

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Daniela Viana dos Santos

AS APOLIPOPROTEÍNAS E SEU PAPEL NA FISIOLÓGIA REPRODUTIVA DE
***RHODNIUS PROLIXUS*, UM VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS**

Belo Horizonte
2025

Daniela Viana dos Santos

**AS APOLIPOPROTEÍNAS E SEU PAPEL NA FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE
RHODNIUS PROLIXUS, UM VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Barbosa Koerich

Coorientador: Prof. Dr. Nelder Gontijo Figueiredo

Belo Horizonte
2025

043

Santos, Daniela Viana dos.

As apolipoproteínas e seu papel na fisiologia reprodutiva de *Rhodnius prolixus*, um vetor da doença de Chagas / Daniela Viana dos Santos. – 2025.
144 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Leonardo Barbosa Koerich. Coorientador: Dr. Nelder Gontijo Figueiredo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Apolipoproteínas. 3. Doença de Chagas.
4. *Rhodnius Prolixus*. 5. Fisiologia. 6. Reprodução. I. Koerich, Leonardo Barbosa. II. Figueiredo, Nelder Gontijo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

DANIELA VIANA DOS SANTOS - 382/2025/16

ENTRADA 2º/2021 - MATRICULA: 2021699026

Às **09:00** horas do dia **27 de novembro de 2025**, no ICB, bloco E3 sala 164, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Daniela Viana dos Santos**. A presidência da sessão coube ao Professor **Leonardo Barbosa Koerich**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída pelos doutores: **Álvaro Gil Araújo Ferreira** - IRR/FIOCRUZ - MG, **Pedro Lagerblad de Oliveira** - UFRJ, **Daniella Castanheira Bartholomeu** - UFMG, **Ricardo Nascimento Araújo** - UFMG, **Nelder de Figueiredo Gontijo** - UFMG - Coorientador e **Leonardo Barbosa Koerich** - UFRJ/UFMG - Orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado** intitulada: "**AS APOLIPOPROTEÍNAS E SEU PAPEL NA FISIOLÓGIA REPRODUTIVA DE RHODNIUS PROLIXUS, UM VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **aprovada** a **Tese de Doutorado**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Observação: Este documento somente terá validade mediante assinatura do(a) Coordenador(a) do PPGPAR.



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Barbosa Koerich, Professor(a)**, em 27/11/2025, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Castanheira Bartholomeu, Professora do Magistério Superior**, em 27/11/2025, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Nascimento Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 28/11/2025, às 07:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nelder de Figueiredo Gontijo, Professor do Magistério Superior**, em 28/11/2025, às 08:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Lagerblad De Oliveira, Usuário Externo**, em 30/11/2025, às 22:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alvaro Gil Araujo Ferreira, Usuário Externo**, em 16/12/2025, às 07:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hudson Alves Pinto, Coordenador(a)**, em 03/02/2026, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4681404 e o código CRC **B3EA1C82**.

*Aos meus pais, Stael e Maciel, que, sob muito sol, fizeram-me
chegar até aqui, à sombra.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Léo, e ao meu co-orientador, Nelder, pelo suporte e pelos ensinamentos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sem a parceria, a confiança e a compreensão de vocês, concluir o doutorado não teria sido possível.

Agradeço à UFMG, ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e ao Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) pela estrutura e pelos recursos técnicos e humanos que serviram de base para minha formação científica.

Agradeço a todos os colegas do LFIH, sem exceção: vocês fizeram do laboratório um ambiente de trabalho divertido e acolhedor. Em especial, agradeço à Letícia e à Marcela por dividirem a bancada da Biomol comigo e por contribuírem diretamente para a minha tese.

Agradeço à Jordânia, à Tatyane e ao Luccas pelos conhecimentos técnicos, disponibilidade de tempo, gentileza e generosidade. Vocês foram essenciais para a realização de uma importante etapa deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas da Escola Estadual Dr. Simão Tamm Bias Fortes e, claro, aos meus queridos ex-alunos. Na busca por ensinar, aprendi com cada um de vocês a ser uma pessoa melhor. Em especial, agradeço à Gabriela Monteiro por, todos os dias, me renovar as esperanças.

Aos amigos de longa data, em especial às meninas da Bio (Ágata, Aninha, Cris, Hortência, Julinha e Thais), agradeço por se fazerem presentes e pelas alegrias compartilhadas. Ter vocês na minha vida é um presente.

Agradeço ao meu namorado, Cassiano, por ser meu porto seguro e por acreditar em mim. Seu amor me faz ir além.

Por fim, agradeço à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã por me ensinarem o poder do amor e do trabalho. Vocês serão sempre o meu lar.

“Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.” (José Saramago)

“Para que eu escreva um poema não político, preciso escutar os pássaros.
Para que eu escute os pássaros,
os aviões de guerra precisam se calar.”
(Marwan Makhoul, poeta palestino)

RESUMO

O triatomíneo *Rhodnius prolixus* é um importante vetor do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, e um dos principais modelos de estudos de fisiologia de insetos hematófagos. Nos últimos anos, apolipoproteínas pertencentes à família das lipocalinas foram descritas nessa espécie, mas suas funções ainda não haviam sido descritas. Considerando sua elevada expressão em testículos e evidências de participação de lipocalinas em processos reprodutivos em outros organismos, esta tese investigou o papel das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 na fisiologia reprodutiva de *R. prolixus*. Para isso, foram realizadas análises genômicas e de modelagem molecular para caracterizar a estrutura e a função putativa de RPRC010099 e RPRC015421. A expressão gênica basal de RPRC010099 e RPRC015421 nos órgãos reprodutivos de *R. prolixus* foi quantificada. Por meio da técnica de RNAi, os genes RPRC010099 e RPRC015421 foram silenciados nos insetos machos para avaliação dos efeitos na reprodução. Por fim, proteínas recombinantes e anticorpos policlonais foram produzidos com o objetivo de avaliar a transferência de RPRC010099 e RPRC015421 dos machos para as fêmeas durante a cópula. As análises *in silico* confirmaram a identidade das proteínas como lipocalinas e sugeriram afinidade por moléculas lipídicas, especialmente eicosanoides como a prostaglandina E2 (PGE2) e o ácido eicosapentaenoico (EPA). A expressão gênica mostrou-se significativamente mais elevada em testículos, com padrão diferencial entre machos e fêmeas. O silenciamento dos genes por RNAi resultou em redução na fertilidade dos insetos, evidenciada pela diminuição do número de ovos depositados, sem afetar a taxa de eclosão. Os ensaios de transferência revelaram que ambas apolipoproteínas estudadas são transferidas do macho para a fêmea durante a cópula. Em conjunto, os resultados indicam que as apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 atuam como fatores reprodutivos masculinos, possivelmente carreando eicosanoides durante a cópula e modulando a fertilidade da fêmea. Este estudo amplia o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva de triatomíneos, ressaltando a relevância dos fatores masculinos na fertilidade da espécie e sugerindo novos alvos moleculares para estratégias de controle populacional de *R. prolixus* e, com isso, da transmissão da doença de Chagas.

Palavras-chave: apolipoproteína; *Rhodnius prolixus*; fertilidade; reprodução; eicosanoides.

ABSTRACT

The triatomine *Rhodnius prolixus* is an important vector of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, and one of the main model organisms for studies on the physiology of blood-feeding insects. In recent years, apolipoproteins belonging to the lipocalin family have been described in this species, but their functions have not yet been elucidated. Considering their high expression in testes and evidence of lipocalin involvement in reproductive processes in other organisms, this thesis investigated the role of the apolipoproteins RPRC010099 and RPRC015421 in the reproductive physiology of *R. prolixus*. Genomic and molecular modeling analyses were performed to characterize the structure and putative function of RPRC010099 and RPRC015421. Basal gene expression of RPRC010099 and RPRC015421 in reproductive organs of *R. prolixus* were quantified. Using RNAi, the genes RPRC010099 and RPRC015421 were silenced in male insects to evaluate their effects on reproduction. Finally, recombinant proteins and polyclonal antibodies were produced to assess the transfer of RPRC010099 and RPRC015421 from males to females during copulation. *In silico* analyses confirmed the identity of these proteins as lipocalins and suggested affinity for lipid molecules, especially eicosanoids such as prostaglandin E2 (PGE2) and eicosapentaenoic acid (EPA). Gene expression was significantly higher in testes, with differential patterns between males and females. RNAi-mediated gene silencing resulted in reduced insect fertility, evidenced by a decrease in the number of eggs laid, without affecting hatching rates. Transfer assays revealed that both apolipoproteins studied are transferred from males to females during copulation. Altogether, the results indicate that apolipoproteins RPRC010099 and RPRC015421 act as male reproductive factors, possibly carrying eicosanoids during copulation and modulating female fertility. This study expands the understanding of reproductive physiology in triatomines, highlighting the relevance of male factors in species fertility and suggesting new molecular targets for strategies aimed at controlling *R. prolixus* populations and, consequently, the transmission of Chagas disease.

Keywords: apolipoprotein; *Rhodnius prolixus*; fertility; reproduction; eicosanoids.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo de desenvolvimento do *Rhodnius prolixus*.** Estágios de ovo, ninfa (com cinco estádios ninfais) e adulto (fêmea e macho, respectivamente)..... 16
- Figura 2 – Distribuição geográfica das espécies do gênero *Rhodnius*.** A espécie *Rhodnius prolixus* é representada em vermelho, com distribuição concentrada na Venezuela e Colômbia e alguns registros na América Central..... 17
- Figura 3 – Modelo da estrutura tridimensional de uma lipocalina.** As letras A - H indicam as fitas beta formando o β -barril. Figura baseada na estrutura cristalina da b-lactoglobulina bovina, por Kontopidis e colaboradores (2002)..... 21
- Figura 4 – Fotografia do sistema reprodutor feminino de *R. prolixus*.** À esquerda: foto do sistema reprodutor feminino de um triatomíneo na cavidade abdominal. BC: Bolsa Copulatória; Esm: Espermateca; Esp: Espermatóforo (recebido do macho durante o acasalamento); O: Ovo maduro; OL: Oviduto Lateral; Ov: Ovariolo; Tq: Traqueíolas. Imagem de Ariane Pereira-Lourenço retirada de Machado (2022). À direita: esquema dos órgãos reprodutivos internos da fêmea de *R. prolixus* com os ovários repletos de ovos. 1 – Filamento terminal; 2 – ovariolos; 3 – oviduto comum; 4 – vagina; 5 – cálice; 6 – oviduto lateral; 7 – espermateca; 8 – glândula acessória..... 25
- Figura 5 – Fotografia do sistema reprodutor masculino de *R. prolixus*.** À esquerda: t - testículo; ta - glândula acessória transparente anterior; ponta de seta branca - local onde o ducto deferente do testículo se fixa à ponta anterior da glândula transparente anterior; tp - as duas glândulas acessórias posteriores; o - glândula opaca; eb - bulbo ejaculatório. Barra de escala = 1 mm. (Adaptado de Chiang et al., 2013). À direita: 1 – corpo adiposo torácico; 2 – filamento terminal; 3 – estigma respiratório; 4 – saco contendo os tubos testiculares; 5 – glândulas acessórias; 6 – vesícula seminal; 7 – membrana que recobre o órgão copulador; a-f – músculos tergo-externais..... 26
- Figura 6 – Cópula de *R. prolixus*.** O macho (à esquerda) segura a fêmea com seus pares de pernas e rotaciona seus segmentos genitais para possibilitar a penetração do edeago na genitália feminina. Barra de escala: 5mm..... 27
- Figura 7 – Precusores de eicosanóides.** Estrutura química do ácido dihomo- γ -linolênico (DGLA), ácido araquidônico (AA) e ácido eicosapentaenoico (EPA)..... 31
- Figura 8 – Esquema geral do metabolismo do ácido araquidônico.** Três ácidos graxos poli-insaturados (20:3n-6, 20:4n-6 e 20:5n-3) podem servir de substrato para a biossíntese de eicosanóides. Destes, o mais bem estudado é o ácido araquidônico (20:4n-6). Os números indicam as estruturas químicas: 1 = fosfolipídio; 2 = ácido araquidônico hidrolisado; 3 = prostaglandina E2; 4 = ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico; 5 = leucotrieno B4; 6 = ácido 11,12-epoxieicosatrienoico; 7 = lipoxina A. As letras maiúsculas indicam as principais enzimas responsáveis pelo biossíntese dos eicosanóides: A = fosfolipase A2; B = ciclooxigenase e etapa enzimática associada; C = citocromo P450 epoxigenase; D = lipoxigenase..... 33
- Figura 9 – Representação da microinjeção de dsRNA.** À esquerda: fotografia do momento da injeção de dsRNA em uma ninfa do 5º estágio macho de *R. prolixus* (fotografia de autoria própria). A injeção é realizada na região lateral do corpo, entre o primeiro e o segundo par de

pernas. À direita: imagem do Nanoinjector (Drummond) utilizado no experimento.....	44
Figura 10 – Esquema experimental do silenciamento por RNAi. Produção e microinjeção do dsRNA; e avaliação do fenótipo dos insetos <i>knockdown</i> para os genes RPRC010099 e RPRC015421.....	46
Figura 11 – Plasmídeos pET-TEV28a. À esquerda o plasmídeo contendo o inserto RPRC010099 e à direita, o inserto RPRC015421.....	47
Figura 12 – Localização dos genes RPRC010099 e RPRC015421 no genoma de <i>R. prolixus</i>. RPRC010099 e RPRC015421 estão localizados em scaffolds diferentes.....	54
Figura 13 – Alinhamento das sequências de nucleotídeos de RPRC010099 e RPRC015421. Em vermelho: sequência do dsRNA utilizado nos experimentos de silenciamento por RNAi. Em amarelo: sequência dos iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR. Asterisco (*) – indica nucleotídeos idênticos.....	55
Figura 14 – Alinhamento das sequências de aminoácidos de RPRC010099 e RPRC015421. (*) – aminoácidos idênticos; (:) – aminoácidos altamente conservados; (.) – aminoácidos pouco conservados.....	56
Figura 15 – Estrutura tridimensional da proteína RPRC010099. O modelo de confiança do programa AlphaFold se baseia na pontuação de confiança do modelo por resíduo (pLDDT) entre 0 e 100. Azul escuro: pLDDT > 90. Azul claro: 90 > pLDDT > 70. Amarelo: 70 > pLDDT > 50. Laranja: pLDDT < 50. Algumas regiões abaixo de 50 podem ser desestruturadas isoladamente.....	57
Figura 16 – Estrutura tridimensional da proteína RPRC015421. O modelo de confiança do programa AlphaFold se baseia na pontuação de confiança do modelo por resíduo (pLDDT) entre 0 e 100. Azul escuro: pLDDT > 90. Azul claro: 90 > pLDDT > 70. Amarelo: 70 > pLDDT > 50. Laranja: pLDDT < 50. Algumas regiões abaixo de 50 podem ser desestruturadas isoladamente.....	58
Figura 17 – Expressão relativa dos genes de RPRC010099 e RPRC015421 em fêmeas e machos antes e após o acasalamento. PCR quantitativa dos órgãos reprodutivos de fêmeas e machos de <i>R. prolixus</i> , antes e após o acasalamento. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação à expressão gênica observada em fêmeas. * p < 0,05; ** p < 0,005 (teste T, não paramétrico, Mann Whitney).....	62
Figura 18 – Expressão relativa dos genes RPRC010099 e RPRC015421 em testículos de insetos silenciados pela técnica de RNAi. Análise realizada por PCR quantitativa. (A) Expressão relativa dos genes RPRC010099 e (B) RPRC015421 no grupo dsKer (controle), em machos 72h pós-injeção do dsRNA (p.i.) e em machos pós-cópula (p.c.). ** p < 0,005; *** p < 0,0005.....	63
Figura 19 – Número de ovos produzidos por casal. Cada ponto representa a quantidade de ovos produzidos por cada casal formado por um inseto macho injetado com dsRNA e uma fêmea virgem. *p < 0,05; **p < 0,005.....	64
Figura 20 – Taxa de eclosão das ninfas (%). Percentual de ninfas eclodidas em cada grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos.....	65
Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto da PCR de colônia das bactérias transformadas com o plasmídeo pET-TEV28a/inserto. A banda de 630 pb corresponde ao gene de RPRC010099 e a banda de 657 pb corresponde ao gene de RPRC015421. Foi utilizado o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder da	

ThermoFisher. Gel corado com brometo de etídio (EtBr) e revelado sob luz UV.....	66
Figura 22 – Proteínas recombinantes purificadas por cromatografia por afinidade. S – padrão de peso molecular; 1 e 2 – RPRC010099; 3 e 4 – RPRC015421. Foi utilizado o padrão de peso molecular BIO-RAD: Precision Plus Protein™ Unstained Standards #161-0363. A imagem do gel foi revelada no ImageQuant LAS 4000.....	67
Figura 23 – Western blotting das apolipoproteínas recombinantes purificadas. Utilizou-se o anticorpo anti-Histidina para detecção das apolipoproteínas. P.M. - padrão molecular Kaleidoscope Bio-Rad 10-250 kDa; 1 - apolipoproteína recombinante RPRC010099; 2 - apolipoproteína recombinante RPRC015421.....	68
Figura 24. Soroconversão dos camundongos imunizados com as apolipoproteínas recombinantes RPRC010099 e RPRC015421. Ensaio de ELISA para detecção dos anticorpos policlonais no soro de camundongos imunizados com a proteína recombinante. T0 – antes da imunização; T1 – após primeira dose; T2 – após segunda dose; T3 – após terceira dose.....	69
Figura 25 – Transferência da apolipoproteína RPRC010099 via cópula. Ensaio de ELISA para detecção das proteínas RPRC010099 e RPRC015421 endógenas nos órgãos reprodutivos de <i>R. prolixus</i> . Testículos, Glândulas acessórias (Glând. Acessória), Ovário, Ovário fertilizado (Ov. Fertilizado), Espermateca e Espermateca fertilizada (Esper. Fertilizada). ** $p < 0.005$; **** $p < 0.00005$	71
Figura 26 – Transferência da apolipoproteína RPRC015421 via cópula. Ensaio de ELISA para detecção das proteínas RPRC010099 e RPRC015421 endógenas nos órgãos reprodutivos de <i>R. prolixus</i> . Testículos, Glândulas acessórias (Glând. Acessória), Ovário, Ovário fertilizado (Ov. Fertilizado), Espermateca e Espermateca fertilizada (Esper. Fertilizada). ** $p < 0.005$; **** $p < 0.00005$	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA – ácido araquidônico

ADP – adenosina difosfato

ApoD – apolipoproteína D

ApoB – apolipoproteína B

BABPs – proteínas ligadoras de aminas biogênicas

cDNA – DNA complementar

DGLA – ácido dihomo- γ -linolênico

DNA – ácido desoxirribonucleico

dsRNA – RNA dupla fita

EF – elongation factor

ELISA – ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EPA – ácido eicosapentaenoico

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

kDa – quilodalton

mRNA – RNA mensageiro

NP – nitroforina

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

PAIs – inibidoras da agregação plaquetária

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

PGE2 – prostaglandina E2

qPCR – PCR quantitativa

RNA – ácido ribonucleico

RNAi – RNA interferente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. <i>Rhodnius prolixus</i> e a doença de Chagas.....	16
1.2. A Família das Lipocalinas e a subfamília Apolipoproteína.....	20
1.2.1. As Lipocalinas.....	20
1.2.2. As lipocalinas já descritas em <i>Rhodnius prolixus</i>	23
1.2.3. As apolipoproteínas de <i>Rhodnius prolixus</i>	24
1.3. Fisiologia reprodutiva de <i>Rhodnius prolixus</i>	25
1.4. Os eicosanóides e seu papel na fisiologia dos insetos.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. <i>Rhodnius prolixus</i>	38
4.2. A escolha das apolipoproteínas.....	38
4.3. Iniciadores.....	38
4.4. Análises bioinformática.....	39
4.4.1. Análise genômica.....	39
4.4.2. Alinhamento de proteínas e análise de domínio.....	39
4.4.3. Predição da conformação tridimensional das apolipoproteínas.....	40
4.4.4. Predição de ligantes por <i>Docking</i> molecular.....	40
4.5. Quantificação da expressão gênica basal de RPRC010099 e RPRC015421 nos órgãos reprodutores de <i>R. prolixus</i>	41
4.6. Silenciamento pela técnica de RNA interferente.....	42
4.6.1. A técnica de RNA interferente.....	42
4.6.2. Síntese de dsRNA.....	42
4.6.3. Microinjeção.....	43
4.6.4. Formação dos casais e análise do fenótipo.....	44
4.6.5. Análise do silenciamento por PCR quantitativa.....	45
4.7. Expressão das proteínas recombinantes.....	46
4.7.1. Desenho dos plasmídeos.....	46
4.7.2. Expressão heteróloga das proteínas recombinantes.....	47
4.7.3. Purificação das proteínas recombinantes.....	50
4.8. Produção dos anticorpos policlonais.....	51
4.9. Avaliação da transferência de apolipoproteínas via cópula.....	51
4.10. Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS.....	54

5.1. Análises <i>in silico</i> dos genes RPRC010099 e RPRC015421.....	54
5.1.1. Análise genômica.....	54
5.1.2. Alinhamento das sequências de nucleotídeos.....	54
5.1.3. Alinhamento das sequências de aminoácidos.....	56
5.1.4. Predição da conformação tridimensional das apolipoproteínas.....	56
5.1.5. Predição dos ligantes.....	58
5.2. Expressão gênica basal das apolipoproteínas nos órgãos reprodutivos de <i>R. prolixus</i>	60
5.3. Silenciamento gênico por RNAi e os efeitos sobre a reprodução.....	62
5.4. Proteínas recombinantes e anticorpos policlonais.....	65
5.5. Transferência via cópula.....	70
6. DISCUSSÃO.....	73
6.1. Análises de bioinformática das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421.....	76
6.2. A expressão de RPRC010099 e RPRC015421 em machos e fêmeas de <i>R. prolixus</i>	78
6.3. Os efeitos do silenciamento gênico de RPRC010099 e RPRC015421 na fertilidade de <i>R. prolixus</i>	82
6.4. A transferência das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 via cópula.....	85
6.5. As moléculas alvo das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421.....	88
6.6. Uma nova nomenclatura para RPRC010099 e RPRC015421.....	90
7. CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS.....	94
ANEXO A – Certificado CEUA nº 149/2025.....	108
ANEXO B – Artigo submetido para publicação no Journal of Insect Physiology	110
ANEXO C – Artigo publicado na Insect Biochemistry and Molecular Biology.....	135

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Rhodnius prolixus* e a doença de Chagas

Rhodnius prolixus é um inseto da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Foi descrito por Carl Stål em 1859 e, assim como outros triatomíneos, é popularmente conhecido como “barbeiro”. Este inseto possui um ciclo de vida do tipo paurometábolo, dividido nos estágios de ovo, ninfa (com cinco estádios ninfais) e adultos (Figura 1). Em todas as fases pós-embrionárias, machos e fêmeas são hematófagos, alimentando-se do sangue de hospedeiros vertebrados homeotérmicos (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Figura 1 – Ciclo de desenvolvimento do *Rhodnius prolixus*. Estágios de ovo, ninfa (com cinco estádios ninfais) e adulto (fêmea e macho, respectivamente).



Fonte: Paim (2014)

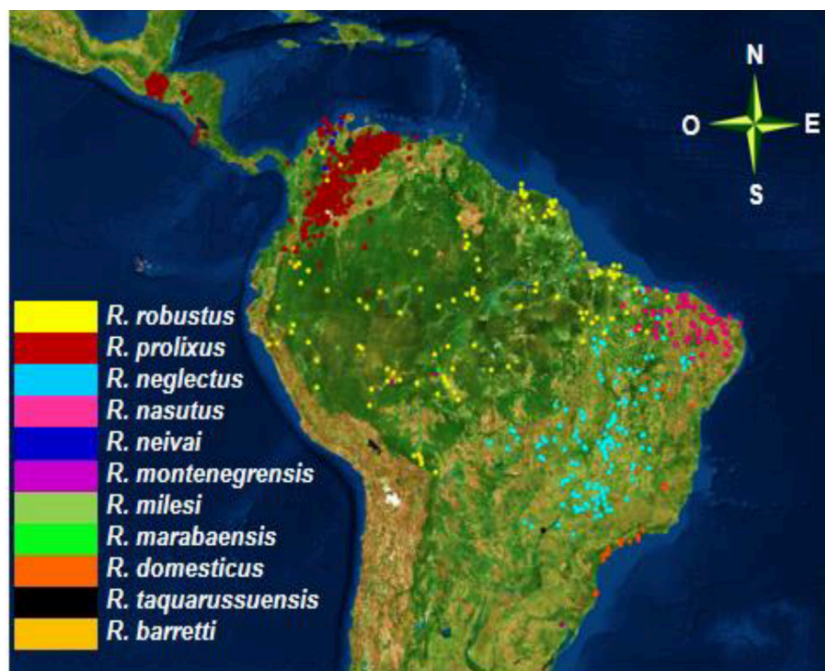
O inseto possui coloração marrom-avermelhada e, na fase adulta, apresenta de 20 a 30 mm de comprimento. O corpo é levemente achatado dorso-ventralmente, com tórax dividido em pronoto – que apresenta um formato trapezoidal mais largo que a cabeça –, mesonoto e metanoto. O abdômen é segmentado, de coloração mais clara, e os últimos segmentos abdominais apresentam dimorfismo sexual. Os três pares de pernas são finos e alongados, divididos em quatro tarsos. As asas anteriores possuem uma base coreácea com a parte distal membranosa. Já as asas posteriores são membranosas e transparentes em sua totalidade. A cabeça de *R. prolixus* é estreita e alongada com olhos compostos grandes, lateralmente posicionados. As antenas são inseridas no ápice da cabeça e o aparelho bucal é do tipo picador-sugador (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Na natureza, *R. prolixus* leva cerca de 6 meses a um ano para completar seu ciclo de vida,

mas em laboratório, com ambiente devidamente controlado, o ciclo é mais curto – de 4 a 6 meses. A oviposição ocorre entre 20 e 30 dias após a cópula dos insetos adultos. Os ovos são geralmente colocados aderidos ao substrato. São ovos operculados, de coloração esbranquiçada logo após a postura, mas que se tornam rosados à medida que o embrião se desenvolve. A incubação tem a duração média de 20 dias. As ninfas que eclodem dos ovos se diferem dos adultos, dentre outras características, pelo menor tamanho, ausência de ocelos, ausência de asas e pela imaturidade sexual. Cada estágio ninfal necessita de ao menos um repasto sanguíneo para mudar à fase seguinte, até atingir a fase adulta (DIOTAIUTI & BARBOSA, 2015; RIDDFORD, 2007; ROCHA & SANTOS, 2014).

O inseto pode ser encontrado em diversos países da América Latina, especialmente na Colômbia e na Venezuela (Figura 2). Os insetos vivem nas copas das palmeiras, próximos a ninhos e tocas de animais utilizados como fonte alimentar (GUHL, 2007). Devido ao alto grau de invasão e destruição do ambiente silvestre por ações antrópicas, esses insetos passaram a colonizar também regiões rurais e urbanas, sendo encontrados no domicílio e no peridomicílio, onde, eventualmente, podem utilizar os seres humanos como fonte alimentar (GALVÃO, 2003).

Figura 2 – Distribuição geográfica das espécies do gênero *Rhodnius*. A espécie *Rhodnius prolixus* é representada em vermelho, com distribuição concentrada na Venezuela e Colômbia e alguns registros na América Central.



Fonte: Hernández *et al.* (2020).

A espécie *R. prolixus* é uma das principais vetoras do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Esta enfermidade, considerada negligenciada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), é endêmica no continente americano, especialmente na América Latina, e de grande relevância epidemiológica, uma vez que apresenta uma incidência média de 30 mil casos e cerca de 10 mil óbitos ao ano (OPAS, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, e pelo menos 75 milhões estão sob risco de infecção. Apesar disso, as taxas de detecção da doença são baixas, o que evidencia uma dificuldade de diagnóstico e de acesso à saúde das populações mais vulneráveis (WHO, 2024).

A transmissão vetorial do *T. cruzi* ocorre de forma contaminativa. As formas infectantes do protozoário – as tripomastigotas metacíclicas – são eliminadas nas fezes e urina do triatomíneo infectado durante ou logo após o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado. Quando fezes e/ou urina contaminados entram em contato com a mucosa ou a pele descontinuada do hospedeiro, o protozoário ali presente é capaz de penetrar no organismo hospedeiro e iniciar o processo de infecção (WHO, 2002). Pode ocorrer ainda a transmissão por via congênita, por transfusão sanguínea ou por transplante de órgãos infectados. Estas formas de infecção são mais frequentes em países não endêmicos, onde não há uma vigilância adequada para a doença de Chagas em gestantes e nos bancos de doação de órgãos e tecidos (GARCIA *et al.*, 2007; WHO, 2002). A transmissão também pode ocorrer por via oral, quando o hospedeiro vertebrado ingere alimentos contaminados por triatomíneos ou seus dejetos infectados por *T. cruzi*. Esta é, provavelmente, a forma de infecção ancestral na natureza, já que é a mais comum entre hospedeiros e vetores silvestres. Nos últimos anos, a transmissão por via oral se tornou relevante também nos casos humanos, tendo sido reportados diversos surtos em países endêmicos como o Brasil, Venezuela, Colômbia e Bolívia (LÓPEZ-GARCÍA & GILABERT, 2023). Entre as fontes de infecção por via oral mais comuns, pode-se destacar o açaí e a cana de açúcar no Brasil, a graviola e a tangerina na Colômbia, a goiaba na Venezuela e o majo (um fruto amazônico) na Bolívia (LÓPEZ-GARCÍA & GILABERT, 2023). Os casos humanos reportados nas últimas décadas acendem um alerta sobre a transmissão oral da doença de Chagas, mas, sobretudo, evidenciam que a presença do inseto infectado no ambiente – condição necessária para a ocorrência de casos de transmissão oral – demanda atenção quanto ao controle vetorial.

A doença de Chagas se apresenta em duas fases clínicas: a fase aguda, com duração de 6 a 8 semanas, e a fase crônica, que dura o resto da vida do indivíduo infectado. Logo no início da

infecção, o indivíduo pode apresentar uma reação cutânea, chamada de chagoma, no local da picada do inseto vetor. Quando a picada ocorre na região próxima aos olhos, pode ocorrer ainda edema unilateral das pálpebras e linfadenite dos gânglios pré-auriculares, sinal conhecido como sinal de Romaña. Após estas reações iniciais, o indivíduo infectado pode desenvolver sinais e sintomas inespecíficos, como febre, fraqueza, hepatomegalia e esplenomegalia, seguidas por vômitos, diarreia e anorexia (WHO, 2002; MARIN-NETO, *et al.*, 2023). Com a queda da parasitemia, os sinais e sintomas da fase aguda desaparecem, dando início à fase crônica. Cerca de 50–70% dos indivíduos infectados não apresentam sintomas durante a fase crônica da doença e permanecem assim por toda a vida. Essa condição é denominada de forma indeterminada da doença de Chagas e, em regiões endêmicas, onde a transmissão vetorial ainda ocorre, os indivíduos nesta fase funcionam como reservatórios naturais da infecção por *T. cruzi*, o que contribui para a manutenção do ciclo de vida do parasito (WHO, 2002; MARIN-NETO *et al.*, 2023). Há, no entanto, cerca de 10 a 40% dos indivíduos infectados que, após vários anos com a forma indeterminada da fase crônica da doença de Chagas, desenvolvem lesões em vários órgãos, como coração e sistema digestivo. Essas condições são chamadas, respectivamente, de forma cardíaca e forma digestiva da doença de Chagas crônica. Tal comprometimento cardíaco e digestivo impacta negativamente na qualidade de vida dos portadores da doença de Chagas crônica e imputa custos significativos aos sistemas nacionais de saúde (WHO, 2002; MARIN-NETO *et al.*, 2023).

Devido aos programas de controle vetorial realizados desde a década de 1990, a população de triatomíneos, incluindo a espécie *Rhodnius prolixus*, reduziu de forma significativa no ambiente intradomiciliar (rural e urbano) de países endêmicos. Graças a iniciativas de prevenção e controle da doença de Chagas, que estabeleceu um esquema de cooperação técnica horizontal entre os países endêmicos da América Latina, houve uma redução no número de casos agudos, bem como da morbidade e da mortalidade pela doença de Chagas (OPAS, 2021). Dentre as medidas adotadas, destacam-se uma maior cobertura para diagnóstico e tratamento dos doentes, incluindo casos congênitos, a implementação de triagem universal dos bancos de sangue nos países endêmicos e, principalmente, a eliminação de espécies alóctones de vetores e a redução da transmissão vetorial em 17 dos 21 países endêmicos. Entre 2009 e 2010, por exemplo, *Rhodnius prolixus* foi eliminado como principal vetor no México, Costa Rica e El Salvador. Em 2012, *Triatoma infestans* foi eliminado do Brasil e em 2014, do Uruguai (OPAS, 2021). No entanto, ainda existem focos de transmissão da doença de Chagas com a participação do triatomíneo, seja pela via vetorial ou pela transmissão oral, em diversas regiões da América

Latina. Na ausência de vacina, o controle integrado de vetores é o método de profilaxia mais eficaz contra a doença de Chagas (WHO, 2002; OPAS, 2021).

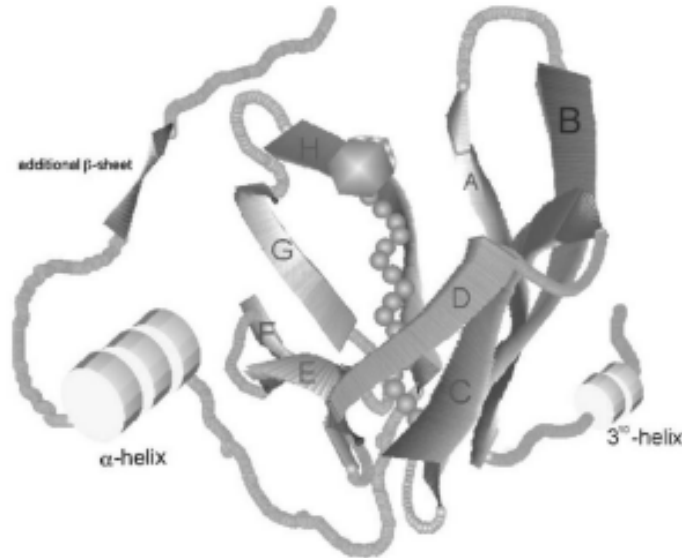
Além da importância como espécie vetora, *Rhodnius prolixus* é um modelo para estudos de fisiologia de insetos hematófagos desde a primeira metade do século XX (WIGGLESWORTH, 1976). Os conhecimentos adquiridos a partir desse organismo modelo têm possibilitado a compreensão de diversos sistemas fisiológicos de insetos hematófagos, muitos deles vetores de patógenos de importância em saúde pública (BEAMENT *et al.*, 1980). Por isso, compreender a fisiologia do *Rhodnius prolixus* e de outras espécies vetoras é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de doenças transmissíveis.

1.2. A Família das Lipocalinas e a subfamília Apolipoproteína

1.2.1. As Lipocalinas

As lipocalinas são proteínas amplamente encontradas em bactérias, plantas e animais. Elas se caracterizam pela presença de uma estrutura terciária de β -barril que forma uma espécie de cálice internamente revestido por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Tal conformação confere às lipocalinas a principal característica bioquímica da família: a capacidade de interagir e carrear pequenas moléculas de caráter hidrofóbico (GRZYB *et al.*, 2006; LAKSHMI *et al.*, 2015).

Figura 3 – Modelo da estrutura tridimensional de uma lipocalina. As letras A - H indicam as fitas beta formando o β -barril. Figura baseada na estrutura cristalina da b-lactoglobulina bovina, por Kontopidis e colaboradores (2002).



Fonte: Grzyb *et al.* (2006).

Já foram descritas, em diversos organismos, lipocalinas associadas a importantes processos biológicos, como resposta imunológica, transporte de retinol, transporte de feromônios, maturação de células e tecidos, síntese biológica de prostaglandinas e interação espermatozoide-óvulo (GRZYB *et al.*, 2006; LEONE *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2014; SCHIEFNER *et al.*, 2015; URADE & EGUCHI, 2002). Os triatomíneos, especificamente, desenvolveram ao longo do processo evolutivo, lipocalinas salivares com funções anti-hemostáticas, como vasodilatação, anti-agregação plaquetária e anti-coagulação sanguínea. Dentre as lipocalinas salivares mais estudadas em triatomíneos estão as nitroforinas, as PAIs (inibidoras da agregação plaquetária), as palidipinas e as BABPs (proteínas ligadoras de aminas biogênicas) (RIBEIRO *et al.*, 1998; NOESKE-JUNGBLUT *et al.*, 1994; NOESKE JUNGBLUT *et al.*, 1995). Há ainda as apolipoproteínas, um grupo de lipocalinas recém-descoberto em *R. prolixus* cuja função é, até então, desconhecida (SANTOS *et al.*, 2022).

As nitroforinas foram descritas pela primeira vez em 1993. São lipocalinas de 20 kDa caracterizadas pela presença de um grupamento heme férrico (FeIII) em sua estrutura de β -barril (RIBEIRO *et al.*, 1993). Estas lipocalinas são as mais estudadas em insetos e uma das proteínas mais abordadas em estudos de fisiologia alimentar em *R. prolixus*. Já foram descritas, nesta espécie, sete nitroforinas, nomeadas de NP1 a NP7 (CHAMPAGNE *et al.*, 1995; ANDERSEN *et*

al., 2005; SANTOS *et al.*, 2022).

De modo geral, as nitroforinas apresentam três atividades distintas, sendo a mais bem estudada a capacidade de armazenar e transportar o óxido nítrico (NO). Esse composto, ao ser liberado no tecido-alvo do hospedeiro durante o repasto sanguíneo, se liga à guanilato ciclase solúvel (sGC), desencadeando uma série de sinais que promove o relaxamento da musculatura lisa e, com isso, a vasodilatação (MONCADA *et al.*, 1988). Estas lipocalinas também são capazes de inibir a inflamação e a resposta imune, uma vez que se ligam e neutralizam a histamina, substância liberada por mastócitos com o objetivo de sinalizar uma resposta inflamatória e imunológica (MONTFORT *et al.*, 2000). Além disso, uma das nitroforinas já descritas – a NP2 – mostrou atividade anticoagulante ao impede a conversão do fator X em Xa e, com isso, bloquear a continuidade da cascata da coagulação sanguínea (HELLMAN & HALKINS, 1965; RIBEIRO *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1998).

A nitroforina NP7, descrita por Andersen e colaboradores (2004) a partir de uma biblioteca de cDNA de glândulas salivares de ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*, apresentou função vasodilatadora, anti-histamínica, anticoagulante e inibidora de agregação plaquetária. Essa nitroforina, além de se ligar ao óxido nítrico (NO) e à histamina, tem afinidade por membranas fosfolipídicas aniônicas, como as superfícies carregadas negativamente das plaquetas ativadas. Devido a esta afinidade, a NP7 bloqueia os locais de ligação dos fosfolipídios para o complexo da protrombinase nas superfícies das plaquetas ativadas, inibindo, assim, a ativação da protrombina. Carreando o NO, ela inibe o colágeno e a agregação plaquetária induzida por ADP (ANDERSEN *et al.*, 2004).

Outro importante grupo de lipocalinas são as PAIs – lipocalinas inibidoras da agregação plaquetária. São proteínas de 19 kDa que foram isoladas da glândula salivar de *Rhodnius prolixus* e descritas como as primeiras lipocalinas a atuarem sobre o ADP (adenosina difosfato). Ao se ligar ao ADP, a PAI impede a ativação de vias de sinalização específicas que levam à expressão funcional do receptor de fibrinogênio nas plaquetas, prejudicando, assim, a agregação plaquetária (FRANCISCHETTI *et al.*, 2000). As palidipinas, por sua vez, são lipocalinas de 19 kDa descritas inicialmente em *Triatoma pallidipennis* e, mais tarde, identificadas também em *R. prolixus*. Ao se ligar ao colágeno, essa lipocalina impede que ele se ligue às integrinas alfa e beta das plaquetas, inibindo, assim, a agregação plaquetária por esta via (NOESKE-JUNGBLUT *et al.*, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2004).

As chamadas BABPs – proteínas ligadoras de amins biogênicas – formam um outro

grupo de lipocalinas já identificadas em *R. prolixus*. Essas proteínas se ligam a serotonina, a epinefrina e a norepinefrina, impedindo que essas substâncias se liguem ao receptor 5-HT, o que resulta na inibição da contração da musculatura lisa (ANDERSEN *et al.*, 2005). A serotonina e a epinefrina, quando secretadas pelas plaquetas, contribuem significativamente para a ativação e agregação das mesmas. Por isso, quando as BAPs se ligam a esses neurotransmissores, exercem um papel anti-agregador plaquetário. Outra interação importante pode ser observada quando ocorre uma lesão no vaso sanguíneo do hospedeiro vertebrado. Nessa ocasião, norepinefrina é liberada pelos nervos simpáticos na parede deste vaso e interage com receptores adrenérgicos, resultando na vasoconstrição. Esse importante mecanismo de defesa contra perda de sangue é, no entanto, bloqueado quando as BABPs inibem a norepinefrina circulante (ANDERSEN *et al.*, 2005).

É possível observar que, de modo geral, as lipocalinas de triatomíneos foram estudadas e ficaram conhecidas como proteínas salivares. O papel das lipocalinas no combate à homeostasia do hospedeiro vertebrado é amplamente abordado na literatura. Pouco se sabe, no entanto, sobre a atuação dessas proteínas em outros mecanismos fisiológicos não relacionados à alimentação do inseto.

1.2.2. As lipocalinas já descritas em *Rhodnius prolixus*

Ao todo, 59 lipocalinas já foram descritas em *R. prolixus*, dentre elas nitroforinas, PAIs, palidipinas, BABPs e apolipoproteínas. Destas 59 lipocalinas, 29 foram descritas em meu trabalho de mestrado por meio de análises *in silico* (SANTOS *et al.*, 2022). A partir de uma análise baseada em similaridade, estas lipocalinas foram classificadas de acordo com sua função putativa. Três foram classificadas como proteínas de ligação a amina biogênica (BABPs), 9 como inibidores de agregação plaquetária (PAIs) e 7 como apolipoproteínas, além de 10 lipocalinas sem função putativa identificada. Dos grupos de lipocalinas citados, todos são conhecidos em triatomíneos por sua função anti-hemostática, com exceção das apolipoproteínas, grupo de lipocalinas nunca antes descrito em *R. prolixus*. O mais interessante desse trabalho, além de descrever lipocalinas novas, foi detectar a expressão delas em outros tecidos do inseto, e não apenas na glândula salivar, algo inédito até então. Tal descoberta levantou questionamentos sobre quais seriam as funções dessas lipocalinas para além da fisiologia alimentar (SANTOS *et al.*, 2022).

1.2.3. As apolipoproteínas de *Rhodnius prolixus*

As apolipoproteínas são lipocalinas que fazem parte da composição proteica de diversas lipoproteínas e apresentam funções biológicas muito variadas. Como exemplo de apolipoproteínas, tem-se a apolipoproteína B (ApoB), associada ao sistema imune inato de mamíferos, e a apolipoproteína D (ApoD), uma proteína plasmática presente na composição da lipoproteína de alta densidade (HDL), também encontrada em mamíferos. Já foram descritas apolipoproteínas homólogas à ApoB e ApoD em insetos, mas seu papel nesses organismos ainda é desconhecido (WEN *et al.* 2017).

Foi no trabalho de Santos e colaboradores (2022) – apresentado integralmente no Anexo C – que, pela primeira vez, apolipoproteínas foram evidenciadas em *R. prolixus*. Foi demonstrado que essas lipocalinas são expressas em diversos tecidos do inseto, incluindo glândula salivar, intestinos, reto, corpo gorduroso, túbulos de Malpighi, testículos e ovários, sendo significativamente mais abundante em testículos que em outros tecidos. A diversidade e abundância de apolipoproteínas nos testículos do inseto levantou questionamentos de uma possível participação dessas lipocalinas na fisiologia reprodutiva de *R. prolixus* (SANTOS *et al.*, 2022).

