaios de eletroforese em SDS-PAGE 15% foram realizados em tampão de corrida (Tris 250 mM, glicina 1,92 M e SDS 1%, pH 8,3) utilizando o equipamento *Mini-Protean Tetra Cell* (*Biorad*). Frações do extrato proteico foram desnaturadas por fervura durante 5 min em tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 10 %, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 5 %, pH 6,8, e azul de bromofenol 0,1 % p/v) e aplicadas (5 µL) no gel junto com o padrão de massa molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein* (*Biorad*). A eletroforese foi realizada a 80 V por cerca de 30 minutos, seguida por 200 V, por mais 60 minutos.

4.17. DIGESTÃO EM GEL

As bandas coradas na região de peso molecular esperado verificadas por SDS-PAGE Ao fim das etapas de cromatografia foram recortadas e descoradas com bicarbonato de amônio 25 mM em ACN 50 %. As amostras foram então lavadas com bicarbonato de amônio 25 mM, desidratadas com acetonitrila 100 % durante 10 min e secas completamente em sistema de centrifugação a vácuo (*SpeedVac*, *Thermo Fisher Scientific*, Walthan, MA, EUA). Os pedaços de gel foram reidratados em aproximadamente 10 µL de tampão de digestão contendo tripsina (*Sequencing Grade Modified*, Promega) a uma concentração final de 10 ng/mL em 25 mM de bicarbonato de amônio, durante 20 h, a 37°C e, em seguida, ácido fórmico puro foi adicionado para interromper a digestão. Os peptídeos foram extraídos três vezes com acetonitrila 50 % (v/v). Os extratos foram reunidos e purificados em ponteiras com resina C18 (*ZipTip*, *Millipore*, Grupo Merck). Em seguida, foram liofilizados, reconstituídos em 0,1 % (v/v) de ácido fórmico e enviados para Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica da UFRJ (UEMP/IFRJ) para análise por LC-MS/MS.

4.18. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O protocolo utilizado na UEMP/UFRJ constitui em análise por nLC-ESI-Q/TOF (*Waters Corporation, Milford, MA, EUA*), utilizando para a cromatografia líquida uma coluna capilar de fase reversa BEH 130 C18 com 100 µm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento (*Waters*). A eluição foi feita com 0,5 % (v/v) de acetonitrila/min e gradiente linear (3 a 40 % (v/v)) de acetonitrila contendo 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. Os peptídeos eluídos da coluna foram ionizados por *electrospray* a 3,5 kV e os espectros de massas dos peptídeos foi adquirido. A identificação dos peptídeos foi realizada em espectrômetro Q-TOF (quadrupolo/aceleração ortogonal *time of flight*) acoplado ao cromatógrafo UPLC (*Waters*).

4.19. BUSCA EM BANCO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Os espectros MS/MS foram analisados pelo *software Mascot 2.3.02* (licenciado para o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - Campinas, SP, Brasil) utilizando bancos de dados de peptídeos preditos do genoma de *R. prolixus*, com os seguintes parâmetros de busca: perda de um sítio de clivagem, hidrólise por tripsina, ±15 ppm de tolerância de massa para peptídeo

precursor e ±0,6 Da para fragmentos de íon, ESI-TRAP como instrumento utilizado, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e espectro de massa MS/MS monoisotópico. Os critérios para a identificação positiva incluíram a pontuação mínima de confiabilidade fornecida pelo *Mascot* e o percentual de cobertura da sequência. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. O FDR (*False Discovery Rate*) foi determinado utilizando uma busca automática do banco de dados *decoy* do Mascot, de modo que os peptídeos foram identificados em 1 % de FDR pela abordagem de filtragem *Mascot-Percolator*.

4.20. PAINEL DE LIGANTES

O painel foi montado de modo a incluir ligantes fisiologicamente relevantes para *Rhodnius* e compostos previamente descritos como sendo comportamentalmente ativos para outros insetos. Voláteis da glândula metasternal (MG) de *Rhodnius* incluíram: (2R/2S) 4-metil-3-pentan-2-ol, (S)-2-butanol, (S)-2-pentanol, 2-butanona, 2-metil-1-butanol, 2-metil-3-buten-2-ol, 2-pentanona, 3-metil-2-butanol e 3-pentanol (PONTES *et al.*, 2008). Voláteis da glândula de Brindley (BG) de triatomíneos incluíram: 2-butanona, 2-metilbutan1-ol, ácido 2-metilbutírico, 3-metil-3-buten-1-ol, 1-metilbutan-1-ol, 3-pentanona, ácido acético, isobutirato de amila, ácido butírico, ácido capróico, álcool isobutílico, isobutirato de isobutila, propanoato de isobutila, ácido isobutírico, feniletil álcool, isobutirato de feniletila e ácido propiônico (MANRIQUE *et al.*, 2006). Ligantes candidatos a atrativo/repelente: (-)-α-pineno, (E)-nerolidol, (E)-β-farneseno, (Z)-hex-3-en-1-ol, 1-octen-3-ol, 2-heptanona, 4-(4-metilfenil) pentanal, 4-metilciclo-hexan-1-ol, acetofenona, carvracol, cedrol, acetate de cis-3-hexenila, citral, eugenol, (E)-β-ocimeno, farnesol, geraniol, geranilacetona, hexan-1-ol, butirato de hexila, indol, limoneno, linalool, salicilato de metila, p-anisyl hexanoato de p-anisila, pentadecan-2-ona, fenilmetanol, escatol, timol, acetate de timila, isovalerato de timila, tridecan-2-ona, α-humuleno, α-felandreno, β-cariofileno, β-citronelol, β-damascenona, β-pineno and γ-octalactona (JIANG et al., 2009; SYED; LEAL, 2009; WANG et al., 2013; DEISIG et al., 2014; HE; HE, 2014; SICILIANO et al., 2014; YIN et al., 2015; BEZERRA-SILVA et al., 2016; SUN et al., 2016; LI et al., 2017; JU et al., 2018; HU et al., 2019).

5. RESULTADOS

5.1. ESTIMATIVA DA ABUNDÂNCIA DE TRANSCRITOS DE *OBPS* POR PCR SEMI-QUANTITATIVO

A anotação de uma proteína na família das OBPs se baseia, principalmente, na presença de um padrão de seis cisteínas cujas posições relativas são conservadas ao longo de todas as ordens da classe Insecta. Esse critério possibilita que uma série de genes anotados na família das OBPs estejam, na verdade, envolvidos no transporte de moléculas hidrofóbicas em geral, ao invés de semioquímicos associados a respostas olfativas (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016). A estratégia de identificação utilizada atualmente tenta corrigir essa discrepância, e se baseia na hipótese de que *OBPs* expressos em tecidos não olfativos traduzam proteínas responsáveis pelo transporte de moléculas em geral, enquanto *OBPs* expressos exclusivamente em antenas (órgãos primariamente responsáveis pela olfação) codifiquem proteínas cuja função é o transporte de odores no processo de comunicação química. Com base neste critério, faz-se necessária a avaliação do perfil de expressão, nos diferentes tecidos, dos genes anotados no genoma como *OBPs* putativas. Assim, são descartados os genes *OBPs* expressos em tecidos não olfativos, ou seja, não envolvidos com o processo de olfação.

Em estudo prévio, Oliveira e colaboradores (2017) identificaram 17 OBPs nas antenas de *R. prolixus* adultos. Como não há informação na literatura a respeito da expressão dessas OBPs em outros órgãos, ensaios de PCR semi-quantitativo foram utilizados para estimar a presença de transcritos codificantes para cada OBP em antenas, probóscides, pernas e cabeças (sem os apêndices). Os experimentos de PCR semi-quantitativo foram realizados utilizando iniciadores específicos para cada *OBP* (**Tabela 1**) e o gene ribossomal 18S (*RproR18S*) como controle interno. O *RproR18S* mostrou-se constitutivamente expresso em todos os órgãos, produzindo um *amplicon* de 104 bp, confirmando então a integridade de todas as amostras de cDNAa testadas (**Figura 8**).

A maioria dos genes (cerca de 2/3) foram expressos em todos os tecidos: *OBP1, OBP7, OBP11, OBP12, OBP14, OBP18, OBP20, OBP22, OBP23, OBP24* e *OBP29* (**Figura 8**). A presença de transcritos nesses tecidos indicou que essas proteínas devem desempenhar função de transporte de moléculas hidrofóbicas não envolvidas no processo de olfação de *R. prolixus*

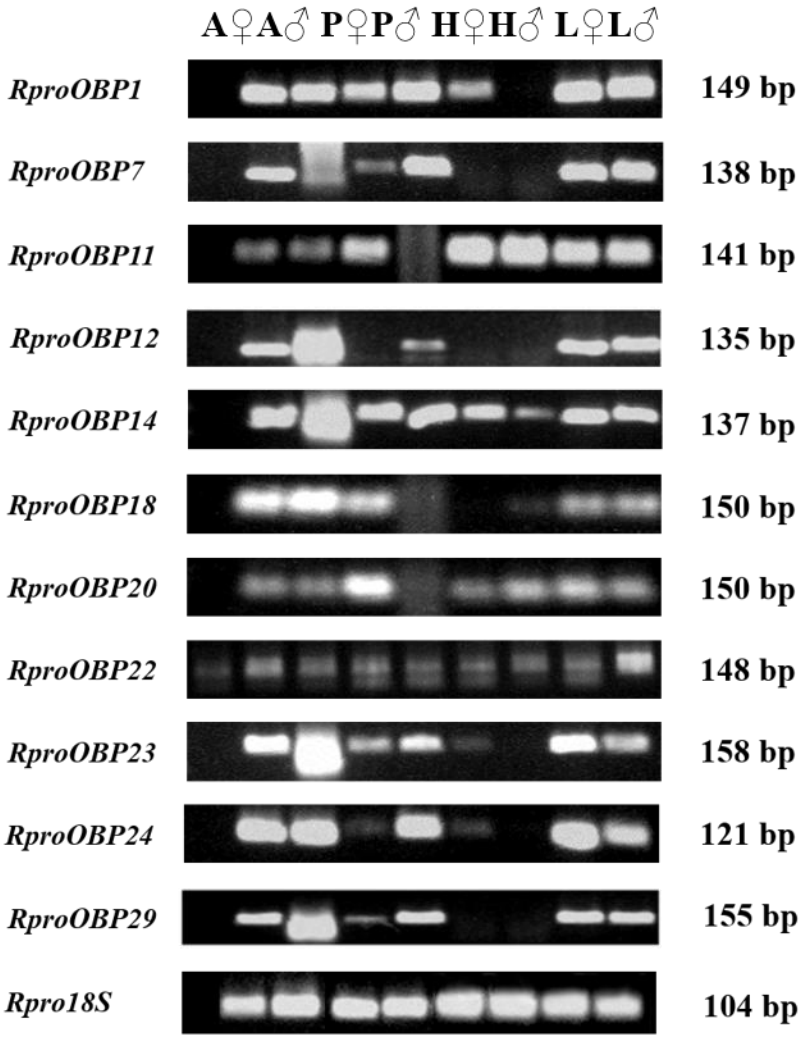


Figura 8 Perfil de expressão dos genes *RproOBP1*, *RproOBP7*, *RproOBP11*, *RproOBP12*, *RproOBP14*, *RproOBP18*, *RproOBP20*, *RproOBP22*, *RproOBP23*, *RproOBP24* e *RproOBP29* em diferentes tecidos de *R. prolixus*. O RNA total foi extraído de diferentes tecidos de insetos adultos machos (M) e fêmeas (F) alimentados, tratado com DNaseI e utilizado na reação de transcrição reversa para síntese do cDNA. A estimativa da presença de transcritos das OBPs foi feita através de ensaios de PCR utilizando iniciadores específicos para cada gene. O gene ribossomal R18S (*RproR18S*) foi utilizado como controle da integridade do cDNA, com iniciadores específicos amplificando uma região de 104 bp. Os produtos de PCR foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % e, em seguida, corado com GelRed. N – controle negativo, A – antenas, P – probóscides, H – cabeças, L – patas.

Em contrapartida, 1/3 dos genes (*OBP6*, *OBP13*, *OBP17*, *OBP21*, *OBP26* e *OBP27*) foram encontrados majoritariamente expressos nas antenas (**Figura 9**). A expressão exclusiva em antenas foi o critério básico utilizado para a seleção dos genes de interesse. Aplicando este critério de seleção, nota-se que, das 17 proteínas classificadas como OBPs que foram encontradas no proteoma da antena, apenas 6 possuem expressão majoritária neste tecido e podem, de fato, estar associadas à olfação. Após essa redução considerável no número de OBPs a serem avaliadas para este estudo, o próximo passo foi analisar o perfil de expressão dos 6 genes restantes. Apesar da expressão majoritária em antenas, a presença de *amplicons* dos genes *OBP6*, *OBP13*, *OBP21* e *OBP27* nos tecidos das probóscides e patas fez com que não fossem considerados de interesse. Dos 17 genes iniciais, apenas *OBP17* e *OBP26* mostraram expressão exclusiva neste tecido. Uma vez que este trabalho visa encontrar OBPs para a prospecção de novos atrativos/repelentes para diminuir a transmissão da doença de Chagas, e como machos e fêmeas podem transmitir o *T. cruzi*, o *OBP26* (**Figura 9***)* foi descartado por apresentar transcritos apenas em machos.

Desta forma, da totalidade de genes avaliados, o *OBP17* foi selecionado para o presente estudo, uma vez que apresentou transcritos exclusivamente em antenas de machos e fêmeas (**Figura 9**).

5.2. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO TRANSCRITO *RPROOBP17* POR qPCR

A fim de confirmar o perfil de expressão observado por PCR, a quantificação relativa do transcrito *RproOBP17* foi determinada por PCR em tempo real (qPCR), utilizando o método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) em relação ao gene de referência *RproR18S*. Os nucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios podem ser encontrados na (**Tabela 1**). A eficiência da amplificação do gene de referência e do gene alvo foi de 95 e 101 %, respectivamente.

O resultado, apresentado na (**Figura 10**), mostrou que o *RproOBP17* é, de fato, expresso exclusivamente em antenas de machos e fêmeas, não apresentando transcritos em tecidos não sensoriais, aqui representados por probóscides e patas. Curiosamente, os transcritos codificantes desta proteína apresentaram uma abundância 2,5 vezes maior em machos. A integridade do cDNA utilizado como molde também foi confirmada pela amplificação do gene de referência *RproR18S*. O perfil de expressão observado para o *RproOBP17* sugere a participação dessa proteína no processo de olfação.

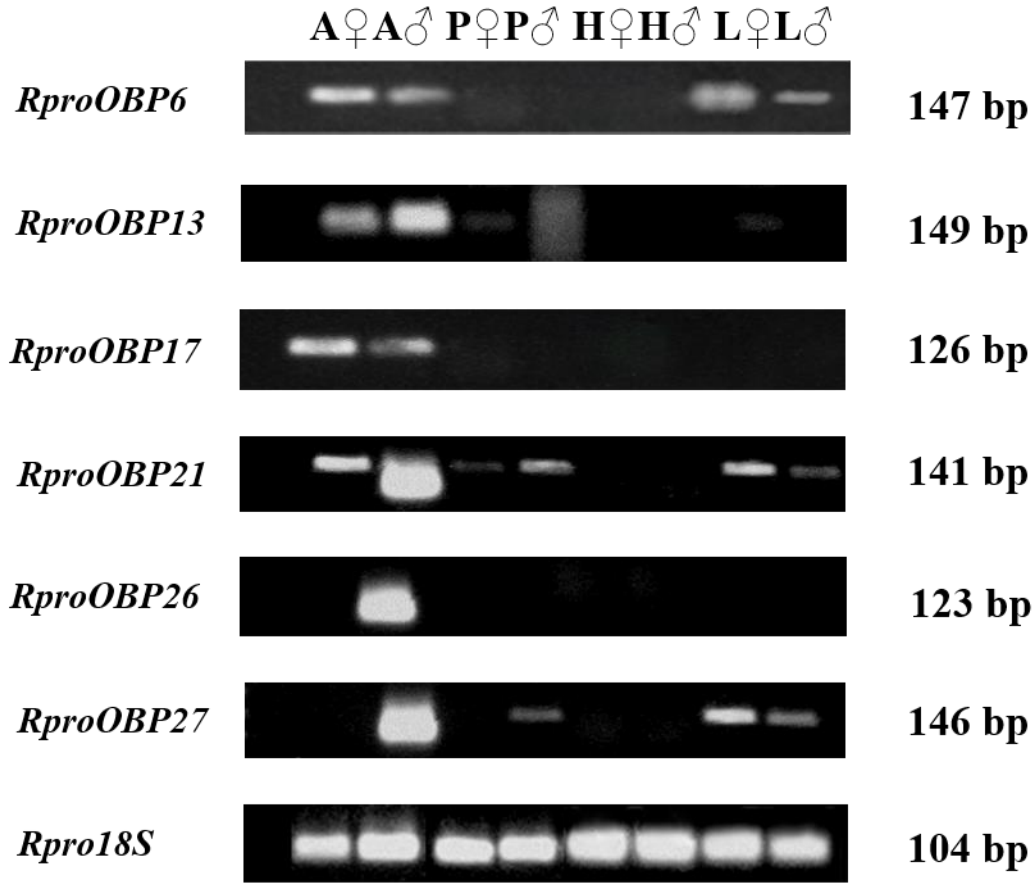


Figura 9 Perfil de expressão dos genes *RproOBP6, RproOBP13, RproOBP17, RproOBP21, RproOBP26* e *RproOBP27*. O RNA total foi extraído diferentes tecidos de insetos machos (M) e fêmeas (F) adultos alimentados, tratado com DNaseI e utilizado na reação de transcrição reversa para síntese do cDNA. A estimativa da abundância de transcritos das OBPs foi feita através de ensaios de PCR utilizando iniciadores específicos para cada gene. O gene ribossomal R18S (*RproR18S*) foi utilizado como controle da integridade do cDNA, com iniciadores específicos amplificando uma região de 104 bp. Os produtos de PCR foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e, em seguida corado com GelRed. N – controle negativo, A – antenas, P – probóscides, C – cabeças, L – patas.

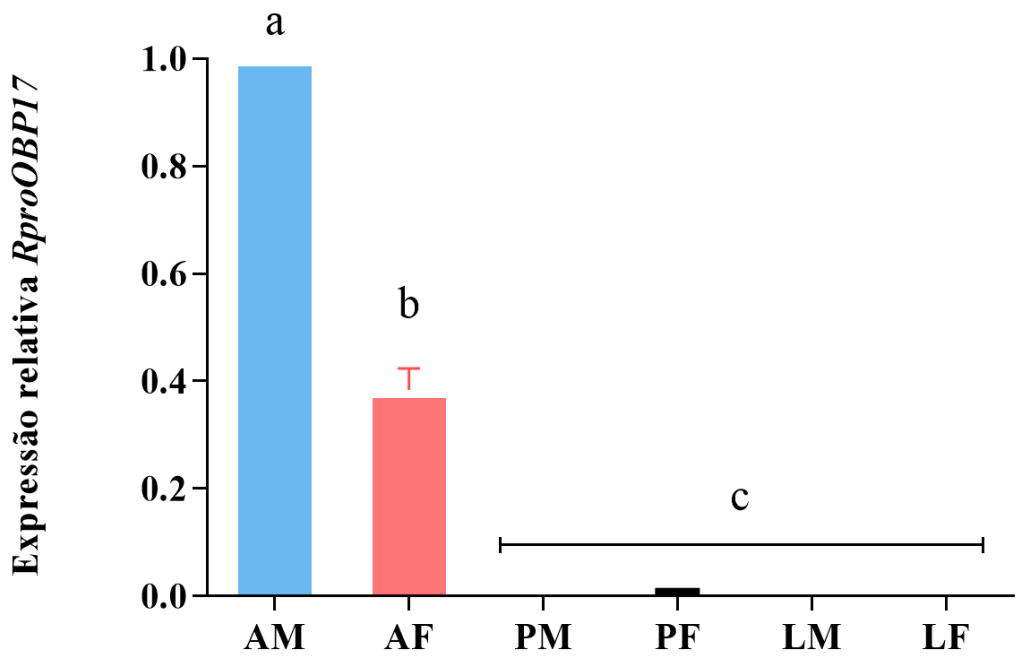


Figura 10 Perfil de expressão relativa do gene codificante OBP17 em *Rhodnius prolixus*. Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando cDNA de insetos adultos alimentados. Os valores de Ct obtidos foram normalizados em relação ao gene de referência *Rpro18S* e quantificados pelo método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os níveis de expressão do gene *OBP17* são representados em relação ao valor obtido para a antena de macho (1,0). Os resultados estão apresentados na forma de média +/- desvio padrão para 3 determinações independentes. AM – antena de macho, AF – antena de fêmea, PM – probóscides de macho, PF – probóscides de fêmea, LM – patas de macho, LF – patas de fêmea. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando ANOVA, seguido de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05).

5.3. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA E PROPRIEDADES FISICO-QUÍMICAS DA RPROOBP17

A predição do peptídeo sinal indicou que, na sequência de 139 aminoácidos que constituem a RproOBP17, o sítio de clivagem mais provável encontra-se entre as posições 21 e 22 (AYA-AV). A RproOBP17 madura, hipoteticamente, possui 118 aminoácidos, massa molecular teórica de 12,8 kDa e pI calculado igual a 4,17. A proteína contém 23 aminoácidos carregados negativamente (13 Asp + 10 Glu), referentes a 29,5 % da sequência, e 19 aminoácidos carregados positivamente (10 Arg + 9 Lys), referentes a 7,6 %. A busca por domínios conservados confirmou que a RproOBP17 apresenta alta similaridade com a superfamília de proteínas ligadoras de feromônios/odores gerais (PBP_GOBP; pfam01396). A estrutura secundária predita para a RproOBP17 consiste em seis α-hélices: α_1 (resíduos 6 ao 23), α_2 (27 ao 34), α_3 (42 ao 54), α_4 (66 ao 72), α_5 (75 ao 89) e α_6 (96 ao 110). A análise da sequência também mostrou alta probabilidade da presença de três pontes dissulfeto (PD) entre as posições Cys19-Cys50 (PD1), Cys46-Cys97 (PD2) e Cys88-Cys106 (PD3) (**Figura 11**).

5.4. EXPRESSÃO TECIDO-ESPECÍFICA DO *RPROOBP17* EM ESTADOS NUTRICIONAIS DISTINTOS

Um aspecto crucial para a sobrevivência de insetos hematófagos é a procura pelo hospedeiro vertebrado para refeições de sangue. No caso específico do *R. prolixus*, onde tanto fêmeas quanto machos se alimentam de sangue, é razoável levantar a hipótese de que a regulação da expressão gênica da OBP17 possa estar sob a pressão do estado nutricional do inseto. Este tipo de regulação já foi demonstrado em outros insetos hematófagos, onde os genes envolvidos na olfação são “ligados e desligados” de acordo com o estado nutricional do indivíduo.

Para testar a hipótese do gene *OBP17* sofrer regulação pela alimentação, seus transcritos foram quantificados em insetos em diferentes estados nutricionais. Assim, RNA de antenas de insetos adultos machos e fêmeas, alimentados e em jejum de 21 dias, foram utilizados na quantificação relativa do *RproOBP17* por qPCR (**Figura 12**).

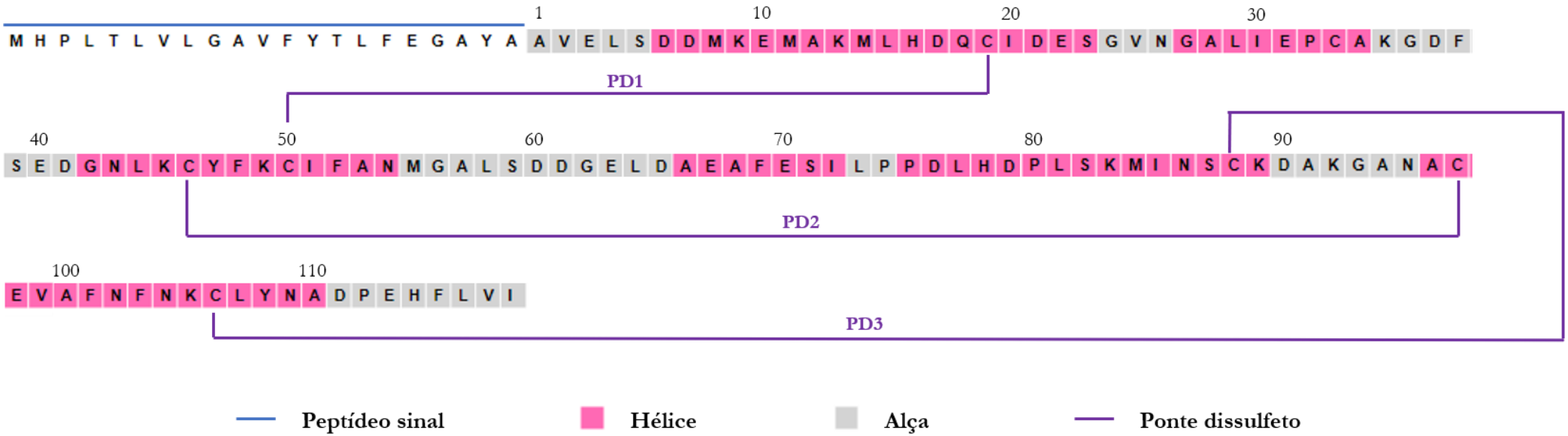


Figura 11 Análise da sequência da OBP 17 de *Rhodnius prolixus*. O peptídeo sinal predito pelo *SignalP 5.0 Server* possui 21 aminoácidos, sinalizados pela linha azul. A estrutura secundária encontrada pelo *PSIPRED 4.0* apresenta 6 α-hélices, representadas em rosa. A busca realizada com o servidor *DiANNA 1.1* prevê a presença de 3 pontes dissulfeto (PD1, PD2 e PD3), representadas em violeta.

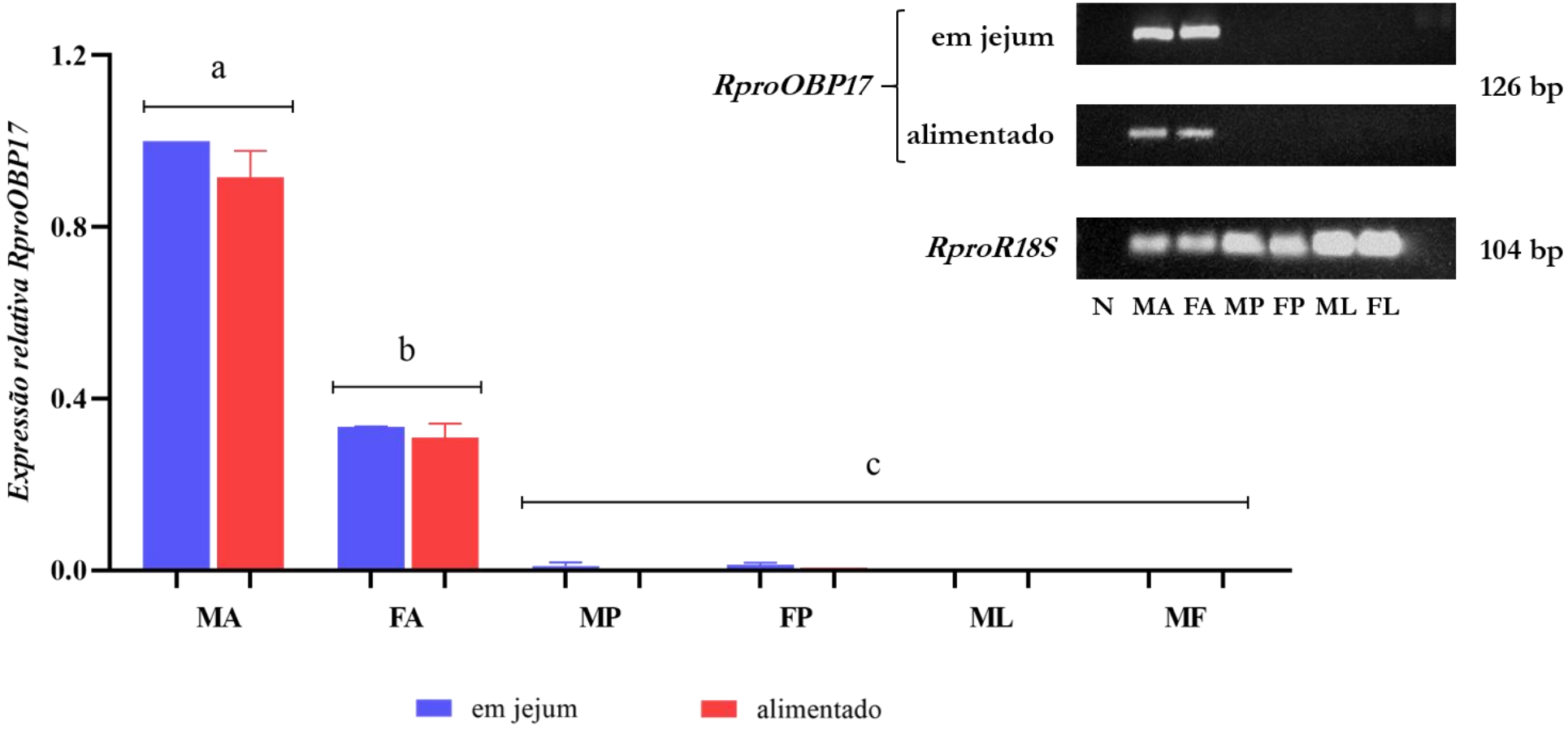


Figura 12 Perfil de expressão da OBP17 em *Rhodnius prolixus* em diferentes estados nutricionais. Os ensaios de qPCR foram realizandos utilizando cDNA de insetos adultos alimentados e em jejum por pelo menos 21 dias. Os valores de Ct obtidos foram normalizados em relação ao gene de referência *Rpro18S* e quantificados pelo método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os níveis de expressão do gene OBP17 são representados em relação ao valor obtido para a antena de macho em jejum (1,0). Os resultados estão apresentados na forma de média +/- desvio padrão para 3 determinações independentes. AM – antena de macho, AF – antena de fêmea, PM – probóscides de macho, PF – probóscides de fêmea, LM – patas de macho, LF – patas de fêmea. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando ANOVA, seguido de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (p<0,05). No destaque, gel de agorose 1% corado com GelRed. O gel *Rpro18S* mostrado refere-se ao cDNA do inseto alimentado, ilustrando o padrão de bandas obtido nos dois estados nutricionais.

A análise mostrou que o perfil de expressão da RproOBP17 não apresenta alteração significativa em ambas as condições avaliadas (insetos alimentados x insetos em jejum). A quantidade relativa do *OBP17* observada em antenas de macho e fêmea em jejum permanece a mesma que a dos insetos alimentados. Não há amplificação do transcrito em tecidos não olfativos (probóscides e patas) em nenhum dos estados nutricionais avaliados. A integridade do cDNA foi comprovada pela amplificação do gene de referência *RproR18S*. Como não houve diferença no perfil de expressão do gene RproOBP17 entre indivíduos alimentados e em jejum, esse resultado sugere que a RproOBP17 não está diretamente envolvida com a identificação e transporte de semioquímicos relacionados com a procura por fontes de alimento pelo inseto.

Como a expressão do gene RproOBP17 não está sob pressão do estado nutricional, levantou-se a hipótese de que a OBP17 poderia estar associada com reconhecimento e transporte de moléculas envolvidas em comportamentos de localização de abrigos, de reconhecimento sexual e/ou de fuga de ameaça iminente.

5.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA

Com o objetivo de investigar uma possível função para a OBP17 na fisiologia de *Rhodnius*, uma análise filogenética foi realizada utilizando OBPs de *Rhodnius* e proteínas homólogas de outros insetos cujas funções já eram conhecidas. O levantamento de OBPs homólogas foi realizado utilizando o programa *BLASTp*. Foram incluídas todas as proteínas anotadas como OBPs no genoma de *R.prolixus* (RproOBP1, RproOBP2, RproOBP3, RproOBP4, RproOBP6, RproOBP7, RproOBP8, RproOBP9, RproOBP10, RproOBP11, RproOBP12, RproOBP13, RproOBP14, RproOBP15, RproOBP16, RproOBP17, RproOBP18, RproOBP19, RproOBP20, RproOBP21, RproOBP22, RproOBP23, RproOBP24, RproOBP25, RproOBP26 , RproOBP27), OBPs dos insetos hemípteros *Acyrthosiphon pisum* (ApisOBP3), *Adelphocoris lineolatus* (AlinOBP1, AlinOBP2, AlinOBP4, AlinOBP5, AlinOBP8, AlinOBP9, AlinOBP10, AlinOBP11, AlinOBP13), *Apolygus lucorum* (AlucOBP24, AlucOBP38), *Bemisia tabaci* (BtabOBP4), *Lethocerus distinctifemur* (LedisVenomPOBP2), *Lygus lineolaris* (LylinLAP), *Megoura viciae* (MvicOBP3), *Nasonovia ribisnigri* (NribOBP3) e *Sogatella furcifera* (SfurOBP2, SfurOBP3), dos lepidópteros *Antheraea polyphemus* (ApolPBP1, ApolPBP2) e *Conogethes punctiferalis* (CpunOBP2), e dos dípteros *Anopheles gambiae* (AgamOBP47, AgamOBP48), *Ceratitis capitata* (CcapOBP83a-2), *Culex quinquefasciatus* (CquiOBP1, CquiOBP2, CquiOBP5, CquiOBP6) e *Drosophila melanogaster*

(DmelOBP76a_LUSH). Além disso, insetos da ordem Himenoptera (*Microplitis mediator* - MmedOBP1, MmedOBP6), Neuroptera (*Chrysopa pallens* - CpalPBP1, CpalOBP10, CpalOBP15) e Blattaria (*Leucophaea maderae* – LmadPBP) também foram incluídos na análise. As sequências primárias das proteínas usadas nesse estudo estão listadas no Material Suplementar. A árvore filogenética foi gerada usando o método *Maximum Likelihood* com 1000 repetições *bootstrap*.

A árvore construída (**Figura 13**) mostrou a formação de quatro *clusters* principais. Um grupo reuniu OBPs relacionadas com a detecção de voláteis de plantas e álcoois (MmedOBP1, MmedOBP6, AlinOBP5, SfurOBP2, CquiOBP6 e Dmel76a), incluindo a RproOBP6. Um ramo com OBPs associadas ao transporte de componentes de diferentes feromônios (CpalOBP10, AlinOBP4, LynLAP, CquiOBP5, CquiOBP2, CcapOBP3a-2, CquiOBP1), onde se agrupou a RproOBP17. Um grupo reunindo as proteínas transportadoras de heme (RproOBP9, RproOBP10 e RproOBP11). E o último ramo, exclusivo de *Rhodnius*, formado por 6 OBPs (RproOBP23, RproOBP13, RproOBP14, RproOBP22, RproOBP26 e RproOBP27).

A presença de um ramo exclusivo agrupando as OBPs de *R. prolixus* sugere que estas proteínas estejam envolvidas na identificação e transporte de semioquímicos relacionados especificamente a comportamentos nesse gênero. As demais RproOBPs foram distribuídas ao longo da árvore.

Um fato curioso foi que a RproOBP6 agrupou em um *cluster* de proteínas associadas ao transporte de voláteis de plantas (MmedOBP1, MmedOBP6, AlinOBP5 e SfurOBP2) e de compostos alcoólicos (Dmel76a e CquiOBP6). É interessante considerar que a capacidade de detectar voláteis de plantas possa existir em *Rhodnius*. Já foi demonstrado que o *R. prolixus* é capaz de se alimentar de frutos, comportamento que pode estar associado a compostos transportados por essa OBP.

A RproOBP17 foi agrupada com proteínas envolvidas na detecção de pistas feromonais de diferentes insetos (CquiOBP1, CquiOBP2, CquiOBP5, CcapOBP83a-2, LylinLAP, AlinOBP4 e CpalOBP10). Considerando este resultado, somado ao fato de que essa OBP é expressa tanto em machos quanto em fêmeas, é razoável considerar que a OBP17 possa estar envolvida na detecção de componentes feromonais que provocam uma resposta comportamental comum a ambos os sexos.

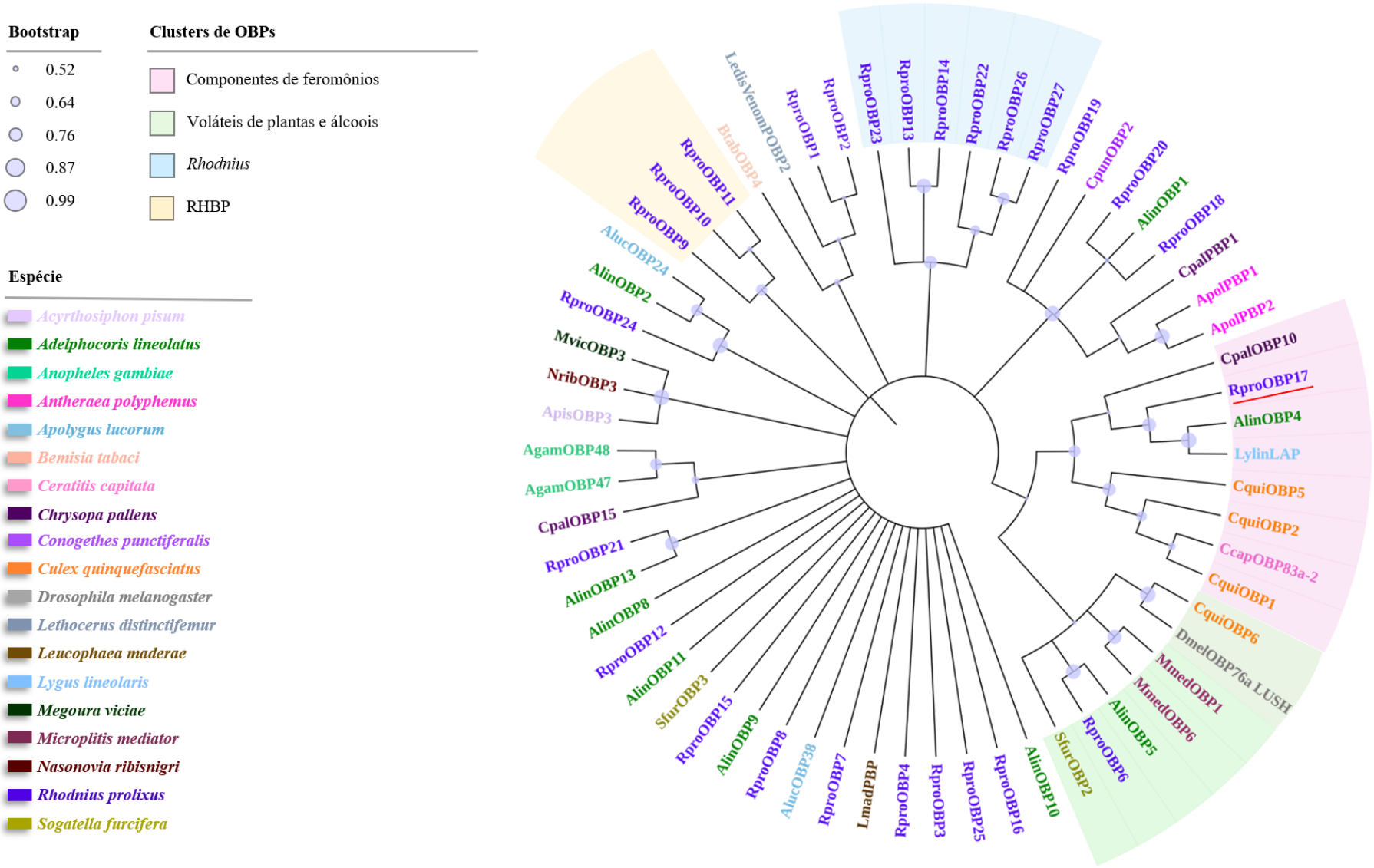


Figura 13 Análise filogenética de OBPs de insetos. A árvore foi construída utilizando o método maximum likelihood e a árvore consenso foi gerada a partir de 1000 repetições *bootstrap*. As análises foram realizadas utilizando o software *MEGA X*. A RproOBP17 está destacada pelo sublinhado em vermelho. Observa-se a formação de três clusters diferentes: OBPs associadas ao reconhecimento de feromônios, OBPs relacionadas à detecção de compostos voláteis, e um grupo de OBPs de *Rhodnius*.

5.6. SILENCIAMENTO DA RPROOBP17 POR RNA DE INTERFERÊNCIA

A técnica de RNAi foi utilizada para reduzir as quantidades relativas de RNAs do gene *OBP17* nas antenas de insetos machos. Os insetos tratados com dsRNA seriam usados em bioensaios para avaliar como a redução da expressão da proteína afetaria o comportamento dos indivíduos tratados, usando os insetos injetados com ds*β-gal* como controle. Os resultados que haviam sido obtidos até o momento indicavam que a RproOBP17 estaria envolvida na detecção de compostos que provocassem comportamentos comuns a ambos os sexos, que não a busca pela refeição sanguínea. A análise filogenética indicou que a proteína seria uma transportadora de compostos feromonais. Sendo assim, os ensaios comportamentais verificariam a capacidade dos insetos injetados com ds*OBP17* de detectarem indivíduos do sexo oposto e/ou indivíduos sob estresse. A princípio, esses dois testes seriam feitos para determinar a participação da proteína no reconhecimento de compostos envolvidos no reconhecimento sexual e de compostos associados ao comportamento de fuga e defesa que, em *Rhodnius*, seriam equivalentes ao feromônio sexual e ao de alarme, respectivamente.

