

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**INVESTIGAÇÃO SOBRE O EFEITO REPELENTE DOS ÓLEOS NATURAIS DE
CITRONELA E EUCALIPTO-LIMÃO E O PAPEL DE RECEPTORES
IONOTRÓPICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS REPELENTE EM
TRIATOMÍNEOS**

Por

Iago Souza Dias Canedo

Belo Horizonte

2020

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

I. S. D. Canedo

2020

Iago Souza Dias Canedo

**INVESTIGAÇÃO SOBRE O EFEITO REPELENTE DOS ÓLEOS NATURAIS DE
CITRONELA E EUCALIPTO-LIMÃO E O PAPEL DE RECEPTORES
IONOTRÓPICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS REPELENTE EM
TRIATOMÍNEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientação: Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza

Coorientação: Dra. Marina de Moraes Mourão

Belo Horizonte

2020

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

C162i
2020

Canedo, Iago Souza Dias.

Investigação sobre o efeito repelente dos óleos naturais de citronela e eucalipto-limão e o papel de receptores ionotrópicos na identificação de moléculas repelentes em triatomíneos / Iago Souza Dias Canedo. – Belo Horizonte, 2020.

XIV, 75 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 65 - 74

Dissertação de Mestrado – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Transmissores de Patógenos.

1. Triatominae/efeito de fármacos. 2. Canais Iônicos Ativados por Ligantes. 3. Reação em Cadeia da Polimerase/métodos. I. Título. II. Souza, Rita de Cássia (Orientação). III. Mourão, Marina Moraes (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

Iago Souza Dias Canedo

**INVESTIGAÇÃO SOBRE O EFEITO REPELENTE DOS ÓLEOS NATURAIS DE
CITRONELA E EUCALIPTO-LIMÃO E O PAPEL DE RECEPTORES
IONOTRÓPICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS REPELENTE EM
TRIATOMÍNEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientação: Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza

Coorientação: Dra. Marina de Moraes Mourão

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Rita de Cássia Moreira de Souza (Instituto René Rachou/Fiocruz Minas)

Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo (Universidade Federal de Minas Gerais)

Prof. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (Instituto René Rachou/Fiocruz Minas)

Prof. Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira (Instituto René Rachou/Fiocruz Minas)

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 15/07/2020

Dedico este trabalho a

*todos aqueles em risco de infecção pela doença de Chagas, sobretudo às populações
carentes que também sofrem com tantas outras doenças negligenciadas.*

*Lúcia de Souza Dias e José Nunes Dias, meus avós e seres humanos incríveis que fizeram
possível o homem que me tornei hoje.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Dra. Rita por ser uma verdadeira mãe científica. Pela minha introdução no meio científico e por toda a paciência, carinho e atenção durante todos esses anos. Uma pessoa com um coração enorme, que sabe acolher e transmitir conhecimento de uma maneira fantástica. Devo grande parte do profissional que sou hoje a ela. Pela disponibilidade e cabeça aberta para escutar e valorizar as minhas sugestões e ideias.

Também agradeço à Dra. Liléia por ser uma pessoa incrível e uma profissional admirável. Uma avó científica, como sempre brincou. Proporciona ao laboratório o sentido de família, de acolhimento e conhecimento. Por tantas lições e conversas que me abriram os olhos e me ensinaram tanto.

À Dra. Marina, por ser um pilar essencial desta pesquisa. Tão prestativa e preocupada com o andamento do trabalho, sempre se empenhando em ajudar ao máximo. É uma profissional excelente que sabe auxiliar nas horas mais difíceis e que fez possível o andamento deste trabalho.

À Dra. Roberta que sempre foi muito simpática, atenciosa e preocupada com o andamento do trabalho. Cedeu a utilização do espaço, equipamentos e reagentes que permitiram a realização desta pesquisa.

À Nathália que sempre dividiu todos os momentos (bons e ruins) desde os primeiros passos na Fiocruz. É um ser humano fantástico, que me ensinou todo tipo de lição valiosa. Ela foi a primeira a enfrentar essa nova linha de pesquisa para o laboratório e os seus frutos fizeram o meu trabalho possível.

Ao Dr. Newmar que além de um grande amigo e participar dos momentos mais felizes no laboratório me ajudou muito, mesmo estando em um momento delicado. É alguém que sempre vou agradecer por ter conhecido e que nunca vou poder pagar tudo o que fez por mim.

À Aline, que já demonstra ser uma excelente profissional e um ser humano incrível. Sempre disponível e carinhosa, permitiu que toda a parte de extração de RNA se tornasse possível.

À todos do grupo de Helminologia e Malacologia Médica, em especial a Dra. Sandra, Juliano, Felipe, Izabella, Fernanda, Naiara e Silvia, que dividiram tantos ensinamentos e foram muito simpáticos e atenciosos comigo.

À Dra. Viviane, responsável pela plataforma de PCR em tempo real do IRR, que sempre foi extremamente profissional, simpática e solícita, que me ajudou inúmeras vezes e tornou esse projeto possível.

À Dra. Raíssa que sempre me apoiou e teve ótimas conversas comigo, me dando conselhos e incentivando, o que me fortaleceu durante todos esses anos ao lado dela.

À Dra. Luciana que me deu muito suporte e esteve do meu lado para me ajudar da forma que pudesse. Muito preocupada e carinhosa, me auxiliou a passar por momentos muito difíceis.

À Laila que é uma grande amiga, sempre preocupada e presente, deixou os momentos no laboratório mais leves e divertidos.

Ao Ademilson que me ajudou tantas vezes na manutenção dos triatomíneos e sempre foi muito simpático comigo.

Ao Grupo Triatomíneos e ao grupo de pesquisa Comportamento de Vetores e Interação com Patógenos que fizeram parte de toda a minha caminhada na ciência. Pessoas que tive a sorte de conviver e me tornar cada vez melhor, especialmente à Dra. Sílvia, Dra. Raquel, Dr. Vladimir, Eduardo, Kathy, Pedro, Bárbara, Cíntia, Mayara e Flávio.

À Sheila que é uma pessoa muito atenciosa e disposta a ajudar, e faz o seu trabalho com excelência no laboratório.

À Núzia que sempre foi muito prestativa e atenciosa, e me forneceu toda a ajuda necessária na biblioteca.

Ao Laboratório de Mosquitos e Vetores que permitiram o uso de equipamentos, além de sempre me auxiliarem com qualquer dúvida.

Aos setores de secretaria, manutenção, informática e biotério, em especial aos funcionários Hélio, João de Deus, José Luiz, Ana Carolina, Fernanda, Ana Paula, Elem, Rosângela, Samuel, Nilson e Andréa.

Ao Instituto René Rachou (IRR) pela infraestrutura e apoio à pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela organização e possibilitar a minha formação.

À Valéria que sempre foi uma amiga incrível e que se tornou essencial no meu último ano de mestrado. Esteve ao meu lado em um dos momentos mais difíceis da minha vida e me deu forças para sempre continuar em frente. Não tenho palavras para agradecer.

Aos meus amigos-irmãos Ana Clara, Laíza e Gustavo que tanto fizeram por mim. Sem eles não poderia ter os melhores momentos da minha vida. Agradeço todos os dias pela sorte de tê-los conhecido.

Ao Renan, Diogo, Bob, Manu, Karina, Emanuel, João e César que me proporcionaram momentos de muita alegria, e que desde o início demonstraram muito carinho e me acolheram de uma forma muito bonita.

Aos meus avós, Lucia e José que foram instrutores essenciais para a construção do que eu sou. Com eles eu aprendi que dignidade e empatia são características básicas de um ser humano, e que não há limites para o amor.

À minha mãe Monique e aos meus queridos irmãos Caio e Davi, que sempre estiveram junto a mim, me dando suporte e carinho, além de dividirem momentos lindos durante a minha vida. São fontes de inspiração e força.

À Nina, também pilar do que tornei hoje. Mais que uma amiga, fez possível todos os meus dias ao lado dela. Sempre preocupada, nunca me esquecerei de cada café da manhã, cada carinho, cada gesto de amor. É uma pessoa que amo muito.

À minha família que sempre torceu pelo o meu sucesso, e que eu tenho um enorme carinho por eles.

À Aline Rodrigues, por ser uma profissional exemplar que me permitiu ser forte por boa parte desta jornada no mestrado, e me fez aprender muito comigo mesmo para me tornar uma pessoa melhor e mais feliz, algo que nada no mundo paga.

Enfim, agradeço ao meu querido marido Felipe, com quem estou há mais de 11 anos. Com ele fui capaz de despertar e florescer o melhor em mim. Participou de todos os meus momentos, dos mais alegres aos mais difíceis. Juntos, fomos capazes de vencer inúmeras barreiras, incluindo a do preconceito, mostrando ao mundo que nada é mais forte e importante que o amor.