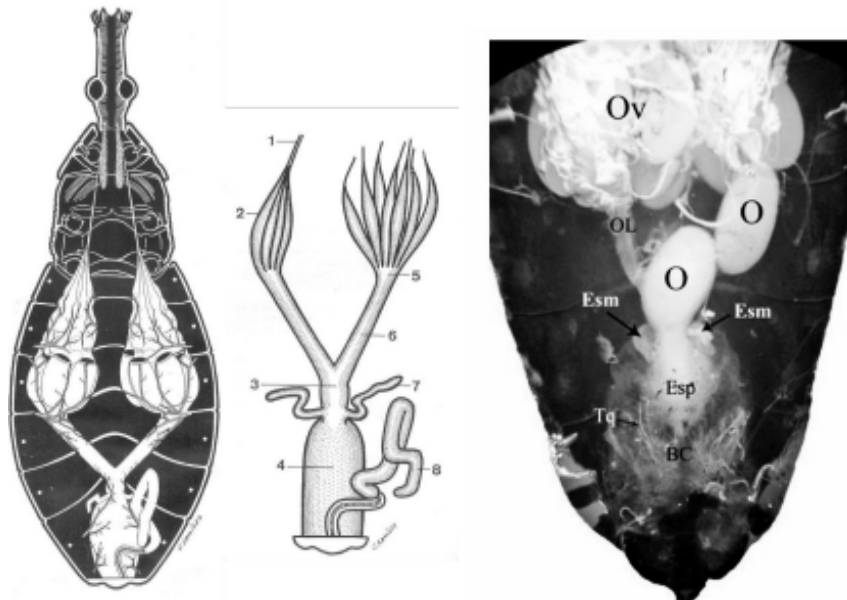
Estudos anteriores realizados em mamíferos mostraram a participação de lipocalinas na síntese de prostaglandinas (URADE & EGUCHI, 2002), moléculas derivadas de ácidos graxos pertencentes ao grupo dos eicosanóides, que exercem uma gama de atividades biológicas. Estudos realizados em fêmeas de grilos da espécie *Teleogryllus comodus* concluíram que a prostaglandina E2 (PGE2) é um estimulante da oviposição (LOHER, 1979). Mais tarde foi evidenciada que a atividade de biossíntese dessa prostaglandina é transferida dos insetos machos para as fêmeas via espermatóforo durante o acasalamento (LOHER *et al.*, 1981). Em 1989, Brener e Bernasconi identificaram e descreveram a biossíntese de prostaglandina em espermatóforos e testículos de *Triatoma infestans*, tendo sido relacionada também ao aumento da postura de ovos nessa espécie de triatomíneo (BRENER & BERNASCONI, 1989).

A partir dos estudos supracitados, levantamos a hipótese de que o mesmo mecanismo de transferência de prostaglandinas via cópula pode estar presente também em *Rhodnius prolixus* e que as apolipoproteínas expressas no testículo do inseto atuam no transporte desses eicosanóides. Por isso, a tese aqui apresentada irá se debruçar sobre o potencial papel das apolipoproteínas como moléculas transportadoras de eicosanóides via cópula, bem como sobre o efeito desse transporte para a fertilidade dos triatomíneos.

1.3. Fisiologia reprodutiva de *Rhodnius prolixus*

O aparelho reprodutor feminino de *Rhodnius prolixus* (Figura 4) é formado por um par de ovários, cada um contendo sete ovariolos onde os ovócitos se desenvolvem. Ao serem liberados, os ovócitos maduros são depositados em um cálice conectado aos ovidutos laterais. Estes, por sua vez, se conectam ao oviduto comum, cujas laterais se inserem às espermatecas (estruturas que armazenam os espermatozóides transferidos pelo macho durante o acasalamento). A extremidade posterior do oviduto comum se estende até a vagina. Posicionada no lado dorsal da abertura vaginal há uma glândula de cimento, cuja secreção reveste os ovos eliminados na oviposição. Este cimento é responsável pela aderência dos ovos ao substrato (CHIANG & CHIANG, 2016).

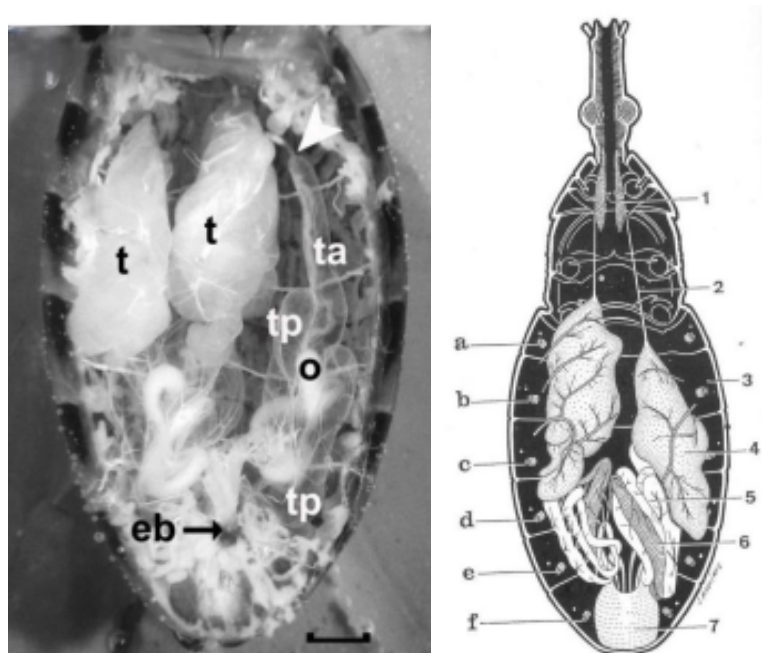
Figura 4 – Fotografia do sistema reprodutor feminino de *R. prolixus*. À esquerda: foto do sistema reprodutor feminino de um triatomíneo na cavidade abdominal. BC: Bolsa Copulatória; Esm: Espermateca; Esp: Espermatóforo (recebido do macho durante o acasalamento); O: Ovo maduro; OL: Oviduto Lateral; Ov: Ovariolo; Tq: Traqueíolas. Imagem de Ariane Pereira-Lourenço retirada de Machado (2022). À direita: esquema dos órgãos reprodutivos internos da fêmea de *R. prolixus* com os ovários repletos de ovos. 1 – Filamento terminal; 2 – ovariolos; 3 – oviduto comum; 4 – vagina; 5 – cálice; 6 – oviduto lateral; 7 – espermateca; 8 – glândula acessória.



Fonte: Adaptado de Pérez (1969).

O aparelho reprodutor masculino (Figura 5), por sua vez, é composto por um par de testículos (cada um formado por 7 tubos testiculares; dois longos e cinco curtos), canal deferente e 4 glândulas acessórias (3 transparentes e 1 opaca). O pigóforo, ou edeago, é o aparelho usado para inseminar a fêmea. Está localizado no nono segmento abdominal e se externaliza no momento da cópula. Os testículos começam a se desenvolver no 4º estágio ninfal, apresentando um pico de desenvolvimento no 5º estágio. Nos adultos recém emergidos, os testículos são bem desenvolvidos, ocupando os 3º e 4º segmentos abdominais, e vão aumentando de tamanho ao longo do amadurecimento do adulto, chegando a ocupar boa parte da cavidade abdominal (CHIANG *et al.*, 2013).

Figura 5 – Fotografia do sistema reprodutor masculino de *R. prolixus*. À esquerda: t - testículo; ta - glândula acessória transparente anterior; ponta de seta branca - local onde o ducto deferente do testículo se fixa à ponta anterior da glândula transparente anterior; tp - as duas glândulas acessórias posteriores; o - glândula opaca; eb - bulbo ejaculatório. Barra de escala = 1 mm. (Adaptado de Chiang *et al.*, 2013). À direita: 1 – corpo adiposo torácico; 2 – filamento terminal; 3 – estigma respiratório; 4 – saco contendo os tubos testiculares; 5 – glândulas acessórias; 6 – vesícula seminal; 7 – membrana que recobre o órgão copulador; a-f – músculos tergo-esternais.



Fonte: Adaptado de Pérez (1969).

Durante a cópula, o casal de *R. prolixus* se posiciona lado a lado (Figura 6). O macho segura a fêmea com seus três pares de pernas e gira seus segmentos genitais em direção à genitália feminina. O edeago é então externalizado e inserido na fêmea através de suas valvíferas. Nesta posição o macho permanece firmemente conectado à fêmea, enquanto esta pode se movimentar. A inseminação é completada em cerca de 40 a 50 minutos (CHIANG & CHIANG, 2016).

Figura 6 – Cópula de *R. prolixus*. O macho (à esquerda) segura a fêmea com seus pares de pernas e rotaciona seus segmentos genitais para possibilitar a penetração do edeago na genitália feminina. Barra de escala: 5mm.



Fonte: Chiang & Chiang (2016).

A alimentação tem um papel central na fertilidade da fêmea de *R. prolixus*, uma vez que o sangue ingerido possui o aporte nutricional necessário para a produção e a postura dos ovos. O repasto sanguíneo realizado logo após o acasalamento é o fator que desencadeia a produção de ovos. Durante a hematofagia, a fêmea ingere sangue até estar saciada e pode aumentar seu peso corporal em 3 ou 4 vezes. Cerca de 3 ou 4 dias após o repasto inicia-se a produção dos ovos, que permanece em uma taxa constante por cerca de 3 semanas (DAVEY *et al.*, 1986). Em média, fêmeas que realizaram um repasto sanguíneo completo produzem de 30 a 50 ovos (DAVEY *et al.*, 1986). Fêmeas não alimentadas também produzem ovos, mas em quantidade muito menor,

possivelmente utilizando os recursos nutricionais que permaneceram após a sua muda para adultos. Em estudos anteriores, foi observado que fêmeas acasaladas não alimentadas produziam uma média de 7,19 ovos, valor que não apresentou diferença significativa em relação à quantidade de ovos produzidos por fêmeas não acasaladas e não alimentadas, que produzem uma média de 4,67 ovos não fecundados (DAVEY *et al.*, 1989). Isso mostra que sem uma alimentação adequada as fêmeas têm a fertilidade reduzida.

Há o entendimento de que, em diversos grupos de insetos, fatores da biologia reprodutiva de indivíduos machos também influenciam na fertilidade da fêmea e, portanto, da espécie como um todo. É o caso das substâncias que compõem o fluido seminal, que é produzido no sistema reprodutor de insetos machos e, juntamente aos espermatozoides, introduzido na fêmea durante a cópula (POIANI, 2006). O fluido seminal é composto por uma mistura de proteínas e outras moléculas não proteicas. Estudos anteriores já mostraram a influência de componentes do fluido seminal na fertilidade de diversos grupos de insetos. Já foram observados, por exemplo, o aumento da ovulação e da taxa de postura de ovos, a alteração do comportamento alimentar da fêmea e a modulação dos parâmetros de armazenamento de esperma (ÁVILA *et al.*, 2011). Dentre as classes de proteínas do fluido seminal de insetos, já foram identificadas, em trabalhos anteriores, proteases e inibidores de protease, lectinas, pró-hormônios, peptídeos e proteínas protetoras (como antioxidantes) (POIANI, 2006), além de moléculas não proteicas, como as prostaglandinas (LOHER *et al.*, 1981). Além disso, de acordo com esses estudos, a ausência dessas substâncias no fluido seminal afeta negativamente o sucesso reprodutivo do inseto. Wolfner (2002) revisou trabalhos publicados sobre as proteínas seminais produzidas nas glândulas acessórias de machos de *Drosophila melanogaster*. Nesta revisão o autor mostra que as proteínas (incluindo enzimas de modificação, como proteases e lipases) fornecidas pelos machos são capazes de incitar respostas reprodutivas importantes nas fêmeas. A ovulina (Acp26Aa), por exemplo, estimula a ovulação em fêmeas de *Drosophila* acasaladas. Já a glicoproteína Acp36DE, contribui para um armazenamento mais eficiente de esperma na espermateca de fêmeas acasaladas (WOLFNER, 2002). Em um outro estudo, utilizando *Tenebrio molitor* como modelo experimental, foi observado que as proteínas B das glândulas acessórias deste inseto possuem sequências de aminoácidos semelhantes a proteínas de ligação de feromônios e odorantes em *Drosophila*. Isso sugere que as proteínas B de *T. molitor* podem ter propriedades de ligação e de transporte de lipídios, em especial feromônios (PAESEN & HAPP, 1995).

Em diversos insetos, a transferência do fluido seminal do macho para a fêmea durante o acasalamento modifica o comportamento da fêmea. Em várias ordens de insetos já foram

identificadas moléculas chamadas de substâncias que aumentam a fecundidade (FES) e substâncias inibidoras da receptividade (RIS). Os trabalhos mostraram que as FES promoviam a produção de ovos. Este estímulo, recebido após o acasalamento, faz com que as fêmeas realizem a oviposição após a inseminação, de modo que haja espermatozoides disponíveis à medida que ovos passam pelo trato genital feminino. Já as RIS, substâncias inibidoras da receptividade, tornam as fêmeas já inseminadas refratárias a novos acasalamentos. Dessa forma, o macho “garante” a utilização dos seus espermatozoides e, de forma indireta, estimula os outros machos a procurarem fêmeas virgens (GILLOT, 1996). Em 1958, Davey mostrou que a secreção das glândulas acessórias de machos de *Rhodnius prolixus* dispara um sinal neural que estimula o peristaltismo do trato genital feminino. Esses movimentos peristálticos facilitam o deslocamento do esperma até as espermatecas da fêmea (DAVEY, 1958). Além deste estudo, nenhuma investigação robusta sobre os compostos do fluido seminal foi realizada em *Rhodnius prolixus*. Tal fato evidencia a necessidade de maiores estudos sobre fisiologia reprodutiva e fertilidade masculina de triatomíneos, bem como sobre a influência que esses fatores exercem sobre a fertilidade das fêmeas.

Dentre as diversas substâncias encontradas em insetos e importantes para os processos reprodutivos, tem-se a ecdisona e o hormônio juvenil. A ecdisona é um hormônio esteroide derivado do colesterol, pertencente à classe dos ecdisteroides, produzido principalmente pelas glândulas protorácicas em insetos imaturos e pelos ovários em adultos. No organismo, a ecdisona é rapidamente convertida em sua forma biologicamente ativa, a 20-hidroxiccdisona (20E), responsável por regular processos de crescimento, metamorfose e reprodução (RIDDIFORD, 2012). Na fase adulta, a ecdisona desempenha papel central na fisiologia reprodutiva, estimulando a vitelogênese e a maturação ovariana. Em mosquitos hematófagos, como *Aedes aegypti*, o repasto sanguíneo ativa a liberação de 20E, que induz a expressão de genes da vitelogenina no corpo gorduroso, permitindo a deposição de vitelina nos ovócitos (HANSEN *et al.*, 2014). Em *Anopheles gambiae*, além do já conhecido papel de 20E na vitelogênese, foi observado que o hormônio é produzido nas glândulas acessórias do inseto macho e transferido para as fêmeas durante o acasalamento. Esse trabalho mostrou que, além de contar com o 20E produzido endogenamente, as fêmeas recebem um aporte adicional deste hormônio dos machos. (PONDEVILLE *et al.*, 2008).

Em triatomíneos, como *Rhodnius prolixus*, a ecdisona também está envolvida na regulação da reprodução. Estudos demonstraram que os ovários produzem e secretam ecdisteroides durante o ciclo gonadal, sugerindo um papel autócrino e parácrino no

desenvolvimento folicular e na vitelogênese (BENRABAA, ORCHARD, LANGE, 2022). Além disso, a interação entre ecdisona e hormônio juvenil é fundamental para promover a ativação do corpo gorduroso e a síntese de vitelogenina após a alimentação sanguínea (RIDDIFORD, 2012). Um estudo realizado em 2013 evidenciou um importante papel do hormônio 20-hidroxiecdisona (20E) para a fertilidade de fêmeas de *Anopheles gambiae*. Este hormônio seria produzido pelo inseto macho e transferido para a fêmea durante a cópula. O estudo mostrou que o hormônio 20E interage com uma proteína estimuladora de oogênese induzida por acasalamento, chamada de MISO, presente no trato reprodutor feminino. Esta interação desencadeia uma sequência de eventos que resulta no aumento da expressão de um transportador de lipídios vitelogênicos. A maior quantidade desse transportador é responsável por incrementar a produção de ovos em fêmeas alimentadas (BALDINI *et al.*, 2013).

O hormônio juvenil (JH) é um importante regulador endócrino na fisiologia de insetos. Inicialmente esse hormônio foi identificado por Wigglesworth (1934) em estudos clássicos com *Rhodnius prolixus*, e mais tarde foi descrito em diversos grupos taxonômicos de insetos (RIDDIFORD, 2012). Em *R. prolixus*, por exemplo, a isoforma predominante do JH foi caracterizada como JH III skipped bisepoxide (JHSB₃) (VILLALOBOS-SAMBUCARO *et al.*, 2020). Durante os estágios imaturos, o JH atua em conjunto com a ecdisona para regular as mudas e a metamorfose. Quando presente em concentrações elevadas no momento da ecdise, o JH mantém o inseto no estado juvenil, determinando a transição para um novo estágio larval ou ninfal. Quando o JH está ausente ou em baixos níveis, a ecdisona induz a metamorfose para pupa ou adulto (RIDDIFORD, 2012).

Estudos experimentais em *R. prolixus* demonstraram que a ausência de JH resulta em desenvolvimento anormal do inseto, ocasionando uma metamorfose precoce. Por outro lado, a aplicação exógena do hormônio é capaz de restaurar o padrão normal de desenvolvimento (WIGGLESWORTH, 1948). Em mosquitos *Aedes aegypti*, manipulações semelhantes indicam que a supressão do JH acelera a transição para fases adultas, confirmando seu papel na manutenção do status juvenil (NORIEGA, 2004). No inseto adulto, o JH desempenha um importante papel na reprodução, controlando o início e a manutenção da vitelogênese. Em fêmeas, ele estimula a síntese de vitelogenina (precursora da vitelina) no corpo gorduroso e sua posterior incorporação nos ovócitos (WANG & DAVEY, 1993). Além disso, o JH induz alterações fisiológicas nas células foliculares ovarianas, como a ativação da Na⁺,K⁺-ATPase e da proteína quinase C (PKC), permitindo a entrada de proteínas da hemolinfa para os ovócitos

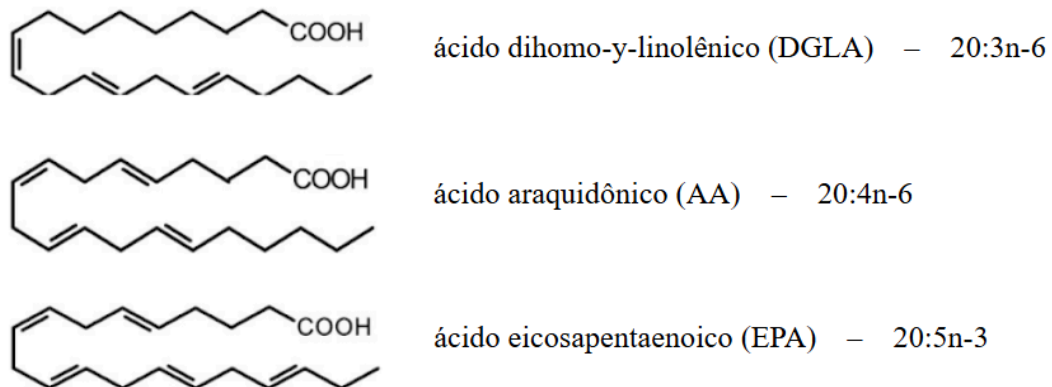
(SEVALA & DAVEY, 1989).

Nos insetos hematófagos, a hematofagia atua como gatilho para a reprodução, com participação do hormônio juvenil. Em *R. prolixus*, a ingestão de sangue desencadeia a produção e liberação de JHSB₃, o que promove a síntese de vitelogenina e a maturação ovariana (VILLALOBOS-SAMBUCARO et al., 2020). Experimentos de remoção das corpora allata (glândula responsável por produzir e secretar o JH) mostraram queda drástica na produção de vitelogenina, mas a aplicação exógena de JH restaurou a vitelogênese e a deposição de vitelina nos ovócitos, confirmando sua ação gonadotrópica (WANG & DAVEY, 1993).

1.4. Os eicosanóides e seu papel na fisiologia dos insetos

Os eicosanóides são moléculas derivadas de três ácidos graxos poliinsaturados com 20 carbonos, denominados ácido dihomo- γ -linolênico – DGLA (20:3n-6), ácido araquidônico – AA (20:4n-6) e ácido eicosapentaenoico – EPA (20:5n-3) (Figura 7). Existem 3 grupos principais de eicosanóides: as prostaglandinas, os ácidos epoxieicosatrienoicos e as lipoxigenases (como os leucotrienos). Essas moléculas exercem importante papel em diversos sistemas fisiológicos de animais vertebrados e invertebrados, especialmente na inflamação, imunidade, reprodução e sistema nervoso desses seres vivos (STANLEY, 2000).

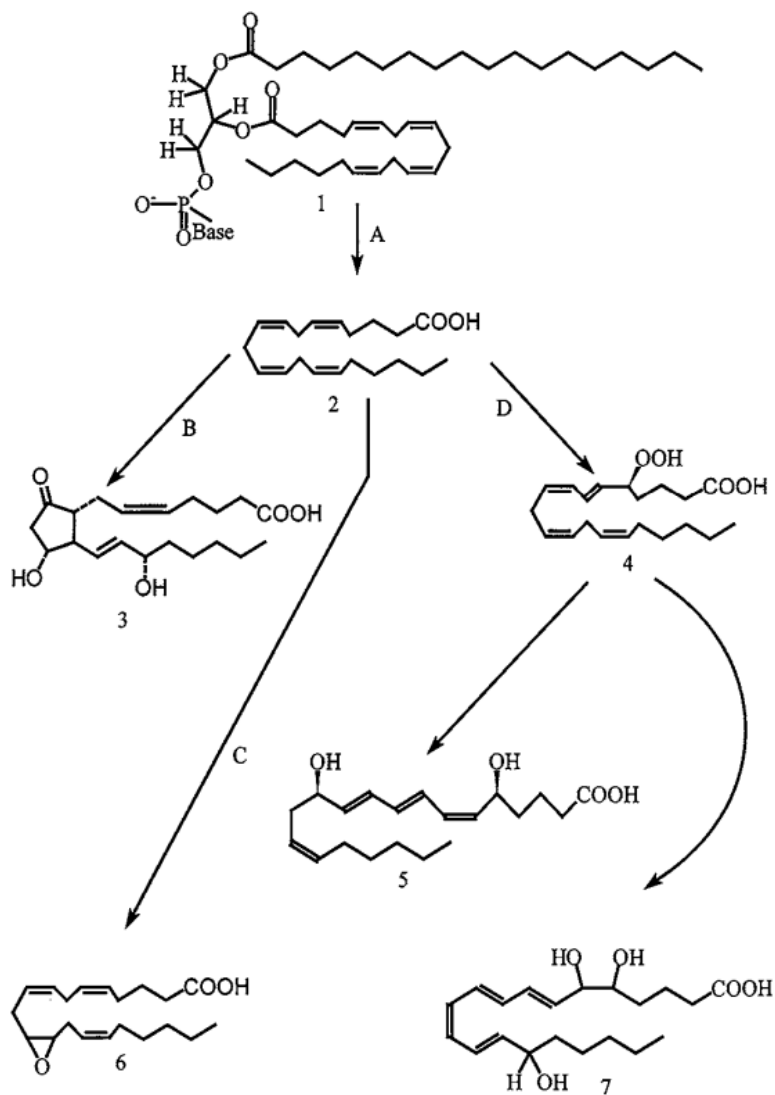
Figura 7 – Precursores de eicosanoides. Estrutura química do ácido dihomo- γ -linolênico (DGLA), ácido araquidônico (AA) e ácido eicosapentaenoico (EPA).



Fonte: Adaptado de Stanley & Kim (2014).

Dos três precursores de eicosanoides, o mais estudado é o ácido araquidônico (AA), principal responsável pela biossíntese de prostaglandinas. Um esquema ilustrativo do metabolismo desses compostos orgânicos em mamíferos é mostrado na Figura 8. Vale ressaltar que, apesar de insetos não possuírem ciclooxigenases típicas, enzimas alternativas – como peroxidases e lipoxigenases – são utilizadas para a metabolização do AA e de outros precursores de eicosanoides. O resultado bioquímico é semelhante: a geração de derivados bioativos como as prostaglandinas (STANLEY, 2006).

Figura 8 – Esquema geral do metabolismo do ácido araquidônico. Três ácidos graxos poli-insaturados (20:3n-6, 20:4n-6 e 20:5n-3) podem servir de substrato para a biossíntese de eicosanóides. Destes, o mais bem estudado é o ácido araquidônico (20:4n-6). Os números indicam as estruturas químicas: 1 = fosfolipídio; 2 = ácido araquidônico hidrolisado; 3 = prostaglandina E₂; 4 = ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico; 5 = leucotrieno B₄; 6 = ácido 11,12-epoxieicosatrienoico; 7 = lipoxina A. As letras maiúsculas indicam as principais enzimas responsáveis pelo biossintese dos eicosanóides: A = fosfolipase A₂; B = ciclooxigenase e etapa enzimática associada; C = citocromo P450 epoxigenase; D = lipoxigenase.



Fonte: Stanley (2006).

As prostaglandinas, que derivam do ácido araquidônico (AA, ou 20:4n-6), são os eicosanóides mais bem estudados em mamíferos. Nos humanos, por exemplo, elas possuem um importante papel na reprodução, além de atuarem em processos fisiológicos de lesão e dano e, por isso, serem alvos de fármacos analgésicos comuns, como a aspirina. Já nos insetos, as prostaglandinas se mostraram importantes para o sistema imune, para a fisiologia alimentar e para a reprodução (STANLEY, 2000).

Um dos primeiros estudos a evidenciar o papel das prostaglandinas na reprodução dos insetos foi o realizado por Loher e Edson, em 1973. Neste trabalho, utilizando o inseto *Teleogryllus commodus* como modelo, os autores levantaram a hipótese de que havia um fator químico de acasalamento que era passado de macho para fêmea durante a cópula. A transferência deste fator resultaria no aumento da postura de ovos pela fêmea (LOHER & EDSON, 1973). Em 1981, Loher e colaboradores demonstraram que o fator de acasalamento era uma enzima responsável por converter o ácido araquidônico (AA) em prostaglandina E2 (PGE2). A PGE2 era, então, liberada da espermateca para a hemolinfa da fêmea e, ao interagir com receptores do gânglio abdominal terminal, promovia o comportamento de postura de ovos (LOHER *et al.*, 1981). Mais tarde, em 1989, Brenner e Bernasconi evidenciaram o mesmo fenômeno em *Triatoma infestans*. Neste estudo, observou-se que a PGE2 também era transferida do inseto macho para a fêmea durante o acasalamento e tal transferência aumentava a produção de ovos pelas fêmeas (BRENNER & BERNASCONI, 1989). Um recente estudo realizado em *Aedes albopictus* relatou a participação da prostaglandina E2 na oogênese. Ao injetar aspirina (um inibidor de PGE2) em fêmeas alimentadas, verificou-se uma redução na transferência de citoplasma das células nutrízes para o ovócito em desenvolvimento, prejudicando a oogênese. Esse efeito foi revertido com a adição de PGE2. Neste mesmo trabalho, a técnica de RNA interferente (RNAi) foi utilizada para silenciar genes relacionados à biossíntese de prostaglandinas, o que resultou na supressão da oviposição em fêmeas *knockout* (CHOI *et al.*, 2022).

Os trabalhos citados chamaram a atenção para a participação dos eicosanóides derivados do ácido araquidônico (em especial as prostaglandinas) na fisiologia reprodutiva dos insetos. Os eicosanóides, no entanto, são moléculas instáveis. Sua natureza lipofílica, a presença de grupos reativos em sua composição química, a existência de enzimas de degradação no meio fisiológico, bem como a inexistência de armazenamento vesicular, fazem com que essas moléculas tenham uma meia-vida curta – de segundos ou poucos minutos. É sabido, portanto, que os eicosanóides

são produzidos sob demanda e, assim que secretados, possuem uma atividade local (MADDIPATI & ZHOU, 2011).

Sob essa perspectiva é de se esperar que, para que os eicosanoides tenham uma função mais sistêmica, ou seja, distante do local de síntese, é necessária a participação de moléculas capazes de estabilizá-los e transportá-los. Nossa hipótese é que as apolipoproteínas, proteínas especializadas no transporte de lipídios, são as candidatas ideais para essa função. Acreditamos que, nos tecidos reprodutivos de *R. prolixus*, duas apolipoproteínas específicas, RPRC010099 e RPRC015421, atuam como carreadoras de eicosanoides, como a prostaglandina PGE₂, mediando a crucial sinalização entre macho e fêmea que garante o sucesso da reprodução. Neste trabalho, exploramos essa hipótese, investigando a participação de RPRC010099 e RPRC015421 na reprodução de *R. prolixus* e, em particular, o seu potencial papel como carreadoras de eicosanoides nos tecidos reprodutivos do inseto.

2. JUSTIFICATIVA

Historicamente, o foco dos estudos sobre a reprodução de insetos de importância médica tem sido nas fêmeas, por serem as únicas que se alimentam de sangue e transmitem agentes patogênicos em muitos dos grupos de relevância, como os mosquitos e os flebotômíneos. Contudo, a lacuna de conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva dos machos representa uma oportunidade inexplorada. Ignorar os fatores masculinos é negligenciar um componente-chave da fertilidade de toda a espécie. Esta tese se debruça sobre essa fronteira do conhecimento.

A descoberta de apolipoproteínas expressas no testículo de *Rhodnius prolixus* abre uma promissora via de investigação sobre esse grupo de proteínas que fazem parte da família das lipocalinas. Nossos estudos, ancorados em evidências que mostram a participação de lipocalinas na fertilidade de outros organismos, sugerem que essas apolipoproteínas desempenham funções importantes para a fisiologia reprodutiva masculina.

Nossa pesquisa visa desvendar o papel dessas apolipoproteínas na reprodução de *R. prolixus*, explorando, em particular, seu potencial como transportadoras de eicosanoides. Ao elucidar esse mecanismo, nosso trabalho não apenas avança a ciência básica sobre a fisiologia de vetores, mas também pavimenta o caminho para o desenvolvimento de alvos moleculares inovadores para o controle da população de triatomíneos, com possíveis contribuições no desenvolvimento de futuras pesquisas para controle de vetores.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o papel das apolipoproteínas expressas em testículo de *Rhodnius prolixus* na fisiologia reprodutiva do inseto.

3.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar genômica, estrutural e funcionalmente de duas apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 por meio de ferramentas de bioinformática;
- b) Analisar a expressão gênica basal das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 nos órgãos reprodutivos de fêmeas e machos adultos de *R. prolixus*.
- c) Avaliar o fenótipo reprodutivo de insetos knockdown para os genes RPRC010099 e RPRC015421 utilizando a técnica de RNA interferente (RNAi).
- d) Determinar a transferência das apolipoproteínas ao longo do sistema reprodutor de *R. prolixus* antes e após o acasalamento;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Rhodnius prolixus*

Os insetos utilizados nos experimentos do presente trabalho pertenciam a uma colônia de *Rhodnius prolixus* advinda de Honduras e mantida no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, desde 1997. Os insetos são mantidos em condições controladas de temperatura (28 ± 2 °C) e umidade ($65 \pm 10\%$), com fotoperíodo de 12 horas de claro/escuro. A alimentação dos insetos é realizada quinzenalmente, utilizando hamsters previamente anestesiados.

4.2. A escolha das apolipoproteínas

Dentre as apolipoproteínas expressas em *Rhodnius prolixus*, foram selecionadas para o desenvolvimento do presente estudo duas delas: a RPRC010099 e a RPRC015421. Estas duas apolipoproteínas foram escolhidas por serem, segundo estudos anteriores do transcriptoma de *R. prolixus*, as apolipoproteínas mais expressas em testículo. Além disso, não foi detectada expressão gênica em outros tecidos testados, o que indica que estas apolipoproteínas são expressas exclusivamente em testículo.

4.3. Iniciadores

A partir das sequências gênicas já conhecidas das apolipoproteínas de interesse, foram desenhados os iniciadores utilizados nos ensaios de PCR convencional, PCR quantitativa (qPCR), síntese de RNA dupla fita (para os ensaios de RNAi) e na produção das proteínas recombinantes. Para o desenho dos iniciadores, utilizou-se a ferramenta Primer3Plus (www.primer3plus.com/index.html). Suas sequências são indicadas no quadro abaixo.

Quadro 1 – Lista dos iniciadores utilizados.

Iniciador	Sequência	Amplicon (pb)
Rp10099 qF/R	5' ACGCTCTCATCTACTCTTGCAC 3' 5' TCTTTCGATCTGCCAAGTACCC 3'	76 pb
Rp15421 qF/R	5' TAAGTGTGTCAGCGCATTGAGC 3' 5' CGCCAAGGTTTATAGTCACCAG 3'	82 pb
EF qF/R	5' GATTTCACTGAACCGCCTTA 3' 5' GCCGGGTTATATCCGATTTT 3'	92 pb
Rp10099 T7 F/R	5' TAATACGACTCACTATAGGGCCTCGTCATCGCTATCTGTTTC 3' 5' TAATACGACTCACTATAGGGCTGGCCAACACCATGTTTCAG 3'	315 pb
Rp15421 T7 F/R	5' TAATACGACTCACTATAGGGCAGGTATCTGTCCCACCACA 3' 5' TAATACGACTCACTATAGGGGGAGCACAAACATTATTGACC 3'	400 pb
KER T7 F/R	5' TAATACGACTCACTATAGGGGGTCTCCTCTCTGGAAAC 3' 5' TAATACGACTCACTATAGTTAGCAGCCGTGGAAGAGA 3'	275 pb

F = Forward; R = Reverse; pb = pares de base; Tm = temperatura de anelamento; Em negrito = sequência T7

4.4. Análises bioinformática

4.4.1. Análise genômica

Para avaliar a posição dos genes de interesse no genoma de *R. prolixus*, as sequências de RPRC010099 e RPRC015421 foram obtidas do transcriptoma depositado no banco de dados público VectorBase (<https://vectorbase.org/vectorbase/app/>), utilizando-se, respectivamente, os identificadores RPRC010099 e RPRC015421. As sequências foram alinhadas ao genoma de referência utilizando-se a ferramenta BLASTn (parâmetros Word 26, e-value 0.00001) tendo o transcrito como modelo (query) e o genoma (versão 3.1) como alvo. Os resultados da sequência query foram filtrados de acordo com a cobertura (>90%) e identidade de nucleotídeos (>98%). As posições onde as sequências se alinharam (scaffold, cromossomo, faixa de nucleotídeos) foram extraídas dos resultados do BLASTn.

4.4.2. Alinhamento de proteínas e análise de domínio

As sequências das proteínas RPRC010099 e RPRC015421 foram obtidas do banco de dados VectorBase utilizando-se os identificadores de cada gene (RPRC010099 e RPRC015421, respectivamente). Foi realizado um alinhamento de múltiplas sequências para identificar regiões conservadas e divergentes e possíveis sítios funcionais, além de avaliar a similaridade evolutiva

entre as proteínas de interesse. Para isso, foi utilizada a ferramenta MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (EDGAR, 2004). Para a identificação de domínios funcionais conservados foi realizado o alinhamento das proteínas pelo Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (SIEVERS et al., 2011) e posterior consulta ao Conserved Domains Database. Foram consideradas apenas as anotações com e-value inferior a 0.00001. Os domínios identificados foram utilizados para inferência funcional e comparação entre ortólogos/parálogos. Por fim, as sequências de nucleotídeos também foram alinhadas para verificar se os iniciadores desenhados para as qPCRs e para produção de dsRNA (Quadro 1) são específicos.

4.4.3. Predição da conformação tridimensional das apolipoproteínas

Para predição da estrutura tridimensional das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421, foi utilizado o programa AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>), conforme metodologia descrita por Jumper e colaborador (2021). Esta ferramenta é capaz de prever a estrutura 3D de uma proteína baseada em *deep learning*. Após a predição da estrutura tridimensional das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421, utilizou-se a técnica de *Docking* molecular para a identificação de possíveis ligantes (moléculas alvo).

4.4.4. Predição de ligantes por *Docking* molecular

O *Docking* molecular, ou ancoragem molecular, é uma técnica de análise de informática que permite prever a afinidade de ligação entre uma proteína de interesse e suas possíveis moléculas-alvo. Nesta técnica, a estrutura tridimensional das moléculas é acoplada com o objetivo de se verificar se existe afinidade de ligação (BATISTA, *et al.*, 2022).

No presente trabalho, as estruturas tridimensionais das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 foram ancoradas a algumas moléculas para avaliação da afinidade de ligação. Utilizou-se a ferramenta de docking molecular DockThor (<https://www.dockthor.lncc.br/v2/>), desenvolvida pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC-MCTI).

As análises foram realizadas seguindo as orientações dos desenvolvedores da ferramenta. Utilizou-se a molécula da glicose (ChEBI: 17234) como controle negativo e foram testadas as moléculas do ácido araquidônico (ChEBI: 15843), da prostaglandina E2 (ChEBI: 15554), da

ecdisona (ChEBI: 16688), do ácido linoleico (ChEBI: 17351) e do ácido eicosapentaenoico (ChEBI: 84883). Foi avaliada a afinidade de ligação entre as apolipoproteínas e as possíveis moléculas ligantes.

4.5. Quantificação da expressão gênica basal de RPRC010099 e RPRC015421 nos órgãos reprodutores de *R. prolixus*

Para avaliar o nível de expressão gênica das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 em diferentes estágios fisiológicos de *R. prolixus* adulto (antes e após o acasalamento), 5 machos virgens, 5 fêmeas virgens e 5 fêmeas acasaladas foram dissecados em solução salina 0,9% para obtenção dos testículos, glândulas acessórias, ovários e espermatecas. Os tecidos foram coletados e armazenados em solução TRIzol, macerados e o RNA total extraído utilizando o kit de extração de RNA total por TRIzol da Invitrogen®, seguindo protocolo do fabricante. O RNA total foi quantificado no equipamento Nanodrop® (ThermoScientific) com leitura a 260nm. Após a dosagem, a concentração da amostra foi ajustada para 200 ng/μL. O RNA total de cada tecido foi usado na produção de cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Biosystems). Para confirmar a produção do cDNA recém sintetizado, uma PCR foi realizada utilizando-se o par de iniciados EF qF/R (Quadro 1). Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Gel Red (Biotium) para visualização, sob luz ultravioleta, da banda de tamanho correspondente a 92 pb. O cDNA foi utilizado em um ensaio de PCR quantitativa utilizando o kit Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante, no termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em triplicatas, contendo as amostras de cDNA dos tecidos reprodutivos, os iniciadores Rp10099 qF/R, Rp15421 qF/R e EF qF/R (Quadro 1) e o Power SYBR Green PCR Master Mix. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Controles negativos foram utilizados em cada placa e para cada conjunto de iniciadores utilizados, a fim de confirmar a ausência de DNA genômico, de dímeros de primers ou de contaminação dos reagentes. Após as reações, foi feita a análise da curva de dissociação dos amplificados de cada amostra para verificar a presença de mais de um produto amplificado ou de dímeros. A quantidade relativa de transcritos-alvo em cada amostra foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) utilizando o gene elongation factor (EF)

como gene de referência (PAIM *et al.*, 2011). A eficiência das reações de qPCR foi determinada para cada gene estudado utilizando o valor da inclinação da curva obtida pela diluição seriada do cDNA (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01ng de cDNA) em um modelo de regressão linear, de acordo com RADONIĆ *et al* (2004). Os iniciadores utilizados estão indicados no Quadro 1. Foram consideradas aceitáveis as eficiências entre 90% e 110%.

4.6. Silenciamento pela técnica de RNA interferente

4.6.1. A técnica de RNA interferente

A técnica do RNA de interferência, ou RNA interferente (RNAi), é uma ferramenta de silenciamento gênico pós-transcricional comumente utilizada para estudos de genômica funcional. A técnica se baseia na produção de um RNA dupla fita (dsRNA) complementar à sequência do RNA mensageiro (mRNA) transcrito do gene de interesse. Quando introduzidas no organismo, as fitas de dsRNA são identificadas e clivadas por proteínas endógenas denominadas Dicer, dando origem a fragmentos menores chamados de siRNAs. Os siRNAs se associam a proteínas celulares formando um complexo denominado RISC. Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, de forma que a fita antisense do duplex guia o complexo até o mRNA alvo. Ao se ligar ao mRNA alvo, o mesmo é degradado. Sem a presença do mRNA, a proteína codificada pelo gene de interesse não é produzida. Dessa maneira, é possível estudar o fenótipo dos organismos que tiveram um determinado gene silenciado pela técnica de RNAi (PAIM, 2014).

4.6.2. Síntese de dsRNA

Inicialmente, 5 insetos adultos machos foram dissecados em solução salina 0,9% com auxílio de uma lupa estereoscópica, pinças e micro tesoura. Os testículos dos insetos foram coletados e utilizados para extração de RNA total seguido da síntese de cDNA, conforme protocolo descrito anteriormente (item 4.5.). O material foi então armazenado a -20 C° até a sua utilização para a produção das moléculas de RNA de dupla fita (dsRNA).

A síntese do dsRNA foi realizada utilizando o kit MegaScript RNAi Kit (Ambion), tendo o cDNA de testículo de *R. prolixus* como molde e seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para essa etapa, foi realizada uma reação em termociclador utilizando os iniciadores RP10099 T7 F/R e RP15421 T7 F/R (Quadro 1). Os produtos da PCR contendo o promotor T7

(5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA 3') em ambas as extremidades foram incubados por 4 horas a 37 °C com rUTP, rCTP, rGTP e rATP, tampão 10x Buffer e Enzyme Mix (T7). Posteriormente, as amostras foram tratadas com DNase e o dsRNA foi precipitado utilizando-se Isopropanol. Ao final, as amostras de dsRNA foram dosadas a 260nm no Nanodrop® (ThermoScientific). Uma eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Gel Red (Biotium) foi realizada para a visualização das bandas correspondentes aos genes RPRC0010099 (dsRPRC010099) e RPRC0015421 (dsRPRC015421).

O mesmo procedimento supracitado foi utilizado para a produção do dsRNA controle, correspondente ao gene de queratina de camundongo (dsKER). Para isso, um pequeno fragmento de pele da cauda de um camundongo da linhagem BALB-c anestesiado foi cortado e macerado em solução TriZol. O RNA total foi extraído e utilizado para a síntese de cDNA. Em seguida, o cDNA foi utilizado como molde para a produção do dsRNA de queratina, utilizando-se o par de iniciadores KER T7 F/R (Quadro 1). Os kits e protocolos utilizados foram os mesmos descritos anteriormente.

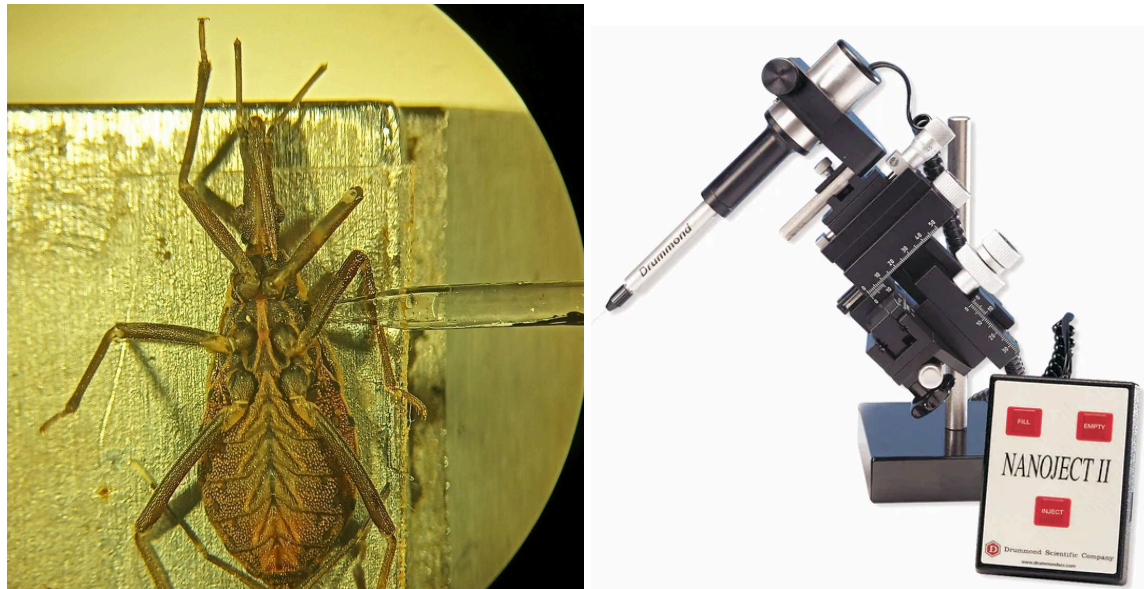
4.6.3. Microinjeção

Para a produção de insetos machos *knockdown* utilizando a técnica de RNAi, 1µg de dsRNA específico para cada gene-alvo foi introduzido via injeção única em ninfas machos de 5º estágio (com cerca de 7 dias de jejum após a muda). A sexagem das ninfas para a seleção de machos foi realizada com base no dimorfismo sexual observado nos últimos segmentos abdominais do inseto.