Os níveis de transcritos foram avaliados por qPCR. O gene *R18S* foi utilizado como referência para calcular a expressão relativa. A análise dos resultados do qPCR mostrou uma redução significativa, na faixa dos 89 %, no nível de transcrição do gene *OBP17* nos insetos tratados com ds*OBP17*, em comparação aos níveis de transcritos no grupo controle (*fold* ds*β-gal* = 1,08; *fold* ds*OBP17*= 0,12) (**Figura 14**). Portanto, na linfa sensilar dos insetos tratados com ds*OBP17* existiria uma menor quantidade de proteína madura circulante.

Devido as restrições impostas pela pandemia por covid 19, os bioensaios foram substituídos por análises *in silico* com objetivo de obter informações funcionais a partir de características estruturais.

5.7. IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS REPETIDOS

Para obter mais informações sobre a RproOBP17, uma busca por motivos repetidos foi realizada utilizando o servidor *MEME Suite*. Foram incluídas as sequências RproOBP17 e OBPs de outros insetos com informações estruturais já elucidadas, tais como *A. aegypti* (AaegOBP1; AaegOBP22), *A. gambiae* (AgamOBP1; AgamOBP4; AgamOBP7; AgamOBP20; AgamOBP47; AgamOBP48), *Apis mellifera* (AmelASP1¸AmelASP2; AmelOBP14), *Amyelois transitella* (AtraPBP1), *Bombyx mori* (BmorGOBP2; BmorPBP), *Chrysopa pallens* (CpalOBP4), *Culex quinquefasciatus* (CquiOBP1), *Drosophila melanogaster*

(DmelOBP76a), *Leucophaea maderae* (LmadOBP1), *Locusta migratoria* (LmigOBP1), *Megoura viciae* (MvicOBP3) e *Nasonovia ribisgrini* (NribOBP3). As sequências primárias das proteínas utilizadas nessa análise estão descritas no Material Suplementar.

O programa *MEME Suite* identificou os 10 motivos repetidos estatisticamente mais significativos entre as OBPs analisadas (**Figura 15**). O motivo 1 (KCYMKCLFEKAGLLD) foi encontrado em todas as proteínas avaliadas. Apenas 2 OBPs (AgamOBP47, AgamOBP48) não apresentaram o motivo 2 (BKCEKAYNLAKCLK), que também parece ser recorrente em OBPs. O motivo 3 foi observado em 9 proteínas (AgamOBP1, AaegOBP1, CquiOBP1, CpalOBP4, RproOBP17, AgamOBP7, AgamOBP20, DmelOBP76a, AgamOBP4) e parece ser um motivo mais comumente encontrado em dípteros. O motivo 4 foi encontrado em 4 OBPs (AgamOBP1, AaegOBP1, CquiOBP1, Dmel76a), sendo observado, nessa análise, exclusivamente em dípteros. Somente 3 proteínas (AgamOBP1, AaegOBP1, CquiOBP1) apresentaram o motivo 5. Aliás, essas 3 OBPs compartilham o mesmo padrão de motivos conservados, o que pode estar relacionado a uma função comum entre essas espécies. Já o motivo 6 foi compartilhado por 4 proteínas (AgamOBP1, AaegOBP1, CquiOBP1, BmorGOBP2), sugerindo que ele pode ocorrer em OBPs de dípteros e lepidópteros. O motivo 7 foi identificado apenas em duas OBPs (AgamOBP7, AaegOBP22), podendo estar associado a uma função em comum. O motivo 8 foi encontrado em OBPs de insetos de diferentes ordens (AgamOBP1, AaegOBP1, CquiOBP1, CpalOBP4, RproOBP4, LmigOBP1), sempre na região C-terminal.

Apenas 2 OBPs (NribOBP3, MvicOBP3) apresentaram o motivo 9. Essas proteínas apresentam padrões de motivos conservados iguais, o que pode indicar uma função fisiológica semelhante. Por fim, o motivo 10 foi encontrado apenas em 2 OBPs de *A. gambiae*, na região C-terminal. Essa análise revelou que a RproOBP17 apresenta o mesmo padrão de motivos que a OBP4 de *Chrysopa pallens*.

As sequências da RproOBP17 e CpalOBP4 possuem 36 % de identidade, o que provavelmente explica porque ela não foi encontrada anteriormente como proteína homóloga para a construção da árvore filogenética. Além das 6 cisteínas esperadas (C19, C46, C50, C88, C97 e C106), as sequências apresentaram outros 32 aminoácidos conservados (M8, A132, V25, I30, K35, G36, F38, D41, Y47, I51, M55, G63, L65, A68, E70, L76, P77, K86, I88, K92, A94, E101, A103, N105, F106, L110, Y111, P115, E116, F119, L120) , a maioria no interior dos motivos encontrados. Padrões de aminoácidos em posições conservadas entre proteínas da mesma classe podem refletir similaridade no enovelamento para a formação do sítio ativo.

Sendo assim, características estruturais relacionadas aos motivos conservados entre RproOBP17 e CpalOBP4 foram investigadas na etapa seguinte.

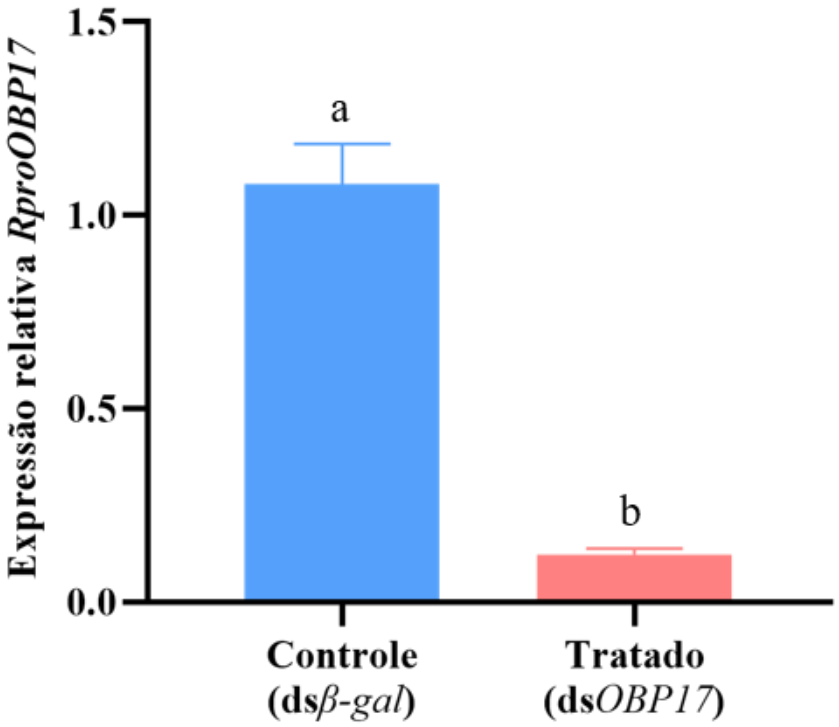


Figura 14 Expressão relativa de transcritos do gene RproOBP17 em antenas de *R. prolixus* machos adultos, tratados com dsRNA. Os insetos foram injetados com o controle dsβ-gal (gene não relacionado) ou com dsOBP17. O gene RproR18S foi utilizado como gene de referência. Os níveis de expressão relativa de transcritos foram comparados com dsβ-gal. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando ANOVA, seguido de teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$).

(a)

Motivo	Logo	*E*-value	Sequência
1		5,7e-46	KCYMKCLFEKAGLLD
2		2,3e-36	BKCEKAYNLAKCLK
3		4,8e-16	MLREICPKTGVTEE
4		4,0e-14	VTPRRDAEYPPPEFL
5		4,9e-14	SMHDIALHMGKRCLY
6		3,6e-09	YIIEFSDGKIH
7		3,6e-07	DTGHVHLEKLHDALP
8		1,5e-05	SDPKHYFL
9		2,1e-05	RFTTEQIDYYGKACN
10		1,4e-03	ICHPISGTILRCMGM

(b)

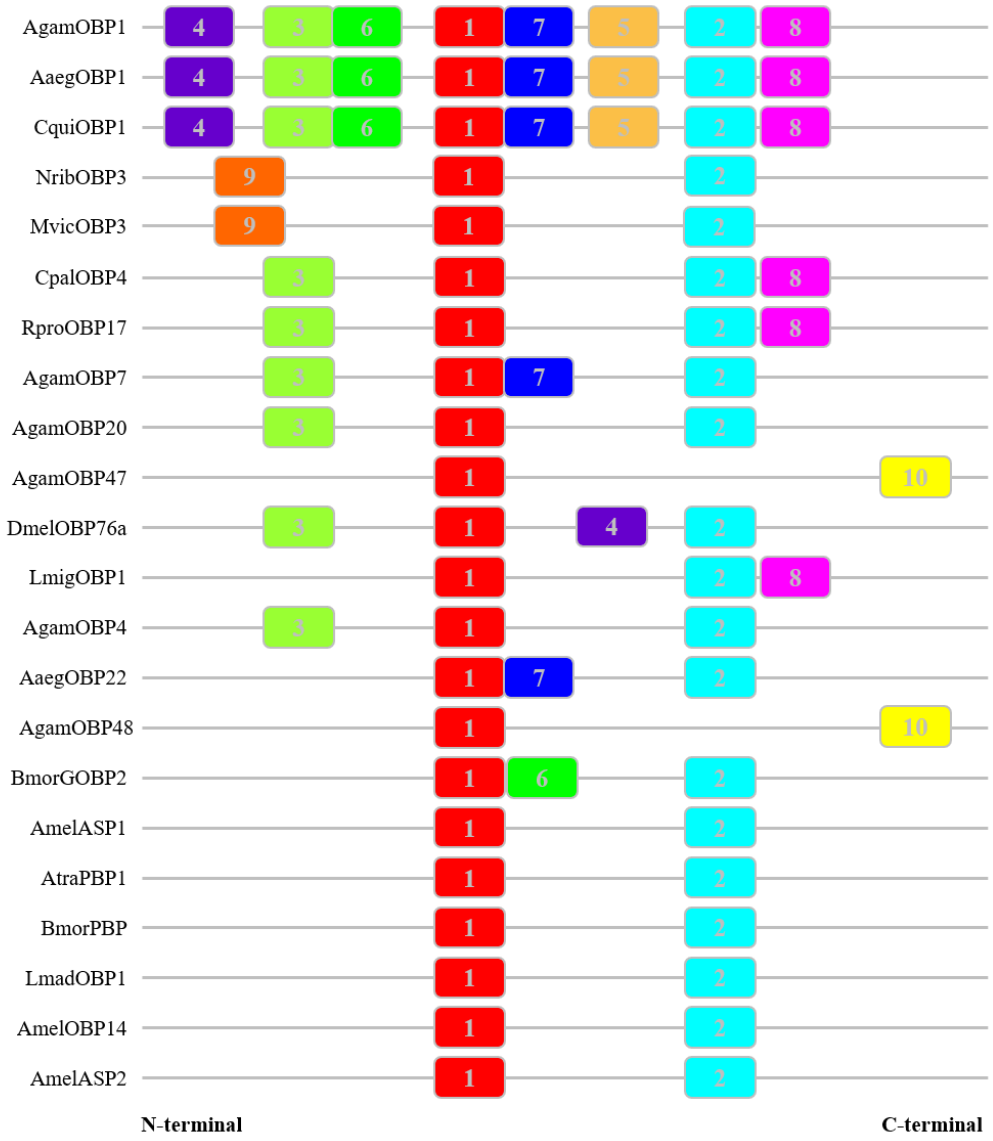


Figura 15 - Motivos convervados em OBPs de insetos. (a) Os 10 motivos conservados com maior significância estatística foram determinados pelo *software MEME Suite*.Os blocos coloridos representam o número de cada motivo encontrado. O logo apresenta aminoácidos empilhados em cada posição da proteína. Pilhas altas indicam maior conservação da sequência na posição correspondente, e a altura de cada símbolo na pilha indica a frequência relativa de cada aminoácido naquela posição. O *E*-value indica o quanto cada motivo é estatisticamente significativo, números menores indicam maior significância. **(b)** Localização relativa de cada motivo nas sequências analisadas. Os blocos coloridos correspondem aos motivos em **(a)**.

5.8. CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL DA RPROOBP17

Em tese, a sequência primária de uma proteína possui toda a informação necessária para determinar sua estrutura tridimensional, o que então determina sua função bioquímica. Em busca de similaridades estruturais com a CpalOBP4 que pudessem trazer mais informações a respeito da possível função da proteína de interesse, um modelo tridimensional da RproOBP17 foi construído utilizando o servidor *Phyre2* e validado pelos programas *PROCHECK* e *Verify3D*.

Os 5 modelos mais prováveis encontrados pelo *Phyre2* incluíram a OBP1 de *Locusta migratoria* (PDB#4PT1; confiança (C) = 100,0; % id = 29), OBP4 de *C. pallens* (PDB#6JPM; C = 99,9; % id = 34), OBP1 de *A. gambiae* (PDB#2ERB; C = 100,00; % id = 31), OBP5 de *Apis mellifera* (PDB#3R72; C = 99,9; % id = 22) e OBP56a de *Phormia regina* (PDB#5DIC; C = 99,9; % id = 22). Os modelos teóricos foram testados e o que melhor satisfez os critérios exigidos pelo *PROCHECK* e *Verify 3D* (Material suplementar) para a validação de um bom modelo foi obtido utilizando a estrutura cristalina da OBP1 de *A. gambiae* (AgamOBP1, PDB#2ERB). O melhor modelo tridimensional construído para a RproOBP17 apresenta o padrão esperado de seis regiões de α-hélice conectadas por três pontes dissulfeto formadas por cisteínas conservadas. A observação da superfície da proteína revelou uma cavidade de ligação (**Figura 16**).

O programa *MEME Suite*, utilizado na etapa anterior, forneceu as sequências de aminoácidos que estão incluídas nos modelos encontrados. A comparação entre o modelo construído para a RproOBP17 (**Figura 17a**) e a estrutura da CpalOBP4 determinada por cristalografia de raios-X (PDB#6JPM) (**Figura 17b**) revelou que os motivos conservados entre essas duas proteínas ocupam posições muito próximas no enovelamento tridimensional (**Figura 17c**). Aminoácidos conservados entre duas proteínas que se enovelam de forma análoga no espaço tridimensional podem indicar sítios de ligação similares, o que, por sua vez, sugeriria afinidade por ligantes com grupamentos funcionais semelhantes. De acordo com a literatura, estudos de ligação envolvendo a CpalOBP4 demonstraram a existência de alta afinidade pelos ligantes farneseno, hexanoato de 3-cis-hexenila, nerolidol e farnesol (LI *et al.*, 2019). Considerando as informações obtidas até o momento, estudos de *docking* molecular foram realizados com dois propósitos: (1) verificar se a RproOBP17 apresenta afinidade por ligantes com grupamentos químicos semelhantes aos observados para a CpalOBP14, e (2) buscar mais

informações funcionais sobre esta OBP de acordo com a afinidade observada por diferentes compostos já descritos como comportamentalmente ativos para triatomíneos.

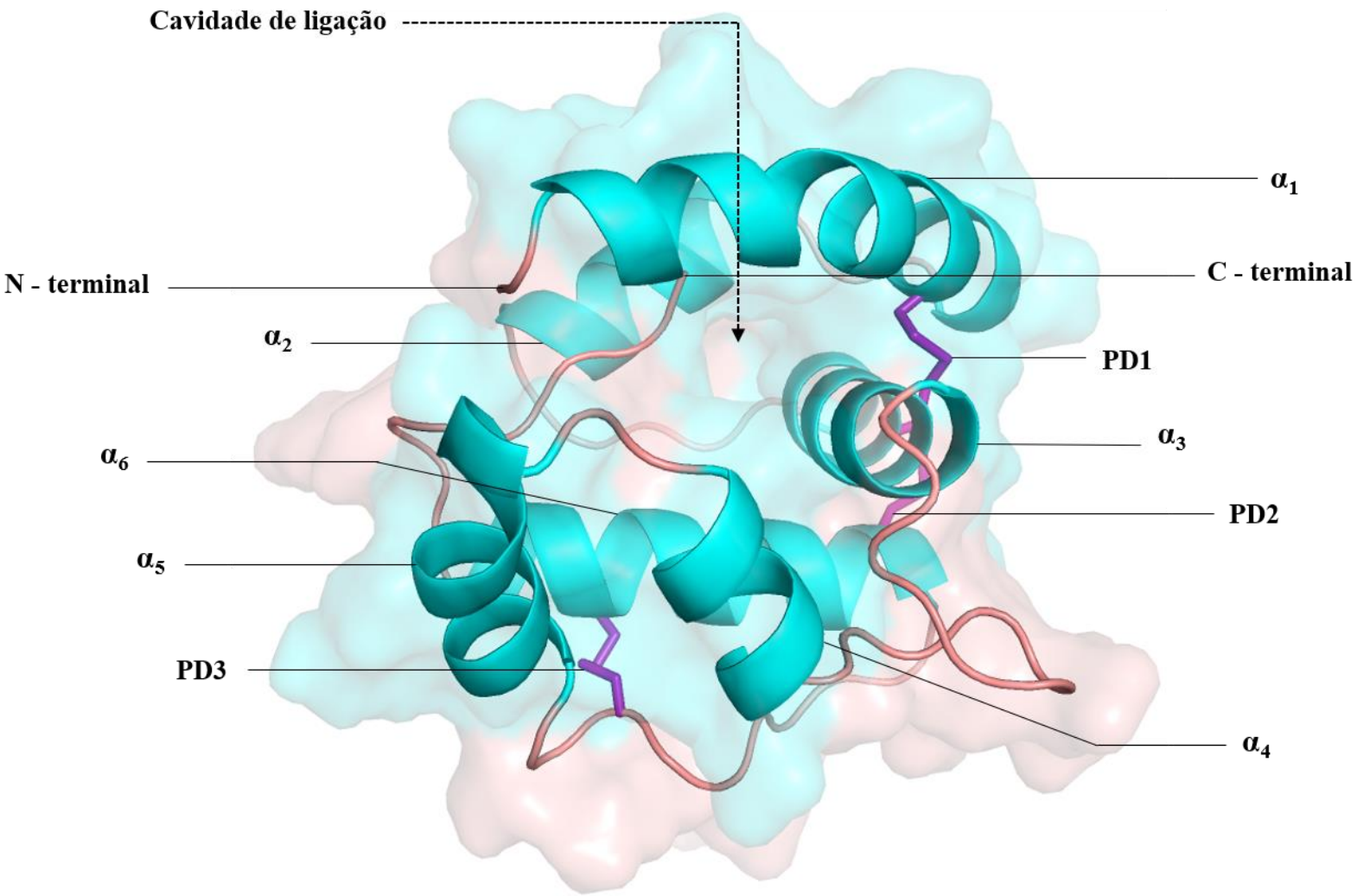


Figura 16 Modelo tridimensional da RproOBP17. A estrutura foi predita utilizando o servidor *online Phyre2*. Hélices são representadas em azul, loops e rosa e pontes dissulfeto estão destacadas em violeta. A cavidade de ligação é observada na superfície construída para a proteína. As ilustrações foram elaborad através do programa *PYMOL*.

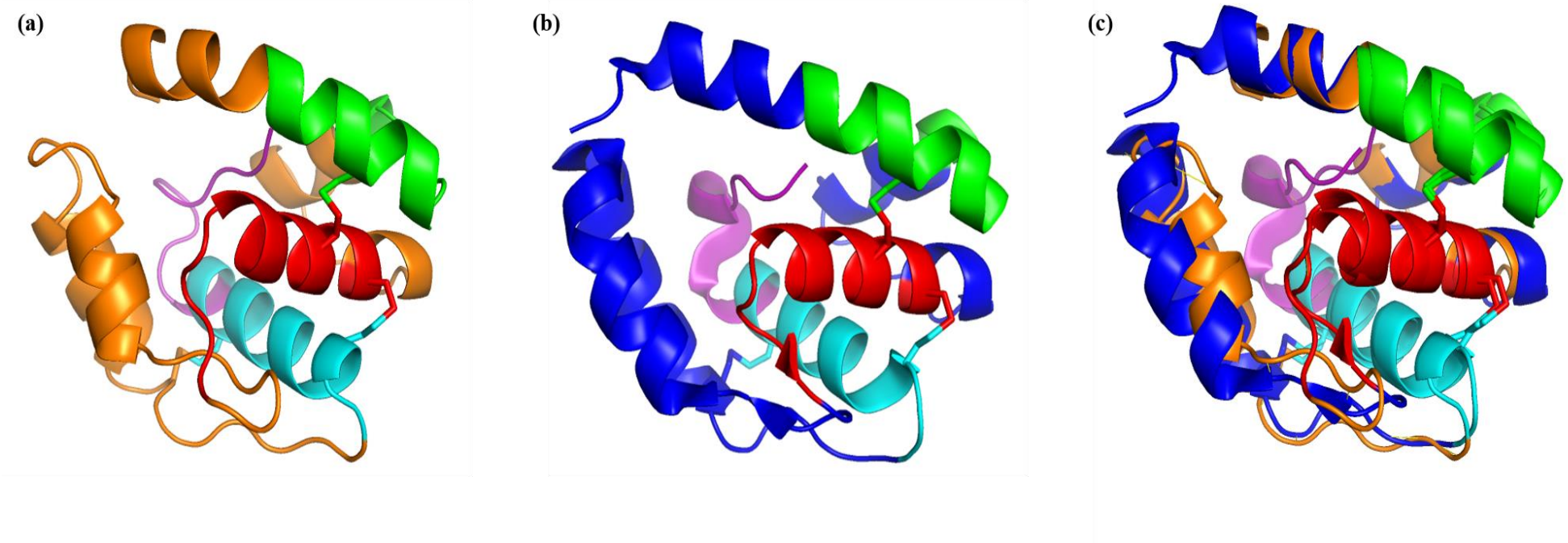


Figura 17 Localização espacial dos motivos conservados entre as OBPs 17 de *R. prolixus* e 4 de *C. pallens*. (a) O modelo tridimensional da RproOBP17, em laranja, e **(b)** a estrutura cristalina da CpalOBP4, em azul, foram preparados utilizando o programa *PYMOL*. Os motivos conservados estão destacados de acordo com a cor designada para cada um, mostradas na **Figura 14**, motivo 1 – vermelho, motivo 2 – ciano, motivo 3 – verde, motivo 4 - rosa . **(c)** Sobreposição da RproOBP17 e CpalOBP4. Os motivos repetidos apresentam posições semelhantes no espaço tridimensional.

5.9. ANÁLISE *IN SILICO* DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO POR COMPOSTOS FISIOLOGICAMENTE RELEVANTES

A análise filogenética indicou que a RproOBP17 poderia ter a função de transportar componentes de feromônios. Já a análise por analogia estrutural mostrou que a OBP17 pode apresentar afinidade por ligantes com grupamentos químicos similares aos reportados para a CpalOBP4. Buscando obter o máximo de informação a respeito da função da RproOBP17 *in silico*, o modelo construído para esta proteína foi utilizado em estudos de *docking* molecular contra compostos equivalentes a componentes de feromônios em triatomíneos. Foi demonstrado que os voláteis emitidos pela glândula metasternal (GM) de *R. prolixus* estão relacionados ao comportamento sexual do inseto (PONTES et al., 2008; PONTES; LORENZO, 2012). Já os compostos que provocam respostas comportamentais de fuga parecem ser emitidos pela glândula de Brindley (GB) (MANRIQUE *et al.*, 2006).

Termodinamicamente, os ligantes se acoplam fortemente ao sítio ativo de uma proteína quando a energia livre de ligação (ΔG) do processo é baixa. Esse parâmetro foi usado para estimar as afinidades de ligação de compostos fisiologicamente relevantes (DU *et al.*, 2016) à RproOBP17 com os programas *Chimera* e *Autodock Vina* (**Tabela 2**).

Os valores negativos obtidos sugeriram interações mais favoráveis com os ligantes 2-metilpropanoato de 2-feniletila (ΔG = -6,0 Kcal/mol), 2-feniletanol (ΔG = -5,4 Kcal/mol) e 2-metilpropanoato de 2-metilpropila (ΔG = -5,0 Kcal/mol) (**Figura 18**). É interessante notar que estes compostos com maior afinidade à RproOBP17 realmente apresentaram grupamentos éster e álcool, como foi sugerido anteriormente pela analogia estrutural com a CpalOBP4 (**Figura 17**). A análise dos complexos RproOBP17•ligante, realizada através do programa *BIOVIA Discovery Studio Visualizer*, revelou que os ligantes mais favoráveis interagem com a OBP17 através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O resultado sugere que os resíduos I48, F49, V114 e I115 façam parte do sítio de ligação da RproOBP17, uma vez que estão envolvidos nas interações com diferentes ligantes (**Figura 18**).

Tabela 2 Energia de ligação da RproOBP17 com componentes de feromônios em triatomíneos. A energia livre de ligação foi calculada em estudos de *docking* molecular utilizando *Chimera* e *Autodock Vina*.

Glândula metaesternal	ΔG (Kcal/mol)	Glândula de Brindley	ΔG(Kcal/mol)
(2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol	-4,3	2-metilpropanoato de 2-feniletila	-6,0
2-metil-3-buten-2-ol	-4,1	2-feniletanol	-5,4
3-metil-2-butanol	-4,1	2-metilpropanoato de 2-metilpropila	-5,0
2-pentanona	-4,0	2-metilpropanoato de pentila	-4,8
(S)-2-pentenol	-3,9	propanoato de 2-metilpropila	-4,7
2-metil-butan-1-ol	-3,9	ácido 2-metilbutírico	-4,4
3-pentanol	-3,9	ácido hexanoico	-4,4
(S)-2-butanol	-3,6	3-metil-3-buten-1-ol	-4,1
2-butanona	-3,5	3-metilbutan-1-ol	-4,0
		ácido isobutírico	-4,0
		2-metilbutan-1-ol	-3,9
		3-pentanona	-3,9
		ácido butírico	-3,9
		2-metilpropan-1-ol	-3,6
		2-butanona	-3,5
		ácido propanoico	-3,4
		ácido acético	-2,8

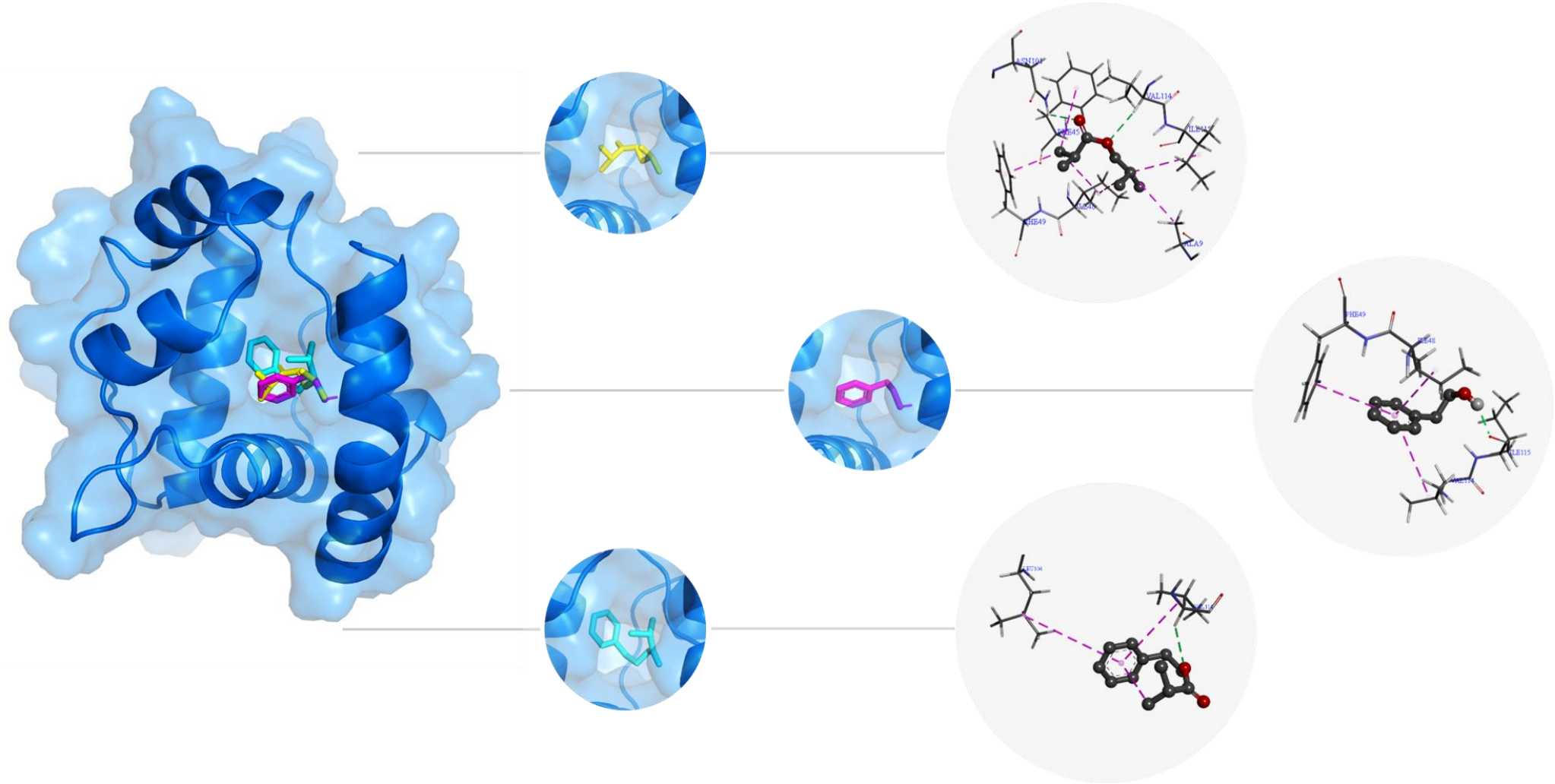


Figura 18 Resíduos envolvidos na interação entre a RproOBP17 e ligantes fisiológicos. O composto 2-metilpropanoato de 2-feniletila está representado em ciano, 2-feniletanol em magenta e 2-metilpropanoato de 2-metilpropila em amarelo. Ligações de hidrogênio estão indicadas em verde e interações hidrofóbicas em violeta. Os ensaios de *docking* foram realizados utilizando os programas *Chimera* e *Autodock Vina*. As interações foram preditas com o *software* BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*. As ilustrações foram elaboradas com o *PYMOL*.

5.10. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA RPROOBP17 RECOMBINANTE

De acordo com os resultados iniciais de qPCR (**Figura 10**), a RproOBP17 foi escolhida para ser utilizada em estudos de ecologia química reversa com o objetivo de encontrar novos compostos atrativos/repelentes para *R. prolixus*. Sendo assim, a elaboração de protocolos adequados para a expressão heteróloga em *E. coli* e purificação da proteína recombinante é primordial.

Inicialmente, a sequência codificante da RproOBP17 foi amplificada por PCR, ligada em vetor pGEM T Easy e cepas DH5-alfa de *E. coli* foram transformadas com o DNA recombinante. Os clones positivos foram identificados por PCR de colônia e purificados (*miniprep*).O sequenciamento do DNA plasmidial dos clones positivos confirmou a existência de insertos contendo a região codificante da OBP17 de *Rhodnius*, além dos sítios de restrição inseridos nas extremidades pelo uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos.

Como OBPs são proteínas que possuem pontes dissulfeto, é preciso fornecer um ambiente menos redutor que o do citoplasma para que estas sejam formadas. Os clones positivos foram então subclonados em vetor pET22b(+) (**Figura 19**), que possui o peptídeo sinal pelB de endereçamento ao periplasma.

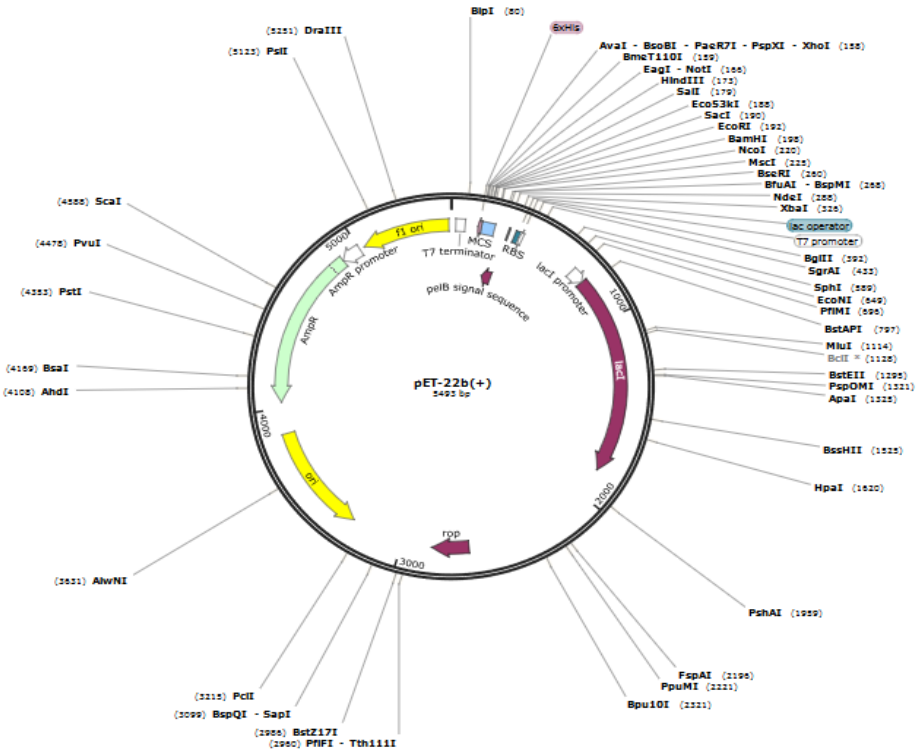


Figura 19 Vetor de expressão pET22b(+). O plasmídeo possui o peptídeo sinal pelB de endereçamento da expressão para o periplasma.

Com o objetivo de desenvolver um protocolo otimizado, a expressão heteróloga foi testada em diferentes condições de temperatura, concentração de IPTG e densidade ótica em 600 nm (DO_{600}) (**Tabela 3**). Após a indução durante 3 h, amostras dos extratos celulares brutos foram submetidas à SDS-PAGE e coradas com Comassie G-250 para a avaliação das bandas na região de 12,8 kDa, esperada para a RproOBP17 (**Figura 20**).

Tabela 3 Condições de expressão testadas. Um total de nove condições de temperatura, DO_{600} e [IPTG] foram testadas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Condição	DO_{600}	T (ºC)	[IPTG] (mM)
1	>1	37	1
2	0,3	37	1
3	>1	18	1
4	0,3	18	1
5	>1	37	0,1
6	0,3	37	0,1
7	>1	18	0,1
8	0,3	18	0,1
9	0,6	28	0,5

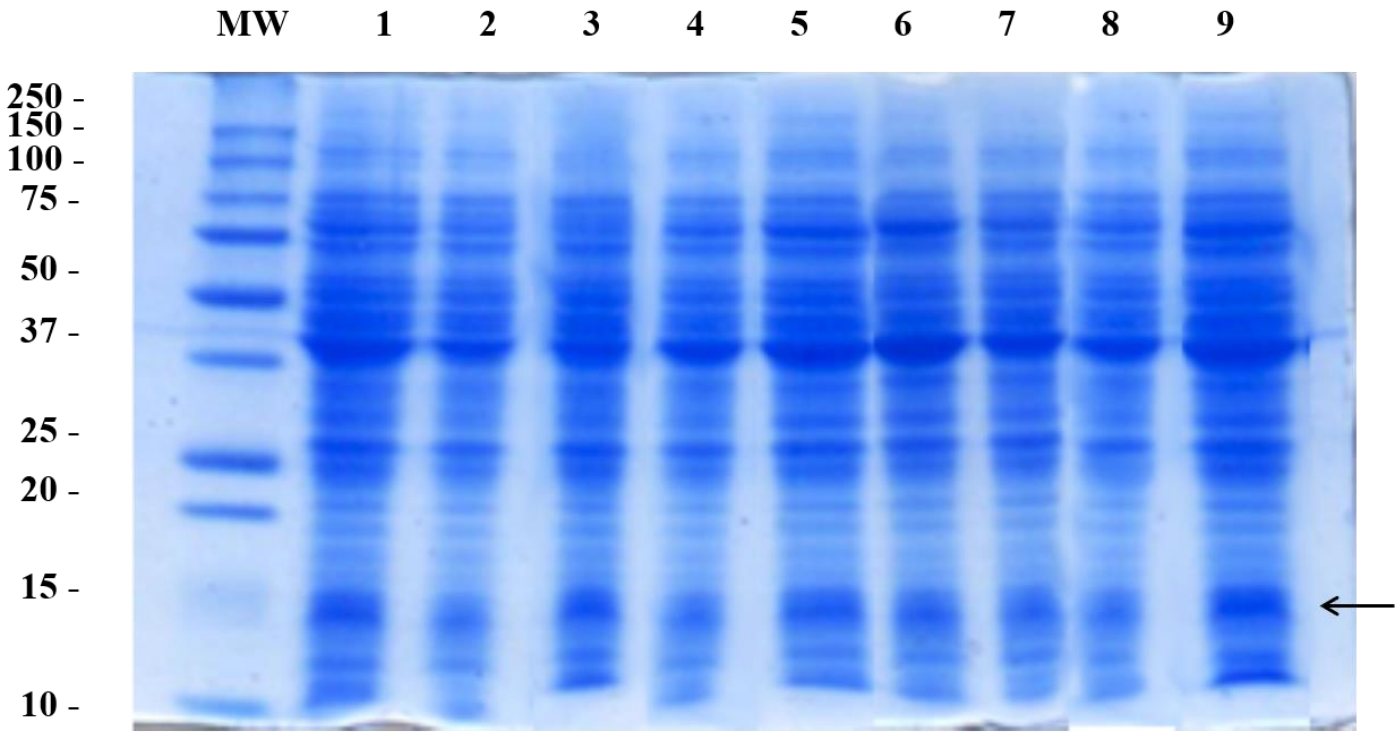


Figura 20 Gel de SDS-PAGE de diferentes condições de expressão. A expressão heteróloga da RproOBP17 foi testada em combinações diferentes de temperatura, densidade ótica e concentração de IPTG. Poço MW: padrão de peso molecular. Poços 1-9: referem-se às condições descritas na **Tabela 3**. As amostras aplicadas no gel consistiam em extratos celulares brutos após o tempo de indução (3h) e as bandas foram coradas com Comassie G-250. A seta indica as regiões de peso molecular esperadas para a OBP17 (12,8 kDa).

As condições 2, 4, 5, 6, 7 e 8 apresentaram resultados pouco satisfatórios, evidenciados pelas bandas de baixa intensidade observadas na região de 12,8 kDa. Por outro lado, os experimentos 1, 3 e 9 mostraram bandas similares, de maior intensidade que as condições anteriores. Sendo assim, utilizou-se a concentração de IPTG como parâmetro para a escolha da condição, uma vez que se trata de um reagente de alto custo. Dentre elas, a condição que utiliza a menor concentração. Logo, a condição 9 (DO_{600} = 0,6; T = 28 ºC; [IPTG] 0,5 μM) foi escolhida para a realização da expressão heteróloga da RproOBP17 no periplasma de *E. coli*. A fração periplasmática foi extraída após 3 ciclos de *freeze and thaw*, com o *pellet* celular sendo ressuspendido em 30 mL de Tris-HCl 10 mM pH 6,5 para cada 500 mL de cultura coletada, e centrifugada para a remoção de *debris* celulares.

Este estudo desenvolveu um protocolo de purificação para a RproOBP17 recombinante composto por 3 etapas, duas de troca iônica e uma de gel filtração. A primeira etapa consistiu em uma troca iônica fraca realizada na coluna Hiprep DEAE FF 16/10, em gradiente de 0-500 mM de NaCl em Tris-HCl 20 mM pH 8, durante 40 min, seguida por gradiente 500 mM 1M de NaCl por 20 min, em fluxo de 2 mL/min. Em seguida, o cromatograma foi construído com auxílio do programa *GraphPad* e os picos encontrados foram mapeados por SDS-PAGE 12 % (**Figura 21**).

Após a primeira troca iônica, as frações 16, 17, 18 e 19 (**Figura 21**) foram agrupadas, o *pool* de frações foi diluído em 10 vezes, e então encaminhado para a segunda etapa de purificação. Essa segunda etapa envolveu a realização de uma troca iônica forte usando a coluna Mono Q 10/100 GL. O gradiente utilizado foi de 0-500 mM de NaCl em Tris-HCl 20 mM pH 6,5, durante 45 min, seguido por *steps* de 5 min em 1,0 M e 1,5 M, a 3 mL/min (**Figura 22**).