RESUMO

Os repelentes são utilizados há décadas para a proteção individual contra picadas de insetos de importância médica. Ainda assim, pouco se sabe sobre os mecanismos genéticos envolvidos no fenômeno da repelência, principalmente em relação aos triatomíneos, insetos vetores do *Trypanosoma cruzi* que causa a doença de Chagas. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação de repelência de substâncias naturais em comparação ao DEET e a participação de receptores ionotrópicos envolvidos no processo de detecção de repelentes, em *Rhodnius prolixus*. Na primeira etapa, ninfas de 5º estágio com 21 dias de jejum foram colocadas em arenas experimentais, contendo camundongos tratados topicamente com as substâncias repelentes citronela, eucalipto-limão e DEET, para a observação direta da busca pelo hospedeiro durante 30 minutos. Em todos os ensaios os insetos foram totalmente repelidos. Em contrapartida, nos respectivos grupos controle (camundongos não tratados), mais de 80% das ninfas realizaram o repasto. A segunda etapa consistiu na padronização e análise da expressão relativa dos receptores ionotrópicos *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, *RproIR75a* e *RproIR75e*, por RT-qPCR, em antenas de ninfas de 5º estágio com 21 dias de jejum. Os insetos foram expostos aos repelentes em dois grupos: “tratado” (ninfas expostas a camundongos tratados com as substâncias repelentes) e “forçado” (insetos expostos ao contato com papel filtro impregnado com as substâncias avaliadas), para posterior extração do RNA. Todos os alvos, independente do grupo, em relação ao controle (ninfas não expostas às substâncias repelentes), apresentaram diminuição da expressão, quando houveram diferenças. O gene *RproIR75e* foi o único que respondeu significativamente aos três repelentes testados. Os alvos *RproIR8a* e *RproIR75a* responderam apenas aos óleos naturais, sendo o valor mais significativo do gene *RproIR75a* no repelente citronela, com uma redução de 63,9% no grupo “tratado”. Nos grupos “forçado” os genes *RproIR8a* e *RproIR76b* apresentaram uma redução ainda maior que no “tratado”, quando os insetos foram expostos à citronela. Já o receptor *RproIR25a* respondeu somente ao óleo de citronela no grupo “forçado”, enquanto que no “tratado” demonstrou alterações na expressão apenas para o eucalipto-limão e DEET. A compreensão ao nível molecular da maquinaria olfativa envolvida no processo de percepção de repelentes em triatomíneos poderá possibilitar o manejo inteligente de produtos que atuem de forma efetiva para a proteção individual, contra a picada destes insetos.

Palavras-chave: Triatominae; Repelentes; Receptor ionotrópico; RT-qPCR.

ABSTRACT

Repellents have been used for decades to protect individuals against insect bites of medical importance. Even so, little is known about the genetic mechanisms involved in the phenomenon of repellency, especially in relation to triatomines, vectors of *Trypanosoma cruzi* that causes Chagas disease. The objective of this study was to evaluate the action of repellent natural substances in comparison to DEET and the participation of ionotropic receptors involved in the process of detecting repellents, in *Rhodnius prolixus*. In the first stage, 5th stage nymphs with 21 days of fasting were placed in experimental arenas, containing mice treated topically with the repellent substances citronella, lemon eucalyptus and DEET, for direct observation of the search for the host in 30 minutes. The insects were completely repelled in all tests. In contrast, the respective control groups (untreated mice), more than 80% of the nymphs fed. The second stage consisted of standardization and analysis of the relative expression of the ionotropic receptors *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, *RproIR75a* and *RproIR75e*, by RT-qPCR, in antennae of 5th stage nymphs with 21 days of fasting. The insects were exposed to the repellents in two groups: "treated" (nymphs exposed to mice treated with repellent substances) and "forced" (insects exposed in contact with filter paper impregnated with the substances), for later RNA extraction. All targets, regardless of the group, in relation to control (nymphs not exposed to repellent substances), showed decreased expression, when there were differences. The *RproIR75e* gene was the only one that responded significantly to the three repellents tested. The targets *RproIR8a* and *RproIR75a* responded only to natural oils, being the most significant value of the *RproIR75a* gene in the citronella repellent, with a 63.9% reduction in the "treated" group. In the "forced" groups, the *RproIR8a* and *RproIR76b* genes showed an even greater reduction than in the "treated" group, when the insects were exposed to citronella. The *RproIR25a* receptor, on the other hand, responded only to citronella oil in the "forced" group, while in the "treated" group it showed changes in expression for lemon eucalyptus and DEET. The understanding at the molecular level of the olfactory machinery involved in the process of perceiving repellents in triatomines can enable the intelligent handling of products that act effectively for individual protection against these insect bites.

Palavras-chave: Triatominae; Repellents; Ionotropic receptors; RT-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das principais estruturas de uma antena de inseto ..	25
Figura 2. Representação esquemática da estrutura geral de uma sensila olfatória	26
Figura 3. Representação esquemática da arena experimental utilizada para alimentação das ninfas de triatomíneos nos estudos de repelência	33
Figura 4. Análise da qualidade dos iniciadores utilizados nos ensaios.....	42
Figura 5. Avaliação da expressão relativa dos receptores ionotrópicos <i>RproIR8a</i> , <i>RproIR25a</i> ; <i>RproIR76b</i> , <i>RproIR7</i> e <i>RproIR75</i> em antenas de <i>Rhodnius prolixus</i> expostos a diferentes substâncias repelentes (Citronela, Eucalipto-limão e DEET) do grupo Tratado em relação ao grupo Controle	47
Figura 6. Avaliação da expressão relativa dos receptores ionotrópicos <i>RproIR8a</i> , <i>RproIR25a</i> ; <i>RproIR76b</i> , <i>RproIR7</i> e <i>RproIR75</i> em antenas de <i>Rhodnius prolixus</i> expostos a diferentes substâncias repelentes (Citronela, Eucalipto-limão e DEET) do grupo Forçado em relação ao grupo Controle.....	49
Figura 7. Avaliação da expressão relativa dos receptores ionotrópicos <i>RproIR8a</i> , <i>RproIR25a</i> ; <i>RproIR76b</i> , <i>RproIR7</i> e <i>RproIR75</i> em antenas <i>Rhodnius prolixus</i> expostas a diferentes substâncias repelentes (Citronela, Eucalipto-limão e DEET) do grupo Forçado em relação ao grupo Tratado	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Padronização dos iniciadores α -tubulina, <i>RproIR8a</i> , <i>RproIR25a</i> , <i>RproIR76b</i> , <i>RproIR75a</i> e <i>RproIR75e</i>	44
Gráfico 2. <i>Curvas de dissociação dos iniciadores α-tubulina, <i>RproIR8a</i>, <i>RproIR25a</i>, <i>RproIR76b</i>, <i>RproIR75a</i> e <i>RproIR75e</i></i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados nos ensaios de biologia molecular	35
Tabela 2. Número de ninfas que realizaram repasto sanguíneo nos grupos teste/controlado expostas aos óleos de citronela e eucalipto-limão, e ao DEET.	40
Tabela 3. Valores de eficiência e coeficiente de correlação dos iniciadores padronizados.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP - Academia Americana de Pediatria

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros de Controle e Prevenção de Doenças)

cDNA - DNA complementar

Cq - *Quantification cycle* (Ciclo de quantificação)

dCH - doença de Chagas

DEET - N,N-Diethyl-3-methylbenzamide

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DNase - Turbo DNA-free

dNTPs - Desoxirribonucleotídeo trifosfato

EDOs - Enzimas degradadoras de odor

EPA - *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

IR3535 - Ethyl 3-[acetyl(butyl)amino]propanoate

IRs - Receptores ionotrópicos

M - Molar

mL - Mililitros

ng - Nanograma

nM - Nanomolar

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

ORs - Receptores olfativos

p - *p value* (Valor de p)

Pb - Pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PMD - pmenthan-3,8-diol

GRs - Receptores gustativos

RNA - Ácido ribonucléico

RNase - Ribonuclease

g - Força g

RT-qPCR - *Quantitative reverse transcription real time PCR*

SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

USDA - *United States Department of Agriculture* (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

WT - *Wild type* (tipo selvagem)

ΔF - Variação na fluorescência

ΔT - Variação na Temperatura

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Panorama da Doença de Chagas	16
1.2. Repelentes: uma alternativa viável	20
1.3. Sistema olfativo em insetos e o papel dos receptores ionotrópicos	25
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVO	30
3.1. Objetivos específicos	30
4. METODOLOGIA	31
4.1. Modelo para o estudo	31
4.2. AVALIAÇÃO DA REPELÊNCIA EM <i>Rhodnius prolixus</i>	32
4.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS	34
4.3.1. Seleção dos alvos moleculares e desenho dos iniciadores	34
4.3.2. Padronização da extração de RNA	35
4.3.3. Ensaio de PCR convencional	36
4.3.4. Padronização dos iniciadores e cDNA utilizados nos ensaios de RT-qPCR	36
4.3.5. Caracterização do perfil de expressão dos alvos moleculares	37
4.3.6. Extração de RNA e síntese de cDNA	38
4.3.7. Ensaio RT-qPCR	38
4.3.8. Análise estatística	39
5. RESULTADOS	40
5.2. Determinação do efeito repelente em <i>Rhodnius prolixus</i>	40
5.3. Padronização da extração de RNA	41
5.4. Ensaio de PCR convencional	42
5.5. Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR	43
5.6. Ensaio de RT-qPCR	46
5.6.1. Grupos Tratados	46

5.6.2. Grupos Forçados	48
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	64
8. REFERÊNCIAS	65
9. ANEXO	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Panorama da Doença de Chagas

A doença de Chagas (dCh), ou Tripanossomíase Americana, é uma parasitose sistêmica, que leva a uma infecção crônica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Primariamente considerada como uma enzootia silvestre, este parasito é transmitido aos hospedeiros mamíferos através de insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae). Por sua vez, a contaminação desses insetos ocorre durante o repasto sanguíneo em hospedeiros infectados (LENT & WYGODZINSKY 1979).