Foi utilizado um microinjetor (Nanoinjector, Drummond) e a injeção foi realizada na lateral do tórax dos insetos, entre o primeiro e o segundo par de pernas. Ao todo, 35 ninfas de 5º estágio machos foram injetadas com dsRPRC010099 (para o silenciamento do gene RPRC010099), 35 com dsRPRC015421 (para o silenciamento do gene RPRC015421) e 35 com dsKER (grupo controle). 72 horas após a microinjeção, 10 ninfas de cada grupo foram dissecados em solução salina 0,9% sob lupa microscópica e com o auxílio de pinças e micro-tesouras. Os testículos foram então coletados em TriZol e o RNA total das amostras foi extraído. Em seguida, foi produzido o cDNA a ser utilizado em um ensaio de qPCR para a avaliação da eficiência do silenciamento gênico, conforme será descrito a seguir. Os demais insetos microinjetados foram alimentados semanalmente em hamsters anestesiados e acompanhados até a muda para adultos

para a formação dos casais.

Figura 9 – Representação da microinjeção de dsRNA. À esquerda: fotografia do momento da injeção de dsRNA em uma ninfa do 5º estágio macho de *R. prolixus* (fotografia de autoria própria). A injeção é realizada na região lateral do corpo, entre o primeiro e o segundo par de pernas. À direita: imagem do Nanoinjector (Drummond) utilizado no experimento.



Fonte: à direita, autoria própria; à esquerda, imagem retirada do website do fabricante (<https://www.fishersci.com/>).

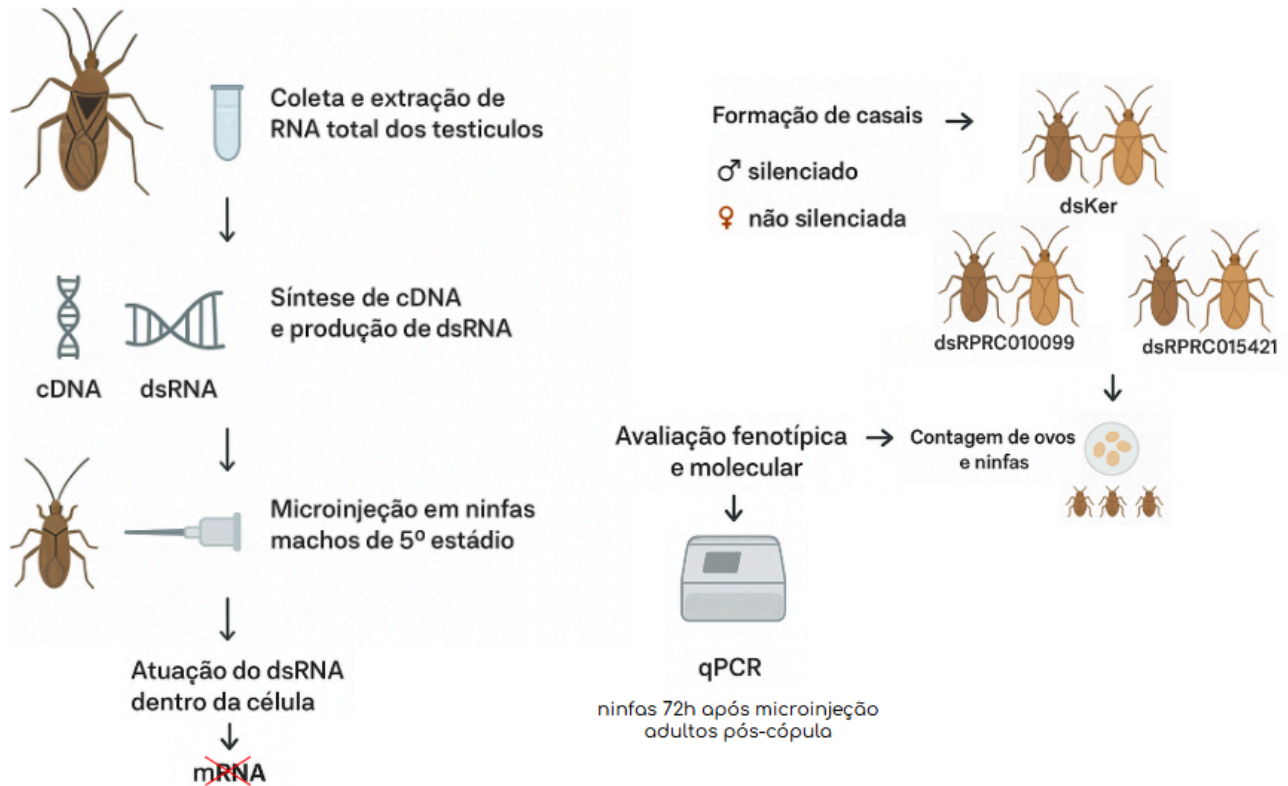
4.6.4. Formação dos casais e análise do fenótipo

Para cada grupo de insetos microinjetados com dsRNA, 25 casais foram formados utilizando um macho injetado e uma fêmea virgem não injetada (retirada da colônia mantida no laboratório). Cada casal foi acondicionado em um recipiente individualizado. Os insetos foram alimentados em hamsters anestesiados no terceiro dia após a formação dos casais e acompanhados por 5 semanas. Uma semana após a formação dos casais, os machos foram separados das fêmeas, dissecados em solução salina 0,9% sob lupa microscópica e com o auxílio de pinças e micro-tesouras. Os testículos foram então coletados em TriZol e o RNA total das amostras foi extraído. Em seguida, foi produzido o cDNA a ser utilizado em um ensaio de qPCR para a avaliação da eficiência do silenciamento gênico, conforme será descrito a seguir. As fêmeas permaneceram em acompanhamento até o final do experimento. Os parâmetros observados foram a quantidade de ovos produzidos por cada fêmea (taxa de oviposição) e a quantidade de ninfas eclodidas (taxa de eclosão das ninfas).

4.6.5. Análise do silenciamento por PCR quantitativa

Ensaio de PCR quantitativo (qPCR) foram realizados para avaliar a eficiência do silenciamento dos insetos microinjetados. Para isso, foram utilizadas as amostras de cDNA produzidas a partir do RNA total extraído dos testículos dos insetos machos nos estádios de n5 (72h após a microinjeção) e adultos (após o período de 7 dias de acasalamento). Foi utilizado o kit Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems), seguindo protocolo descrito anteriormente (item 4.5.). Um resumo de todo o processo do silenciamento por RNAi é mostrado na Figura 10, a seguir.

Figura 10 – Esquema experimental do silenciamento por RNAi. Produção e microinjeção do dsRNA; e avaliação do fenótipo dos insetos *knockdown* para os genes RPRC010099 e RPRC015421.



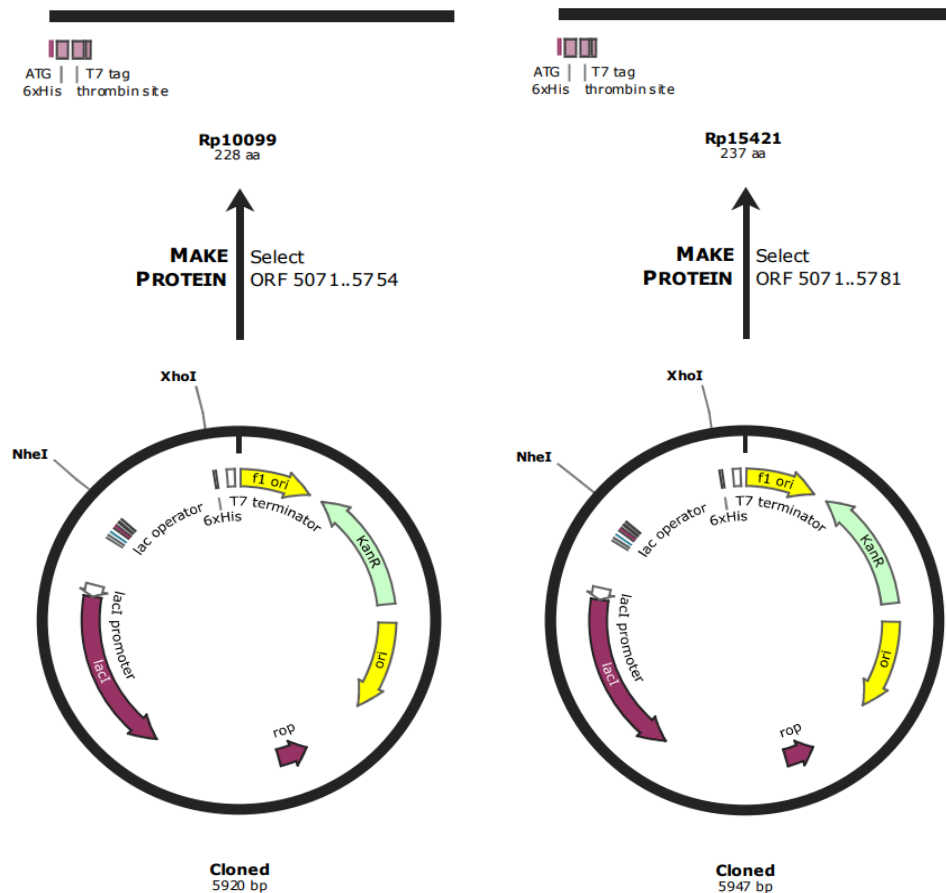
Fonte: autoria própria.

4.7. Expressão das proteínas recombinantes

4.7.1. Desenho dos plasmídeos

Os plasmídeos pET-TEV28a foram desenhados com o auxílio da ferramenta ApE - A Plasmid Editor (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ap/>). Foram inseridas as sequências de nucleotídeos dos genes de interesse (RPRC010099 ou RPRC015421) obtidas na plataforma VectorBase (<https://vectorbase.org/vectorbase/app>). Também foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *NheI* e *XhoI*, no início e no final da sequência gênica, bem como o gene de resistência ao antibiótico canamicina. Além disso, incluiu-se uma sequência de nucleotídeos correspondente a seis resíduos de aminoácidos histidina na extremidade N-terminal da proteína que será traduzida. Os plasmídeos, já inseridos em bactérias *Escherichia coli*, foram adquiridos da fabricante FastBio (Figura 11).

Figura 11 – Plasmídeos pET-TEV28a. À esquerda o plasmídeo contendo o inserto RPRC010099 e à direita, o inserto RPRC015421.



Fonte: disponibilizada pelo fabricante (FastBio).

4.7.2. Expressão heteróloga das proteínas recombinantes

O plasmídeo pET-TEV28a contendo o inserto (gene RPRC0010099 ou RPRC0015421) foi retirado da bactéria de origem e inserido em bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21-Star pelo processo de transformação via eletroporação. Para isso, foi adicionado 3 μL de pET-TEV28a/Inserto a uma alíquota de 50 μL de bactéria BL21-Star, homogeneizando cuidadosamente. A suspensão foi transferida para uma cubeta de 0,1 cm (Bio-Rad) e foi dado um pulso elétrico de 1,8 kV no eletroporador Micro Pulser (Bio-Rad). Foi adicionado 250 μL de meio de cultura 2xYT líquido (sem antibiótico) na cubeta, homogeneizando e transferindo a suspensão para um tubo estéril de 1,5 mL.

Após incubação de 1h a 37 °C sob agitação a 180 rpm no shaker, 50 μL da suspensão foi espalhada na placa de Petri com meio 2xYT sólido contendo kanamicina. Em outra placa de

Petri, o restante da suspensão (200 μ L) também foi espalhada em meio 2xYT sólido contendo kanamicina. As placas foram identificadas, vedadas com parafilme e incubadas em estufa a 37 °C *overnight*.

Para a análise dos transformantes, foram selecionadas 10 colônias de bactérias que cresceram nas placas de Petri incubadas anteriormente. Uma PCR de cada colônia foi realizada, utilizando os primers Rp10099 T7 qF/R e Rp15421 T7 qF/R (Quadro 1), que possuem a terminação T7 (5' – TAATACGACTCACTATAG – 3'). As mesmas colônias selecionadas foram repicadas em uma nova placa de Petri contendo meio 2xYT sólido com canamicina e incubada a 37 °C *overnight* (placa “réplica”). O produto da amplificação por PCR foi analisado em uma eletroforese em gel de agarose 1%.

As colônias que apresentaram o tamanho de banda esperado para a bactéria + plasmídeo com o inserto de interesse (colônias positivas) foram selecionadas e utilizadas em um pré-inóculo para obtenção de clones de mais plasmídeos BL21-Star/pET-TEV28a/Inserto. Para isso, colônias positivas foram selecionadas da placa “réplica” e repicadas em 4 mL de meio 2xYT líquido contendo 4 μ L de antibiótico canamicina. A cultura foi incubada a 37 °C, *overnight*, sob agitação de 180 rpm. Para criopreservação das colônias, 700 μ L do pré-inóculo foram adicionados a 300 μ L de glicerol 10% e a suspensão foi armazenada a -80 °C.

Para o teste de expressão, 750 μ L do pré-inóculo restante foram adicionados a 14,25 mL de meio + 14,25 μ L de kanamicina, representando uma diluição de 1:20. A suspensão foi incubada a 37 °C sob agitação de 180 rpm e a densidade óptica (O.D) foi verificada constantemente até atingir valores entre 0,6 e 0,8 (~ 3h). Após atingir a O.D esperada, 1 mL da cultura foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos. Após o descarte do sobrenadante, 75 μ L de água Milli-Q e 25 μ L de tampão de amostra para proteína (4X) foram adicionados ao pellet e a suspensão foi armazenada a -20 °C. Esta amostra correspondeu ao tempo não-induzido (tempo 0 horas / T0).

Ao extrato bacteriano restante foram adicionados 12 μ L de IPTG (1 mM) e a suspensão foi incubada a 37 °C por 3h no shaker, sob agitação de 180 rpm. Após a incubação, a O.D foi verificada e 0,5 mL de cultura foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 75 μ L de água Milli-Q e 25 μ L de tampão de amostra para proteína (4X) e a suspensão foi armazenada a -20 °C. Esta amostra correspondeu ao tempo induzido T3 (3h após a indução IPTG). Uma outra amostra da cultura foi retirada após 24h de

incubação e igualmente preparada. Esta amostra correspondeu ao tempo induzido T24 (24h após a indução por IPTG). O restante da cultura (~10mL) foi centrifugada a 3.000 rpm por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C.

Mais tarde, o pellet mantido a -80 °C foi utilizado para o teste de solubilidade das proteínas recombinantes. Foi adicionado 1 mL de PBS 1X e homogeneizado no vortex até a completa ressuspensão do pellet. Em seguida, 10 µL de lisozima (10 mg/mL) foram adicionados e, após homogeneização, a suspensão foi incubada em gelo por 30 minutos. Foram realizados 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, intercalados com descongelamento a 37 °C e o material passado em seringa de insulina (1 mL) até perder a viscosidade. O lisado celular foi então centrifugado a 6.000 g por 5 minutos a 4 °C para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (pellet). Foram coletados 75 µL do sobrenadante ao qual se adicionou 25 µL do tampão de proteína 4X, homogeneizando-se bem. Esta amostra correspondeu à fração solúvel. O pellet foi ressuspensionado em 500 µL de PBS 1X. Foi adicionado 25 µL do tampão de proteína 4X ao material ressuspensionado, homogeneizando-se bem. Esta amostra correspondeu à fração insolúvel.

A análise da expressão e da solubilidade das proteínas recombinantes foi realizada por meio de uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 1.5mm. Para isso, 20 µL de cada amostra (T0, T3, T24, Fração solúvel, Fração insolúvel) foram desnaturadas por 10 minutos a 95 °C no termociclador e, então, corridas no gel.

A expressão em larga escala das proteínas foi realizada em seguida. Inicialmente um pré-inóculo foi preparado utilizando 100 mL de meio 2xYT líquido, 100 µL de kanamicina (50 µg/mL) e 1 µL da bactéria estoque (BL21-Star/pET-TEV28a/Inserito). A suspensão foi incubada sob agitação de 180 rpm a 37 °C overnight. Para a preparação do inóculo final, 50 µL do pré-inóculo foi adicionado a 1 L de meio 2xYT líquido contendo 1 mL de kanamicina (50 µg/mL). A suspensão foi incubada sob agitação de 180 rpm a 37 °C até atingir uma O.D entre 0,6 e 0,8 (~ 3h). Após alcançar a O.D desejada, 1 mL da cultura (T0) foi separada para o teste de expressão em gel de poliacrilamida conforme descrito anteriormente. Ao restante da suspensão foi adicionado 1 mL de IPTG, seguido de incubação sob agitação de 180 rpm, a 37 °C, por 24h. Foi separado 0,5 mL da suspensão após 24h de indução (T24) para o teste de expressão em gel de poliacrilamida conforme descrito anteriormente.

A cultura foi separada em frascos de 500 mL previamente autoclavados e estes centrifugados por 30 min a 2.000 g em 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet coletado e ressuspendido em 50 mL de AKTA “A”. O material foi novamente centrifugado por 30 min a 2.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até o momento da purificação das proteínas.

4.7.3. Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram purificadas pela técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos. Utilizou-se uma coluna de níquel (HisTrap HP) que possui afinidade à cauda de histidina presente nas proteínas recombinantes. A coluna HisTrap HP foi conectada ao sistema de cromatografia ÄKTAprime (GE Healthcare, EUA) e as amostras das proteínas recombinantes recém sintetizadas foram preparadas e purificadas de acordo com metodologia sugerida pelo fabricante. A confirmação das apolipoproteínas recombinantes purificadas foi realizada por meio de uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) para observação de bandas com tamanho esperado.

Além disso, foi realizado um ensaio de Western blotting. Para isso, amostras das apolipoproteínas recombinantes RPRC010099 e RPRC015421 (1–2 µg) foram preparadas com tampão de amostra 4X e desnaturadas a 95 °C por 10 minutos. Em seguida, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE), juntamente com marcador de peso molecular (Kaleidoscope, BioRad 10-250 kDa). A corrida eletroforética foi conduzida inicialmente a 80 V até a entrada completa das amostras no gel de separação, sendo então aumentada para 200 V até a completa migração. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µm, BioRad) utilizando sistema úmido, a 100 V por 1 hora, em tampão de transferência contendo Tris, glicina e metanol. A eficiência da transferência foi confirmada por coloração com Ponceau S. Posteriormente, a membrana foi submetida a bloqueio em solução de TBS-T (0,1% Tween-20) contendo 5% de leite em pó desnatado, por 1 hora à temperatura ambiente, seguida de incubação overnight a 4 °C. Em seguida, a membrana foi lavada em TBS-T e incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo primário anti-His (1:1000, diluído em solução de bloqueio). Após lavagens sucessivas, foi realizada incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado (1:2000, diluído em solução de bloqueio), também por 1 hora. A detecção foi feita por

quimioluminescência, utilizando substrato Luminata (Millipore), e as imagens foram registradas em sistema de fotodocumentação por quimioluminescência digital.

4.8. Produção dos anticorpos policlonais

As proteínas recombinantes serão utilizadas como imunizantes para estimular a produção de anticorpos anti-apolipoproteínas. Os anticorpos obtidos serão utilizados para os ensaios de imunolocalização, cujo objetivo é observar a localização das apolipoproteínas no sistema reprodutor masculino e feminino do inseto *Rhodnius prolixus*, antes e após o acasalamento.

Serão realizados três eventos de imunização com intervalos de 14 dias em camundongos da linhagem Balb-c com idade entre 4 e 8 semanas. Nos eventos de imunização, cada camundongo será injetado no dorso, de forma subcutânea, com 0,1 mg de hidróxido de alumínio e 5 µg de proteína recombinante (RPRC010099 ou RPRC015421) em um volume final de 100 µL de tampão fosfato estéril. Para o grupo controle, camundongos serão injetados apenas com o hidróxido de alumínio diluído no tampão fosfato estéril. Os camundongos serão mantidos em biotério (ciclo claro-escuro de 12:12 h) com alimentação e água *ad libitum*.

Amostras de sangue serão colhidas por punção da veia lateral caudal dos camundongos 10 dias após o último evento de imunização. As amostras serão centrifugadas a 4.000 g por 10 min para a obtenção do soro. Os níveis de IgG antígeno-específicos para cada uma das apolipoproteínas recombinantes serão determinados a partir de um ensaio de ELISA indireto. Para isso, serão utilizados 0,5 µg/poço de cada apolipoproteína recombinante em placas de ELISA de 96 poços Nunc MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific). Após incubação overnight, as placas serão lavadas, bloqueadas com solução de bloqueio, incubadas com os soros dos camundongos na diluição 1:160 e, após novas lavagens, incubadas com anticorpos Goat anti-Mouse IgG, IgM (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor™ (ThermoFisher – USA) na diluição 1:5.000. A revelação será feita com a adição do tampão fosfato-citrato 100 mM pH 5.0 contendo H₂O₂ e O-Fenilenodiamina. A reação será parada com a adição de H₂SO₄ 12,5% e a absorbância medida a 495 nm em leitor de ELISA.

4.9. Avaliação da transferência de apolipoproteínas via cópula

A transferência das apolipoproteínas dos machos para as fêmeas de *R. prolixus* durante a cópula foi testada por meio de um ensaio de ELISA, utilizando-se os anticorpos

anti-apolipoproteínas recombinantes RPRC010099 e RPRC015421 produzidos na etapa anterior. Insetos machos, fêmeas virgens e fêmeas pós-acasalamento (n = 9 insetos por grupo – 3 pools contendo 3 pares de órgãos cada) foram dissecados para obtenção dos órgãos reprodutores (testículos, glândulas acessórias, ovários e espermatecas). Uma microplaca de ELISA Maxisorp (Nunc®) foi sensibilizada durante 12 horas, à temperatura de 4°C dentro de uma câmara úmida, com 50 uL de extrato dos órgãos dissecado (3 pares do órgão diluído em 200 ul de tampão carbonato). Os controles foram preparados da mesma forma utilizando-se 50ul da apolipoproteína recombinante (controle positivo) na concentração de 0,4 ug/ul ou tampão carbonato (controle negativo) para sensibilização da placa. Cada uma das amostras foi realizada em triplicata. Os poços sensibilizados foram bloqueados com 150 µl de solução bloqueadora – leite em pó desnatado diluído a 10% em PBS-Tween (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g q.s.p. H₂O 1000 mL + 0,05% Tween-20) – durante 30 minutos em temperatura ambiente e sob agitação de 160 rpm. Após o bloqueio, os poços foram lavados três vezes utilizando-se PBS-Tween por 2 minutos a temperatura ambiente e sob agitação de 160 rpm. Foram adicionados 50 uL do soro dos camundongos imunizados com as apolipoproteínas recombinantes (RPRC010099 ou RPRC015421) diluídos em PBS na proporção 1:100 e incubados por 45 minutos, em temperatura ambiente e sob agitação. Em seguida os poços foram lavados 3 vezes com 150 uL de PBS-Tween por 2 minutos e novamente incubados por 45 minutos à temperatura ambiente e sob agitação com 50 µL do anticorpo IgG anti-mouse de coelho conjugado com peroxidase (Abcam - Ab6728) diluído a 1:20000 em PBS. Os poços foram lavados 2 vezes com 150 mL PBS-Tween e uma vez com PBS por 2 minutos sob agitação. Após a última lavagem, os poços foram rapidamente preenchidos com 200 µL de substrato OPD-H₂O₂ (1 mg/mL de O-PhenyleneDiamine [Sigma: P-9029]) dissolvido em tampão citrato de sódio (ácido cítrico 50 mM; Na₂HPO₄ 50 mM; pH 5,0) e incubados por 10 minutos à 37°C no escuro. A reação foi parada com adição de 100 µL de ácido sulfúrico 1 M por poço. As leituras foram executadas a 450 nm em leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices®) e os dados gerados foram utilizados para os cálculos estatísticos.

4.10. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados encontrados nos experimentos, foram realizados testes estatísticos com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. A normalidade dos dados foi

avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Variáveis com distribuição normal foram testadas pelo Teste T (no caso de 2 grupos) ou ANOVA (no caso de mais de 2 grupos) seguido pelo teste de Tukey ou Bonferroni para identificar as diferenças entre os grupos. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, as análises foram feitas com o teste de Mann-Whitney (no caso de dois grupos) ou Kruskal-Wallis (no caso de mais de 2 grupos). O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar proporções de variáveis nominais. $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

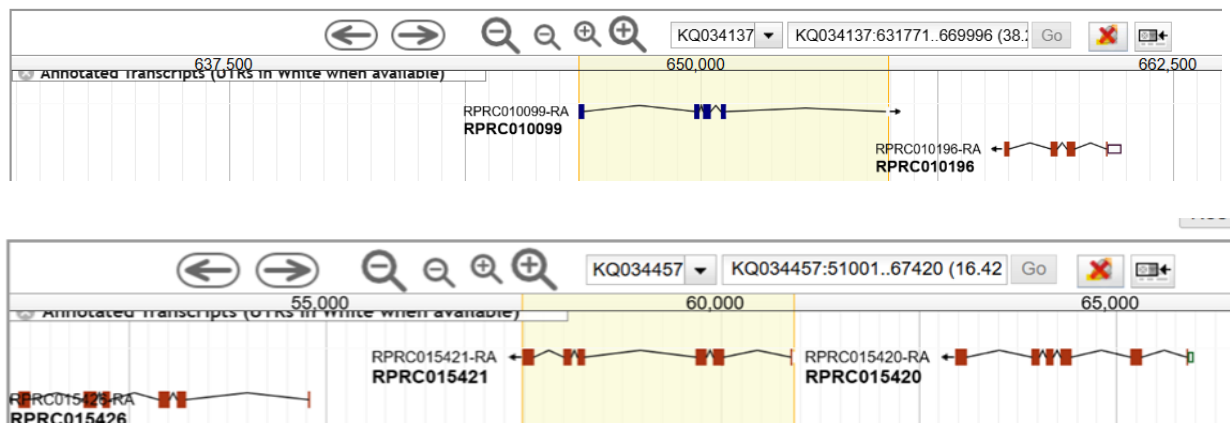
5. RESULTADOS

5.1. Análises *in silico* dos genes RPRC010099 e RPRC015421

5.1.1. Análise genômica

De acordo com as anotações disponíveis no VectorBase, os genes estudados – RPRC010099 e RPRC015421 estão localizados em regiões distintas do genoma de *R. prolixus*. Enquanto RPRC010099 está localizado no contig KQ034137, entre as posições 646.765 e 654.990 pb na fita senso, RPRC015421 está localizado no contig KQ034457, entre as posições 57.486 e 60.929 pb na fita antisenso (Figura 12). Isso mostra que os dois genes estão distantes um do outro no genoma do inseto e não estão organizados *in tandem*.

Figura 12 – Localização dos genes RPRC010099 e RPRC015421 no genoma de *R. prolixus*. RPRC010099 e RPRC015421 estão localizados em *scaffolds* diferentes.



Fonte: anotações disponíveis na base de dados VectorBase (<https://vectorbase.org/vectorbase/app>).

5.1.2. Alinhamento das sequências de nucleotídeos

O alinhamento das sequências gênicas de RPRC010099 e RPRC015421 (Figura 13) mostrou que há uma baixa identidade de nucleotídeos – de apenas 50%. Foram identificadas as sequências referentes ao iniciadores Rp10099 qF/R e Rp15421 qF/R, utilizados nos ensaios de qPCR, bem como a sequência correspondente ao dsRNA produzido para os experimentos de silenciamento por RNAi.

Figura 13 – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos de RPRC010099 e RPRC015421.
Em vermelho: seqüência do dsRNA utilizado nos experimentos de silenciamento por RNAi. Em amarelo: seqüência dos iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR. Asterisco (*) – indica nucleotídeos idênticos.

RPRC010099	ATGAAAGCTGAACTGGGCGCTACGGTCAGCTGGGGCTACCAGCTCCT CCTCGTCATCGCT	60
RPRC015421	ATGATTTTCGAAAATTACATTTATTTTCC TAAGTG---- TCAGCGCATTGAGCTTGTACACA	56
	**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
RPRC010099	ATCTGTTTCTTTAGTCTGTC-----CTCCGGCCAGCGACCAGCGT-----TCGG	104
RPRC015421	AGCTTTTCTTTTGGATTTGGACCATTCACCC CTGGTGACTATAAACCTTGGCG ATTAGG	116
	* *	
RPRC010099	CAGGTGTCCCGATGTACAGCCAAAAAAGACTTTGACGTATCCAGTTTACT--- GGAGA	161
RPRC015421	TACATGCTTAGTGCCAACCTCAGTGAAGAACTTCAACCAGAGAAGTTCTTTAAAGGTCA	176
	* *	
RPRC010099	ATGGAACGAAATAGAACGTTCTTTTATCTGTTCGAGTCCCTCACTTTCATGCACCAA ACT	221
RPRC015421	CTGGTACGTAC---AAAATCATTGTGGTAATTTTCAATGGATACTTCC CAGGTATCTGTCC	233
	* *	
RPRC010099	GAA-----CTTCACTTTGTA CTCAAACGACACTATGGTGGCCGA-TGTTAACTATAGAG	274
RPRC015421	CACCACAGAAATATAATGTCACTCAAGATGGTGATATATTGGAATTAGACTATCACTACAT	293
	* *	
RPRC010099	CTCCGTGGCGCGCCACCAGCAGTACATCTGAGTACATAATCAAAGATGTGTCCAAGACTC	334
RPRC015421	TCCAATGACTGGGAGGTATAAAGAGAAACGAGCACACAGTA-----ATACTA	340
	* *	
RPRC010099	CAGGTATTCTGAACATGGTGTGGCCAGCACGCTGCCAGCGC-TAATCGCAAGGATGGC-	392
RPRC015421	AACTTATTA--AGAATGGCGAAGGTCACTTTACCTATGACTTTTGAATTTCTGAGAGGTCT	398
	* *	
RPRC010099	---TCCAGGCAGTGGCAAGTACATCGTTTTGGATACGGACTACATAGACT ACGCTCTCAT	449
RPRC015421	TCATCCGATGGATGTACCAACTTTCATTTTAGGTACAGATTATGAAAACGGGCGGTAGT	458
	* *	
RPRC010099	CTACTCTTGAC CGATTT--ACGTCTGTACATG-CA-----GATTCATTT GGGTA	498
RPRC015421	ATATTACTGTAAACAGCAGCAAGTGTTAAAATTTGAAGAGTCACTGATCTTAACTCGTAA	518
	* *	
RPRC010099	CTTGGCAGATCGAAAGA CATCTCCATCGACGCTAGA-----ACCATAATCTATTCAA	550
RPRC015421	AAGGGATGATGAAGAAATATGGCAACCTGTTTGGACACACTCAA ACTGAACAAAT TGGA	578
	* *	
RPRC010099	CGCTAGATAAATTTAAAATCAACAGACAGACTGTTGTTGTCGAAAACCAAAGATTTGTT	610
RPRC015421	CTATCGTTACTTTA--AACCAACGGTCAATAATGGTTGTCTCCTAATGAACCACATCTT	636
	* *	
RPRC010099	AA- 612	
RPRC015421	TGA 639	

Fonte: autoria própria.

5.1.3. Alinhamento das sequências de aminoácidos

A partir do alinhamento das sequências de aminoácidos de RPRC010099 e RPRC015421, observou-se que as proteínas apresentam uma baixa identidade – de apenas 24% – conforme mostrado na Figura 14. A análise de domínio mostrou que, apesar da baixa identidade de nucleotídeos e de aminoácidos das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421, ambas possuem o domínio da superfamília das lipocalinas conservado.

Figura 14 – Alinhamento das sequências de aminoácidos de RPRC010099 e RPRC015421. (*) – aminoácidos idênticos; (:) – aminoácidos altamente conservados; (.) – aminoácidos pouco conservados.

RPRC010099	--MKLN--WAATVSWG YQLLLVIAICFFSLSSGQRPAFGRC PDVTPKKDFDVSQ-FTGEW	55
RPRC015421	MISKITFI FL SVSALSLSQAF LFGFGPFTPGDYKPWRLGTCLVPTPVKNFQPEKFFKGHW	60
	*:. : : . . : : : * : . : : * * ** * : . : * . * . *	
RPRC010099	NEIERS-FYLFESSLSCTKLNFTLYSNDTMVADV NYR-APWRGTSSTS--EYIIKDVSKT	111
RPRC015421	YVQNHCGNFEWILPGICPTTEYNVTQD GDI-LELDYHYIPMTGRYKEKRAHSNTKLIKNG	119
	: : . : : * . : : : . : : : : * * . . . * : : :	
RPRC010099	PGILNMV LASTLPALIARMAPGSGKYIVLDTDYIDYALIYSCTDLRLVHADFIWVLGRSK	171
RPRC015421	EGHLPMTF-----EFLRGLHPMDVPTFILGTDYENWAVVY YCKQQV LKFEE SLILTRKR	174
	* * * . : : : * . : : * . * . * : : : : : * * . :	
RPRC010099	DISIDARTIIYSTLDK LKINRDRLL---LSKTKDC----- 203	
RPRC015421	DD---EEIWQPVLDTLKL NKL D YRYFKPTVNNGCAPNEPHL 212	
	* . * . * . * . * . * : : : : : : : : : : : : : : : *	

Fonte: autoria própria.

5.1.4. Predição da conformação tridimensional das apolipoproteínas

As estruturas tridimensionais das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 foram preditas a partir de modelagem utilizando a ferramenta AlphaFold (Figuras 15 e 16). Em ambas as apolipoproteínas é possível observar a estrutura em β -barril com uma cavidade hidrofóbica central, típica da família das lipocalinas. No entanto, há diferenças estruturais entre elas, principalmente na região periférica das proteínas.

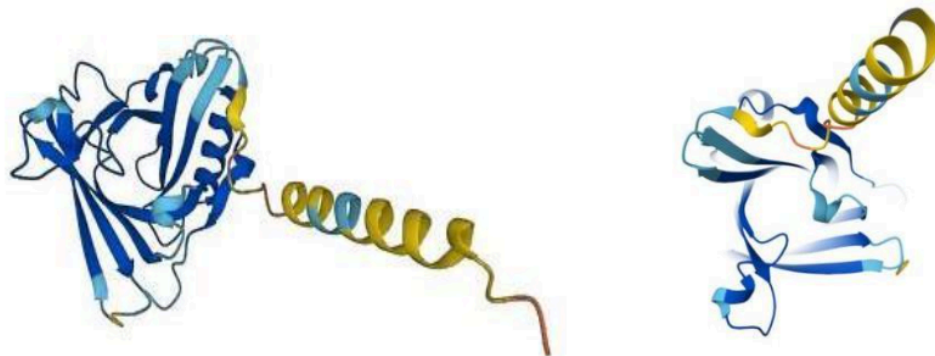
A proteína RPRC010099 apresenta um domínio globular compacto, no qual predominam folhas β centrais intercaladas por hélices α , compondo um núcleo bem definido. A partir desse domínio, projeta-se uma região helicoidal alongada, representada em coloração azul a amarela, que se estende para fora do núcleo estrutural. As áreas em azul indicam maior confiabilidade do modelo (pLDDT > 70), sugerindo a presença de elementos estáveis, enquanto as regiões em

amarelo e laranja correspondem a segmentos de menor confiança (pLDDT < 70), possivelmente mais flexíveis ou desordenados. Essa conformação confere à proteína um arranjo assimétrico, com um núcleo estável associado a uma extensão helicoidal lateral.

A proteína RPRC0015421, por sua vez, apresenta também um núcleo globular central bem organizado, formado por folhas β associadas a hélices α , semelhante ao observado na RPRC0010099. No entanto, destaca-se pela presença de longas extensões desordenadas, evidenciadas por regiões em amarelo e laranja (pLDDT < 70), que se projetam a partir do núcleo. Diferente da RPRC0010099, essas regiões não assumem conformação helicoidal bem definida, caracterizando-se principalmente como segmentos flexíveis ou não estruturados. O núcleo proteico mostra predominância de áreas em azul escuro (pLDDT > 90), o que indica maior confiabilidade no arranjo compacto central, contrastando com a baixa confiabilidade estrutural das regiões periféricas.

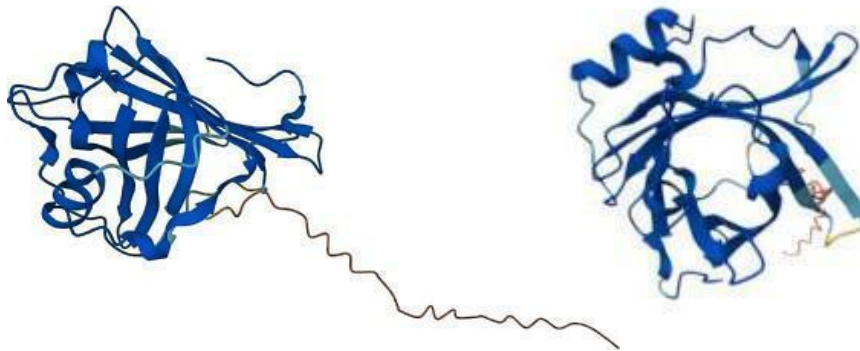
De forma comparativa, ambas as proteínas compartilham a presença de um núcleo globular formado por elementos secundários bem definidos, mas diferem quanto à organização de suas regiões periféricas: a RPRC0010099 apresenta uma hélice alongada de maior estabilidade relativa, enquanto a RPRC0015421 possui extensões desordenadas mais longas e pouco estruturadas.

Figura 15 – Estrutura tridimensional da proteína RPRC010099. O modelo de confiança do programa AlphaFold se baseia na pontuação de confiança do modelo por resíduo (pLDDT) entre 0 e 100. Azul escuro: pLDDT > 90. Azul claro: 90 > pLDDT > 70. Amarelo: 70 > pLDDT > 50. Laranja: pLDDT < 50. Algumas regiões abaixo de 50 podem ser desestruturadas isoladamente.



Fonte: AlphaFold.

Figura 16 – Estrutura tridimensional da proteína RPRC015421. O modelo de confiança do programa AlphaFold se baseia na pontuação de confiança do modelo por resíduo (pLDDT) entre 0 e 100. Azul escuro: pLDDT > 90. Azul claro: 90 > pLDDT > 70. Amarelo: 70 > pLDDT > 50. Laranja: pLDDT < 50. Algumas regiões abaixo de 50 podem ser desestruturadas isoladamente.



Fonte: AlphaFold.

5.1.5. Predição dos ligantes

Os resultados das análises de *docking* molecular das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 são mostrados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. A afinidade de ligação entre uma molécula e seu ligante é medida pela constante de dissociação de equilíbrio (K_D). Quanto menor o valor de K_D , maior a afinidade de ligação. A energia total representa a soma de todas as forças envolvidas na interação molécula-ligante. Quanto maior a energia total, maior a força desta interação. A energia vdW (energia de Van der Waals, ou forças de Van der Waals) representa o conjunto de forças intermoleculares. Quanto maior a energia vdW, maior a força de interação entre as moléculas. A energia eletrostática representa as forças de atração e repulsão entre moléculas eletricamente carregadas. Quanto maior a energia eletrostática maior a força de atração entre as moléculas.

A apolipoproteína RPRC010099 apresentou maior afinidade de ligação à prostaglandina E2 (-9.581 K_D). A energia total da interação foi de 66.927, enquanto a energia vdW foi de 31.382 e a energia eletrostática, -5.907. RPRC010099 também apresentou uma alta afinidade de ligação ao ácido araquidônico (-9.495 K_D), com energia total de 36.781, energia vdW de 19.613 e energia eletrostática de -210.193. Por sua vez, a apolipoproteína RPRC015421 apresentou maior afinidade de ligação ao ácido eicosapentaenoico (-8.494 K_D). A interação entre essas moléculas apresentou uma energia total de 160.193, energia vdW de 93.253 e energia eletrostática de

-0.398. O ligante glicose, utilizado como controle negativo para fins de comparação, apresentou baixa afinidade de ligação à apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 (-7.263 K_D e -6.817 K_D, respectivamente).

Tabela 1. Resultados do *Docking* molecular da apolipoproteína RPRC0010099.

Ligante*	Afinidade (K _D)	Energia total	Energia vdW	Energia eletrostática
Prostaglandina E2	-9.581	66.927	31.382	-5.907
Ácido araquidônico	-9.495	36.781	19.613	-21.193
Ecdisona	-9.438	342.864	155.71	-1.42
Ácido linoleico	-9.376	25.243	-5.627	-12.998
Ácido eicosapentaenoico	-9.321	70.787	-1.77	-2.122
Glicose	-7.263	3.435	-8.244	-20.205

* Os ligantes aparecem em ordem de afinidade de ligação à apolipoproteína (do que apresenta maior afinidade para o que apresenta menor afinidade).

Tabela 2. Resultados do *Docking* molecular da apolipoproteína RPRC0015421.

Ligante*	Afinidade (K _D)	Energia total	Energia vdW	Energia eletrostática
Ácido eicosapentaenoico	-8.494	160.193	93.253	-0.398
Ácido linoleico	-8.415	99.943	64.211	-19.921
Ácido araquidônico	-8.306	134.970	114.048	-6.478
Prostaglandina E2	-7.942	189.243	157.348	-16.331
Glicose	-6.817	-3.668	1.712	-36.916
Ecdisona	-5.962	603.949	423.161	-7.287

* Os ligantes aparecem em ordem de afinidade de ligação à apolipoproteína (do que apresenta maior afinidade para o que apresenta menor afinidade).

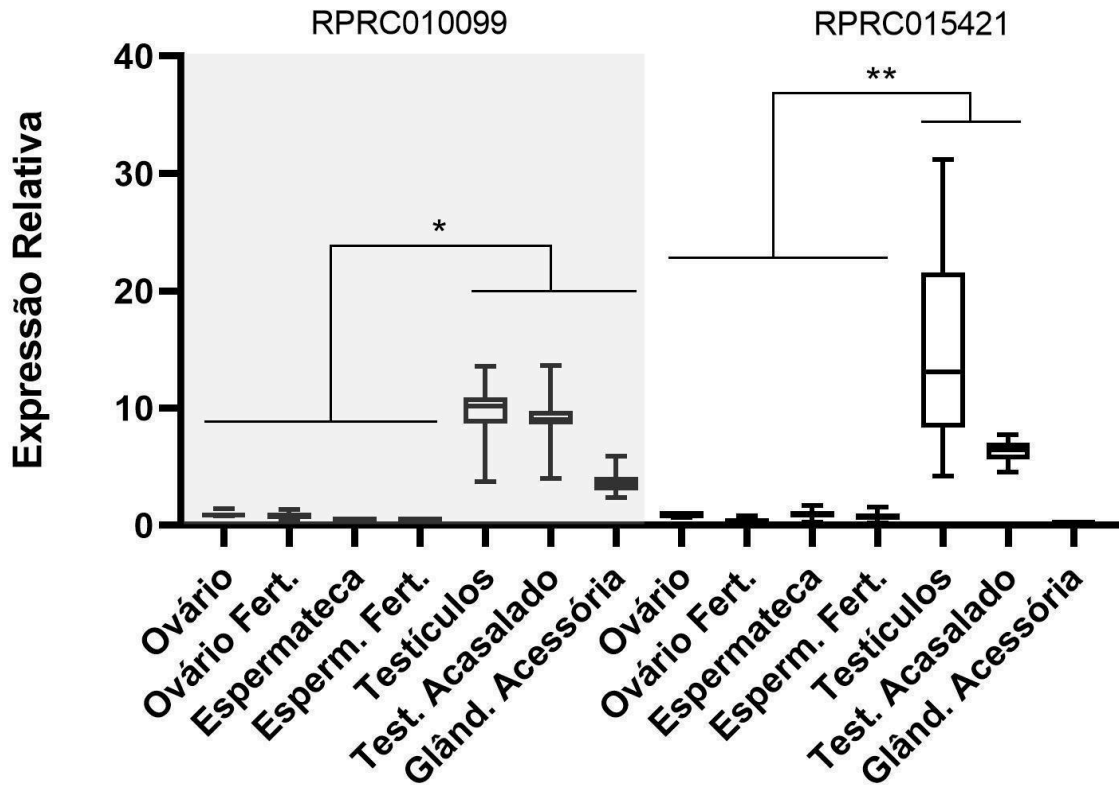
5.2. Expressão gênica basal das apolipoproteínas nos órgãos reprodutivos de *R. prolixus*

Os órgãos reprodutivos de machos e fêmeas adultos (testículos, glândulas acessórias, ovários e espermatecas) foram extraídos de insetos antes e após o acasalamento. A partir do RNA total do material obtido, foi produzido cDNA, utilizado em ensaios de qPCR para análise do nível de expressão gênica de RPRC010099 e RPRC015421 nos insetos antes e após o acasalamento. Os resultados da qPCR são apresentados na Figura 17.