A região de massa molecular esperada para a OBP17 foi observada nas frações 32, 33, 34, 35 e 36. Elas foram reunidas, a amostra foi concentrada em *Centriprep-3* e em seguida, submetida à gel filtração em coluna HiLoad 16/600 Superdex 75. A coluna utilizada nessa terceira e última etapa de purificação foi pré-equilibrada com NaCl 150 mM em Tris-HCl 20 mM pH 6,5. A eluição foi realizada em coluna de 120 mL, com fluxo de 1 mL/min (**Figura 23**).

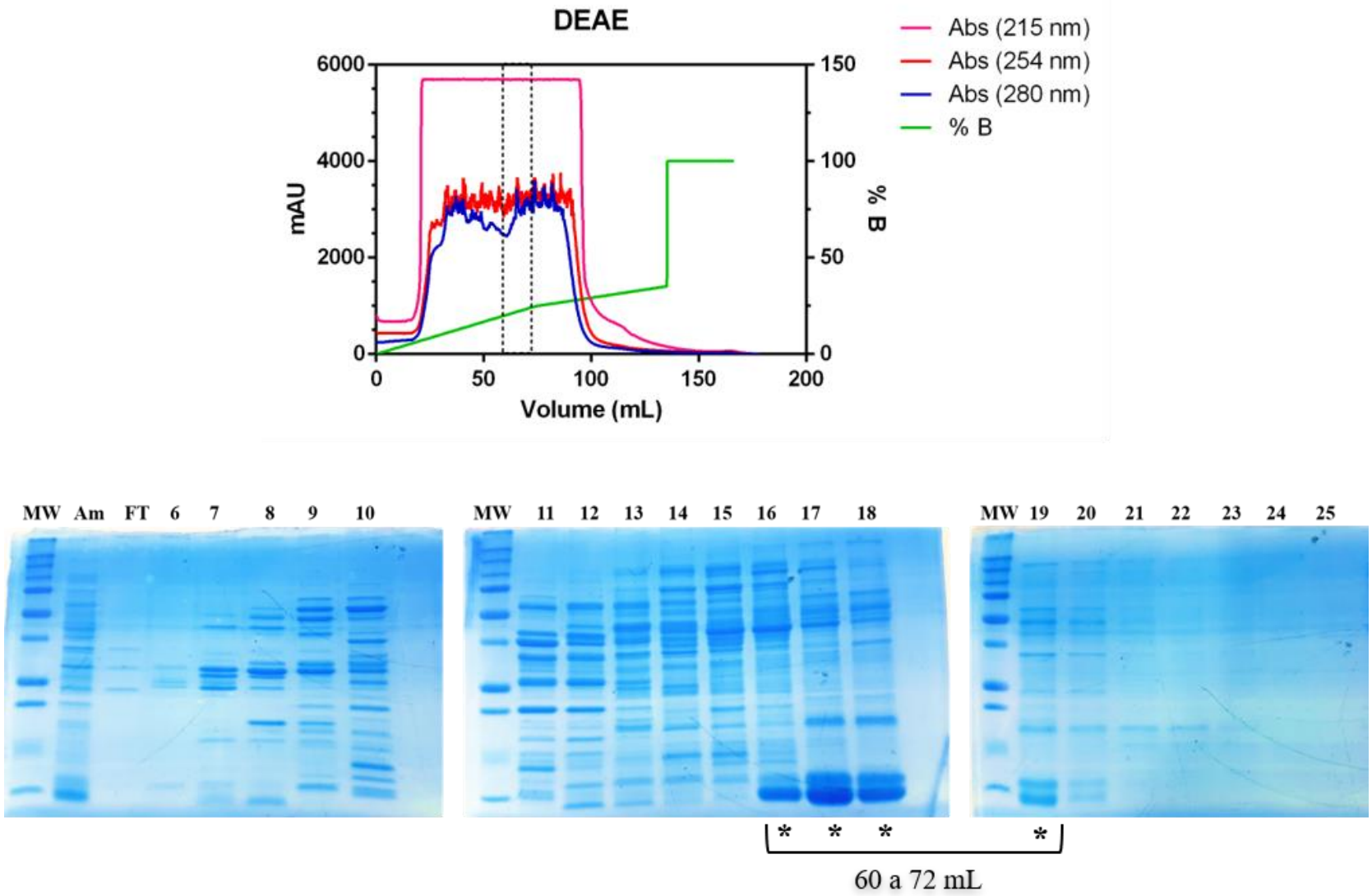


Figura 21 Cromatograma e mapeamento das frações obtidas após a primeira etapa de purificação em Hiprep DEAE FF 16/10. No cromatograma, observa-se as absorvâncias obtidas em 215 nm, 254 nm e 280 nm, além do aumento da porcentagem de B, formando o gradiente. A purificação foi realizada em gradiente de 0-500 mM de NaCl em Tris-HCl 20 mM durante 40 min, seguida por gradiente 500mM-1M de NaCl por 20 min, em fluxo de 2 mL/min. O step de 2M de NaCl foi realizado para fazer a lavagem final por 3 volumes de coluna. As frações foram coletadas em 4 mL/Fr e mapeadas por SDS-PAGE 12 %. Am – amostra; FT – *flow through*. O asterisco indica fração de interesse.

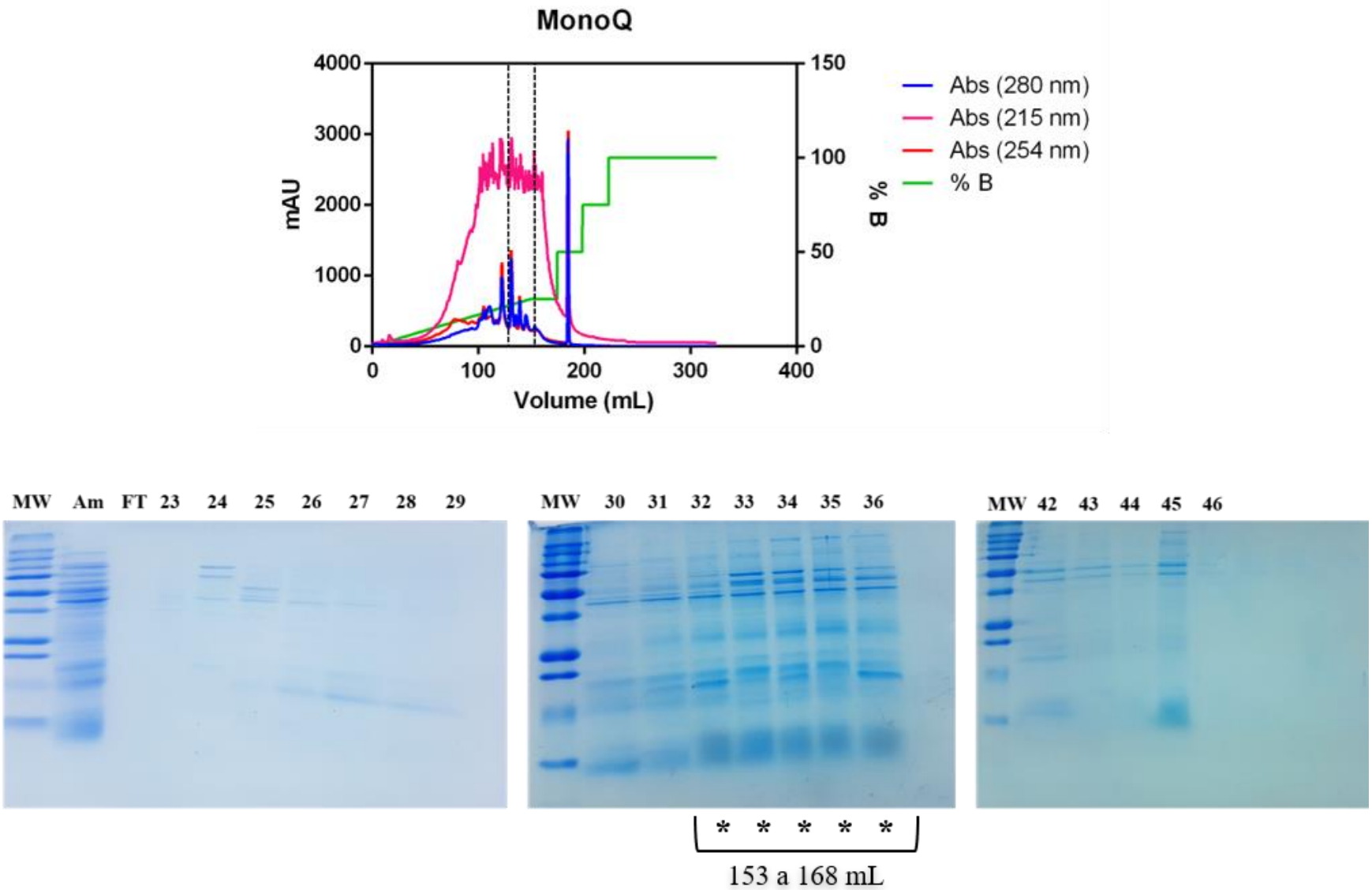
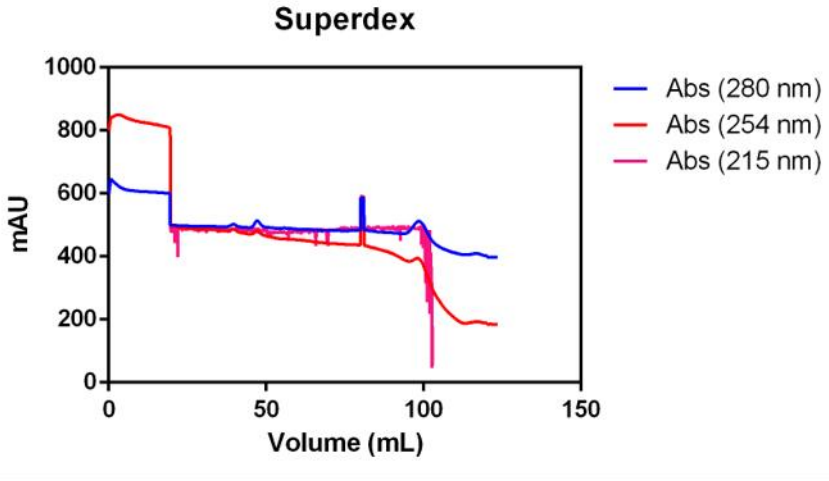


Figura 22 Cromatograma e mapeamento das frações obtidas após a segunda etapa de purificação em Mono Q 10/100 GL. No cromatograma, observa-se as absorvâncias obtidas em 215 nm, 254 nm e 280 nm, além do aumento da porcentagem de B, formando o gradiente. A purificação foi realizada em gradiente de 0-500 mM de NaCl em Tris-HCl 20 mM, durante 45 min, seguida por steps de 5 min de 1,0 M e 1,5 M, a 3 mL/min, e de 2M para a lavagem final por 3 volumes de coluna.As frações foram coletadas em 5 mL/Fr e mapeadas por SDS-PAGE 12 %. Am – amostra; FT – *flow through*.O asterisco indica as frações de interesse.



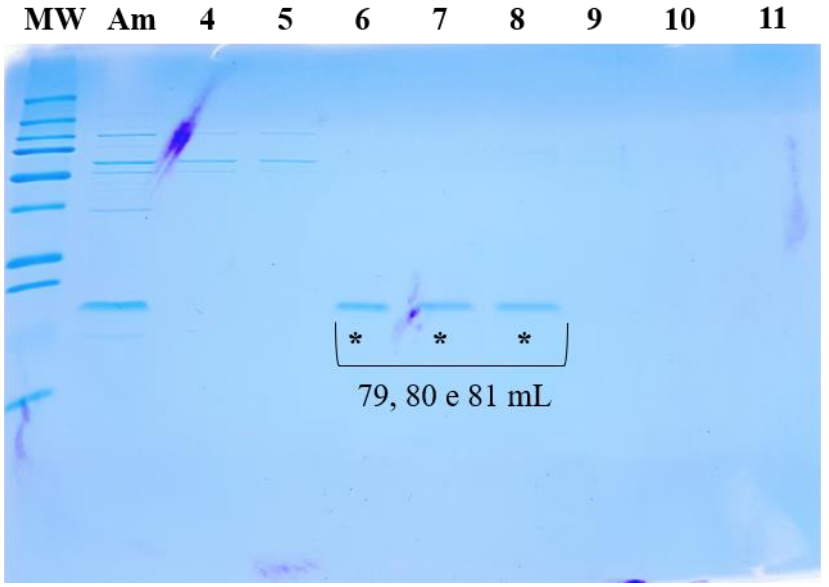


Figura 23 Cromatograma e mapeamento das frações obtidas após a terceira etapa de purificação em Superdex-75. No cromatograma observa-se as absorvâncias obtidas em 215 nm, 254 nm e 280 nm. A purificação foi realizada em tampão NaCl 150 mM em Tris-HCl, durante 120 min. As frações (numeradas) foram coletadas em 1 mL/Fr e mapeadas SDS-PAGE 12 %. Am – amostra. O asterisco indica fração de interesse.

O volume de eluição (V_E) de uma proteína em uma coluna de gel filtração é proporcional ao log de sua massa molecular. Dessa forma, uma curva de calibração foi construída utilizando V_Es de proteínas de massa conhecida (**Tabela 4**). Através de um *fit* linear no gráfico logMW versus V_E (**Figura 24**), a equação da reta foi obtida e utilizada para estimar a massa molecular da RproOBP17.

Tabela 4 Proteínas da curva de calibração. Massa molecular de proteínas padrão e seus respectivos volumes de eluição em HiLoad 16/600 Superdex.

Proteína	Massa (kDa)	logMW	Eluição (mL)
Aprotinina	6,5	0,81	93,42
Ribonuclease A	13,7	1,13	78,07
Anidrase Carbônica	29	1,46	66,67
Ovoalbumina	44	1,64	57,6
Conalbumina	75	1,87	52,64

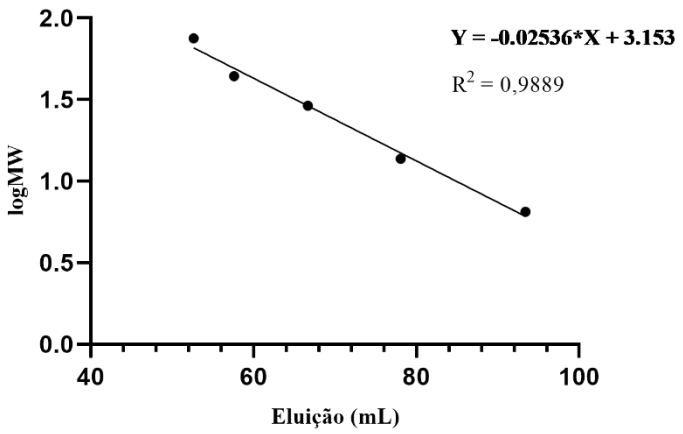


Figura 24 Curva de calibração. A equação da reta é utilizada para estimar a MW de proteínas eluídas na coluna HiLoad 16/600 Superdex.

Sendo assim, o valor de eluição da RproOBP17 na coluna (79 mL, volume no qual ela começou a eluir) indicam uma massa molecular de 12,5 kDa, valor bem próximo ao esperado de 12,7 kDa.

Após as três etapas de purificação descritas, as bandas que se encontravam em regiões de peso molecular próximas a esperada para a RproOBP17 (12,8 kDa) foram recortadas, tratadas como descrito na metodologia e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Em posse dos espectros de massa MS/MS dos peptídeos analisados, foi possível realizar uma busca contra bancos de dados de peptídeos preditos do genoma de *R. prolixus*, utilizando o programa *Mascot* (Material Suplementar). Peptídeos únicos foram encontrados nas três bandas testadas, mostrando que foi possível obter frações enriquecidas em RproOBP17 recombinante após as etapas de purificação realizadas.

Um dos objetivos deste estudo era utilizar a proteína recombinante purificada em ensaios competitivos de ligação com sonda fluorescente para selecionar, em um painel de ligantes, novos compostos candidatos a atrativos/repelentes para *R. prolixus* utilizando ecologia química reversa como abordagem.. Em seguida, bioensaios comportamentas seriam realizados para verificar se a afinidade observada *in vitro* de fato provocaria uma resposta comportamental *in vivo* e, em caso positivo, qual seria o tipo de resposta (atração ou repelência). Como esses últimos ensaios não puderam ser realizados por conta da pandemia de COVID-19, as análises *in silico* foram utilizadas para estimar a afinidade de um painel de ligantes pela RproOBP17.

5.11. ANÁLISE DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO POR COMPOSTOS CANDIDATOS A NOVOS ATRATIVOS/REPELENTES *IN SILICO*

Posto que a análise por qPCR mostrou expressão exclusiva em antenas de adultos (**Figura 10**), é muito provável que a OBP17 participe do processo de olfação em *R. prolixus*. Dessa forma, ela poderia ser utilizada como alvo molecular em estudos de ecologia química reversa com o objetivo de encontrar novos compostos que possam ser utilizados para o controle populacional desse inseto. No entanto, a execução de ensaios de *binding* utilizando a RproOBP17 recombinante purificada não foi possível, assim como os bioensaios previstos para ocorrer em seguida. Dessa forma, mais uma vez recorreu-se a análises *in silico*.

A afinidade de ligação dessa proteína por diferentes ligantes candidatos a atrativos/repelentes foi estimada através de ensaios de *docking* molecular utilizando os programas *Chimera e Autodock Vina* (**Tabela 5, Figura 25**). Os semioquímicos avaliados pertencem a diferentes classes químicas, a maior parte descritos na literatura como comportamentalmente ativos para outros insetos.

Na literatura, a relação entre a energia livre de ligação e a afinidade entre a OBP e um ligante foi demonstrada utilizando um valor de *cut-off* em ΔG = -4,00 Kcal/mol (PAGADALA DAMDARAM *et al.*, 2014). De acordo com os valores de energia livre de ligação observados, verifica-se que todos os compostos avaliados possuem, em tese, alguma afinidade à RproOBP17 (**Tabela 2**). Estabelecendo um critério mais rigoroso e colocando o *cut-off* em ΔG = -7,00 Kcal/mol, é possível observar que terpenóides como cedrol (-7,8 Kcal/mol), α-humuleno (7,6 Kcal/mol), β-cariofileno (-7,4 Kcal/mol) e β-damascenona (-7,0 Kcal/mol) ainda alcançaram esse valor de energia livre de ligação, o que indica ligações bastante favoráveis (**Tabela 2**). Ainda assim, compostos como geranilacetona (-6,4 Kcal/mol), acetato de timila (-6,4 Kcal/mol), isovalerato de timila (-6,4 Kcal/mol), (E)-nerolidol (-6,8 Kcal/mol), (E)-β-farneseno, carvracol (-6,5 Kcal/mol), farnesol (-6,8 Kcal/mol), limoneno (-6,1 Kcal/mol), α-felandreno (-6,2 Kcal/mol), β-pineno (-6,3 Kcal/mol) e 4-(4-metilfenil)-pentanal (-6,6 Kcal/mol) também parecem representar ótimos candidatos a novos atrativos/repelentes para *R. prolixus*. A análise realizada com o programa *BIOVIA Discovery Studio* revelou que as interações proteína-ligante são hidrofóbicas e ocorreram majoritariamente via os resíduos I48, F49, V114 e I115 (**Figura 25**). Nota-se que estes resíduos são os mesmos observados nos ensaios de *docking* contra os compostos produzidos pelas GM e BM, sugerindo que esses aminoácidos de fato façam parte do sítio de ligação da proteína.

Tabela 5 Energia de ligação da RproOBP17 com compostos candidatos a atrativos/repelentes. A energia livre de ligação dos compostos à RproOBP27 foi calculada em estudos de *docking* molecular utilizando *Chimera* e *Autodock Vina*.

Álcools alifáticos	**ΔG (Kcal/mol)**
(Z)-hex-3-en-1-ol	-4,2
1-octen-3-ol	-4,8
4-methylcyclohexan-1-ol	-5,0
hexan-1-ol	-4,1
Fenóis	**ΔG (Kcal/mol)**
2-feniletanol	-5,4
fenilmetanol	-5,1
Cetonas	**ΔG (Kcal/mol)**
2-heptanona	-4,5
acetofenona	-5,7
geranilacetona	-6,4
pentadecan-2-ona	-5,6
tridecan-2-ona	-5,4
γ-octalactona	-5,1
Aldeídos	**ΔG (Kcal/mol)**
(2E)-hexenal	-4,0
benzaldeído	-5,1
decanal	-4,9
dodecanal	-5,3
heptanal	-4,3
nonanal	-4,5
octanal	-4,4
undecanal	-5,1
Heteroarenos	**ΔG (Kcal/mol)**
indol	-5,6
escatol	-6,1

Esteres	**ΔG (Kcal/mol)**
acetato de cis-3-hexenilo	-4,8
butirato de hexilo	-4,8
salicilato de metila	-5,6
acetato de timila	-6,4
isovalerato de timila	-6,8
Terpenóides	**ΔG (Kcal/mol)**
(-)-α-pineno	-6,3
(E)-nerolidol	-6,8
(E)-β-farneseno	-6,5
carvracol	-6,2
cedrol	-7,8
citral	-5,5
(E)-β-ocimeno	-5,6
farnesol	-6,8
geraniol	-5,3
limoneno	-6,1
linalol	-5,4
thymol	-5,9
α-humuleno	-7,6
α-felandreno	-6,2
β-cariofileno	-7,4
β-citronelol	-5,5
β-damascenona	-7,0
β-pineno	-6,3
Fenilpropanóides	**ΔG (Kcal/mol)**
4-(4-metilfenil)-pentanal	-6,6
eugenol	-5,8

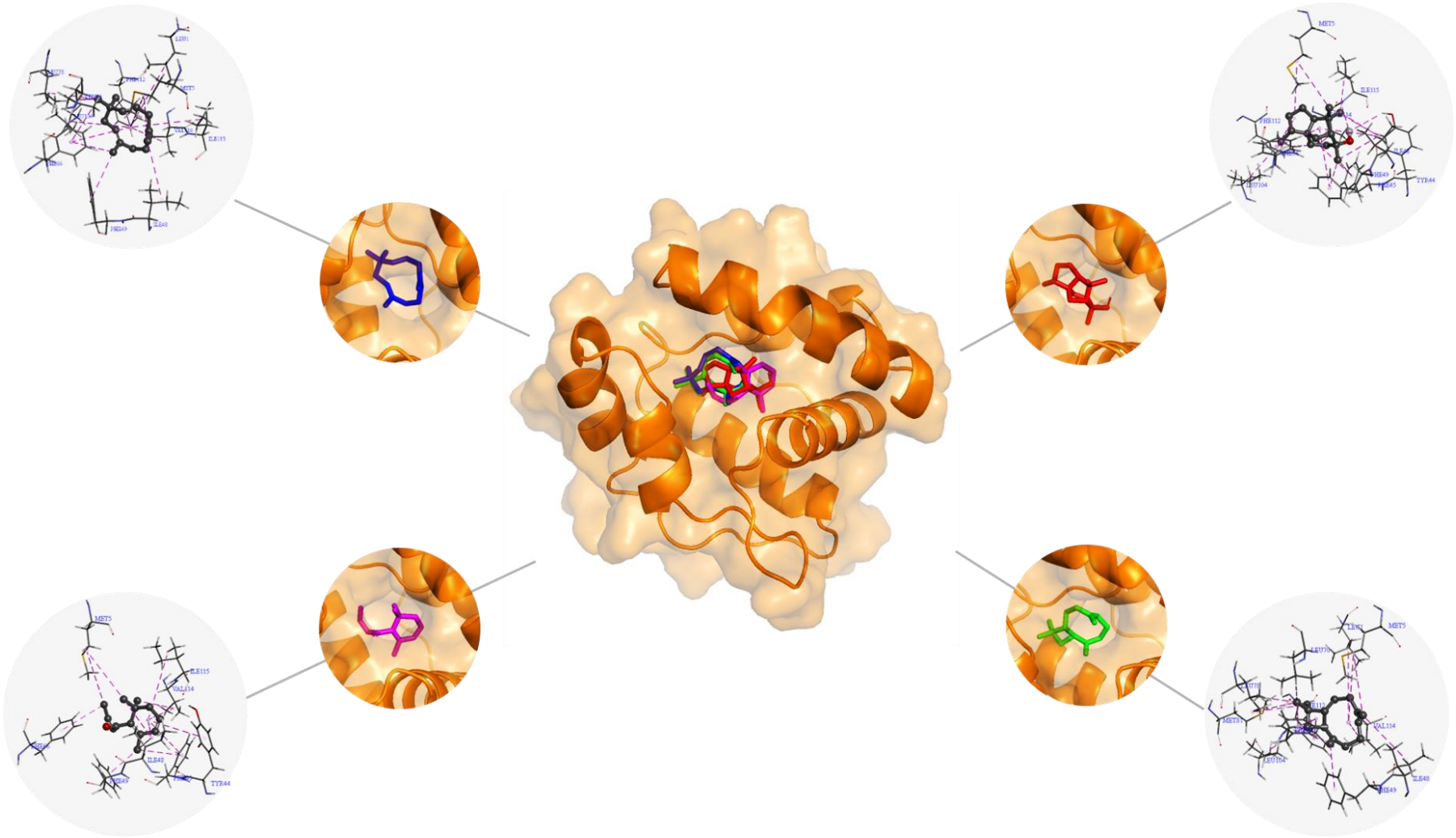


Figura 25 Resíduos envolvidos na interação entre a RproOBP17 e ligantes candidatos a atrativos/repelentes. O composto cedrol está representado em vermelho, α-humuleno em azul, β-cariofileno em verde e β-damascenona em magenta. Interações hidrofóbicas estão indicadas em violeta. Os ensaios de docking foram realizados utilizando os programas *Chimera* e *Autodock Vina*. As interações foram preditas com o *software BIOVIA Discovery Studio Visualizer*. As ilustrações foram elaboradas no *PYMOL*.

.

6. DISCUSSÃO

A comunicação química é uma das formas mais antigas de interação entre seres vivos e a natureza (TOMBERLIN *et al.*, 2016). Já é bem estabelecido que insetos possuem um sistema olfativo bastante sofisticado destinado à detecção de sinais químicos do ambiente. A percepção de semioquímicos promove respostas comportamentais essenciais para a sobrevivência, tais como encontrar uns aos outros, localizar fontes de alimento, sítios de oviposição, parceiros para acasalamento, identificar predadores, dentre outras funções. A olfação é a modalidade sensorial responsável pelo processamento dessa informação e ocorre basicamente nas antenas.

Quando uma molécula de odor encontra a antena, ela é capaz de penetrar a parede da cutícula através de poros encontrados na superfície das sensilas olfativas e alcançar o ambiente aquoso da linfa sensilar. O primeiro contato entre um odor e o aparelho olfativo ocorre através das OBPs. Essas proteínas estão presentes em altas concentrações na linfa sensilar e representam a interface entre o meio ambiente e os neurônios sensoriais olfativos. OBPs são responsáveis pelo transporte de odores até os receptores olfativos (ORs), localizados na membrana desses neurônios, onde a transdução do sinal é iniciada (ZWIEBEL; TAKKEN, 2004; BRITO; MOREIRA; MELO, 2016). Após o reconhecimento, proteínas degradadoras de odor e/ou outro mecanismo ainda não determinado removem o semioquímico processado, dessensibilizando os ORs e deixando-os disponíveis para novas rodadas de sinalização (LEAL, 2013).

O mecanismo molecular associado ao sistema olfativo tornou-se uma área de interesse para pesquisas com o objetivo de desenvolver novas estratégias de controle populacional de insetos vetores de doenças e pragas de lavoura. A interferência no comportamento do inseto com o objetivo de confundi-lo tem sido alvo de diferentes estudos. Como odores não chegam até os ORs sem o auxílio de uma OBP, elas podem ser usadas como alvos moleculares para triagem de novos compostos comportamentalmente ativos (atrativos ou repelentes). Esta abordagem é conhecida como ecologia química reversa (LEAL et al., 2008; BRITO et al., 2020). Embora outras proteínas olfativas como ORs (FRANCO *et al.*, 2018) e CSPs (DUAN; LI; WANG, 2019) possam ser empregadas como alvos moleculares nessa estratégia, as OBPs ainda são as proteínas mais utilizadas por serem proteínas pequenas, solúveis, bastante estáveis e mais simples de serem produzidas e manipuladas em laboratório. A ecologia química reversa já foi utilizada para a identificação, síntese e avaliação de campo de formulações contendo feromônios da mariposa *A. transitella*, levando ao desenvolvimento de melhores iscas para armadilhas (LEAL *et al.*, 2005). Um estudo combinando abordagens de ecologia química

reversa e convencional utilizou a CquiOBP1 como alvo molecular para encontrar um forte atrativo para *C. quinquefasciatus* (LEAL *et al.*, 2008). OBPs de *A. gambiae* foram empregadas em ensaios de ligação para identificar repelentes de mosquitos em óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas. O uso das OBPs diminuiu em 57 % a quantidade de ligantes a serem testados em bioensaios (KRÖBER *et al.*, 2018). Para *Holotrichia parallela*, duas OBPs foram utilizadas para encontrar um volátil de folhas que, ao ser testado em campo, aumentou o número de insetos capturados em armadilhas em até 7 vezes (JU *et al.*, 2018). A OBP14 de *Cnaphalocris medinalis* foi usada com sucesso para a triagem de compostos comportamentalmente ativos, identificando dois fortes atrativos e um repelente para essa espécie (SUN *et al.*, 2019).

Considerando-se que, nas áreas endêmicas, a transmissão vetorial tem papel determinante no número de casos de doença de Chagas, a investigação de compostos atrativos/repelentes que possam auxiliar no manejo populacional dos barbeiros pode ser um fator chave para diminuir a taxa de transmissão. Além disso, a presença do barbeiro não é relevante somente para a transmissão vetorial, uma vez que a transmissão por via oral é a principal forma de contágio atualmente e ocorre principalmente pela ingestão de alimentos que, em algum momento, foram contaminados com o inseto inteiro ou com suas fezes. Um exemplo desse tipo de transmissão ocorre através do consumo de açaí. Este alimento, muito consumido na região norte do Brasil, está associado ao maior índice de casos de doença de Chagas por contaminação oral no país (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2020). Nos estados do norte do Brasil, o açaí tem um importante papel socioeconômico, além de representar uma grande fonte de nutrientes para populações ribeirinhas e urbanas (DE OLIVEIRA; SOCCOL; ROGEZ, 2019). É importante ressaltar que a transmissão oral pela polpa de açaí está longe de ser um problema exclusivo da região norte. Um estudo realizado por FERREIRA e colaboradores (2018) revelou a presença do *T. cruzi* em produtos derivados do açaí no Rio de Janeiro, por exemplo.

Para utilizar OBPs em estudos de ecologia química reversa, é essencial focar em OBPs funcionais, ou seja, aquelas realmente envolvidas na detecção de odores no processo de comunicação química (LEAL, 2003). Além disso, a produção da proteína recombinante em laboratório também deve ser viável para que ela represente um alvo molecular adequado para esse tipo de abordagem. A seguir, serão discutidos os dados que selecionam a RproOBP17 como uma OBP envolvida na detecção de odores e sugerem seu papel fisiológico, assim como a produção da proteína recombinante. Ao final, a utilização desta proteína em ensaios de varredura *in silico* foi capaz de encontrar ligantes que formam ligações bastantes favoráveis.

6.1. SELEÇÃO DE OBPS FUNCIONAIS

Embora o papel fundamental de OBPs no processo de olfação seja reforçado por estudos que mostram que grande parte dessas proteínas são expressas especificamente em antenas (PELOSI *et al.*, 2006), conforme a lista de membros identificados na família das OBPs cresce, torna-se mais claro que nem todas as OBPs estão associadas aos órgãos sensoriais, indicando que essas proteínas podem apresentar outras funções. Proteínas olfativas e não olfativas da família das OBPs apresentam as mesmas características estruturais, o que dificulta o processo de anotação. Sendo assim, a primeira etapa para a escolha de uma OBP que possa ser utilizada como alvo molecular em estudos de ecologia química reversa é verificar a abundância de transcritos dessas proteínas em tecidos sensoriais e não sensoriais.

O genoma do *R. prolixus* possui 27 genes anotados como OBPs (MESQUITA *et al.*, 2015), mas somente 17 foram encontrados nas antenas de insetos adultos (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Esse fato sugere que diversos genes incluídos na família das OBPs provavelmente não estão diretamente envolvidos no transporte de moléculas quimiossensoriais, o que é frequentemente observado em insetos (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016; PELOSI *et al.*, 2017). Em *P. regina*, uma OBP é responsável pela solubilização de ácidos graxos presentes na dieta do inseto (ISHIDA; ISHIBASHI; LEAL, 2013). OBPs também já foram encontradas no transcriptoma do intestino de insetos hematófagos como o próprio *R. prolixus* e *C. quinquefasciatus*, o que indica que essas proteínas provavelmente estão envolvidas no transporte de nutrientes ou outras moléculas envolvidas na função intestinal (SMARTT; ERICKSON, 2009; RIBEIRO et al., 2014). Aliás, em *R. prolixus*, o gene anotado como OBP11 é, na verdade, a proteína transportadora de heme (*Rhodnius* heme-binding protein – RHBP) que é sintetizada majoritariamente no corpo gorduroso e secretada para a hemolinfa. A principal função da RHBP é o transporte de radicais heme gerados a partir da digestão do sangue, protegendo as células intestinais do estresse oxidativo (DANSA-PETRETSKI *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1995). Tecidos como as glândulas produtoras de feromônios e órgãos reprodutores também sintetizam OBPs. A OBP10 de *Helicoverpa armigera* e a OBP22 de *A. aegypti* foram encontradas nesses tecidos, sugerindo a participação dessas proteínas na liberação controlada de semioquímicos no ambiente (LI et al., 2008; SUN et al., 2012a).

6.1.1. Varredura por PCR semi-quantitativo

Nesse trabalho, onze genes *OBPs* de *R. prolixus* foram encontrados em probóscides, pernas e cabeças, além das antenas (*OBP1, OBP7, OBP11, OBP12, OBP14, OBP18, OBP20, OBP22, OBP23, OBP24* e *OBP29*) (**Figura 8**). Este resultado indica que essas proteínas, assim como observado em outros insetos, provavelmente participem do transporte de moléculas hidrofóbicas não associadas à olfação, tornando-as inadequadas para estudos de ecologia química reversa. Embora os *OBP6, OBP13, OBP21* e *OBP27* apresentem expressão majoritária em antenas (**Figura 9**), também foi possível observar a presença de transcritos em tecidos não olfativos. Como não é possível afirmar que estes genes participem do processo de olfação, decidiu-se utilizar uma estratégia mais conservadora e apenas as OBPs cujos genes são expressos exclusivamente nas antenas foram analisadas.

A varredura por PCR semi-quantitativo sugeriu que os *OBP17* e *OBP26* são encontrados exclusivamente em antenas (**Figura 9**). Com base nesta informação, a proposta deste trabalho foi encontrar OBPs adequadas para a identificação de compostos candidatos a atrativos/repelentes para ambos os sexos. Assim, o *OBP26*, encontrado apenas em macho, não se adequou ao critério utilizado. Entretanto, é válido comentar que, devido ao seu perfil de expressão, a OBP26 parece ser um alvo interessante para estudos relacionados ao comportamento sexual de *R. prolixus*. Em insetos, a expressão diferenciada de *OBPs* entre machos e fêmeas é observada com frequência e costuma estar relacionada com funções específicas de cada sexo. Um exemplo disso é a proteína ligadora de feromônio da barata *L. maderae*. Esta proteína é expressa especificamente nas antenas de fêmeas, justamente o sexo que percebe e reconhece os componentes da mistura feromonal (RIVIÈRE *et al.*, 2003). Em culicídeos, a OBP1 de *C. quinquefasciatus* é expressa somente em antenas de fêmeas e está relacionada com a detecção do feromônio de oviposição (MOP) (LEAL *et al.*, 2008; PELLETIER *et al.*, 2010). Outra OBP, a OBP1 de *A. gambiae*, expressa também nas antenas de fêmeas, é necessária para as respostas olfativas relacionadas à detecção de indol e 3-metil-indol, que são componentes do suor humano. A detecção desses voláteis é essencial para que as fêmeas localizem o hospedeiro humano para a ingestão de sangue, necessária para o desenvolvimento de seus ovos (BIESSMANN *et al.*, 2010). Em *R. prolixus*, a OBP27, expressa em antenas de machos, aparentemente se liga à semioquímicos produzidos pelas glândulas metasternais de fêmeas (OLIVEIRA *et al.*, 2018) descritos como relevantes para o comportamento sexual do inseto (PONTES *et al.*, 2008). Outro exemplo de OBP expressa exclusivamente em antenas de machos é a OBP4 do hemíptero *A. lineolatus*. Esta proteína

apresenta alta afinidade a dois componentes do feromônio sexual produzidos pelas fêmeas dessa espécie (WANG *et al.*, 2020). Feromônios são detectados por OBPs específicas, denominadas PBPs (pheromone-binding protein). As PBPs apresentam extraordinária seletividade e podem funcionar como o primeiro "filtro" do sistema olfativo transportando sinais químicos do ambiente, preferencial ou exclusivamente, de determinados odores até os ORs. O exemplo clássico é a PBP de *B. mori*. Nesta espécie, a mistura feromonal tem dois componentes, o *bombykol* e o *bombykal*, que atuam como antagonistas no comportamento dos machos. Enquanto o *bombykol* tem afeito atrativo, a detecção de *bombykal* provoca comportamento inverso (GRÄTER *et al.*, 2006). Assim, a presença de OBP/PBPs exclusivas circulando na hemolinfa sensilar de machos ou de fêmeas representam uma importante interface entre os semioquímicos do meio ambiente e o comportamento desencadeado pelo reconhecimento deles pelo inseto.

Dos 17 genes investigados, apenas *o OBP17* foi encontrado, exclusivamente, nas antenas de ambos os sexos (**Figura 9**), sugerindo um papel desta proteína na olfação dos adultos.

6.1.2. Perfil de expressão do gene *OBP17* em insetos adultos

Inicialmente, para excluir a possibilidade de expressão em tecidos não olfativos, foi realizada a quantificação relativa dos transcritos *RproOBP17* por qPCR utilizando o método de Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) em relação ao gene de referência *R18S*. O resultado confirmou a expressão exclusiva em antenas de ambos os sexos (**Figura10**). Curiosamente, os transcritos codificantes desta proteína apresentaram uma abundância 2,5 vezes maior em machos.

Com base em dados da literatura, sabe-se que genes *OBPs* expressos somente em antenas de insetos adultos costumam estar envolvidos com a detecção de odores relacionados a comportamentos comuns a ambos os sexos. A mariposa *Spodoptera litura*, por exemplo, é uma praga de lavoura cujas larvas se alimentam de diferentes cultivares. Os adultos expressam a GOBP2 nas antenas. Essa proteína tem a função de identificar voláteis produzidos pelas plantas que servirão de alimentos para as lagartas. Ou seja, a GOPB2, ao detectar os voláteis, é responsável por induzir o voo dos adultos em direção aos locais de cópula e de oviposição (LIU *et al.*, 2015). Efeito semelhante é observado para a OBP13 de outra praga de lavoura conhecida como inseto da planta de alfafa, *A. lineolatu*s. Essa OBP também é encontrada em antenas de machos e fêmeas, e é responsável pela detecção de terpenóides emitidos pelas folhas das plantas hospedeiras (SUN *et al.*, 2014). Várias outras OBPs expressas nas antenas dos adultos também

já foram apontadas desempenhando papel semelhante, como a OBP10 de *C. pallens*, que participa do transporte de componentes do feromônio de alarme (LI *et al.*, 2017). A OBP7 de *Grapholita molesta* apresenta alta afinidade por voláteis como éster de pêra, lauraldeído (laurato de metila) e α-ocimene, todos emitidos nos pomares de macieiras, pereiras e ameixeiras, entre outras plantas hospedeiras. Já os adultos da mosca *Sitodiplosis mosellana* são atraídos por voláteis do trigo quando a proteína SmosOBP17 identifica esses semioquímicos no ambiente (CHENG *et al.*, 2020).

Sendo assim, é possível que a OBP17 tenha um papel na detecção de compostos associados a comportamentos comuns para ambos os sexos, como a busca pela refeição sanguínea, o reconhecimento intraespecífico, e a fuga de perigo em potencial, por exemplo.

6.2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA RPROOBP17

6.2.1. Sequência primária e aspectos físico-químicos da OBP17

As características fisico-químicas preditas para a RproOBP17 (**Figura 11**) estão de acordo com o que seria esperado para OBPs de insetos, descritas como pequenas proteínas solúveis que geralmente apresentam características ácidas e, consequentemente, possuem carga negativa no pH da linfa sensilar (LEAL, 2013; BRITO; MOREIRA; MELO, 2016). Além disso, a RproOBP17 apresenta seis cisteínas conservadas e a estrutura secundária encontrada está em concordância com a assinatura de OBPs clássicas de insetos (PELOSI et al., 2006; BRITO; MOREIRA; MELO, 2016).