Dentre os mecanismos de transmissão, a vetorial clássica, caracterizada pelo contato do hospedeiro (a partir de lesões na pele ou mucosa) com as fezes e/ou urina de triatomíneos infectados, constitui uma das principais formas de transmissão. Outras vias importantes de contaminação incluem a oral por ingestão de alimentos contaminados (ainda mediada por vetores), transfusão sanguínea, transmissão vertical (congênita) e transplante de órgãos (DIAS et al., 2016; PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2018).

O caráter endêmico da infecção na América Latina coincide com a distribuição dos vetores, alcançando desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina e Chile, sendo a espécie *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859), encontrada em 16 países latino-americanos, um dos principais vetores destas regiões (JULBERG & GALVÃO, 2006).

Esta doença representa uma enfermidade negligenciada que coloca em risco a saúde de milhões de pessoas, especialmente nas áreas socioeconomicamente vulneráveis (SUETH-SANTIAGO et al., 2017). Estima-se que oito milhões de pessoas estejam infectadas mundialmente, com 41.200 novas infecções e 10.000 mortes ao ano (RASSI et al., 2010; WHO, 2020)

No Brasil, a prevalência de infecção pelo *T. cruzi* varia em 1,4 milhão a 3,2 milhões, sendo que a maioria das pessoas acometidas não possui conhecimento da doença (DIAS et al., 2016). Anualmente são registrados mais de 500 novos casos de infecção, em uma população de mais de 25 milhões que vive exposta ao risco (WHO, 2015). Este cenário epidemiológico torna-se ainda mais preocupante diante das fragilidades dos

diversos sistemas de informação utilizados para: 1) captar os casos de pessoas infectadas e 2) promover a utilização de indicadores epidemiológicos e operacionais nas regiões endêmicas. Neste sentido, o número de novos casos registrados provavelmente reflete a ponta de um *iceberg*, sendo necessário um aprimoramento das ações de atenção à saúde, incluindo vigilância e controle (DIAS et al., 2016).

A expressão clínica da doença ocorre em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela presença de parasitos circulantes, e pode apresentar-se assintomática ou oligossintomática (confundindo-se com outras doenças), ou ainda sintomática, com a possibilidade de evoluir para óbito nos casos mais graves. A doença crônica pode permanecer assintomática por 10 a 20 anos. Após este período aproximadamente 30% dos pacientes poderão apresentar alterações cardíacas, e até 10% irão sofrer com problemas digestivos (RASSI et al., 2010; DIAS et al., 2006). As complicações de saúde causadas envolvem frequentemente cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, megacólon e megaesôfago que conseqüentemente reduzem a produtividade, incapacitando os indivíduos, e aumentam a mortalidade da população, causando alto impacto econômico (LEE et al., 2013).

Um dos marcos mais importantes no controle vetorial dos triatomíneos no Brasil ocorreu em 2006, através da certificação da eliminação da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* (Klug, 1834), espécie alóctone de importância primária, conferido pela OPAS/OMS (FERREIRA & SILVA, 2006). Este resultado se deve às ações integradas de localização dos focos de infestação domiciliar, borrifação de inseticidas com ação residual e vigilância, realizadas de forma sistemática a partir de 1975 sob tutela da Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), posteriormente incorporada à Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (DIAS, 1993; DIAS, 2000). Atualmente, cabe aos municípios a manutenção dos índices de controle alcançados em um contexto de vigilância epidemiológica descentralizada (DIAS, 2000).

Ressalta-se que o *T. infestans* não é a única espécie presente no país. A subfamília Triatominae compreende 152 espécies válidas, incluindo duas fósseis (MONTEIRO et al., 2018; DORN et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020; BRITO et al., 2019). Destas, 67 são endêmicas no Brasil (COSTA & PETERSON, 2012), sobre as quais não há possibilidade de eliminação, sendo aquelas capacitadas a invadir e colonizar o ambiente artificial as mais importantes para a manutenção do ciclo de

transmissão domiciliar, demandando ações permanentes de vigilância e controle (SCHOFIELD et al., 1999; ABAD-FRANCH et al., 2013). Adicionalmente, deve-se considerar que ainda há fatores socioculturais e político-econômicos que estão relacionados com o descaso que muitas vezes não são colocados em pauta, agravando o quadro da enfermidade no país (DIAS et al., 2008).

A complexidade gerada pelo surgimento de novos cenários epidemiológicos também é uma preocupação iminente. A região Amazônica, considerada indene até o final da década de 70, representa uma delas (SHAW et al., 1969). É sabido que nesta região a transmissão vetorial ocorre independentemente do processo de colonização dos ambientes artificiais, a partir da invasão das residências por insetos adultos provenientes do ambiente silvestre. Neste caso, o uso de inseticidas não é totalmente eficaz. Soma-se o crescente processo de desmatamento, seguido de drástica redução da reserva de fonte alimentar, aumentando ao risco de invasões e, conseqüentemente, de novos casos de transmissão (COURA, 1990).

Ainda na perspectiva do potencial de invasão e colonização das casas pelos triatomíneos, novamente evidencia-se o cenário epidemiológico pós *T. infestans*. Nos últimos anos a diversidade de espécies capturadas (vetores de importância secundária ou até terciária) no ambiente artificial em várias regiões do país têm despertado atenção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Além da dificuldade da notificação destas espécies devido à reduzida densidade de triatomíneos nas casas, o índice de infecção dos espécimes capturados é elevado na maioria das vezes, em função da íntima relação destes vetores com os hospedeiros silvestres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Há que se considerar também a expansão da enfermidade em função do processo de globalização. Casos de infecção na Europa, América do Norte, Japão e Austrália estão cada vez mais frequentes em decorrência do fluxo de imigração (GASCON et al., 2010; JACKSON et al., 2014). Nesta perspectiva, a presença do *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773), espécie cosmopolita muito bem adaptada às habitações humanas em zonas portuárias, incluindo vários países do velho mundo, vem despertando a atenção no sentido de ampliar o risco de transmissão vetorial para além dos limites atuais. Alguns autores relatam uma grande e recente infestação peridoméstica por este vetor em cidades do Vietnã, envolvendo centenas de insetos capturados em áreas urbanas e rurais (DUJARDIN et al., 2015; TRUONG & DUJARDIN, 2013). Na China, espécimes adultos de *T. rubrofasciata*

também foram relatados infestando apartamentos desde o térreo ao oitavo andar, alimentando das pessoas e se escondendo em suas camas (LIU et al., 2017).

A importância médica dos triatomíneos não se limita apenas à transmissão da dCh. Exposições frequentes às picadas destes insetos podem causar reações imunológicas (Walter et al. 2012). A saliva possui moléculas bioativas que podem levar a reações alérgicas graves, podendo, em alguns casos, causar anafilaxia (TEO & CHEAH, 1973; MOFFITT et al., 2003; VECCHIO & VAN TRAN, 2004; WANG & PENG, 2006). Nos Estados Unidos, por exemplo, o principal inseto responsável pelos casos de anafilaxia é o *Triatoma rubida* (Uhler, 1894) em Tucson (Arizona) (KLOTZ et al., 2010), e *Triatoma protacta* (Uhler, 1894) no sul da Califórnia. No mesmo país, houve registro de óbito em Phoenix, Arizona (VECCIO & VAN TRAN, 2004), o que agrava ainda mais a preocupação com estes insetos. No Vietnã o *T. rubrofasciata* também é reconhecido pelo incômodo provocado pela picada, que pode ocasionar grandes áreas de edema, coceira, febre e infecções na pele (DUJARDIN et al., 2015).

Finalmente, é importante ressaltar que apesar do grande número de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, dos quais uma parcela significativa pode desenvolver quadros clínicos graves, menos de 1% das pessoas infectadas têm acesso ao diagnóstico e tratamento (CHATELAIN, 2017). Sendo assim, a manutenção do controle vetorial, o diagnóstico precoce da doença, o desenvolvimento de vacinas e novas drogas para tratamento, bem como o uso de métodos alternativos para inibir o contato do hospedeiro com o vetor permanecem como desafios na elaboração de políticas públicas de saúde (DIAS, 2008).

1.2. Repelentes: uma alternativa viável

O uso de substâncias com ação repelente data desde a literatura greco-romana e ao longo da história das civilizações há vários exemplos da utilização de recursos naturais para o controle de pragas e doenças (BROWN & HERBERT, 1997). Por definição, repelentes são substâncias que, quando aplicadas na pele, roupas e superfícies, afetam o comportamento dos insetos na busca pelos hospedeiros, reduzindo o risco de transmissão de doenças infecciosas e reações alérgicas resultantes da picada de artrópodes (RIBAS & CARREÑO, 2010).

Do ponto de vista comercial, um repelente deve apresentar as seguintes características: 1) tempo de ação prolongado; 2) volatilidade suficiente para manter pressão de vapor próxima à pele, sem, contudo, permitir que a substância repelente se dissipe rapidamente; 3) efetividade contra uma ampla variedade de espécies; 4) não ser tóxico ou irritante à pele após aplicação tópica ou aplicação nas roupas; 5) possuir odor agradável ou ser inodoro; 6) não promover alterações nas roupas (BROWN & HERBERT, 1997).

Atualmente, não há um único produto que atenda a todos os requisitos citados acima (PAULA, 2002). Entretanto, instituições responsáveis pelo registro de substâncias repelentes, bem como a validação de seus efeitos, como a Agência Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* – EPA) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC), têm registrado repelentes eficazes com os ingredientes ativos sintéticos DEET, Icaridina e IR3535 (EPA, 2020a).