A expressão gênica de RPRC010099 e de RPRC015421 nos ovários das fêmeas virgem foi considerada como sendo de 100% e utilizada para fins de comparação com os demais órgãos testados. A expressão de RPRC010099 foi de 100% ($\pm 0,28$) nos ovários virgens, 84% ($\pm 0,27$) nos ovários fertilizados, 39% ($\pm 0,05$) nas espermatecas virgens, 41% ($\pm 0,07$) nas espermatecas fertilizadas, 963% ($\pm 2,59$) nos testículos virgens, 921% ($\pm 2,40$) nos testículos acasalados e 370% ($\pm 1,07$) nas glândulas acessórias. Para a apolipoproteína RPRC015421, a expressão gênica foi de 100% ($\pm 0,11$) nos ovários virgens, 36% ($\pm 0,22$) nos ovários fertilizados, 95% ($\pm 0,46$) nas espermatecas virgens, 78% ($\pm 0,42$) nas espermatecas fertilizadas, 1556% ($\pm ,47$) nos testículos virgens, 6299% ($\pm 0,95$) nos testículos acasalados e 9,29% ($\pm 0,42$) nas glândulas acessórias.

Em resumo, estes resultados mostraram que as apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 são muito mais expressas nos insetos machos que nas fêmeas, como já era esperado (Figura 17). Além disso, a expressão de ambas as apolipoproteínas é maior nos testículos que nas glândulas acessórias dos machos. No caso da RPRC015421, a expressão nas glândulas acessórias é insignificante. Quanto ao estado fisiológico do inseto, foi possível observar que RPRC010099 é igualmente expressa nos testículos de machos virgens e de machos acasalados. Já a RPRC015421 mostrou uma maior expressão nos testículos virgens que nos testículos após o acasalamento. Em relação às fêmeas, a expressão de RPRC010099 e RPRC015421 foi muito pequena em todos os tecidos testados. Não houve diferença significativa quanto ao órgão – se ovário ou espermateca – ou quanto ao estado fisiológico do inseto – se virgem ou acasalada.

Figura 17 – Expressão relativa dos genes de RPRC010099 e RPRC015421 em fêmeas e machos antes e após o acasalamento. PCR quantitativa dos órgãos reprodutivos de fêmeas e machos de *R. prolixus*, antes e após o acasalamento. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação à expressão gênica observada em fêmeas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (teste T, não paramétrico, Mann Whitney).



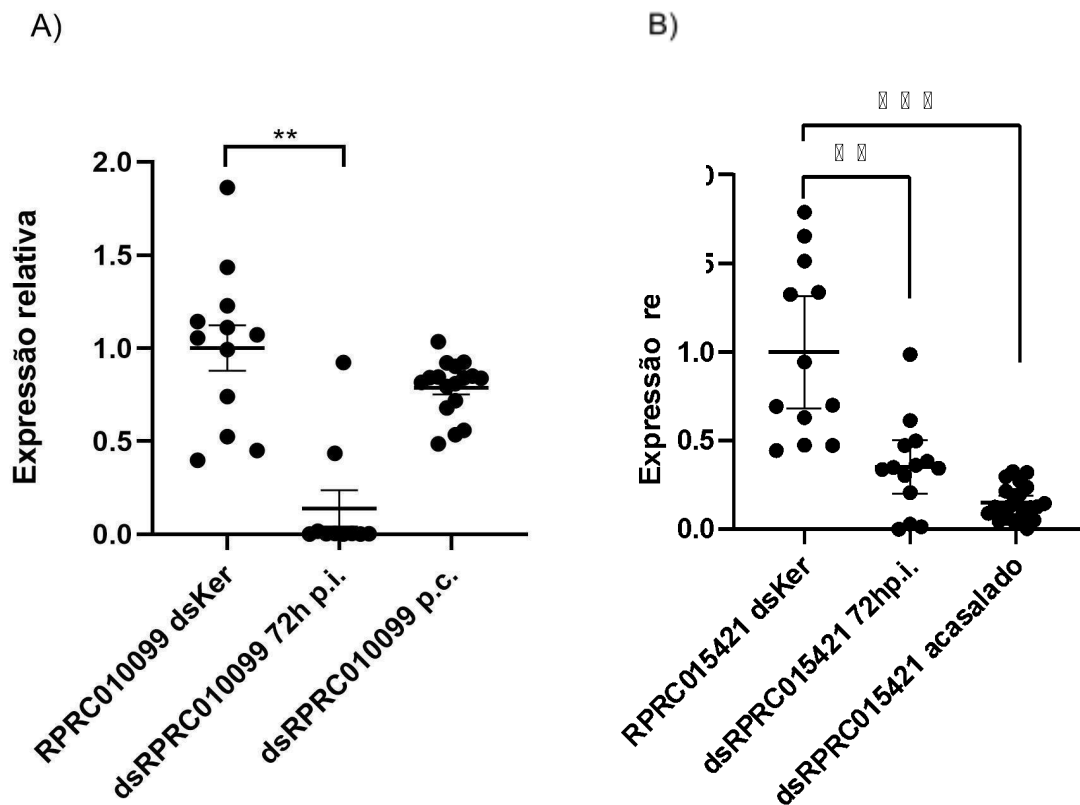
Fonte: autoria própria.

5.3. Silenciamento gênico por RNAi e os efeitos sobre a reprodução

As moléculas de dsRNA (dsRPRC010099, dsRPRC015421 e dsKER), utilizadas para o silenciamento pós transcricional a partir da técnica de RNA interferente (RNAi) foram produzidas de forma bem-sucedida. Insetos machos foram injetados com 1 μ g de dsRNA e acompanhados até a vida adulta, quando foram colocados para o acasalamento com fêmeas virgens. Passadas 72h de injeção de dsRNA, 10 machos de cada grupo foram separados para avaliação do silenciamento por meio de um ensaio de qPCR. Os testículos foram dissecados e o RNA total foi extraído para produção de cDNA. O cDNA foi utilizado em ensaios de qPCR para avaliação do silenciamento. O mesmo foi realizado com os machos adultos de cada casal

formado, 7 dias após o período de acasalamento. Os resultados da qPCR mostraram que a expressão relativa de RPRC010099 nos insetos machos 72 horas após a injeção de dsRPRC010099 foi de 13,9% ($\pm 0,31$) em relação ao grupo controle cuja expressão foi de 100% ($\pm 0,42$). Já nos insetos pós-cópula, a expressão gênica foi de 78,7% ($\pm 0,15$). Para o gene RPRC015421, a expressão relativa foi de 32,5% ($\pm 0,27$) nos insetos 72h após a injeção de dsRPRC015421 em relação ao grupo controle, enquanto que a expressão relativa após a cópula foi de 14,5% ($\pm 0,09$) (Figura 18).

Figura 18 – Expressão relativa dos genes RPRC010099 e RPRC015421 em testículos de insetos silenciados pela técnica de RNAi. Análise realizada por PCR quantitativa. (A) Expressão relativa dos genes RPRC010099 e (B) RPRC015421 no grupo dsKer (controle), em machos 72h pós-injeção do dsRNA (p.i.) e em machos pós-cópula (p.c.). ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

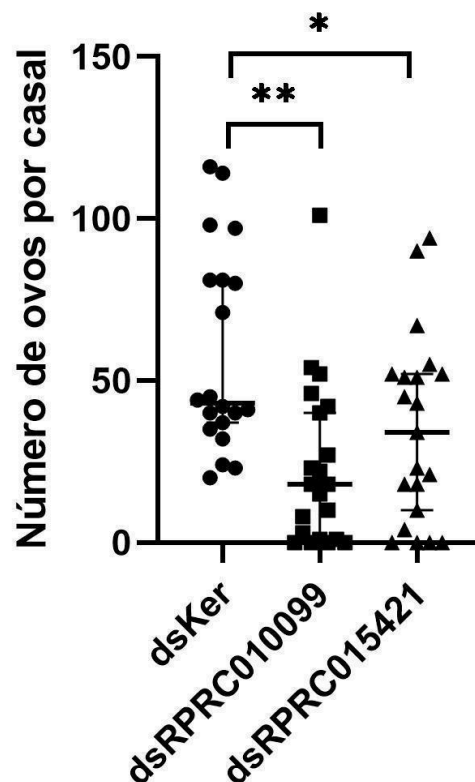


Fonte: autoria própria.

Após a formação dos casais e o período de 7 dias de acasalamento, as fêmeas foram acompanhadas por mais 5 semanas. Durante este período, realizou-se a contagem dos ovos produzidos por cada fêmea. Registrou-se ainda a eclosão das ninfas.

A análise da oviposição indicou que fêmeas acasaladas com machos silenciados para RPRC010099 e para RPRC015421 apresentaram uma redução significativa na produção de ovos. Enquanto as fêmeas do grupo dsKer produziram, em média, 58,05 ovos ($\pm 30,09$), as fêmeas do grupo dsRPRC010099 produziram 22,90 ovos ($\pm 25,57$), o que equivale a 39,44% da quantidade de ovos produzidos pelo grupo controle. As fêmeas do grupo dsRPRC015421, por sua vez, produziram no total 34,67 ovos ($\pm 28,80$), 59,72% em relação ao grupo controle (Figura 19).

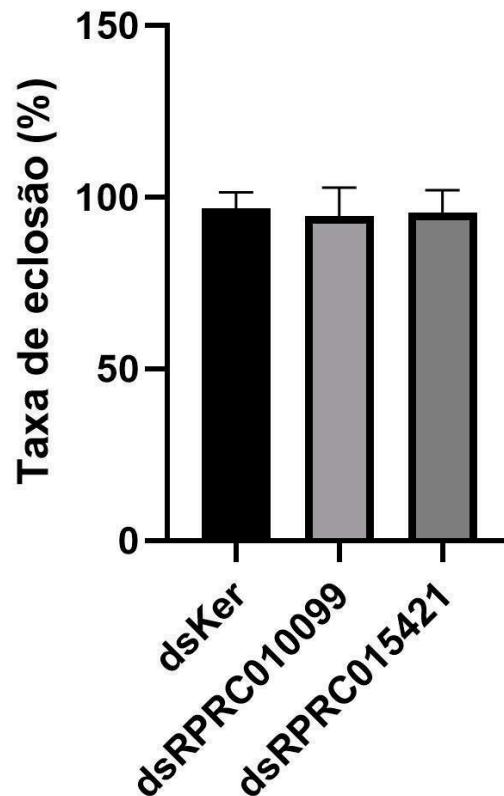
Figura 19 – Número de ovos produzidos por casal. Cada ponto representa a quantidade de ovos produzidos por cada casal formado por um inseto macho injetado com dsRNA e uma fêmea virgem. *p < 0,05; **p < 0,005.



Fonte: autoria própria.

No entanto, apesar da diferença na quantidade de ovos produzidos, não houve diferença significativa na taxa de eclosão das ninfas entre os grupos dsKer, dsRPRC010099 e dsRPRC015421 (Figura 20). Foi observada a eclosão de 96,89% ($\pm 4,96$) da prole do grupo controle, 94,56% ($\pm 8,70$) do grupo dsRPRC010099 e 89,68% ($\pm 6,86$) do grupo dsRPRC015421.

Figura 20 – Taxa de eclosão das ninfas (%). Percentual de ninfas eclodidas em cada grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos.



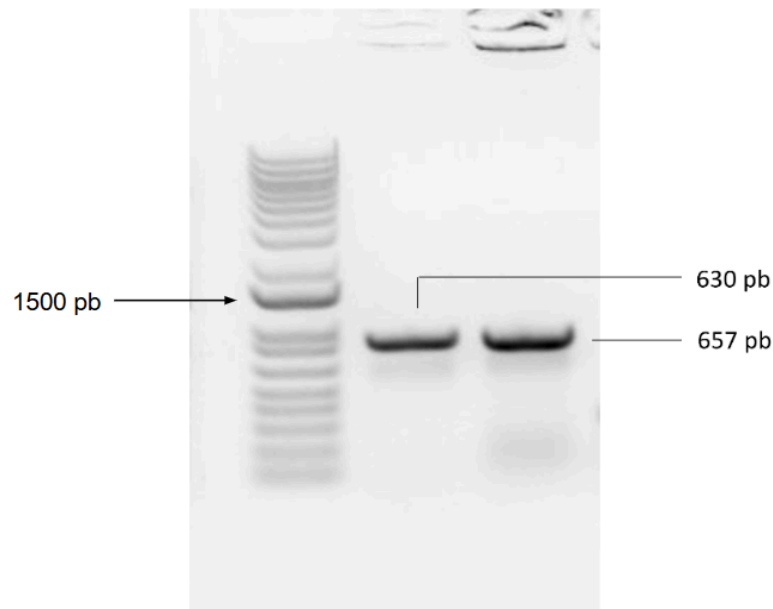
Fonte: autoria própria.

5.4. Proteínas recombinantes e anticorpos policlonais

Bactérias *E. coli* BL21-Star foram transformadas com o plasmídeo pET-TEV28a contendo o inserto (gene RPRC010099 ou RPRC015421) e induzidas por IPTG para a expressão

das proteínas recombinantes RPRC010099 (24,7 kDa) e RPRC015421 (23 kDa). A Figura 21 mostra o resultado de uma eletroforese em gel de agarose do produto de PCR das colônias de bactérias transformadas. É possível observar as bandas de tamanhos equivalentes aos genes de interesse, mostrando que a transformação bacteriana foi bem sucedida.

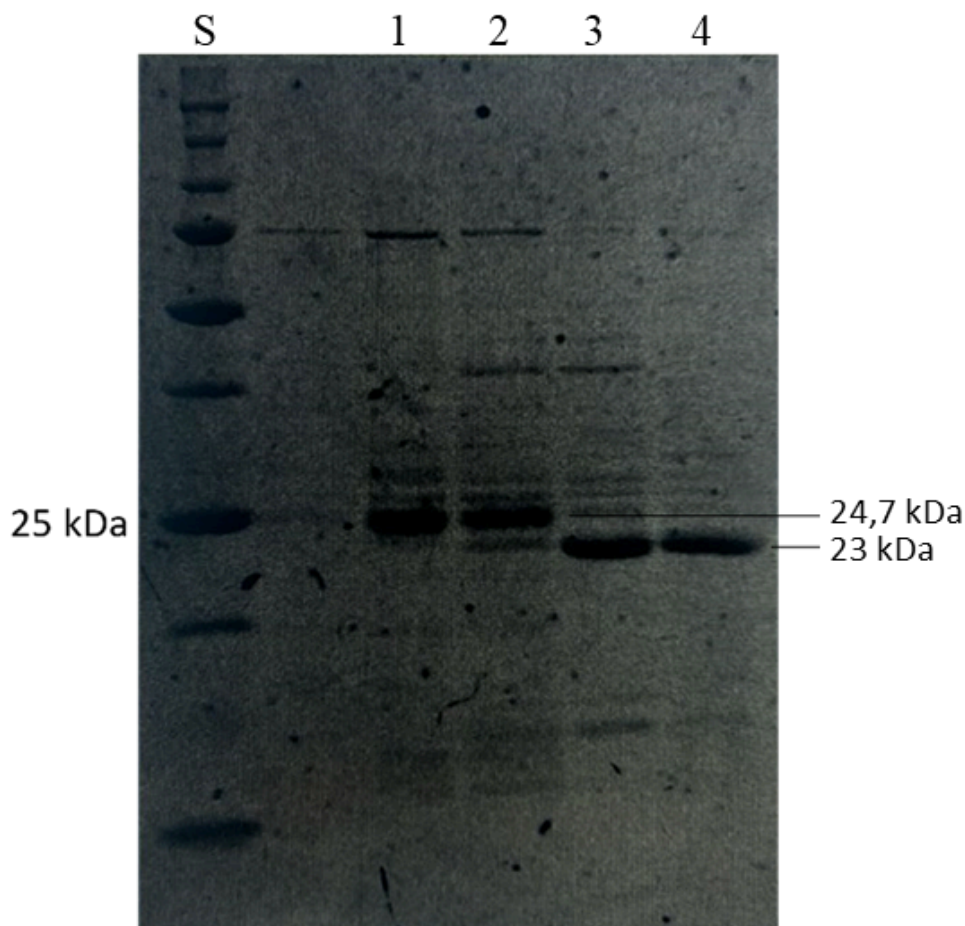
Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto da PCR de colônia das bactérias transformadas com o plasmídeo pET-TEV28a/inserto. A banda de 630 pb corresponde ao gene de RPRC010099 e a banda de 657 pb corresponde ao gene de RPRC015421. Foi utilizado o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder da ThermoFisher. Gel corado com brometo de etídio (EtBr) e revelado sob luz UV.



Fonte: autoria própria.

Após a expressão gênica em larga escala, estimulada pela adição de IPTG, o extrato total das proteínas produzidas foi purificado por cromatografia de afinidade por íons metálicos, utilizando-se uma coluna de níquel. Uma eletroforese em gel SDS-PAGE foi realizada com o produto purificado para observação das bandas correspondentes ao peso molecular das proteínas recombinantes RPRC010099 (24,7 kDa) e RPRC015421 (23 kDa) (Figura 22). Os resultados mostram que as proteínas recombinantes foram produzidas de forma satisfatória.

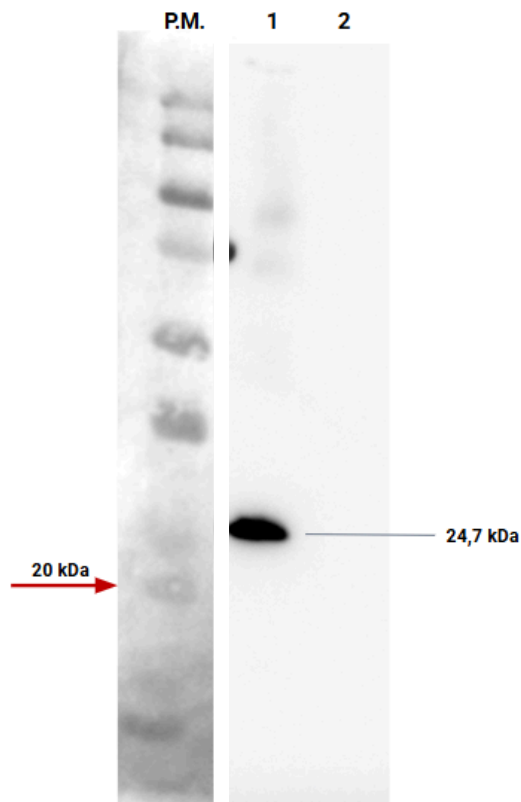
Figura 22 – Proteínas recombinantes purificadas por cromatografia por afinidade. S – padrão de peso molecular; 1 e 2 – RPRC010099; 3 e 4 – RPRC015421. Foi utilizado o padrão de peso molecular BIO-RAD: Precision Plus Protein™ Unstained Standards #161-0363. A imagem do gel foi revelada no ImageQuant LAS 4000.



Fonte: autoria própria.

Adicionalmente, foi realizado um ensaio de Western blotting com anticorpo anti-histidina (Figura 23). Foi possível observar a banda correspondente à apolipoproteína RPRC010099 (24,7 kDa). Não foi observado, no entanto, a banda referente à apolipoproteína RPRC015421. É possível que a proteína tenha perdido a cauda de histidina ou ainda que esta esteja internalizada na estrutura de β -barril da apolipoproteína, impossibilitando sua detecção pelo anticorpo anti-histidina. Apesar disso, a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) realizada na etapa anterior (Figura 22) confirma que ambas as apolipoproteínas recombinantes foram sintetizadas de forma satisfatória.

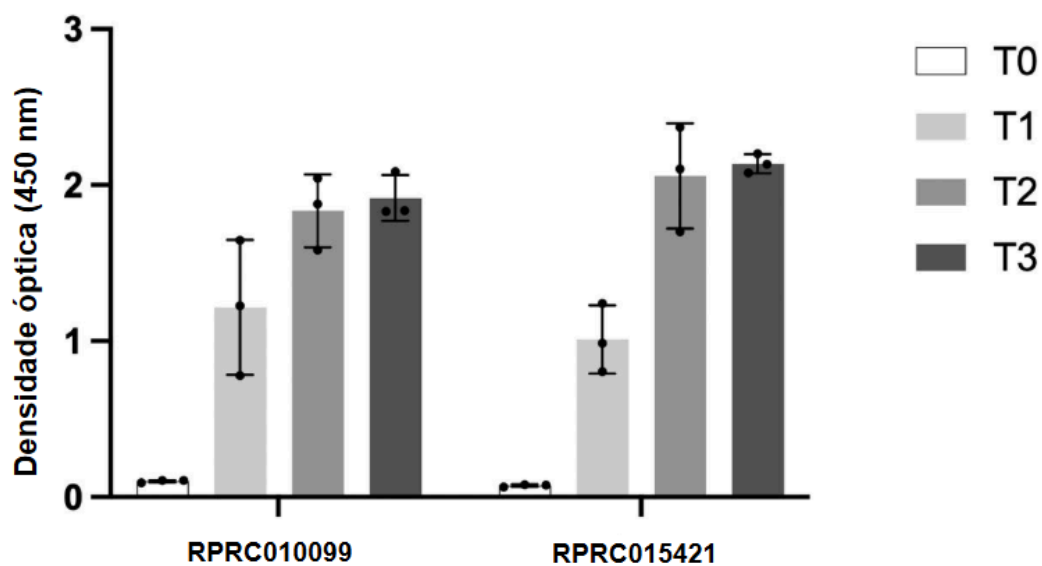
Figura 23 – Western blotting das apolipoproteínas recombinantes purificadas. Utilizou-se o anticorpo anti-Histidina para detecção das apolipoproteínas. P.M. - padrão molecular Kaleidoscope Bio-Rad 10-250 kDa; 1 - apolipoproteína recombinante RPRC010099; 2 - apolipoproteína recombinante RPRC015421



Fonte: autoria própria.

As proteínas recombinantes sintetizadas foram utilizadas nos ensaios de transferência via cópula (item 4.9.). Para isso, camundongos foram imunizados com as proteínas recombinantes para a produção de anticorpos policlonais anti-apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421. A soroconversão foi avaliada a partir de um ensaio de ELISA com o soro dos camundongos antes da imunização (T0), após a primeira dose de imunizante (T1), após a segunda dose (T2) e após a terceira dose (T3). Os camundongos apresentaram soroconversão a partir da segunda dose de imunização com as apolipoproteínas recombinantes, conforme demonstrado na Figura 24. Em T3, a densidade óptica das amostras de soro dos camundongos imunizados com RPRC010099 recombinante foi de 1,92 (\pm 0,15). Já a densidade óptica observada nas amostras de soro dos camundongos imunizados com RPRC015421 recombinante foi de 2,14 (\pm 0,06).

Figura 24. Soroconversão dos camundongos imunizados com as apolipoproteínas recombinantes RPRC010099 e RPRC015421. Ensaio de ELISA para detecção dos anticorpos policlonais no soro de camundongos imunizados com a proteína recombinante. T0 – antes da imunização; T1 – após primeira dose; T2 – após segunda dose; T3 – após terceira dose.



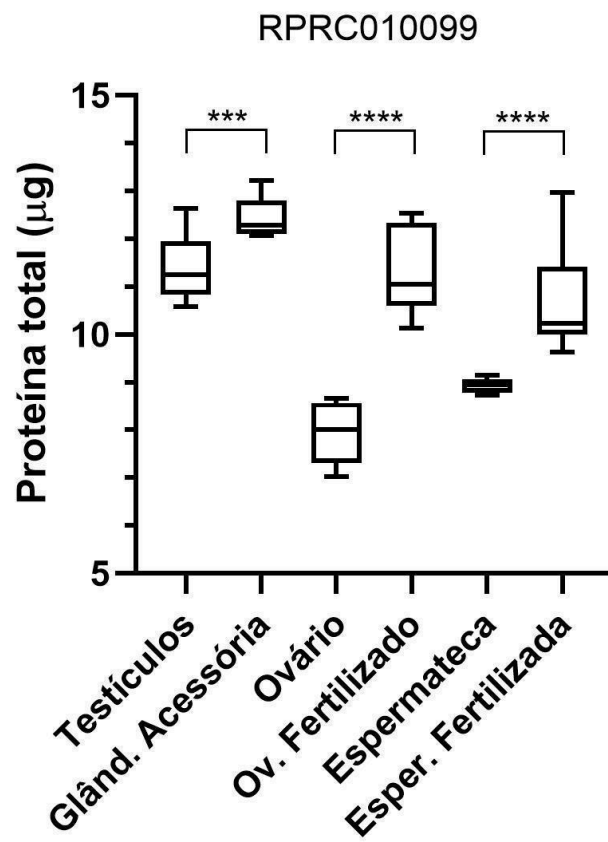
Fonte: autoria própria.

5.5. Transferência via cópula

Ensaio imunoenzimático (ELISA), realizados com o soro dos animais imunizados com as proteínas recombinantes e extratos de órgãos reprodutivos de fêmeas de *Rhodnius prolixus*, foram realizados para avaliação da transferência de apolipoproteínas do macho para fêmea via cópula.

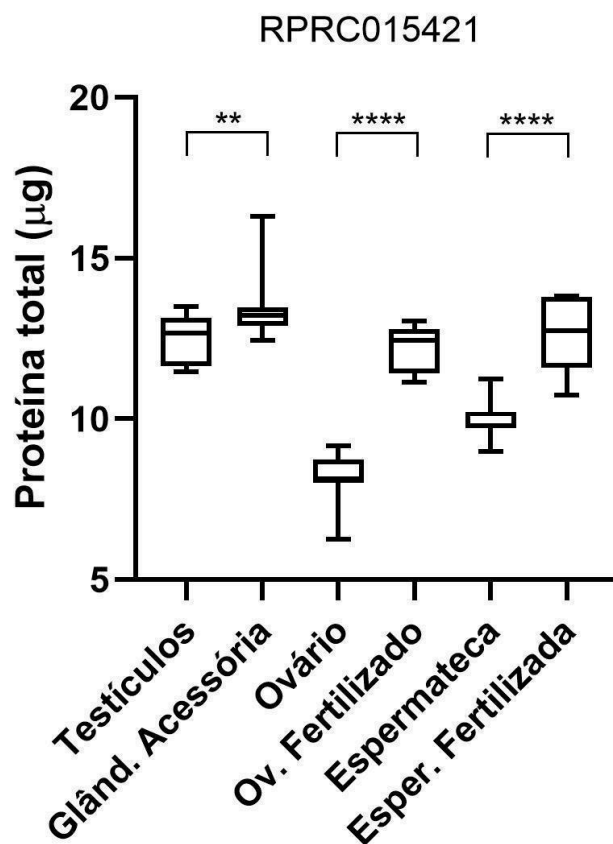
Os resultados dos ensaios de ELISA revelaram níveis mais elevados das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 em fêmeas acasaladas, em comparação com fêmeas virgens. Esses resultados indicam a transferência de apolipoproteínas endógenas dos machos para as fêmeas durante a cópula (Figuras 25 e 26). Nos insetos machos, foi detectado 11,37 ug (\pm 0,69) de RPRC010099 nos testículos e 12,45 ug (\pm 0,41) nas glândulas acessórias. Já nas fêmeas, os ovários virgens continham 7,97 ug (\pm 0,64) da apolipoproteína, enquanto os ovários fertilizados continham 11,39 ug (\pm 0,94). Nas espermatecas das fêmeas virgens foi detectado 8,94 ug (\pm 0,14) de RPRC010099 e nas espermatecas fertilizadas, 10,77 ug (\pm 1,06). Em relação à apolipoproteína RPRC015421, foi detectado 12,44 ug (\pm 0,80) nos testículos e 13,46 ug (\pm 1,12) nas glândulas acessórias. Já nas fêmeas, os ovários virgens continham 8,17 ug (\pm 0,83) da apolipoproteína, enquanto os ovários fertilizados continham 12,11 ug (\pm 0,75). Nas espermatecas das fêmeas virgens foi detectado 9,95 ug (\pm 0,63) de RPRC015421 e nas espermatecas fertilizadas, 12,62 ug (\pm 1,13).

Figura 25 – Transferência da apolipoproteína RPRC010099 via cópula. Ensaio de ELISA para detecção das proteínas RPRC010099 e RPRC015421 endógenas nos órgãos reprodutivos de *R. prolixus*. Testículos, Glândulas acessórias (Glând. Acessória), Ovário, Ovário fertilizado (Ov. Fertilizado), Espermateca e Espermateca fertilizada (Esper. Fertilizada). ** $p < 0.005$; **** $p < 0.00005$



Fonte: autoria própria.

Figura 26 – Transferência da apolipoproteína RPRC015421 via cópula. Ensaio de ELISA para detecção das proteínas RPRC010099 e RPRC015421 endógenas nos órgãos reprodutivos de *R. prolixus*. Testículos, Glândulas acessórias (Glând. Acessória), Ovário, Ovário fertilizado (Ov. Fertilizado), Espermateca e Espermateca fertilizada (Esper. Fertilizada). ** $p < 0.005$; **** $p < 0.00005$.



Fonte: autoria própria.

6. DISCUSSÃO

A espécie *Rhodnius prolixus* é amplamente utilizada como modelo para estudos de fisiologia de insetos hematóficos desde meados do século XX (WIGGLESWORTH, 1976). E isto não ocorre por acaso. Diferente da maioria dos grupos de insetos hematófagos de importância para saúde pública – como os Culicídeos e Flebotomíneos –, os triatomíneos são hematófagos em todas as fases de vida pós-embriônicas, tanto as fêmeas quanto os machos. Além disso, os triatomíneos são de fácil criação em laboratório, sobretudo a espécie *Rhodnius prolixus*, que possui um ciclo de vida curto, é pouco seletiva quanto à fonte alimentar e se reproduz bem em ambiente controlado. Outros fatores que tornam esta espécie um bom modelo de estudo são a sua robustez e resistência – que facilitam a manipulação física – e a existência de genoma e transcriptoma bem consolidados nos bancos de dados genéticos (NUNES-DA-FONSECA *et al.*, 2017).

O transcriptoma realizado por Ribeiro e colaboradores (2014) foi o ponto de partida para nossas investigações acerca das apolipoproteínas expressas no sistema reprodutor de *R. prolixus*. No referido transcriptoma, os autores se debruçaram sobre o sequenciamento de diversos tecidos do inseto. Dos transcritos montados, muitos foram identificados como proteínas da família das lipocalinas, encontradas amplamente distribuídas em todos os tecidos testados. Das lipocalinas encontradas, as apolipoproteínas se mostraram as mais intrigantes, em especial a RPRC010099 e a RPRC015421 por serem expressas em testículos de *R. prolixus* machos, mas não nos ovários das fêmeas (SANTOS, 2021). Esta foi a primeira vez que apolipoproteínas foram identificadas em *Rhodnius prolixus* (SANTOS *et al.*, 2022).

Dentre as apolipoproteínas mais conhecidas em metazoários, destaca-se a apolipoproteína D (ApoD), tradicionalmente estudada em vertebrados, mas que apresenta homólogos bem estabelecidos em insetos. Nesses organismos, os genes do tipo ApoD expandiram-se e diversificaram-se, dando origem a vários parálogos que possuem diferentes padrões de expressão e, possivelmente, funções especializadas. Estudos comparativos revelaram que, em Lepidoptera, a família ApoD-like passou por processos de duplicação gênica e divergência funcional, com alguns parálogos apresentando sinais de seleção positiva em regiões importantes da estrutura da proteína. Esse fenômeno tem sido interpretado como uma adaptação a demandas fisiológicas específicas, como o metabolismo lipídico durante o desenvolvimento e a metamorfose (ZHOU *et al.*, 2020).

Estudos mais recentes acerca do papel das apolipoproteínas no desenvolvimento das asas de Lepidoptera demonstraram que duplicações recentes de ApoD estão relacionadas à plasticidade metabólica desse tecido. Alterações funcionais em diferentes parálogos resultaram em modificações no crescimento e na morfologia das asas, sugerindo que os ApoD-like desempenham funções importantes no suprimento de lipídios e na regulação metabólica durante a formação das asas dos insetos adultos (JIA *et al.*, 2024). Este trabalho mostra que as apolipoproteínas influenciam nos caracteres fenotípicos que dependem intensamente do metabolismo lipídico.

Em *Acyrtosiphon pisum*, o silenciamento de um gene ApoD-like reduziu significativamente os níveis de hidrocarbonetos cuticulares internos e epicuticulares, afetando a impermeabilização da cutícula e a tolerância à dessecação. Além disso, os indivíduos tratados apresentaram menor fecundidade, indicando que as proteínas ApoD-like contribuem para a homeostase lipídica relacionada à reprodução (QIAO *et al.*, 2020). Esse achado associa diretamente a atividade das apolipoproteínas ao sucesso adaptativo de insetos que dependem da integridade cuticular para enfrentar condições ambientais adversas. Além disso, o estudo indica a importância dessa classe de proteínas para o sucesso reprodutivo do inseto.

Outros estudos demonstram que a apolipoproteína D (ApoD) e seus homólogos desempenham papéis multifuncionais em insetos, envolvendo metabolismo lipídico, resposta ao estresse oxidativo, regulação da longevidade, reprodução e interação com patógenos. Em *Bombyx mori*, Chen *et al.* (2016) caracterizaram o gene ApoD, identificando sua sequência de 174 aminoácidos com domínio lipocalina (PF08212) e analisando sua expressão em diferentes tecidos. O estudo mostrou que a expressão de ApoD aumenta significativamente sob estresse oxidativo e desafio bacteriano, sugerindo um papel na defesa e na manutenção da homeostase celular.

Em *Drosophila melanogaster*, os homólogos de ApoD GLaz (Glial Lazarillo) e NLaz (Neural Lazarillo) regulam a longevidade e a resistência ao estresse de maneira dependente do sexo. NLaz afeta a longevidade de ambos os sexos, enquanto GLaz reduz significativamente a longevidade apenas em machos. Ambos influenciam o metabolismo lipídico, a resistência à fome, a atividade locomotora, a fecundidade e o comportamento de cortejo (RUIZ *et al.*, 2011). Em *Nilaparvata lugens*, LU *et al.* (2023) identificaram 10 genes ApoD-like com expressão diferencial relacionada ao desenvolvimento, reprodução e estresse. Foram encontrados genes

essenciais para a sobrevivência, outros com influência na resistência ao estresse, enquanto aqueles expressos nos testículos foram implicados na reprodução. Esses estudos mostram que os genes homólogos à ApoD em insetos são altamente diversificados e desempenham funções adaptativas importantes na fisiologia, imunidade inata, resistência ao estresse e sucesso reprodutivo, com papéis específicos dependendo do organismo, do tecido e do contexto ambiental.

Em um trabalho realizado em 2001, Urade e Eguchi evidenciaram a participação de lipocalinas na biossíntese de prostaglandinas, moléculas conhecidas pela participação em diversos eventos fisiológicos, incluindo os relacionados à reprodução. Neste estudo foi observado uma redução na síntese de prostaglandinas em camundongos *knockout* para o gene da lipocalina estudada. Ao mesmo tempo, camundongos transgênicos que superexpressam o gene da lipocalina apresentaram um aumento na síntese de prostaglandinas (URADE & EGUCHI, 2001).

Em insetos, trabalhos anteriores já haviam mostrado a importância de prostaglandinas – como a prostaglandina E2 (PGE2) – para a reprodução de insetos. De acordo com Loher e colaboradores (1981), a síntese de prostaglandinas estava relacionada ao trato reprodutivo de machos e de fêmeas acasaladas, mas não da fêmea virgem. Os autores propuseram a existência de uma substância nos testículos dos insetos machos que, durante a cópula, era transferida para as fêmeas via espermatóforo. Nas fêmeas, essa substância seria responsável por converter o ácido araquidônico (AA) em PGE2, resultando num maior estímulo à oviposição. Brener e Bernasconi evidenciaram a presença de uma maior quantidade de ácido araquidônico e de enzimas conversoras de AA em PGE2 nos testículos e espermatóforos de machos de *Triatoma infestans*. Já nas fêmeas, a síntese de PGE2 só foi identificada após o acasalamento. Estes resultados mostraram que os machos podem transferir para as fêmeas não apenas o ácido araquidônico, mas também o sistema enzimático para síntese de PGE2 a partir de precursores endógenos como o próprio AA (BRENER & BERNASCONI, 1989).

Até o momento, no entanto, não existem relatos na literatura que relacionem de forma direta o papel de apolipoproteínas da família das lipocalinas na fisiologia reprodutiva de insetos. Ao mesmo tempo, é sabido que as prostaglandinas e outros eicosanoides e seus precursores são moléculas instáveis, o que sugere a existência de possíveis moléculas transportadoras. Por estas razões, buscamos preencher com este trabalho algumas lacunas de conhecimento, discutindo, a partir dos resultados encontrados, possíveis funções das apolipoproteínas expressas no sistema

reprodutor masculino de *Rhodnius prolixus* bem com a participação dessas proteínas à via dos eicosanoides.

6.1. Análises de bioinformática das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421

As análises genômicas dos dois genes estudados, RPRC010099 e RPRC015421, revelaram que eles estão localizados em regiões distantes do genoma de *Rhodnius prolixus* (em *scaffolds* diferentes). Essa distância sugere que os genes não surgiram por uma duplicação gênica recente, uma vez que genes parálogos derivados de eventos de duplicação mais recentes tendem a permanecer próximos uns dos outros (geralmente *in tandem*), antes de processos de rearranjos cromossômicos promoverem a sua separação (BAKER & WOOLLARD, 2022). Além disso, o alinhamento das sequências de nucleotídeos por meio do BLASTn evidenciou baixa similaridade entre elas (50%), reforçando a hipótese de que esses genes não compartilham uma origem evolutiva recente.

Adicionalmente, o alinhamento das sequências de aminoácidos de RPRC010099 e RPRC015421 mostrou uma identidade ainda menor, de apenas 24%. Essa baixa identidade pode indicar a ocorrência de mutações não-sinônimas, em que a alteração de um único nucleotídeo resulta na substituição do aminoácido (CHOUDHURI, 2014). Dessa forma, apesar de RPRC010099 e RPRC015421 manterem os domínios da superfamília das lipocalinas conservados, preservando sua função típica de transportadoras de pequenos ácidos graxos (GRZYB, 2006), as diferenças observadas entre essas duas apolipoproteínas sugerem divergência evolutiva em suas funções.

Mutações pontuais no genoma de insetos já foram identificadas como um importante mecanismo de seleção positiva. A troca de um único aminoácido pode resultar em mudanças significativas na função proteica, conferindo uma vantagem evolutiva para a espécie. Estudos em *Drosophila melanogaster*, por exemplo, associaram substituições pontuais no gene do citocromo P450 (Cyp6a2) a um aumento significativo da metabolização do inseticida DDT (AMICHOT *et al.*, 2004). Substituições pontuais no gene da acetilcolinesterase de *Culex quinquefasciatus* também já foram reportadas como responsáveis por reduzir a afinidade por organofosforados e carbamatos, aumentando a resistência contra estes inseticidas (ZHAO *et al.*, 2014). Mutações pontuais no canais de sódio de *Aedes aegypti* (AL NAGGAR *et al.*, 2025) e de *Triatoma infestans*

(FABRO *et al.*, 2012) também foram identificados como fator de resistência a piretroides nestes insetos hematófagos.

Em relação às lipocalinas de *Rhodnius prolixus*, a baixa identidade entre as sequências gênicas já havia sido apontada anteriormente (SANTOS, 2022). No caso das apolipoproteínas, os resultados obtidos no presente trabalho, os quais discutiremos a seguir, indicam que RPRC010099 e RPRC015421 se comportam de formas distintas no organismo do inseto. É possível que mutações pontuais nas sequências dessas apolipoproteínas tenham sido suficientes para imputar funções distintas a cada uma delas. Por isso, acreditamos que as apolipoproteínas estudadas possuem singularidades funcionais, podendo não desempenhar papéis redundantes na fisiologia reprodutiva de *R. prolixus*. Estudos em *Drosophila*, por exemplo, já demonstraram que diversas proteínas do fluido seminal exercem funções complementares, e não idênticas. Tais proteínas apresentam algum grau de especialização, mas atuam de forma sinérgica em diferentes etapas da fisiologia reprodutiva do inseto. Estas proteínas interagem entre si, estabilizando umas às outras ou mesmo contribuindo para a sua ativação (FINDLAY *et al.*, 2008).

Por fim, o alinhamento das sequências de nucleotídeos de RPRC010099 e RPRC015421 nos permitiu identificar que os iniciadores desenhados para os experimentos de biologia molecular são específicos para cada uma das apolipoproteínas, o que reduz a possibilidade de reação cruzada. Outro aspecto importante observado refere-se a sequência dos dsRNAs desenhados. A posição distinta das sequências do dsRPRC010099 e dsRPRC015421, juntamente com a baixa identidade de nucleotídeos, sugere que não houve silenciamento cruzado nos experimentos de RNAi.

A partir da modelagem estrutural de RPRC010099 e RPRC015421, foi possível construir a estrutura tridimensional dessas apolipoproteínas e identificar, como já era esperado, a presença da estrutura em β -barril, típica da família das lipocalinas. Isso corrobora com os resultados de identificação de domínios conservados. A partir do acoplamento molecular (*docking* molecular), foi possível observar que o complexo proteína-ligante formado entre as apolipoproteínas e alguns dos eicosanoides testados é quimicamente viável, indicando que tal ligação pode ocorrer no meio fisiológico. Observamos que a apolipoproteína RPRC010099 apresentou maior afinidade de interação à prostaglandina E2 (PGE2). Já a apolipoproteína RPRC015421 mostrou maior afinidade de ligação ao ácido eicosapentaenoico, um precursor de eicosanoides pouco estudado.

Há evidências claras sobre o papel das prostaglandinas (incluindo a PGE2) na fisiologia reprodutiva de insetos. Como já abordado anteriormente, a PGE2 se mostrou importante para a formação do córion durante os estágios finais da ovogênese em *Aedes albopictus*. Os estudos mostraram que a PGE2 é necessária para a transferência de nutrientes das células tróficas para o oócito, etapa essencial da vitelogênese (CHOI *et al.*, 2022). Em *Spodoptera exigua*, o silenciamento gênico da enzima PGE2-sintase compromete a postura de ovos, sendo os efeitos restaurados pela administração de PGE2 (AHMED *et al.*, 2018).