As OBPs de insetos são geralmente constituídas por seis domínios α-hélice enoveladas em estruturas bastante compactas e estáveis (SANDLER *et al.*, 2000; TEGONI; CAMPANACCI; CAMBILLAU, 2004). Experimentos anteriores demonstraram que as seis cisteínas formam três pontes dissulfeto entrelaçadas em um arranjo que confere grande estabilidade para a estrutura tridimensional da proteína, o que também parece ser uma característica conservada em OBPs. Esse padrão de cisteínas se tornou a assinatura de OBPs clássicas de insetos (PELOSI *et al.*, 2006).

6.2.2. Expressão do gene *OBP17* em diferentes perfis nutricionais

Considerando-se que a procura pelo hospedeiro vertebrado para a alimentação sanguínea é um aspecto fundamental para a sobrevivência do *R. prolixus*, a quantidade de transcritos em antenas de machos e fêmeas em dois estados nutricionais foi avaliada por qPCR (**Figura 11**). A regulação aqui investigada foi demonstrada em outros insetos hematófagos, onde os genes envolvidos na olfação são "ligados e desligados" de acordo com seu estado nutricional. Embora existam relatos na literatura que confirmem a regulação da expressão de proteínas olfativas em insetos hematófagos (FOX *et al.*, 2001; RINKER *et al.*, 2013), os resultados indicam que este não parece ser o caso para a RproOBP17. O gene *OBP17* apresenta a mesma quantidade de transcritos em antenas de indivíduos alimentados e em jejum (**Figura 12**). O estudo da regulação da expressão de genes envolvidos com a olfação pela alimentação sanguínea tenta estabelecer um elo com proteínas que possam participar diretamente da identificação de odores do hospedeiro. Em *A. gambiae*, apesar dos transcritos de um pequeno grupo de ORs mostrarem-se mais abundantes logo que as fêmeas se alimentam de sangue, a maior parte dos genes quimiossensoriais (OBPs, SMNPs, ORs) têm os níveis de seus transcritos reduzidos após a alimentação sanguínea (RINKER *et al.*, 2013). Em *R. prolixus*, a expressão relativa dos genes *RproIR8a*, *RproIR25a* e *RproIR76b* sofrem *down-regulation* após a alimentação (LATORRE-ESTIVALIS *et al.*, 2015). Apesar desse trabalho discutir a regulação da expressão do correceptor olfativo, *RproORCO*, de acordo com o estado nutricional do inseto, isso parece não ocorrer. FRANCO e colaboradores (2016) demonstraram que a quantidade de transcritos do *ORCO* não varia com o estado nutricional do *R. prolixus*. O ORCO é um tipo especial de OR de inseto, atuando como uma chaperona para ORs convencionais. Dentre as funções do ORCO, estão a localização correta dos ORs na membrana dos neurônios sensoriais olfativos (NSOs), e a formação, junto com os ORs, de um complexo heteromérico que é indispensável para o reconhecimentos de moléculas de odor (SAKURAI; NAMIKI; KANZAKI, 2014; FRANCO et al., 2016). Sendo assim, é pouco provável que sua expressão varie de acordo com o estado nutricional do inseto. Para OBPs, essa regulação foi observada em *A. lineolatus*, que apresenta uma variação significativamente maior na quantidade de transcritos do *OBP13* após horas de jejum (SUN *et al.*, 2014).

A partir dos resultados obtidos, levantou-se a hipótese que a RproOBP17 estivesse envolvida na detecção de compostos que desencadeiem respostas comportamentais comuns a ambos os sexos, que não a busca pela refeição de sangue.

6.2.3. Análise filogenética

Tendo identificado homólogos putativos, as árvores filogenéticas podem fornecer informações quando uma proteína de função desconhecida se agrupa em um *cluster* de proteínas com função específica (WHISSTOCK; LESK, 2003). Então, decidiu-se construir uma árvore incluindo OBPs de *Rhodnius* e de outras espécies com função e/ou ligante já descritos na literatura.

Um fato curioso foi observar a OBP6 no ramo de proteínas associadas à detecção de voláteis de plantas e compostos alcoólicos (**Figura 13**). Acredita-se que a alimentação com fluidos vegetais provavelmente surgiu com a origem da ordem Hemiptera. Os hemípteros são a quinta maior ordem de insetos, sendo um dos grupos mais abundantes e diversos de insetos que se alimentam de plantas. Dados fósseis e analise filogenética sugerem que a hematofagia surgiu em algum momento entre a mudança da herbivoria para a predação (JOHNSON *et al.*, 2018). O grupo terrestre dos Cimicomorpha teria dado origem aos grupos de predadores da família Reduviidae (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2006). Discute-se que, no início de sua evolução, alguns predadores possivelmente se alimentavam de invertebrados que habitavam os ninhos de animais vertebrados, como lagartas, larvas e aranhas, e depois passaram a tentar perfurar a pele de pequenos vertebrados. Os triatomíneos, em contraste com outros insetos hematófagos como mosquitos ou moscas tsé-tsé, ocupam o ninho (residência) dos hospedeiros, indicando que esses hemípteros hematófagos sejam descendentes de formas primitivas de predadores Reduviidae (SCHOFIELD, 2000). A evolução para formas que se alimentam de sangue pode ser explicada através de uma fase de transição onde os predadores, que inicialmente se alimentavam de pequenos invertebrados que habitavam ninhos de vertebrados, se adaptaram progressivamente para explorar o próprio hospedeiro vertebrado como fonte de nutrição. Essa transição é acompanhada de várias vantagens, principalmente em termos de proteção em relação a outros predadores e condições climáticas extremas, assim como da maior disponibilidade de fonte de alimento rica em proteína. A proteção contra extremos climáticos e o melhor abastecimento de alimento faz com que a reprodução se torne menos dependente de mudanças sazonais e a densidade populacional passa a aumentar até o limite de fonte de nutrição disponível (SCHOFIELD, 2000; TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2006). Assim, o agrupamento da OBP6 no *cluster* de detecção de voláteis de plantas e álcoois sugere que a capacidade ancestral da infraordem Cimicomorpha de detectar semioquímicos de plantas para a alimentação pode estar mantida em *Rhodnius*.

A OBP17 de *R. prolixus* agrupou-se em um *cluster* contendo OBPs associadas à detecção de componentes de diferentes feromônios (**Figura 13**), CquiOBP1, CquiOBP2, CquiOBP5, LylinLAP, AlinOBP4 e CpalOBP10. Algumas proteínas transportadoras de odor têm como função primordial o transporte de diferentes tipos de feromônios. A identificação desses semioquímicos está relacionada a comportamentos específicos de cada espécie. A proteína OBP1 de *C. quinquefasciatus*, por exemplo, está envolvida no reconhecimento do feromônio de oviposição MOP (**M**osquito **O**viposition **P**heromone) (PELLETIER *et al.*, 2010). Ainda existem poucos estudos que demonstrem o uso de feromônios na comunicação de culicídeos, mas um dos mais relevantes foi a descoberta do MOP. Esse feromônio natural de *C. quinquefasciatus* foi extraído de gotículas apicais encontradas sobre os ovos do mosquito. A estrutura do composto foi identificada por espectrometria de massas e sínteses enantioseletivas foram utilizadas para determinar a configuração absoluta do feromônio natural, (5R.6S)-MOP. A avaliação dos possíveis isômeros revelou que apenas a conformação natural promove a oviposição e, atualmente, esse feromônio está disponível comercialmente para sistemas de captura (LEAL *et al.*, 2008). Outra OBP de *C. quinquefasciatus*, a CquiOBP2, apresenta alta afinidade pelo atrativo de oviposição escatol, um composto que, quando avaliado como atrativo em armadilhas, apresentou uma relação dose-resposta na captura de fêmeas de *C. quinquefasciatus* (LEAL *et al.*, 2008; YIN *et al.*, 2015). A OBP5 dessa espécie apresenta afinidade pelo nonanal, um componente importante em perfis de odores de humanos e pássaros (YIN *et al.*, 2015). Foi demonstrado que a adição de nonanal em armadilhas que usavam CO_2 levou a um aumento de 50 % na captura de *C. queinquefasciatus* (SYED; LEAL, 2009). No caso de hemípteros, a OBP-LAP (***L**ygus* **A**ntennal **P**rotein) de *L. lineolaris* é encontrada somente em insetos adultos e acredita-se estar relacionada com o comportamento reprodutivo. Estudos com a OBP-LAP demonstraram que sua expressão se inicia em tecido adulto, mas antes da muda ninfa-adulto, sugerindo que os insetos já emerjam como adultos com um sistema olfativo totalmente funcional (VOGT *et al.*, 1999). Em *A. lineolatus*, foi demonstrado que o silenciamento da OBP4 fez com que a resposta aos componentes putativos de feromônio sexual butanoato de butila, butirato de 1-hexenilo, butirato de 2-hexenilo e hexanoato de hexilo, verificada por eletroantenograma, é significativamente reduzida (ZHANG et al., 2017; WANG et al., 2021). No crisopídeo *C. pallens*, a OBP10 apresenta alta afinidade ao (E)-ß-farneseno, um feromônio de alarme de afídios que funciona como um impeditivo de oviposição para essa espécie. *C. pallens* é uma espécie predadora de afídios, portanto, a seleção do local de oviposição é fundamental para a sobrevivência das larvas. Como o (E)-ß-farneseno é o feromônio de alarme de pulgões, esses insetos deixarão a área onde esse composto está

localizado. Se o *C. pallens* ovipositar em uma área sem pulgões, as larvas terão dificuldade em encontrar alimento para sobreviver. Assim, *C. pallens* adultos evitam a oviposição em uma área com (E)-ß-farneseno (LI *et al.*, 2017).

A próxima etapa da caracterização funcional dessa proteína seria a realização de bioensaios utilizando insetos que sofreram silenciamento do *OBP17* por RNA de interferência. A técnica de RNAi é amplamente utilizada para investigar funções de genes em insetos (MALESZKA et al., 2007; BIESSMANN et al., 2010; SWARUP; WILLIAMS; ANHOLT, 2011; REBIJITH et al., 2016; ZHANG et al., 2017; HU et al., 2019; HE et al., 2020). Em *R. prolixus*, essa técnica foi aplicada com sucesso para o silenciamento do coreceptor olfativo (FRANCO *et al.*, 2016), do OR80 (FRANCO *et al.*, 2018) e para o silenciamento da quitina sintase (MANSUR *et al.*, 2014). A técnica de RNAi também contribuiu para identificação de ligantes específicos das OBPs e para verificar os efeitos fenotípicos comportamentais desencadeados pelo silenciamento (CHEN *et al.*, 2008; BIESSMANN *et al.*, 2010; PELLETIER *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2011; SWARUP *et al.*, 2011; DENG *et al.*, 2013; REBIJITH *et al.*, 2016; SHORTER *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016). Algumas evidências mostram que o silenciamento de genes olfativos pode ser usado como estratégia para o controle de insetos. Indivíduos submetidos ao tratamento com dsRNA apresentam modificação no comportamento que influencia diretamente na sobrevivência dos mesmos (HE *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2017). No presente estudo, insetos injetados com o ds*OBP17* apresentaram redução de 89 % na quantidade de transcritos para o *gene OBP17* (**Figura 14**), sendo possível deduzir que estes insetos possuíam uma diminuição de RproOBP17 circulante na linfa sensilar. No entando, a realização dos bioensaios com os insetos silenciados não foi possível devido à pandemia de COVID-19. Os resultados obtidos pelo qPCR indicaram que a RproOBP17 se trata de uma proteína associada à detecção de compostos que provocariam respostas comuns a ambos os sexos que não seja a busca pelo hospedeiro vertebrado para alimentação sanguínea. Sendo assim, os bioensaios planejados investigariam a capacidade dos insetos tratados com ds*OBP17* de detectarem indivíduos do sexo oposto e/ou indivíduos recebendo estímulos irritativos, em referência ao *cluster* de detecção de componentes de feromônios no qual a RproOBP17 foi agrupada na análise filogenética. Como isso não foi possível, decidiu-se utilizar análises *in silico* com o objetivo de determinar a função da OBP17 com base em suas características estruturais.

6.2.4. Caracterização estrutural *in silico* da OBP17

Existem duas abordagens básicas para a predição da função de uma proteína a partir da sua sequência primária: similaridade geral da sequência e "assinaturas" de padrões de motivos ou sítios ativos (WHISSTOCK; LESK, 2003). A busca por motivos pode fornecer informações diferentes das obtidas por métodos mais globais de comparação, oferecendo outro ponto de partida para uma análise paralela (LEE; REDFERN; ORENGO, 2007). Dessa forma, foi realizada uma busca por motivos conservados entre a RproOBP17 e OBPs de outros insetos com estruturas já determinadas. A OBP17 de *R. prolixus* apresenta o mesmo padrão de motivos conservados que a OBP4 de *C. pallens* (**Figura 15**).

Uma vez que motivos conservados costumam corresponder a regiões de estrutura conservada relacionadas à função, um modelo estrutural para a RproOBP17 foi construído (**Figura 16**). O modelo revelou a existência de seis regiões de α-hélice e uma cavidade de ligação, como era esperado para uma OBP clássica. Esse tipo geral de enovelamento, formado por seis hélices ligadas por três pontes dissulfeto é uma característica comum em OBPs de insetos. A resolução da estrutura tridimensional da AaegOBP1 mostrou a formação desse tipo de configuração tridimensional (LEITE *et al.*, 2009). Uma cavidade de ligação hidrofóbica é descrita ao longo de OBPs de diferentes ordens de insetos, como a PBP de *B. mori* (SANDLER *et al.*, 2000) e a OBP14 de *A. mellifera* (SPINELLI *et al.*, 2012). A LmadPBP de *L. maderae* é, até o momento, a única exceção, apresentando uma cavidade de ligação com uma quantidade significativa de resíduos polares/carregados (LARTIGUE *et al.*, 2003).

Da mesma forma que os métodos baseados em sequência, a análise baseada em estrutura também busca por homólogos. Sabe-se que a estrutura muda de forma mais conservadora do que a sequência durante a evolução, e homologias distantes são frequentemente mais facilmente detectadas em estruturas do que em sequências. O correspondente tridimensional da abordagem por similaridade geral da sequência é o alinhamento por analogia estrutural, que busca estabelecer correspondências entre pares de resíduos que ocupam a mesma posição geométrica em duas estruturas. A sobreposição das estruturas da RproOBP17 e CpalOBP4 mostrou que essas proteínas apresentam alta similaridade estrutural, embora não sejam homólogas em sequência (36 % de identidade) (**Figura 17**). Estudos de *binding* realizados por LI e colaboradores (2019) evidenciaram a afinidade da CpalOBP4 por compostos como farneseno, hexanoato de cis-3-hexenila, nerolidol e farnesol. Uma vez que a homologia estrutural pode indicar semelhanças no sítio catalítico ou na afinidade por ligantes com determinados grupos

químicos, é possível que a RproOBP17 tenha afinidade por ligantes das mesmas classes químicas que os observados para a CpalOBP4.

Dessa forma, a próxima etapa de caracterização *in silico* foi realizada para verificar se a RproOBP17 apresentava afinidade por ligantes similares aos descritos para a CpalOBP4; e investigar a função da OBP17 de acordo com suas afinidades de ligação por compostos reportados capaze de provocar resposta comportamental em *R. prolixus*.

6.2.5. Afinidade da OBP17 por compostos fisiologicamente relevantes para *R. prolixus*

Para testar a afinidade da RproOBP17 por ligantes com diferentes grupamentos químicos e investigar sua possível função como transportadora de componentes de feromônios, o modelo construído para essa proteína foi utilizado em ensaios de *docking* molecular contra compostos descritos como fisiologicamente relevantes para *R. prolixus* (**Tabela 2**; **Figura 18**). Voláteis produzidos pela glândula metasternal (GM) estão associados à comunicação sexual dessa espécie. A cópula de triatomíneos está associada aos voláteis emitidos pelas GMs de fêmeas (PONTES et al., 2008, 2014), que são capazes de modular a orientação do voo de adultos machos. Os compostos produzidos pelas GMs também parecem ser emitidos durante a cópula e promovem a agregação de machos, garantindo a estratégia reprodutiva poliândrica de *Rhodnius* (PONTES; LORENZO, 2012; PONTES et al., 2014). Compostos produzidos pelas glândulas de Brindley (GB) de triatomíneos são associados a comportamentos de fuga e defesa. Em estudo conduzido por MANRIQUE e colaboradores (2006), voláteis das GBs excisadas foram identificados por LC-MS/MS. Em seguida, compostos emitidos por indivíduos que tiveram as patas apertadas com fórceps, foram coletados em *vials* e agitados por 15 s, e também identificados por LC-MS/MS. O perfil LC-MS/MS de compostos presentes nas GBs excisadas correspondiam aos mesmos emitidos por insetos sob perturbação mecânica, sugerindo que as GBs sintetizam esses compostos. Foi reportado que a resposta de insetos quando confrontados por esses voláteis é de afastamento e fuga (ROJAS et al., 2002; MAY-CONCHA et al., 2015), equivalentes ao que seria esperando quando componentes de feromônios de alarme são detectados. O comportamento de fuga mediado por feromônios de alarme é muito relevante para a sobrevivência do inseto, uma vez que permite identificar e escapar de um perigo potencial (MINOLI; PALOTTINI; MANRIQUE, 2013).

Os ensaios de *docking* revelaram ligações mais favoráveis com compostos como 2-metilpropanoato de 2-feniletila (ΔG = -6,0 Kcal/mol), 2-feniletanol (ΔG = -5,4 Kcal/mol) e 2-

metilpropanoato de 2-metilpropila (ΔG = -5,0 Kcal/mol), emitidos pela glândula de Brindley. Ainda se nota que os ligantes de maior afinidade pertencem as mesmas classes químicas observadas para a CpalOBP4, álcoois e ésteres. Os resíduos I48, F49, V114 e I115 participam da interação majoritariamente hidrofóbica com os ligantes e parecem fazer parte do sítio ativo da proteína. Este resultado está de acordo com os dados da literatura que mostram interações hidrofóbicas como cruciais para a estabilidade da ligação OBP+odor. A determinação da estrutura tridimensional da PBP de *B. mori* complexada com seu ligante, o *bombykol*, mostrou a existência de interações hidrofóbicas com o composto no interior do *pocket* da proteína (SANDLER *et al.*, 2000). O mesmo foi observado para a AgamOBP1 complexada com DEET (TSITSANOU *et al.*, 2012), que se liga à borda de um túnel hidrofóbico longo formado por um dímero da proteína através de uma série de interações hidrofóbicas e uma ligação de hidrogênio. O estudo do complexo formado entre a AgamOBP1e a icaridina mostrou uma semelhança geral em relação à forma, arranjo geométrico dos grupos e distribuição espacial da cavidade hidrofóbica, sugerindo que o mecanismo de reconhecimento seja comum para ambos os repelentes (DRAKOU *et al.*, 2016). A elucidação das estruturas dos complexos formados entre a OBP-LUSH de *D. melanogaster* e diferentes compostos alcoólicos mostrou que o complexo é estabilizado por ligações de hidrogênio com aminoácidos próximos à cavidade hidrofóbica e, quanto mais longa for a cadeia alcoólica, maior a estabilidade do complexo (KRUSE *et al.*, 2003).

Em resumo, os ensaios de qPCR revelaram que o *RproOBP17* é expresso exclusivamente em antenas de adultos. A análise de similaridade de sequência realizada pela construção da árvore filogenética agrupou a RproOBP17 com OBPs associadas ao transporte de componentes de diferentes tipos de feromônios. Já a observação da analogia estrutural e ensaios de *docking* com ligantes fisiologicamente relevantes indicou que a OBP17 apresenta maior afinidade pelos compostos fisiológicos 2-metilpropanoato de 2-feniletila, 2-feniletanol e 2-metilpropanoato de 2-metilpropila**,** emitidos pelas glândulas de Brindley. Esse resultado também está de acordo com a hipótese levantada inicialmente após a observação do padrão de expressão do gene *OBP17* por qPCR, uma vez que o comportamento de evasão do perigo é comum para triatomíneos de ambos os sexos (MAY-CONCHA *et al.*, 2015) e não está sob pressão do estado nutricional do inseto.

6.3. PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS CANDIDATOS A ATRATIVOS/REPELENTES USANDO A RPROOBP17 COMO ALVO MOLECULAR

6.3.1. Produção da RproOBP17 recombinante

Como os resultados sugeriram que a RproOBP17 se trata, de fato, de uma OBP funcional em *R. prolixus*, o próximo passo foi verificar a viabilidade da produção da proteína recombinante em laboratório. Como a OBP17 apresenta três pontes dissulfeto, primeiro é necessário fornecer um ambiente oxidante o suficiente para que elas sejam formadas. Já foi reportado que a expressão periplasmática em *E. coli* é capaz de produzir OBPs devidamente enoveladas e funcionais, como a CquiOBP1 (MAO *et al.*, 2010) e a AgamOBP1 (WOGULIS et al., 2006; TSITSANOU et al., 2012). Sendo assim, o vetor de expressão pET22b(+) foi escolhido pois possibilita o endereçamento ao periplasma através do peptídeo sinal pelB.

Após a realização de testes em diferentes combinações de temperatura, DO_{600} e [IPTG], foi verificado que as melhores condições para a expressão periplasmática da RproOBP17 recombinante foram T = 28 ºC, DO_{600} = 0,6 e [IPTG] 0,5 µM (**Figura 20**) . A purificação da RproOBP17 recombinante, verificada por LC-MS/MS, foi alcançada através de duas etapas de troca iônica combinada a uma etapa de gel filtração (**Figuras, 21, 22** e **23**). Dentre outros autores, JIANG e colaboradores (2009) também reportaram a utilização da combinação de etapas de troca iônica e gel filtração para a purificação de OBPs recombinantes. Um protocolo similar é encontrado em um trabalho que avalia a seletividade da CquiOBP1 por ligantes fisiologicamente relevantes (YIN *et al.*, 2015). Recentemente, a utilização de cauda de histidina e coluna de níquel também vem sendo reportada como um método alternativo para a purificação de OBPs recombinantes (JU et al., 2018; HU et al., 2019). Até o momento da finalização desse trabalho, essa é a primeira vez que a produção recombinante de uma OBP olfativa de triatomíneo é demonstrada. Como não foi possível utilizar a proteína recombinante purificada para ensaios de ligação com sonda fluorescente para selecionar os ligantes que seriam posteriormente avaliados em bioensaios, estratégias *in silico* foram utilizadas para realizar uma pré-seleção de compostos.

6.3.2. Identificação *in silico* de compostos candidatos a atrativos/repelentes

Métodos computacionais têm sido cada vez mais incorporados em estudos de ecologia química reversa, com o objetivo de pré-selecionar os compostos candidatos que serão testados nos ensaios experimentais e, assim, acelerar a descoberta de novos atrativos/repelentes (BRITO; MOREIRA; MELO, 2016). A utilização de *docking* molecular como modelo teórico para determinação de ligantes de uma OBP da praga agrícola *Bactrocera dorsalis* se mostrou confiável para a previsão de compostos fisiologicamente ativos (PAGADALA DAMDARAM *et al.*, 2014). Em estudo com uma OBP de *M. Viciae*, foi demonstrada a utilização da sua estrutura teórica em simulações computacionais para caracterizar a interação desta proteína com análogos do feromônio de alarme de pulgões (DU *et al.*, 2018). Assim, na ausência de procedimentos experimentais, este estudo se propôs a realizar uma varredura *in silico* por compostos candidatos a atrativos/repelentes, visando selecionar os principais ligantes para ensaios de ligação posteriores.

Os estudos de *docking* da RproOBP17 contra um painel de diferentes ligantes (**Tabela 5**; **Figura 25**) revelou interações muito favoráveis, com energia livre de ligação menores que -7,0 Kcal/mol. Em estudo realizado por PAGADALA DAMDARAM e colaboradores, a confiabilidade na previsão de compostos comportamentalmente ativos por métodos computacionais foi demonstrada utilizando o valor de *cut-off* em $\Delta G = -4{,}0$ Kcal/mol. Logo, os ligantes aqui identificados, como cedrol (-7,8 Kcal/mol), α-humuleno (-7,6 Kcal/mol), β-cariofileno (-7,4 Kcal/mol) e β-damascenona (-7,0 Kcal/mol), formam ligações teoricamente favoráveis com a RproOBP17 e podem ser candidatos promissores a atrativos/repelentes.

Esses ligantes são terpenóides que desencadeiam comportamentos relevantes em diferentes espécies de culicídeos e de lepidópteros. O cedrol, por exemplo, é um atrativo de oviposição para fêmeas grávidas de *A. gambiae* (LINDH *et al.*, 2015). Esse composto foi testado com sucesso em armadilhas para a captura do *A. gambiae*, contribuindo para o controle da transmissão da malária (MBARE; LINDSAY; FILLINGER, 2019). Já o α-humuleno, assim como o β-cariofileno, agem impedindo a oviposição em *A. aegypti* (DA SILVA *et al.*, 2015). Além disso, também mostraram ter potencial larvicida médio e inseticida alto para a mariposa *H. armigera* (BENELLIA *et al.*, 2018). Diferente do que ocorre em *A. aegypti*, o α-humuleno age atraindo fêmeas de *A. gambiae*, ou seja, o mesmo composto possui ação antagônica em culicídeos (MEZA *et al.*, 2020). Ademais, o óxido de β-cariofileno foi reportado como irritativo e repelente para *A. aegypti* e *Anopheles minimus* (NARARAKA *et al.*, 2019). Um fato interessante e inesperado é que este composto parece fazer parte da combinação de voláteis

descrita como biomarcadora de câncer de pulmão na respiração (PHILLIPS *et al.*, 2007). Isso sugere uma aplicação em potencial da RproOBP17 como elemento sensorial em biosensores para testes de saúde.

Por fim, mas não menos importante, a β-damascenona também apresentou alta afinidade de ligação pela RproOBP17 (-7,0 Kcal/mol). As damascenonas pertencem a uma família de compostos conhecidos como cetonas de rosas, presentes em óleos essenciais. Em *Anopheles stephensi* este composto tem efeito repelente (PIRMOHAMMADI *et al.*, 2016). Em humanos, esse composto está relacionado com a percepção sensorial do aroma de vinhos tintos e rosé (TOMASINO; BOLMAN, 2021). Curiosamente, a β-damascenona também é encontrada como o composto aroma-ativo mais intenso no açaí (LIM *et al.*, 2016), fruta associada aos altos índices de transmissão oral da doença de Chagas (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2020).

Utilizando análises experimentais combinadas a estudos *in silico*, este estudo foi capaz de selecionar os principais compostos-teste que, futuramente, serão utilizados nos experimentos cuja execução não foi possível devido à pandemia por SARS-CoV 2. Ensaios de ligação competitivos com sonda fluorescente poderão verificar a relação entre a afinidade de ligação obtida *in vitro* e a calculada em ensaios de *docking* molecular *in silico*. Já os bioensaios demonstrarão o tipo de resposta comportamental *in vivo* aos compostos selecionados e, em caso positivo, se é de atração ou repelência. Além disso, bioensaios também serão realizados com insetos injetados com o ds*OBP17* para investigar o papel fisiológico da RproOBP17.

Ao realizar a varredura por candidatos a atrativos/repelentes, foi encontrado, acidentalmente, o semioquímico que pode ser responsável pelos altos índices de contaminação do açaí por *T. cruzi*. É razoável levantar a hipótese do papel central da OBP17 na identificação de β-damascenona presente no açaí (-7,0 Kcal/mol). Do ponto de vista do ecossistema, *R. prolixus* é uma espécie considerada silvestre e que se abriga em palmeiras (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2020). Além disso, foi demonstrado que, em condições de laboratório, o *R. prolixus*, dependendo de determinantes ambientais como jejum prolongado, pode alterar sua preferência alimentar, tornando-se um fitófago facultativo (DÍAZ-ALBITER *et al.*, 2016). Quando a alta afinidade da RproOBP17 pela β-damascenona passa a ser considerada, a possibilidade de fitofagia facultativa pode estar intimamente relacionada com a transmissão do *T. cruzi* através da polpa do açaí. A existência de fatores que atraem os triatomíneos para os frutos do açaí vem sendo investigada há algum tempo. Os frutos possuem cinética de crescimento microbiano acelerado, causado por condições ambientais como colheita, armazenamento, transporte e processamento, que gera fermentação espontânea, produzindo

metabólitos como o CO_2, que atraem o inseto (ROGEZ *et al.*, 2012). Também já foi discutido que a geração desses metabólitos se associam com um aumento da temperatura do fruto, atraindo triatomíneos sensíveis a esses gradientes (AGUIAR; MENEZES; ROGEZ, 2013). À luz desse trabalho, é razoável considerar que a fermentação do açaí possa liberar grandes quantidades de β-damascenona, que é detectada pelo inseto com o auxílio da RproOBP17 circulante nas antenas.

7. CONCLUSÕES

Este estudo utilizou ferramentas de bioquímica, biologia molecular e bioinformática para selecionar ligantes candidatos a novos atrativos/repelentes para o *R. prolixus*, inseto vetor da doença de Chagas.

A OBP17 foi selecionada como uma proteína funcional de *R. prolixus* devido ao perfil de expressão exclusiva em antenas, tanto de macho quanto de fêmea, verificado por PCR e qPCR. Utilizando RNAi, foi possível obter 89 % de redução nos transcritos *OBP17*. Os resultados indicaram que RproOBP17 provavelmente está relacionada com a detecção de voláteis produzidos pela glândula de Brindley (2-metilpropanoato de 2-feniletila, 2-feniletanol e 2-metilpropanoato de 2-metilpropila), associados ao comportamento de fuga e defesa.

Protocolos para a expressão e purificação da RproOBP17 foram elaborados com sucesso e a proteína recombinante foi obtida. A utilização desta OBP como alvo molecular para a identificação *in silico* de compostos candidatos a atrativos/repelentes através de uma abordagem por ecologia química reversa sugeriu o cedrol, α-humuleno, β-cariofileno e β-damascenona como os principais ligantes a serem testados. Além disso, durante a varredura por novos compostos comportamentalmente ativos, foi observada grande afinidade pela β-damascenona, o composto aromático mais intenso no açaí, que pode estar relacionado aos altos índices de transmissão da doença de Chagas através do consumo deste fruto.

8. PERSPECTIVAS

A realização de ensaios experimentais utilizando o conhecimento adquirido ao fim deste trabalho precisou ser adiada em decorrência da pandemia por COVID-19, sendo substituída pela análise *in silico*. A abordagem *in silico* identificou ligantes com alta afinidade pela OBP17. Uma vez que o silenciamento do gene *OBP17* mostrou-se eficiente, bioensaios com insetos contendo menos OBP17 circulante serão avaliados quanto à capacidade de identificar outro indivíduo em situação de estresse. Visto que a produção da proteína recombinante foi possível através dos protocolos elaborados, a RproOBP17 será usada em ensaios competitivos de ligação com sonda fluorescente para que a relação entre a energia livre de ligação calculada *in silico* e a afinidade de ligação observada *in vitro* possa ser melhor estudada. Em seguida, os ligantes selecionados serão testados em bioensaios para verificar se a afinidade observada *in vitro* é capaz de produzir resposta comportamental *in vivo* e, em caso positivo, se ela é de atração ou repelência.

9. REFERÊNCIAS

AGUIAR, F.; MENEZES, V.; ROGEZ, H. Spontaneous postharvest fermentation of açai (Euterpe oleracea) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 294–299, 1 dez. 2013.

ANTINORI, S. et al. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, v. 43, p. 6–15, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>.

ANTINORI, S. et al. **Chagas disease in Italy: The study's contribution of Italian researchersPanminerva Medica**Edizioni Minerva Medica, , 1 dez. 2019. . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31362479/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

ANTON, S.; HOMBERG, U. Antennal Lobe Structure. In: **Insect Olfaction**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 97–124.

ARGOLO, A. M. et al. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. **Doença de Chagas e seus …**, p. 63, 2008. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=690417&indexSearch=ID>.

BAILEY, T. L. et al. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. WEB. SERV. ISS., p. 369–373, 2006.

BAILEY, T. L. et al. The MEME Suite. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W39–W49, 2015.

BARROZO, R. B. et al. An inside look at the sensory biology of triatomines. **Journal of Insect Physiology**, v. 97, p. 3–19, 1 fev. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27840287/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

BARTSCH, S. M. et al. The economic value of identifying and treating Chagas disease patients earlier and the impact on Trypanosoma cruzi transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1–22, 2018.

BENELLIA, G. et al. Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α-humulene from Cheilocostus speciosus rhizome essential oil against the Old-World bollworm, Helicoverpa armigera.pdf. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 781–786, 2018.

BENTON, R. et al. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in Drosophila. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 149–162, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135896>.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1410150>. Acesso em: 30 abr. 2021.

BEZERRA-SILVA, P. C. P. C. P. C. P. C. P. C. P. C. P. C. P. C. et al. Evaluation of the Activity of the Essential Oil from an Ornamental Flower against Aedes aegypti: Electrophysiology, Molecular Dynamics and Behavioral Assays.

PLoS ONE, v. 11, n. 2, p. e0150008, 2016. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0150008>.

BIESSMANN, H. et al. The Anopheles gambiae odorant binding protein 1 (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.

BOHMAN, B. et al. Attraction of Rhodnius prolixus males to a synthetic female-pheromone blend. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2018.

BOSCH, O. J.; GEIER, M.; BOECKH, J. Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female Aedes aegypti. **Chemical senses**, v. 25, n. 3, p. 323–330, 2000.

BRAKS, M. A. H.; MEIJERINK, J.; TAKKEN, W. The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae* , to two components of human sweat, ammonia and <scp>l</scp> -lactic acid, in an olfactometer. **Physiological Entomology**, v. 26, n. 2, p. 142–148, 1 jun. 2001. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3032.2001.00227.x>. Acesso em: 30 abr. 2021.

BRIAND, L. et al. Disulfide pairing and secondary structure of ASP1, an olfactory-binding protein from honeybee (Apis mellifera L). **Journal of Peptide Research**, v. 58, n. 6, p. 540–545, 2001.

BRITO, N. F. et al. Current and potential biotechnological applications of odorant-binding proteins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, p. 8631–8648, 2020.

BRITO, N. F.; MOREIRA, M. F.; MELO, A. C. A. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. **Journal of Insect Physiology**, v. 95, p. 51–65, dez. 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191016301081>. Acesso em: 27 jun. 2017.

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. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1840504>.

CHANG, H. et al. Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in Chilo suppressalis. **Scientific Reports**, v. 5, n. August, p. 13093, 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep13093>.

CHENG, W. et al. Functional analysis of odorant-binding proteins 12 and 17 from wheat blossom midge sitodiplosis mosellana géhin (Diptera: Cecidomyiidae). **Insects**, v. 11, n. 12, p. 1–15, 2020.

DA SILVA, R. C. S. et al. (E)-Caryophyllene and α-humulene: Aedes aegypti oviposition deterrents elucidated by gas chromatography-electrophysiological assay of commiphora leptophloeos leaf oil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.

DAMBERGER, F. F. et al. Structural basis of ligand binding and release in insect pheromone-binding proteins: NMR structure of Antheraea polyphemus PBP1 at pH 4.5. **Journal of molecular biology**, v. 373, n. 4, p. 811–9, 2007.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17884092>.

DANSA-PETRETSKI, M. et al. **Antioxidant role of Rhodnius prolixus heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidationJournal of Biological Chemistry**, 1995. .

DE BRUYNE, M.; BAKER, T. C. Odor detection in insects: volatile codes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 7, p. 882–897, jul. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18535862>. Acesso em: 23 set. 2015.

DE OLIVEIRA, A. C.; SOCCOL, V. T.; ROGEZ, H. Prevention methods of foodborne Chagas disease: Disinfection, heat treatment and quality control by RT-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, n. April, p. 34–40, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.04.009>.

DE OLIVEIRA, W. All-around care for patients with Chagas disease: A challenge for the XXI century. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 181–186, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000900024&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 30 abr. 2021.

DEISIG, N. et al. Responses to Pheromones in a Complex Odor World: Sensory Processing and Behavior. **Insects**, v. 5, n. 2, p. 399–422, 17 jan. 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4592597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 5 mar. 2016.

DIAS, J. C. P. **Control of chagas disease in BrazilParasitology Today**Parasitol Today, , 1987. . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15462880/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

DÍAZ-ALBITER, H. M. et al. Everybody loves sugar: First report of plant feeding in triatomines. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1401-0>.

DRAKOU, C. E. et al. The crystal structure of the AgamOBP1•Icaridin complex reveals alternative binding modes and stereo-selective repellent recognition. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 2, p. 319–338, 2016.

DU, S. et al. Computational investigation of the molecular conformation-dependent binding mode of (E)-β-farnesene analogs with a heterocycle to aphid odorant-binding proteins. **Journal of Molecular Modeling**, v. 24, n. 3, 2018.

DU, X. et al. Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–34, 2016.

DUAN, S. G.; LI, D. Z.; WANG, M. Q. Chemosensory proteins used as target for screening behaviourally active compounds in the rice pest Cnaphalocrocis medinalis (Lepidoptera: Pyralidae). **Insect Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 123–135, 2019.

DUMONTEIL, E.; GOURBIÈRE, S. Predicting Triatoma dimidiata abundance and infection rate: A risk map for natural transmission of Chagas disease in the Yucatán Peninsula of Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and**

Hygiene, v. 70, n. 5, p. 514–519, 2004.

EINSENBERG, D.; LUTHY, R.; BOWEI, J. Verify3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in enzymology**, v. 277, p. 396–404, 1997.

ESCANDÓN-VARGAS, K.; MUÑOZ-ZULUAGA, C. A.; SALAZAR, L. Blood-feeding of. p. 299–302, 2017.

FEENEY, M.; MURPHY, K.; LOPILATO, J. Designing PCR Primers Painlessly. **Journal of Microbiology & Biology Education**, v. 15, n. 1, p. 28–29, 2014.

FELICIANGELI, M. D. et al. Morphometric evidence for a possible role of Rhodnius prolixus from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela). **Acta Tropica**, v. 101, n. 2, p. 169–177, 2007.

FERRÈ, F.; CLOTE, P. DiANNA: A web server for disulfide connectivity prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, 2005.

FERREIRA, R. A. et al. Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, 26 set. 2007.

FERREIRA, R. T. B. et al. Detection and genotyping of Trypanosoma cruzi from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2018.

FITZPATRICK, S. et al. Molecular genetics reveal that silvatic Rhodnius prolixus do colonise rural houses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, 2008.

FORSTNER, M. et al. Differential expression of SNMP-1 and SNMP-2 proteins in pheromone-sensitive hairs of moths. **Chemical Senses**, v. 33, n. 3, p. 291–299, 2008.

FORSTNER, M.; BREER, H.; KRIEGER, J. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkmoth Antheraea polyphemus. **International journal of biological sciences**, v. 5, n. 7, p. 745–57, 2009. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2793307&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

FORSYTH, C. J. et al. “You Don’t Have a Normal Life”: Coping with Chagas Disease in Los Angeles, California. **Medical Anthropology: Cross Cultural Studies in Health and Illness**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33784220/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

FOX, A. N. et al. Candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito Anopheles gambiae and evidence of down-regulation in response to blood feeding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14693–14697, 2001.

FRANCO-PAREDES, C. et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 36, n. October 2019, p. 101565, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101565>.

FRANCO, T. A. et al. Silencing the odorant receptor co-receptor RproOrco affects the physiology and behavior of the Chagas disease vector Rhodnius prolixus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 82–90, fev. 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174815000442>. Acesso em: 27 jun. 2017.

FRANCO, T. A. et al. 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**, v. 103, n. October, p. 46–52, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.004>.

GALINDO, K.; SMITH, D. P. A large family of divergent Drosophila odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. **Genetics**, v. 159, n. 3, p. 1059–1072, 2001.

GALVÃO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil [online]. In: **Zoologia: guias e manuais de identificação series**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 289.

GARCIA, E. S. et al. O Sistema Neuroendócrino de Insetos. **Tópicos avançados em entomologia**, p. 1–26, 2012. Disponível em: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo_8_O_Sistema_Neuroendocrino_de_Insetos.pdf>.

GONG, D. P. et al. The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, bombyx mori. **BMC Genomics**, v. 10, 2009.

GRÄTER, F. et al. Pheromone Discrimination by the Pheromone-Binding Protein of Bombyx mori. **Structure**, v. 14, n. 10, p. 1577–1586, 2006.

GROSSE-WILDE, E. et al. A Pheromone-binding protein mediates the bombykol-induced activation of a pheromone receptor in vitro. **Chemical Senses**, v. 31, n. 6, p. 547–555, 2006.

GROSSE-WILDE, E. et al. Candidate pheromone receptors provide the basis for the response of distinct antennal neurons to pheromonal compounds. **The European journal of neuroscience**, v. 25, n. 8, p. 2364–2373, abr. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17445234>. Acesso em: 18 jan. 2016.

GUERENSTEIN, P. G.; GUERIN, P. M. A comparison of volatiles emitted by adults of three triatomine species. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 111, n. 2, p. 151–155, maio 2004.

GUERENSTEIN, P. G.; LAZZARI, C. R. Host-seeking: How triatomines acquire and make use of information to find blood. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2–3, p. 148–158, maio 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18983971/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

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

Journal of physiology, Paris, v. 108, n. 2–3, p. 96–111, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928425714000175>.

HANSSON, B. S.; STENSMYR, M. C. **Evolution of insect olfactionNeuron**Cell Press, , 8 dez. 2011. .