O DEET (N,N-Diethyl-3-methylbenzamide), descoberto pela *United States Department of Agriculture* (USDA), e desenvolvido pelo exército dos Estados Unidos em 1946, é o sintético mais utilizado no mundo na formulação de repelentes. Isso se deve ao grande número de estudos que comprovam a proteção deste ingrediente ativo contra a picada de insetos hematófagos, sendo reconhecido como padrão-ouro entre os repelentes (EPA, 2020a; KOREN et al., 2003; LEAL, 2014; MCGREADY et al., 2001).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos EUA, indica o uso desta substância para mulheres grávidas como forma de proteção contra espécies de mosquitos do gênero *Culex*, potenciais vetores da Febre do Nilo Ocidental (CDC, 2020a), e espécies de

carrapatos que podem transmitir a bactéria que causa a doença de Lyme (CDC, 2020b). O produto também é indicado para evitar picadas das espécies do gênero *Aedes* e *Anopheles*, sendo importante no cenário da transmissão do vírus Zika e do protozoário que causa a Malária, respectivamente (EPA, 2020b). Também demonstrou ser um eficiente repelente para *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) durante 4h de exposição, em uma concentração de 20% (MISNI et al., 2017). Para *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), por exemplo, promoveu a inibição da alimentação em 55%, em condições de laboratório (MULATIER et al., 2018).

Por outro lado, é essencial destacar que produtos contendo DEET podem apresentar baixo impacto em algumas regiões endêmicas, para diferentes enfermidades, devido ao seu alto custo, acesso e necessidade de reaplicações contínuas (KRAJICK, 2006). Deve-se atentar também, que apesar do efeito repelente comprovado e de ser o princípio ativo padrão-ouro utilizado na maior parte dos repelentes disponíveis atualmente, os potenciais efeitos tóxicos do DEET representam uma preocupação para a sua utilização.

As reações sistêmicas adversas desta substância estão relacionadas à sua absorção para a corrente sanguínea. Após seis horas, até 56% da dose está presente na circulação, e a sua metabolização se dá pelas enzimas P450 no fígado, sendo a meia-vida deste químico no organismo de 2,5 horas (ELLENHORN & BARCELOUX, 1997; KOREN et al., 2003). Corbel e seus colaboradores em 2009 demonstraram, a partir de ensaios bioquímicos e eletrofisiológicos, que o DEET inibe a atividade colinesterásica de insetos e mamíferos, acentuando o efeito tóxico de carbamatos, uma classe de inseticidas. Uma vez que o DEET é comumente utilizado em associação à inseticidas em áreas endêmicas, a sua utilização deve ser repensada ao passo que mais estudos neste sentido são necessários.

A maior parte das manifestações clínicas por intoxicação ao DEET ocorreram por exposição em crianças. Apesar dos casos de toxicidade serem considerados “raros”, devido ao número de aplicações, vários efeitos subletais já foram reportados. Sintomas como dermatites são as mais comuns, como erupções cutâneas, vermelhidão, prurido e até necrose local. O sistema cardiovascular é um dos principais alvos deste químico, podendo resultar em hipotensão e bradicardia. Encefalopatias também já foram observadas, que incluem tremores, coma, hipertonia (hiperatividade muscular) e convulsões (TICE & BREVARD, 1999; ATSDR, 2020). Sabe-se também que este composto apesar de não apresentar efeito tóxico aparente ao feto, pode atravessar a placenta, como visto no trabalho de McGready et al (2001).

Por sua vez, os óleos naturais são utilizados há milhares de anos em diversas culturas pelos povos nativos, tanto pela finalidade terapêutica quanto repelente, sendo considerados inofensivos ao meio ambiente e à saúde humana pela população em geral, despertando interesse e aceitação (MAYA & MOORE, 2011).

Do ponto de vista da saúde pública o uso de repelentes naturais apenas é recomendado em áreas endêmicas, quando há dificuldade de acesso ao DEET. Isso se deve principalmente à elevada taxa de evaporação destes compostos e escassez de estudos científicos que comprovem a eficiência e a baixa toxicidade para uso humano. Além disso, é importante destacar que as substâncias presentes nos óleos naturais podem apresentar variação de acordo com a forma de extração, composição do solo, órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo (ANGIONI et al., 2006).

A utilização dos óleos naturais como repelentes potenciais partem do princípio de que as plantas produzem substâncias voláteis como o citronelal, eugenol, geraniol e limoneno, a partir de seu metabolismo secundário, as quais irão atuar para a preservação da integridade das mesmas, agindo como sinais de comunicação química na interação com o meio ambiente, como por exemplo, repelindo potenciais predadores, evitando a herbivoria (VERPOORTE, 1998). Estas substâncias estão armazenadas e concentradas em diferentes estruturas especializadas e órgãos das plantas, como as células parenquimáticas, bolsas lisígenas ou esquizolisígenas, além de canais oleíferos, células epidérmicas, folhas, raízes, sementes, frutos, flores e caule. Sua concentração nas partes mais verdes é consequência das vias metabólicas da fotossíntese. (BAKKALI et al., 2008).

Atualmente várias espécies de plantas são avaliadas a fim de esclarecer os mecanismos de ação de repelência e isolamento de princípios ativos (VIEGAS JR & BOLZANI, 2006). Contudo, a explicação para a eficácia dessas substâncias contra artrópodes hematófagos ainda não foi totalmente esclarecida, mas acredita-se que tenha uma relação com o processo evolutivo. Uma das teorias discute que a percepção de moléculas olfativas se dá por receptores quimiossensoriais que são altamente conservados nos insetos, a exemplo dos receptores ionotrópicos (IR), refletindo nos insetos hematófagos a história entre as plantas e insetos herbívoros (BENTON et al., 2009). Outra discussão da origem do fenômeno de repelência para este grupo reitera a presença de um ancestral comum com insetos herbívoros, os quais desenvolveram uma probóscide capaz de alcançar

a seiva no interior do corpo da planta (HARREWIJN et al., 1995). Entretanto, ainda há muito para se elucidar sobre essas relações

O óleo essencial de citronela, extraído das espécies *Cymbopogon nardus* e *Cymbopogon winterianus* (Poaceae), apresenta grande importância econômica, sendo utilizado na fabricação de perfumes e cosméticos. Também apresenta ação inseticida, fungicida, bactericida e repelente (TRONGTOKIT et al., 2005; WONG et al., 2005). No início do século XX o óleo de citronela foi utilizado como repelente para mosquitos pelo Exército Indiano, e o primeiro registro para fins comerciais data de 1948 (COVELL, 1940). O óleo é obtido industrialmente por "arraste de vapor", através das folhas da planta. Em concentrações de 5-10%, o óleo de citronela é amplamente utilizado no mercado atual, comumente associado a produtos sintéticos nos repelentes comerciais. Testes laboratoriais demonstraram que a aplicação tópica desta substância na concentração de 100% promoveu proteção contra a picada de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles dirus* (Peyton & Harrison, 1979), com inibição total da alimentação por até 120, 100 e 70 minutos, respectivamente (TRONGTOKIT et al., 2005). Na concentração de 40%, a proteção chega a ser ainda maior para *Anopheles stephensi* (Liston, 1901), com duração de 7-8 horas, evitando completamente a aproximação dos insetos (CARROLL & LOYE, 2006).

Para triatomíneos a citronela já demonstrou resultados promissores. Esta substância foi capaz de inibir completamente o repasto sanguíneo de ninfas e adultos de *Triatoma rubida* (TERRIQUEZ et al., 2013). Ela também foi capaz de reduzir drasticamente a alimentação de *Triatoma protracta* e *Triatoma recurva* (Stal, 1868) (ZAMORA et al., 2015). Os componentes ativos presentes no extrato de citronela também tiveram seu potencial repelente evidenciado por outros estudos, onde o geraniol e o citronellol repeliram significativamente ninfas de *R. prolixus* (Stal, 1859) (MORETTI et al., 2013; LUTZ et al., 2014).

O óleo obtido da espécie *Corymbia citriodora* (Myrtaceae) - popularmente conhecida como eucalipto-limão, eucalipto-cidrô ou eucalipto-cheiroso, também representa um forte candidato para evitar o contato de insetos de importância médica com humanos. Descoberto em 1960 durante uma triagem realizada nas plantas utilizadas pela medicina chinesa tradicional, e utilizado há anos na Ásia e Europa, sua composição pode apresentar

até 85% de citronelal, uma das principais substâncias associadas à repelência em vários óleos naturais, incluindo a citronela (MAYA & MOORE, 2011).

A partir do extrato dessa planta, é possível obter o composto p-menthane-3,8-diol (PMD) que na concentração de 30% demonstrou repelir diferentes espécies de mosquitos durante quatro horas, em um estudo realizado na Bolívia (SAKULKU et al., 2009). Apresentou também proteção total contra *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus* (Giles, 1900) por 6-7 horas (MOORE et al., 2007), e *Anopheles stephensi* por 11-12 horas (FRADIN & DAY, 2002).

Diante do exposto e considerando o cenário epidemiológico atual da doença de Chagas, em que as infestações domiciliares por triatomíneos são baixas, dificultando a detecção dos vetores e, conseqüentemente, comprometendo as medidas de controle usuais; e a possibilidade de transmissão na ausência de colonização domiciliar; a elaboração de novas estratégias são essenciais para a proteção das populações que vivem ou frequentam as regiões endêmicas. Neste contexto, o uso de repelentes, incluindo formulações contendo óleos naturais, pode atuar na diminuição ou inibição do contato com vetores da dCh, assim como já ocorre com outras doenças infecciosas como a Dengue, Zika e Chikungunya.