Os estudos clássicos de Loher (1981) evidenciaram a transferência dos fatores de biossíntese da PGE2 do macho para a fêmea de *Teleogryllus commodus*, bem como o efeito positivo da transferência no aumento da oviposição. Brenner e Bernasconi (1989) evidenciaram fenômeno semelhante em *Triatoma infestans*, mostrando que a PGE2 é um fator importante para a produção de ovos também nos triatomíneos. O ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), por outro lado, é um ácido graxo poli-insaturado da série ômega-3 cuja função em insetos ainda é pouco compreendida. O que se sabe é que, assim como o ácido araquidônico (AA) e o ácido dihomo- γ -linoleico (DGLA), o EPA também é um precursor de prostaglandinas, leucotrienos e outros eicosanoides (STANLEY, 2006). Embora a maioria dos estudos sobre eicosanoides esteja centrada no precursor ácido araquidônico e seus derivados, há evidências de que o EPA seja metabolizado em derivados biologicamente ativos, como prostaglandinas da série 3, leucotrienos da série 5 e resolvinas da série E, moléculas conhecidas por participarem de processos relacionados à reprodução e à imunidade em organismos animais (STANLEY & KIM, 2014). Fica claro, portanto, que EPA atua na via dos eicosanoides, mas seu papel na fisiologia de insetos ainda é desconhecido.

6.2. A expressão de RPRC010099 e RPRC015421 em machos e fêmeas de *R. prolixus*

Os resultados do transcriptoma realizado por Ribeiro e colaboradores (2014) indicam, a princípio, que RPRC010099 e RPRC015421 são apolipoproteínas altamente expressas nos testículos do inseto macho, mas ausentes nos ovários das fêmeas de *R. prolixus*. No entanto, apesar do transcriptoma ter gerado uma enorme quantidade de dados, alguns problemas foram identificados quanto ao método de sequenciamento e de montagem de sequências escolhidos naquela época.

Atualmente, sabe-se que o método de sequenciamento utilizado naquele trabalho – o pirosequenciamento por sequenciadores Roche 454 – produz uma grande quantidade de erros em regiões de homopolímeros de DNA, o que dificulta a montagem de genomas e transcriptomas (SCHLEBUSCH & ILLING, 2012). Além disso, os pirosequenciadores não produziam sequências em volumes suficientes para uma posterior análise de expressão diferencial de genes. Em relação ao método de montagem, os autores utilizaram um algoritmo criado para montagem de transcriptomas sequenciados pelo método de Sanger (RIBEIRO *et al.*, 2014), que, diferente dos sequenciadores Roche 454, produzem leituras longas (maiores de 700 nucleotídeos) e de alta qualidade. Além disso, o sequenciamento realizado em 2014 mostrou-se deficiente em identificar e processar a ocorrência de *splicing* alternativo. Nesse cenário, apesar de o transcriptoma fornecer informações que indicam se um gene era mais ou menos expresso em um determinado tecido, não era possível analisar isto de forma objetiva e quantitativa, com análises estatísticas de confiança. Isso limitou a análise dos dados do transcriptoma à detecção ou não detecção de um transcrito em um determinado tecido. Por essa razão, uma das primeiras perguntas que precisavam ser respondidas no presente trabalho era se as apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 eram de fato expressas de forma exclusiva no sistema reprodutivo do inseto macho e quantificar essa expressão.

Por essa razão, realizamos os ensaios de qPCR para quantificar a expressão basal dos genes RPRC010099 e RPRC015421 nos órgãos reprodutivos de machos e de fêmeas de *R. prolixus*. Foram testados insetos virgens e pós-cópula para identificar se a expressão gênica se alterava com o estímulo do acasalamento. Os resultados obtidos mostraram que ambas as apolipoproteínas são muito mais expressas no sistema reprodutor dos machos que nas fêmeas. A RPRC010099 é igualmente expressa nos testículos de machos virgens e acasalados e também apresenta expressão, em menor grau, nas glândulas acessórias. Já a RPRC015421 é altamente expressa em testículos virgens, menos expressa em testículos acasalados e quase não é expressa nas glândulas acessórias. Essas diferenças de expressão gênica, juntamente com os resultados das análises de bioinformática, nos levam a acreditar que RPRC010099 e RPRC015421 desempenham funções diferentes na fisiologia reprodutiva dos machos de *R. prolixus*.

Os testículos têm como principal função a produção e maturação dos espermatozoides, processo que ocorre continuamente ao longo da vida adulta do inseto. A espermatogênese ocorre neste órgão, que é composto por sete folículos testiculares em cada lado. Cada folículo contém

cistos, onde as células germinativas se desenvolvem de forma sincronizada, sustentadas por células somáticas que fornecem suporte e nutrientes (LANGE *et al.*, 2023). O processo inicia-se com as espermatogônias, localizadas na região apical do folículo. Estas células-tronco germinativas se dividem por mitose sucessiva, expandindo a população celular. A seguir, formam-se os espermatócitos primários, que sofrem a primeira divisão meiótica, caracterizada por recombinação e segregação cromossômica. Os espermatócitos secundários resultantes passam rapidamente pela meiose II, originando várias espermátides haploides. Durante a espermiogênese, as espermátides sofrem intensas modificações morfológicas. Ao final, formam-se espermatozoides maduros, alongados e flagelados, que são liberados dos cistos e armazenados nas vesículas seminais até a cópula (CHAPMAN, 2013).

É interessante observar que os testículos de *R. prolixus* também produzem moléculas bioativas (como o peptídeo Rhodtestolin, de ação cardioinibitória), o que demonstra que estes órgãos podem secretar compostos com efeitos sistêmicos além da reprodução (CHIANG *et al.*, 2013). Isso indica que, apesar de ter como principal função a produção e maturação dos espermatozoides, os testículos podem produzir substâncias que não estejam diretamente relacionadas à espermatogênese, mas que sejam importantes para o sucesso reprodutivo do inseto. Embora os espermatozoides sejam formados nos testículos, sua funcionalidade plena depende da secreção das glândulas acessórias. As substâncias presentes nessa secreção fornecem matriz protetora e nutritiva, permitem a formação do espermatóforo e modulam a fisiologia reprodutiva da fêmea após a cópula (LANGE *et al.*, 2023; FREITAS *et al.*, 2010).

De modo geral, as glândulas acessórias masculinas de insetos são estruturas secretoras associadas ao sistema reprodutor, responsáveis pela produção de proteínas e outros componentes bioativos que são transferidos à fêmea durante a cópula. Em *Rhodnius prolixus*, essas glândulas possuem papel essencial na reprodução, uma vez que seus produtos não apenas compõem o fluido seminal, mas também modulam processos fisiológicos e comportamentais nas fêmeas após o acasalamento (GILLOTT, 2003). Estudos mostram que as secreções das glândulas acessórias contêm proteínas de diversas funções, incluindo moléculas de transporte de lipídios, enzimas digestivas e fatores imunomodulatórios. Essas substâncias podem aumentar a longevidade dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino, estimular a utilização de esperma estocado, influenciar a receptividade sexual das fêmeas e favorecer a maturação dos ovos (ÁVILA *et al.*, 2011).

Em triatomíneos, as glândulas acessórias são particularmente importantes porque algumas de suas proteínas são transferidas e detectadas nos ovários e nas espermatecas das fêmeas após a cópula, sugerindo participação direta na fertilização e no desenvolvimento inicial dos ovos (GILLOT, 1996). Estes estudos corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho. Além disso, há evidências de que tais secreções possam contribuir para a competição espermática, aumentando o sucesso reprodutivo do macho copulante em relação a outros machos (GILLOTT, 2003). Por isso, entende-se que as glândulas acessórias masculinas de *R. prolixus* não são apenas estruturas auxiliares, mas componentes centrais do sucesso reprodutivo do inseto.

É de se esperar que proteínas expressas de forma mais homogênea ao longo da fase adulta do inseto macho – seja antes ou após o acasalamento – desempenham funções relevantes em toda etapa da vida sexual do inseto. Por outro lado, proteínas com expressão gênica mais evidente nos primórdios da maturidade sexual podem estar relacionadas a processos fisiológicos que ocorrem mais precocemente. Por isso, os diferentes padrões de expressão gênica das duas apolipoproteínas estudadas pode ser um indicativo de diversidade funcional. A expressão de RPRC010099 tanto em testículos – virgens e acasalados – quanto nas glândulas acessórias, pode indicar que sua função seja mais abrangente. Enquanto isso, RPRC015421 que é altamente expressa em testículos virgens, pouco expressa em testículos acasalados e ainda menos nas glândulas acessórias, pode ter seu papel relacionado aos eventos mais precoces que ocorrem nos testículos.

Ao observarmos os resultados de expressão gênica de RPRC010099 e RPRC015421 nos órgãos reprodutores femininos (ovários e espermatecas), verificamos que as apolipoproteínas também são expressas nas fêmeas – virgens e acasaladas – mais em quantidades muito inferiores à expressão observada nos machos. Esta expressão basal nas fêmeas já era esperada, e níveis tão baixos podem indicar que as apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 endógenas não são relevantes para a fisiologia feminina. Isso reforça nossa hipótese de que o aporte de apolipoproteínas doadas pelos machos é essencial para o papel que essas proteínas desempenham na fisiologia reprodutiva da espécie.

Estudos clássicos em triatomíneos descrevem a presença de um espermatóforo como veículo para o transporte do material reprodutivo masculino (espermatozoides e substâncias acessórias) para as fêmeas. Este espermatóforo teria como função não só a transferência do esperma, mas também a proteção dos gametas e o fornecimento de nutrição acessória (PEREIRA-LOURENÇO et al., 2013). Vale destacar que um estudo mais recente examinou a

morfologias dos genitais masculinos de *R. prolixus* em tecidos vivos e concluiu que a estrutura antes identificada como um espermátóforo propriamente dito seria, na verdade, um canal tubular dentro do edeago, responsável apenas por conduzir o material seminal até a vagina da fêmea (CHIANG, 2020). Seja qual for o grau de encapsulamento, a existência ou não de um espermátóforo, a qualidade do material seminal (quantidade e viabilidade dos gametas, bem como a composição do fluido seminal como um todo) é fator determinante para o sucesso reprodutivo da espécie.

A presença de prostaglandinas no fluido seminal, bem como sua transferência via acasalamento e importância para os processos reprodutivos, já foi evidenciada anteriormente. Stanley (2006) demonstrou que as prostaglandinas atuam na diferenciação e maturação das células germinativas femininas e masculinas de insetos. Além disso, há indícios de que prostaglandinas interagem com hormônios juvenis e ecdisteroides, afetando a produção e liberação de gametas (STANLEY & KIM, 2011). Se o transporte de prostaglandinas de fato ocorrer com o auxílio de apolipoproteínas, é esperado que a redução de proteínas transportadoras produza um efeito fisiológico similar à redução das próprias prostaglandinas. Por essa razão, realizamos o silenciamento gênico de RPRC010099 e RPRC015421 para avaliar o efeito na fertilidade dos insetos. Como mostrado nos resultados já apresentados, reduzir a expressão de apolipoproteínas via silenciamento gênico comprometeu a oviposição. A seguir discutiremos esses achados.

6.3. Os efeitos do silenciamento gênico de RPRC010099 e RPRC015421 na fertilidade de *R. prolixus*

A partir da produção de insetos machos *knockdown* para os genes RPRC010099 e RPRC015421 buscamos compreender o papel dessas apolipoproteínas na fisiologia reprodutiva de *R. prolixus*. Além do desafio de silenciar de forma eficiente genes de função desconhecida, nosso objetivo era ainda mais ambicioso: observar o fenótipo do silenciamento não nos insetos silenciados, e sim nas fêmeas que acasalam com estes insetos.

A técnica de RNA interferente (RNAi), por si só, apresenta diversas limitações. Apesar de ser amplamente utilizada em estudos de genômica funcional, trabalhos anteriores já apontaram os desafios para a sua aplicação. Fatores relacionados à estabilidade ou à entrega do dsRNA, além de falhas no processamento dessas moléculas (seja pela saturação do sistema de RNAi ou pela

baixa qualidade do dsRNA desenhado), podem dificultar o estudo de alguns genes. Ademais, a presença de genes redundantes ou cujo mRNA é rapidamente reciclado pode dificultar a observação do fenótipo nos insetos modificados (PALLI, 2023; JAIN, et al. 2020). No presente trabalho, o primeiro passo foi desenhar sequências de iniciadores para a produção de dsRNAs específicos para cada uma das apolipoproteínas estudadas. O objetivo era estudar a função gênica de cada uma das apolipoproteínas de forma individualizada. A partir dos resultados do alinhamento das sequências gênicas, apresentados anteriormente, confirmamos que as moléculas de dsRNA produzidas eram específicas para cada apolipoproteína alvo. No entanto, é importante ressaltar que, de acordo com o transcriptoma de *R. prolixus*, existem diversas apolipoproteínas expressas em todo o organismo do inseto, de modo que não é possível garantir que apenas a apolipoproteína de interesse for silenciada dentre todas aquelas que são expressas pelo inseto e que não foram abordadas neste trabalho.

A eficiência do silenciamento gênico a partir da técnica de RNAi aqui realizado foi avaliada por meio de ensaios de qPCR. Os resultados mostraram que o silenciamento do gene RPRC010099 foi mais eficiente logo após a entrega do dsRNA. Nos insetos avaliados após o acasalamento, houve um aumento da expressão do gene em relação ao observado 72h após a microinjeção de dsRNA, mostrando que o efeito do silenciamento havia sido reduzido com o tempo. Isso mostra que os efeitos do silenciamento por RNAi foram, até certo ponto, revertidos pelo inseto. É possível que tenha ocorrido uma superexpressão tardia do gene RPRC010099, como uma espécie de efeito rebote, ou ainda que houve uma sobrecarga na maquinaria do RNAi.

Já o silenciamento do gene RPRC015421 apresentou um comportamento distinto. Após as primeiras 72h de entrega do dsRNA, houve uma queda na expressão gênica. Com o passar do tempo, essa queda se acentuou, de modo que os insetos avaliados após o acasalamento apresentaram uma menor expressão de RPRC015421. Isso sugere que, para este gene, os efeitos do silenciamento pela técnica de RNAi podem ser mais tardios ou podem perdurar por mais tempo.

Embora o RNAi seja uma ferramenta amplamente utilizada para estudos funcionais em insetos, sua eficiência pode variar em função do gene, do tecido e da estabilidade do silenciamento. Uma revisão publicada por Zhu e Palli (2010) analisou os desafios encontrados em estudos de silenciamento de insetos por RNAi. Observou-se que os principais mecanismos que afetam a eficiência do RNAi nos insetos incluem a degradação do dsRNA, dificuldades na

captação celular e no transporte intracelular do dsRNA, deficiências no processamento do dsRNA em siRNA, diferenças na formação do complexo RISC e diversos fatores fisiológicos específicos de cada modelo estudado (ZHU & PALLI, 2010).

Apesar da variação na expressão gênica nos machos de cada um dos grupos avaliados, o fenótipo do silenciamento foi observado de forma indireta nas fêmeas fecundadas pelos machos silenciados. Os resultados de oviposição mostram que as fêmeas acasaladas com machos *knockdown* para RPRC010099 e RPRC015421 produzem consideravelmente menos ovos em relação ao grupo controle. Além de corroborar com o consenso de que a fisiologia reprodutiva masculina interfere diretamente a fisiologia reprodutiva feminina, tais resultados mostram que as apolipoproteínas estudadas possuem um papel na oviposição e, portanto, na fertilidade de *Rhodnius prolixus*. Ao analisar a prole dos insetos experimentais, verificamos que não houve diferença estatística na taxa de eclosão dos ovos produzidos pelos grupos silenciados (dsRPRC010099 e dsRPRC015421) em relação ao grupo controle (dsKER). Em todos os grupos, a taxa de eclosão dos ovos foi superior a 90%. Com isso, é possível afirmar que as apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 influenciam na quantidade de ovos depositados pelas fêmeas, mas não na viabilidade desses ovos. Ou seja, provavelmente ambas as apolipoproteínas possuem importância na indução de oviposição, mas não na espermatogênese, o que segue em acordo com nossa hipótese de que estas proteínas são transportadoras de eicosanóides.

Para estudos futuros, entendemos que a utilização de ferramentas mais avançadas, como a técnica de edição gênica baseada em CRISPR-Cas9, é uma alternativa. Esta técnica de CRISPR-Cas9 permite edições no DNA genômico, possibilitando tanto o *knockout* de genes de interesse quanto a inserção de mutações direcionadas (HAMMOND et al., 2016). Diferentemente do RNAi, que atua na degradação de mRNAs, o CRISPR-Cas9 viabiliza análises de perda ou ganho de função mais estáveis, ampliando o potencial para estudos de biologia reprodutiva, fisiologia e interação vetor-parasito em hemípteros. Assim, sua aplicação em *R. prolixus* pode representar um avanço metodológico significativo em trabalhos futuros.

6.4. A transferência das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 via cópula

Inicialmente, as proteínas recombinantes RPRC010099 e RPRC015421 foram utilizadas para imunizar camundongos da linhagem Balb-c e, com isso, produzir anticorpos policlonais para os ensaios de ELISA. A resposta imune resultante deste processo de imunização é responsável por gerar um conjunto heterogêneo de anticorpos capazes de reconhecer múltiplos epítomos da proteína. Especialmente nos casos onde proteínas recombinantes são utilizadas como antígenos, a produção de anticorpos policlonais apresenta vantagens. Por reconhecer múltiplos epítomos, reduz-se o risco de perda de reatividade frente a possíveis erros conformacionais da proteína recombinante, principalmente no caso de proteínas produzidas em sistema procariontes, que podem gerar erros de enovelamento. Por essa razão, os anticorpos policlonais apresentam uma alta sensibilidade na identificação do antígeno em técnicas de ELISA e western blot (ASCOLI, 2018).

O esquema de imunização realizado foi dividido em três doses, com intervalos de 15 dias entre cada desafio, e mostrou-se eficiente para a produção de anticorpos em titulações significativas. Já a partir da segunda dose de imunizante (RPRC010099 ou RPRC015421), houve a soroconversão dos camundongos imunizados. Após a coleta de sangue e obtenção do soro, o material foi utilizado para detecção das apolipoproteínas nos órgãos reprodutivos das fêmeas de *R. prolixus* antes e após o acasalamento. Neste experimento, no qual utilizamos a técnica de ELISA, buscamos observar se as apolipoproteínas endógenos do macho são transferidas para a fêmea durante a cópula.

Os ensaios de ELISA realizados mostraram que, apesar da expressão endógena das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 nas fêmeas virgens e acasaladas ser muito pequena, a quantidade dessas proteínas nos ovários e nas espermatecas aumentam consideravelmente após o acasalamento. Baixos níveis de RNAm não significam necessariamente que pouca proteína é produzida, já que os complexos mecanismos de regulação pós-transcricional podem resultar em aumento da tradução de proteínas mesmo que não haja um aumento na quantidade de mRNAs disponíveis (LAHTVEE, 2017). Ainda assim, observar um aumento de RPRC010099 e RPRC015421 endógenas nas fêmeas fecundadas, mesmo sem aumento da expressão gênica, é um indício de que este incremento de apolipoproteínas é decorrente de uma transferência dos insetos machos. Portanto, o resultado encontrado é uma evidência de que RPRC010099 e RPRC015421 são transferidas do macho para a fêmea via fluido seminal.

O papel exercido pelo fluido seminal masculino no organismo da fêmea é um importante objeto de estudo em fisiologia de insetos. Em 2015, Worthington e colaboradores mostraram que machos de *Gryllus texensis* transferem, via espermátforo, quantidades significativas de prostaglandina E2 (PGE2) e ácido araquidônico (AA) para as fêmeas. Essas moléculas são armazenadas na espermateca e estariam relacionadas à manutenção da viabilidade dos espermatozóides no organismo feminino (WORTHINGTON *et al.*, 2015).

Este mesmo trabalho mostrou ainda que a quantidade de PGE2 recebida do macho se esgota rapidamente na espermateca da fêmea acasalada (cerca de 1 semana após o acasalamento) (WORTHINGTON *et al.*, 2015). A curta meia-vida da PGE2 no organismo feminino reforça que: i) a PGE2 precisa ser continuamente repostada nas fêmeas (seja por uma biossíntese endógena ou por aporte de origem exógena); ii) a natureza química instável da PGE2 pode indicar que essas moléculas dependem de proteínas transportadoras que estabilizam e viabilizam sua atividade no ambiente fisiológico do inseto.

Em fêmeas de triatomíneos, a oogênese se inicia logo após a emergência do adulto e se completa após o primeiro repasto sanguíneo. Sabe-se que após a alimentação, há um aumento na síntese de hormônios ecdisteroides e de prostaglandinas pelas fêmeas, o que estimula o desenvolvimento dos ovócitos no ovário, a vitelogênese e a oviposição (STANLEY & KIM, 2011). De modo geral, as fêmeas tendem a acasalar após o primeiro repasto sanguíneo, quando a oogênese já foi finalizada. Sendo assim, é razoável imaginar que as apolipoproteínas masculinas – e as moléculas que elas transportam – podem não atuar diretamente na gametogênese feminina, que já está completa. Sob essa perspectiva, acreditamos que as apolipoproteínas masculinas, ao transportarem PGE2, atuam coordenando os eventos fisiológicos e comportamentais necessários para a liberação dos ovos (STANLEY, 2006).

Conforme já demonstrado em trabalhos anteriores, a transferência de PGE2 dos machos para as fêmeas de triatomíneos foi responsável pelo aumento da oviposição (BRENNER & BERNASCONI, 1989). Até aqui, mostramos que as apolipoproteínas estudadas possuem afinidade de ligação à PGE2 e precursores como o EPA e evidenciamos que ocorre uma redução na oviposição quando da ausência de níveis normais de apolipoproteínas masculinas. Agora, mostramos que há transferência de RPRC010099 e RPRC015421 dos machos para as espermatecas e ovários das fêmeas durante o acasalamento.

Os ovários dos insetos são os órgãos responsáveis pela produção e maturação dos ovócitos e pelo armazenamento dos recursos nutricionais (vitelo) necessários ao desenvolvimento embrionário. Em triatomíneos, incluindo *Rhodnius prolixus*, o processo de vitelogênese envolve não apenas a produção de vitelogenina no corpo gorduroso, mas também aportes diretos pelo próprio ovário. O vitelo é formado por um complexo de proteínas, lipídios e carboidratos, que são acumulados no interior dos ovócitos e utilizados durante a embriogênese, culminando na formação da ninfa de primeiro instar (Atella *et al.*, 2005).

As espermatecas, por sua vez, são órgãos reprodutores femininos especializados no armazenamento e manutenção dos espermatozoides após a cópula. Em *Rhodnius prolixus*, assim como em outros hemípteros, as espermatecas funcionam como reservatórios onde o esperma transferido pelo macho permanece viável por longos períodos, permitindo a fecundação de diversos lotes de ovos sem a necessidade de acasalamentos repetidos (DAVEY, 1958). As espermatecas também desempenham papel estratégico no controle da liberação gradual dos espermatozoides durante a oviposição, assegurando a fertilização contínua dos ovócitos ao longo da vida adulta da fêmea. As substâncias armazenadas nas espermatecas juntamente com os espermatozoides têm papel relevante nesses processos reprodutivos. (NASCIMENTO, 2019).

Tendo em vista os eventos fisiológicos que ocorrem nos ovários e nas espermatecas dos insetos, observar um aumento de apolipoproteínas nesses órgãos após a copulação é mais um importante indício do papel dessas proteínas para a reprodução. Juntamente com as evidências observadas nos ensaios de silenciamento gênico, os resultados dos experimentos de transferência indicam que RPRC010099 e RPRC015421 são importantes para a produção e liberação dos ovos na espécie *R. prolixus*.

É importante ressaltar que, em ensaios preliminares, identificamos que os anticorpos policlonais produzidos apresentaram reatividade cruzada. Deste modo, é possível que os anticorpos policlonais produzidos tenham identificado de forma indiscriminada tanto a proteína RPRC010099 quanto a proteína RPRC015421. Isto reforça a necessidade de experimentos adicionais para determinar a ocorrência da transferência das apolipoproteínas do macho para a fêmea via cópula.

6.5. As moléculas alvo das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421

Os eicosanoides constituem uma classe de mediadores lipídicos derivados, dentre outros precursores, do ácido araquidônico (AA). Essas substâncias desempenham papéis importantes em processos fisiológicos de insetos, como regulação da imunidade, reprodução, desenvolvimento e homeostase geral, e são conhecidas por sua ação rápida e de curta duração (STANLEY, 2006). O ácido araquidônico (20:4, n-6) encontra-se esterificado em fosfolipídios de membranas celulares e é liberado pela ação da fosfolipase A2 (PLA2), dando início da biossíntese de eicosanoides (STANLEY & KIM, 2014).

Entre os derivados do AA, destaca-se a prostaglandina E2 (PGE2), uma das mais estudadas em insetos. A PGE2 já foi associada a mecanismos imunológicos, como a participação na degranulação de hemócitos e na síntese de peptídeos antimicrobianos (SHRESTHA & KIM, 2010). Também já foi associada à regulação da homeostase intestinal, atuando na interação entre microbiota e hospedeiro (STANLEY & KIM, 2019) e na reprodução, modulando a oviposição e a fecundidade, como já abordado anteriormente.

Em *Aedes aegypti*, vetor da dengue, zika e chikungunya, os eicosanoides têm sido implicados tanto na imunidade quanto na reprodução. A PGE2 foi demonstrada como um sinalizador na ativação de hemócitos e na produção de peptídeos antimicrobianos, reforçando a resposta contra infecções bacterianas (BARLETTA *et al.*, 2020). Além disso, estudos em *Aedes albopictus* mostraram que o bloqueio da via de eicosanoides interfere na deposição de ovos e na viabilidade embrionária, evidenciando seu papel na biologia reprodutiva da espécie (CHOI *et al.*, 2022).

Em *Anopheles gambiae*, eicosanoides mostraram-se moduladores da sobrevivência de *Plasmodium berghei*, desde o estágio de oocisto até a invasão das glândulas salivares. A administração de indometacina, um inibidor da biossíntese de eicosanoides, favorece a infecção dos esporozoítos já liberados dos oocistos. Este efeito é revertido após o tratamento com ácido araquidônico teve o efeito oposto (RAMOS; CUSTÓDIO; SILVEIRA, 2014). Em *Rhodnius prolixus*, a via dos eicosanoides está diretamente associada à imunidade inata. Estudos demonstraram que a inibição da fosfolipase A2 (PLA2) reduz a microagregação dos hemócitos, tornando os insetos mais suscetíveis à infecção por *Trypanosoma rangeli*. Os efeitos foram revertidos após a administração de ácido araquidônico (GARCIA, MACHADO, AZAMBUJA, 2004). Estudos anteriores descrevem a atuação de ácido araquidônico e prostaglandina E2 na

maturação sexual, no desenvolvimento de ovários e testículos, bem como na gametogênese de insetos. Em *Aedes albopictus*, por exemplo, PGE2 atua na formação do córion na ovogênese tardia (ZHANG *et al.*, 2023). Já em *Bombyx mori*, as prostaglandinas participam da vitelogênese e do desenvolvimento dos folículos ovarianos (Machado *et al.*, 2007).

Em relação à fisiologia reprodutiva masculina, há evidências de que prostaglandinas presentes nos testículos de insetos podem regular a função testicular e a fertilidade (LOHER *et al.*, 1981). Como as gônadas apresentam compartimentos funcionais que promovem a produção de gametas e a síntese hormonal, é possível que os eicosanoides integrem a regulação endócrina que ocorre durante a gametogênese. Já nas fêmeas de insetos, a PGE2 modula a maturação final dos oócitos, além de induzir respostas bioquímicas que preparam o sistema reprodutivo para a oviposição. Ela estimula a contração muscular do trato reprodutivo, facilitando a passagem e expulsão dos ovos. Esse controle da atividade muscular ocorre por meio da interação da PGE2 com receptores específicos acoplados à proteína G (GPCRs) nas células-alvo, que ativam cascatas de sinalização intracelular envolvendo segundos mensageiros como AMP cíclico (cAMP) e cálcio (STANLEY, 2006). Além disso, a PGE2 interage com outras vias hormonais e neuromoduladoras, como os hormônios juvenis e a ecdisona, promovendo a coordenação do processo de oviposição (LOHER, 1981). Estudos experimentais demonstram que a aplicação exógena de PGE2 pode estimular diretamente a oviposição em mosquitos, reforçando seu papel crucial no controle desse processo (CHOI *et al.*, 2022). Portanto, a PGE2 é um componente essencial da rede de sinalização que regula a oviposição em insetos, atuando na preparação fisiológica e na ativação dos mecanismos musculares necessários para a postura dos ovos. Nesse sentido, acreditamos que as apolipoproteínas, ao transportarem PGE2 e/ou seus precursores, seja fundamental na regulação dos eventos que culminam na oviposição.

Nossos resultados indicam que RPRC010099 possui afinidade de ligação à PGE2 enquanto RPR015421 provavelmente se liga ao ácido eicosapentaenoico (EPA). Por isso, sugerimos que estudos futuros sejam realizados para avaliar, experimentalmente, se as apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC05421 de fato se ligam e transportam esses compostos. É importante ressaltar que o uso experimental de eicosanoides, como o ácido araquidônico (AA) e a prostaglandina E2 (PGE2), apresenta dificuldades metodológicas que podem explicar resultados inconclusivos. Estas moléculas são altamente instáveis quimicamente, sobretudo devido à presença de duplas ligações conjugadas e grupos funcionais suscetíveis à oxidação, isomerização

e degradação espontânea. O AA, por exemplo, é rapidamente peroxidado na presença de oxigênio e luz, originando uma ampla gama de produtos secundários que dificultam a interpretação experimental (FUNK, 2001). Da mesma forma, as prostaglandinas, incluindo a PGE₂, possuem meia-vida curta em soluções aquosas e são facilmente metabolizadas por enzimas específicas ou degradadas por instabilidade físico-química. Essa natureza instável exige condições de manipulação altamente controladas, incluindo a utilização de solventes adequados, estocagem em temperaturas muito baixas (−80 °C), proteção da luz e preparo imediato das soluções de trabalho.

Apesar dos desafios, experimentos de ligação direta entre as apolipoproteínas e os eicosanoides serão fundamentais para corroborar os resultados obtidos no presente trabalho. Além disso, investigações futuras serão importantes para descrever os mecanismos de ação das apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421. Infelizmente o presente trabalho não é capaz de preencher esta lacuna do conhecimento, mas acreditamos que nossos achados serão úteis para subsidiar hipóteses a serem testadas experimentalmente em estudos futuros.

6.6. Uma nova nomenclatura para RPRC010099 e RPRC015421

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com nossa hipótese inicial: as apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 influenciam na fertilidade de *Rhodnius prolixus*. A proteína RPRC010099 apresenta expressão tanto nos testículos quanto nas glândulas acessórias de machos virgens e acasalados, o que sugere funções no sistema reprodutivo. Além disso, encontramos indícios de que as duas apolipoproteínas estudadas são transferidas do macho para a fêmea via acasalamento. Esses resultados indicam que RPRC010099 pode atuar como uma proteína seminal envolvida na modulação fisiológica da fêmea após a cópula, estimulando a vitelogênese e a oviposição. Esse padrão é consistente com o papel de várias proteínas seminais descritas em outros insetos, que aumentam a taxa de postura ao interagir com vias endócrinas e de sinalização (GILLOT, 2003; ÁVILA *et al.*, 2011).

Além disso, como apolipoproteína, RPRC010099 pode funcionar como carreadora de lipídios, ácidos graxos poli-insaturados ou esteróides, suprindo o ovário da fêmea com precursores essenciais à maturação folicular. Em hemípteros, já foi sugerido que proteínas desta classe participam do transporte de lipídios para ovários durante a vitelogênese (ARRESE *et al.*, 2001). Nesse contexto, RPRC010099 poderia facilitar a entrega de moléculas como a prostaglandina E₂ ou seu precursor ácido araquidônico, que regulam contrações do trato

reprodutivo e a oviposição em insetos (Stanley, 2006). Assim, RPRC010099 pode estar relacionada tanto à estimulação comportamental e endócrina da postura quanto ao fornecimento de recursos lipídicos para a produção de ovos.

A apolipoproteína RPRC015421, por sua vez, apresenta expressão predominante em testículos de machos virgens, com queda após o acasalamento e pouca expressão nas glândulas acessórias. Esse padrão sugere uma proteína associada ao esperma ou a vesículas espermáticas, sendo transferida principalmente no primeiro acasalamento. Sua presença em espermatecas e ovários das fêmeas reforça a hipótese de que RPRC015421 funcione como um fator seminal deplecionável, possivelmente atuando como um “nutriente ou sinal imediato” que estimula a oviposição nas primeiras posturas após a cópula.

A literatura mostra que proteínas associadas ao sêmen podem tanto proteger e estabilizar os espermatozoides quanto modular a fisiologia reprodutiva da fêmea (Simmons & Fitzpatrick, 2012). No caso de RPRC015421, sua redução após a cópula sugere que não é rapidamente repostada, funcionando como um aporte inicial de recursos lipídicos e/ou moléculas sinalizadoras que garantem o estímulo à produção de ovos, como os precursores de eicosanoides (especialmente o ácido eicosapentaenoico, um precursor alternativo de prostaglandinas). Assim, sua ausência explicaria a queda no número de ovos depositados, sem afetar a fertilização ou a viabilidade embrionária, uma vez que os ovos efetivamente formados mantêm a qualidade normal.

Sugere-se que ambas as apolipoproteínas atuam na via dos eicosanoides, seja de forma redundante ou não, para garantir uma sinalização mais robusta e eficiente. Nosso trabalho mostrou ainda que o silenciamento gênico de RPRC010099 e RPRC015421 resulta na diminuição no número de ovos depositados, sem alteração na taxa de eclosão. Esse fenótipo indica que ambas as apolipoproteínas atuam nos processos relacionados à produção/postura dos ovos, mas não ao desenvolvimento embrionário. Entende-se portanto, que as apolipoproteínas estudadas atuam como fatores de fertilidade masculina de *Rhodnius prolixus*, com efeito na indução da oviposição e não na produção de gametas ou na embriogênese.

Na ausência ou redução dessas proteínas, os eicosanoides não conseguiriam alcançar o sistema reprodutivo feminino em quantidades suficientes, prejudicando o comportamento normal de oviposição. Por isso, a partir dos resultados encontrados no presente trabalho, sugerimos que as proteínas RPRC010099 e RPRC015421 sejam nomeadas, respectivamente, de “*Rhodnius*

prolixus fertility factor Apolipoprotein 1” (RpffAPO-1) e “*Rhodnius prolixus* fertility factor Apolipoprotein 2” (RpffAPO-2).

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstra que as apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 são relevantes para a fisiologia reprodutiva de *Rhodnius prolixus*, um importante vetor da doença de Chagas. De forma inédita, os resultados aqui apresentados caracterizam as apolipoproteínas estudadas e evidenciam o seu papel como fator de fertilidade masculina importante para a reprodução da espécie.

As análises da expressão gênica basal mostram que estas lipocalinas são altamente expressas nos órgãos do sistema reprodutor do inseto macho, mas não nas fêmeas. Os ensaios de transferência proteica indicam ainda que RPRC010099 e RPRC015421 são transferidas do macho para a fêmea durante a cópula. Por sua vez, o silenciamento por RNAi dos genes RPRC010099 e RPRC015421 em machos foi responsável por reduzir significativamente a quantidade de ovos produzidos pelas fêmeas fecundadas por machos silenciados. Tais resultados são evidências diretas da importância funcional dessas proteínas para a fertilidade da espécie.

Em conjunto, os resultados encontrados sugerem que as apolipoproteínas estudadas atuam como carreadoras de eicosanoides durante a cópula. RPRC010099 e RPRC015421 possuem afinidade de ligação à prostaglandina E2 e ao ácido eicosapentaenoico, respectivamente. Ao estabilizar e transportar estes eicosanoides, as apolipoproteínas podem mediar a oviposição induzida pelo macho, fenômeno já descrito e amplamente estudado em triatomíneos e outros grupos de insetos. É possível concluir, portanto, que as apolipoproteínas RPRC010099 e RPRC015421 são importantes para a fertilidade de *R. prolixus*.

Além de identificar um novo papel reprodutivo para as apolipoproteínas, nosso trabalho contribui para uma compreensão mais ampla da biologia reprodutiva de insetos e da fisiologia de vetores, principalmente a respeito dos mecanismos moleculares de interação macho-fêmea. Esperamos que as discussões aqui suscitadas sirvam de direcionamento para estudos futuros a respeito dos fatores de fertilidade com potencial na redução do crescimento populacional de insetos. Tais estudos são essenciais para o desenvolvimento de novas estratégias de controle vetorial e, conseqüentemente, para o enfrentamento de doenças transmitidas por insetos vetores.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S.; STANLEY, D.; KIM, Y. An insect prostaglandin E₂ synthase acts in immunity and reproduction. *Frontiers in Physiology*, v. 9, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01231>.
- AL NAGGAR, Y. *et al.* Mechanisms and genetic drivers of resistance of insect pests to insecticides and approaches to its control. *Toxics*, Basel, v. 13, n. 8, p. 681, 16 ago. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxics13080681>. Acesso em: 24 ago. 2025.
- AMICHOT, M. *et al.* Point mutations associated with insecticide resistance in the *Drosophila* cytochrome P450 Cyp6a2 enable DDT metabolism. *European Journal of Biochemistry*, v. 271, n. 7, p. 1250-1257, abr. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04025.x>.
- ANDERSEN, J. F. *et al.* Recognition of anionic phospholipid membranes by an antihemostatic protein from a blood-feeding insect. *Biochemistry*, v. 43, n. 22, p. 6987-6994, jun. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi049655t>.
- ANDERSEN, J. F. *et al.* The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 58, n. 2, p. 97-105, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.20032>.
- ARRESE, E. L. *et al.* Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, n. 1, p. 7-17, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00102-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00102-8).
- ASCOLI, C.; AGGELER, B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *BioTechniques*, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0065>. Acesso em: 13 set. 2025.
- ATELLA, G. C. *et al.* Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, p. 405-430, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000300005>.

ÁVILA, F. W. *et al.* Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annual Review of Entomology*, v. 56, n. 1, p. 21-40, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144823>.

BAKER, E. A.; WOOLLARD, A. The road less travelled? Exploring the nuanced evolutionary consequences of duplicated genes. *Essays in Biochemistry*, v. 66, n. 6, p. 737-744, 8 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1042/EBC20220213>.

BALDINI, F. *et al.* The interaction between a sexually transferred steroid hormone and a female protein regulates oogenesis in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology*, v. 11, n. 10, e1001695, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001695>.

BARLETTA, A. B. F. *et al.* Prostaglandins regulate humoral immune responses in *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 10, e0008706, 23 out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008706>.

BATISTA, V. S. *et al.* Construção, otimização e ancoragem molecular de substâncias bioativas em biomacromoléculas: um tutorial prático. *Química Nova*, v. 45, n. 2, p. 223-234, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170821>.

BEAMENT, J. *et al.* Wigglesworth's contribution to insect biology and the state of the art. In: LOCKE, M.; SMITH, D. S. (ed.). *Insect biology in the future*. [S. l.]: Elsevier, 1980. p. 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-454340-9.50005-7>.

BENRABAA, S. A. M.; ORCHARD, I.; LANGE, A. B. The role of ecdysteroid in the regulation of ovarian growth and oocyte maturation in *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Journal of Experimental Biology*, v. 225, n. 21, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.244830>.

BRENNER, R. R.; BERNASCONI, A. Prostaglandin biosynthesis in the gonads of the hematophagous insect *Triatoma infestans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 93, n. 1, p. 1-4, jan. 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90207-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90207-1).

CHAMPAGNE, D. E.; NUSSENZVEIG, R. H.; RIBEIRO, J. M. C. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary

glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 15, p. 8691-8695, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.15.8691>.

CHAPMAN, R. F. *The insects: structure and function*. 5. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 282-342.

CHEN, S. D. *et al.* Molecular identification and expression patterns of apolipoprotein D from *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to oxidative stress and bacterial challenge. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 109, n. 5, p. 759-767, 2016.

CHIANG, R. G. New findings on the functional morphology of the male genitalia of the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus* in the light of a different observation on living tissue. *Arthropod Structure & Development*, v. 59, p. 100982, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100982>.

CHIANG, R. *et al.* Exploring the role of Rhodtestolin, a cardio-inhibitor from the testes of *Rhodnius prolixus*, in relation to the structure and function of reproductive organs in insect vectors of Chagas disease. *Insects*, v. 4, n. 4, p. 593-608, 30 out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects4040593>.

CHIANG, R. G.; CHIANG, J. A. Reproductive physiology in the blood feeding insect, *Rhodnius prolixus*, from copulation to the control of egg production. *Journal of Insect Physiology*, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.06.001>.

CHOI, D. Y. *et al.* Aspirin inhibition of prostaglandin synthesis impairs mosquito egg development. *Cells*, Basel, v. 11, n. 24, p. 4092, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11244092>.

CHOUDHURI, S. Fundamentals of molecular evolution. In: CHOUDHURI, S. *Bioinformatics for beginners: genes, genomes, molecular evolution, databases and analytical tools*. Academic Press, 2014. p. 27-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410471-6.00002-5>.

DAVEY, K. G. The migration of spermatozoa in the female of *Rhodnius prolixus* Stål. *Journal of Experimental Biology*, v. 35, p. 694-701, 1958. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.35.3.694>.

DAVEY, K. G.; MAIMETS, I. K.; RUEGG, R. P. The relationship between crop size and egg production in *Rhodnius prolixus*. *Canadian Journal of Zoology*, v. 64, n. 12, p. 2654-2657, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1139/z86-385>.

DAVEY, K. G.; SINGLETON, D. M. Activation of egg production and the corpus allatum without feeding in the adult female of the insect *Rhodnius prolixus*. *Invertebrate Reproduction & Development*, v. 16, n. 1-3, p. 131-134, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1080/07924259.1989.9672068>.

DIOTAIUTI, L.; BARBOSA, S. H. *Triatomíneos*. Belo Horizonte: CPqRR, 2015.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 8 mar. 2004. Oxford University Press. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

FABRO, J. *et al.* Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Infection, Genetics And Evolution*, v. 12, n. 2, p. 487-491, mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.006>.

FINDLAY, G. D. *et al.* Proteomics reveals novel *Drosophila* seminal fluid proteins transferred at mating. *PLOS Biology*, v. 6, n. 7, e178, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060178>.

FRANCISCHETTI, I. M. B. *et al.* Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal Of Biological Chemistry*, v. 275, n. 17, p. 12639-12650, abr. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12639>.

FREITAS, S. P. *et al.* Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron*, v. 41, n. 5, p. 518-525, jul. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.01.008>.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1871>.

GALVÃO, C. A sistemática dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. *Entomologia e Vectores*, v. 10, n. 4, p. 511-530, 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/313047927>. Acesso em: 29 set. 2025.

GARCIA, E. S.; MACHADO, E. M. M.; AZAMBUJA, P. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Insect Physiology*, v. 50, n. 2-3, p. 157-165, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2003.11.002>.

GARCIA, E. S. *et al.* Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi* – *Rhodnius prolixus* interactions. *Journal Of Insect Physiology*, v. 53, n. 1, p. 11-21, jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.10.006>.

GILLOTT, C. Male insect accessory glands: functions and control of secretory activity. *Invertebrate Reproduction & Development*, v. 30, n. 1-3, p. 199-205, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672546>.

GILLOTT, C. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*, v. 48, p. 163-184, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112657>.

GRZYB, J. *et al.* Lipocalins – a family portrait. *Journal Of Plant Physiology*, v. 163, n. 9, p. 895-915, set. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.12.007>.

GUHL, F. Chagas disease in Andean countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 29-38, out. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000099>.

HAMMOND, A. *et al.* A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 1, p. 78-83, jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3439>.

HANSEN, I. A. *et al.* Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes: ecdysone, juvenile hormone, nutrient signalling and transcription factors. *Frontiers in Physiology*, v. 5, p. 103, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00103>.

HELLMANN, K.; HALKINS, R. I. Prolixin-S and Prolixin-G: two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stål. *Nature*, v. 207, n. 4994, p. 265-267, jul. 1965. DOI: <https://doi.org/10.1038/207265a0>.

HENRIQUES, B. S. *et al.* Genome wide mapping of peptidases in *Rhodnius prolixus*: identification of protease gene duplications, horizontally transferred proteases and analysis of peptidase A1 structures, with considerations on their role in the evolution of hematophagy in Triatominae. *Frontiers in Physiology*, v. 8, art. 1051, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01051>.