HASHIMOTO, K.; SCHOFIELD, C. J. Elimination of Rhodnius prolixus in Central America. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 45, 22 dez. 2012. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-45>. Acesso em: 30 abr. 2021.

HE, M.; HE, P. Molecular characterization, expression profiling, and binding properties of odorant binding protein genes in the whitebacked planthopper, Sogatella furcifera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 174, n. 1, p. 1–8, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.04.008>.

HE, P. et al. **Silencing the odorant coreceptor (Orco) disrupts sex pheromonal communication and feeding responses in Blattella germanica: toward an alternative target for controlling insect-transmitted human diseases**. [s.l: s.n.]

HEKMAT-SCAFE, D. S. et al. Genome-Wide Analysis of the Odorant-Binding Protein Gene Family in Drosophila melanogaster. **Genome Research**, p. 1357–1369, 2002.

HORST, R. et al. NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14374–9, 2001. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=64689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

HU, K. et al. Three odorant-binding proteins are involved in the behavioral response of Sogatella furcifera to rice plant volatiles. **PeerJ**, v. 2019, n. 3, p. 1–14, 2019.

ISHIDA, Y.; ISHIBASHI, J.; LEAL, W. S. Fatty acid solubilizer from the oral disk of the blowfly. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e51779, 2013. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0051779>.

ISHIDA, Y.; LEAL, W. S. Rapid inactivation of a moth pheromone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 14075–14079, 2005.

ISHIDA, Y.; LEAL, W. S. Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 26, p. 9076–9080, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18579770>.

JIANG, Q. et al. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 7, p. 440–447, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.04.004>.

JOHNSON, K. P. et al. Phylogenomics and the evolution of hemipteroid insects. v. 115, 2018.

JU, Q. et al. Two odorant-binding proteins of the dark black chafer (Holotrichia parallela) display preferential binding to biologically active host plant volatiles. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–14, 2018.

KAISSLING, K. E. K.-E. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: A kinetic model revised. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 195, n. 10, p. 895–922, 1 fev. 2009. Disponível em: <http://chemse.oxfordjournals.org/content/26/2/125.long>. Acesso em: 1 fev. 2016.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.053%5Cn10.1038/nprot.2015.053%5Cnhttp://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2015.053%5Cnhttp://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2015.053>.

KIM, M. S.; REPP, A.; SMITH, D. P. LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in Drosophila melanogaster. **Genetics**, v. 150, n. 2, p. 711–721, 1998.

KIM, S. et al. PubChem substance and compound databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 2016.

KNOLS, B. G. J. et al. Behavioural and electrophysiological responses of the female malaria mosquito Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) to Limburger cheese volatiles. **Bulletin of Entomological Research**, v. 87, n. 2, p. 151–159, 1997. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/bulletin-of-entomological-research/article/abs/behavioural-and-electrophysiological-responses-of-the-female-malaria-mosquito-anopheles-gambiae-diptera-culicidae-to-limburger-cheese-volatiles/A9312DEC0F56960AE9C60A6996468E52>. Acesso em: 30 abr. 2021.

KO, H. J.; PARK, T. H. Enhancement of odorant detection sensitivity by the expression of odorant-binding protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 7, p. 1017–1023, fev. 2008. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0956566307004368/1-s2.0-S0956566307004368-main.pdf?_tid=3933a1cc-67c5-11e7-b298-00000aab0f6c&acdnat=1499948422_f44adc7b347fcc9e4b4d656e04332860>. Acesso em: 13 jul. 2017.

KRIEGER, J. et al. Binding proteins from the antennae of Bombyx mori. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 297–307, mar. 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0965174895000968>. Acesso em: 18 jan. 2016.

KRÖBER, T. et al. Odorant-binding protein-based identification of natural spatial repellents for the African malaria mosquito Anopheles gambiae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 96, p. 36–50, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.008>.

KRUSE, S. W. et al. Structure of a specific alcohol-binding site defined by the odorant binding protein LUSH from Drosophila melanogaster. **Nature structural biology**, v. 10, n. 9, p. 694–700, 2003.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LAGARDE, A. et al. Crystal structure of a novel type of odorant-binding protein from Anopheles gambiae, belonging to the C-plus class. **The Biochemical journal**, v. 437, p. 423–430, 2011.

LARSSON, M. C. et al. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. **Neuron**, v. 43, n. 5, p. 703–14, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627304005264>.

LARTIGUE, A. et al. The crystal structure of a cockroach pheromone-binding protein suggests a new ligand binding and release mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 30213–30218, 2003.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LATORRE-ESTIVALIS, J. M. et al. Molecular basis of peripheral olfactory plasticity in Rhodnius prolixus, a Chagas disease vector. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 3, n. JUL, p. 1–9, 2015.

LAUGHLIN, J. D. et al. Activation of Pheromone-Sensitive Neurons Is Mediated by Conformational Activation of Pheromone-Binding Protein. **Cell**, v. 133, n. 7, p. 1255–65, 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4397981&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

LAZZARI, C. R.; LORENZO, M. G. Exploiting triatomine behaviour: Alternative perspectives for their control. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 65–70, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000900011&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 30 abr. 2021.

LEAL, W. S. **Proteins that make sense**. [s.l: s.n.]

LEAL, W. S. Pheromone Reception. **Topics in Current Chemistry**, v. 240, p. 1–36, 2005. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/b98314>. Acesso em: 18 jan. 2016.

LEAL, W. S. et al. Unusual pheromone chemistry in the navel orangeworm: Novel sex attractants and a behavioral antagonist. **Naturwissenschaften**, v. 92, n. 3, p. 139–146, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668783>.

LEAL, W. S. Molecular-based chemical prospecting of mosquito attractants and repellents. In: DEBBOUN, M.; FRANCES, S. P.; STRICKMAN, D. (Ed.). **Insect Repellents - Principles, Melhods and Uses**. 1st. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006a. p. 495.

LEAL, W. S. Molecular-Based Chemical Propecting of Mosquito Attractants and Repellents. In: M., D.; FRANCES S.; STRICKMAN D. (Ed.). **Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses**. 1st. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006b. p. 495.

LEAL, W. S. et al. Reverse and conventional chemical ecology approaches for the development of oviposition attractants for Culex mosquitoes. **PloS one**, v. 3, n. 8, p. e3045, 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2516325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

LEAL, W. S. Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 120928130709004, 2013.

LEE, D.; REDFERN, O.; ORENGO, C. Predicting protein function from sequence and structure. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 12, p. 995–1005, 2007.

LEITE, N. R. et al. Structure of an Odorant-Binding Protein from the Mosquito Aedes aegypti Suggests a Binding Pocket Covered by a pH-Sensitive "Lid". **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. 1–7, 2009.

LI, S. et al. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito Aedes aegypti. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, n. 3, p. 464–468, 1 ago. 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X08009649>. Acesso em: 2 fev. 2016.

LI, T. T. et al. Crystal structure and ligand identification of odorant binding protein 4 in the natural predator Chrysopa pallens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 1004–1012, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.043>.

LI, Z. et al. Three odorant binding proteins may regulate the behavioural response of Chrysopa pallens to plant volatiles and the aphid alarm pheromone (E) - b -farnesene. v. 00, n. 1, p. 1–11, 2017.

LI, Z. X. et al. Identification and expression of odorant-binding proteins of the malaria-carrying mosquitoes Anopheles gambiae and Anopheles arabiensis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 58, n. 3, p. 175–189, 2005.

LIM, S. H. et al. Aroma Characteristics of Acai Berry. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 122–127, 2016. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=KR2017000761>. Acesso em: 23 abr. 2021.

LINDH, J. M. et al. Discovery of an oviposition attractant for gravid malaria vectors of the Anopheles gambiae species complex. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2015. Disponível em: <???>.

LIU, N. Y. et al. Two general-odorant binding proteins in Spodoptera litura are differentially tuned to sex pheromones and plant odorants. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 180, p. 23–31, 2015. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.11.005>.

LORENZO FIGUEIRAS, A. N.; LAZZARI, C. R. Aggregation behaviour and interspecific responses in Rhodnius prolixus stål. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 569–571, 2002.

LORENZO, M. G.; MELO, A. C. do A. Olfação e Comportamento. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. [s.l: s.n.]

MAJEROWICZ, D. et al. Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 713–722, 2011.

MALESZKA, J. et al. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (Apis mellifera). **Development Genes and Evolution**, v. 217, n. 3, p. 189–196, 2007.

MANRIQUE, G. et al. 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. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 9, p. 2035–2052, 2006.

MANSUR, J. F. et al. Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the Chagas disease vector Rhodnius prolixus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51, n. 1, p. 110–121, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.12.006>.

MAO, Y. et al. Crystal and solution structures of an odorant-binding protein from the southern house mosquito complexed with an oviposition pheromone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 44, p. 19102–19107, 2010. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/early/2010/10/12/1012274107>.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Burden of Chagas disease in Brazil, 1990–2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 3–4, p. 301–310, 2019.

MATSUO, T. et al. Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in Drosophila sechellia. **PLoS Biology**, v. 5, n. 5, p. 0985–0996, 2007.

MAY-CONCHA, I. et al. Volatile compound diversity and conserved alarm behaviour in Triatoma dimidiata. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.

MBARE, O.; LINDSAY, S. W.; FILLINGER, U. Testing a pyriproxyfen auto-dissemination station attractive to gravid Anopheles gambiae sensu stricto for the development of a novel attract-release -and-kill strategy for malaria vector control. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2019.

MBOERA, L. E. G.; TAKKEN, W.; SAMBU, E. Z. The response of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) to traps baited with carbon dioxide, 1-octen-3-ol, acetone, butyric acid and human foot odour in Tanzania. **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, n. 2, p. 155–159, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10948375/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, v. 16, n. 4, p. 404–405, 2000.

MESQUITA, R. D. et al. Genome of Rhodnius prolixus, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 48, p. 14936–14941, 1 dez. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627243>. Acesso em: 27 jun. 2017.

MEZA, F. C. et al. Behavioural and Electrophysiological Responses of Female Anopheles gambiae Mosquitoes to Volatiles from a Mango Bait. **Journal of Chemical Ecology**, v. 46, n. 4, p. 387–396, 2020.

MINOLI, S.; PALOTTINI, F.; MANRIQUE, G. The main component of an alarm pheromone of kissing bugs plays multiple roles in the cognitive modulation of the escape response. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. JUN, p. 1–10, 2013.

MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. CAPÍTULO 15 Resistência e Inseticidas : Estratégias , Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos . **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, p. 1–23, 2012.

MOSQUERA, K. D.; LORENZO, M. G. Triatomines of the Genus Rhodnius Do Not Mark Shelters with Feces. **Journal of Chemical Ecology**, v. 46, n. 9, p. 865–870, 2020.

MOTA, T. et al. A Multi-species Bait for Chagas Disease Vectors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. 1–8, 2014.

NARARAKA, J. et al. Excito-repellent activity of β-caryophyllene oxide against Aedes aegypti and Anopheles minimus. **Acta Tropica**, v. 197, 2019.

NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE L, J. E. **Revisão dos semioquímicos que mediam a oviposição em mosquitos: Uma possível ferramenta sustentável para o monitoramento e controle de CulicidaeRevista Brasileira de Entomologia**Sociedade Brasileira De Entomologia, , 2009. . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0085-56262009000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 30 abr. 2021.

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 biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 4, p. 398–415, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174807002548>.

OLIVEIRA, D. S. et al. Proteomic analysis of the kissing bug Rhodnius prolixus antenna. **Journal of Insect Physiology**, v. 100, n. 1, p. 108–118, jul. 2017. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0022191017300744/1-s2.0-S0022191017300744-main.pdf?_tid=5e85eab6-67c5-11e7-aeca-00000aacb35d&acdnat=1499948485_0f1f3ac4ef62fe286ae42d38b289a2cd>. Acesso em: 27 jun. 2017.

OLIVEIRA, D. S. et al. Functional characterization of odorant binding protein 27 (RproOBP27) from rhodnius prolixus antennae. **Frontiers in**

Physiology, v. 9, n. AUG, p. 1–11, 2018.

OLIVEIRA, P. L. et al. A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, Rhodnius prolixus. Isolation and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 18, p. 10897–10901, 1995.

OZAKI, M. et al. A putative lipophilic stimulant carrier protein commonly found in the taste and olfactory systems - A unique member of the pheromone-binding protein superfamily. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, n. 1, p. 298–308, 1995.

PAGADALA DAMDARAM, K. J. et al. Computational reverse chemical ecology: Virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for Bactrocera dorsalis. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 209, 2014. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/209>.

PELLETIER, J. et al. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 3, p. 245–8, 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2837830&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

PELOSI, P. et al. Soluble proteins in insect chemical communication. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 14, p. 1658–1676, 2006.

PELOSI, P. et al. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. **Biological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 184–200, 7 fev. 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/brv.12339>. Acesso em: 13 jul. 2017.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

PHILLIPS, M. et al. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 16_suppl, p. 9510–9510, 2007.

PIRES, H. H. R. et al. Aggregation behaviour in Panstrongylus megistus and Triatoma infestans: Inter and intraspecific responses. **Acta Tropica**, v. 81, n. 1, p. 47–52, 1 jan. 2002.

PIRMOHAMMADI, M. et al. Chemical composition and repellent activity of Achillea vermiculata and Satureja hortensis against Anopheles stephensi. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 201–210, 2016.

PONTES, G. et al. Female odours promote the activation of sheltered kissing bug Rhodnius prolixus males and modulate their orientation. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, n. 3, p. 257–263, 2014.

PONTES, G. B. et al. Metasternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug, Rhodnius prolixus. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 4, p. 450–457, 2008.

PONTES, G. B.; LORENZO, M. G. Female metasternal gland odours mediate male aggregation in Rhodnius prolixus, a triatomid bug. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 1, p. 33–36, 2012.

PROVECHO, Y. M. et al. The peri-urban interface and house infestation with Triatoma infestans in the Argentine Chaco: An underreported process? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 923–934, 2014.

QIAO, H. et al. Discrimination of alarm pheromone (E)-β-farnesene by aphid odorant-binding proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 5/6, p. 414–419, 2009. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lah&AN=20093203872&site=ehost-live%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/journal/09651748%5Cnemail: ppelosi@agr.unipi.it>.

REBIJITH, K. B. et al. RNA Interference of Odorant-Binding Protein 2 (OBP2) of the Cotton Aphid, Aphis gossypii (Glover), Resulted in Altered Electrophysiological Responses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 251–266, 2016.

RIBEIRO, J. M. C. J. M. C. et al. An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, Rhodnius prolixus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 27, 9 jan. 2014. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002594>. Acesso em: 27 jun. 2017.

RINKER, D. C. et al. Blood meal-induced changes to antennal transcriptome profiles reveal shifts in odor sensitivities in Anopheles gambiae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 20, p. 8260–5, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3657813&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

RIVIÈRE, S. et al. A pheromone-binding protein from the cockroach Leucophaea maderae: cloning, expression and pheromone binding. **The Biochemical journal**, v. 371, n. Pt 2, p. 573–9, 15 abr. 2003. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1223297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 5 fev. 2016.

RODRIGUEZ-SAONA, C. R.; STELINSKI, L. L. Behavior-modifying strategies in IPM: Theory and practice. In: **Integrated Pest Management**. [s.l.] Springer Netherlands, 2009. 1p. 263–315.

ROGERS, M. E. et al. Antennal SNMPS (sensory neuron membrane proteins) of lepidoptera define a unique family of invertebrate CD36-like proteins. **Journal of Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 47–61, 2001.

ROGEZ, H. et al. Kinetic Modeling of Anthocyanin Degradation and Microorganism Growth during Postharvest Storage of Açai Fruits (*Euterpe oleracea*). **Journal of Food Science**, v. 77, n. 12, p. C1300–C1306, 1 dez. 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.02996.x>. Acesso em: 25 abr. 2021.

ROJAS, J. C. et al. A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compounds of Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 256–265, 2002.

RYTZ, R.; CROSET, V.; BENTON, R. Ionotropic Receptors (IRs):

Chemosensory ionotropic glutamate receptors in Drosophila and beyond. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 9, p. 888–897, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.02.007>.

SAKURAI, T.; NAMIKI, S.; KANZAKI, R. Molecular and neural mechanisms of sex pheromone reception and processing in the silkmoth Bombyx mori. **Frontiers in Physiology**, v. 5 MAR, n. March, p. 1–20, 2014.

SANCHEZ-MARTIN, M. J. et al. Could the Chagas disease elimination programme in Venezuela be compromised by reinvasion of houses by sylvatic Rhodnius prolixus bug populations? **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 10, p. 1585–1593, out. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17002733/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

SANDLER, B. H. et al. Sexual attraction in the silkworm moth: Structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. **Chemistry and Biology**, v. 7, n. 2, p. 143–151, 2000.

SATO, K. et al. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 1002–6, 24 abr. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature06850>. Acesso em: 18 jan. 2016.

SCHNEIDER, D. Insect Antennae. **Annual Review of Entomology**, v. 9, n. 1, p. 103–122, 28 jan. 1964. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.09.010164.000535>. Acesso em: 30 abr. 2021.

SCHOFIELD, C. J. Triatominae: biology & control. **Triatominae: biology & control.**, 1994.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics and evolution of the Triatominae. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 16 Suppl 2, p. 89–92, 2000.

SICILIANO, P. et al. Identification of pheromone components and their binding affinity to the odorant binding protein CcapOBP83a-2 of the Mediterranean fruit fly, Ceratitis capitata. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 48, n. 1, p. 51–62, 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174814000319>.

SILVA-OLIVEIRA, G. et al. Insulin receptor deficiency reduces lipid synthesis and reproductive function in the insect Rhodnius prolixus. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1866, n. 2, p. 158851, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158851>.

SIMOSSIS, V. A.; HERINGA, J. PRALINE: A multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. 289–294, 2005.

SMARTT, C. T.; ERICKSON, J. S. Expression of a novel member of the odorant-binding protein gene family in Culex nigripalpus (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 6, p. 1376–1381, 2009.

SPINELLI, S. et al. Crystal structure of Apis mellifera OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules. **Insect**

Biochemistry and Molecular Biology, v. 42, n. 1, p. 41–50, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.10.005>.

SULLIVAN, G. A.; LIU, C.; SYED, Z. Oviposition signals and their neuroethological correlates in the Culex pipiens complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 735–743, 1 dez. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25460826/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

SUN, L. et al. The antenna-specific odorant-binding protein AlinOBP13 of the alfalfa plant bug Adelphocoris lineolatus is expressed specifically in basiconic sensilla and has high binding affinity to terpenoids. **Insect Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 417–434, 2014.

SUN, L. et al. The Mouthparts Enriched Odorant Binding Protein 11 of the Alfalfa Plant Bug Adelphocoris lineolatus Displays a Preferential Binding Behavior to Host Plant Secondary Metabolites. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. June, p. 1–10, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2016.00201>.

SUN, S. et al. Molecular Screening of Behaviorally Active Compounds with CmedOBP14 from the Rice Leaf Folder Cnaphalocrocis medinalis. 2019.

SUN, Y.-L. et al. Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling Helicoverpa species. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30040, 2012a. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3264552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SUN, Y. F. et al. Two odorant-binding proteins mediate the behavioural response of aphids to the alarm pheromone (e)-??-farnesene and structural analogues. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012b. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3299684&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SWARUP, S.; WILLIAMS, T. I.; ANHOLT, R. R. H. Functional dissection of Odorant binding protein genes in Drosophila melanogaster. **Genes, brain, and behavior**, v. 10, n. 6, p. 648–57, 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3150612&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SYED, Z. et al. Bombykol receptors in the silkworm moth and the fruit fly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 20, p. 9436–9439, 2010.

SYED, Z.; LEAL, W. S. Acute olfactory response of Culex mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 44, p. 18803–18808, 2009.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2 B, p. 703–708, 2006.

TEGONI, M.; CAMPANACCI, V.; CAMBILLAU, C. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 5, p. 257–264, 2004.

THOMAZINI, M. J. A Comunicação Química entre os Insetos: Obtenção e Utilização de Feromônios no Manejo de Pragas. In: **Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia.** Rio Branco: EMBRAPA Acre, 2009. p. 338–354.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145–154, 2011.

TOMASINO, E.; BOLMAN, S. The Potential Effect of β-Ionone and β-Damascenone on Sensory Perception of Pinot Noir Wine Aroma. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 5, 27 fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33673491/>. Acesso em: 25 abr. 2021.

TOMBERLIN, J. K. et al. Indole: An evolutionarily conserved influencer of behavior across kingdoms. **BioEssays**, v. 39, n. 2, 2016.

TSITSANOU, K. E. et al. Anopheles gambiae odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: Implications for structure-based design of novel mosquito repellents. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 2, p. 283–297, 2012.

TSITSANOU, K. E. et al. Crystal and solution studies of the “plus-C” odorant-binding protein 48 from Anopheles gambiae: Control of binding specificity through three-dimensional domain swapping. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 46, p. 33427–38, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24097978>.

VALDEZ TAH, A. R. Making Sense of Chagas Disease among Mexican Immigrants in California. **Medical Anthropology: Cross Cultural Studies in Health and Illness**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33798000/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

VAZQUEZ-PROKOPEC, G. M. et al. Spatiotemporal patterns of reinfestation by Triatoma guasayana (Hemiptera: Reduviidae) in a rural community of northwestern Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 571–581, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16119545/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

VIEIRA, F. G.; ROZAS, J. Comparative Genomics of the Odorant-Binding and Chemosensory Protein Gene Families across the Arthropoda: Origin and Evolutionary History of the Chemosensory System. **Genome Biology and Evolution**, v. 3, n. 0, p. 476–490, 2011. Disponível em: <http://gbe.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/gbe/evr033>.

VITTA, A. C. R. et al. Aggregation mediated by faeces and footprints in Triatoma pseudomaculata (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 865–867, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000600020&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 30 abr. 2021.

VITTA, A. C. R. et al. Behavioral and electrophysiological responses of triatoma brasiliensis males to volatiles produced in the metasternal glands of females. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 10, p. 1212–1221, 2009.

VITTA, A. C. R.; LORENZO, M. G. Copulation and mate guarding behavior in Triatoma brasiliensis (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 4, p. 789–795, 2009.

VOGT, R. G. et al. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug Lygus lineolaris (Hemiptera, heteroptera). **Chemical Senses**, v. 24, n. 5, p. 481–495, 1999.

VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M. Pheromone Binding and Inactivation by Moth Antennae. **Nature**, v. 293, n. 5828, p. 161–163, 10 set. 1981. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v293/n5828/pdf/293161a0.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2015.

VOSSHALL, L. B.; HANSSON, B. S. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. **Chemical Senses**, v. 36, n. 6, p. 497–498, 2011.

WANG, Q. et al. Sensilla localization and sex pheromone recognition of odorant binding protein OBP4 in the mirid plant bug Adelphocoris lineolatus (Goeze). **Journal of Insect Physiology**, v. 121, p. 104012, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104012>.

WANG, Q. et al. The *Adelphocoris lineolatus* OBP4: Support for evolutionary and functional divergence of a mirid pheromone-binding protein from that found in lepidopteran moths. **Insect Science**, p. 1744- 7917.12919, 22 abr. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1744-7917.12919>. Acesso em: 25 abr. 2021.

WANG, S. Y. et al. Specific involvement of two amino acid residues in cis-nerolidol binding to odorant-binding protein 5 AlinOBP5 in the alfalfa plant bug, Adelphocoris lineolatus (Goeze). **Insect Molecular Biology**, v. 22, n. 2, p. 172–182, 2013.

WHISSTOCK, J. C.; LESK, A. M. Prediction of protein function from protein sequence and structure. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 36, n. 3, p. 307–340, 2003.

WICHER, D. et al. dOr83b--receptor or ion channel? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1170, p. 164–7, jul. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686130>. Acesso em: 18 jan. 2016.

WIGGLESWORTH, V. B.; GILLETT, J. D. The Function of the Antennae in *Rhodnius prolixus*: Confirmatory Experiments. **Journal of Experimental Biology**, v. 11, n. 4, p. 408–408, 1 out. 1934. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jeb/article/11/4/408/3906/The-Function-of-the-Antennae-in-Rhodnius-prolixus>. Acesso em: 30 abr. 2021.

WISNIVESKY-COLLI, C. et al. Dispersive flight and house invasion by Triatoma guasayana and Triatoma sordida in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 27–32, 1993. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761993000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 30 abr. 2021.

WOGULIS, M. et al. The crystal structure of an odorant binding protein from Anopheles gambiae: Evidence for a common ligand release mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, p. 157–164, 2006.

WOJTASEK, H.; LEAL, W. S. Conformational change in the pheromone-binding protein from Bombyx mori induced by pH and by interaction with membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30950–30956, 1999.

XU, P. et al. Drosophila OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. **Neuron**, v. 45, n. 2, p. 193–200, 2005.

XU, P. et al. Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 46, p. 16592–16597, 2014.

XU, P. X.; ZWIEBELT, L. J.; SMITH, D. P. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, Anopheles gambiae. **Insect Molecular Biology**, v. 12, p. 549–560, 2003.

YIN, J. et al. Selectivity of odorant-binding proteins from the southern house mosquito tested against physiologically relevant ligands. **Frontiers in physiology**, v. 6, n. February, p. 56, 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4343023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Insect pheromones: Technology and challenges for a competitive agriculture in brazil. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 722–731, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300016&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 30 abr. 2021.

ZHANG, X. et al. Silencing of odorant binding protein gene AlinOBP4 by RNAi induce electrophysiological responses declining of Adelphocoris lineolatus to six semiochemicals. **Insect Science**, v. 24, n. 5, p. 789–797, 2017.

ZHOU, J.-J. et al. “Plus-C” odorant-binding protein genes in two Drosophila species and the malaria mosquito Anopheles gambiae. **Gene**, v. 327, n. 1, p. 117–129, 2004a.

ZHOU, J. J. et al. Revisiting the odorant-binding protein LUSH of Drosophila melanogaster: evidence for odour recognition and discrimination. **FEBS Lett**, v. 558, n. 1–3, p. 23–26, 2004b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759510>.

ZHOU, J. J. et al. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito Aedes aegypti: Genome annotation and comparative analyses. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 2, p. 147–163, 2008.

ZWIEBEL, L. J.; TAKKEN, W. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 645–652, 2004.

ZWIEBEL, L. J.; TAKKEN, W.; ZWEIBEL L.J. AND W. TAKKEN.

Olfactory regulation of mosquito–host interactions. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 34, n. 7, p. 645–652, 2004.

ANEXOS

ANEXO I Material Suplementar

Sequências de proteínas usadas para a construção da árvore filogenética

- O peptídeo sinal que foi retirado está destacado em vermelho.

>AgamOBP47_GenBank_AAQ16280
MVESHVRALISTTISTLQNAAECCVTPFLVEPSAFMTCHSKWIGQTKRQMAMEGIPRGCCVAECVMNSTSLYSNG
KIDREALTKLYLASTKSMAPEWNKITLDAIDGCFKMADTIKDEIEAGAKLTPAFEGEQICHPISGTILACMGMTL
FAECPAKLFTVNDDCNKLKSYHSKCPFL

>AgamOBP48_GenBank_AAQ16281
MGQRQRVVVQLALCFLTFGALLQAGVLAGDNPCAAGPPVDTNPAECCPTPMLVDGTIMMDCYKKYGEQTKKQLQM
DGIPRGCCIAECAMNATNMYADGMLKRDDLSKMFMDAVKDKPEWMSLVRDATNACFELAEKKMDEIEAGAKLEPS
FEGEKICHPISGTILRCMGMMMFAQCPASVFNVNENCNKLREYGSICPMI

>AlinOBP1_GenBank_ACZ58027.1
MNSLIPVLLVVCAAATRADEQTNAMVAKAFNKCREEFPISDDEIGGVREKTTIPESHNAKCLMACMLREGKMLRD
GKYEKENALIMADVLNKDDPASADKAKQLVETCAGKVGTDAGGDECEFAYKMAVCAAEEAKKLGVRPPDF
>AlinOBP2_GenBank_ACZ58028.1
MSLKIQFFVFAAICAACVCAYQEQLKQTIRDCQDGKEVTDDELEEFTKPLIPRNREEKCIMACVMRTYNIISNGH
YDPKIAFGILKGILKDHPEKLNKIKEVMDHCGEDVPSHMDDECDLAGEIMQCEVKYQKAMGMA

>AlinOBP4_GenBank_ ACZ58030.1
MRIFVIFTAALTCVMAGELPEEMKEMAQGLHDSCVEETGVDNGLIAPCAKGNFADDAKLRCYFKCVFGNLGVISD
EGELDAEAFGSILPDSMQELLPTIKSCGGTTGSDPCDLAMNFNKCLQKADPVNFLVI

>AlinOBP5GenBank_ACZ58031.1
MVLKMNLLLVVLVMSQVFFSVTEAAMSQAQMKQAMKTVRNMCIPKSGVDKEALAKMVNGEFDESDQKLKCYLGCV
LGMMQAVKNNKINLTMVRNQITKMLAPERGQRILAAFESCATVTGDDNCGLAFRFAKCIYDTDKEAFIVP
>AlinOBP8_GenBank_ACZ58079.1

MDTHFGLLIASLAILHTANAVINKDYLEKVVTAKDKCLKEFNVDDSVVEDFIVKYNKPQSESGKCMVACFMEERG
MMKDGKTITEQVMLDNQEKWIAATHVNMGKEVIDTCDKEVPNEENDKCDLAVDYMMCLVKRGDEAGLPKMDVAQL
KH

>AlinOBP9_GenBank_ACZ58080.1
MMELWKWRLALIIFGLVSCIQQTEGSQRTKQQPKSKTKESVVGATRPRDAKATECVNKVNANEEESASFFRKEIP
ETEAGKCLLACYLEGKGLIVGGKISSSGAARVAARAYPNNRVKTGNVKHILSHCGTIAGRESNNCEMAYKLADCT
TTLSDKFRL

>AlinOBP10_GenBank_ACZ58081.1
MFFNSVFLLVVCVSSYVTKGQELPPPGDVKNKTVVFKNSFLRSAKYCSSIYETSTLAIMALLMSEKSDDQNGKCF
LNCMLQRYRLMSQDGSYNKDKFKPFLEYIPDSKFLQSIRGNLKNCISEKDPDPCEKASKFIKCFYTRARNKGEIG
ASKEVIPADGF
>AlinOBP11_GenBank_ACZ58082.1
MKTFVGLIFAVALVEFASAISKEYHDKAIEAKNTCAKLHNVDDETIMTYWKNHQLPEKEPETCIVICYLKEMKLV
VDGKVDADAWKASNKEKWDDEKHVAAADEIVDKCSAEVPPTENECEWGLALTKCALKHGKEAGIPPPDMEHPKRR

>AlinOBP13GenBank_ACZ58084.1
MNISTRMISLTMAYLAAALVSGHRALDGILPQANQDECREESNFRGELNDDVGRNVTQELKCFAACSLMKLGIMN
EKDGTVNMTRLDELIASHTPGKDAADVFKTTVVEPCMKEVKKSTDYCEYSYQLIACGMSKVP

>AlucOBP24_GenBank_AMQ76477.1

MSTKLRSVGMILAIAITHVCAYQEQLKETIKQCQDGREVTDDEVEEFTKPLVPKNQEERCLVACVFKEYKVIIDG
HFDPVNALNVAKMVYKDYPEKWKRIKDVIDHCGEDIPTHNDNECDLAGDIMNCEVKYLNSMPKGVSLELLAGSIA
ATAEP

>AlucOBP38_GenBank_AMQ76491.1
MGFKFVKYRSYFFVLVIHIILCIQIKAKELTDEQKEQIFAEIKNCMESTKLTDEEFESIMAKKELPTSKEGKCFT
KCLMEKMEYLEEGGKINVIAVQAGLEENMEKESEITKAKEIIQQCADTVPPEDSCEYAYGISQCMYTKMKEAGIS
GGP

>ApisOBP3GenBank_NP_001153529.1
MISSTFYITLVFGIAMLISCGHGRFTTEQIDYYGKACNASEDDLVVVKSYKVPTTETGKCLMKCMITKLGLLNDD
GSYNKTGMEAGLKKYWSEWSTEKIESINNKCYEEALLVSKEVVATCNYSYTVMACLNKQLDLDKST

>ApolPBP1GenBank_CAA35592.1
MLRKISLLLLPVFVAINLVHSSPEIMKNLSNNFGKAMDQCKDELSLPDSVVADLYNFWKDDYVMTDRLAGCAINC
LATKLDVVDPDGNLHHGNAKDFAMKHGADETMAQQLVDIIHGCEKSAPPNDDKCMKTIDVAMCFKKEIHKLNWVP
NMDLVIGEVLAEV

>ApolPBP2GenBank_CAB86718.1
MSLSLFLAMLVTINLVQASPEIMKNLCMNYGKTMDQCKQELGLPDSVINDLYNFWKDDYVMTDRLAGCAINCLST
KLDIVDPDGNLHHGNAKEFAMKHGADDGMAQQLVDIIHRCEKSTPPNDDKCTKTMDIAMCFKKEIHKLNWVPNMD
LVVCEVLAVV

>BtabOBP4_GenBank_AQS80477.1
MKSFIAVLAVLFVFACVQAQDAKQKVAAVAEKCKTEVHGGHDVLRIVGTSELPKTEEQRCFLECVYKNLQLIVDD
KFAEPGAKRLMMMKYGSNPDQLKIAQTEIETCAKEVKPTAGMKCSLAHNIRQCFAKEGQKRNFYIKA

>CcapOBP83a-2GenBank_CDJ79887.1
MYILRTILGALLWCSVLLNLIWAQKELRRDETYPPPELLEALRPVHDKCVAKTGVTEEAIKEFSDGEIHEDEPLK
CYMYCVFEETDVLHEDGEVHLEKLLDSLPNSMHNIALHMGKKCLYPKGDTKCERAFWLHRCWKESDPKHYFLI

>CpalPBP1_GenBank_ ADK66921.1
SQTVMKSMTKNFLKAYEVCAKEYSLKEGTAGILIGFWKDDFSTTSRDVGCAILCLSTKLDLIDPEGKLHHGKATE
FAMQHGSGEEMAKKLVEILHNCEQTVTPNEDKCMRALDIAMCFKKELHTLGWAPDPELLFEELIAEMR

>CpalOBP10_GenBank_ AKM52558.1
MLQFGLVRFCVSVYCLFLMSSSVEGLSEEMQELVNMLHTNCIEETGVAEGTIEDARNLNFAEDEKLKCYMRCLMI
QMATMDDDGIIDVDATIALLPDEMKTVFSGPLKTCGTKVGANHCD1NAFQTNKCWADILKTDYYLI

>CpalOBP15_GenBank_KP403736.1
MKFLVVLCLTIVCSYAEPLRIRGGQEVDIGDYFHVCKRNKEFNTCLQETLQEALPKWAKGIPELGITQLDPFIEP
EITINFKQNQFQGHATMRNVRMYGFSNVLIKNVESELTDDKLAIDVDCFFPRLETEGNFKGQGSFNAIVLNTKGY
YNMSMSEVSAIWKIRGEKEVINGEEFMKIKSFTMRPKVEKMKIYVSDLFPGNPELNQATNMFLNENWQRIYNELL
PYAEKYWSTAMAKIANEVFLKVPYDDLIPLN

>CpunOBP2_GenBank_ALC76550.1
MMKDMTKNFLKAYGECQQELHLTDDTARDLMFFWKEDYEVTSREAGCTILCLSKKLEIIDPEGKLHKGKTADFIK
QHGSDEETAQKVIDVLHACEASAVPNEDHCIMALGVATCFKKEIHKLNWAPDTEVLLEELMAEMSER

>CquiOBP1_GenBank_CPIJ007604
MAARCAKTLVLFSAVLGIAVVVLADVTPRRDAEYPPPELLEALKPLHDICAKKTGVTDEAIIEFSDGKIHEDEKL
KCYMNCLFHEAKVVDDNGDVHLEKLHDSLPNSMHDIAMHMGKRCLYPEGENLCEKAFWLHKCWKQADPKHYFLV

>CquiOBP2_GenBank_CPIJ007617
MFTTTVLGLGLLLLLQVGLISCEEPRRDAEYPPPEFLVKMKPMHDECVAETGASEDAIKRFSDQEIHEDDNLKCY
MNCLFHKAGVVNDKGEFHYVKIQDFLPESMHLITLNWFKRCLYPQGENLCEKAFWLNKCWKERDPVHYFLP

>CquiOBP5_GenBank_CPIJ007608
MTVATWLSSSVLIRAAPQQRAPDFPPASLIELTVASRKVCVDETGVTEDSIARFNNEPEVFDDDERLKCYMDCMF
RQFNVTKPDTGDVDMIELYHAIPKEYNSVTLKVYNKCRDVVEGSTLCERAFSHHKCWKQNDPVHYYLF

>CquiOBP6_GenBank_ACR43436.1
MERFTFVILVLFLKLLGPSDGAMTMKQLKNSLEMMRKACAPKFKVDDASLNELTAGNFRSDPDPELKCYTVCIAQ
MAGTLTKKGEISLSKTTAQIDAMLPNEMKAFAKEAMTACKDAQAGYKETCDKIYYSVKCVAEFNKDAFLFP

>DmelOBP76aLUSH_GenBank_AAB58940.1
MKHWKRRSSAVFAIVLQVLVLLLPDPAVAMTMEQFLTSLDMIRSGCAPKFKLKTEDLDRLRVGDFNFPPSQDLMC
YTKCVSLMAGTVNKKGEFNAPKALAQLPHLVPPEMMEMSRKSVEACRDTHKQFKESCERVYQTAKCFSENADGQF
MWP

>LedisVenomPOBP2_GenBank_ATU82459.1
MNTFVFVLAAASAVALVHGATVKPAGNPVREKVVALSKKCAADSKATPDQAKIAFSQDLPKTETERCYLECLYTG
VGAVKDGGFNVEGAKKLASNRFTNSNELGLANKLIESCAKEVAKKEGEKCSLGHSIRECFVKHGKEVNFFPSS

>LmadPBP_GenBank_AY116618.1
MRSLQLTCLLAVATATLADSTQSYKDAMGPLVRECMGSVSATEDDFKTVLNRNPLESRTAQCLLACALDKVGLIS
PEGAIYTGDDLMPVMNRLYGFNDFKTVMKAKAVNDCANQVNGAYPDRCDLIKNFTDCVRNSY

>LylinLAP_GenBank_AAC43033.1
MRILVLFTAALTCVMAGELPEEMREMAQGLHDGCVEETGVDNGLIGPCAKGNFADDQKLKCYFKCVFGNLGVISD
EGELDAEAFGSILPDNMQELLPTIRGCAGTTGADPCELAMNFNKCLQKVDPVNFMVI

>MmedOBP1_GenBank_ABM05968.2
MKNIIIFTTAITIFTFINFSQTEARMTMTQIRNAMKPLGKTCLGKTGLSKEVQAGQHNGEFPEDEALMCYHSCLL
KLAKISDKSGNINLDTVHKQIDLMMPEDLIARAKAVTTDCFGEIKSTEICRMSFEFVKCYFIKGPEIVFFP

>MmedOBP6_GenBank_ABO15559.1
MKNTLFFTLAAAFLLGYNIPHVESRMSMAQTINTMKPLGKTCAAKTGLSKEMQDGQHEGQFPEEEALMCYHTCLL
KMAKVADKTGKLNIDAMVKQIDMLMPEDLVDKAKTACSGCADEVTATEGCRPSWEFMKCWYGRAPELYFFP

>MvicOBP3_GenBank_4Z39_B
ASMRFTTEQIDYYGKACNASEDDLVVVKSYKVPSSETGKCLMKCMITKLGLLNDDGSYNKTGMEAGLKKYWSEWS
TEKIESINNKCYEEALLVSKEVIATCNYSYTVMACLNKQLDLDKST

>NribOBP3_GenBank_4Z45_D
ASMRFTTEQIDYYGKACNASEDDLVVVKSYKVPSTETGKCLMKCMITKLGLLNDDGSYNKTGMEAGLKKYWSEWS
TEKIETINNKCYEEALLVSKEVVATCNYSYTVMACLNKQLDLDKST

>RproOBP1_VectorBaseID_ RPRC010284
MKTTLSVLAVFLVIAYVNGAATQSPVKEKVAALAKKCSADHKATPEQTKLVFSQKVPSDEVERCLLECVYTGVGV
IQGGEFSAEGSKKLATLRFSDPKERETVNKLVDTCTKEVTKNKDEKCSLGKSVRECFVKHGEKVHFFPSAN

>RproOBP2_VectorBaseID_ RPRC000378
TEQAKVILSKKVPSDEVEKCLLECVYQEVGVVIEGDEFSVEGSKKLATSRYSDQKELETVHKMIDACTNEVTKNK
DEKCSLGKSVRECFAKHGEKVHFFPSAN

>RproOBP3_VectorBaseID_ RPRC000527
MEARYCIEECVYKGMGLLDESGTALNHQRLTQELNRAVTGAGLWESAMQQAITSCSGATGVYLFFFFKKKKYYIS
YLK

>RproOBP4_VectorBaseID_ RPRC000274
NAPLCQPPTAAPHKLEKVIGQCQEEIKYALIQEALNVLRESVGLSQARNSAAHLRSKRQAFTGEERRIAGCLLQC
VYRKMKAVDESGFPVATGLVKIYSEGVKDRNYYLATIQAVQQCLSREIQNKNNDPKIVEEGYTCDVAYNMFNCIS
DQIELLCGSTP