Para isso, além de testes in vivo para avaliar a ação de repelência nos triatomíneos, também é fundamental compreender o(s) mecanismo(s) de ação envolvido(s). Atualmente há uma quantidade reduzida de informações sobre este fenômeno, sendo a maioria dos artigos publicados relacionados à ordem Diptera, demandando mais estudos para outros grupos de insetos de importância médica (NERIO, 2010; ZERMOGLIO et al., 2015).

1.3. Sistema olfativo em insetos e o papel dos receptores ionotrópicos

O sistema sensorial em insetos é fundamental para a obtenção de informações que irão desencadear diferentes respostas comportamentais, a fim de promover a localização de alimento, parceiros sexuais e abrigos, bem como a avaliação da presença de possíveis ameaças e orientação pelo ambiente (LORENZO & MELO, 2012).

A percepção de moléculas de odor em insetos é realizada principalmente através das antenas, que apresentam uma estrutura segmentada (escapo, pedicelo e flagelo) (Figura 1). Estas, apesar de diferir entre as espécies por particularidades morfológicas, compartilham a capacidade de detectar substâncias voláteis, sendo esta função essencial em todas (SCHNEIDER, 1964).

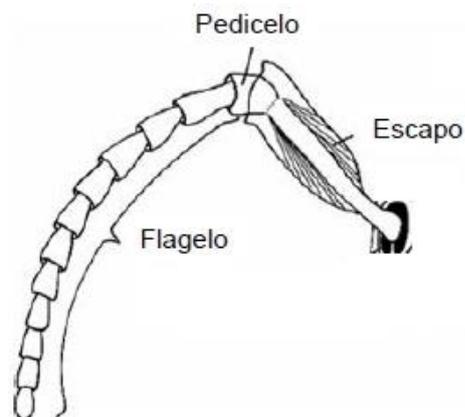


Figura 1: Representação esquemática das principais estruturas de uma antena de inseto. Adaptado de: <http://agronomais.blogspot.com/2016/01/entomologia-anatomia-externa-dos.html>.

Os segmentos presentes nesses órgãos contêm elementos quitinosos denominados sensilas, que abrigam os neurônios sensoriais olfativos (Figura 2). As sensilas podem apresentar poros em diferentes disposições na parede cuticular, e um canal preenchido por um líquido chamado linfa sensilar, onde moléculas presentes no ar são dissolvidas e apresentadas à membrana neuronal, o que provoca um sinal elétrico que após uma série de processos fisiológicos, resulta em uma determinada resposta do inseto. As sensilas olfativas

podem apresentar até 50 neurônios sensoriais olfativos no seu interior, tornando-as ponto chave no processo de detecção de odor (HALLBERG & HANSSON, 1999; ZACHARUK, 1980).



Figura 2: Representação esquemática da estrutura geral de uma sensila olfatória. (Retirado de Lorenzo & Melo. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT, 2012, pag 6).

O processo de detecção desses estímulos tem a participação de proteínas solúveis e de membrana, as quais possibilitam que a resposta celular seja quase imediata. Estas podem estar envolvidas: 1) no transporte através das proteínas ligadoras de odor (*Odorant Binding Proteins* – OBPs), que se associam à moléculas hidrofóbicas, permitindo a sua passagem na linfa sensilar, onde estão abrigadas as proteínas ligantes de odores; 2) no reconhecimento e desencadeamento de sinais elétricos, através de receptores olfativos (ORs), receptores ionotrópicos (IRs), e/ou receptores gustativos (GRs) que conferem especificidade olfativa ao neurônio (LARSSON et al., 2004); e finalmente 3) na eliminação das moléculas de odor do espaço sensilar (enzimas degradadoras de odor - EDOs), importantes para a recuperação do sistema olfativo e percepção de novas substâncias (LORENZO & MELO, 2012).

No que tange ao reconhecimento dos estímulos, há três tipos de receptores quimiosensoriais em insetos: 1) receptores olfativos (ORs), que são acoplados à proteína G;

2) receptores ionotrópicos (IRs), que são conformados fundamentalmente em um canal iônico; e 3) receptores gustativos (RGs), que são essencialmente expressos nas sensilas gustativas (SANTANA, 2016). Os receptores olfativos são proteínas com domínios transmembrana, que apresentam o repertório de genes muito variável entre as espécies de insetos (BENTON et al., 2006). Algumas sensilas abrigam neurônios olfativos que co-expressam o co-receptor olfativo denominado *Orco* (VOSSHALL & HANSSON, 2011) e um OR que determina a resposta neuronal a diferentes estímulos (LARSSON et al., 2004).

Pouco se sabe sobre os mecanismos genéticos responsáveis pela percepção de moléculas odor/repelentes, e como estas desencadeiam uma determinada ação em insetos (BREER et al., 2019), sendo a maior parte dos estudos atuais concentrada nos mecanismos de detecção de odores para receptores olfativos (ORs).

Há três hipóteses discutidas atualmente em relação à detecção do composto ativo DEET: a) Bloqueio de odores atrativos, “mascarando” o hospedeiro (DITZEN et al., 2008); b) Modulação do sistema olfativo, a partir da ligação de moléculas olfativas, resultando na repulsão da fonte alimentar (BOHBOT & DICKENS, 2010) e c) Ativação direta de receptores quimiossensoriais órgãos sensoriais que repelem os insetos, um processo chamado de “sentir e evitar” (LEE et al., 2010; SYED & LEAL, 2008). Contudo, após ensaios realizados com insetos mutantes para o co-receptor *Orco*, há evidências de que a segunda e terceira hipótese constituem o real mecanismo de percepção desta substância nestes organismos (DEGENNARO et al., 2013).

O *OR136* de *Culex quinquefasciatus*, por exemplo, é possivelmente responsável pela detecção do DEET, Icaridina, IR3535, PMD (pmenthan-3,8-diol) e da substância metil jasmonato, todos considerados repelentes de insetos (XU et al., 2014). Já o co-receptor olfativo *Orco* demonstrou ser responsável pela detecção de DEET em *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (DITZEN et al., 2008) e *Aedes aegypti* (DEGENNARO et al., 2013). Estudos de expressão heteróloga em óocitos de *Xenopus* indicam que o receptor olfativo *RproOr80* responde ao DEET na espécie *R. prolixus* (FRANCO et al., 2018).

Descritos por Benton e seus colaboradores em 2009 em *D. melanogaster* os receptores ionotrópicos constituem uma família de proteínas de membrana que, com sua abertura, permitem o fluxo de íons. O complexo destes receptores ligado aos neurônios olfativos é composto por um receptor de odor específico mais um ou dois correceptores,

que são comuns a todos os outros IR (portanto, co-expressos): o *IR25a*, *IR8a* e *IR76b* (ABUIN et al., 2011). Diferente dos receptores olfativos, os IRs são bem conservados, e acredita-se que sejam a primeira família de receptores de detecção de odor em insetos (CROSET et al., 2010).

Os triatomíneos apresentam 33 IRs incluindo os três co-receptores acima citados (MESQUITA et al., 2015). Latorre-Estivalis et al (2016) reforçaram o papel quimiossensorial de receptores ionotrópicos nestes insetos, em que seus transcritos foram encontrados expressos de forma significativa nas antenas e outros órgãos sensoriais de *R. prolixus*. O *IR41b*, por exemplo, é abundante nas antenas de triatomíneos adultos sugerindo que este receptor está associado a sinais químicos relacionados à vida adulta, como a detecção de feromônios que são essenciais para a reprodução.

A literatura envolvendo estes receptores é escassa, principalmente relacionado à detecção de repelentes naturais, não existindo estudos neste sentido para triatomíneos. Portanto, o desenvolvimento de um trabalho com o intuito de avaliar a participação de IRs no reconhecimento dessas substâncias é essencial.

2. JUSTIFICATIVA

Mais de 100 anos após a descoberta da infecção humana pelo *T. cruzi*, a doença de Chagas permanece como um grave problema de saúde pública pelo impacto inerente à morbimortalidade (DIAS, 2011; LEE, 2013). Estima-se que 8 milhões de pessoas se encontram infectadas pelo parasita. No Brasil, as estimativas variam entre 1,4 milhão a 3,2 milhões (DIAS et al., 2016).

Devido ao sucesso do Programa de Controle da Doença de Chagas, sistematizado para a área endêmica clássica em 1975, e baseado na borrifação de inseticidas de ação residual, o Brasil recebeu em 2006 a certificação da eliminação da transmissão vetorial pelo *T. infestans*. Este reconhecimento, apesar de representar um grande avanço no contexto epidemiológico, é um perigo por seu panorama ufanista e estímulo ao afrouxamento das políticas públicas (DIAS, 2006). Ainda deve-se considerar que há mais de 60 espécies autóctones no país, com potencial de invasão do ambiente artificial e possível transmissão do parasita (COSTA & PETERSON, 2012).

Alterações recentes no cenário epidemiológico de transmissão vetorial, seja na Amazônia ou na área endêmica clássica, onde os insetos são capazes de transmitir o *T. cruzi* mesmo na ausência de colonização, impõem limitações ao tradicional método de controle. Além disso, a reduzida densidade das infestações domiciliares também dificulta o trabalho de vigilância entomológica (AGUILAR, 2007). Sendo assim, estes novos desafios demandam novas estratégias de vigilância.