HERNÁNDEZ, C. *et al.* Taxonomy, evolution, and biogeography of the Rhodniini tribe (Hemiptera: Reduviidae). *Diversity*, v. 12, n. 3, p. 97, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/d12030097>.

JAIN, R. G. *et al.* RNAi-based functional genomics in Hemiptera. *Insects*, v. 11, n. 9, p. 557, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects11090557>.

JIA, S. *et al.* Evolutionary novelty of apolipoprotein D facilitates metabolic plasticity in lepidopteran wings. *Molecular Biology and Evolution*, v. 41, n. 1, p. 1-14, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msae252>.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, v. 596, p. 583-589, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

LAHTVEE, P. J. *et al.* Absolute quantification of protein and mRNA abundances demonstrate variability in gene-specific translation efficiency in yeast. *Cell Systems*, v. 4, n. 5, p. 495-504, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.03.003>.

LAKSHMI, B. *et al.* Structure-based phylogenetic analysis of the lipocalin superfamily. *PLoS One*, v. 10, n. 8, p. 1-18, 11 ago. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135507>.

LANGE, A. B. *et al.* The male reproductive system of the kissing bug, *Rhodnius prolixus*: musculature, innervation, and activity. *Insects*, v. 14, n. 1, p. 1-22, 2023..

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 163, n. 3, p. 123-520, jul. 1979.

LEONE, M. G. et al. Lipocalin type prostaglandin D-synthase: which role in male fertility? *Contraception*, v. 65, n. 4, p. 293-295, abr. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(02\)00280-9](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(02)00280-9).

LEYRIA, J.; ORCHARD, I.; LANGE, A. B. The involvement of insulin/ToR signaling pathway in reproductive performance of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 130, p. 103526, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103526>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta CT)$ method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LOHER, W.; EDSON, K. The effect of mating on egg production and release in the cricket *Teleogryllus commodus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 16, n. 4, p. 483-490, 1973. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1973.tb00300.x>.

LOHER, W. The influence of prostaglandin E2 on oviposition in *Teleogryllus commodus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 25, n. 1, p. 107-109, jan. 1979. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1979.tb02853.x>.

LOHER, W. et al. Prostaglandins: their role in egg-laying of the cricket *Teleogryllus commodus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 78, n. 12, p. 7835-7838, dez. 1981. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7835>.

LÓPEZ-GARCÍA, A.; GILABERT, J. A. Oral transmission of Chagas disease from a One Health approach: a systematic review. *Tropical Medicine & International Health*, v. 28, n. 9, p. 689-698, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/tmi.13915>.

LU, J. B. et al. The evolution and functional divergence of 10 apolipoprotein D-like genes in *Nilaparvata lugens*. *Insect Science*, v. 31, n. 1, p. 91-105, fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13216>.

MACHADO, E. *et al.* Prostaglandin signaling and ovarian follicle development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 37, n. 8, p. 876-885, ago. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.04.003>.

MADDIPATI, K. R.; ZHOU, S. L. Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids in tissue culture media. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, v. 94, n. 1-2, p. 59-72, jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2011.01.003>.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Diretriz da SBC sobre diagnóstico e tratamento de pacientes com cardiomiopatia da doença de Chagas – 2023. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 120, n. 6, p. e20230269, jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20230269>.

MONCADA, S. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochemical Pharmacology*, v. 37, n. 13, p. 2495-2501, jul. 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90236-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90236-5).

MONTFORT, W. R. *et al.* Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1482, n. 1-2, p. 110-118, out. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00165-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00165-5).

NASCIMENTO, J. D. *et al.* Spermathecae: Morphofunctional features and correlation with fat bodies and trachea in six species of vectors of Chagas disease. *Acta Tropica*, v. 197, p. 105032, set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.023>.

NOESKE-JUNGBLUT, C. *et al.* An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 7, p. 5050-5053, 18 fev. 1994.

NOESKE-JUNGBLUT, C. *et al.* Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 48, p. 28629-28634, 1 dez. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28629>.

NORIEGA, F. G. Nutritional regulation of JH synthesis: a mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 7, p. 687-693, jul. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.021>.

NUNES-DA-FONSECA, R. *et al.* *Rhodnius prolixus*: From classical physiology to modern developmental biology. *Genesis*, v. 55, n. 5, p. e22995, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/dvg.22995>.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. OPAS: 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas. 13 abr. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas>. Acesso em: 13 ago. 2021.

PAESEN, G. C.; HAPP, G. M. The B proteins secreted by the tubular accessory sex glands of the male mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, have sequence similarity to moth pheromone-binding proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 25, n. 3, p. 401-408, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)00085-V](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00085-V).

PAIM, R. M. M. Genômica funcional de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae): avaliação da persistência do silenciamento (RNAi) e caracterização in vivo de genes importantes na interação do inseto com hospedeiros e parasitos. 2014. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <http://www.parasitologia.icb.ufmg.br/defesas/438D.PDF>. Acesso em: 18 ago. 2024.

PALLI, S. R. RNAi turns 25: contributions and challenges in insect science. *Frontiers in Insect Science*, v. 3, p. 1209478, 4 out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/finsc.2023.1209478>.

PEREIRA-LOURENÇO, A. S.; SANTOS-MALLET, J. R.; FREITAS, S. P. Anatomy of the spermatophore in triatomines (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its applications to the study of Chagas disease vector biology. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, n. 4, p. 775-780, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0133>.

PÉREZ, J. R. Estudio sobre la anatomía de *Rhodnius prolixus*. *Revista Venezolana de Sanidad y Asistencia Social*, 1969.

PONDEVILLE, E. *et al.* *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)*, v. 105, n. 50, p. 19631-19636, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0809264105>.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 60, n. 3, p. 289-310, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0178-0>.

QIAO, J. *et al.* Involvement of apolipoprotein D in desiccation tolerance and adult fecundity of *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, v. 127, p. 104160, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104160>.

RADONIC, A. *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 313, p. 856-862, 2004.

RAMOS, S.; CUSTÓDIO, A.; SILVEIRA, H. *Anopheles gambiae* eicosanoids modulate *Plasmodium berghei* survival from oocyst to salivary gland invasion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 109, n. 5, p. 668-671, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-0276140098>.

RIBEIRO, J. M.; NUSSENZVEIG, R. H. The salivary catechol oxidase/oxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. *Journal of Experimental Biology*, v. 179, n. 1, p. 273-287, 1 jun. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.179.1.273>.

RIBEIRO, J. M. C. *et al.* Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochemical Journal*, v. 308, n. 1, p. 243-249, 15 maio 1995. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj3080243>.

RIBEIRO, J. M. C. *et al.* Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *Journal of Medical Entomology*, v. 35, n. 4, p. 599-610, 1 jul. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.4.599>.

RIBEIRO, J. M. C. *et al.* Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 1, p. 61-79, jan. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.09.004>.

RIBEIRO, 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. 1-31, 9 jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002594>.

RIDDIFORD, L. M. The control of metamorphosis in the kissing bug. *Journal of Experimental Biology*, v. 210, n. 18, p. 3133-3140, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.001321>.

RIDDIFORD, L. M. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *General and Comparative Endocrinology*, v. 179, n. 3, p. 477-484, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.06.001>.

ROCHA, D. S.; SANTOS, C. M. Morfologia dos ovos e ninfas. In: GALVÃO, C. (org.). *Vetores da doença de Chagas no Brasil* [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 40-63. (Zoologia: guias e manuais de identificação).

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 172, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.

RUIZ, M. *et al.* Sex-dependent modulation of longevity by two *Drosophila* homologues of human Apolipoprotein D, GLaz and NLaz. *Experimental Gerontology*, v. 46, n. 7, p. 579-589, jul. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.02.014>.

SANTOS, D. V. Sobre as lipocalinas expressas em *Rhodnius prolixus*, um vetor da doença de Chagas. 2021. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) — Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021. Disponível em: <http://www.parasitologia.icb.ufmg.br/defesas/659M.PDF>. Acesso em: 15 ago. 2024.

SANTOS, D. V. *et al.* An updated catalog of lipocalins of the chagas disease vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 146, p. 103797, abr. 2022. ISSN 0965-1748. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103797>.

SCHIEFNER, A. *et al.* The dimeric crystal structure of the human fertility lipocalin glycodefin reveals a protein scaffold for the presentation of complex glycans. *Biochemical Journal*, v. 466, n. 1, p. 95-104, 6 fev. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1042/bj20141003>.

SEVALA, V. L.; DAVEY, K. G. Action of juvenile hormone on the follicle cells of *Rhodnius prolixus*: Evidence for a novel regulatory mechanism involving protein kinase C. *Experientia*, v. 45, p. 355–356, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01957476>.

SHRESTHA, S.; KIM, Y. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in *Spodoptera exigua*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 10, p. 761-767, 2010.

SHUKLA, J. N. *et al.* RNAi-based functional genomics in Hemiptera. *Insects*, v. 11, n. 9, p. 557, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4450/11/9/557>. Acesso em: 31 jul. 2025.

SIBLEY, C. R.; SEOW, Y.; WOOD, M. J. A. Novel RNA-based strategies for therapeutic gene silencing. *Molecular Therapy*, v. 18, n. 3, p. 466-476, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mt.2009.306>.

SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, v. 7, n. 1, p. 539, jan. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2011.75>.

SIMMONS, L. W.; FITZPATRICK, J. L. Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction*, v. 144, n. 5, p. 519–534, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-12-0285>.

STANTEY, D. W. *Eicosanoids in Invertebrate Signal Transduction Systems*. New York: Princeton University Press, 2000.

STANLEY, D. W. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: Biological Significance. *Annual Review of Entomology*, v. 51, n. 1, p. 25–44, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151021>.

STANLEY, D.; KIM, Y. Prostaglandins and their receptors in insect biology. *Frontiers in Endocrinology*, v. 2, p. 105, 2011. DOI: 10.3389/fendo.2011.00105.

STANLEY, D.; KIM, Y. Eicosanoid Signaling in Insects: from Discovery to Plant Protection. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 33, n. 1, p. 20–63, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.847631>.

STÅL, C. Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. *Berliner Entomologische Zeitschrift*, v. 3, n. 2-3, p. 99–117, 1859. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mmnd.18590030202>.

SWANSON, W. J.; VACQUIER, V. D. The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 2, p. 137–144, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg733>.

VILLALOBOS-SAMBUCARO, M. J. *et al.* The juvenile hormone described in *Rhodnius prolixus* by Wigglesworth is juvenile hormone III skipped bisepoxide. *Scientific Reports*, v. 10, art. 3091, 2020.

URADE, Y.; EGUCHI, N. Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, v. 68-69, p. 375-382, ago. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0090-6980\(02\)00042-4](https://doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00042-4).

WEN, D. *et al.* Cloning and characterization of an insect apolipoprotein (apolipoprotein-II/I) involved in the host immune response of *Antheraea pernyi*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.08.010>.

WHO — World Health Organization. *Control of Chagas disease*. Geneva: WHO, 2002. (Series of Technical Reports, 905). 117 p.

WHO — World Health Organization. World Chagas Disease Day 2024: urging early diagnosis and care for life. Geneva: OMS, 11 abr. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/11-04-2024-world-chagas-disease-day-2024-urging-early-diagnosis-and-care-for-life>. Acesso em: 13 jul. 2025.

WIGGLESWORTH, V. B. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, v. 77, p. 191–222, 1934.

WIGGLESWORTH, V. B. The Functions of the Corpus Allatum in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Experimental Biology*, v. 25, p. 1-14, 1948.

WIGGLESWORTH, V. B. *Insects and the Life of Man*. New York: John Wiley & Sons, 1976.

WOLFNER, M. F. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity*, v. 88, n. 2, p. 85–93, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800017>.

WORTHINGTON, A. M. *et al.* Mating for male-derived prostaglandin: a functional explanation for the increased fecundity of mated female crickets? *Journal of Experimental Biology*, v. 218, n. 17, p. 2720–2727, set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.121327>.

ZHANG, Y. *et al.* Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-x activating complex. *Biochemistry*, v. 37, n. 30, p. 10681–10690, jul. 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/bi973050y>.

ZHANG, H. *et al.* *Aedes aegypti* exhibits a distinctive mode of late ovarian development. *BMC Biology*, v. 21, art. 11, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01511-7>.

ZHAO, M. *et al.* Point mutations associated with organophosphate and carbamate resistance in Chinese strains of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*, v. 9, n. 5, e95260, 1 maio 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095260>.

ZHOU, Y. *et al.* Apolipoprotein D in Lepidoptera: evolution and functional divergence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 526, n. 2, p. 472–478, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.112>.

ZHU, K. Y.; PALLI, S. R. Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annual Review of Entomology*, v. 65, p. 293–311, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025224>.

ANEXO A – Certificado CEUA nº 149/2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Produção de anticorpos policlonais contra as apolipoproteínas e seu papel na fisiologia reprodutiva de *Rhodnius prolixus*, um vetor da doença de Chagas", protocolo do CEUA: 149/2025 sob a responsabilidade de Ricardo Toshio Fujiwara que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/06/2025.

Vigência da Autorização	03/06/2025 a 02/06/2030
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	3
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	3
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	6
Idade	6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

03/06/2025	Aprovado no dia 03/06/2025. Validade: 03/06/2025 à 02/06/2030. Este protocolo foi aprovado condicionado à resposta a diligência na reunião de 26/05/2025
------------	--

Belo Horizonte, 03/06/2025.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B – Artigo submetido para publicação no *Journal of Insect Physiology***1 The role of apolipoproteins RPRC010099 and RPRC015421 in male
2 fertility of the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus*.**

3 Daniela Viana dos Santos^{1,2}; Jordânia Costa Pinto³; Luccas Gabriel Ferreira Malta²;
4 Tatyane Martins Cirilo³; Leticia Beatriz Silva Almeida²; Marcela Cristina Raso Mattos²;
5 Grasielle Caldas D'Avila Pessoa¹; Mauricio Roberto Vianna Sant'Anna²; Marcos
6 Horacio Pereira²; Ricardo Toshio Fujiwara³; Nelder Figueiredo Gontijo²; Leonardo
7 Barbosa Koerich^{1,4*}

8 ¹Laboratório de Entomologia Médica, Departamento de Parasitologia, Universidade
9 Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. Brazil

10 ²Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia,
11 Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. Brazil

12 ³Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitas, Departamento de Parasitologia,
13 Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. Brazil

14 ⁴Laboratório de Genômica Evolutiva, Departamento de Genética, Universidade Federal
15 do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ. Brazil

16 *To whom correspondence should be addressed: lbkoerich@biologia.ufrj.br

17 Daniela Viana dos Santos: danielaviana.bio@gmail.com

18 Jordânia Costa Pinto: jordaniacosta96@hotmail.com

19 Luccas Gabriel Ferreira Malta: lucasmalta10@hotmail.com

20 Tatyane Martins Cirilo: tatlanemartins95@gmail.com

21 Leticia Beatriz Silva Almeida: leticiabsalmeida04@outlook.com

22 Marcela Cristina Raso Mattos: mraso54@gmail.com

23 Grasielle Caldas D'Avila Pessoa: grasiellepessoa2016@gmail.com

24 Mauricio Roberto Vianna Sant'Anna: mrvsantanna@gmail.com

25 Marcos Horacio Pereira: marcoslfih@gmail.com

26 Ricardo Toshio Fujiwara: rtfujiwara@gmail.com

27 Nelder Figueiredo Gontijo: nelder@icb.ufmg.br

28 Leonardo Barbosa Koerich: lbkoerich@gmail.com

29 **Abstract**

30 The kissing bug *Rhodnius prolixus*, a primary vector of Chagas disease, serves as a model
31 for understanding insect physiology and vector-pathogen interactions. While the role of
32 male reproductive factors in influencing female fertility is well-established in many
33 insects, little is known about male fertility in *R. prolixus*. Our study examines the role of
34 two apolipoproteins, RPRC010099 and RPRC015421, in male fertility and their potential
35 function as carriers of eicosanoid hormones. Using RNA interference (RNAi), we
36 silenced the genes for both apolipoproteins in male *R. prolixus*. The silencing of
37 RPRC010099 led to a significant reduction of ~60% in the number of eggs laid by mated
38 females, while silencing RPRC015421 resulted in a ~20% reduction. Further analysis,
39 including molecular docking and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA),
40 confirmed that these proteins are transferred from males to females during copulation and
41 have a high affinity to eicosanoid signaling molecules, such as prostaglandin E2. Our
42 findings demonstrate that RPRC010099 and RPRC015421 are important male fertility
43 factors that promote female oviposition and probably act as carriers for eicosanoids. This
44 work not only identifies a novel reproductive role for apolipoproteins but also contributes
45 to a broader understanding of male-female interactions in insect reproduction.

46 **Keywords:** apolipoprotein, *Rhodnius prolixus*, fertility, reproduction, eicosanoids

47

48 **Introduction**

49 *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) is one of the primary vectors of
50 *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease in Latin (Dias et al., 2002;
51 Hashimoto and Schofield, 2012). In addition to its medical importance, *R. prolixus* has
52 long been recognized as a model for insect physiology, particularly in the study of
53 hematophagy (Azambuja et al., 2017; Wigglesworth, 1936). Several salivary proteins
54 with anti-hemostatic properties have been characterized (Ribeiro, 1998), most notably
55 members of the lipocalin family. Lipocalins are defined by a β -barrel tertiary structure
56 forming a hydrophobic binding pocket, enabling the transport of small hydrophobic
57 molecules (Flower, 1996). In *R. prolixus*, well-studied lipocalins include nitrophorins,
58 which store and deliver nitric oxide (NO) to host tissues to induce vasodilation, as well as
59 pallidipins, biogenic amine-binding proteins (BABPs), and platelet aggregation inhibitors
60 (PAIs), which act on different pathways of host hemostasis (Andersen et al., 2005).
61 Recent transcriptomic analyses revealed a new group of lipocalins in *R. prolixus*: the
62 apolipoproteins (Santos et al., 2022). Interestingly, two of them (RPRC01099 and
63 RPRC015421) were predominantly expressed in testes, suggesting a possible role in
64 reproduction rather than in blood feeding.

65 In insects, male seminal fluid is known to influence behavioral and physiological
66 switches in females, triggering responses in several processes related to fertility by
67 delivering proteins and enzymes that transport prostaglandins (arachidonic acid-derived
68 eicosanoids) into the female reproductive tract (Avila et al., 2011; Poiani, 2006). These
69 molecules are then released from the spermathecae into the female hemolymph, where
70 they interact with receptors in the abdominal ganglion to stimulate oviposition (Loher et
71 al., 1981; Schjenken and Robertson, 2020). Similar findings were reported in the kissing
72 bug *Triatoma infestans*, in which PGE2 transfer during copulation enhanced female egg
73 production (Brenner and Bernasconi, 1989). However, eicosanoids are chemically
74 unstable, with short half-lives and primarily local effects (Maddipati and Zhou, 2011).
75 This suggests that stabilizing and carrier proteins are required for their systemic or
76 reproductive functions.

77 Based on this evidence, we hypothesized that apolipoproteins expressed in the testes of *R.*
78 *prolixus* contribute to male fertility by acting as carriers of eicosanoids such as PGE2.
79 Our experiments demonstrate that silencing RPRC01099 and RPRC015421 reduces male
80 fertility, and that these proteins are indeed transferred to female ovaries and spermathecae
81 during copulation.

82

83 **Materials and Methods**

84 **Insects**

85 Specimens of *Rhodnius prolixus* were obtained from the insect colony maintained under
86 controlled conditions ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ RH, 12:12 hours light/dark photoperiod) at the
87 Laboratory of Hematophagous Insect Physiology, Department of Parasitology, UFMG.
88 Insects were fed to anesthetized hamsters weekly.

89 **Structural Modeling and Molecular Docking**

90 Amino acid and nucleotide sequences for RPRC010099 and RPRC015421 were retrieved
91 from VectorBase (<https://vectorbase.org>). Synteny analysis was performed in Vectorbase.
92 To analyze protein homology and similarity, nucleotide and amino acid sequences of
93 RPRC010099 and RPRC015421 were aligned using MUSCLE and BLAST. Protein
94 modeling was performed using the AlphaFold Protein Structure Database
95 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) (Jumper et al., 2021) with proteins R4G315 and R4G3AA3
96 serving as templates in sequence alignments against RPRC010099 and RPRC015421,
97 respectively. After predicting the three-dimensional structures of RPRC010099 and
98 RPRC015421, molecular docking was performed to identify potential ligands. Docking
99 analyses were conducted using DockThor (<https://www.dockthor.lncc.br/v2/>), developed
100 by the Laboratório Nacional de Computação Científica (Guedes et al., 2024), in
101 accordance with the developers' recommendations. Predicted 3D structures were docked
102 with eicosanoids arachidonic acid (ChEBI: 15843), prostaglandin E2 (ChEBI: 15554),
103 and Eicosapentaenoic Acid (ChEBI:84883). We also tested with Linoleic Acid
104 (ChEBI:17351), Ecdysone (ChEBI:16688), and glucose (ChEBI: 17234) to evaluate
105 binding affinity (glucose was used as a negative control).

106 RNA expression analyses

107 To evaluate the gene expression levels of RPRC010099 and RPRC015421 in different
108 reproductive tissues and physiological stages of adult *R. prolixus* (before and after
109 mating), five virgin males, five virgin females, five mated males, and five mated females
110 were dissected in 0.9% saline solution to obtain testes, accessory glands, ovaries, and
111 spermathecae. Tissues were collected and stored in TRIzol solution, macerated, and total
112 RNA was extracted using the TRIzol Total RNA Extraction Kit (Invitrogen® - US)
113 according to the manufacturer's protocol. Total RNA was quantified using a Nanodrop®
114 spectrophotometer (ThermoScientific - US) at 260nm, and sample concentrations were
115 adjusted to 200ng/μL. Total RNA from each tissue was used for cDNA synthesis with the
116 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems - US). cDNA was
117 used for quantitative PCR (qPCR) with the Power SYBR Green PCR Master Mix Kit
118 (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions, in a StepOne Plus
119 thermocycler (Applied Biosystems - US). Reactions were performed in triplicate. qPCR
120 primers for RPRC010099 (forward 5' ACGCTCTCATCTACTCTTGAC 3' / reverse 5'
121 TCTTTCGATCTGCCAAGTACCC 3'), RPRC015421 (forward 5'
122 TAAGTGTGTCAGCGCATTGAGC 3' / reverse 5' CGCCAAGGTTTATAGTCACCAG
123 3'). Amplification conditions were: 95°C for 10min, followed by 40 cycles of 95°C for
124 15s and 60°C for 1min. Relative transcript abundance was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$
125 method (Schmittgen and Livak, 2008), with Elongation Factor (EF) as the reference gene
126 (Paim et al., 2013). Reaction efficiency for each gene was determined from the slope of
127 the standard curve obtained from serial dilutions of cDNA (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng,
128 0.01 ng), using linear regression as described by RADONIĆ *et al.* (2004). Efficiencies
129 between 90% and 110% were considered acceptable.

130 Gene silencing by RNAi and phenotypic evaluation of knockdown insects

131 RNA interference (RNAi) was employed to silence RPRC010099 and RPRC015421 and
132 to assess the phenotype of silenced insects. Testis-derived cDNA was used as a template
133 to synthesize double-stranded RNA (dsRNA) complementary to the target gene
134 sequences using the MegaScript RNAi Kit (Ambion) according to the manufacturer's
135 protocol. PCR reactions with primers RPRC010099 (forward 5'

136 *TAATACGACTCACTATAGGGCCTCGTCATCGCTATCTGTTTC 3' / 5' reverse*
 137 *TAATACGACTCACTATAGGGCTGGCCAACACCATGTTTCAG 3')* and RPRC015421
 138 (forward 5' *TAATACGACTCACTATAGGGCAGGTATCTGTCCCACCACA 3' / reverse*
 139 *5' TAATACGACTCACTATAGGGGGAGCACAACCATTATTGACC 3')* were used to
 140 amplify gene fragments for dsRNA synthesis. The resulting dsRNA (dsRPRC010099 and
 141 dsRPRC015421) was quantified at 260nm (Nanodrop®), and PCR followed by agarose
 142 gel electrophoresis (1.5% agarose gel stained with GelRed, Biotium). For the negative
 143 control dsRNA (dsKer), a keratin gene fragment was obtained from BALB/c mouse tail
 144 skin, processed with TriZol for RNA extraction, and amplified with primers KER T7 F/R.
 145 Fifth-instar nymphs (5–7 days post-molt, unfed) were injected laterally in the thorax with
 146 1µg of dsKer (n = 30), dsRPRC010099 (n = 30), or dsRPRC015421 (n = 30). After 72
 147 hours, testes from five insects per group were dissected for RNA extraction, cDNA
 148 synthesis, and qPCR to verify silencing efficiency. The remaining nymphs were
 149 monitored until they molted into adults. After molting, 24 males from each group were
 150 paired with virgin females (5–7 days post-molt) in individual containers. After 7 days,
 151 males were dissected for testes collection and qPCR to evaluate long-term silencing
 152 effects. Females were monitored for 5 weeks, during which oviposition rate and egg
 153 eclosion rate were recorded. Insects were fed fortnightly on anesthetized hamsters, except
 154 for adult females, which were fed once on day 3 post-pairing.

155 **Production of recombinants**

156 Cloning pET-TEV28a plasmids containing the coding sequences for RPRC010099 and
 157 RPRC015421, with a six-histidine tag added to the C-terminus, and restriction sites for
 158 NheI and XhoI, was designed using ApE – A Plasmid Editor (available at
 159 <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>) (Davis and Jorgensen, 2022). Plasmids
 160 were acquired from FastBio LTDA (Brazil), already cloned in *Escherichia coli*.
 161 Heterologous expression was carried out in *E. coli* BL21-Star cells grown on 2xYT
 162 medium with kanamycin at 37°C with shaking (180rpm) until the OD600 reached 0.6–
 163 0.8. Protein expression was induced with IPTG (1mM) at 37°C for 24 hours. Protein
 164 expression was confirmed by SDS-PAGE. Recombinant proteins were purified by nickel-
 165 affinity chromatography using a HisTrap HP column (GE Healthcare, US) connected to

166 an ÄKTAprime system, according to the manufacturer's protocols. Purification was
167 confirmed by Western blot using anti-histidine antibodies.

168 **Production of polyclonal antibodies and ELISA assays**

169 Polyclonal antibodies against RPRC010099 and RPRC015421 were generated in six
170 BALB/c male mice (4–8 weeks old), immunized subcutaneously with three doses of
171 antigen (20 µg recombinant protein + 40 µg saponin adjuvant in PBS) at 14-day intervals.
172 Control sera were collected before immunization. Ten days after the final immunization,
173 blood was collected via tail vein puncture, and serum was obtained by centrifugation
174 (4,000g, 10min). Antigen-specific IgG levels were determined by indirect ELISA.

175 **Quantification of RPRC010099 and RPRC015421 proteins in reproductive organs**
176 **by immunoassays.**

177 The quantification of RPRC010099 and RPRC015421 proteins in reproductive tissues
178 before and after copulation was performed using ELISA with recombinant antibodies to
179 each protein produced in the previous step. Virgin and mated males and females (n = 9
180 insects per group – 3 pools containing 3 pairs of organs each) were dissected to obtain the
181 reproductive organs (testes, accessory glands, ovaries, and spermathecae). A Maxisorp
182 ELISA microplate (Nunc®) was sensitized for 12 hours at 4°C in a humid chamber with
183 50µL of extract from the dissected organs (3 pairs of organs diluted in 200µL of
184 carbonate buffer). As a reference for protein concentration, controls were prepared using
185 50 µL of recombinant apolipoprotein at 0.4 µg/µL (positive control) or carbonate buffer
186 (negative control) to sensitize the plate. Each sample was performed in triplicate. The
187 sensitized wells were blocked with 150 µL of blocking solution – skim milk powder
188 diluted to 10% in PBS-Tween (NaCl 8g; KCl 0.2g; Na₂HPO₄ 1.44g; KH₂PO₄ 0.24g q.s.
189 H₂O 1000mL + 0.05% Tween-20) – for 30min at room temperature, with shaking at 160
190 rpm. After blocking, the wells were washed three times with PBS-Tween for 2 minutes
191 each at room temperature, with shaking at 160rpm. A total of 50 µL of serum from
192 immunized mice with recombinant apolipoproteins (RPRC010099 or RPRC015421)
193 diluted 1:100 in PBS was added, and the mixture was incubated for 45min at room
194 temperature under shaking. The wells were then washed three times with 150 µL of PBS-

195 Tween for 2min and incubated for 45min at room temperature under shaking with 50 μ L
196 of rabbit anti-mouse IgG antibody conjugated to peroxidase (Abcam - Ab6728) diluted
197 1:20000 in PBS. The wells were washed twice with 150 mL PBS-Tween and once with
198 PBS for 2 minutes under shaking. After the last wash, the wells were quickly filled with
199 200 μ L of OPD-H₂O₂ substrate (1 mg/mL of O-PhenyleneDiamine [Sigma: P-9029])
200 dissolved in sodium citrate buffer (50 mM citric acid; 50 mM Na₂HPO₄; pH 5.0) and
201 incubated for 10min at 37°C in the dark. The reaction was stopped by adding 100 μ L of 1
202 M sulfuric acid per well. Readings were performed at 450nm in a microplate reader
203 (VersaMax, Molecular Devices® - US), and the generated data were used for statistical
204 calculations.

205 **Arachidonic acid binding assays**

206 All interaction assays were conducted using recombinant proteins RPRC010099 (400
207 μ g/mL) and RPRC015421 (200 μ g/mL). Chromatographic analyses were performed on a
208 Shimadzu system (SPD-M20A, CBM-20A, LC-20AT, DGU-20A5) equipped with a
209 reversed-phase C18 column (NST 18 – 154605100) operating under a gradient elution
210 method. Methanol (SIGMA 34885-2.5L-R) was used as the mobile phase, with
211 concentrations ranging from 20% to 90%, and each run lasted 30 minutes. For all assays,
212 200 μ L of each sample was injected, corresponding to the following conditions:
213 Arachidonic acid 0.5 mM; Arachidonic acid 0.5 mM + RP10099 40 μ g; Arachidonic acid
214 0.5 mM + RP15421 20 μ g. All chromatograms were recorded at 220 nm and
215 subsequently processed using LC Solution software (Shimadzu).

216 **Results**

217 **Sequence and Synteny Analysis**

218 To investigate the similarity between RPRC010099 and RPRC015421 and the possibility
219 that both genes result from a recent duplication, a series of bioinformatic analyses was
220 performed. Alignments between the two genes (Supplementary Material – SFig. 1A and
221 1B) revealed amino acid identities of 24% and nucleotide identities of 50%, indicating a
222 higher rate of nonsynonymous mutations. The nucleotide alignment analyses also suggest

223 that the designed qPCR primers and dsRNA were target-specific (Supplementary
 224 Material – SFig. 1B). Synteny analyses (Supplementary Material – SFig. 2) show that
 225 RPRC010099 and RPRC015421 are not located *in tandem* and are on different scaffolds.

226 **Structure Modeling and Molecular Docking Analysis**

227 The predicted three-dimensional structures of apolipoproteins RPRC010099 and
 228 RPRC015421, as identified by AlphaFold software, revealed a characteristic β -barrel
 229 structure with a central hydrophobic cavity, typical of the lipocalin family
 230 (Supplementary Fig. 3A and 3B). Molecular docking analyses suggest that RPRC010099
 231 has a higher affinity with prostaglandin PGE2 (-9.581 kcal/mol) and arachidonic acid (-
 232 9.495 kcal/mol) (Table 1). On the other hand, RPRC015421 showed higher affinity of the
 233 polyunsaturated acids eicosapentaenoic acid (-8.494 kcal/mol) and linoleic acid (-8.415
 234 kcal/mol).

235 **Table 1. Molecular Docking analyses of RPRC010099 and RPRC015421 with**
 236 **different fatty acids.**

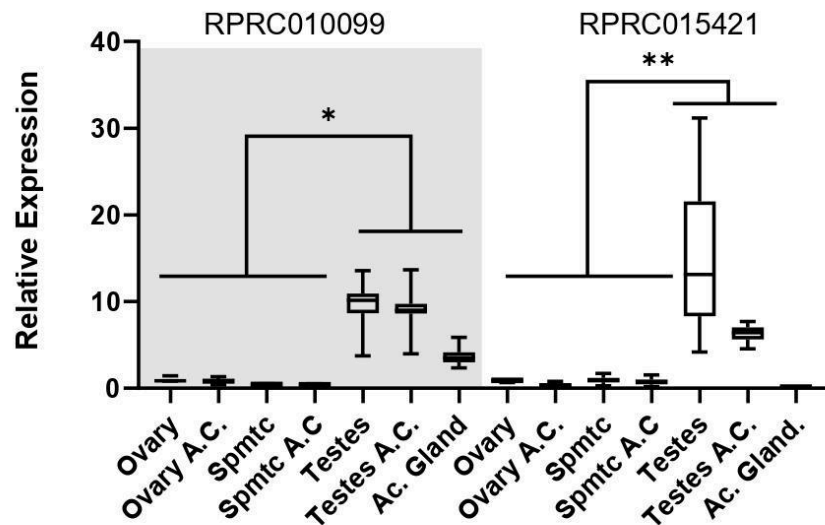
	Rank*	Compound	Affinity (kcal/mol)	Total Energy	vdW Energy	Elec. Energy
RPRC010099	1	Prostaglandin PGE2	-9.581	66.927	31.382	-5.907
	2	Arachidonic Acid	-9.495	36.781	19.613	-21.193
	3	Ecdysone	-9.438	342.864	155.71	-1.42
	4	Linoleic Acid	-9.376	25.243	-5.627	-12.998
	5	Eicosapentaenoic Acid	-9.321	70.787	-1.77	-2.122
	6	Glucose	-7.263	3.435	-8.244	-20.205
RPRC015421	1	Eicosapetaenoic Acid	-8.494	160.193	93.253	-0.398
	2	Linoleic Acid	-8.415	99.943	64.211	-19.921
	3	Arachidonic Acid	-8.306	134.97	114.048	-6.478
	4	Prostaglandin PGE2	-7.942	189.243	157.348	-16.331
	5	Glucose	-6.817	-3.668	1.712	-36.916
	6	Ecdysone	-5.962	603.949	423.161	-7.287

237 *Results for each protein are ranked according to affinity to each compound.

238 **mRNA expression of RPRC010099 and RPRC015421 in the reproductive tissues of**
 239 ***R. prolixus***

240 Quantitative PCR analyses indicate that the relative expression of both genes,
 241 RPRC010099 and RPRC015421, is significantly higher ($p < 0.05$) in male reproductive
 242 organs than in female reproductive organs (Fig. 1), both before and after copulation.
 243 While RPRC010099 showed a higher expression (~4x to ~10x higher) in testes (before
 244 and after copula) and accessory glands, in comparison to female tissues, RPRC015421
 245 presented significantly higher expression only in testes (before and after copula). There
 246 were no significant differences in the expression of both genes between female tissues
 247 (ovary and spermathecae) before and after fertilization.

248



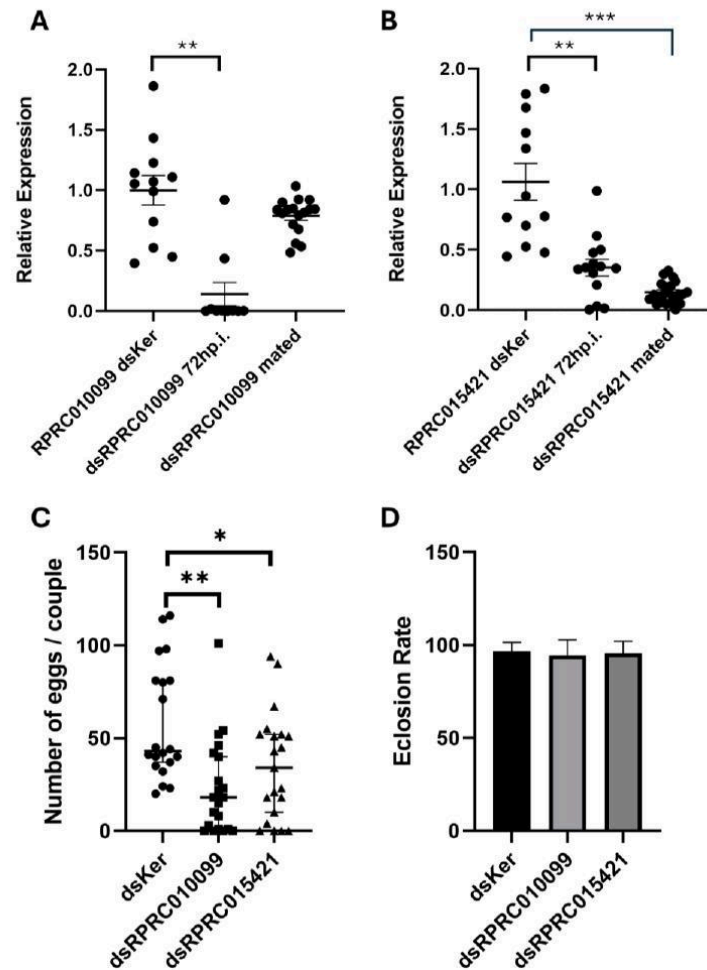
249

250 **Figure 1. Relative expression of RPRC010099 and RPRC015421 in the reproductive**
 251 **organs of *R. prolixus* before and after copulation.** The figure shows the median
 252 relative expressions for each gene in the ovary, ovary after copulation (Ovary A.C.),
 253 spermathecae (Spmtc), spermathecae after copulation (Spmtc A.C.), testes,
 254 testes after copulation (Testes A.C.), and accessory glands (Ac. Gland). Boxplot bars represent 95%
 255 confidence intervals with lower and upper quartiles. Asterisk shows significant

256 differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) between the expression levels of each male tissue
257 compared to each female tissue.

258 **Effect of RPRC010099 and RPRC015421 silencing on male fertility**

259 RPRC010099 and RPRC015421 were silenced in 5th instar nymphs, and qPCR analyses
260 show that silencing reduced mRNA abundance significantly, to $13.9\% \pm 9.7\%$ for
261 RPRC010099 and $25.9\% \pm 6.9\%$ for RPRC015421 72 hours post-injections (Fig. 2A and
262 2B, respectively). The reduction of mRNA expression was also observed for
263 RPRC015421 after mating ($15.0\% \pm 2.0\%$; Fig. 2B), but not for RPRC010099. Silencing
264 of both RPRC010099 and RPRC015421 significantly reduced the oviposition of fertilized
265 females (Fig. 2C), with a median of 43 eggs/couple for the control treatment. In contrast,
266 the dsRNA treatment for RPRC010099 and RPRC015421 showed medians of 18 and 34
267 eggs/couple, respectively. On the other hand, silencing of RPRC010099 and
268 RPRC015421 did not impair eclosion rates (Fig. 2C).



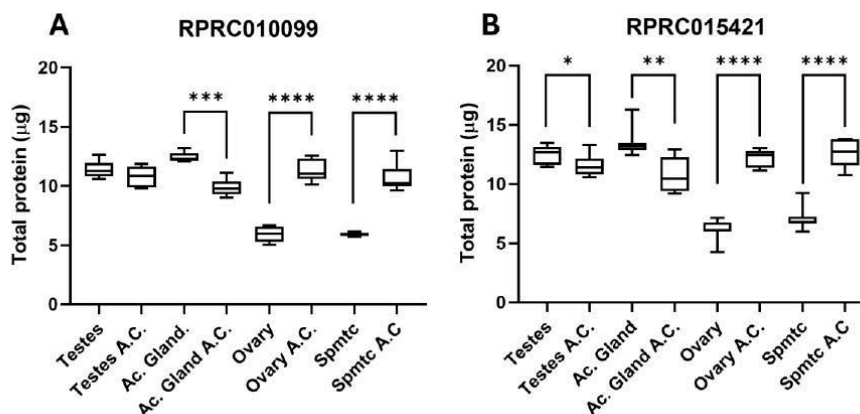
269

270 **Figure 2. Effect of dsRNA injection in *R. prolixus* male fertility.** A. Relative
 271 expression of RPRC010099 mRNA in males 72h post-injection and after copulation
 272 (mated) with bars representing mean \pm standard deviation. B. Relative expression of
 273 RPRC015421 mRNA in males 72h post-injection and after copulation (mated) with bars
 274 representing mean \pm standard deviation. C. Number of eggs laid per female fertilized by
 275 males of the control treatment (dsKer), dsRPRC010099, and dsRPRC015421 treated
 276 males, with bars representing median and 95% confidence intervals. D. Mean eclosion

277 rate for eggs laid by females fertilized with control males (dsKer), dsRPRC010099, and
278 dsRPRC015421 injected males (bars represent standard error).

279 **Quantification of RPRC010099 and RPRC015421 proteins in the reproductive**
280 **tissues of *R. prolixus*.**

281 The recombinant proteins RPRC010099 (24.7 kDa) and RPRC015421 (23 kDa) were
282 expressed in *E. coli* BL21-Star cells transformed with the plasmid pET-TEV28a, which
283 carries the gene of interest, upon IPTG induction. The proteins were purified by metal ion
284 affinity chromatography. Western blotting with anti-histidine antibody was performed to
285 confirm the proteins produced (Supplementary Material – SFig. 4A). Mice immunized
286 with the recombinant proteins showed seroconversion from the second dose, as shown in
287 (Supplementary Material – SFig. 4B). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)
288 performed on extracts of reproductive tissues from *R. prolixus* revealed significative
289 higher levels ($p < 0.01$) of RPRC010099 and RPRC015421 in male accessory glands
290 (respectively $12.5 \pm 0.4 \mu\text{g}$ and $13.5 \pm 1.1 \mu\text{g}$) than in testes (respectively $11.4 \pm 0.2 \mu\text{g}$
291 and $12.4 \pm 0.8 \mu\text{g}$) (Fig. 3), with a significant reduction in protein levels in the accessory
292 glands after copulation (Fig. 3) for both proteins. In females, we observed a significant
293 abundance increase ($p < 0.001$) of RPRC010099 (Fig. 3A) in ovaries (from $5.97 \pm 0.6 \mu\text{g}$
294 to $11.39 \pm 0.9 \mu\text{g}$) and spermathecae (from $5.94 \pm 0.1 \mu\text{g}$ to $10.77 \pm 1.0 \mu\text{g}$) after
295 copulation. Similar increase in protein levels after copulation was observed for
296 RPRC015421 (Fig. 3B), with an increase from $6.17 \pm 0.8 \mu\text{g}$ to $12.11 \pm 0.8 \mu\text{g}$ in ovaries
297 and from $7.06 \pm 0.9 \mu\text{g}$ to $12.62 \pm 1.1 \mu\text{g}$ in the spermathecae.

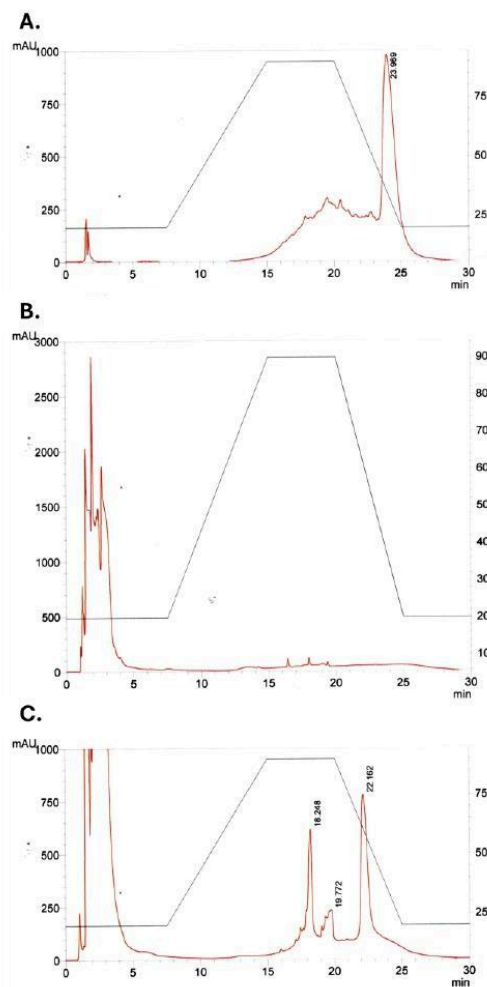


298

299 **Figure 3. Protein abundance in *R. prolixus* reproductive tissues.** Protein abundance
 300 was calculated relative to fluorescence of controls (20ug) for male reproductive tissues:
 301 testes and accessory glands (Ac. Gland.); and female ovaries and spermathecae (spmtc)
 302 before and 72h after fertilization (fert.). The boxplot displays the median values and 95%
 303 confidence intervals. Asterisks indicate significant differences of $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$
 304 (***) and $p < 0.0001$ (****).