>RproOBP6_VectorBaseID_ RPRC004413
MGPSRTIVLVTTFTLTTLLLITNTNGAMSEAQMKQAMKTLRGMCLGKSGVTTETLDKMQEGVFNDDDRNLKCYLG
CIMGMLQVVKNNKISLKMVKSQVAKMLEPDMGKRLIAAFEGCKDTVGEDNCDLAYKFAKCIYVADSSAFIVP

>RproOBP7_VectorBaseID_ RPRC000311
MCKLVILLTVFVLQMYLISAQEVNEELWGKAEKKCQQLSKLSSIERASILTSLGNISRTAKCYVNCFFEEVGLMI
GAAVNSTLLHSWLKEEAEISENKEELYNRIKTCVDAITVEDKCDKAYELYICFENR

>RproOBP8_VectorBaseID_ RPRC000564
MQDMEVCKNDTKMSDEEFSELMAQQMPKSPEGKCFIFCMMRSMTLMSEEGELNSEGCSAMIAEAPIDDDQKEKMK
GMPEECAKEGCEKKEDPCETAYRISLCFQKKAEEVNKHIYF

>RproOBP9_VectorBaseID_ RPRC000194
MNMLTILATFCFLIAAVNCRVLKQEDALEKCSKENSIDRELAQKIISHQAHATTPNEKCLIACYLKVKRYLLNHQ
IDWVAIYKSHAARITDETEKEKVKAIFEECEANSYENKDDCQIAYDAYECKKL

>RproOBP10_VectorBaseID_ RPRC000560
MKNFSLIIFNCFVICGVICVTITDTPAFFESVVEKCSAEHRIDKNEARRMIGNVRRYALTEDDKCMLSCYMKERQ
YFVNGKINWQRIFIPVSIMLSTESERSTMWANFLNCDKYLSYGVRNDCQIAYESLRCFEDVMNA

>RproOBP11_VectorBaseID_ RPRC004408
MKTIAVIAIVCYLFVATESFPSHSPELDTCSTKHHLSKDRARQLAIHSVQATDDNEKCFLSCYLKERGYLVDGRV
DFDKLLENHKKFQPTLFEELKKTFDECKKNLDYNGKNECEVAYQAYSCAFTRP

>RproOBP12_VectorBaseID_ RPRC000492
MMVHFYPLLIGILIVNSVYKVDSTGGETVKKALEVLSKCQKEFSVDDGTLSKLMDFSRVPQSAEAKRMVTCWMNG
VGFLEDGKPCVEEIKRWHRVLYTSEEHQKLADENVDICSASLKAKEEGELAYELTNCFVSLAEKTGLPPPKLRI

>RproOBP13_VectorBaseID_ RPRC000177
MLFYAALIVAHAIYFTDAVAELKGLTKSELLDLEKKTMAECLSKHGIEKSVHTDYLKNQPLDVSKEFKCAIGCYV
GEVGYVIDRRTRWSAIEEVHDIEYKSEENKEKAAQVLRICKTIVPEVGEDSCEAGFALYSCYMKEAIKIDLHP

>RproOBP14_VectorBaseID_ RPRC004407
MFLYAVLLVTCTVLCTYAALDLKGMTKTKLAELEAKKMSECLKKFGVNITTLSGYLNEESNNTTKEFKCVLGCFT
EEMGYGKDNKPLWDIMEEVHKIEYETKEDKEKALKIVETCKTIVPEEAEDSCELGFAMHSCYTAQARKLGLTLE

>RproOBP15_VectorBaseID_ RPRC008413
MDGDVASLKKKDIPTTEKGKMKKGKFNSKNTMKIAHKAYPNDAEKINKVIEILDSCGTKESKNGAETVRRVLRKF
DYHGRVAWKNPFVMVFTFNTFLVEQ

>RproOBP16_VectorBaseID_ RPRC011610
MLSRVFTILLFLWFGLFNLVLLQRPKTGGHPQNKTALLKASFIESSKYCSERHDVNMVQMLVLFSEKEVNDYKGK
CYLHCMLQRYRLMDKDGNYLKDRFQPFMEYIPISNFLKTLKKNLNYCLNQDSEDPCEKAYRFIKCFQMRGGTKTN
PFQETEVQPADGF

>RproOBP17_VectorBaseID_RPRC000118
MHPLTLVLGAVFYTLFEGAYAAVELSDDMKEMAKMLHDQCIDESGVNGALIEPCAKGDFSEDGNLKCYFKCIFAN
MGALSDDGELDAEAFESILPPDLHDPLSKMINSCKDAKGANACEVAFNFNKCLYNADPEHFLVI

>RproOBP18_VectorBaseID_ RPRC001924
MNSFVAFTLFACISAASVTAEDNEKILQIFNKCSEMHKISDDELAMIQSKQSVPSSAEAKCMAACMLKEGKLIIG
TTYMKDNALMIADALYKDSADMASKAREVVEHCATEVGVDTAGDDCEFAYKLAVCSDNHAKKIGVTRPF

>RproOBP19_VectorBaseID_ RPRC000593
MRYYLPVLLIAFCIAATKALDENVKDKILGTFRKCRNQHPISDKVQQIKNFESVPSSREAKCLAACMLKEAGMLR
DGKYNKEVAKFVAEGVHEDQQEVVKSKEMIDHCTAKVGEFAGDDECEFAYRMAICSHDYAKK

>RproOBP20_VectorBaseID_ RPRC007008
MKGFGAICVFAIAITLSLAIDEAAKKKAINTFNKCREQYPITDAELEKLKKHESLPTSENAKCLAKCMLMEGNML
KDGKYRKDIAITFAETLHSDNAEEAEKARQVVEFCANEVGTEVKGDACEHAYKMAECSFNKAKEIGLEKPEWEN

>RproOBP21_VectorBaseID_ RPRC001925
MKALLLIVFMSVSINKIICENATESDEADPETVQYLTCIQKYNLTGTEVATKGSYAEKCGHACAMKAKGMLSDDG
EFIKDRMLLQGFPPNMTYVEMTRMQMAIEMCARQVTQEEDECEKVSALMDCLHTKMKDPRNLRKVK

>RproOBP22_VectorBaseID_ RPRC000115

FLNCIKKNDVLGPSGEIYFLQKDSPDSGNVCTQMLGIPNERLVNKNITKEVLEEIEMMVLEECRIKFNIAEIIDD
YFNESVPLPVNEDFKCMLQCQDERLGYINNQIINWDLIRVVQNIYYKDYDNSKKYLEVVDNCEQKGEFSIVVKIE
QYYMHADR

>RproOBP23_VectorBaseID_ RPRC000174
MKYLCIIVSCLLHYVYTAQQNVTELSKKELSDLEDEVMEKCREKHNVGEEIFSKLEAISQHKEELPSSKDFKCML
GCFAEEMGYAKDAQPQWETMVAVHKIEYEKEEDANKAIQVVETCKKSVPEKEEDICELGYSMATCYLLESEKLGL
DLV

>RproOBP24_VectorBaseID_ RPRC009905
MAHFKKVICTLTVLFLALVSGYKEELRATMKSCKNGQDVTDAEIEEFMKPLIPKTDEEKCLMACVFKAFNVIDNG
HYDPKIALAVASDLMKNEPEKLQKIKNIIDHCGDDVPRKMDNECELASEIMQCVVKYEREVGIA

>RproOBP25_VectorBaseID_ RPRC000257
ATCGPLQTYVRCRLESNISMRILGEISRLELLQLPVSQEGKCYIACLLRSSGLVINTEGDIDPYNVISLGRKYAV
DRSKLLRMETVVLECGNQGNFHFISYFIQY

>RproOBP26_VectorBaseID_ RPRC000182
MSKLYFCLVLLTAFYFAQSHVQRREVQNEKVVLSNLTPKQLDDLERKVYEECAVKLNVDKGYVEKYFRNDTGVPD
DVGFKKITGCYGEKMGYVSGTKPNWERLRESYEVYYKDNKEDLETALKIVDECQKIPLDNLDGNEVNYTLAKCTK
EGYLKSGLEW

>RproOBP27_VectorBaseID_ RPRC009914
MHLFGYILVGLAVVDLVLSIQEIKGLNKKEIQELELRSLEECRVEYNVDKSEVQNYLDMDKVIPDNDGFKKVLGC
YAGKMTFVDDTRINWDKVRLAAEIYHENEKEYRDKSLKLIDECEKKCKLSYEGLSHNEVSYVVAKCIKDGYVQRG
IKW

>SfurOBP2_GenBank_AGZ04902.1
MSTLLNFVFVFLVCLCSYSEASPALTEAQIEQVGKAMANMCISSSGVQRSLITKAMTGEIEDDRKLKCFFGCIME
AVQVTKNGKMQPEVLKRRANAMLPKTMREMILPTIDSCSHIENEDKCELAYSIVKCHFSVNGKNPFFFNF

>SfurOBP3_GenBank_AGZ04903.1
MPPVFRTAHDKFESCLEELSSIFPPPPPPNGHHGPPPPGGPGGHGPPPPPPPGGRRGPPPGFGGPPGHEPPIFAC
AHECLFNKTGLLENGKLNVEALKKKLEGELGDDEVWKNLLQSIVDKCMESKDPPSNDMCTSGSHELARCVLRDMF
MNCPQEKWKESDDCSNMKMKLEKCPELVPPMAMRLSQPPMP

Sequências de proteínas usadas para a busca por motivos conservados

- O peptídeo sinal que foi retirado está destacado em vermelho.

```
>AaegOBP1_GenBank_AAO74643.1
MNGSVVFVLSALVSLSVGDVTPRRDAEYPPPEFLEAMKPLREICIKKTGVTEEAIIEFSDGKVHEDENLK
CYMNCLFHEAKVVDDTGHVHLEKLHDALPDSMHDIALHMGKRCLYPEGENLCEKAFWLHKCWKESDPKHYFLI

>AaegOBP22_GenBank_6P2E_A
MEFTVSTTEDLQRYRTECVSSLNIPADYVEKFKKWEFPEDDTTMCYIKCVFNKMQLFDDTEGPLVDNLVHQLAHG
RDAEEVRTEVLKCVDKNTDNNACHWAFRGFKCFQKNNLSLIKASIKKD

>AgamOBP1_GenBank_AAO12081
MKLVTFVFAALLCCSMTLGDTTPRRDAEYPPPELLEALKPLHDICLGKTGVTEEAIKKFSDEEIHEDEKLKCYMN
CLFHEAKVVDDNGDVHLEKLHDSLPSSMHDIAMHMGKRCLYPEGETLCDKAFWLHKCWKQSDPKHYFLV

>AgamOBP4_GenBank_3Q8I_A
MTMKQLTNSMDMMRQACAPKFKVEEAELHGLRKSIFPANPDKELKCYAMCAQMAGTMTKKGEISFSKTM
AQIEAMLPPEMKTMAKEALTHCKDTQTSYKDPCDKAYFSAKCAADFTPDTFMFP

>AgamOBP20_GenBank_AAO12087
MLFVFFTLLSCTKKKKIFPLRKEQMMKSGEMIRSVCLGKTKVAEELVNGLRESKFADVKELKCYVNCV
MEMMQTMKKGKLNYDASVKQIDTIMPDELAGPMRAALDICRTVADGIKNNCDAAYVLLQCLSKNNPKF
IFP

>AgamOBP47_GenBank_AAQ16280
MVESHVRALISTTISTLQNAAECCVTPFLVEPSAFMTCHSKWIGQTKRQMAMEGIPRGCCVAECVMNS
TSLYSNGKIDREALTKLYLASTKSMAPEWNKITLDAIDGCFKMADTIKDEIEAGAKLTPAFEGEQICH
PISGTILACMGMTLFAECPAKLFTVNDDCNKLKSYHSKCPFL

>AgamOBP48_GenBank_AAQ16281
MGQRQRVVVQLALCFLTFGALLQAGVLAGDNPCAAGPPVDTNPAECCPTPMLVDGTIMMDCYKKYGEQTKKQLQM
DGIPRGCCIAECAMNATNMYADGMLKRDDLSKMFMDAVKDKPEWMSLVRDATNACFELAEKKMDEIEAGAKLEPS
FEGEKICHPISGTILRCMGMMMFAQCPASVFNVNENCNKLREYGSICPMI

>AmelASP1_GenBank_NP_001011590.1
MASNTKQAFIYSLALLCLHAIFVNAAPDWVPPEVFDLVAEDKARCMSEHGTTQAQIDDVDKGNLVNEPSITCYMY
CLLEAFSLVDDEANVDEDIMLGLLPDQLQERAQSVMGKCLPTSGSDNCNKIYNLAKCVQESAPDVWFVI

>AmelASP2_GenBank_ AAL60418.1
MNTLVTVTCLLAALTVVRGIDQDTVVAKYMEYLMPDIMPCADELHISEDIATNIQAAKNGADMSQLGCLKACVMK
RIEMLKGTELYVEPVYKMIEVVHAGNADDIQLVKGIANECIENAKGETDECNIGNKYTDCYIEKLFS

>AmelOBP14_GenBank_ABD92646.1
MKTIVLIFGFCVCVGALTIEELKTRLHTEQSVCKTETGIDQQKANDVIEGNIDVEDKKVQLYCECILKNFNILDK
NNVFKPQGIKAVMELLIDENSVKQLVSDCSTISEENPHLKASKLVQCVSKYKTMKSVDFL

>AtraPBP1_GenBank_ACX47890.1
MKMHLFVQVIAASVMLMAGVDSSPEIMKDLSINFGKALDTCKKELDLPDSINEDFYKFWKEDYEITNRLTGCAIK
CLSEKLEMVDADGKLHHGNAREFAMKHGADDAMAKQLVDLIHGCEKSIPPNDDRCMEVLSIAMCFKKEIHNLKWA
PNMEVVVGEVLAEV

>BmorGOBP2_GenBank_001037498.1
MFSFLILVFVASVADSVIGTAEVMSHVTAHFGKTLEECREESGLSVDILDEFKHFWSDDFDVVHRELGCAIICMS
NKFSLMDDDVRMHHVNMDEYIKGFPNGQVLAEKMVKLIHNCEKQFDTETDDCTRVVKVAACFKKDSRKEGIAPEV
AMIEAVIEKY
```

>BmorPBP1AcessionNumber:AGR44781.1
MSIQGQIALALMVYMAVGSVDASQEVMKNLSLNFGKALDECKKEVGKMTLTDAINEDFYNFWKEGYEIKNRETGC
AIMCLSTKLNMLDPEGNLHHGNAMEFAKKHGADETMAQQLIDIVHGCEKSTPANDDLCIWTLGVATCFKAEIHKL
NWAPSMDVAVGEILAEV

>CpalOBP4_GenBank_ 6JPM_A
MLTEAQMASTANLMRKMCQPKTKVTDEQINNFHKGVFDDDKKMMCYMNCILETMKIIKNGKLDMSAVEQQMPTLP
KKYQESTKKSIEECKSADTGDKCEPAYNFAKCLYLSNPEMYFLP

>CquiOBP1_GenBank_CPIJ007604
MAARCAKTLVLFSAVLGIAVVVLADVTPRRDAEYPPPELLEALKPLHDICAKKTGVTDEAIIEFSDGKIHEDEKL
KCYMNCLFHEAKVVDDNGDVHLEKLHDSLPNSMHDIAMHMGKRCLYPEGENLCEKAFWLHKCWKQADPKHYFLV

>DmelOBP76aLUSH_GenBank_AAB58940.1
MKHWKRRSSAVFAIVLQVLVLLLPDPAVAMTMEQFLTSLDMIRSGCAPKFKLKTEDLDRLRVGDFNFPPSQDLMC
YTKCVSLMAGTVNKKGEFNAPKALAQLPHLVPPEMMEMSRKSVEACRDTHKQFKESCERVYQTAKCFSENADGQF
MWP

>LmadOBP1_GenBank_ 1OW4_A
MDIGINSDPNSSTQSYKDAMGPLVRECMGSVSATEDDFKTVLNRNPLESRTAQCLLACALDKVGLISP
EGAIYTGDDLMPVMNRLYGFNDFKTVMKAKAVNDCANQVNGAYPDRCDLIKNFTDCVRNSY

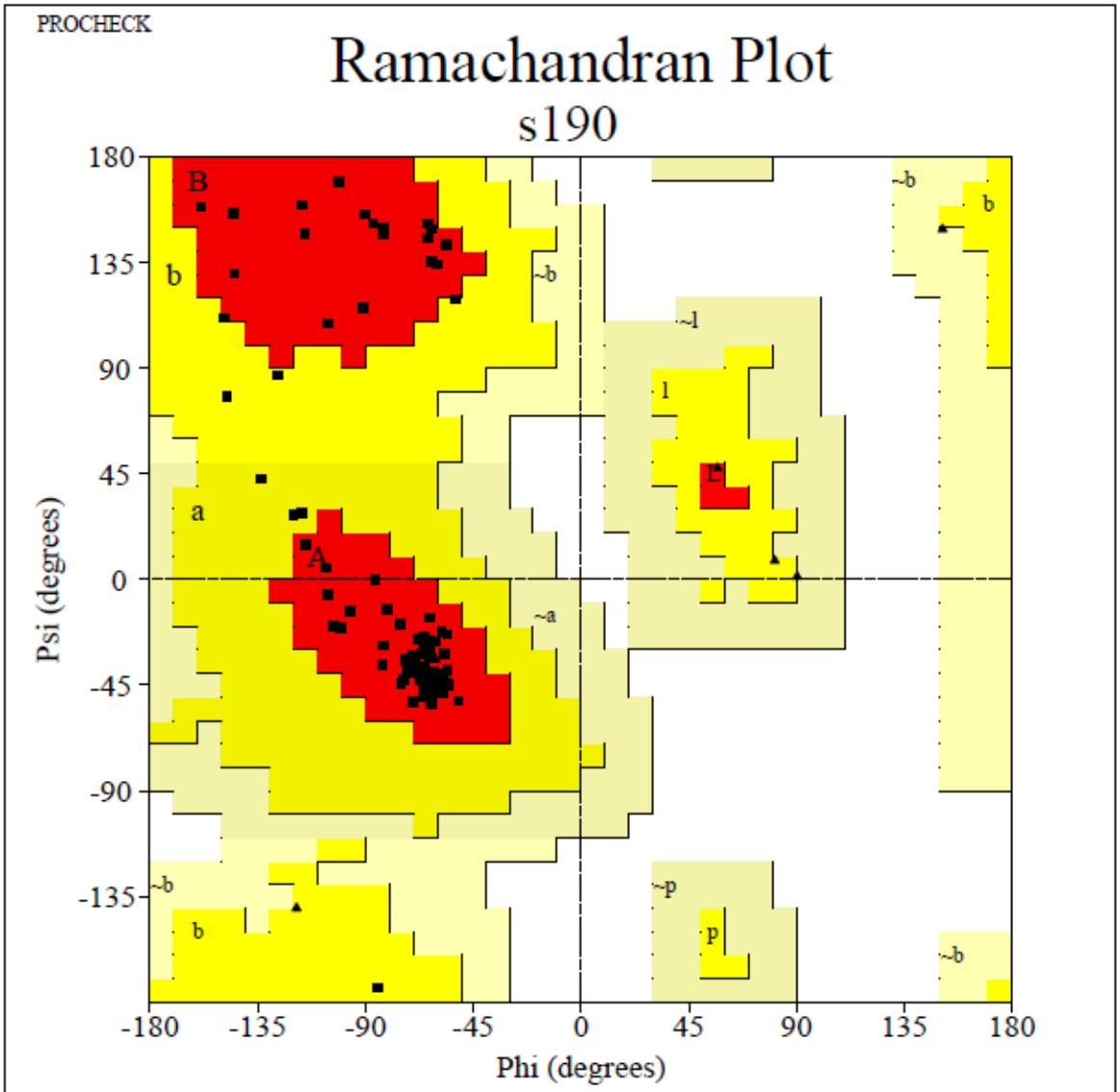
>LmigOBP1_GenBank_4PT1_B
MDVNMKLTGRIMDAAKEVDHTCRSSTGVPRDMLHRYAEGQTVDDDDFKCYLKCIMVEFNSLSDDGVFVLEEELEN
VPPEIKEEGHRVVHSCKHINHDEACETAYQIHQCYKQSDPELYSLVVRAFDATIGD

>MvicOBP3_GenBank_4Z39_B
ASMRFTTEQIDYYGKACNASEDDLVVVKSYKVPSSETGKCLMKCMITKLGLLNDDGSYNKTGMEAGLKKYWSEWS
TEKIESINNKCYEEALLVSKEVIATCNYSYTVMACLNKQLDLDKST

>NribOBP3_GenBank_4Z45_D
ASMRFTTEQIDYYGKACNASEDDLVVVKSYKVPSTETGKCLMKCMITKLGLLNDDGSYNKTGMEAGLKKYWSEWS
TEKIETINNKCYEEALLVSKEVVATCNYSYTVMACLNKQLDLDKST

>RproOBP17_VectorBaseID_RPRC000118
MHPLTLVLGAVFYTLFEGAYAAVELSDDMKEMAKMLHDQCIDESGVNGALIEPCAKGDFSEDGNLKCYFKCIFAN
MGALSDDGELDAEAFESILPPDLHDPLSKMINSCKDAKGANACEVAFNFNKCLYNADPEHFLVI

Validação da qualidade estereoquímica do modelo pelo PROCHECK



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	94	93.1%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	7	6.9%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
	---	------
Number of non-glycine and non-proline residues	101	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	7	
Number of proline residues	5	

Total number of residues	115	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

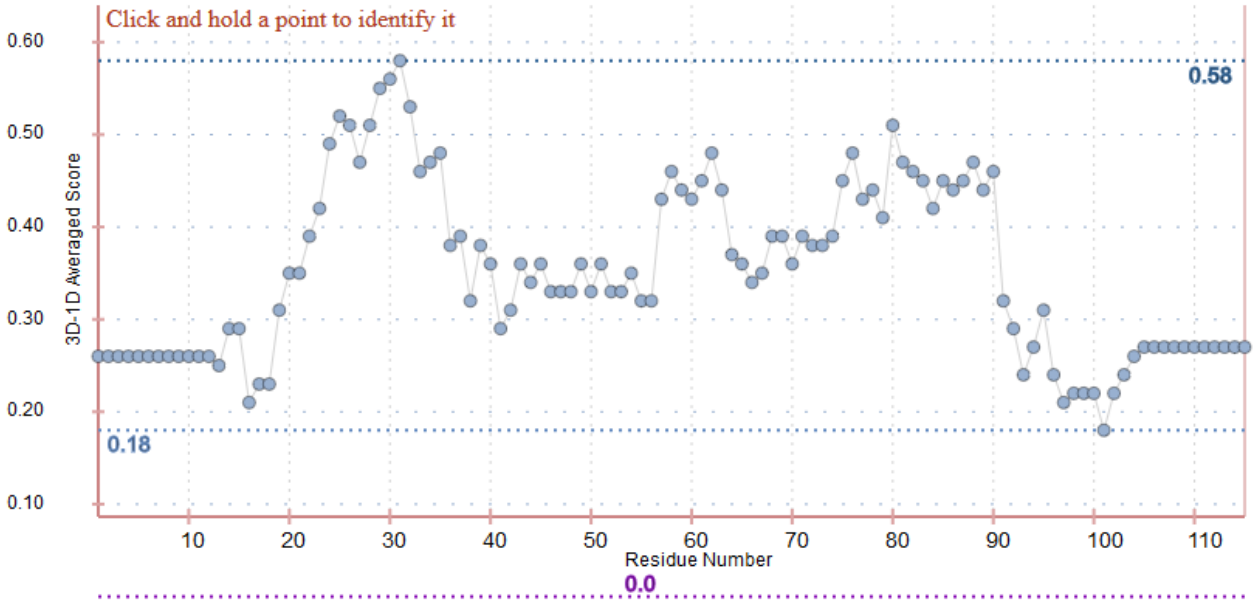
s190_01.ps

Validação do perfil 3D do modelo pelo VERIFY3D

Verify 3D Results plot

99.13% of the residues had an averaged 3D-1D score >= 0.2

Pass
At least 80% of the amino acids have scored >= 0.2 in the 3D/1D profile.



Busca contra banco de dados usando o *Mascot*

Busca contra o bando de dados de peptídeos preditos de *R. prolixus*. *Scores* de íons maiores que 33 indicam identidade. RproOBP17 corresponde à RPRC000118, na nomenclatura do *VectorBase*.

(a) F6_Superdex

1. RPRC000118-PA Mass: 15569 Score: 60 Matches: 3(2) Sequences: 3(2)
hypothetical protein|protein_coding|GL563191:926680-930619:1|gene:RPRC000118
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
☑ 21	541.2455	1080.4764	1080.4724	0.0041	0	30	0.019	1	U	K.GDFSEDGNLK.C
☑ 50	721.3365	1440.6584	1440.6456	0.0129	0	53	0.0001	1	U	K.GANACEVAFNFNK.C
☑ 54	795.8983	1589.7820	1589.7548	0.0272	0	12	1.3	1	U	K.CLYNADPEHFLVI.-

(b) F7_Superdex

1. RPRC000118-PA Mass: 15569 Score: 70 Matches: 3(2) Sequences: 3(2)
hypothetical protein|protein_coding|GL563191:926680-930619:1|gene:RPRC000118
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
☑ 22	541.2509	1080.4872	1080.4724	0.0149	0	34	0.0074	1	U	K.GDFSEDGNLK.C
☑ 43	721.3368	1440.6590	1440.6456	0.0135	0	53	0.0001	1	U	K.GANACEVAFNFNK.C
☑ 53	795.8947	1589.7748	1589.7548	0.0200	0	13	1	1	U	K.CLYNADPEHFLVI.-

(c) F8_Superdex

1. RPRC000118-PA Mass: 15569 Score: 76 Matches: 3(2) Sequences: 3(2)
hypothetical protein|protein_coding|GL563191:926680-930619:1|gene:RPRC000118
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
☑ 17	541.2504	1080.4862	1080.4724	0.0139	0	33	0.01	1	U	K.GDFSEDGNLK.C
☑ 37	721.3378	1440.6610	1440.6456	0.0155	0	67	4.1e-006	1	U	K.GANACEVAFNFNK.C
☑ 43	795.8954	1589.7762	1589.7548	0.0214	0	24	0.071	1	U	K.CLYNADPEHFLVI.-

ANEXO II Artigo publicado

BRITO, Nathália F.; OLIVEIRA, Daniele S.; SANTOS, Thaisa C.; MOREIRA, Monica F.; MELO, Ana Claudia A. Current and potential biotechnological applications of odorant-binding proteins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 104, p. 8631–8648, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10860-0.

ANEXO III Manuscrito submetido

Author's personal copy

Applied Microbiology and Biotechnology
https://doi.org/10.1007/s00253-020-10860-0

MINI-REVIEW

Current and potential biotechnological applications of odorant-binding proteins

Nathália F. Brito[1] · Daniele S. Oliveira[1] · Thaisa C. Santos[1] · Monica F. Moreira[1,2] · Ana Claudia A. Melo[1,2]

Received: 15 May 2020 / Revised: 22 August 2020 / Accepted: 26 August 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Odorant-binding proteins (OBPs) are small soluble proteins whose biological function is believed to be facilitating olfaction by assisting the transport of volatile chemicals in both vertebrate and insect sensory organs, where they are secreted. Their capability to interact with a broad range of hydrophobic compounds combined with interesting features such as being small, stable, and easy to produce and modify, makes them suitable targets for applied research in various industrial segments, including textile, cosmetic, pesticide, and pharmaceutical, as well as for military, environmental, health, and security field applications. In addition to reviewing already established biotechnological applications of OBPs, this paper also discusses their potential use in prospecting of new technologies. The development of new products for insect population management is currently the most prevailing use for OBPs, followed by biosensor technology, an area that has recently seen a significant increase in studies evaluating their incorporation into sensing devices. Finally, less typical approaches include applications in anchorage systems and analytical tools.

Key points

- *Odorant-binding proteins (OBPs) present desired characteristics for applied research.*
- *OBPs are mainly used for developing new products for insect population control.*
- *Incorporation of OBPs into chemosensory devices is a growing area of study.*
- *Less conventional uses for OBPs include anchorage systems and analytical purposes.*

Keywords Odorant-binding protein · Review · Olfactory system · Biotechnology

Introduction

The olfactory system plays an essential role in maintaining life, representing one of the most basic principles in nature: perception of the environment in order to make sense of odorant cues that elicit behavioral responses which are crucial for survival. It is well established that, through olfaction, mammalians can constantly monitor the ever-changing chemical composition of their surroundings by detecting compounds, some of them in concentrations as low as parts per trillion (Breer 2003). Similarly, insects are able to use various semiochemicals to find one another, locate food sources, oviposition sites, mating partners, suitable hosts and identify predators (Brito et al. 2016).

Knowledge regarding the molecular mechanism involving odorant detection is essential when working towards the discovery of biotechnological applications for olfactory sensing. Despite the morphological differences between the characteristic olfactory organs of vertebrate (sensory epithelium within a nasal chamber) and invertebrate (appendages such as antennae) species, odorants are detected in olfactory neurons by similar mechanisms (Hildebrand and Shepherd 1997). Recent studies have provided more refined insights into aspects related to odorant detection as well as strategies adopted to achieve a better understanding of the olfactory system.

✉ Ana Claudia A. Melo
anamelo@iq.ufrj.br

[1] Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil

[2] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Published online: 05 September 2020

Author's personal copy

Such information has been discussed in excellent reviews over the last years (Firestein 2001; Hansson and Stensmyr 2011; Leal 2011; Sankaran et al. 2012; Pelosi et al. 2014; Grabe and Sachse 2018). In short, after reaching the olfactory organ, volatile organic compounds (VOCs), which have low water solubility and polarity, are transported by odorant-binding proteins (OBPs) across the aqueous environment of mammalian nasal mucus (Zarzo 2007) or insect sensillar lymph, where chemosensory proteins (CSPs) are also found (Brito et al. 2016). They are then presented to membrane-bound olfactory receptors (ORs), where they are detected and signal transduction is initiated. It is worth pointing out that chemosensory receptor families also include gustatory receptors (GRs) and ionotropic receptors (IRs). GRs are related to the processing of information in gustatory sensilla, present on several parts of the body, such as mouthparts and ovipositors in females insects (Dahanukar et al. 2005). IRs are expressed in sensory neurons that respond to many odors but do not express neither ORs nor GRs and are believed to function as ligand-induced ion channels (Benton et al. 2009).

Both vertebrate and invertebrate OBPs are small, soluble proteins with a hydrophobic binding pocket in their compact structure. The main difference between insects and vertebrate classes of OBPs is regarding their three-dimensional structure. Vertebrate OBPs belong to the lipocalin superfamily of proteins and exhibit their typical β-barrel structure (Fig. 1a, b) (Flower 1996; Flower et al. 2000) with a calyx-shaped hydrophobic cavity combined of eight antiparallel β-sheets with a short segment of α-helix at the C-terminus (Sankaran et al. 2012). On the other hand, insects OBPs are an independent gene family composed of six α-helical domains (Fig. 1c, d) folded into very compact globular structures where six conserved cysteines form three interlocked disulfide bridges in an arrangement that provides great stability (Sandler et al. 2000; Tegoni et al. 2004; Brito et al. 2016). Moreover, another important element that should be considered when comparing both classes of OBPs is their number per species: *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* genomes code for 109 and 111 OBPs, respectively (Manoharan et al. 2013) whereas there are only 5 known OBP genes in mice, for example (Shiao et al. 2012; Cave et al. 2019).

Despite the fact that ORs are responsible for the detection and recognition of different odorants (Mombaerts 1999; Korsching 2002; Breer 2003; Leal 2011; Suh et al. 2014; Grabe and Sachse 2018), previous reports indicated that ORs cannot be properly folded when expressed in bacteria (Wang et al. 2016), causing them to be only partly located in the membrane and also found in cell organelles and inclusion bodies (Kaiser et al. 2008). Currently, there are well-established experimental strategies which allow the functional heterologous expression of ORs in eukaryotes. In vitro systems involve cell culture platforms, among which is possible to highlight *Xenopus laevis* oocytes (Franco et al. 2018; Liu et al. 2020) and also human embryonic kidney cells (HEK)

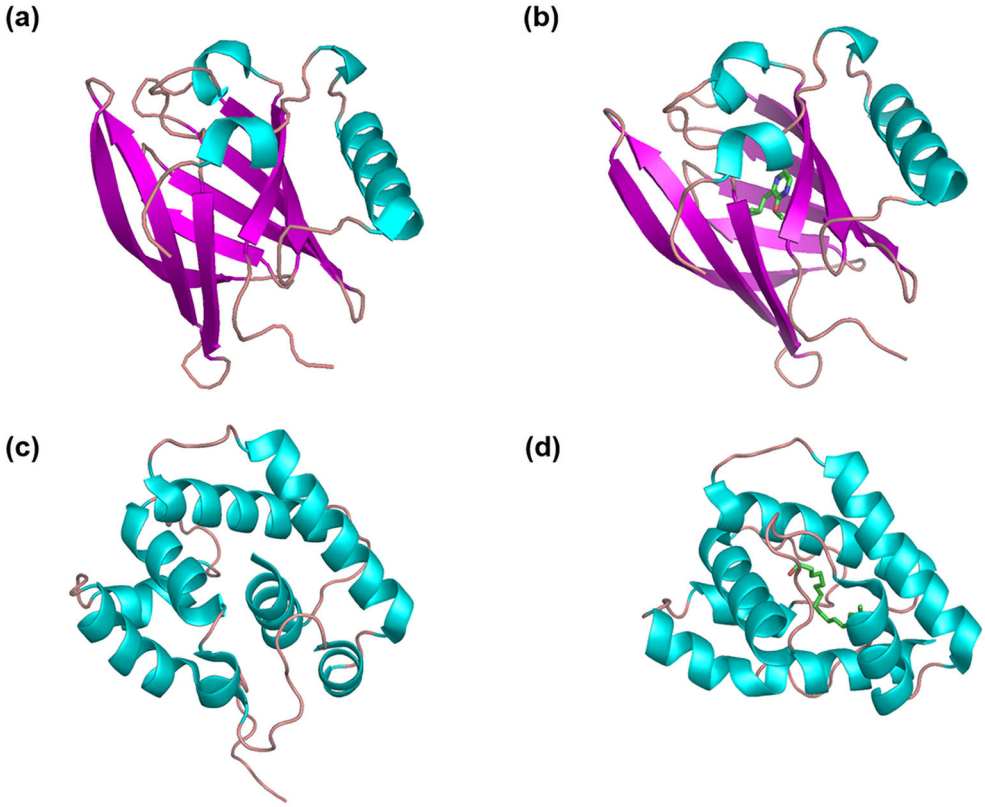


Fig. 1 Representative three-dimensional structures of vertebrate and insect OBPs. α-Helices are shown in cyan, β-barrel in magenta and loops in brown. Presented structures were obtained from the Protein Data Bank (PDB) and prepared using PyMOL software. **a** Odorant-binding protein from the nasal mucosa of a pig, pOBP (PDB ID: 1A3Y). **b** The same protein complexed with pyrazine (2-isobutyl-3-metoxypyrazine) (PDB ID: 1DZK). **c** *Bombyx mori* pheromone-binding protein (BmorPBP) in its unbound form (PDB ID: 1GM0). **d** BmorPBP1 in complex with its natural ligand bombykol (PDB ID: 1DQE)

Author's personal copy

(Corcoran et al. 2014; Hou et al. 2020), while in vivo heterologous expression is based on the use of transgenic *Drosophila* techniques, including the "empty neuron" system (Dobritsa et al. 2003; Chahda et al. 2019) and the Or67d^{GAL4} knock-in system (Kurtovic et al. 2007). Therefore, expression of ORs in heterologous systems are much more demanding and undermined by low yields and poor stability for both vertebrate and insect receptors (Hamana et al. 2010; Corcoran et al. 2014; Carraher et al. 2015), since it encounters problems which are inherent to their nature as seven-transmembrane proteins, frequently causing protein aggregation and toxicity (Kaiser et al. 2008; Miazzi et al. 2019). The manipulation of membrane proteins is often difficult and time consuming, which has contributed to the investigation of simpler biomolecules to be used as sensing elements (Barbosa et al. 2018). Also, insect ORs have a unique topology consisting of heterodimers assembled by a ligand-selective OR and an olfactory coreceptor (Orco) (Larsson et al. 2004; Sato et al. 2008; Nichols and Luetje 2010; Vosshall and Hansson 2011), forming gated ion channels that have already been shown to be nonfunctional without Orco expression (Zhou et al. 2014; Franco et al. 2016).

Still on this matter, CSPs belong to a different family of small soluble proteins identified in many insect orders. They are shorter and share no sequence homology with OBPs, in addition to presenting a different type of α-helical fold, containing only four conserved cysteines forming two disulfide bridges instead of three in classical OBPs (Campanacci et al. 2003). CSPs present high thermal stability and are associated with the transport of small hydrophobic compounds in chemosensory organs, which could make them suitable targets for the same biotechnological applications as OBPs. It is worth noting that Liu et al. (2016) have described CSPs from *Bemisia tabaci* to be crucial in facilitating the transport of fatty acids, while others seem to be tuned to insecticide exposure, suggesting these results could be further exploited for the development of a new generation of biosensor chips to monitor lipid blood concentration and chemical environmental pollution (Liu et al. 2017). However, CSPs have a larger tissue distribution when compared with OBPs, and their role in olfaction still is a matter of debate, since they are also expressed in nonsensory organs and proposed to be involved in a variety of other functions, such as tissue regeneration (Nomura Kitabayashi et al. 1998), development and differentiation (Maleszka et al. 2007; Zhou et al. 2013) and physiological shifts (Guo et al. 2011), among others. Also, even though a few CSPs have been reported to bind behaviorally active compounds such as brood pheromones (Briand et al. 2002), host plant volatiles (Zhou et al. 2020) and repellent compounds (Duan et al. 2019), they are way less rigid when compared with OBPs. Their conformation can be so drastically modified upon ligand binding that its pocket becomes able to accommodate three ligands (Campanacci et al. 2003). For this reason, molecular modeling and docking simulations are less reliable and ligand selectivity is affected, since such a flexible binding site can accommodate a variety of different compounds.

Finally, the small size and easy production of both insect and vertebrate OBPs place them in a favorite position for biotechnological applications. Such proteins have been efficiently expressed in bacterial systems (Wojtasek and Leal 1999; Yabuki et al. 2010; Yang et al. 2011; Klint et al. 2013), as well as in yeast (Ferrari et al. 1997; Briand et al. 2001; Lartigue et al. 2004) with satisfactory yields. Also, purification can be easily accomplished by chromatographic steps. Besides having exceptional stability to solvent denaturation and to proteolytic degradation, OBPs are particularly stable to thermal denaturation. In addition, binding of the ligand inside the hydrophobic cavity has been reported to increase their thermal stability even more (Paolini et al. 1999). OBPs have pretty compact three-dimensional structures that, when combined with structure prediction methods such as homology modeling, dynamics simulation and molecular docking, support the creation of reliable models (Venthur and Zhou 2018). The number of OBP structures resolved so far provides sufficient information regarding the architecture of the binding pocket to allow the modification of their sequences by site-directed mutagenesis with a reasonable degree of accuracy, making it possible to obtain mutants with the desired specificity and predicted behavior (Pelosi et al. 2018).

In summary, OBPs have desired features such as being small, soluble, stable, and easier to manipulate and modify, making them more accessible targets for research. Their superior workability has led to studies in different systems over recent years (Fig. 2), and this review aspires to present a contemporary unified source of information concerning current applications as well as perspectives and potential uses in biotechnology involving OBPs. At present, the development of new products for insect population control is the most widely discussed use for these proteins. However, the growing amount of research aiming to uncover new commercial applications has led to a noteworthy increase in studies evaluating the construction of biosensors as well as the potential use of OBPs for less conventional purposes, which are discussed in the following text.