Considerando a inexistência de vacinas e a ineficiência do tratamento das infecções crônicas, o uso de repelentes pode representar uma potencial medida profilática de proteção individual, seja pela possibilidade de diminuição ou interrupção do contato com os triatomíneos, e conseqüente possibilidade de transmissão do *T. cruzi*, ou ainda com o objetivo de diminuir as reações alérgicas causadas pela saliva desses insetos.

Nesta perspectiva, o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na detecção das moléculas repelentes pelos triatomíneos torna-se fundamental para a geração de conhecimentos que poderão contribuir para o desenvolvimento racional de repelentes contra estes insetos.

3. OBJETIVO

Avaliar a ação de repelência de substâncias naturais e a participação de receptores ionotrópicos envolvidos no processo de detecção de moléculas repelentes em *Rhodnius prolixus*.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar se os óleos de citronela e eucalipto-limão possuem efeito de repelência semelhante ao composto ativo DEET, em ninfas de *R. prolixus*;
- Analisar os níveis de expressão gênica relativa de receptores ionotrópicos *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, *RproIR75a* e *RproIR75e* em *R. prolixus*, mediante contato com o óleo de citronela, eucalipto-limão e DEET;
- Comparar os níveis de expressão gênica dos receptores ionotrópicos *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, *RproIR75a* e *RproIR75e* nas antenas de *R. prolixus* expostos às substâncias repelentes em diferentes modalidades de exposição.

4. METODOLOGIA

4.1. Modelo para o estudo

A espécie *Rhodnius prolixus* foi selecionada por representar importância epidemiológica na América Central e parte da Colômbia e Venezuela, com formação de colônias de alta densidade (PRATA et al., 2011). Além disso, o genoma desse vetor foi recentemente sequenciado (MESQUITA et al., 2015), tornando-se referência para a maior parte dos trabalhos realizados em biologia molecular com triatomíneos.

As colônias usadas neste trabalho foram mantidas pelo Grupo de Pesquisa Triatomíneos do Instituto René Rachou - FIOCRUZ MG, origem: Honduras, em estufa com condições controladas de temperatura (27°C), umidade relativa (60%) e fotoperíodo (12 horas claro/escuro). Estes insetos são acondicionados em potes plásticos (12 cm x 10 cm) e a alimentação ocorre quinzenalmente em galinhas anestesiadas (Licença LM 10/18). Após a ecdise para o 5º estágio, os insetos foram agrupados e assim permaneceram na estufa até serem utilizados nos experimentos.

Os camundongos utilizados nos ensaios de avaliação do efeito repelente e na caracterização do perfil de expressão dos alvos moleculares foram fornecidos pelo Biotério de Produção do Instituto René Rachou, mantidos em sala com temperatura e umidade controladas (Licença LM 10/18). Todos os procedimentos que envolveram animais foram realizados conforme o Manual de Utilização de Animais/Fiocruz (2008).

4.2. AVALIAÇÃO DA REPELÊNCIA EM *Rhodnius prolixus*

Os óleos naturais de citronela e eucalipto-limão, bem como o composto ativo sintético DEET, foram selecionados devido aos seus efeitos repelentes evidenciados pela literatura (MAYA & MOORE, 2011; LEAL, 2014; CARROLL & LOYE, 2006; SAKULKU et al., 2009), além do registro de uso e indicação em regiões endêmicas pelos Centros de Controle e Prevenção a Doenças (CDC). Os óleos essenciais (puros) foram fornecidos pela empresa LAZLO, que garante a qualidade e pureza dos seus extratos pela técnica de Cromatografia. O DEET (97%) foi obtido da empresa Sigma-Aldrich.

Os ensaios para determinação do efeito repelente foram realizados a partir da observação direta da busca pelo hospedeiro, em uma arena experimental de acrílico com um orifício central (15 x 15 x 15cm) (Figura 3). Para isso, foram constituídos os grupos experimentais controle (animais tratados apenas com acetona absoluta - Merck) e teste (óleo de citronela, eucalipto-limão e DEET diluídos em acetona absoluta na proporção de 50%). Para cada um destes grupos foram utilizadas 10 ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* com 21 dias de jejum pós-muda.

Cada grupo experimental foi exposto, por 30 minutos, a um camundongo macho anestesiado (diluição 3:2 de Cetamina e Xilazina) da linhagem Swiss com oito semanas de idade e aproximadamente 25g (Licença LM 10/18). Nos grupos teste, a região abdominal dos camundongos foi topicamente “tratada” com 28 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ da substância a ser testada. Concomitantemente, para cada experimento testando os três repelentes, animais tratados apenas com acetona (grupos controle), foram também expostos. Estes ensaios foram realizados em três réplicas biológicas.

A escolha da diluição para a realização dos ensaios foi definida baseada em resultados encontrados anteriormente pelo nosso grupo, em que a concentração de 50% apresentou a melhor eficiência para estes mesmos repelentes quando testados em ninfas de segundo estágio de *Rhodnius neglectus* ($P < 0,05$) (CANEDO et al., 2019).

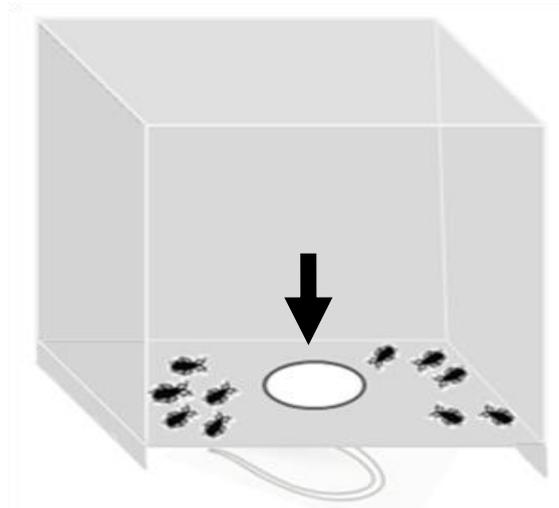


Figura 3 - Representação esquemática da arena experimental utilizada para alimentação das ninfas de triatomíneos nos estudos de repelência (15x15x15 cm), sendo a região abdominal da fonte alimentar (camundongo tratado ou não) exposta através do orifício central (diâmetro: 2cm), apontado pela seta.

O cálculo da repelência foi feito pela fórmula de Abbott (1925): % repelência = $[(C-T)/C] \times 100$, onde C corresponde ao número de ninfas que se alimentaram no grupo controle; T é o número de ninfas que se alimentaram no grupo teste. A comparação entre os grupos (controle x repelente) foi realizada pelo teste t (paramétrico).

4.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS

4.3.1. Seleção dos alvos moleculares e desenho dos iniciadores

Com base nos trabalhos de repelência e olfação disponíveis na literatura (ABUIN et al., 2011; BENTON et al., 2009; LATORRE-ESTIVALIS et al., 2015; MESQUITA et al., 2015; OMONDI ET al. 2015), a seleção dos genes candidatos foi realizada a partir dos seguintes critérios: i) Genes de receptores ionotrópicos de antenas de insetos envolvidos no processo de reconhecimento de moléculas repelentes (de origem sintética ou natural); ii) Genes olfativos expressos nas antenas de triatomíneos. E para o gene normalizador (α -*tubulina*): iii) apresentar expressão homogênea nas diferentes amostras.

O gene constitutivo *α -tubulina* e os genes que codificam os co-receptores ionotrópicos *RproIR8*, *RproIR25a* e *RproIR76B* (Vector Base: RPRC002763, RPRC000589, RPRC000469, respectivamente), assim como os receptores ionotrópicos *RproIR75a* e *RproIR75e* (RPRC002112 e RPRC000047, respectivamente) foram selecionados para a análise da expressão gênica.

Os desenhos dos iniciadores foram realizados no software Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) e a síntese foi feita pela IDT (Integrated DNA Technologies). Os nomes, sequências e tamanho dos fragmentos amplificados dos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores utilizados nos ensaios de biologia molecular

Gene	Senso	Antisenso	Amplicon (pb)
<i>a-tubulina</i>	5'-TTTCCTCGATCACTGCTTCC-3'	5'-CGGAAATAACTGGGGCATAA-3'	129
<i>RproIR8a</i>	5'-TGCAGTCCAACAAGGTAGTCAC-3'	5'-GCGTAATGCCTTCATCTTCGTCA-3'	155
<i>RproIR25a</i>	5'-AAGATGTGGCAGGCAATGAAGG-3'	5'-CTGTTGCATCACCAAGGAAAGC-3'	118
<i>RproIR76b</i>	5'-GCGTTTGCGTACCAAATGGACA-3'	5'-GCGTCCGGTAGATCCAAAGTGATT-3'	113
<i>RproIR75a</i>	5'-CTGGCAGTGCCTGTAGTCAA-3'	5'-AACGAAACCACTTCCGTTTG-3'	150
<i>RproIR75e</i>	5'-GGGTGCGGACAGACAGTAAT-3'	5'-GTGAATGGCAGCGATATGTG-3'	100

4.3.2. Padronização da extração de RNA

A padronização da extração do RNA das antenas dos triatomíneos foi necessária para obter quantidades homogêneas do material em todos os ensaios realizados. Para isto, foi feita uma série de modificações no protocolo inicial de extração. As mudanças executadas nesta etapa evoluíram: i) Tempo de maceração das antenas; ii) Tempo na precipitação em isopropanol (Ensure, Merck); iii) Aplicação de glicogênio (Invitrogen) ou acetato de sódio 3M (Thermo Scientific) a fim de aprimorar a precipitação em isopropanol; iv) Volume inicial de TRIzol Reagent (ThermoFisher) utilizado para a maceração; v) Velocidade de rotação e tempo na centrífuga; vi) Temperatura e tempo de permanência das amostras no banho seco; vii) Tempo de permanência das amostras em baixas temperaturas (-20 °C) e viii) Tempo de secagem do sedimento após limpeza com etanol 70% (Neon).