305 **Biding apolipoproteins to arachidonic acid**

306 The quantification of arachidonic acid in solutions after mixture with recombinant
 307 apolipoproteins RPRC010099 and RPRC015421 was performed by HPLC. Our
 308 observations showed that arachidonic acid alone was detected after 23.969 min (Fig. 4A).
 309 However, none of the eicosanoids were observed after the interaction with RPRC015421
 310 (Fig. 4B), and a change in the interaction of the arachidonic acid with the HPLC column
 311 (from 23.969 to 22.162) was observed after the interaction with RPRC010099, suggesting
 312 a strong interaction of the arachidonic acid with both apolipoproteins.



313

314 **Figure 4. Binding assays of arachidonic acid and apolipoproteins.** All interaction
 315 assays were conducted using recombinant proteins RPRC010099 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and
 316 RPRC015421 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). **A.** Arachidonic acid 0.5 mM; **B.** Arachidonic acid 0.5 mM +
 317 RP15421 20 μg ; **C.** Arachidonic acid 0.5 mM + RP10099 40 μg . All chromatograms
 318 were recorded at 220 nm and each run recorded for 30 minutes.

319

320 **Discussion**

321 The hypothesis that apolipoproteins are potential carriers of prostaglandins builds upon a
322 long history of research on eicosanoids in insect reproduction. Loher & Edson (1973)
323 first demonstrated in the cricket *Teleogryllus commodus*, a male-derived factor
324 transferred during copulation stimulated oviposition in females. Subsequent work
325 identified this factor as PGE₂, which is synthesized from arachidonic acid and released
326 into the female hemolymph, where it acts on abdominal ganglia to trigger oviposition
327 behavior (Loher et al., 1981). Similar findings were later reported in *Triatoma infestans*,
328 a close relative of *R. prolixus*, where Brenner & Bernasconi (1989) showed that PGE₂
329 transferred during mating increased female egg production.

330 Despite these advances, the mechanism by which prostaglandins were stabilized and
331 transported from males to females remained unresolved. Prostaglandins and related
332 eicosanoids are notoriously unstable molecules, with half-lives ranging from seconds to
333 minutes due to enzymatic degradation, chemical reactivity, and a lack of vesicular storage
334 (Maddipati and Zhou, 2011). Their lipophilic nature also makes them poorly suited for
335 long-range transport in aqueous environments such as hemolymph. These properties
336 strongly suggest the need for carrier molecules to ensure stability and delivery. Previous
337 transcriptome studies have identified a new family of lipocalins in *R. prolixus*, the
338 apolipoproteins, which are primarily expressed in the testes. Such male-biased expression
339 patterns are a common feature of seminal fluid proteins (SFPs) across insects (Avila et
340 al., 2011; Hurtado et al., 2022; Sepil et al., 2019). In *Drosophila melanogaster*, for
341 example, dozens of SFPs produced in male accessory glands are transferred to females
342 during copulation, modulating ovulation, oviposition, sperm storage, and even female
343 post-mating behavior (Avila et al., 2011; Chapman and Davies, 2004). In this context, we
344 hypothesized that *R. prolixus* testis-specific apolipoproteins could play a role in male
345 fertility, and our results position apolipoproteins RPRC010099 and RPRC015421 as
346 strong candidates to fulfill this role.

347 Here, we provide the first evidence that apolipoproteins RPRC010099 and RPRC015421
348 function as male fertility factors in the kissing bug, *Rhodnius prolixus*. The most striking
349 result is that RNAi-mediated silencing of these genes in males significantly reduced

350 oviposition by mated females, without affecting egg viability. This pattern points
351 specifically to a defect in oviposition induction rather than in gamete production or
352 embryogenesis, which is consistent with SFPs. These findings add a new dimension to
353 the biology of lipocalins in kissing bugs, a protein family previously associated primarily
354 with blood-feeding physiology in hematophagous insects (Andersen et al., 2005; Araujo
355 et al., 2009; Francischetti et al., 2002; Ribeiro, 1998). The RNAi experiments presented
356 here provide a direct, reproducible functional link between these proteins and male
357 fertility. While other experimental approaches (expression profiling, molecular docking,
358 protein transfer assays, and binding assays) were primarily designed to explore
359 underlying mechanisms, the silencing data alone establish a causal relationship between
360 apolipoprotein function and reproductive success in *R. prolixus*.

361 Although the roles of both apolipoproteins in inducing oviposition were clear from RNAi
362 experiments, the mechanism of action of these proteins remained unclear. Bioinformatic
363 docking analyses predicted that RPRC010099 has a high affinity for prostaglandin E2
364 (PGE2), whereas RPRC015421 showed stronger binding to other eicosanoids such as
365 eicosapentaenoic acid (a precursor to other eicosanoids). This suggests that the two
366 apolipoproteins may not be redundant but instead may serve complementary roles in
367 transporting different lipid mediators. Such specialization is reminiscent of *Drosophila*
368 SFPs, in which multiple proteins often act synergistically, either by stabilizing one
369 another or by targeting different steps in reproductive physiology (Findlay et al., 2008).

370 Immunoassays revealed an increase in apolipoprotein abundance in female reproductive
371 tissues following copulation, despite no detectable rise in female mRNA levels.

372 Concomitantly, a reduction of both apolipoproteins in male accessory glands was also
373 observed after copulation. These observations strongly suggest that the proteins
374 themselves are transferred from males to females during mating, rather than an increase
375 in protein production by females. Transfer of intact proteins from males to females is a
376 well-established phenomenon in many insect species. In mosquitoes such as *Anopheles*
377 *gambiae*, males produce a mating plug containing the hormone 20-hydroxyecdysone,
378 which is transferred to females and modulates their post-mating physiology (Gabrieli et
379 al., 2014; Pondeville et al., 2008). In *Drosophila*, more than 100 SFPs are transferred,

380 some of which bind directly to female reproductive tissues and regulate sperm storage or
381 oviposition (Avila et al., 2011; Findlay et al., 2008; Sirot et al., 2009; White and Wolfner,
382 2022). One limitation of our study is that, while immunoassays clearly detect
383 apolipoproteins in females after mating (Sirot et al., 2009), it is not possible to quantify
384 exactly how much protein is derived from males. The most rigorous approach would be
385 to generate genetically modified *R. prolixus* expressing apolipoproteins fused to a
386 fluorescent reporter (e.g., GFP). Such transgenic tools, however, are not established for
387 kissing bugs. Nonetheless, the absence of female gene induction and the sharp increase in
388 protein levels after copulation together provide evidence that these proteins are indeed
389 transferred from males. Binding assays also suggest a high affinity of the apolipoproteins
390 for arachidonic acid (the direct precursor of PGE2), reinforcing the argument that both
391 proteins play a role in carrying eicosanoids to females. However, further assays are
392 needed to determine which of the eicosanoids (PGE2, eicosapentaenoic acid, and
393 arachidonic acid) has the greatest affinity for each protein.

394 Nonetheless, the results presented here collectively support the proposed role of
395 apolipoproteins as carriers of eicosanoids from males to females, inducing oviposition in
396 mated females. If these proteins are absent or reduced, the signaling molecules may not
397 reach the female reproductive system in sufficient amounts, thereby failing to trigger
398 normal oviposition behavior. The fact that eclosion rates were unaffected further supports
399 the notion that these proteins do not directly influence sperm function or egg viability but
400 rather act as signaling intermediaries in post-mating reproductive physiology.

401 The identification of apolipoproteins as fertility factors in *R. prolixus* contributes to a
402 broader understanding of male contributions to insect reproduction. Our findings in *R.*
403 *prolixus* provide a mechanistic advance by identifying specific carrier proteins that may
404 facilitate this transfer. The role of lipid-binding proteins in reproduction has also been
405 documented in other systems. For example, lipophorins, major lipid carriers in insect
406 hemolymph, are known to transport juvenile hormone and other lipophilic molecules
407 (Soulages and Wells, 1994). Also, the importance of odorant binding proteins (proteins
408 from the lipocalin family) for *D. melanogaster* male fertility has been reported (Brown et
409 al., 2023). Apolipoproteins, as members of the lipocalin superfamily, share structural

410 features that allow them to bind and transport small hydrophobic ligands (Flower, 1996).
411 Their involvement in reproduction thus represents a logical, though previously
412 unrecognized, extension of their biochemical capabilities.

413 The suggested functional divergence between the two apolipoproteins remains an open
414 question. RPRC010099 appears to specialize in binding prostaglandins, consistent with a
415 direct role in oviposition induction. RPRC015421, by contrast, showed predicted affinity
416 for other eicosanoids. One possibility is that it transports precursors or alternative
417 signaling molecules that complement prostaglandin signaling. Another possibility is that
418 the two proteins act redundantly to ensure robust signaling, with overlapping but not
419 identical ligand specificities. Functional redundancy is a common feature in insect
420 reproductive proteins, which often evolve rapidly under the pressure of sexual selection
421 (Dhole and Servedio, 2014; Sirot, 2019). Further biochemical and functional assays will
422 be necessary to clarify the precise roles of each protein.

423 While our findings provide strong evidence for the involvement of apolipoproteins in *R.*
424 *prolixus* reproduction, several limitations should be acknowledged. First, definitive proof
425 of protein transfer from males to females will require the development of transgenic tools
426 for protein tagging in kissing bugs. Second, the functional divergence between
427 RPRC010099 and RPRC015421 is not yet fully understood, and future work should
428 address whether they act redundantly or synergistically.

429 Despite these limitations, our study opens several promising avenues for further research.
430 One is to investigate whether similar apolipoproteins exist and function in other
431 triatomines, including *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus*. Another approach
432 is to investigate whether apolipoproteins play a role in reproduction in non-
433 hematophagous insects, suggesting a conserved evolutionary function. Ultimately,
434 understanding the molecular mechanisms of male–female interactions in *R. prolixus*
435 could inform the development of novel vector control strategies, such as targeting male
436 fertility factors to reduce population growth.

437 **Conclusions**

438 In summary, our study demonstrates that two apolipoproteins, RPRC010099 and
439 RPRC015421, have a role in male fertility in *R. prolixus*. RNAi silencing experiments
440 provide direct evidence of their functional importance, while expression analyses,
441 molecular docking, and protein transfer assays suggest that they act as carriers of
442 eicosanoids during copulation. By stabilizing and delivering prostaglandins and related
443 molecules, these proteins may mediate the long-recognized phenomenon of male-induced
444 oviposition in kissing bugs. This work not only identifies a novel reproductive role for
445 apolipoproteins but also contributes to the broader understanding of insect reproductive
446 biology and vector physiology.

447 **Supplementary Files**

448 **Supplementary Material – Figures 1 to 4.** Synteny, CDS and protein alignments,
449 protein structure predictions, and protein expression

450 **Supplementary Material – Raw Data.** qPCR raw results, oviposition tables, and
451 immunoassay raw results.

452 **Acknowledgments**

453 We would like to acknowledge the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia –
454 Entomologia Molecular (INCT-EM), Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa
455 (FUNDEP), and the Universidade Federal de Minas Gerais for providing support for this
456 research.

457 **Author Contributions**

458 Conceptualization: DVS, NFG, and LBK; Bioinformatic Analyses: DVS, NFG and LBK;
459 Expression analyses and RNAi experiments: DVS, LBSA, and MCRM; Protein
460 expression and immunoassays: DVS, JCP, LGFM, TMC, and RTF; Data Analysis: DVS,
461 GCDP, MRVS, MHP, NFG, and LBK; Resources: GCDP, MHP, RTF, NFG, and LBK;
462 Supervision: NGF and LBK; Writing – Original draft: DVS and LBK; Writing – Review
463 and editing: GCDP, MRVS, MHP, NFG, and LBK.

464 **Funding sources**

465 This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
466 (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ),
467 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de
468 Pós-Graduação em Parasitologia, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
469 e Tecnológico (CNPq).

470 **References**

- 471 Andersen, J.F., Gudderra, N.P., Francischetti, I.M.B., Ribeiro, J.M.C., 2005. The role of
472 salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem*
473 *Physiol* 58, 97–105. <https://doi.org/10.1002/ARCH.20032>
- 474 Araujo, R.N., Soares, A.C., Paim, R.M.M., Gontijo, N.F., Gontijo, A.F., Lehane, M.J.,
475 Pereira, M.H., 2009. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by
476 the triatomine bug *Rhodnius prolixus* {(Reduviidae:} Triatominae). *Insect Biochem*
477 *Mol Biol* 39, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.10.002>
- 478 Avila, F.W., Sirot, L.K., Laflamme, B.A., Rubinstein, C.D., Wolfner, M.F., 2011. Insect
479 seminal fluid proteins: Identification and function. *Annu Rev Entomol* 56, 21–40.
480 <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-120709-144823/CITE/REFWORKS>
- 481 Azambuja, P., Garcia, E.S., Waniek, P.J., Vieira, C.S., Figueiredo, M.B., Gonzalez, M.S.,
482 Mello, C.B., Castro, D.P., Ratcliffe, N.A., 2017. *Rhodnius prolixus*: from
483 physiology by Wigglesworth to recent studies of immune system modulation by
484 *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *J Insect Physiol*.
485 <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.11.006>
- 486 Brenner, R.R., Bernasconi, A., 1989. Prostaglandin biosynthesis in the gonads of the
487 hematophagous insect *Triatoma infestans*. *Comparative Biochemistry and Physiology*
488 *Part B: Comparative Biochemistry* 93, 1–4. [https://doi.org/10.1016/0305-](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90207-1)
489 [0491\(89\)90207-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90207-1)
- 490 Brown, N.C., Gordon, B., McDonough-Goldstein, C.E., Misra, S., Findlay, G.D., Clark,
491 A.G., Wolfner, M.F., 2023. The seminal odorant binding protein Obp56g is required

- 492 for mating plug formation and male fertility in *Drosophila melanogaster*. *Elife* 12.
493 <https://doi.org/10.7554/ELIFE.86409>
- 494 Chapman, T., Davies, S.J., 2004. Functions and analysis of the seminal fluid proteins of
495 male *Drosophila melanogaster* fruit flies. *Peptides (N.Y.)* 25, 1477–1490.
496 <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2003.10.023>
- 497 Davis, M.W., Jorgensen, E.M., 2022. ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA
498 Manipulation and Visualization Program. *Frontiers in Bioinformatics* 2, 818619.
499 <https://doi.org/10.3389/FBINF.2022.818619/BIBTEX>
- 500 Dhole, S., Servedio, M.R., 2014. Sperm competition and the evolution of seminal fluid
501 composition. *Evolution (N Y)* 68, 3008–3019. <https://doi.org/10.1111/EVO.12477>
- 502 Dias, J.C.P., Silveira, A.C., Schofield, C.J., 2002. The impact of Chagas disease control
503 in Latin America - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 603–612.
504 <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500002>
- 505 Findlay, G.D., Yi, X., MacCoss, M.J., Swanson, W.J., 2008. Proteomics Reveals Novel
506 *Drosophila* Seminal Fluid Proteins Transferred at Mating. *PLoS Biol* 6, e178.
507 <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0060178>
- 508 Flower, D.R., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical*
509 *Journal* 318, 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj3180001>
- 510 Francischetti, I.M., Andersen, J.F., Ribeiro, J.M., 2002. Biochemical and functional
511 characterization of recombinant *Rhodnius prolixus* platelet aggregation inhibitor 1
512 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine
513 nucleotides. *Biochemistry* 41, 3810–3818. <https://doi.org/bi011015s> [pii]
- 514 Gabrieli, P., Kakani, E.G., Mitchell, S.N., Mamei, E., Want, E.J., Anton, A.M., Serrao,
515 A., Baldini, F., Catteruccia, F., 2014. Sexual transfer of the steroid hormone 20E
516 induces the postmating switch in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National*
517 *Academy of Sciences* 111, 16353–16358.
518 <https://doi.org/10.1073/PNAS.1410488111>

- 519 Guedes, I.A., Pereira da Silva, M.M., Galheigo, M., Krempser, E., de Magalhães, C.S.,
520 Correa Barbosa, H.J., Dardenne, L.E., 2024. DockThor-VS: A Free Platform for
521 Receptor-Ligand Virtual Screening. *J Mol Biol* 436, 168548.
522 <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2024.168548>
- 523 Hashimoto, K., Schofield, C.J., 2012. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central
524 America. *Parasites & Vectors* 2012 5:1 5, 1–10. [https://doi.org/10.1186/1756-3305-](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-45)
525 5-45
- 526 Hurtado, J., Almeida, F.C., Belliard, S.A., Revale, S., Hasson, E., 2022. Research gaps
527 and new insights in the evolution of *Drosophila* seminal fluid proteins. *Insect Mol*
528 *Biol* 31, 139–158. <https://doi.org/10.1111/IMB.12746>
- 529 Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O.,
530 Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer,
531 C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain,
532 R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M.,
533 Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals,
534 O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate
535 protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589.
536 <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03819-2;TECHMETA>
- 537 LOHER, W., EDSON, K., 1973. The effect of mating on egg production and release in
538 the cricket *Teleogryllus commodus*. *Entomol Exp Appl* 16, 483–490.
539 <https://doi.org/10.1111/J.1570-7458.1973.TB00300.X>
- 540 Loher, W., Ganjian, I., Kubo, I., Stanley-Samuelson, D., Tobe, S.S., 1981.
541 Prostaglandins: Their role in egg-laying of the cricket *Teleogryllus commodus*.
542 *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78, 7835–7838.
543 <https://doi.org/10.1073/PNAS.78.12.7835>
- 544 Maddipati, K.R., Zhou, S.L., 2011. Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids
545 in tissue culture media. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 94, 59–72.
546 <https://doi.org/10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2011.01.003>

- 547 Paim, R.M.M., Araujo, R.N., Lehane, M.J., Gontijo, N.F., Pereira, M.H., 2013. Long-
548 term effects and parental RNAi in the blood feeder *Rhodnius prolixus* (Hemiptera;
549 Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol* 43, 1015–20.
550 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.08.008>
- 551 Poiani, A., 2006. Complexity of seminal fluid: A review. *Behav Ecol Sociobiol* 60, 289–
552 310. <https://doi.org/10.1007/S00265-006-0178-0/FIGURES/1>
- 553 Pondeville, E., Maria, A., Jacques, J.C., Bourgouin, C., Dauphin-Villemant, C., 2008.
554 *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-
555 hydroxyecdysone to females during mating. *Proceedings of the National Academy*
556 *of Sciences* 105, 19631–19636. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0809264105>
- 557 Ribeiro, J.M.C., 1998. *Rhodnius prolixus* salivary nitrophorins display heme-peroxidase
558 activity. *Insect Biochem Mol Biol* 28, 1051–1057. [https://doi.org/10.1016/S0965-](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00096-4)
559 [1748\(98\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00096-4)
- 560 Santos, D. V., Gontijo, N.F., Pessoa, G.C.D., Sant’Anna, M.R.V., Araujo, R.N., Pereira,
561 M.H., Koerich, L.B., 2022. An updated catalog of lipocalins of the chagas disease
562 vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol* 146.
563 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103797>
- 564 Schjenken, J.E., Robertson, S.A., 2020. The Female Response to Seminal Fluid.
565 <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2018> 100, 1077–1117.
566 <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00013.2018>
- 567 Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative
568 CT method. *Nature Protocols* 2008 3:6 3, 1101–1108.
569 <https://doi.org/10.1038/NPROT.2008.73>
- 570 Sepil, I., Hopkins, B.R., Dean, R., Thézénas, M.L., Charles, P.D., Konietzny, R., Fischer,
571 R., Kessler, B.M., Wigby, S., 2019. Quantitative Proteomics Identification of
572 Seminal Fluid Proteins in Male *Drosophila melanogaster*. *Molecular & Cellular*
573 *Proteomics* 18, S46–S58. <https://doi.org/10.1074/MCP.RA118.000831>

- 574 Sirot, L.K., 2019. On the evolutionary origins of insect seminal fluid proteins. *Gen Comp*
575 *Endocrinol* 278, 104–111. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2019.01.011>
- 576 Sirot, L.K., Buehner, N.A., Fiumera, A.C., Wolfner, M.F., 2009. Seminal fluid protein
577 depletion and replenishment in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*: An ELISA-
578 based method for tracking individual ejaculates. *Behav Ecol Sociobiol* 63, 1505–
579 1513. <https://doi.org/10.1007/S00265-009-0806-6/FIGURES/3>
- 580 Soulages, J.L., Wells, M.A., 1994. Effect of diacylglycerol content on some
581 physicochemical properties of the insect lipoprotein, lipophorin. Correlation with the
582 binding of apolipoprotein-III. *Biochemistry* 33, 2356–2362.
583 <https://doi.org/10.1021/BI00175A002>
- 584 White, M.A., Wolfner, M.F., 2022. The Effects of Male Seminal Fluid Proteins on
585 Gut/Gonad Interactions in *Drosophila*. *Insects* 2022, Vol. 13, Page 623 13, 623.
586 <https://doi.org/10.3390/INSECTS13070623>
- 587 Wigglesworth, V.B., 1936. The function of the Corpus allatum in the growth and
588 reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quarterly Journal of Microscopical*
589 *Science* 79, 91–121.
- 590

ANEXO C – Artigo publicado na *Insect Biochemistry and Molecular Biology*

Insect Biochemistry and Molecular Biology 146 (2022) 103797



Contents lists available at ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibmbAn updated catalog of lipocalins of the chagas disease vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae)

Daniela V. Santos, Nelder F. Gontijo, Grasielle C.D. Pessoa, Mauricio R.V. Sant'Anna, Ricardo N. Araujo, Marcos H. Pereira, Leonardo B. Koerich*

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Lipocalins
Haematophagy
Transcriptome
Triatominae
Rhodnius prolixus

ABSTRACT

The haematophagy process by arthropods has been one of the main targets of studies in the parasite-host interaction, and the kissing-bug *Rhodnius prolixus*, vector of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, has been one of the main models for such studies. Still in the 1980s, it was identified that among the salivary proteins for disrupting vertebrate host homeostasis, lipocalins were among the most relevant proteins for this process. Since then, 30 lipocalins have been identified in the salivary glands of *R. prolixus*, that promotes vasodilatation, prevents inflammation, act as anticoagulants and inhibits platelet aggregation. The present work aims to identify new lipocalins from *R. prolixus*, combining transcriptome and genome data. Identified new genes were mapped and had their structure annotated. To infer an evolutionary relationship between lipocalins, and to support the predicted functions for each lipocalin, all amino acid sequences were used to construct phylogenetic trees. We identified a total of 29 new lipocalins, 3 new bioaminogenic-binding proteins (which act to inhibit platelet aggregation and vasodilatation), 9 new inhibitors of platelet aggregation, 7 new apolipoproteins and 10 lipocalins with no putative function. In addition, we observed that several of the lipocalins are also expressed in different *R. prolixus* tissues, including gut, central nervous system, antennae, and reproductive organs. In addition to newly identified lipocalins and a mapping the new and old lipocalins in the genome of *R. prolixus*, our study also carried out a review on functional status and nomenclature of some of the already identified lipocalins. Our study reinforces that we are far from understanding the role of lipocalins in the physiology of *R. prolixus*, and that studies of this family are still of great relevance.

1. Introduction

The triatomine *Rhodnius prolixus* is one of the most important biological vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease in Latin America (Coura and Borges-Pereira, 2010; Petherick, 2010). Both immature forms (from the first nymphal stage) and adults feed on blood. In addition to its vector importance, *Rhodnius prolixus* has been a model species for the study of insect physiology since the 1930s (Beament, 1980; Wigglesworth, 1936). Regarding the physiology of haematophagy, saliva and its anti-hemostatic molecular components have been the target of increasingly elucidative studies, with major contributions from the therapeutic and pharmacological point of view (Ribeiro, 1995; Santiago et al., 2020). For haematophagy to work, some challenges must be faced. Vertebrate animals developed, throughout their evolutionary process, complex physiological responses to prevent blood loss, such as hemostasis, inflammation, and the

immune response (Mans, 2011; Ratnoff, 1987). However, hematophagous insects have an arsenal of chemical substances present in their saliva capable of overcoming the challenges posed by their hosts (Bowman et al., 1997; Champagne et al., 1995; Mans, 2011; Ribeiro and Francischetti, 2003), and amongst these molecules are the lipocalins.

Lipocalins are proteins characterized by the presence of a tertiary β -barrel structure formed by six or eight β -sheet polypeptide chains, which interact with each other by hydrogen bonds (Grzyb et al., 2006). The entire tertiary structure of the β -barrel is stabilized by one, two or three disulfide bridges, forming a kind of barrel that is internally coated with hydrophobic amino acid residues. This conformation gives lipocalins its main biochemical characteristic: the ability to interact and carry small hydrophobic molecules (Flower, 2000; Grzyb et al., 2006). In several organisms, lipocalins associated with important biological processes, such as immune response, retinol transport, biological synthesis of prostaglandins and its transport, pheromones transport, cell

* Corresponding author.

E-mail address: lbkoerich@ufmg.br (L.B. Koerich).<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103797>

Received 17 April 2022; Received in revised form 24 May 2022; Accepted 25 May 2022

Available online 28 May 2022

0965-1748/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

and tissue maturation, and sperm-egg interaction have been described (Åkerstrom et al., 2000; Flower, 1996; Grzyb et al., 2006). Triatomines developed along the evolutionary process, salivary lipocalins with anti-hemostatic functions, such as vasodilation, anti-platelet aggregation and anti-blood clotting (Andersen et al., 2005; Noeske-Jungblut et al., 1994, 1995; Ribeiro et al., 1990). In *Rhodnius prolixus*, 30 salivary lipocalins have already been described, including: fourteen nitrophorins (Champagne et al., 1995; Mesquita et al., 2015; Ribeiro et al., 2004) one amine binding proteins (Ribeiro et al., 2004; Xu et al., 2013); seven platelet aggregation inhibitors (Francischetti et al., 2000; Ribeiro et al., 2004); two pallipidins; two procalins and four triabins (Ribeiro et al., 2004).

Nitrophorins (NP) are 20 kDa lipocalins that have a heme ferric group (FerIII) in their β -barrel structure acting as vasodilators by releasing nitric oxid (NO) or histamine binding during blood feeding (Ribeiro et al., 1990), and as anticoagulant (Ribeiro et al., 1995). Biogenic amine binding proteins (BABPs) are proteins that bind serotonin, as well as epinephrine and norepinephrine, preventing it from binding to the 5-HT receptor, which results in the inhibition of smooth muscle contraction (Mans et al., 2007, 2008; Xu et al., 2013). Platelet aggregation inhibitory lipocalins (PAI) are 19 kDa proteins that act on ADP preventing the activation of signaling pathways that lead to the functional expression of the fibrinogen receptor on platelets, thus impairing platelet aggregation (Francischetti et al., 2000). However, recent studies showed that *R. prolixus* PAI-4 is a cysteinyl leukotriene binding protein, with a role as an antiinflammatory rather than platelet inhibitory function, being renamed as LTBP1 (Jablonka et al., 2016). Similarly, triabins impairs platelet aggregation induced by thrombin (Fuentes-Prior et al., 1997; Noeske-Jungblut et al., 1995). Pallipidind was firstly describes as platelet aggregation inhibitors induced by collagen (Noeske-Jungblut et al., 1994). Conversely, a study of *Dipetalogaster maxima* dipetalodipin suggested that pallipidins inhibits platelet aggregation by binding the platelet agonist thromboxane A2 (Assumpção et al., 2010). Finally, procalins are salivary lipocalins, with 18–20 kDa, responsible for strong allergic reactions in humans bitten by *Triatoma protracta*, but without described function so far (Paddock et al., 2001). Besides the role on haematophagy, there are many other lipocalins that are classified in sub-families, such as Odorant Biding Proteins (OBPs), that have roles on insect behaviour (e.g., host identification and insect-insect communication) and central nervous system (CNS) physiology.

Spite the importance of lipocalins in triatomine physiology, the transcriptome and genome of *R. prolixus* added little knowledge to this family of proteins (Mesquita et al., 2015; Ribeiro et al., 2014). Thus, we decided to revise the previous works on lipocalins in the light of the available genome and transcriptome. We were able to map most of the known lipocalins to the *R. prolixus* genome and we identified 29 new lipocalins. We also found that many of the salivary lipocalins are also expressed in other tissues, such as testes, ovary, gut, malphigian tubules and fat body, which might indicate different functions from those expressed in salivary glands.

2. Material and methods

2.1. The transcriptome of *R. prolixus*

For the present study, transcriptome sequences of anterior gut, posterior gut, rectum, testis, ovary, fat body and malphigian tubules (accession numbers PRJNA71323 and LIBEST_020692) were used as basis for the identification of new lipocalins. Gene expression and function data were acquired from supplementary material in the article of the transcriptome of *R. prolixus* (Ribeiro et al., 2014). The initial identification of Lipocalins in the supplementary material was carried out using keywords as search, namely: lipocalin, nitrophorin, platelet aggregation inhibitor, PAI, triabin, pallipidin. For this study, we excluded OBPs from our search, since our aim was to identify lipocalins

with putative role in haematophagy. We also checked for lipocalins and expression data in the transcriptomes of salivary glands (Ribeiro et al., 2004; accession SAMN00154380), antennae (Latorre-Estivalis et al., 2017; accession PRJEB44111) and central nervous system (Ons et al., 2016; available at VectorBase).

2.2. Structural annotation of lipocalins expressed in *R. prolixus*

For the structural annotation of lipocalins, lipocalins already sequenced and characterized in *R. prolixus* were used as a model (Supplementary Table 1 in Supplementary Material). The genomic sequences were first identified by homology using the BLASTn tool (Word 26 parameters, e-value 0.00001) having the transcript as a template (query) and the genome (version 3.1) as a target. Results were filtered according to coverage (>90%) and nucleotide identity (>98%). Transcriptome sequences were also blasted (BLASTp, Word parameter 3, e-value 0.00001, amino acid identity >98%) against *R. prolixus* annotated proteins (version 3.3.1) to check if there were already annotated proteins for transcriptome sequences. All BLASTs were performed locally. In cases where a proteome protein has been identified as belonging to a transcript, the annotated sequence (RPRCXXXX) is used as the reference sequence. In other cases, we kept the transcriptome nomenclature (rp.asb-XXXX). Also, all identified lipocalins were named according to the putative function (e.g. Nitrophorin, PAI, triabin, etc.) returned by reciprocal BLAST.

In cases where the genomic region of the transcript was identified, but there was no annotated protein, manual annotation of the protein was performed with the GeneWise2 tool (www.ebi.ac.uk) (Bimney et al., 2004), being used as a model the closest protein identified in the evolutionary analyses. The genomic region was identified by BLAST and the sequence was obtained containing 5000 more nucleotides at the 5' and 3' ends, using the BLAST information to correctly obtain the original sequence or its reverse complement (in cases where we identified that the protein was encoded in the negative frame). The GeneWise parameters were kept as the default except for the splice-site parameter where "modeled" was chosen. The active domains and site of the annotated proteins were identified by analysis in the Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

2.3. Function prediction of annotated lipocalins

To predict the function and evolutionary relationship between lipocalins expressed in *R. prolixus*, the amino acid sequences of all lipocalins with function already described (in *R. prolixus* and other triatomines) were obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) and used, together with the sequences of those identified in the transcriptome, to analyze the evolutionary relationships. The process was carried in four steps: *i*) Reciprocal BLAST to ascertain the most likely paralogous proteins with known function (all proteins were named after its orthologous counterpart with the "-like" suffix added); *ii*) Phylogenetic analysis with all annotated proteins; *iii*) Phylogenetic analysis by functional groups (e.g. nitrophorins, BABPs, triabins, etc). For all phylogenetic analysis, proteins were aligned with Muscle (EDGAR, 2004). The MEGAX program (Kumar et al., 2018) was used, which inferred the evolutionary history among all amino acid sequences using the Neighbor-Joining method (Bootstrap with 10000 replicas, Poisson correction and rate variation among sites modeled with a gamma distribution). Analyses were performed with complete deletion or pairwise deletion of the ambiguous sites depending on the group of proteins to be studied and the choice of treatment for positions without information was specified in the legend of the respective figures. We also performed a citolocalization prediction for each protein using DeepLoc (Almagro Armenteros et al., 2017). Final functional prediction was defined by looking at all evidence with priority to: *i*) phylogeny results (bootstrap >80); *ii*) phylogeny + reciprocal blast coherence (ID% >50% and bootstrap values > 30); *iii*) reciprocal blast results (ID% > 70%).

Table 1
An updated catalog of *Rhodnius prolixus* lipocalins.

Main role	Proposed mechanism	Updated name	Former name	Accession Number	Cytolocalization	Expressed in												Original Reference	
						Im	SG	AM	PM	RT	MT	FB	Ov	Te	CN	Ant			
Vasodilator	Nitric Oxide carrier and histamine binding	Nitrophorin-1	Nitrophorin-1	Q25239	Extracellular													Champagne et al., 1995	
		Nitrophorin-3	Nitrophorin-3	Q94713	Extracellular													Champagne et al., 1995	
		Nitrophorin-4	NP-1 in genome	RPRC000223	Not found	Extracellular												Andersen et al., 1998	
		Nitrophorin-5	Nitrophorin-5	Not found	Not found	Extracellular												Moreira et al., 2003	
		Nitrophorin-7	Nitrophorin-7	Q6PQK2	Extracellular													Ribeiro et al., 2004	
		Nitrophorin-8		RPRC000498	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
		Nitrophorin-9		RPRC000498	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
		Nitrophorin-10		RPRC000061	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
		Nitrophorin-11		RPRC000367	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
		Nitrophorin-12		RPRC000389	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
		Nitrophorin-13		RPRC000034	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
		Nitrophorin-14		RPRC000077	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
		Anticoagulant	activation of Factor X	Nitrophorin-2	NP-2 and NP-6	RPRC000072	Extracellular												Ribeiro et al., 1995; Moreira et al., 2003
		Vasodilator and Platelet Aggregation inhibitor	Nor-epinephrin, epinephrin and serotonin binding	BABP-1	BABP	AAQ25746	Extracellular												Andersen et al., 2003
BABP-2				rp_asb-48128	Extracellular														
BABP-3	Nitrophorin			RPRC000114	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
BABP-4	Nitrophorin			RPRC000313	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
BABP-5	Nitrophorin			RPRC010481	Extracellular													Mesquita et al., 2015	
BABP-6				rp_asb-85900	Extracellular														
Anti-inflammatory	binding cysteinyl leukotrienes	LTBP-1	LTBP-1	AAQ20818	Extracellular												Ribeiro et al., 2004; Jolenska et al., 2016		
Platelet Aggregation inhibitors	Ligation to ADP	PAI-1	PAI-1	RPRC002102	Extracellular													Francischetti, 2000	
		PAI-2		RPRC000175	Extracellular													Francischetti, 2000	
		PAI-3	PAI-3	AAQ20817	Extracellular													Ribeiro et al., 2004	
		PAI-6	PAI-6	rp_asb-104785	Extracellular													Ribeiro et al., 2004	
		PAI-7	PAI-7	RPRC000463	Extracellular													Ribeiro et al., 2004	
		PAI-8		RPRC000677	Extracellular														
		PAI-9		RPRC000446	Extracellular														
		PAI-10		RPRC000347	Extracellular														
		PAI-11		rp_asb-65689	Extracellular														
		Pallipidin-1	Pallipidin-1	RPRC000012	Extracellular														
	Pallipidin-2	Pallipidin-2	AAQ20826	Extracellular														Ribeiro et al., 2004	
	Pallipidin-3		RPRC002137	Extracellular															
	Triabin-1	Triabin-1	RPRC002583	Extracellular														Ribeiro et al., 2004	
	Triabin-2	Triabin-2	RPRC012954	Extracellular														Ribeiro et al., 2004	
	Triabin-3	Triabin-3	RPRC000147	Extracellular														Ribeiro et al., 2004	
	Triabin-4	Triabin-4	RPRC002583	Extracellular														Ribeiro et al., 2004	
	Triabin-5		RPRC000275	Extracellular															
	Triabin-6		rp_asb-105577	Extracellular															
	Triabin-7	PAI-5	RPRC002584	Extracellular														Ribeiro et al., 2004	
Triabin-8	Procalin-1	RPRC010444	Extracellular														Ribeiro et al., 2004		
Triabin-9	Procalin-2	AQ208281	Extracellular														Ribeiro et al., 2004		
Unknown	Unknown																		
Unknown	Unknown	Apolipoprotein-1		RPRC010999	Lys/Vacuole														
		Apolipoprotein-2		RPRC004179	Extracellular														
		Apolipoprotein-3		RPRC004463	Extracellular														
		Apolipoprotein-4		RPRC003387	Extracellular														
		Apolipoprotein-5		RPRC000014	Extracellular														
		Apolipoprotein-6		RPRC015421	Extracellular														
		Apolipoprotein-7		rp_asb-6771	Extracellular														
		Rp-Lipocalin-1		RPRC000250	Extracellular														
		Rp-Lipocalin-2		RPRC000537	Extracellular														
		Rp-Lipocalin-3		RPRC002646	Extracellular														
		Rp-Lipocalin-4		rp_asb-33413	Extracellular														
		Rp-Lipocalin-5		RPRC002647	Extracellular														
		Rp-Lipocalin-6		RPRC000603	Extracellular														
		Rp-Lipocalin-7		RPRC000163	Extracellular														
		Rp-Lipocalin-8		RPRC010695	Mitochondrion														
		Rp-Lipocalin-9		RPRC000438	Extracellular														
		Rp-Lipocalin-10		RPRC000339	Mitochondrion														

3. Results

3.1. Identification and mapping of new and known lipocalins

As a first step in this review, we carried out the mapping of the 23 *R. prolixus* lipocalins identified in the pre-genomic years (before 2015) to the genome and proteome of the insect (Supplementary Table 1 in Supplementary Material), as this work had not yet been carried out. Thus, it was possible to map, both the genome and the proteome, 13 of the 23 lipocalins already described. Nine of the lipocalins already described mapped only to the genome, with no corresponding proteins annotated in the insect proteome. We identified that the lack of annotation occurred because of gaps (the case of NP-1), genome fragmentation (the case of NP-7 and LTBP1) or missannotation (PAI-3, Pallipidin-2 and BABP-1). Four lipocalins could not be mapped in the genome (NP-3, NP-5, NP-6 and Procalin-2). Our results also suggest that NP-1 was incorrectly annotated as RPRC000114 in the *R. prolixus* genome (Mesquita et al., 2015).

The transcriptome of *R. prolixus* generated a total of 25,673 transcripts (Ribeiro et al., 2014). The supplementary excel table of the manuscript classified 112 transcripts as lipocalins and it was possible to classify them initially as: 41 nitrophorins (NP), 22 PAI, 12 pallidipines, 24 triabines, 11 apolipoproteins (APO) and 1 unclassified lipocalin. We aligned each of the 112 transcripts to the genome and annotated proteins (Supplementary Tables 2–7). We were not able to map (either to genome or to annotated proteins) 36 transcripts and they were discarded from future analysis. We also found that 15 transcripts contained many

stop-codons in the sequence. These transcripts were classified as pseudogenes and were excluded from future analysis. Other 15 transcripts aligned to the same locus as other transcripts and were classified as possible isoforms. One transcript generated a very short protein (15 amino acids) and was excluded from future analysis. The remaining 44 transcripts were analyzed by reciprocal blast against annotated proteins of *R. prolixus*, *D. melanogaster*, *Tribolium castaneum*, *Triatoma pallidipenis* (*Meccus pallidipenis*) and *Cimex lectularis*. Based on the reciprocal blast result (Supplementary Table 8) we reclassified our proteins: 13 NP-like proteins; 5 APO-like; 5 PAI-like; 1 Pallipidin-like; 5 Triabin-like and 1 biogenic amine-binding protein (BABP). Twelve proteins showed no similarities with annotated proteins and were classified as RP-lipocalins. Finally, one transcript (rp_asb-105554) did not show any similarity with lipocalins (no lipocalin domain found) and was discarded from future analysis.

For the initial phylogenetic analyses, we also discarded five sequences (highlighted in yellow in Supplementary Table 8) due to short amino acid sequences (which prevented divergence estimation with other proteins). We were able to discern large distinct clades for nitrophorins, BABPs and apolipoproteins (Supplementary Fig. 1). On the other hand, PAI, pallidipines, triabines and procalins were scattered in minor groups and three clades contained lipocalins with distinct predicted functions (triabines and pallidipines or triabines and PAI). Ten transcripts identified as lipocalins remained scattered in the phylogeny and we were not able to ascertain a putative function to them. Still, we have transcription data for these proteins, and they were analysed as RP-Lipocalins. Based on evolutionary analyses and reciprocal blast results,

we renamed the proteins and performed a new phylogenetical analysis presented in Fig. 1.

3.2. The nitrophorins of *Rhodnius prolixus*

The initial analysis identified fourteen transcripts as nitrophorins, all of them already annotated in the genome or in previous studies. Our map and evolutionary analysis (Figs. 1 and 2) suggest that RPRC000114 is not NP-1, as identified in the genome manuscript, and not even a nitrophorin since it is evolutionarily more similar to BABPs. Nitrophorins RPRC000058, RPRC000498, RPRC000061, RPRC000367, RPRC000380, RPRC00034 and RPRC000077, that had been pointed out as possible nitrophorins in the *R. prolixus* genome, are new nitrophorins, as suggested by our analysis and, therefore, were respectively named NP-3 to NP-14. NP-5 and NP-6 are challenging cases, since we had a very short amino acid sequence for each (Moreira et al., 2003). While our analysis suggests that NP-5 is different from other NPs, NP-6 is not only very similar to NP-2, but also maps to the same locus. Regarding the expression profile (Fig. 2), nitrophorins NP-1, NP-3 and NP-7 were detected only in the adult salivary gland transcriptome and not even in the immature forms transcriptome, which includes the salivary glands of nymphs. On the other hand, NP-8, NP-10, NP-13 and NP-14 were not found on the adult salivary gland transcriptome. Expression of nitrophorins were also observed in other tissues, remarkably central nervous system (9 of the 14 nitrophorins) and testis (3 out of 14). NP-14 had expression detected in midgut, ovary, testis and central nervous system. DeepLoc results (Supplementary Table 9) suggests that all nitrophorins have peptide signal and are soluble extracellular proteins.

3.3. The biogenic amine-binding proteins (BABP) of *R. prolixus*

We identified five transcripts as BABPs (rp.asb-48128, rp.asb-85900, RPRC000114, RPRC000313 and RPRC010481). Genes RPRC000114 and RPRC010481 were identified as possible nitrophorins in the

R. prolixus genome. However, our analyses (Figs. 1 and 2) suggests that these genes are in fact BABPs. None of the BABPs identified in the transcriptomes could be linked to one of the previous known BABP (AAO25746), now called BABP-1. Regarding the expression pattern (Fig. 2), only BABP-2 and BABP-4 were not detected in salivary glands. In fact, BABP-4 was detected only in testis and CNS. Similarly, to nitrophorins, 3 out of 5 BABPs were detected in CNS (BABP-3, BABP-4 and BABP-5). As observed for nitrophorins, DeepLoc analysis suggests that all BABPs identified are expressed extracellularly (Supplementary Table 9).