Screening for behaviorally active compounds

Prospecting new attractants or repellents for population management of agricultural pests and insect vectors strongly relies on a better comprehension of the molecular mechanism underlying the olfactory system. Screenings for novel behaviorally active compounds capable of interfering in olfaction-mediated behavioral responses can be performed based on molecular interactions between candidate compounds and olfactory proteins through an approach called "reverse chemical

Author's personal copy

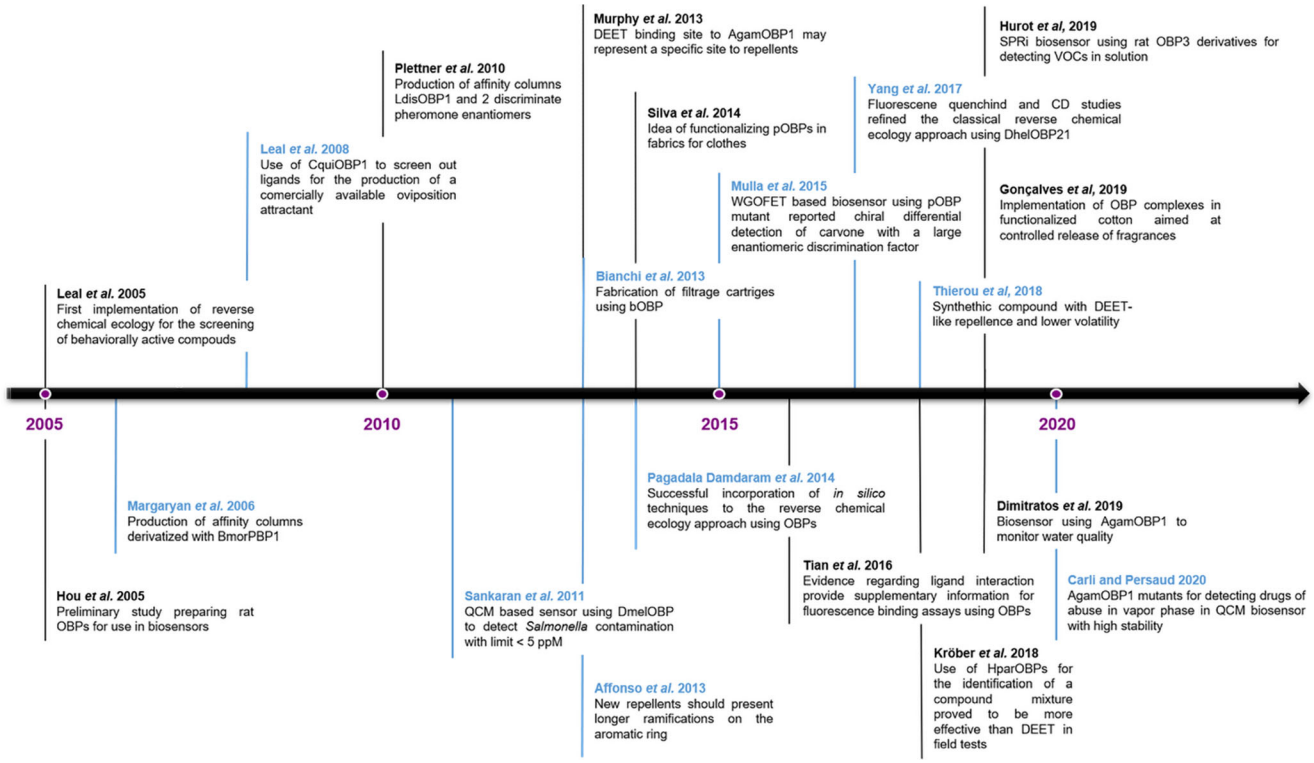


Fig. 2 Overview of biotechnological applications of OBPs over the years

ecology". This strategy is very similar to receptor-based drug discovery and has become an efficient and reliable method for such purpose (Brito et al. 2016).

In light of reverse chemical ecology and based on the principle of competitive binding between a ligand and a fluorescent probe for the hydrophobic pocket of an OBP, fluorescence binding assays (D'Onofrio et al. 2020) are the most widely adopted technique to estimate binding affinities of OBPs to relevant compounds for further use in behavioral tests. Even though other olfactory proteins such as ORs (Franco et al. 2018) and CSPs (Duan et al. 2019) have already been employed as molecular targets for the discovery of new behaviorally active ligands, OBPs are still the most utilized proteins due to the aforementioned advantages associated with their use (Table 1).

This strategy was first implemented for the identification, synthesis and field evaluation of formulations of the pheromone system of the Navel Orangeworm moth, *Amyelois transitella*, leading to the development of better lures (Leal et al. 2005). Later, a study combining reverse and conventional chemical ecology approaches made possible to screen out a strong attractant for the southern house mosquito *C. quinquefasciatus* using CquiOBP1 as a molecular target (Leal et al. 2008). The obtained results have provided significant data for the production of the oviposition attractant which is commercially available nowadays. More recently, six OBPs from *Anopheles gambiae* were employed in binding assays in order to identify mosquito repellents in essential oils extracted from aromatic plants. Their use in the initial evaluation was reported to reduce the number of samples to be examined in repellent bioassays by 57 % due to nonbinding (Kröber et al. 2018). The authors were able to identify a number of compounds and mixtures with significant spatial repellency activity, among which the combination of carvacrol plus cumin alcohol proved to be more effective than DEET (the current golden standard in insect repellents) (Antwi et al. 2008; Diaz 2016) at reducing the number of *Anopheles* species in shelters. In a similar way, two OBPs from the dark black chafer (DBC) *Holotrichia parallela* were described as displaying preferential binding to one particular green-leaf plant volatile (GLV). Both HparOBP20 and HparOBP49 strongly bind (Z)-3-hexenyl acetate, a plant volatile that is released in large amounts after damage and was previously reported to play a crucial role in insect-plant interactions. Field tests revealed that mixing this GLV with its species sex pheromone increases the number of caught insects up to 7-fold when compared with traps baited with sex pheromone alone (Ju et al. 2018). It is not unreasonable to suppose that these findings could assist in the development of new environmentally friendly strategies for DBC population control. Moreover, not long ago, CmedOBP14 from the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis* was successfully employed in fluorescence binding assays for the screening of behaviorally active compounds, of which L-limonene and nerolidol were identified as attractants and ß-ionone a repellent (Sun et al. 2019).

After a while, computational methods were shown to be reliable in order to pre-select candidate ligands and started to

Author's personal copy

Table 1 Overview of OBPs used for screening of behaviorally active compounds

OBP	Species	Ligand	Activity	Reference
AimelOBP3, AimelOBP5	*Ailuropoda melanoleuca*	β-Ionone, cedrol, citral, farnesol, safranal	Attractant	Zhu et al. (2017)
AgamOBP1, AgamOBP3, AgamOBP4, AgamOBP5, AgamOBP30, AgamOBP47	*Anopheles gambiae*	Carvacrol, cumin alcohol, butyl cinnamate, ethyl cinnamate	Repellent	Kröber et al. (2018)
BdorGOBP	*Bactrocera dorsalis*	Methyl eugenol	Attractant	Pagadala Damdaram et al. (2014)
CmedOBP14	*Cnaphalocrocis medinalis*	l-Limonene, nerolidol, ß-ionone	Attractant, attractant, repellent	Sun et al. (2019)
CquiOBP1	*Culex quinquefasciatus*	Trimethylamine, nonanal	Repellent	Leal et al. (2008)
DhelOBP21	*Dastareus helophoroides*	(+)-β-Pinene	Attractant	Yang et al. (2017b)
HparOBP20, HparOBP49	*Holotrichia parallela*	(Z)-3-Hexenyl acetate	Attractant	Ju et al. (2018)
SspOBP7	*Sclerodermus* sp.	(+)-α-Longipinene, terpinolene	Attractant	Yi et al. (2018)

be incorporated as a manner of optimizing the screening process (Brito et al. 2016). Molecular docking and molecular dynamics studies with an OBP from the fruit fly *Bactrocera dorsalis* were successfully employed for the prediction of behaviorally active semiochemicals for this agricultural pest (Pagadala Damdaram et al. 2014). Actually, studies mainly focused on establishing *in silico* screening models to pre-access the potential affinity for new ligands are becoming increasingly relevant in emerging publications, as in the case of Du et al. (2018). They used OBP3 from *Megoura viciae* in molecular docking and molecular dynamics simulations to explore its binding mode to (E)-β-farnesene (the main component of the aphid alarm pheromone) analogs. Results provide theoretical guidance for the rational design of aphid alarm pheromone-like molecules that can be used for the development of products which would be able to keep these insects away from crops.

Reverse chemical ecology has also been employed for a very particular and interesting purpose involving the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca*, which is now considered to be a vulnerable species after many years in the list of endangered ones. The discrepancy between physiology and lifestyle of the giant panda still conceals unexplored aspects that puzzle specialists: its obligate bamboo diet is not compatible with its typical carnivorous digestive system. The low energy obtained from such a poor diet leads to a sedentary life and a very limited reproduction rate, with only a single offspring every other year, increasing the vulnerability of the species. Conventional chemical ecology approaches are based on a process of extracting secretions from semiochemical senders, separating extracts into fractions, using receptors to assist in the identification of active ingredients and, finally, by elucidating chemical structures and synthesis (Leal 2017), which is still too invasive for studying endangered or vulnerable species. As an alternative, Zhu et al. (2017) used reverse chemical ecology associated with proteomics to perform a study regarding olfaction and chemical communication in order to better elucidate the molecular mechanisms responsible for such unique and anomalous diet. Based on their abundance in the nasal mucus, AimelOBP3 and AimelOBP5 were selected for functional and structural characterization. Results indicated that AimelOBP3 has high affinity to plant volatiles such as citral, safranal, farnesol, β-ionone and cedrol; this last one being best represented in bamboo leaves collected in the spring (when the mating season of the panda occurs) and also to long-chain aldehydes, common constituents of insect sex pheromones. Although the pheromone mixture of the giant panda is yet to be identified, it is possible that these linear aldehydes might present a similar function in this species. On the other hand, AimelOBP5 binds unsaturated fatty acids but not their corresponding aldehydes or the plant volatiles which were observed as the best ligands for AimelOBP3, suggesting that these two proteins have complementary spectra of binding. It is worth emphasizing that the discovery of odorants produced by the giant panda, particularly by males, could play an important role in conservation efforts when used to enhance female-oriented behaviors, increasing sexual motivation. Additionally, compounds able to attract the giant panda to bamboo could be employed as attractants to other food sources, drawing the panda to feed on supplemental nutrition such as the panda bread (Bian et al. 2013). Therefore, it is not unexpected that reverse chemical ecology could start to be employed to a greater extent when dealing with endangered or even difficult-to-reach species for which it would be difficult to obtain enough biological samples or perform accurate behavioral observations.

It is worth mentioning that even though fluorescence competition-binding assays very often provide accurate affinities of different ligands for a binding pocket, its limitations need to be considered. It has been reported that, contrary with expectations, some compounds with good binding affinities are not able to actually form a complex with the protein,

Author's personal copy

mainly because this type of experiment does not provide structural information upon ligand binding. This makes the single use of this technique sometimes less reliable because its results might include candidate compounds that do not exhibit biological activity (Siciliano et al. 2014; Yin et al. 2015; Yang et al. 2017b). Basically, the authors describe that besides high binding affinity, conformational flexibility also plays an important role in complex formation. During the collisions that happen between a protein pocket and ligands in the beginning of the binding process, suitable ligands enter and are able to fixate themselves into the pocket, leading to a desired transformation for the formation of the complex. Unsuitable ligands, on the other hand, might be able to enter the pocket but fail to bind the proteins because the conformational transformation does not occur. Recent studies have reported that a protein is able to adjust its conformation to expose its binding site, while a ligand adjusts its structure to bind the active pocket. When both these conformations are a match, stable binding occurs, on the other hand, if the conformations of the proteins and the ligand do not match, the flexibility of the protein will negatively affect ligand binding to avoid wrong ligands. In this context, more direct evidence regarding the interactions between compounds and proteins could provide supplementary information to fluorescence binding assays (Tian et al. 2016). In this regard, fluorescence quenching analysis based on the interaction between phosphor and quenching molecules have been increasingly used to study in detail what happens when a protein binds a ligand (Li et al. 2013, 2018). Briefly, that are two types of quenching modes of proteins: the static quenching, which results from stable binding between the fluorescent sample and the quencher, and the dynamic quenching resulting from collisional encounters between the fluorophore and the quencher (Sun et al. 2006). A study combining fluorescence quenching analyses and competitive binding assays have recently revealed that only six of nineteen ligands with high binding affinities were actually capable of forming complexes with SspOBP7 from the parasitoid wasp *Sclerodermus* sp. (Yi et al. 2018). Authors have hypothesized that the collision of ligands could also cause a decrease in fluorescence by colliding with the binding site of *N*-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN) or even by affecting the stabilization of NPN-OBP complexes. Structural transformations associated with complex formation upon ligand binding can be more thoroughly evaluated by circular dichroism (CD) (Yang et al. 2017b; Li et al. 2018; Yi et al. 2018). It is worth pointing out that Yang et al. (2017a) were only able to explain why camphor, a ligand which presents high affinity and static interaction to DhelOBP21, does not elicit behavioral responses in *Dastareus helophoroides* using CD to investigate conformational changes. CD studies indicated that binding of camphor to DhelOBP21 actually destabilizes the structure because camphor could not cause the formation of a N-terminal helix necessary to stabilize the complex. Thus, it is plausible to expect the association of fluorescence binding to another technique capable of assessing the secondary structure of an OBP upon ligand binding, such as fluorescence quenching analysis or CD, to be the next update in optimizing the reverse chemical ecology approach, as computational methods once were. This new step could be used in future research to narrow down the scope of candidate behaviorally active compounds by excluding false-positive ligands that present high binding affinities to OBPs but are unable to form stable complexes.

Structure-based design of new repellents

The global market for insect repellents, especially mosquitoes, has been continuously growing and projections expect it to reach US$4.8 billion in 2022. This scenario includes a limited number of registered molecules and is largely dominated by diethyltoluamide (DEET), followed by a small number of other repellents such as icaridin and IR3535 (Devillers 2018). However, it has already been suggested that the use of such products could lead to a series of problems: limited or no efficiency in a few insects as well as the phenomena of resistance have been reported (Coleman et al. 1993; Stanczyk et al. 2013; Franco et al. 2018). Additionally, skin irritations and neurotoxic effects have been observed in humans (Antwi et al. 2008; Broschard et al. 2013; Swale et al. 2014; Wiles et al. 2014; Heng et al. 2017). Taking all that into consideration, the search efforts to find new repellents with high efficiency and little to none collateral damage to humans and the environment has become imperative. In this context, even though ligand-based computational methods have already been vastly used, structure-based modeling of new repellents presents itself as a very promising approach that can provide leads with improved binding characteristics and specificity (Table 2) but was, until recently, unfeasible due to the lack of available three-dimensional structures of olfactory proteins in complex with a repellent (Zographos et al. 2018).

The crystal structure of AgamOBP1 from *A. gambiae* in complex with DEET was demonstrated for the first time by Tsitsanou et al. (2012). The study was able to show that the repellent exploits nonpolar interactions and a unique hydrogen bond between the amide oxygen and a water molecule in order to bind at the edge of a long hydrophobic tunnel. The authors perceived such characteristics to be critical for the recognition and binding of DEET and identified desired structural features for designing new repellents. The accuracy of their methodology was evaluated and confirmed by docking simulations of 29 carboxamides and piperidine derivatives. Later, the structure of the complex between AgamOBP1 and the natural repellent 6-methyl-5-heptene-2-one (6-MH), a human sweat component, revealed that 6-MH binds to the protein at the exact same site as DEET (Murphy et al. 2013). The key interaction with a single water molecule that was previously

Author's personal copy

Table 2 Overview of OBPs used for structure-based design of new repellents

OBP	Species	In complex with	New compounds	Reference
AaegOBP1	*Aedes aegypti*	PEG	2-(4-Fluorophenyl)cyclohexanol, 1-(3-methylpiperidin-1-yl) heptan-1-one	Oliferenko et al. (2013)
AgamOBP1	*Anopheles gambiae*	DEET	6-Methyl-5-heptene-2-one	Murphy et al. (2013)
AgamOBP1	*Anopheles gambiae*	DEET	Eugenyl acetate	Affonso et al. (2013)
AgamOBP1	*Anopheles gambiae*	DEET	*p*-Anisyl hexanoate, thymol acetate, thymyl isovalerate	Da Costa et al. (2019)
AgamOBP1	*Anopheles gambiae*	Icaridin	Synthethic compound KO9	Thireou et al. (2018)

proposed to be important for DEET binding does not seem to be involved in the recognition of 6-MH. The fact that more than one compound with repellent activity but different chemical structures are able to bind to the same site supports the idea that the DEET-binding site may represent a specific binding site for repellents. Molecular dynamics simulations of AgamOBP1 in complex with 6-MH and DEET were performed to better investigate the binding of these two ligands, providing new insights on repellent recognition by AgamOBP1 (Tzotzos et al. 2018). Complexes between AgamOBP1 and DEET have also been studied by docking analysis and molecular dynamics simulation to compare the interactions of this OBP wth molecules with known attractive activities such as lactic acid, 1-octen-3-ol, indole and eugenol, and the main components of the oil of Indian clove (*Syzygium aromaticum*), with potential repellent activities, making it possible to observe the fundamental residues for an effective interaction with this protein (Affonso et al. 2013). Results showed that all tested compounds compete for the DEET binding site, interacting with the same residues. Docking analysis indicated that eugenyl acetate presents a greater affinity for AgamOBP1 than DEET. Finally, the authors suggested that new repellent derivatives from DEET should present longer ramifications on the aromatic ring in order to explore nonpolar interactions inside the long hydrophobic tunnel. More recently, the structure of DEET complexed with AgamOBP1 was used as reference to perform a structural and pharmacophoric similarity search for compounds derived from essential oils (Da Costa et al. 2019). The authors made use of several in silico techniques and reported that natural products such as thymol acetate and *p*-anisyl hexanoate binds AgamOBP1 in the same mode as DEET, forming hydrogen bonds and hydrophobic interactions, in addition to having similar physicochemical properties. This study illustrates an interesting approach, focusing on the structure of the bound repellent in order to search for compounds that interact in a similar way with the OBP. It is plausible to assume that this kind of approach could facilitate the design of new repellents with increased selectivity and affinity for the binding cavity.

In order to elucidate the binding mode between AgamOBP1 and icaridin, Drakou et al. (2016) determined the crystal structure of the complex. Results showed that icaridin actually binds to two different regions: a new binding site located at the C-terminal region and also to the DEET-binding site in two different orientations. Which binding mode is preferably adopted seems to be strongly related to the conformation of the sec-butyl moiety of icaridin. A very interesting outcome of this work is the observed capability of AgamOBP1 crystals to stereoselectively bind the most active 1R,2S-isomer of icaridin's equimolar diastereoisomeric mixture. Such result provides structural evidence for the possible contribution of AgamOBP1 to the stereoselectivity of this chemical in mosquitoes. A virtual screening protocol based on structural properties was then proposed for the discovery of novel bioinspired synthetic scaffolds that exhibit lower volatility and increased protection time compared with their plant-derived parental compounds (Thireou et al. 2018). After screening a library of 42 755 synthetic molecules, sixteen were selected and further evaluated for their binding affinity to AgamOBP1 as well as their repellent properties against female *A. gambiae* mosquitoes. Four of these compounds were found to exhibit repellency indexes between 69 and 79%. The novel synthetic compound KO9 displayed DEET-like repellence (91%) while having a significantly lower volatility when compared with DEET and its plant-derived parental cuminic acid. Also, an approach combining quantitative structure-activity relationship (QSAR) modeling, molecular docking and bioassays was employed by Oliferenko et al. (2013) for the identification of potential repellents with activity against *Aedes aegypti*. QSAR analysis revealed structural molecular determinants of repellent action against the mosquito. This information was used to identify highly promising scaffolds and individual compounds with mosquito repellent activity.

Knowledge regarding the specific mechanism of binding to the OBP is crucial for the success of structure-based discovery of novel repellents. However, AgamOBP1•DEET and AgamOBP1•icaridin crystal structures are the only available experimental OBP•repellent models for structure-based approaches to this date. More experimental studies on binding

Author's personal copy

specificities of known repellents to OBPs from various insects' species are still necessary, providing data that would be extremely beneficial for this kind of approach.

Biosensors

In recent years, a higher understanding of mechanisms underlying odor recognition in biological systems has led to an increased progress in biosensor technology. This area of study is primarily focused on making the fabricated biosensor reach parameters close to its biological counterpart, such as high sensitivity, repeatability, specificity, short response time and wide spectrum detection, a goal that could be achieved through the utilization of biological components from naturally occurring chemosensory systems. Furthermore, thanks to advances in biology, biotechnology, genetical engineering and nanotechnology, it is currently possible to use biological materials for the manufacturing of such devices (Wasilewski et al. 2018; Cave et al. 2019).

The general architecture of an artificial chemosensory device consists of a system with two basic components: a chemical sensor and a pattern recognition engine, which converts the chemical input into an electrical signal (Gardner and Bartlett 1994), and it is in the chemical sensor component where development efforts have been concentrated over the last decades. As far as sensor design goes, it is possible to separate them in two major categories: the ones which employ biological components and those which rely on inanimate components, like metal oxides and polymers (Zohora et al. 2013), for the detection of target compounds. With regard to sensors which incorporate biological materials, even though there are reports of whole tissues (Strauch et al. 2014; Ibarra-Soria et al. 2017), cultured cells (Ko and Park 2005; Lee et al. 2009), olfactory neurons (Du et al. 2015), ORs (Khadka et al. 2019; Yang et al. 2017a), OR peptides (Lee et al. 2018), and CSPs (Liu et al. 2013) being used as biosensing elements, OBPs present a series of already discussed advantages that make them the most promising sensors and have prompted the exploration of these proteins associated with different detection systems in chemosensory design (Table 3).

The potential for the development of biosensors using OBPs started to be reported almost two decades ago, when a preliminary study first demonstrated the preparation of ultrathin Langmuir-Blodgett (LB) films incorporating a recombinant rat OBP1, OBP-1F (Hou et al. 2005). Years later, Sankaran et al. (2011) focused on mimicking an insect OBP to detect VOCs indicative of *Salmonella* contamination, such as 3-methyl-1-butanol and 1-hexanol, in packaged beef. Quartz crystal microbalance (QCM) based sensors in conjunction with a synthetic peptide derived from the amino acid sequence of *Drosophila melanogaster* OBP LUSH as the sensing material were developed (Fig. 3a) and shown to be sensitive to alcohols, with estimated lower detection limits of < 5 ppm. A more recent study regarding *Salmonella* contamination has also fabricated a peptide-based biosensor using a LUSH-derived peptide, but with carbon nanotube field-effect transistor (CNT-FET) as the detection method (Son et al. 2016). In order to verify if the designed biosensor could be used for the assessment of food contamination, fresh and *Salmonella*-contaminated ham samples were presented to the biosensor. While the sensor did not elicit any response to the fresh sample, a significant signal was observed with a response time of less than 2 s for the contaminated one. Results demonstrated that the sensor succeeded in detecting 3-methyl-1-butanol at a concentration of femtomolars. It also selectively distinguished the target odor molecule from other compounds with similar structures without a complex pretreatment process. On this topic, one could easily expect this kind of approach to be more and more employed for the quality control of various food samples by using different OBPs from different organisms. Still on the matter of food quality, a proposed sensor system based on an array configuration of five surface acoustic wave (SAW) resonators coated with three types of OBPs: the wild-type OBP from bovine (wtbOBP), a double mutant of the OBP from bovine (dmbOBP) and the wild-type OBP from pig (wtpOBP), has been described for the recognition of R-(−)-1-octen-3-ol (octenol) and R-(−)-carvone (carvone) vapors, two odorants largely used in the food industry. The fabricated device was tested in nitrogen atmosphere and results showed low detection limits for the tested compounds such as 0.48 ppm for octenol and 0.74 ppm for carvone (Di Pietrantonio et al. 2013, 2015; Palla-Papavlu et al. 2014). The authors also mention that the biosensing system was able to discriminate the octenol molecules from the carvone, making it pertinent for the assessment of food contamination by molds, or for the evaluation of indoor air quality in buildings. Monitoring of air quality has also been a matter of interest for Cennamo et al. (2015). According to them, low molecular mass aldehydes are some of the main toxic compounds present in the environment and their characterization could be crucial in order to elucidate reactions that occur in the atmosphere. With that in mind, the group reported the construction of a new biosensor based on surface plasmon resonance (SPR) in a plastic optical fiber using porcine OBP (pOBP) as the sensing element. The device was able to detect butanal in solution in the range of micromolars.

As well as for air quality, water supply safety has always been a major concern to public health. Taking that into consideration, a very recent study described a novel sensor technology encompassing an olfactory protein from *A. gambiae*, AgamOBP1, as the sensing element (Dimitratos et al. 2019). This OBP binds analytes associated with coliform bacteria such as indole, a major *Escherichia coli* metabolite, and does so with high specificity and sensitivity. Taking advantage of

Author's personal copy

Table 3 Overview of biosensors incorporating odorant-binding proteins as sensing elements

OBP	Derived from	Detection method	Detection limit	Detected compounds	Reference
Acer-ASP2	*Apis mellifera*	EIS	μM	Floral odor and pheromones	Lu et al. (2014)
Acer-ASP2	*Apis mellifera*	SPR	pM	Floral odor and pheromones	Zhang et al. (2015)
AgamOBP1	*Anopheles gambiae*	Colorimetric	ppm	Indole	Dimitratos et al. (2019)
AgamOBP1-S82P	*Anopheles gambiae*	QCM	μM	Cocaine-HCl	Cali and Persaud (2020)
AgamOBP7	*Anopheles gambiae*	SiNW	ppb	Human-derived odorants	Gao et al. (2020)
AmelOBP14	*Apis mellifera*	rGO-FET	pM	Bee attractants	Larisika et al. (2015), Reiner-Rozman et al. (2016), Kotlowski et al. (2018)
LUSH	*Drosophila melanogaster*	QCM	ppm	3-Methyl-1-butanol and 1-hexanol	Sankaran et al. (2011)
LUSH	*Drosophila melanogaster*	CNT-FET	fM	3-Methyl-1-butanol	Son et al. (2016)
BdorOBP2	*Bactrocera dorsalis*	EIS	pM	Isoamyl acetate, β-ionone and benzaldehyde	Lu et al. (2015)
dmbOBP	*bovine*	SAW resonators	ppm	Octenol and carvone	Di Pietrantonio et al. (2013, 2015)
wtbOBP	*bovine*	SAW resonators	ppm	Octenol and carvone	Di Pietrantonio et al. (2013, 2015)
wtpOBP	*porcine*	SAW resonators	ppm	Octenol and carvone	Di Pietrantonio et al. (2013, 2015)
pOBP-F88W	*porcine*	WGOFET	pM	Carvone enantiomers	Mulla et al. (2015)
pOBP	*porcine*	PCD cantilevers	μM	IBMP and DNT	Manai et al. (2014)
pOBP	*porcine*	SPR	μM	Butanal	Cennamo et al. (2015)
pOBP	*porcine*	PCD cantilevers	–	IBMP	Possas-Abreu et al. (2017)
OBP-1F	*rat*	EIS	–	Isoamyl acetate	Hou et al. (2005)
OBP derivatives	*rat*	SPR	pM	Hexanal	Hurot et al. (2019)

that fact, the authors have decided to incorporate an AgamOBP1-based biosensor into a lateral flow device which is similar in application to commercially available pregnancy tests, in order to obtain faster results for the detection of indole. The apparatus was supported on a plastic substrate and assembled as nitrocellulose strips with a paper sample pad. This implementation presents a test line containing a known ligand for AgamOBP1 and a control line where an antibody for this protein is placed. Right after the sample pad and before the control and test strips, there is also a strip with a recombinant AgamOBP1-colloidal gold conjugate. The purpose of the gold, in this case, is to make the protein visible to the naked eye. When AgamOBP1 binds the synthetic ligand in the control line, it will deposit colloidal gold and create a color change. If the biosensor is working properly, the control line will always be visible, which demonstrates that AgamOBP1 was able to travel along the entire device. The AgamOBP1-colloidal gold complex is laterally carried across the device's surface when an aqueous analyte is put in the sample pad and the detection is based on the competition between the ligand in the test line and any indole present in the sample. If AgamOBP1 binds to the analyte, it will not bind the synthetic ligand in the test strip and the device will display only the control line for a positive result. On the other hand, if indole is not present in the sample, the AgamOBP1-colloidal gold is free to bind to the test strip and to the control strip, exhibiting two visible lines for a negative result.

Exploring a different field of endeavor, Ramoni et al. (2007) have investigated the potential of vertebrate OBPs for the development of biosensors for the detection of explosives. Their results showed pOBP to have high affinity towards the TNT simulant 2,4-dinitrotoluene (DNT), dimethylformamide (DMF) and phenylbenzenamine (DFA), suggesting the lipocalin scaffold could be an appropriate model for the detection of these hazardous compounds. Later, Manai et al. (2014) reported the manufacture of this type of device, chemically grafting pOBPs onto polycrystalline diamond (PCD) microcantilevers to that end. They were capable of producing sensors with sensitivity for both IBMP, a reference compound commonly used for the characterization of OBPs affinity constants, and DNT, in micromolar concentrations. However, it is also mentioned that low specificity still is an inconvenience to overcome in this case. Another interesting approach for the manufacture of biosensors has been described by Mulla et al. (2015), whose work reported on the binding of carvone enantiomers to a pOBP mutant, pOBP-F88W, detected by means

Author's personal copy

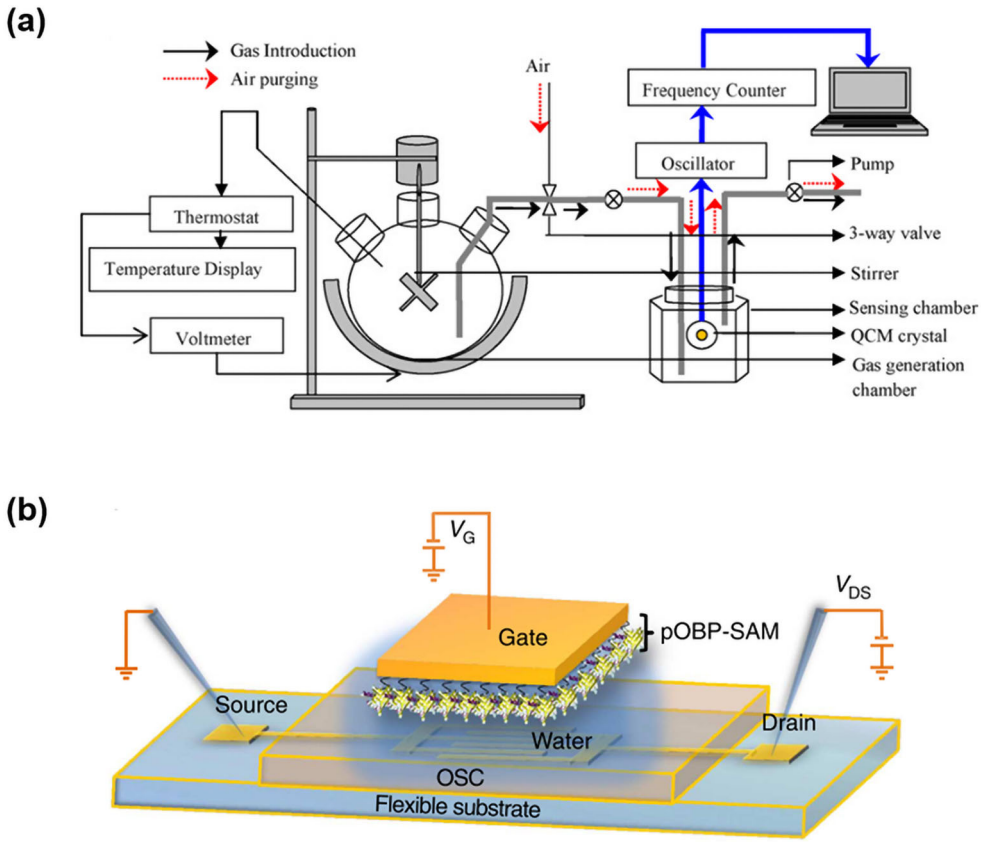


Fig. 3 Schematic view of biosensors incorporating OBPs. **a** Experimental set-up for a QCM-based sensor using a Dmel LUSH synthetic peptide. Modified from Sankaran et al. (2011). **b** Structure of a WGOFET device comprising a pOBP immobilized through a self-assembled monolayer (SAM). Modified from Mulla et al. (2015)

of a water-gated field-effect transistor (WGOFET) (Fig. 3b) in the picomolar concentration range. With this approach, analysis of the free-energy balance and degree of capacitance decreases provided strong support for the hypothesis that, on S-(+)-carvone ligand binding, the pOBP undergoes a conformational change that is not seen with the R-(−)-enantiomer, allowing for chiral differential detection with a large enantiomeric discrimination factor, which could lead to the development of a unique analytical tool with wide applicability. In a like manner, aiming to implement a portable tool that could be applied to situations such as the detection of toxic chemicals and narcotics control, as well as noninvasive diagnosis, Lim et al. (2017) used OBP LUSH from *Drosophila* as a sensing substrate for estimating ethanol concentration. The LUSH protein was fused with silicon-on-insulator (SOI)-based ion-sensitive field-effect transistors (ISFET) and workability as an olfactory sensor was investigated. In the results, LUSH OBP-fused ISFET sensor was able to detect ethanol at concentration ranges of 0.001–1%. Still on the subject of biosensors as potential analytical tools, although at a very preliminary stage, a more recent study developed a competitive fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay to monitor benzene presence in atmospheric environment using pOBP, which displayed high affinity for benzene detection with a limit of 0.05 μM (Capo et al. 2018). These results might suggest that pOBP could eventually be employed in the design of a robust optical biosensor to continuously monitor the level of benzene in atmosphere.

Research groups have also conducted OBP-based biosensor studies with the purpose of exploring molecular recognition processes and providing a better understanding of chemical communication systems in insects. This is the case of a paper which focuses on establishing an impedance biosensor with Acer-ASP2 from the honeybee *Apis mellifera* and exploring the binding properties of the protein to its ligands (Lu et al. 2014). To do so, Acer-ASP2 was immobilized on interdigitated gold electrodes and the binding of test ligands such as queen pheromone (methyl-p-hydroxyl benzoate), alarm pheromone (isoamyl acetate) and floral odors (linalool, geraniol, ß-ionone, 4-allyl veratrole, phenylacetaldehyde, dibutyl phthalate) was detected by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Specific floral odors and pheromones produced linear impedance variations to different concentrations, with a detection limit of millimolars. The authors were then able to improve their work by developing a novel biosensor based on nanocup arrays (nanoCA) in order to monitor the binding of small ligands through SPR (Zhang et al. 2015). This time, the detection limit for the device was in the order of picomolars, showing that SPR detection (Bozdogan et al. 2020) using nanoCA and OBPs provides greater sensitivity than conventional electrochemical methods (Szunerits et al. 2020). The same group also investigated affinities between

Author's personal copy

an OBP from the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* and different ligands of interest. Using the same manufacturing approach, BdorOBP2 was immobilized on the interdigitated electrodes to establish an olfactory biosensor and the detection of semiochemicals such as isoamyl acetate, β-ionone and benzaldehyde, which are emitted by the fly's host plants, was accomplished by EIS in the millimolar range (Lu et al. 2015).

Regarding the application of biosensors for estimating binding affinity, after demonstrating the feasibility of the method (Larisika et al. 2015) and discussing their efforts in designing, bio-functionalizing and characterizing biosensors based on reduced graphene oxide (rGO) as the gate material (Reiner-Rozman et al. 2016), Kotlowski et al. (2018) have finally described the fabrication and performance of a biosensor designed for in situ and real-time monitoring of a broad spectrum of odorants known to be attractants for bees, such as homovanillic acid (also a cancer marker for neuroblastoma), citral, methyl eugenol and geraniol. Wild-type and engineered mutants of OBP14 from the Italian honeybee *Apis mellifera ligustica* were immobilized onto a rGO field-effect transistor (rGO-FET) and used to achieve such result. Authors demonstrated the binding properties of the protein when immobilized on the biosensor to be similar to those measured in solution. Ligands were able to be detected at the picomolar scale, which could lead to the development of a method for measuring affinities to small molecules as an alternative to the currently used fluorescence assay.

One of the most interesting advantages when using OBPs as sensing elements is that their binding properties can be tailored through site-directed mutagenesis. This possibility has recently been further explored by groups such as in the study conducted by Hurot et al. (2019), where three OBP derivatives of the OBP3 from rat in association with SPR imaging (SPRi), were used to develop olfactory biosensors for the detection of VOCs in solution. The manufactured biosensors showed promising results with detection limits in the picomolar range. Optimizing binding affinity has also been a subject of interest for Wasilewski et al. (2019), whose research concentrated on determining the optimal length of a peptide chain based on the binding site of HarmOBP7 from *Helicoverpa armigera* moth to effectively bind octanal molecules. The authors initially believed that the chain length could have substantial influence on the type and effectiveness of peptide–ligand interactions. Results showed that longer peptides indeed presented the most effective interaction with the ligand. It is also worth mentioning that, although strictly not an OBP, the mouse major urinary protein (MUP) is very similar to one in its conserved lipocalin ß-barrel structure. Ricatti et al. (2019) were interested in designing MUP to bind a variety of non-natural ligands in a way that it could be used as recognition elements in biosensors. For that purpose, the authors have employed in silico techniques to select point mutations without disturbing the binding pocket as well as to choose mutants with the best theoretical binding profiles to the ligands. They were then able to express seven mutants and verify their stability and selectivity. This is a perfect example of how molecular modeling and docking techniques can be of service when designing point mutations with the intent of modifying ligand-binding affinity. It is possible to estimate mutant conformational and structural stability, which makes it easier to produce an actual stable protein with good repeatability. Also, the computational assessment of binding affinity for the ligands of interest reduces the number of candidates for heterologous expression and purification, accelerating the process by giving experimental focus only to promising mutants. This is also the case of a recent study involving AgamOBP1, where the authors analyzed its binding pocket using in silico modeling to investigate the possibility of creating mutants capable of detecting drugs of abuse in vapor phase (Cali and Persaud 2020). They were able to show that single amino acid substitutions in the binding pocket, which were modeled in silico and later tested on expressed proteins, cause dramatic changes to binding affinity. In fact, mutant AgamOBP1-S82P was found to have high affinities to cannabidiol, MDMA and cocaine hydrochloride. After immobilization on a QCM, saturated cocaine hydrochloride vapor was actually detected, something that would be impossible to achieve using wild-type OBP because the ligand was not able to access its binding cavity the same way it fits into the designed mutant's. Using such techniques, the authors were able to produce an effective mutation that changes binding characteristics of AgamOBP1 while retaining the structural stability of the protein.

It cannot be denied that important challenges remain in the development of OBP-based chemosensors, such as their lifespan, which is intrinsically limited by the use of proteins. However, recent studies have indicated the feasibility of manufacturing stable devices using OBPs as sensing elements. Possas-Abreu et al. (2017) have validated their new approach of grafting pOBPs onto synthetic diamond microcantilevers, exhibiting results of great relevance concerning stability, since a biosensing interface using synthetic diamond has been perceived for many years as desirable due to its carbon nature, which ensures good stability of a wide range of bioreceptors via covalent C–C binding (Vanhove et al. 2007; Manai et al. 2014). Also, Cali and Persaud (2020) have developed an AgamOBP1-based biosensor that was still able to detect the target analyte over the period of 10 months in laboratory conditions. Still on the matter of difficulties, sensitivity probably remains the main issue regarding artificial olfaction. Yet, a novel study has reported the fabrication of an ultrasensitive biosensor for human-derived odorants based on free-standing silicon nanowire (SiNW) arrays functionalized with AgamOBP7, achieving detection down to parts per billion (Gao et al. 2020) and

Author's personal copy

contributing with promising results to the field. This way, facilitating the production of portable, light-weight, robust, sensitive devices that can benefit several industrial, military, environmental and security field applications seems very likely to be in the potential of biosensor technology using OBPs.

Capture and release systems

OBPs have been shown to participate in biological processes other than the transport of odorant molecules to the ORs, such as storing pheromones for delayed emission (Brito et al. 2016; Pelosi et al. 2017). The broad range of hydrophobic ligands bound by OBPs and their ability in performing a dual role of engaging in the detection and release of semiochemicals suggest an array of biotechnological applications for these proteins, from the removal of pollutants and unpleasant odors from the environment to the controlled release of fragrances, drugs and chemicals, for example.

Bianchi et al. (2013) investigated the possibility of using a bovine OBP to scavenge herbicides from aqueous samples and were able to fabricate filtering cartridges for removing triazine and similar compounds from water. Another interesting application has been proposed by Silva et al. (2014), who explored the idea of functionalizing the pig OBP in fabrics for clothes. The immobilized protein would play a dual role in this scenario by slowly releasing pleasant fragrances while removing cigarette smell. More recently, the use of pig OBP fused with cell-penetrating peptides for the capture and transduction of a model molecule, 1-aminoanthracene (AMA), into liposome reservoirs has been evaluated. Results were promising: the functionalized liposomes remained stable during time and the binding capacity of OBP constructs was not compromised after anchorage (Gonçalves et al. 2018b; Gonçalves et al. 2018a). Authors suggested the possibility of employing these systems as functional nanodevices for the retention and release of molecules in textile and cosmetic industries and, a while later, reported the actual implementation of OBP complexes in functionalized cotton aimed at controlled release of fragrances (Goncalves et al. 2019).

The use of OBPs in the development of capture and release systems still is a new subject regarding biotechnological applications of such proteins, but it is pretty reasonable to imagine that new researches in this little-explored field tend to increase over the years. The multitask properties of OBPs observed in nature indicate they can execute tasks currently performed by other methods with additional advantages, such as providing better selectivity, for instance. Also, the implementation of OBP-based anchorage systems is feasible in a wide range of segments, including pharmaceutical, cosmetic and specially textile (Fig. 4), where odor control technology (McQueen and Vaezafshar 2020) represents a promising field of application for such proteins.