As modificações que permitiram as maiores quantidades de RNA após a quantificação no Qubit (Qubit™ 4 Fluorometer, Invitrogen™), seguindo a mesma metodologia do tópico 4.3.6, foram incorporadas para a realização dos ensaios. Deste modo, foi possível adquirir quantidades semelhantes de RNA (valores iguais ou maiores que 30 ng/μL) para todas as amostras, homogeneizando o rendimento do RNA nos grupos experimentais. As alterações realizadas nesta etapa serão consideradas como resultados neste trabalho (item 5.3).

4.3.3. Ensaios de PCR convencional

Primeiramente, as reações de PCR convencional foram realizadas com um grupo de amostras a fim de verificar se os iniciadores apresentavam boa amplificação, a partir da observação dos tamanhos dos produtos no gel. Os cDNAs utilizados nesta etapa referem-se ao grupo jejum.

As reações consistiram 1 μ L de cDNA, 500 nM de cada iniciador, 400 μ M para cada dNTP e 0,5 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) em um volume final de 20 μ L, realizados em 40 ciclos no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), (95°C por 3 minutos, 95°C por 30 segundos, 60°C por 45 s, 72°C por 30 segundos e 72°C por 4 minutos). Para cada par de iniciadores utilizados, foi realizado um controle negativo (branco), no qual o cDNA é substituído por água livre de nucleases, a fim de descartar a presença de contaminação por DNA nos iniciadores ou em qualquer outro reagente da PCR.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, para posterior visualização no transluminador. Nos géis, foram aplicados o padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) e um mix contendo 3 μ L do produto da PCR e 3 μ L de tampão de amostra (Promega).

4.3.4. Padronização dos iniciadores e cDNA utilizados nos ensaios de RT-qPCR

Com o objetivo de estabelecer os melhores parâmetros de amplificação dos iniciadores e do cDNA produzido para os ensaios de RT-qPCR (PCR de transcrição reversa quantitativa), foi realizada a padronização a partir de diferentes concentrações, seguindo as recomendações do MIQE Guidelines (BUSTIN et al., 2009). Foram feitos ensaios de RT-qPCR utilizando todos os iniciadores nas concentrações de 200, 400, 600 e 900 nM juntamente a diluições seriadas do DNA complementar (30; 15; 7,5; 3,75; 1,875; 0,9375 ng/ μ L). Os resultados obtidos após a análise no software Thermo Fisher Cloud, que demonstraram melhor eficiência (C_q s – *Quantification cycle* menores) com a menor concentração possível de cDNA, foram selecionados para a realização dos experimentos.

4.3.5. Caracterização do perfil de expressão dos alvos moleculares

O possível envolvimento entre os genes selecionados com o reconhecimento de moléculas repelentes foi avaliado a partir da caracterização do perfil de expressão gênica. Para isso, grupos de 10 ninfas de 5º estágio da espécie *R. prolixus* com 21 dias de jejum pós-muda, e mantidas sob as mesmas condições ambientais descritas no item 4.1 foram submetidos a diferentes condições:

1. Grupo “controle”: ninfas expostas a camundongos, porém impedidas de obter o repasto sanguíneo por meio de uma tampa plástica na região de exposição (orifício central) (N=30);
2. Grupo “tratado”: ninfas expostas a camundongos tratados topicamente com os óleos naturais de citronela, eucalipto-limão e o composto ativo DEET na concentração de 50%, seguindo a mesma metodologia descrita no item 4.2 (N=30);
3. Grupo “forçado”: ninfas expostas em uma placa de Petri (14 cm de diâmetro) contendo um círculo de papel filtro (mesmo diâmetro) embebido com 6,5 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ das substâncias selecionadas na concentração de 50%. Anteriormente à exposição das ninfas, cada solução foi homogeneamente distribuída pelas placas, sendo necessário aguardar o período de 5 minutos para a completa evaporação da acetona (N=30).

Após 30 minutos de exposição das ninfas às diferentes condições propostas, as antenas foram dissecadas com o auxílio de pinça e micro-tesoura, formando *pools* com 10 pares de antenas, em tubos de microcentrífuga de 2 mL. Para aprimorar as condições de extração de RNA, os tubos com as antenas foram mantidos em gelo seco. Foram realizadas três réplicas biológicas e três réplicas técnicas para cada substância selecionada.

4.3.6. Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA consistiu na separação de pools de 10 pares de antenas para maceração mecânica com pistilos de polipropileno em um volume inicial de 50 μL de TRIzol Reagent (Invitrogen), completando para 500 μL . Na etapa seguinte, foram aplicados 100 μL de clorofórmio (Neon) seguido de passagem na centrífuga para a separação das fases. O RNA então foi retirado da fase aquosa (transparente) e colocado em 250 μL de Isopropanol (Ensure, Merck) gelado para a etapa de precipitação durante 24 h (overnight). As amostras foram colocadas na centrífuga (17000 g/ 15 minutos/ 4°C) e após o descarte do sobrenadante foi realizada uma lavagem em 500 μL álcool 70% (Neon), duas vezes seguidas.

O RNA foi então dissolvido em 20 μL de água livre de nucleases (Invitrogen) juntamente a 1 μL de inibidor de RNase (Promega) para o tratamento com DNase, utilizando o TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen) para remoção do DNA genômico. A quantificação do RNA total foi feita no Qubit™ 4 Fluorometer, utilizando o kit Qubit™ RNA HS Assay segundo as recomendações do fabricante (Invitrogen).

Após a normalização, 16 μL do RNA (480 ng) de cada amostra foram utilizados para a síntese de cDNA com a adição de 1 μL de Random Primer Hexamer (Promega), juntamente ao sistema da transcriptase reversa (Promega), com 5 μL de tampão, 2 μL de dNTP 10nM (Promega) e 1 μL da enzima M-MLV, totalizando 25 μL para a produção do cDNA. A reação foi realizada no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), a 25°C por 10 minutos, 37°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos para posterior armazenamento a -20°C. O cDNA sintetizado serviu como molde para as reações de PCR convencional e RT-qPCR.

4.3.7. Ensaios de RT-qPCR

A modulação da expressão gênica dos receptores ionotrópicos em diferentes condições experimentais foram avaliadas por RT-qPCR. As reações foram feitas utilizando 5 μL do Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 200 nM (para os alvos *α -tubulina*, *RproIR8a* e *RproIR76b*) e 600 nM (*RproIR25a*, *RproIR75a* e *RproIR75e*) de cada iniciador, 2 μL dos produtos da reação de síntese de cDNA (30 ng/ μL) e o restante completado por água livre de nucleases (Invitrogen), em um volume final de 10 μL , que foram distribuídos em placas de 96 poços (Applied Biosystems).

A detecção dos resultados foi realizada pelo equipamento ViiA7 Real-time PCR System (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de: 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minutos. O grupo controle foi escolhido como calibrador, enquanto que o gene *α-tubulina* foi designado como normalizador para os valores de Cq (Quantification cycle) obtidos. Os Cqs normalizados foram então utilizados para calcular o nível de expressão gênica relativa das amostras usando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak & Schmittgen 2001). Todas as amostras foram amplificadas em triplicatas técnicas.

Adicionalmente, foram estabelecidos três controles para as placas: 1) o RT negativo, em que o RNA foi adicionado numa reação de síntese de cDNA com a ausência da enzima transcriptase reversa, a fim de verificar se houve contaminação por DNA genômico; 2) Branco, que consistiu na aplicação do mix de qPCR com exceção do cDNA, que foi substituído por água livre de nucleases, com o objetivo de observar a contaminação dos reagentes utilizados e 3) Controle interplaca, nos quais dois poços da placa foram selecionados para a aplicação do mesmo cDNA (de insetos controle) com o alvo IR8a, em todas as placas utilizadas nos experimentos, para posterior análise no programa Thermo Fisher Cloud, com a finalidade de assegurar a homogeneidade das corridas, permitindo assim a avaliação de amostras de um mesmo experimento, mas de corridas diferentes.

4.3.8. Análise estatística

A primeira análise foi feita pelo software Thermo Fisher Cloud (endereço eletrônico: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/digital-science.html>), em que os Cqs dos grupos testados foram obtidos a partir da consideração das eficiências de cada iniciador juntamente ao controle interplaca. Posteriormente, com a utilização do software GraphPad Prism 8.0 foi realizado o teste de normalidade dos dados pelo teste Saphiro-Wilk. Para os bioensaios de repelência que comparam grupo controle com seu respectivo grupo teste (Tratado ou Forçado), as análises foram feitas através do teste t (paramétrico). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.2. Determinação do efeito repelente em *Rhodnius prolixus*

Os resultados obtidos nos ensaios para a determinação do efeito repelente em *R. prolixus* mostraram que 100% das ninfas foram repelidas quando expostas aos óleos naturais de citronela e eucalipto-limão, bem como ao composto ativo DEET, na concentração de 50% (Tabela 2), demonstrando efeito semelhante na inibição do repasto sanguíneo dos insetos a estas substâncias. Os insetos permaneceram nas extremidades da arena durante todo o experimento, com exceção de algumas ninfas que apresentaram o comportamento de se aproximar cerca de 1cm de distância da fonte alimentar, permanecer por alguns instantes, voltar para as extremidades e assim se manterem até o fim do experimento.