3.4. The triabins, pallipidins, procalins, PAI and LTBP proteins of *Rhodnius prolixus*

Triabins, pallipidins, procalins and PAI have a general function as inhibitors of platelet aggregation, with the difference on the mechanism used for such; while LTBP has the role to prevent inflammation by binding cysteinyl leukotrienes. In our study we identified ten new proteins like platelet aggregation proteins (6 new PAI, 1 new pallipidin and 2 new triabins). Inhibitors of platelet aggregation have very similar amino acid sequences and only PAI-1 and LTBP1 had its function characterized by experimental analysis (Pallipidins and Triabins were characterized only in *T. pallidipenis*). All other *R. prolixus* platelet aggregation inhibitors discovered in previous works were identified by sequence homology. Our evolutionary analysis (Fig. 3) shows that platelet aggregation inhibitors does not form clear branches with the characterized proteins. We were able to identify loose clades (bootstrap values lower than 50) for PAI (thick black branches), triabin (yellow branches) and pallipidin (purple branches). The only clear paralogs found to PAI-1, were PAI-3, the new PAI-6 (rp.asb-104785) and PAI-7 (RPRC000463). We also found that PAI-2 is paralogous to LTBP1 and could retain the function as an antiinflammatory rather than platelet inhibitory function. The other identifiable cluster is the pallipidins genes, with pallipidin-1, pallipidin-2 and the new pallipidin-3

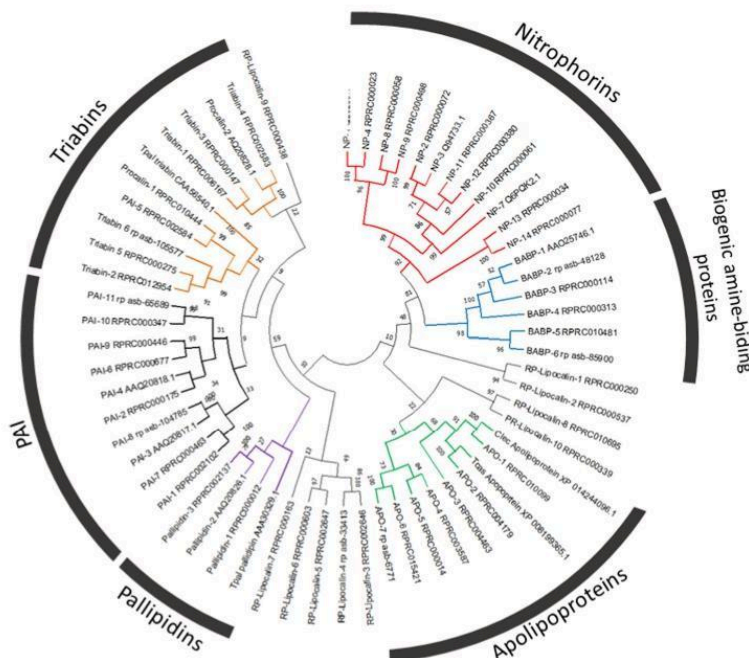


Fig. 1. Evolutionary relationship of *Rhodnius prolixus* lipocalins. Evolutionary history was inferred using the Neighbor-joining method. The bootstrap consensus tree inferred from 10000 replicates. The evolutionary distances were computed in pairwise deletions, using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. The rate variation among sites was modeled with a gamma distribution (shape parameter = 1). Functional group branches are highlighted by colors for easy identification. Nitrophorins (NP) = red; biogenic amine binding proteins (BABP) = blue; apolipoproteins (APO) = green; pallipidins = purple; triabins = orange; platelet aggregation inhibitors (PAI) = thick black.

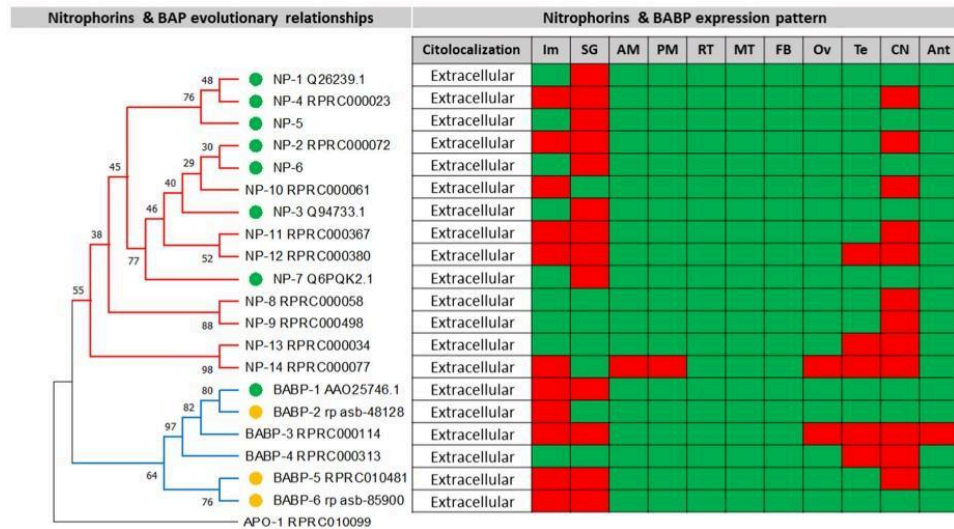


Fig. 2. Evolutionary relationships, citolocalization and expression pattern of *R. prolixus* nitrophenorins and biogenic amine-binding proteins (BABP). Evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method, and the bootstrap test from 10,000 replicas, with pairwise deletion. Green dots represent proteins with experimental evidence of function. The yellow dots highlight new proteins identified by this study. Red branch highlights nitrophenorin proteins, while blue branch indicates BABP proteins. Sequence accession numbers are indicated on each branch of the phylogenetic tree. An apolipoprotein was used as an outer group. Expression pattern was inferred based on transcriptomic data from Immature stages (Im), Salivary Glands (SG), Anterior Midgut (AM), Posterior Midgut (PM), Rectum (RT), Malphigian Tubules (MT), Fat Body (FB), Ovaries (Ov), Testis (Te), Central Nervous System (CN) and Antennae (Ant). Red indicate transcribed detected in the tissue, while green indicates transcript not detected in the tissue transcriptome. Citolocalization was inferred by Deep-lock analysis.

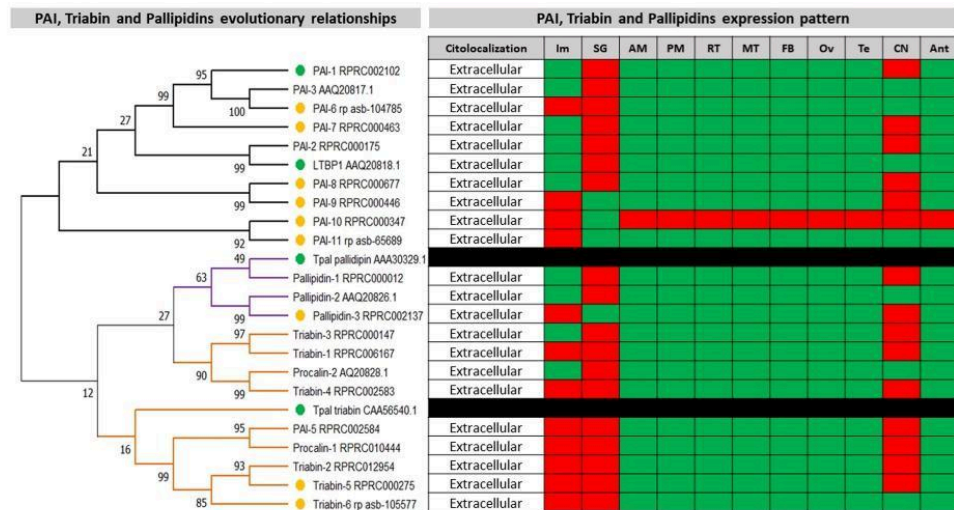


Fig. 3. Evolutionary relationships and expression pattern of *R. prolixus* platelet aggregation inhibitors. Evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method, pairwise deletion, and the bootstrap test from 10,000 replicas. Blue dots represent new proteins identified in this research. Green dots represent proteins with experimental evidence of function. The yellow dots highlight new proteins identified by this study. Putative PAI, pallipidins and triabins are indicated in black, purple, and yellow branches. Sequence accession numbers are indicated on each branch of the phylogenetic tree. Tpal = *Triatoma pallidipes*. Expression pattern was inferred based on transcriptomic data from Immature stages (Im), Salivary Glands (SG), Anterior Midgut (AM), Posterior Midgut (PM), Rectum (RT), Malphigian Tubules (MT), Fat Body (FB), Ovaries (Ov), Testis (Te), Central Nervous System (CN) and Antennae (Ant). Red indicate transcribed detected in the tissue, while green indicates transcript not detected in the tissue transcriptome. Citolocalization was inferred by DeepLoc analysis.

(RPRC002137) located in the same branch as *T. pallidipenis* pallipidin. Pallipidin-1 is orthologous to dipetalodipin, which has been well characterized as thromboxane A2 binding protein, suggesting that *R. prolixus* pallipidins could retain similar role. Triabin-1, triabin-3, triabin-4 and proccalin-2 joined in a well-defined branch (bootstrap >90) but with no correlation to *T. pallidipenis* triabin. PAI-5 and Proccalin-1 were more closely related to the *T. pallidipenis* triabin than to *R. prolixus* respective proteins. Except for the new PAI-9 (RPRC000446), PAI-10 (RPRC000347) and PAI-11 (rp_asb-65689), all other PAI were expressed in the adult salivary glands (Fig. 3). On the other hand, only PAI-6, PAI-9, PAI-10 and PAI-11 were detected immature forms. PAI-10 was detected in all tissues apart from adult salivary glands. Likewise other lipocalins, many PAI (60%), pallipidins (66%) and triabins (88%) were detected in CNS. DeepLoc analysis (Supplementary Table 9) suggests that all platelet aggregation inhibitory proteins are soluble and expressed extracellularly.

3.5. The apolipoproteins of *Rhodnius prolixus*

This is the first study to identify apolipoproteins in *R. prolixus* and we identified seven new apolipoproteins. Other apolipoproteins were identified in the hemipterans *Cimex lectularis* (XP014244096) and *Halyomorpha halys* (XP_014288060.2). Our evolutionary analysis (Fig. 4) suggests that APO-1 (RPRC010099) is orthologous to *C. lectularis* protein, while APO-2 (RPRC004179) is orthologous to *Tribolium castaneum* apolipoprotein. None of the *R. prolixus* apolipoproteins were detected in the adult salivary gland transcriptome (Fig. 4). All apolipoproteins were expressed in immature stages and, in general, they are also expressed in multiple tissues, with prominence to digestive tract (rectum and anterior and posterior midgut), CNS and antennae. Except for APO-2 (RPRC004179), all apolipoproteins were detected in the anterior and posterior midguts. APO-1, APO-5, APO-6 and APO-7 were also detected in testes. DeepLoc analysis (Supplementary Table 9) suggests that APO-1 is soluble but not secreted, being localized in lysosomes and vacuoles, while all other APO are extracellular proteins.

3.6. Other *Rhodnius prolixus* lipocalins

The transcriptome also revealed ten new lipocalins in *R. prolixus*. All ten proteins presented conserved domains linked to the lipocalin family, but evolutionary analyses (Fig. 1) and reciprocal blast searches showed that none of them shared similarities (amino acid) with characterized insect lipocalins. Hence, all ten lipocalins were named RP-Lipocalin-1 to RP-Lipocalin-10. Apart from RP-Lipocalin-4 (rp_asb-33413), all new

lipocalins could be mapped to an annotated protein in the *R. prolixus* genome (Fig. 5). Nine out of then RP-Lipocalins were not detected in salivary gland transcriptome (the exception is RP-Lipocalin-1). Almost all new RP-Lipocalins were detected in CNS and antennae. DeepLoc results suggests that RP-Lipocalin-8 and RP-lipocalin-10 are expressed in mitochondrion, while all other are extracellularly (Supplementary Table 9).

4. Discussion

Several studies have demonstrated the importance of the saliva of hematophagous insects for the success of the blood meal (Andersen, 2010; Andersen et al., 2005; Bowman et al., 1997; Francischetti et al., 2009; Ribeiro and Francischetti, 2003; Ribeiro and Garcia, 1981; Santiago et al., 2020). It is in this context that the first studies appeared, describing the importance and function of salivary lipocalins in *R. prolixus* (Ribeiro and Garcia, 1981). Such studies started a sequence of others that, classically, started to address the lipocalin family in the context of haematophagy physiology (Andersen et al., 2005). Salivary lipocalins are probably the best studied protein family in *R. prolixus*, with 30 identified proteins, including 23 of them sequenced before the genome and 9 of them functionally characterized (7 nitrophorins, 1 PAI and 1 LTBP) (Champagne et al., 1995; Francischetti et al., 2000, 2002; Jablonka et al., 2016; Moreira et al., 2003; Ribeiro et al., 2004; Xu et al., 2013). Despite the availability of the genome (Mesquita et al., 2015) and two transcriptomes (Ribeiro et al., 2004, 2014), we still do not have a compilation and revision of the lipocalin family in *R. prolixus*, as the presence and function of this protein family in other tissues besides salivary glands. Here we compiled all the information of lipocalins described in previous works, updated the information on them according to genome, transcriptomes and evolutionary analysis, identified 29 new lipocalins and found that many salivary lipocalins are also expressed in different tissues, including testes and ovaries.

Obliging its importance for the physiology of the insect and for the history of studies of salivary proteins of *R. prolixus*, it would be expected that all 23 known salivary lipocalins previous to the genome, in special the Nitrophorins, would be identified and annotated in the genome of *R. prolixus*. However, we found only 16 of these 23 lipocalins on the *R. prolixus* genome. The nitrophorins for example: only NP-1 and NP-2 were identified in the genome manuscript respectively mapped to genes RPRC000023 and RPRC000072 (Mesquita et al., 2015). Firstly, our analysis showed that the annotated NP-1 (RPRC000023) is in fact NP-4. NP-1, NP-3 and NP-7 would be missing then, raising the question of what would have happened to them. Search for these proteins in the

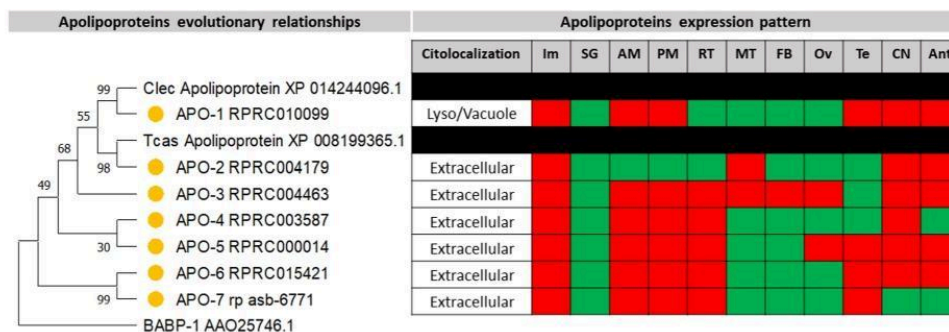


Fig. 4. Evolutionary relationships and expression pattern of *R. prolixus* apolipoproteins. Evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method, complete deletion, and the bootstrap test from 10,000 replicas. Yellow dots represent new proteins identified in this research. Sequence accession numbers are indicated on each branch of the phylogenetic tree. BABP-1 used as outer group. Clec = *Cimex lectularis*; Tcas = *Tribolium castaneum*. Expression pattern was inferred based on transcriptomic data from immature stages (Im), Salivary Glands (SG), Anterior Midgut (AM), Posterior Midgut (PM), Rectum (RT), Malpighian Tubules (MT), Fat Body (FB), Ovaries (Ov), Testis (Te), Central Nervous System (CN) and Antennae (Ant). Red indicate transcribed detected in the tissue, while green indicates transcript not detected in the tissue transcriptome. Citocalization was inferred by DeepLoc analysis.

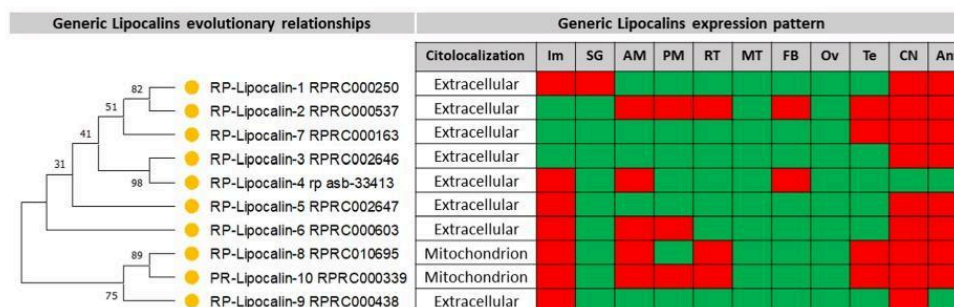


Fig. 5. Evolutionary relationships and expression pattern of *R. prolixus* lipocalins with no putative function. Evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method, complete deletion, and the bootstrap test from 10,000 replicas. Yellow dots represent new proteins identified in this research. Sequence accession numbers are indicated on each branch of the phylogenetic tree. Expression pattern was inferred based on transcriptomic data from Immature stages (Im), Salivary Glands (SG), Anterior Midgut (AM), Posterior Midgut (PM), Rectum (RT), Malpighian Tubules (MT), Fat Body (FB), Ovaries (Ov), Testis (Te), Central Nervous System (CN) and Antennae (Ant). Red indicate transcript detected in the tissue, while green indicates transcript not detected in the tissue transcriptome. Citocalization was inferred by DeepLoc analysis.

genome allowed us to identify that the three nitrophorins were missing due to incompleteness of the genome. Indeed, the *R. prolixus* genome is very fragmented when compared to other insect genomes. While the current assembly of the model fruitfly *Drosophila melanogaster* is assembled in just 1870 scaffolds (Hoskins et al., 2015), and the mosquito *Anopheles gambiae* is assembled in 8145 scaffolds (Sharakhova et al., 2007), the *R. prolixus* genome is scattered in 16,537 scaffolds (Mesquita et al., 2015). The N50 numbers aren't also favorable to *R. prolixus* (35.7 Kb), when compared to *D. melanogaster* (21,485 Kb) and *A. gambiae* (85.5 Kb). The fragmentation of the *R. prolixus* genome largely explains why only 16 of the previous 23 known salivary lipocalins were annotated, and new sequencing technologies (Nanopore and PacBio) could significantly improve the assembly.

On the other hand, the genome itself allowed the identification of 10 new lipocalins (all of them firstly identified as Nitrophorins), and the compilation of genome and transcriptomes data allowed us to identify 29 new lipocalins with putative function (3 BABPs, 9 platelet aggregation inhibitors, 7 apolipoproteins and 10 generic lipocalins) and correct the miss annotation of 6 previously known lipocalins. All the new lipocalins were firstly identified in transcriptome data and 7 of them couldn't be mapped to annotated proteins (showing the power of transcriptome studies in the discovery of new genes). Overall, our searches correct and expand the number of *R. prolixus* lipocalins from 30 to 59 proteins. Many other transcripts with similarities with lipocalins were found, but we had to discard them from our analysis due to lack of quality of the transcriptome and genome (which impaired us from ascertaining if such transcripts were isoforms, products of alternative splicing, pseudogenes or false contigs). Future transcriptomes, resequencing and functional studies can reveal a much diverse family of lipocalins.

4.1. Not so salivary

Perhaps, one of the most interesting discoveries in our investigation is the finding that many of the putatively salivary lipocalins are also expressed in other tissues. It is important to note that many lipocalins that are well characterized in its role in haematophagy (e.g., nitrophorins, PAI, triabins and pallipidins) were detected in other tissues. Nitrophorin-2, a well characterized protein with anticoagulant role, was detected in CNS (besides salivary gland transcriptome). Many other lipocalins identified in previous studies, were named according to homology to characterized salivary lipocalins, which leads us to a nomenclature problem regarding some lipocalins, in specific the platelet aggregation inhibitor proteins. For example, our reciprocal blast analysis suggests that *R. prolixus* PAI-10 is paralogous to PAI-1. However,

PAI-10 was detected in all tissues except for adult salivary glands. Hence, it is very unlikely that such protein has the role of platelet aggregation inhibition. In fact, most of the lipocalins evaluated in this study, were detected in CNS, which indicates a wider range of roles for such proteins besides vasodilatation or inhibition of platelet aggregation. In truth, except for PAI-1, all *R. prolixus* proteins with platelet aggregation inhibition role (PAI, triabins and pallipidins) were identified by similarity of amino-acid sequences (Ribeiro et al., 2004) and, until 2016, none of the proteins named PAI, triabin, pallipidin and procalin have been experimentally tested to see if such genes have the same role as their counterparts (*T. pallidipenis* pallipidin and triabin, and *R. prolixus* PAI). In 2016, Jabonkla and colleagues characterized the lipocalin known as PAI-4 and found that this lipocalin has an anti-inflammatory role instead of platelet aggregation inhibitor, thus been renamed as LTBP-1 (Leukotriene binding protein 1). More on this will be discussed further on the evolution of lipocalins, but our results demonstrate the importance for more functional genomics studies in *R. prolixus*.

On the other hand, we have the new apolipoproteins identified here. None of the apolipoproteins were detected in adult salivary gland transcriptome (however, this could be due the limitations of the typical EST approach performed at that time; Ribeiro et al., 2004). Apolipoproteins are known as hormone carriers (e.g., prostaglandins) and studies in other insects have suggested that these lipocalins are essential for insect fertility and could act as carriers of male prostaglandins or their precursors (arachidonic acid) to females during copulation (Canavoso et al., 2001; Fichera and Brenner, 1985; Marco et al., 2013; Morais Cabral et al., 1995; Whitten et al., 2004). This is partially in accordance with our transcriptomic data, since four of the seven apolipoproteins were also detected in reproductive tissues. Six apolipoproteins were also found in gut tissues and our analysis suggest that five of them are secreted into the lumen or haemolymph. Hence, it is possible that these proteins could act as carriers of lipid to other tissues. However, there is no studies on the role of lipocalins in triatomine blood digestion and all we can provide are speculations to guide future studies.

One interesting finding is that 33 out of 59 (55.9%) lipocalins are expressed in CNS, including 3 lipocalins with well established role in haematophagy (NP-2, NP-4 and PAI-1). Many of the lipocalins were also detected in antennae. This expression pattern could raise the question if such lipocalins could have multiple roles: as vasodilators when expressed in salivary glands; as neurotransmitters when expressed in CNS; and as OBPs when expressed in antennae.

4.2. The evolution of *R. prolixus* lipocalins

Evolutionary studies of genes have the importance to help us to understand the origin of genes and to better stabilize putative function based on homology, paralogy and, specially, orthology. Lipocalins are a huge family of proteins and, despite of its simple role, they present diverse physiological roles based on which type of molecules they carry. In the *R. prolixus* transcriptome we found 105 transcripts coding for proteins containing domains of typical lipocalins. But from those, only 19 were similar enough to lipocalins with known physiological roles in insects. Our evolutionary analyses of the 59 *R. prolixus* lipocalins, give us some insights on the evolution of this family of proteins. First is the close relationship of nitrophorins and amine binding proteins (BABPs). Nitrophorins are the most studied lipocalin of triatomines and, despite its vital role in haematophagy, this family of proteins has been exclusively described in triatomines of the tribe Rhodniini (composed of the genus *Rhodnius* and *Psamolestes*) and Cimicidae (bedbugs). Sialomes of other triatomines (Assumpção et al., 2008; Ribeiro et al., 2012b; Santiago et al., 2018; Santos et al., 2007) suggests the existence of proteins with homology to nitrophorins. However, since nitrophorins are carrier of heme-group, they have the distinction to give a red color for salivary glands of Rhodniini, while all other triatomines have clear salivary gland. Other studies have demonstrated the evolutionary relationship of nitrophorins and BABP (Andersen and Ribeiro, 2017; Ribeiro et al., 2012a). It is suggested that BABPs are derived from nitrophorins (nitrophorins are found in Cimicidae) by the loss of heme group showing higher affinity for serotonin and norepinephrine (Andersen et al., 2005). BABPs weren't found in all triatomine sialomes (Santiago et al., 2020) but, due to its similarity with nitrophorins, it remains to be ascertained if the nitrophorins found in many *Triatoma* spp. sialomes aren't in fact misannotated BABPs, which could link the origin of nitrophorins from BABPs.

Our evolutionary analysis also demonstrates the diversity in amino acid sequences of lipocalins (which suggests a rapid evolution within the group), specially in those primarily identified as homologous to PAI, triabins and pallidipins. We were not able to stabilize clear evolutionary relationship to these family of proteins. Neither the platelet aggregation inhibitory proteins form a cohesive group (besides to be afar from nitrophorins, BABPs and apolipoproteins), nor they from isolated groups within each class of proteins. Therefore, although many of these genes were named based exclusively on similarity, our evolutionary and transcriptome analysis suggests that in many cases, the specific naming of triabin, pallidipin and PAI, is probably incorrect. We found that evidence of functional role based on homology to be too weak for a few proteins (highlighted in Fig. 3) and we suggest that some of these genes had their name changed to indicate its putative generic role, such as "putative-anticoagulant" or "triabin-like", until more functional studies are performed to ascertain the real role of these proteins.

4.3. An updated catalog of *R. prolixus* lipocalins

Our investigation suggests the existence of nearly 100 lipocalins in *R. prolixus* (besides all OBPs not included in this study). Although many of these genes were initially discarded due the presence of stop-codons and doubts on isoforms/misassembly, new transcriptomes and resequencing of *R. prolixus* genome will help us ascertain the real number of lipocalins and identify splicing alternatives for these genes. In the end, we identified 19 new genes with homology to lipocalins with putative function and 10 new lipocalins without putative function. We would also like to end this study with a proposal for a better classification of triatomine lipocalins, based, of course, on evolutionary and functional evidence here observed. The main reason for this is our concern about the lack of standardization in the nomenclature of platelet aggregation inhibitors. The fact that we have a family of proteins called the Platelet Aggregation Inhibitor (PAI) and two other families that perform the same physiological function but are named Triabins and Pallidipins (not

to mention procalins), leads us to believe that there is a possibility that researchers are misled by not immediately identifying that triabins and pallidipins also inhibit platelet aggregation, even if through different pathways. Ideally, proteins should be named according to their molecular mechanism of action, instead of physiological role (since this role can change according to expression localization) or other arbitrary choice (e.g., species where protein was found, researcher name, etc.). Indeed, our analyses suggest that many well known salivary lipocalins may have multiple physiological roles since such genes are expressed in very distinctive tissues, such as CNS and antennae. On the other hand, the scientific community has been using the nomenclature that has existed for more than two decades and a change in nomenclature could cause more confusion than resolution. Still, we present evidence that PAI-5 could be a triabin, as much as procalin-1 and procalin-2 are probably triabins too (in conjunction with the fact that there is no study on the roles of procalins in haematophagy). Thus, in Table 1, we summarize the revised results obtained in this study, with a proposal for a minor revision of the nomenclature for some of the studied lipocalins.

Despite its importance and more than four decades of studies, we still need more studies to better understand the role of lipocalins in hematophagous insect physiology. Although genomic and transcriptomic studies allowed us to identify numerous genes with putative roles in insect haematophagy, such studies are not enough to ascertain the roles of many genes. Lipocalins seems to have been evolving rapidly in triatomine evolution, which hinders the identification of putative roles by typical evolutionary studies. With the advances in RNAi, specially in *R. prolixus* (Paim et al., 2013, 2016, 2021), it is now possible to stabilize the roles of salivary proteins in insect physiology for many genes in a short period of time. This updated catalog not only upgrades our knowledge in triatomine pharmacopeia, but also provides candidates for further functional studies in triatomine physiology.

Funding

This work was supported by the Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia – Entomologia Molecular (INCT-EM), Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (465678/2014-9) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (student scholarships).

Author contributions

DVS: investigation, formal analysis, data curation, writing – original draft; **NFG:** conceptualization, methodology, validation, writing – review & editing; **GCDDP:** resources, writing – review & editing; **MS:** writing – review & editing; **RNA:** writing – review & editing; **MHP:** conceptualization, funding acquisition; writing – review & editing; **LBK:** conceptualization, methodology, validation, formal analysis, writing – review & editing, visualization, supervision, project administration.

Declaration of competing interest

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103797>.

References

- Åkerström, B., Flower, D.R., Salier, J.-P., 2000. Lipocalins: unity in diversity. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1482, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00137-0).
- Almagro Armenteros, J.J., Sønderby, C.K., Sønderby, S.K., Nielsen, H., Winther, O., 2017. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics* 33, 3387–3395. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>.

- Andersen, J.F., 2010. Structure and mechanism in salivary proteins from blood-feeding arthropods. *Toxicon* 56, 1120–1129. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.002>.
- Andersen, J.F., Guddera, N.P., Francischetti, I.M.B., Ribeiro, J.M.C., 2005. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58, 97–105. <https://doi.org/10.1002/ARCH.20032>.
- Andersen, J.F., Ribeiro, J.M.C., 2017. Salivary kratagonins. In: *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission*, vol. 2. Elsevier, pp. 51–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805360-7.00004-6>.
- Assumpção, T., Francischetti, I., Andersen, J., Schwarz, A., Santana, J., Ribeiro, J., Assumpção, T.C.F., Assumpção, T., Francischetti, I., Andersen, J., Schwarz, A., Santana, J., Ribeiro, J., 2008. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 213–232. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.11.001>.
- Assumpção, T.C.F., Alvarenga, P.H., Ribeiro, J.M.C., Andersen, J.F., Francischetti, I.M.B., 2010. Dipetalodipin, a novel multifunctional salivary lipocalin that inhibits platelet aggregation, vasoconstriction, and angiogenesis through unique binding specificity for TXA₂, PGF_{2α}, and 15(S)-HETE. *J. Biol. Chem.* 285, 39001–39012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.152835>.
- Beament, J., 1980. Wigglesworth's contribution to insect biology and the state of the art. *Insect Biology in the Future* 1–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-454340-9.50005-7>.
- Birney, E., Clamp, M., Durbin, R., 2004. GeneWise and genomewise. *Genome Res.* 14, 988–995. <https://doi.org/10.1101/gr.1865504>.
- Bowman, A.S., Coons, L.B., Needham, G.R., Sauer, J.R., 1997. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Med. Vet. Entomol.* 11, 277–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00407.x>.
- Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Kamas, K.J., Pennington, J.E., Wells, M.A., 2001. Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 23–46. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.23>.
- Champagne, D.E., Nussenzeig, R.H., Ribeiro, J.M.C., 1995. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 270, 8691–8695. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.15.8691>.
- Coura, J.R., Borges-Periera, J., 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.008>.
- Fichera, L., Brenner, R., 1985. Biochemistry of the growth cycle of *Triatoma infestans* (Vinchuca). VIII. Preliminary study of hemo-lymphatic apolipoproteins in the adult male. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.: Organó de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas y de la Asociación Latinoamericana de Farmacología* 3, 319–325.
- Flower, D.R., 2000. Experimentally determined lipocalin structures. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00147-3).
- Flower, D.R., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318, 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj3180001>.
- Francischetti, I.M., Andersen, J.F., Ribeiro, J.M., 2002. Biochemical and functional characterization of recombinant *Rhodnius prolixus* platelet aggregation inhibitor 1 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides. *Biochemistry* 41, 3810–3818. <https://doi.org/10.1021/bi011015e>.
- Francischetti, I.M.B., Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos Im, R.J.M., 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* ume, 2051. <https://doi.org/10.2741/3363>.
- Francischetti, I.M.B., Ribeiro, J.M.C., Champagne, D., Andersen, J., 2000. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 275, 12639–12650. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12639>.
- Fuentes-Prior, P., Noeske-Jungblut, C., Donner, P., Schleuning, W.-D., Huber, R., Bode, W., 1997. Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 94, 11845–11850. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.11845>.
- Grzyb, J., Latowski, D., Strzalka, K., 2006. Lipocalins – a family portrait. *J. Plant Physiol.* 163, 895–915. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.12.007>.
- Hoskins, R.A., Carlson, J.W., Wan, K.H., Park, S., Mendez, I., Galle, S.E., Booth, B.W., Pfeiffer, B.D., George, R.A., Svirska, R., Krzywinski, M., Schein, J., Accardo, M.C., Dania, E., Messina, G., Méndez-Lago, M., de Pablos, B., Demakova, O.v., Andreyeva, E.N., Boldyreva, L.v., Marra, M., Carvalho, A.B., Dimitri, P., Villasante, A., Zhimulev, I.F., Rubin, G.M., Karpen, G.H., Celniker, S.E., 2015. The Release 6 reference sequence of the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res.* 25, 445–458. <https://doi.org/10.1101/gr.185579.114>.
- Jablonka, W., Pham, V., Nardone, G., Gittis, A., Silva-Cardoso, L., Atella, G.C., Ribeiro, J.M.C., Andersen, J.F., 2016. Structure and ligand-binding mechanism of a cysteinyl leukotriene-binding protein from a blood-feeding disease vector. *ACS Chem. Biol.* 11, 1934–1944. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00032>.
- Latorre-Estivalis, J.M., Robertson, H.M., Walden, K.K.O., Ruiz, J., Gonçalves, L.O., Guarneri, A.A., Lorenzo, M.G., 2017. The molecular sensory machinery of a Chagas disease vector: expression changes through imaginal moult and sexually dimorphic features. *Sci. Rep.* 7, 40049. <https://doi.org/10.1038/srep40049>.
- Mans, B.J., 2011. Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *Journal of Innate Immunity* 3, 41–51. <https://doi.org/10.1159/000321599>.
- Mans, B.J., Calvo, E., Ribeiro, J.M.C., Andersen, J.F., 2007. The crystal structure of D7r4, a salivary biogenic amine-binding protein from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 36626–36633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706410200>.
- Mans, B.J., Ribeiro, J.M.C., Andersen, J.F., 2008. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. *J. Biol. Chem.* 283, 18721–18733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800188200>.
- Marco, H.G., Simek, P., Clark, K.D., Gäde, G., 2013. Novel adipokinetic hormones in the kissing bugs *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Dipetalogaster maxima* and *Panstrongylus megistus*. *Peptides (N.Y.)* 41, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.032>.
- Mesquita, R.D., Vionette-Amaral, R.J., Lowenberger, C., Rivera-Pomar, R., Monteiro, F. A., Minx, P., Spieth, J., Carvalho, A.B., Panzera, F., Lawson, D., Torres, A.Q., Ribeiro, J.M.C., Sorgine, M.H.F., Waterhouse, R.M., Montague, M.J., Abad-Franch, F., Alves-Bezerra, M., Amaral, L.R., Araujo, H.M., Araujo, R.N., Aravind, L., Atella, G.C., Azambuja, P., Berni, M., Bittencourt-Cunha, P.R., Braz, G.R.C., Calderón-Fernández, G., Carareto, C.M.A., Christensen, M.B., Costa, I.R., Costa, S.G., Dansa, M., Daumas-Filho, C.R.O., De-Paula, I.F., Dias, F.A., Dimopoulos, G., Emrich, S.J., Esponda-Beltrén, N., Fampa, P., Fernandez-Molina, R.D., da Fonseca, R.N., Fontenele, M., Fronick, C., Fulton, L.A., Gandara, A.C., Garcia, E.S., Genta, F.A., Giraldo-Calderón, G.I., Gomes, B., Gondim, K.C., Granzotto, A., Guarneri, A.A., Guigó, R., Harry, M., Hughes, D.S.T., Jablonka, W., Jacquin-Joly, E., Juárez, M.P., Koerich, L.B., Lange, A.B., Latorre-Estivalis, J.M., Lavore, A., Lawrence, G.G., Lazoski, C., Lazzari, C.R., Lopes, R.R., Lorenzo, M.G., Lugon, M.D., Majerowicz, D., Marcet, P.L., Mariotti, M., Masuda, H., Megy, K., Melo, A.C.A., Missirlis, F., Mota, T., Noriega, F.G., Nouzova, M., Nunes, R.D., Oliveira, R.L.L., Oliveira-Silveira, G., Ons, S., Orchard, I., Pagola, L., Paiva-Silva, G.O., Pascual, A., Pavan, M.G., Pedrini, N., Peixoto, A.A., Pereira, M.H., Pike, A., Polycarpou, C., Prodociami, F., Ribeiro-Rodrigues, R., Robertson, H.M., Salerno, A.P., Salmon, D., Santosmasses, D., Shama, R., Seabra-Junior, E.S., Silva-Cardoso, L., Silva-Neto, M.A. C., Souza-Gomes, M., Sterkel, M., Taracena, M.L., Tojo, M., Tu, Z.J., Tubio, J.M.C., Ursic-Bedoya, R., Venancio, T.M., Walter-Nuno, A.B., Wilson, D., Warren, W.C., Wilson, R.K., Huebner, E., Dotson, E.M., Oliveira, P.L., 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 112, 14936–14941. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506226112>.
- Morais Cabral, J.H., Atkins, G.L., Sánchez, L.M., López-Boado, Y.S., López-Otin, C., Sawyer, L., 1995. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 366, 53–56. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00484-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00484-Q).
- Moreira, M.F., Coelho, H.S.L., Zingali, R.B., Oliveira, P.L., Masuda, H., 2003. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 23–28. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00163-7).
- Noeske-Jungblut, C., Haendler, B., Donner, P., Alagon, A., Possani, L., Schleuning, W.-D., 1995. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J. Biol. Chem.* 270, 28629–28634. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28629>.
- Noeske-Jungblut, C., Krätzschmar, J., Haendler, B., Alagon, A., Possani, L., Verhallen, P., Donner, P., Schleuning, W.D., 1994. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J. Biol. Chem.* 269, 5050–5053. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37652-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37652-4).
- Ons, S., Lavore, A., Sterkel, M., Wulff, J.P., Sierra, I., Martínez-Barnette, J., Rodríguez, M.H., Rivera-Pomar, R., 2016. Identification of G protein coupled receptors for opsins and neurohormones in *Rhodnius prolixus*. Genomic and transcriptomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 69, 34–50. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.05.003>.
- Paddock, C.D., McKerrow, J.H., Hansell, E., Foreman, K.W., Hsieh, I., Marshall, N., 2001. Identification, cloning, and recombinant expression of procalin, a major triatomine allergen. *J. Immunol.* 167, 2694–2699. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.5.2694>.
- Paim, R.M.M., Araujo, R.N., Lehane, M.J., Gontijo, N.F., Pereira, M.H., 2013. Long-term effects and parental RNAi in the blood feeder *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 1015–1020. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.08.008>.
- Paim, R.M.M., Araujo, R.N., Leis, M., Sant'anna, M.R.V., Gontijo, N.F., Lazzari, C.R., Pereira, M.H., 2016. Functional evaluation of Heat Shock Proteins 70 (HSP70/HSC70) on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) physiological responses associated with feeding and starvation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 77, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.07.011>.
- Paim, R.M.M., Pessoa, G.C.D., Nascimento, B.W.L., Nascimento, A.M.D., Pinheiro, L.C., Koerich, L.B., Diotaiuti, L., Araujo, R.N., Sant'Anna, M.R.v., Gontijo, N.F., Pereira, M.H., 2021. Effect of salivary *CYP4EM1* and *CYP4EM2* gene silencing on the life span of Chagas disease vector <sc>*Rhodnius prolixus*</sc> (Hemiptera, Reduviidae) exposed to sublethal dose of deltamethrin. *Insect Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1111/imb.12737>.
- Petherick, A., 2010. Country by country. *Nature* 465, S10–S11. <https://doi.org/10.1038/nature09223>.
- Ratoff, O.D., 1987. The evolution of hemostatic mechanisms. *Perspect. Biol. Med.* 31, 4–33. <https://doi.org/10.1353/pbm.1987.0003>.
- Ribeiro, J.M., 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4, 143–152.
- Ribeiro, J.M.C., Andersen, J., Silva-Neto, M.A.C., Pham, V.M., Garfield, M.K., Valenzuela, J.G., 2004. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 61–79. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.09.004>.
- Ribeiro, J.M.C., Assumpção, T.C., Francischetti, I.M.B., 2012a. An insight into the sialomes of bloodsucking heteroptera. *Psyche: J. Entomol.* 1–16. <https://doi.org/10.1155/2012/470436>, 2012.

- Ribeiro, J.M.C., Assumpção, T.C.F., van Pham, M., Francischetti, I.M.B., Reisenman, C.E., 2012b. An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma rubida* (Hemiptera: heteroptera). *J. Med. Entomol.* <https://doi.org/10.1603/ME11243>.
- Ribeiro, J.M.C., Francischetti, I.M.B., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 73–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.060402.102812>.
- Ribeiro, J.M.C., Garcia, E.S., 1981. The role of the salivary glands in feeding in *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 94, 219–230. <https://doi.org/10.1242/jeb.94.1.219>.
- Ribeiro, J.M.C., Marinotti, O., Gonzales, R., 1990. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Br. J. Pharmacol.* 101, 932–936. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1990.TB14183.X>.
- Ribeiro, J.M.C., Schneider, M., Guimarães, J.A., 1995. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.* 308, 243–249. <https://doi.org/10.1042/bj3080243>.
- Ribeiro, M.C., Genta, F.A., Sorgine, M.H.F.F., Logullo, R., Mesquita, R.D., Paiva-silva, G. O., Majerowicz, D., Medeiros, M., Koerich, L., Terra, W.R., Pimentel, C., Bisch, P.M., Leite, D.C., Diniz, M.M.P.P., Junior, S.G. v. Silber, M., Alves-bezerra, M., Gondim, K. C., Atella, G.C., Araujo, H., Dias, F.A., Polycarpo, C., Vionette-amaral, R.J., Lazoski, C., Rivera-Pomar, R., Diambra, L., Oliveira, P.L., Ribeiro, J.M.C., Genta, F. A., Sorgine, M.H.F.F., Logullo, R., Mesquita, R.D., Paiva-silva, G.O., Majerowicz, D., Medeiros, M., Koerich, L., Terra, W.R., Ferreira, C., Pimentel, A.C., Bisch, P.M., Leite, D.C., Diniz, M.M.P.P., da Junior, J.L.S.G.V., da Silva, M.L., Araujo, R.N., Gandara, A.C.P., Brosson, S., Salmon, D., Bousbata, S., Gonzalez-Caballero, N., Silber, A.M., Alves-bezerra, M., Gondim, K.C., Silva-Neto, M.A.C., Atella, G.C., Araujo, H., Dias, F.A., Polycarpo, C., Vionette-amaral, R.J., Fampa, P., Melo, A.C.A., Tanaka, A.S., Balczun, C., Oliveira, J.H.M., Gonçalves, R.L.S., Lazoski, C., Rivera-Pomar, R., Diambra, L., Schaub, G.A., Garcia, E.S., Azambuja, P., Braz, G.R.C., Oliveira, P.L., 2014. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 8, 27. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002594>.
- Santiago, P.B., de Araújo, C.N., Charneau, S., Bastos, I.M.D., Assumpção, T.C.F., Queiroz, R.M.L., Praça, Y.R., Cordeiro, T. de M., Garcia, C.H.S., da Silva, I.G., Raiol, T., Motta, F.N., de Araújo Oliveira, J.V., de Sousa, M.V., Ribeiro, J.M.C., de Santana, J.M., 2018. Exploring the molecular complexity of *Triatoma dimidiata* sialome. *J. Proteomics.* <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.12.016>.
- Santiago, P.B., de Araújo, C.N., Charneau, S., Praça, Y.R., Bastos, I.M.D., Ribeiro, J.M.C., Santana, J.M., 2020. The pharmacopeia within triatomine salivary glands. *Trends Parasitol.* 36, 250–265. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2019.12.014>.
- Santos, A., Ribeiro, J.M.C., Lehane, M.J., Gontijo, N.F., Veloso, A.B., Sant'Anna, M.R.V., Nascimento Araujo, R., Grisard, E.C., Pereira, M.H., 2007. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 702–712. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.04.004>.
- Sharakhova, M. v. Hammond, M.P., Lobo, N.F., Krzywinski, J., Unger, M.F., Hillemeier, M.E., Bruggner, R. v. Birney, E., Collins, F.H., 2007. Update of the *Anopheles gambiae* PEST genome assembly. *Genome Biol.* 8, R5. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-1-r5>.
- Whitten, M.M.A., Tew, I.F., Lee, B.L., Ratcliffe, N.A., 2004. A novel role for an insect apolipoprotein (apolipoprotein III) in β -1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *J. Immunol.* 172, 2177–2185. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2177>.
- Wigglesworth, V.B., 1936. The function of the Corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Q. J. Microsc. Sci.* 79, 91–121.
- Xu, X., Chang, B.W., Mans, B.J., Ribeiro, J.M.C., Andersen, J.F., 2013. Structure and ligand-binding properties of the biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect vector of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 69, 105–113. <https://doi.org/10.1107/S0907444912043326>.