Analytical purposes

An interesting property presented by OBPs that can be further exploited for a variety of analytical applications is their affinity and specificity for small organic molecules. The derivatization of affinity columns with OBPs is somewhat easy to achieve and should be stable after several uses and washes with buffers. In fact, Margaryan et al. (2006) reported the synthesis and characterization of affinity columns derivatized with pheromone-binding protein (PBP) 1 from *Bombyx mori* and OBP1 from *C. quinquefasciatus*. Authors demonstrated that binding capacity was not affected by immobilization and OBPs also retained their pH-dependent ligand affinity, a mechanism which could be employed for the gradual release of tightly bound ligands from the column. It is worth noting that the use of OBPs in the preparation of affinity columns opens a wide range of possibilities, since proteins would be the ideal substrates to differentiate enantiomers, but their poor stability to temperature and solvents seems to be a limiting factor for their application in analytical columns. However, OBPs might be able to present a solution to this matter due to their exceptional stability to thermal denaturation and proteolytic degradation. As a matter of fact, pheromones and other compounds racemates represent natural ligands for these proteins, suggesting derivatized columns could be directly used in discriminating enantiomers. It has been

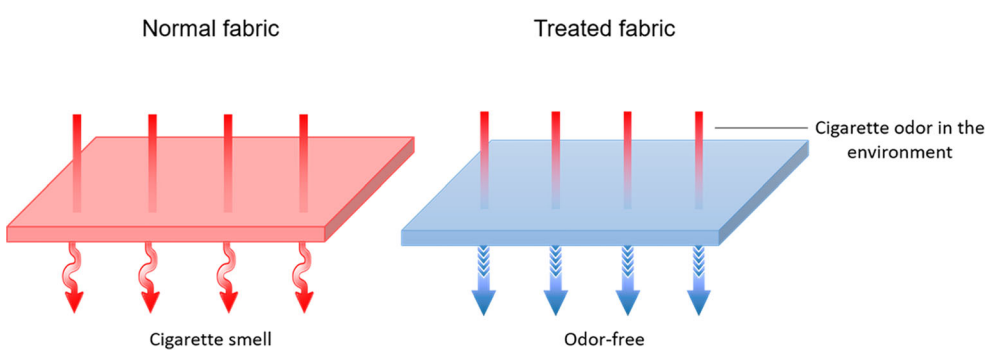


Fig. 4 Schematic view of a potential application of OBPs in odor control technology for the textile industry

Author's personal copy

described that PBP1 and PBP2 from the gypsy moth *Lymantria dispar* are able to discriminate pheromone enantiomers (Plettner et al. 2000). Studies regarding chiral interactions of a pOBP with carvone enantiomers have also been published (Mulla et al. 2015). Further, it has already been discussed that structures of OBP binding pockets can be modified to meet specific analytical requirements (Pelosi et al. 2018). Considering all this information, it is fairly possible that, if properly used as active chromatographic phases, OBPs could not only be powerful tools for affinity purification of a number of ligands, as well as for resolving racemic mixtures.

Measuring the affinity of OBPs to volatile ligands such as pheromones and other odorants found in the environment is crucial for the analysis and characterization of these proteins. As mentioned before, even though several techniques have been employed in order to measure the affinity and the specificity of OBPs to different ligands, by far the most widely adopted method uses a fluorescent reporter, whose optical properties are markedly different when in an aqueous environment and when bound to a protein into a hydrophobic pocket (Pelosi et al. 2017). However, a recent study (Tan et al. 2019) has brought to light that different fluorescent reporters, in this case, AMA and 1-NPN, seem to generate drastic differences in the calculated affinities, which was quite unexpected and started to raise doubt on the reliability of the fluorescent binding assay. Authors even recommended that the results of fluorescent binding experiments with OBPs should be confirmed by using two different probes or alternative methods while the scientific community still deals with the strong demand for label-free methodologies to measure binding constants of small ligands that could be simple, fast and free from the use of radioactive tracers. In this context, one could raise an interesting question: would it be possible to use biosensors in monitoring this affinity and actually provide an alternative method to the fluorescent binding assays that are currently in use? Although today's technology is not yet sophisticated enough to meet the reproducibility requirements of biosensors, it seems quite likely that the future of biosensors could actually find applications for such analytical purposes.

Concluding remarks

Properties such as stability to thermal and proteolytic degradation, small size, easy production and purification, added to the fact that available structural information allows for the design and synthesis of mutants, make OBPs interesting research targets for a wide range of biotechnological applications. Currently, insect population management is the most discussed use for OBPs. These proteins are vastly utilized for the screening of novel behaviorally active compounds as well as structure-based design of new repellents. However, advances in the field of insect olfaction and nanotechnology combined with their desired features have rapidly transformed OBPs in the best candidates to be employed as biosensing elements in order to meet the growing demand for versatile technologies that can be used as sensors for the detection of volatile chemicals in various areas, including environmental pollution control, health care, quality control and homeland security. Also, even though thorough scientific research still needs to be carried out in this field, the possibility of using OBPs in anchorage systems is starting to be explored and has already shown interesting results, especially for textile, cosmetic and pharmaceutical industries. Besides, their affinity for small hydrophobic compounds have been further exploited for analytical purposes and results indicate that, if properly employed, OBPs could become effective tools for affinity purification as well as for resolving racemic mixtures.

Authors' contributions A.C.A.M. and N.F.B. conceived the presented concept for a review article. N.F.B. was responsible for bibliographic search, critical discussion, article design, illustrations and writing of the manuscript. D.S.O. and T.C.S. contributed to article design, writing and bibliographic enrichment. A.C.A.M. and M.F.M. contributed with critical discussion and provided writing support. All authors provided input, read and approved the final version of the manuscript.

Funding This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM/CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. No additional external funding was received for this study.

Availability of data and material Not applicable.

Compliance with ethical standards

Coonflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Code availability Not applicable.

References

Affonso R d S, Guimarães AP, Oliveira AA, GBC S, França TCC (2013) Applications of molecular modeling in the design of new insect repellents targeting the odorant binding protein of *Anopheles gambiae*. J Braz Chem Soc 24:473–482. https://doi.org/10.1590/s0103-50532013000300015

Antwi FB, Shama LM, Peterson RKD (2008) Risk assessments for the insect repellents DEET and picaridin. Regul Toxicol Pharmacol 51: 31–36. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.03.002

Author's personal copy

Barbosa AJM, Oliveira AR, Roque ACA (2018) Protein- and peptide-based biosensors in artificial olfaction. Trends Biotechnol 36:1244–1258. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.004

Benton R, Vannice KS, Gomez-diaz C, Leslie B (2009) Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. Cell 136:149–162. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.001.Variant

Bian X, Liu D, Zeng H, Zhang G, Wei R, Hou R (2013) Exposure to odors of rivals enhances sexual motivation in male giant pandas. PLoS One 8:e69889. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069889

Bianchi F, Basini G, Grolli S, Conti V, Bianchi F, Grasselli F, Careri M, Ramoni R (2013) An innovative bovine odorant binding protein-based filtering cartridge for the removal of triazine herbicides from water. Anal Bioanal Chem 405:1067–1075. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6499-0

Bozdogan A, Hageneder S, Dostalek J (2020) Plasmonic biosensors relying on biomolecular conformational changes: Case of odorant binding proteins, 1st edn. Elsevier Inc.

Breer H (2003) Olfactory receptors: molecular basis for recognition and discrimination of odors. Anal Bioanal Chem 377:427–433. https://doi.org/10.1007/s00216-003-2113-9

Briand L, Nespoulous C, Huet JC, Pernollet JC (2001) Disulfide pairing and secondary structure of ASP1, an olfactory-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L). J Pept Res 58:540–545. https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2001.00949.x

Briand L, Swasdipan N, Nespoulous C, Bézirard V, Blon F, Huet J-C, Ebert P, Pernollet J-C (2002) Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. Eur J Biochem 269:4586–4596. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03156.x

Brito NF, Moreira MF, Melo ACA (2016) A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. J Insect Physiol 95:51–65. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.09.008

Broschard TH, Bohlmann AM, Konietzny S, Schauer UMD, Dekant W (2013) Biotransformation and toxicokinetics of the insect repellent IR3535(R) in male and female human subjects after dermal exposure. Toxicol Lett 218:246–252. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.02.002

Cali K, Persaud KC (2020) Modification of an *Anopheles gambiae* odorant binding protein to create an array of chemical sensors for detection of drugs. Sci Rep 10:1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60824-7

Campanacci V, Lartigue A, Hällberg BM, Jones TA, Giudici-Orticoni MT, Tegoni M, Cambillau C (2003) Moth chemosensory protein exhibits drastic conformational changes and cooperativity on ligand binding. Proc Natl Acad Sci U S A 100:5069–5074. https://doi.org/10.1073/pnas.0836654100

Capo A, Pennacchio A, Varriale A, D'Auria S, Staiano M (2018) The porcine odorant-binding protein as molecular probe for benzene detection. PLoS One 13:1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202630

Carraher C, Dalziel J, Jordan MD, Christie DL, Newcomb RD, Kralicek AV (2015) Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. Insect Biochem Mol Biol 66:31–41. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.09.010

Cave JW, Wickiser JK, Mitropoulos AN (2019) Progress in the development of olfactory-based bioelectronic chemosensors. Biosens Bioelectron 123:211–222. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.063

Cennamo N, Di Giovanni S, Varriale A, Staiano M, Di Pietrantonio F, Notargiacomo A, Zeni L, D'Auria S (2015) Easy to use plastic optical fiber-based biosensor for detection of butanal. PLoS One 10:1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116770

Chahda JS, Soni N, Sun JS, Ebrahim SAM, Weiss BL, Carlson JR (2019) The molecular and cellular basis of olfactory response to tsetse fly attractants. PLoS Genet 15:1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008005

Coleman RE, Robert LL, Roberts LW, Glass JA, Seeley DC, Laughinghouse A, Perkins PV, Wirtz RA (1993) Laboratory evaluation of repellents against four anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) and two phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 30:499–502. https://doi.org/10.1093/jmedent/30.3.499

Corcoran JA, Jordan MD, Carraher C, Newcomb RD (2014) A novel method to study insect olfactory receptor function using HEK293 cells. Insect Biochem Mol Biol 54:22–32. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.08.005

D'Onofrio C, Zaremska V, Zhu J, Knoll W, Pelosi P (2020) Ligand-binding assays with OBPs and CSPs. In: Ligand-binding assays with OBPs and CSPs, 1st edn. Elsevier Inc.

Da Costa KS, Galúcio JM, Da Costa CHS, Santana AR, Dos Santos CV, Do Nascimento LD, Lima E, Lima AH, Neves Cruz J, Alves CN, Lameira J (2019) Exploring the potentiality of natural products from essential oils as inhibitors of odorant-binding proteins: a structure- and ligand-based virtual screening approach to find novel mosquito repellents. ACS Omega 4:22475–22486. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03157

Dahanukar A, Hallem EA, Carlson JR (2005) Insect chemoreception. Curr Opin Neurobiol 15:423–430. https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.06.001

Devillers J (2018) 2D and 3D structure–activity modelling of mosquito repellents: a review. SAR QSAR Environ Res 29:693–723. https://doi.org/10.1080/1062936X.2018.1513218

Di Pietrantonio F, Benetti M, Cannatà D, Verona E, Palla-Papavlu A, Fernández-Pradas JM, Serra P, Staiano M, Varriale A, D'Auria S (2015) A surface acoustic wave bio-electronic nose for detection of volatile odorant molecules. Biosens Bioelectron 67:516–523. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.027

Di Pietrantonio F, Cannatà D, Benetti M, Verona E, Varriale A, Staiano M, D'Auria S (2013) Detection of odorant molecules via surface acoustic wave biosensor array based on odorant-binding proteins. Biosens Bioelectron 41:328–334. https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.046

Diaz JH (2016) Chemical and plant-based insect repellents: efficacy, safety, and toxicity. Wilderness Environ Med 27:153–163. https://doi.org/10.1016/j.wem.2015.11.007

Dimitratos SD, Hommel AS, Konrad KD, Simpson LM, Wu-Woods JJ, Woods DF (2019) Biosensors to monitor water quality utilizing insect odorant-binding proteins as detector elements. Biosensors 9:1–15. https://doi.org/10.3390/bios9020062

Dobritsa AA, Van Der Goes Van Naters W, Warr CG, Steinbrecht RA, Carlson JR (2003) Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. Neuron 37:827–841. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00094-1

Drakou CE, Tsitsanou KE, Potamitis C, Fessas D, Zervou M, Zographos SE (2016) The crystal structure of the AgamOBP1•Icaridin complex reveals alternative binding modes and stereo-selective repellent recognition. Cell Mol Life Sci 74:319–338. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2335-6

Du L, Zou L, Wang Q, Zhao L, Huang L, Wang P, Wu C (2015) A novel biomimetic olfactory cell-based biosensor with DNA-directed site-specific immobilization of cells on a microelectrode array. Sensors Actuators B Chem 217:186–192. https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.08.054

Du S, Yang Z, Qin Y, Wang S, Duan H, Yang X (2018) Computational investigation of the molecular conformation-dependent binding mode of (E)-β-farnesene analogs with a heterocycle to aphid odorant-binding proteins. J Mol Model 24:70. https://doi.org/10.1007/s00894-018-3612-0

Duan SG, Li DZ, Wang MQ (2019) Chemosensory proteins used as target for screening behaviourally active compounds in the rice pest

Author's personal copy

Cnaphalocrocis medinalis (Lepidoptera: Pyralidae). Insect Mol Biol 28:123–135. https://doi.org/10.1111/imb.12532

Ferrari E, Lodi T, Sorbi RT, Tirindelli R, Cavaggioni A, Spisni A (1997) Expression of a lipocalin in *Pichia pastoris*: secretion, purification and binding activity of a recombinant mouse major urinary protein. FEBS Lett 401:73–77. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01436-6

Firestein S (2001) How the olfactory system makes sense of scents. Nature 413:211–218

Flower DR (1996) The lipocalin protein family: structure and function. Biochem J 318:1–14. https://doi.org/10.1042/bj3180001

Flower DR, North ACT, Sansom CE (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol 1482:9–24. https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00148-5

Franco TA, Oliveira DS, Moreira MF, Leal WS, Melo ACAA (2016) Silencing the odorant receptor co-receptor RproOrco affects the physiology and behavior of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. Insect Biochem Mol Biol 69:82–90. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.02.012

Franco TA, Xu P, Brito NF, Oliveira DS, Wen X, Moreira MF, Unelius CR, Leal WS, Melo ACA (2018) Reverse chemical ecology-based approach leading to the accidental discovery of repellents for *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas diseases refractory to DEET. Insect Biochem Mol Biol 103:46–52. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.004

Gao A, Wang Y, Zhang D, He Y, Zhang L, Liu Y, Wang Y, Song H, Li T (2020) Highly sensitive and selective detection of human-derived volatile organic compounds based on odorant binding proteins functionalized silicon nanowire array. Sensors Actuators B Chem 309: 127762. https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127762

Gardner JW, Bartlett PN (1994) A brief history of electronic materials. Sensors Actuators B Chem 18:210–211

Gonçalves F, Castro TG, Nogueira E, Pires R, Silva C, Ribeiro A, Cavaco-Paulo A (2018a) OBP fused with cell-penetrating peptides promotes liposomal transduction. Colloids Surf B: Biointerfaces 161:645–653. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.026

Goncalves F, Ribeiro A, Silva C, Cavaco-Paulo A (2019) Release of fragrances from cotton functionalized with carbohydrate-binding module proteins. ACS Appl Mater Interfaces 11:28499–28506. https://doi.org/10.1021/acsami.9b08191

Gonçalves F, Silva C, Ribeiro A, Cavaco-Paulo A (2018b) 1-Aminoanthracene transduction into liposomes driven by odorant-binding protein proximity. ACS Appl Mater Interfaces 10:27531–27539. https://doi.org/10.1021/acsami.8b10158

Grabe V, Sachse S (2018) Fundamental principles of the olfactory code. BioSystems 164:94–101. https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.10.010

Guo W, Wang X, Ma Z, Xue L, Han J, Yu D, Kang L (2011) CSP and takeout genes modulate the switch between attraction and repulsion during behavioral phase change in the migratory locust. PLoS Genet 7:e1001291. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001291

Hamana H, Shou-xin L, Breuils L, Hirono J, Sato T (2010) Heterologous functional expression system for odorant receptors. J Neurosci Methods 185:213–220. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.09.024

Hansson BS, Stensmyr MC (2011) Evolution of insect olfaction. Neuron 72:698–711. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.003

Heng S, Sluydts V, Durnez L, Mean V, Polo K, Tho S, Coosemans M, Van Griensven J (2017) Safety of a topical insect repellent (picaridin) during community mass use for malaria control in rural Cambodia. PLoS One 12:1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172566

Hildebrand JG, Shepherd GM (1997) Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across Phyla. Annu Rev Neurosci 20:595–631. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.595

Hou X, Zhang DD, Yuvaraj JK, Corcoran JA, Andersson MN, Löfstedt C (2020) Functional characterization of odorant receptors from the moth *Eriocrania semipurpurella*: a comparison of results in the *Xenopus* oocyte and HEK cell systems. Insect Biochem Mol Biol 117:103289. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103289

Hou Y, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Tlili C, Zhang A, Pernollet JC, Briand L, Gomila G, Errachid A, Samitier J, Salvagnac L, Torbiéro B, Temple-Boyer P (2005) Study of Langmuir and Langmuir-Blodgett films of odorant-binding protein/amphiphile for odorant biosensors. Langmuir 21:4058–4065. https://doi.org/10.1021/la0471801

Hurot C, Brenet S, Buhot A, Barou E, Belloir C, Briand L, Hou Y (2019) Highly sensitive olfactory biosensors for the detection of volatile organic compounds by surface plasmon resonance imaging. Biosens Bioelectron 123:230–236. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.072

Ibarra-Soria X, Nakahara TS, Lilue J, Jiang Y, Trimmer C, Souza MAA, Netto PHM, Ikegami K, Murphy NR, Kusma M, Kirton A, Saraiva LR, Keane TM, Matsunami H, Mainland J, Papes F, Logan DW (2017) Variation in olfactory neuron repertoires is genetically controlled and environmentally modulated. Elife 6:1–29. https://doi.org/10.7554/eLife.21476

Ju Q, Li X, Guo XQ, Du L, Shi CR, Qu MJ (2018) Two odorant-binding proteins of the dark black chafer (*Holotrichia parallela*) display preferential binding to biologically active host plant volatiles. Front Physiol 9:1–14. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00769

Kaiser L, Graveland-Bikker J, Steuerwald D, Vanberghem M, Herlihy K, Zhang S (2008) Efficient cell-free production of olfactory receptors: detergent optimization, structure, and ligand binding analyses. Proc Natl Acad Sci U S A 105:15726–15731. https://doi.org/10.1073/pnas.0804766105

Khadka R, Aydemir N, Carraher C, Hamiaux C, Colbert D, Cheema J, Malmström J, Kralicek A, Travas-Sejdic J (2019) An ultrasensitive electrochemical impedance-based biosensor using insect odorant receptors to detect odorants. Biosens Bioelectron 126:207–213. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.043

Klint JK, Senff S, Saez NJ, Seshadri R, Lau HY, Bende NS, Undheim EAB, Rash LD, Mobli M, King GF (2013) Production of recombinant disulfide-rich venom peptides for structural and functional analysis via expression in the periplasm of *E. coli*. PLoS One 8:e63865. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063865

Ko HJ, Park TH (2005) Piezoelectric olfactory biosensor: ligand specificity and dose-dependence of an olfactory receptor expressed in a heterologous cell system. Biosens Bioelectron 20:1327–1332. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.05.002

Korsching S (2002) Olfactory maps and odor images. Curr Opin Neurobiol 12:387–392

Kotlowski C, Larisika M, Guerin PM, Kleber C, Kröber T, Mastrogiacomo R, Nowak C, Pelosi P, Schütz S, Schwaighofer A, Knoll W (2018) Fine discrimination of volatile compounds by graphene-immobilized odorant-binding proteins. Sensors Actuators B Chem 256:564–572. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.093

Kröber T, Koussis K, Bourquin M, Tsitoura P, Konstantopoulou M, Awolola TS, Dani FR, Qiao H, Pelosi P, Iatrou K, Guerin PM (2018) Odorant-binding protein-based identification of natural spatial repellents for the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Insect Biochem Mol Biol 96:36–50. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.008

Kurtovic A, Widmer A, Dickson BJ (2007) A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. Nature 446:542–546. https://doi.org/10.1038/nature05672

Larisika M, Kotlowski C, Steininger C, Mastrogiacomo R, Pelosi P, Schütz S, Peteu SF, Kleber C, Reiner-Rozman C, Nowak C, Knoll W (2015) Electronic olfactory sensor based on *A. mellifera* odorant-

Author's personal copy

binding protein 14 on a reduced graphene oxide field-effect transistor. Angew Chem Int Ed 54:13245–13248. https://doi.org/10.1002/anie.201505712

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB (2004) Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. Neuron 43:703–714. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.019

Lartigue A, Gruez A, Briand L, Blon F, Bézirard V, Walsh M, Pernollet JC, Tegoni M, Cambillau C (2004) Sulfur single-wavelength anomalous diffraction crystal structure of a pheromone-binding protein from the honeybee *Apis mellifera* L. J Biol Chem 279:4459–4464. https://doi.org/10.1074/jbc.M311212200

Leal WS (2011) Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. Annu Rev Entomol 58: 120928130709004–120928130709391. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635

Leal WS (2017) Reverse chemical ecology at the service of conservation biology. Proc Natl Acad Sci U S A 114:12094–12096. https://doi.org/10.1073/pnas.1717375114

Leal WS, Barbosa RMR, Xu W, Ishida Y, Syed Z, Latte N, Chen AM, Morgan TI, Cornel AJ, Furtado A (2008) Reverse and conventional chemical ecology approaches for the development of oviposition attractants for *Culex* mosquitoes. PLoS One 3:e3045. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003045

Leal WS, Parra-Pedrazzoli AL, Kaissling K-EE, Morgan TI, Zalom FG, Pesak DJ, Dundulis EA, Burks CS, Higbee BS (2005) Unusual pheromone chemistry in the navel orangeworm: Novel sex attractants and a behavioral antagonist. Naturwissenschaften 92:139–146. https://doi.org/10.1007/s00114-004-0598-5

Lee KM, Son M, Kang JH, Kim D, Hong S, Park TH, Chun HS, Choi SS (2018) A triangle study of human, instrument and bioelectronic nose for non-destructive sensing of seafood freshness. Sci Rep 8:1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-19033-y

Lee SH, Jun SB, Ko HJ, Kim SJ, Park TH (2009) Cell-based olfactory biosensor using microfabricated planar electrode. Biosens Bioelectron 24:2659–2664. https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.01.035

Li HL, Zhang LY, Zhuang SL, Ni CX, Shang HW (2013) Fluorescence investigation on the interaction of a prevalent competitive fluorescent probe with entomic odorant binding protein. Spectrosc Lett 46: 527–534. https://doi.org/10.1080/00387010.2013.763830

Li QL, Yi SC, Li DZ, Nie XP, Li SQ, Wang MQ, Zhou AM (2018) Optimization of reverse chemical ecology method: false positive binding of *Aenasius bambawalei* odorant binding protein 1 caused by uncertain binding mechanism. Insect Mol Biol 27:305–318. https://doi.org/10.1111/imb.12372

Lim CM, Kwon JY, Cho WJ (2017) Field-effect transistor biosensor platform fused with *Drosophila* odorant-binding proteins for instant ethanol detection. ACS Appl Mater Interfaces 9:14051–14057. https://doi.org/10.1021/acsami.6b15539

Liu G, Arnaud P, Offmann B, Picimbon JF (2017) Genotyping and biosensing chemosensory proteins in insects. Sensors (Switzerland) 17. https://doi.org/10.3390/s17081801

Liu G, Ma H, Xie H, Xuan N, Guo X, Fan Z, Rajashekar B, Arnaud P, Offmann B, Picimbon JF (2016) Biotype characterization, developmental profiling, insecticide response and binding property of *Bemisia tabaci* chemosensory proteins: role of CSP in insect defense. PLoS One 11:1–29. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154706

Liu Q, Wang H, Li H, Zhang J, Zhuang S, Zhang F, Jimmy Hsia K, Wang P (2013) Impedance sensing and molecular modeling of an olfactory biosensor based on chemosensory proteins of honeybee. Biosens Bioelectron 40:174–179. https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.011

Liu Y, Cui Z, Wang G, Zhou Q, Liu Y (2020) Cloning and functional characterization of three odorant receptors from the Chinese citrus fly *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). Front Physiol 11:1–9. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00246

Lu Y, Li H, Zhuang S, Zhang D, Zhang Q, Zhou J, Dong S, Liu Q, Wang P (2014) Olfactory biosensor using odorant-binding proteins from honeybee: ligands of floral odors and pheromones detection by electrochemical impedance. Sensors Actuators B Chem 193:420–427. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.11.045

Lu Y, Yao Y, Zhang Q, Zhang D, Zhuang S, Li H, Liu Q (2015) Olfactory biosensor for insect semiochemicals analysis by impedance sensing of odorant-binding proteins on interdigitated electrodes. Biosens Bioelectron 67:662–669. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.098

Maleszka J, Forêt S, Saint R, Maleszka R (2007) RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). Dev Genes Evol 217:189–196. https://doi.org/10.1007/s00427-006-0127-y

Manai R, Scorsone E, Rousseau L, Ghassemi F, Possas Abreu M, Lissorgues G, Tremillon N, Ginisty H, Arnault JC, Tuccori E, Bernabei M, Cali K, Persaud KC, Bergonzo P (2014) Grafting odorant binding proteins on diamond bio-MEMS. Biosens Bioelectron 60:311–317. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.04.020

Manoharan M, Ng Fuk Chong M, Vaïtinadapoulé A, Frumence E, Sowdhamini R, Offmann B, Chong MNF, Vätinadapoulé A, Frumence E, Sowdhamini R, Offmann B (2013) Comparative genomics of odorant binding proteins in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. Genome Biol Evol 5:163–180. https://doi.org/10.1093/gbe/evs131

Margaryan A, Moaddel R, Aldrich JR, Tsuruda JM, Chen AM, Leal WS, Wainer IW (2006) Synthesis of an immobilized *Bombyx mori* pheromone-binding protein liquid chromatography stationary phase. Talanta 70:752–755. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.01.046

McQueen RH, Vaezafshar S (2020) Odor in textiles: A review of evaluation methods, fabric characteristics, and odor control technologies. Text Res J 90:1157–1173. https://doi.org/10.1177/0040517519883952

Miazzi F, Schulze HC, Zhang L, Kaltofen S, Hansson BS, Wicher D (2019) Low Ca2+ levels in the culture media support the heterologous expression of insect odorant receptor proteins in HEK cells. J Neurosci Methods 312:122–125. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.11.021

Mombaerts P (1999) Molecular Biology of Odorant Receptors in Vertebrates. Annu Rev Neurosci 22:487–509. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.487

Mulla MY, Tuccori E, Magliulo M, Lattanzi G, Palazzo G, Persaud K, Torsi L (2015) Capacitance-modulated transistor detects odorant binding protein chiral interactions. Nat Commun 6:1–9. https://doi.org/10.1038/ncomms7010

Murphy EJ, Booth JC, Davrazou F, Port AM, Jones DNM (2013) Interactions of *Anopheles gambiae* odorant-binding proteins with a human-derived repellent: Implications for the mode of action of N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET). J Biol Chem 288:4475–4485. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436386

Nichols AS, Luetje CW (2010) Transmembrane segment 3 of *Drosophila melanogaster* odorant receptor subunit 85b contributes to ligand-receptor interactions. J Biol Chem 285:11854–11862. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058321

Nomura Kitabayashi A, Arai T, Kubo T, Natori S (1998) Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). Insect Biochem Mol Biol 28:785–790. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00058-7

Oliferenko PV, Oliferenko AA, Poda GI, Osolodkin DI, Pillai GG, Bernier UR, Tsikolia M, Agramonte NM, Clark GG, Linthicum KJ, Katritzky AR (2013) Promising *Aedes aegypti* repellent chemotypes identified through integrated QSAR, virtual screening,

Author's personal copy

synthesis, and bioassay. PLoS One 8:1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064547

Pagadala Damdaram KJ, Kempraj V, Aurade RM, Kumar Roy T, Shivashankara KS, Verghese A (2014) Computational reverse chemical ecology: virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis*. BMC Genomics 15: 209. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-209

Palla-Papavlu A, Patrascioiu A, Di Pietrantonio F, Fernández-Pradas JM, Cannatà D, Benetti M, D'Auria S, Verona E, Serra P (2014) Preparation of surface acoustic wave odor sensors by laser-induced forward transfer. Sensors Actuators B Chem 192:369–377. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.082

Paolini S, Tanfani F, Fini C, Bertoli E, Pelosi P (1999) Porcine odorant-binding protein: structural stability and ligand affinities measured by Fourier-transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol 1431: 179–188. https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00037-0

Pelosi P, Iovinella I, Zhu J, Wang G, Dani FR (2017) Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. Biol Rev 93:184–200. https://doi.org/10.1111/brv.12339

Pelosi P, Mastrogiacomo R, Iovinella I, Tuccori E, Persaud KC (2014) Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins. Appl Microbiol Biotechnol 98:61–70. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5383-y

Pelosi P, Zhu J, Knoll W (2018) Odorant-binding proteins as sensing elements for odour monitoring. Sensors (Switzerland) 18. https://doi.org/10.3390/s18103248

Plettner E, Lazar J, Prestwich EG, Prestwich GD (2000) Discrimination of pheromone enantiomers by two pheromone binding proteins from the gypsy moth *Lymantria dispar*. Biochemistry 39:8953–8962

Possas-Abreu M, Rousseau L, Ghassemi F, Lissorgues G, Habchi M, Scorsone E, Cal K, Persaud K (2017) Biomimetic diamond MEMS sensors based on odorant-binding proteins: sensors validation through an autonomous electronic system. ISOEN 2017 - ISOCS/IEEE Int Symp Olfaction Electron Nose, Proc 9–11. https://doi.org/10.1109/ISOEN.2017.7968909

Ramoni R, Bellucci S, Grycznyski I, Grycznyski Z, Grolli S, Staiano M, De Bellis G, Micciulla F, Pastore R, Tiberia A, Conti V, Merli E, Varriale A, Rossi M, D'Auria S (2007) The protein scaffold of the lipocalin odorant-binding protein is suitable for the design of new biosensors for the detection of explosive components. J Phys Condens Matter 19:395012. https://doi.org/10.1088/0953-8984/19/39/395012

Reiner-Rozman C, Kotlowski C, Knoll W (2016) Electronic biosensing with functionalized rGO FETs. Biosensors 6:1–12. https://doi.org/10.3390/bios6020017

Ricatti J, Acquasaliente L, Ribaudo G, De Filippis V, Bellini M, Llovera RE, Barollo S, Pezzani R, Zagotto G, Persaud KC, Mucignat-Caretta C (2019) Effects of point mutations in the binding pocket of the mouse major urinary protein MUP20 on ligand affinity and specificity. Sci Rep 9:1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36391-3

Sandler BH, Nikonova L, Leal WS, Clardy J (2000) Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. Chem Biol 7:143–151. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00078-8

Sankaran S, Khot LR, Panigrahi S (2012) Biology and applications of olfactory sensing system: a review. Sensors Actuators B Chem 171–172:1–17. https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.03.029, 1

Sankaran S, Panigrahi S, Mallik S (2011) Odorant binding protein based biomimetic sensors for detection of alcohols associated with *Salmonella* contamination in packaged beef. Biosens Bioelectron 26:3103–3109. https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.122

Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, Nakagawa T, Vosshall LB, Touhara K (2008) Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. Nature 452:1002–1006. https://doi.org/10.1038/nature06850

Shiao MS, Chang AYF, Liao BY, Ching YH, Lu MYJ, Chen SM, Li WH (2012) Transcriptomes of mouse olfactory epithelium reveal sexual differences in odorant detection. Genome Biol Evol 4:703–712. https://doi.org/10.1093/gbe/evs039

Siciliano P, He XLL, Woodcock C, Pickett JAA, Field LMM, Birkett MAA, Kalinova B, Gomulski LMM, Scolari F, Gasperi G, Malacrida ARR, Zhou JJJ (2014) Identification of pheromone components and their binding affinity to the odorant binding protein CcapOBP83a-2 of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Insect Biochem Mol Biol 48:51–62. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.02.005

Silva C, Matamá T, Azoia NG, Mansilha C, Casal M, Cavaco-Paulo A (2014) Odorant binding proteins: a biotechnological tool for odour control. Appl Microbiol Biotechnol 98:3629–3638. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5243-9

Son M, Kim D, Kang J, Lim JH, Lee SH, Ko HJ, Hong S, Park TH (2016) Bioelectronic nose using odorant binding protein-derived peptide and carbon nanotube field-effect transistor for the assessment of *Salmonella* contamination in food. Anal Chem 88:11283–11287. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03284

Stanczyk NM, Brookfield JFY, Field LM, Logan JG (2013) *Aedes aegypti* mosquitoes exhibit decreased repellency by DEET following previous exposure. PLoS One:8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054438

Strauch M, Lüdke A, Münch D, Laudes T, Giovanni Galizia C, Martinelli E, Lavra L, Paolesse R, Ulivieri A, Catini A, Capuano R, Di Natale C (2014) More than apples and oranges - detecting cancer with a fruit fly's antenna. Sci Rep 4:1–9. https://doi.org/10.1038/srep03576

Suh E, Bohbot JD, Zwiebel LJ (2014) Peripheral olfactory signaling in insects. Curr Opin Insect Sci 6:86–92. https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.10.006

Sun S, Zeng F, Yi S, Wang M (2019) Molecular screening of behaviorally active compounds with CmedOBP14 from the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis*

Sun SF, Zhou B, Hou HN, Liu Y, Xiang GY (2006) Studies on the interaction between oxaprozin-E and bovine serum albumin by spectroscopic methods. Int J Biol Macromol 39:197–200. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.03.020

Swale DR, Sun B, Tong F, Bloomquist JR (2014) Neurotoxicity and mode of action of N,N-diethyl-meta-toluamide (DEET). PLoS One 9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103713

Szunerits S, Boukherroub R, Vasilescu A (2020) Electrochemical biosensing with odorant binding proteins. In: Electrochemical biosensing with odorant binding proteins, 1st edn. Elsevier Inc.

Tan J, Zaremska V, Lim S, Knoll W, Pelosi P (2019) Probe-dependence of competitive fluorescent ligand binding assays to odorant-binding proteins. Anal Bioanal Chem 412:547–554. https://doi.org/10.1007/s00216-019-02309-9

Tegoni M, Campanacci V, Cambillau C (2004) Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. Trends Biochem Sci 29:257–264. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.03.003

Thireou T, Kythreoti G, Tsitsanou KE, Koussis K, Drakou CE, Kinnersley J, Kröber T, Guerin PM, Zhou JJ, Iatrou K, Eliopoulos E, Zographos SE (2018) Identification of novel bioinspired synthetic mosquito repellents by combined ligand-based screening and OBP-structure-based molecular docking. Insect Biochem Mol Biol 98: 48–61. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.05.001

Tian Z, Liu J, Zhang Y (2016) Structural insights into *Cydia pomonella* pheromone binding protein 2 mediated prediction of potentially active semiochemicals. Sci Rep 6:1–11. https://doi.org/10.1038/srep22336

Author's personal copy

Tsitsanou KE, Thireou T, Drakou CE, Koussis K, Keramioti MV, Leonidas DD, Eliopoulos E, Iatrou K, Zographos SE (2012) *Anopheles gambiae* odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: implications for structure-based design of novel mosquito repellents. Cell Mol Life Sci 69:283–297. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0745-z

Tzotzos G, Iley JN, Moore EA (2018) New insights on repellent recognition by *Anopheles gambiae* odorant-binding protein 1. PLoS One 13:1–23. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194724

Vanhove E, De Sanoit J, Arnault JC, Saada S, Mer C, Mailley P, Bergonzo P, Nesladek M (2007) Stability of H-terminated BDD electrodes: an insight into the influence of the surface preparation. Phys Status Solidi Appl Mater Sci 204:2931–2939

Venthur H, Zhou JJ (2018) Odorant receptors and odorant-binding proteins as insect pest control targets: a comparative analysis. Front Physiol 9:1–16. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01163

Vosshall LB, Hansson BS (2011) A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. Chem Senses 36:497–498. https://doi.org/10.1093/chemse/bjr022

Wang B, Liu Y, He K, Wang G (2016) Comparison of research methods for functional characterization of insect olfactory receptors. Sci Rep 6:1–10. https://doi.org/10.1038/srep32806

Wasilewski T, Gębicki J, Kamysz W (2018) Advances in olfaction-inspired biomaterials applied to bioelectronic noses. Sensors Actuators B Chem 257:511–537. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.086

Wasilewski T, Szulczyński B, Wojciechowski M, Kamysz W, Gębicki J (2019) A highly selective biosensor based on peptide directly derived from the HarmOBP7 aldehyde binding site. Sensors (Switzerland) 19. https://doi.org/10.3390/s19194284

Wiles D, Yee J, Castillo U, Russell J, Spiller H, Casavant M (2014) A lethal case of DEET toxicity due to intentional ingestion. J Anal Toxicol 38:696–698. https://doi.org/10.1093/jat/bku082

Wojtasek H, Leal WS (1999) Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes. J Biol Chem 274:30950–30956. https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30950

Yabuki M, Portman KL, Scott DJ, Briand L, Taylor AJ (2010) DyBOBS: A dynamic biomimetic assay for odorant-binding to odor-binding protein. Chemosens Percept 3:108–117. https://doi.org/10.1007/s12078-010-9070-4

Yang G, Winberg G, Ren H, Zhang S (2011) Expression, purification and functional analysis of an odorant binding protein AaegOBP22 from *Aedes aegypti*. Protein Expr Purif 75:165–171. https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.09.004

Yang H, Kim D, Kim J, Moon D, Song HS, Lee M, Hong S, Park TH (2017a) Nanodisc-based bioelectronic nose using olfactory receptor produced in *Escherichia coli* for the assessment of the death-associated odor cadaverine. ACS Nano 11:11847–11855. https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04992

Yang RN, Li DZ, Yu G, Yi SC, Zhang Y, Kong DX, Wang MQ (2017b) Structural transformation detection contributes to screening of behaviorally active compounds: dynamic binding process analysis of DhelOBP21 from *Dastarcus helophoroides*. J Chem Ecol 43:1033–1045. https://doi.org/10.1007/s10886-017-0897-x

Yi SY, Li DZ, Zhou CX, Tang YL, Abdelnabby HE, Wang MQ (2018) Screening behaviorally active compounds based on fluorescence quenching in combination with binding mechanism analyses of SspOBP7, an odorant binding protein from *Sclerodermus* sp. Int J Biol Macromol 107:2667–2678. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.149

Yin J, Choo Y-M, Duan H, Leal WS (2015) Selectivity of odorant-binding proteins from the southern house mosquito tested against physiologically relevant ligands. Front Physiol 6:56. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00056

Zarzo M (2007) The sense of smell: Molecular basis of odorant recognition. Biol Rev 82:455–479. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00019.x

Zhang D, Lu Y, Zhang Q, Yao Y, Li S, Li H, Zhuang S, Jiang J, Liu GL, Liu Q (2015) Nanoplasmonic monitoring of odorants binding to olfactory proteins from honeybee as biosensor for chemical detection. Sensors Actuators B Chem 221:341–349. https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.091

Zhou YL, Zhu XQ, Gu SH, Cui H, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ (2014) Silencing in *Apolygus lucorum* of the olfactory coreceptor Orco gene by RNA interference induces EAG response declining to two putative semiochemicals. J Insect Physiol 60:31–39. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.10.006

Zhou XH, Zhang L, Ban LP, Iovinella I, Zhao LJ, Gao Q, Felicioli A, Sagona S, Pieraccini G, Pelosi P, Dani FR (2013) Diversity, abundance, and sex-specific expression of chemosensory proteins in the reproductive organs of the locust *Locusta migratoria manilensis*. Biol Chem 394:43–54. https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0114

Zhou YT, Li L, Zhou XR, Tan Y, Pang BP (2020) Three chemosensory proteins involved in chemoreception of *Oedaleus asiaticus* (Orthopera: Acridoidea). J Chem Ecol 46:138–149. https://doi.org/10.1007/s10886-019-01138-5

Zhu J, Arena S, Spinelli S, Liu D, Zhang G, Wei R, Cambillau C, Scaloni A, Wang G, Pelosi P (2017) Reverse chemical ecology: olfactory proteins from the giant panda and their interactions with putative pheromones and bamboo volatiles. Proc Natl Acad Sci U S A 114:E9802–E9810. https://doi.org/10.1073/pnas.1711437114

Zographos SE, Eliopoulos E, Thireou T, Tsitsanou KE (2018) OBP Structure-aided repellent discovery. In: Computational design of chemicals for the control of mosquitoes and their diseases. CRC Press, pp 65–106

Zohora SE, Khan AM, Hundewale N (2013) Chemical sensors employed in electronic noses: a review. Adv Intell Syst Comput 178:177–184. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31600-5_18

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.