Nos grupos controle, mais de 80% dos insetos realizaram o repasto sanguíneo nos primeiros 10 minutos de experimento, demonstrando que a aplicação da acetona como veículo não influenciou na atividade repelente além de evidenciar o potencial das substâncias testadas.

Fórmula de Abbott (1925): 100% de repelência para as três substâncias repelentes testadas.

Tabela 2: Porcentagem de ninfas que realizaram repasto sanguíneo nos grupos teste/controle expostas à camundongos topicamente tratados com os óleos de citronela e eucalipto-limão, e ao DEET.

Espécie/Estádio	Repelente	Teste (%)	Controle* (%)
<i>Rhodnius prolixus</i> / 5°	Citronela	0	100
	Eucalipto-limão	0	80
	DEET	0	90

p<0,0001

*Controle – Camundongos tratados apenas com a acetona.

N=30, para cada grupo.

5.3. Padronização da extração de RNA

Uma vez determinada a quantidade inicial de RNA ótima para termos a maior eficiência dos iniciadores, executar o maior número de ensaios e considerando o baixo rendimento das extrações de RNA de antenas de triatomíneos, trabalhamos na otimização da extração de RNA. Com a finalidade de adquirir uma quantidade homogênea de RNA para todos os ensaios a partir do protocolo de extração das antenas dos triatomíneos, foi realizada uma série de modificações no protocolo inicial, a saber:

- a) Substituição do nitrogênio líquido por gelo seco aprimorou a quantidade de RNA final extraído e facilitou significativamente o processo de extração;
- b) O tempo de maceração das antenas no TRIzol foi fixado em 5 minutos, alternando com a permanência de 30 segundos das amostras no gelo seco para que a ação mecânica (manual) não promovesse aquecimento dos tubos por muito tempo, o que poderia causar a degradação do RNA;
- c) O fabricante recomenda que o tempo de precipitação em isopropanol seja de quatro horas. No entanto, foi observado que a permanência de pelo menos 24h (overnight) em -20°C aumentou a eficiência para a obtenção do material;
- d) A diminuição do volume do TRIzol também foi importante para esta etapa. Quando utilizado apenas 50 μL do reagente inicialmente (para posterior adição de 450 μL) para a maceração das antenas, foi possível destruir o tecido com maior eficiência utilizando um período de tempo significativamente menor do que quando colocado um volume maior (100 μL), de acordo com as recomendações do fabricante.
- e) A velocidade de rotação e permanência das amostras na centrífuga, em todas as etapas em que a sua utilização se fez necessária, foram aumentados de 8500 g para 17000 g, e 10 para 15 minutos, respectivamente.
- f) Ampliação do período de incubação das amostras para 30 minutos a 37°C na etapa de tratamento com DNase.
- g) O uso de 1 μL de glicogênio ou de acetato de sódio 3M na etapa de precipitação com isopropanol não alterou a quantidade final de RNA obtida, não sendo incorporado à metodologia.

Desta forma, as mudanças descritas acima permitiram obter a quantidade de no mínimo 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$ em todas as extrações realizadas neste trabalho, o que não era possível

anteriormente, em que as concentrações variavam bruscamente para cada amostra e muitas vezes apresentavam quantidades baixas, inviabilizando a realização dos ensaios. O protocolo final, com todas as modificações descritas, apresenta-se no Anexo desta dissertação.

5.4. Ensaios de PCR convencional

Precedendo o início dos ensaios de RT-qPCR, foi verificada a qualidade dos cDNA sintetizados com os RNAs extraídos. Portanto, uma pequena amostra do cDNA foi amplificado utilizando o iniciador para cada gene selecionado. As amplificações dos transcritos foram constatadas nas bandas no gel de poliacrilamida 8%, permitindo verificar que os iniciadores apresentaram amplificação específica para os transcritos alvo, sendo identificados os tamanhos de 129, 155, 118 e 113pb para os genes *α -tubulina*, *RproIR8a*, *RproIR25a* e *RproIR76b*, respectivamente (Figura 4A) e 150 e 100pb para os receptores *RproIR75a* e *RproIR75e*, respectivamente (Figura 4B). Os controles negativos dos respectivos genes não amplificaram nenhum fragmento.

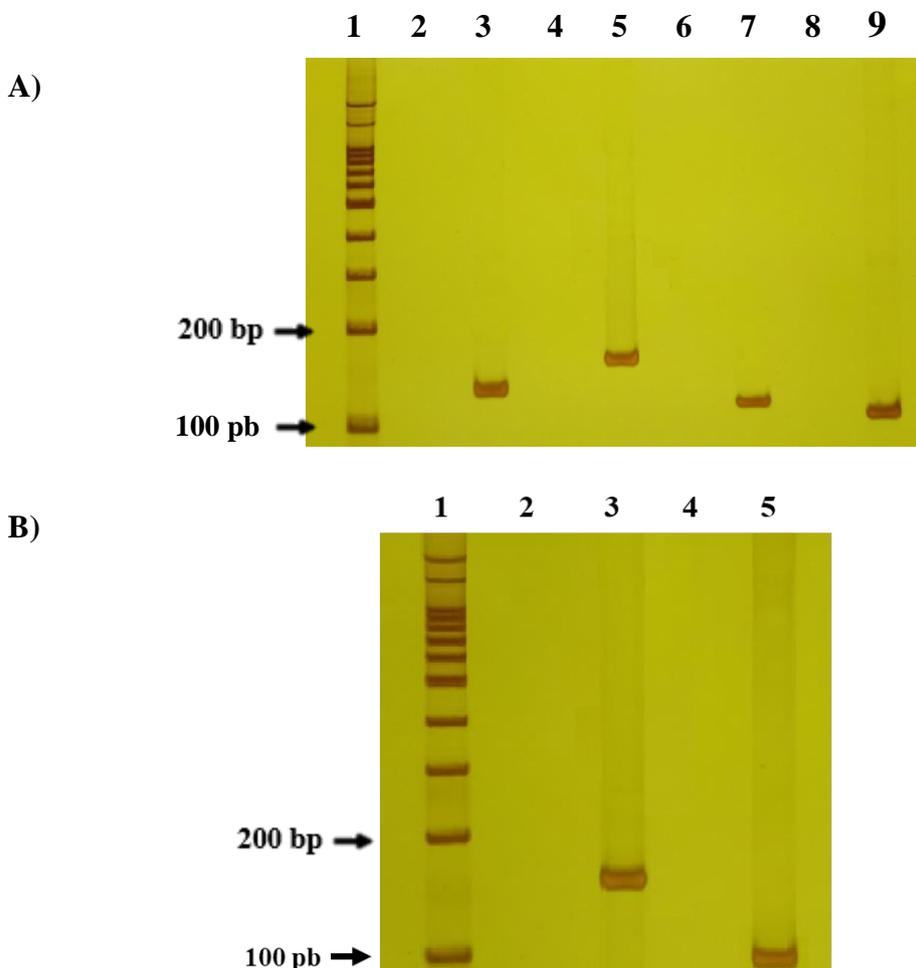


Figura 4. Análise da qualidade dos cDNAs e iniciadores desenhados para utilização nos ensaios de RT-qPCR. **A)** Canaleta 1: Marcador de peso molecular de 100 pares de base. Canaletas 2, 4, 6 e 8: Brancos dos alvos *α-tubulina*, *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, respectivamente. Canaletas 3, 5, 7 e 9: Alvos *α-tubulina*, *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, respectivamente. **B)** Canaleta 1: Marcador de peso molecular de 100 pares de base. Canaletas 2 e 4: Brancos dos alvos *RproIR75a* e *RproIR75e*, respectivamente. Canaletas 3 e 5: Alvos *RproIR75a* e *RproIR75e*, respectivamente.

5.5. Padronização dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR

A fim de determinar a concentração em que os iniciadores desenhados apresentavam maior eficiência nas reações de RT-qPCR, foi realizada a padronização utilizando diferentes concentrações de iniciadores e cDNA. A concentração ideal para o gene constitutivo *α-tubulina* foi de 200 nM, e a curva padrão gerada apresentou uma inclinação de -3,11, e coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,99 (Gráfico 1A). Os outros iniciadores também foram analisados, sendo a concentração ideal de 200 nM para os alvos *RproIR8a* (Gráfico 1B) e *RproIR76b* (Gráfico 1C), e 600 nM para os genes *RproIR25a*, *RproIR75a* e *RproIR75e* (Gráfico 1D, E e F, respectivamente). Os valores da inclinação da curva padrão e do coeficiente de correlação destes iniciadores foram de -3,10 e 0,99 (*RproIR8a*), -3,58 e 0,98 (*RproIR76b*), -3,4 e 0,99 (*RproIR25a*), -3,2 e 0,99 (*RproIR75a*) e -3,3 e 0,98 (*RproIR75e*). Os valores de eficiência e os coeficientes de correlação estão descritos na Tabela 3.

A curva de dissociação (curva de melting), importante para a verificação da especificidade do iniciador, demonstrou apenas um pico para todos os alvos analisados, o que garante a especificidade da amplificação dos ensaios (Gráfico 2).

A melhor eficiência atingida para todos os iniciadores utilizando o cDNA teste, foi com 60 ng/ μ L (2μ L = 60 ng), que representa a maior concentração testada.

O controle interplaca demonstrou após a análise que as corridas entre as diferentes placas utilizadas foram homogêneas, e o controle negativo não apresentou contaminação.

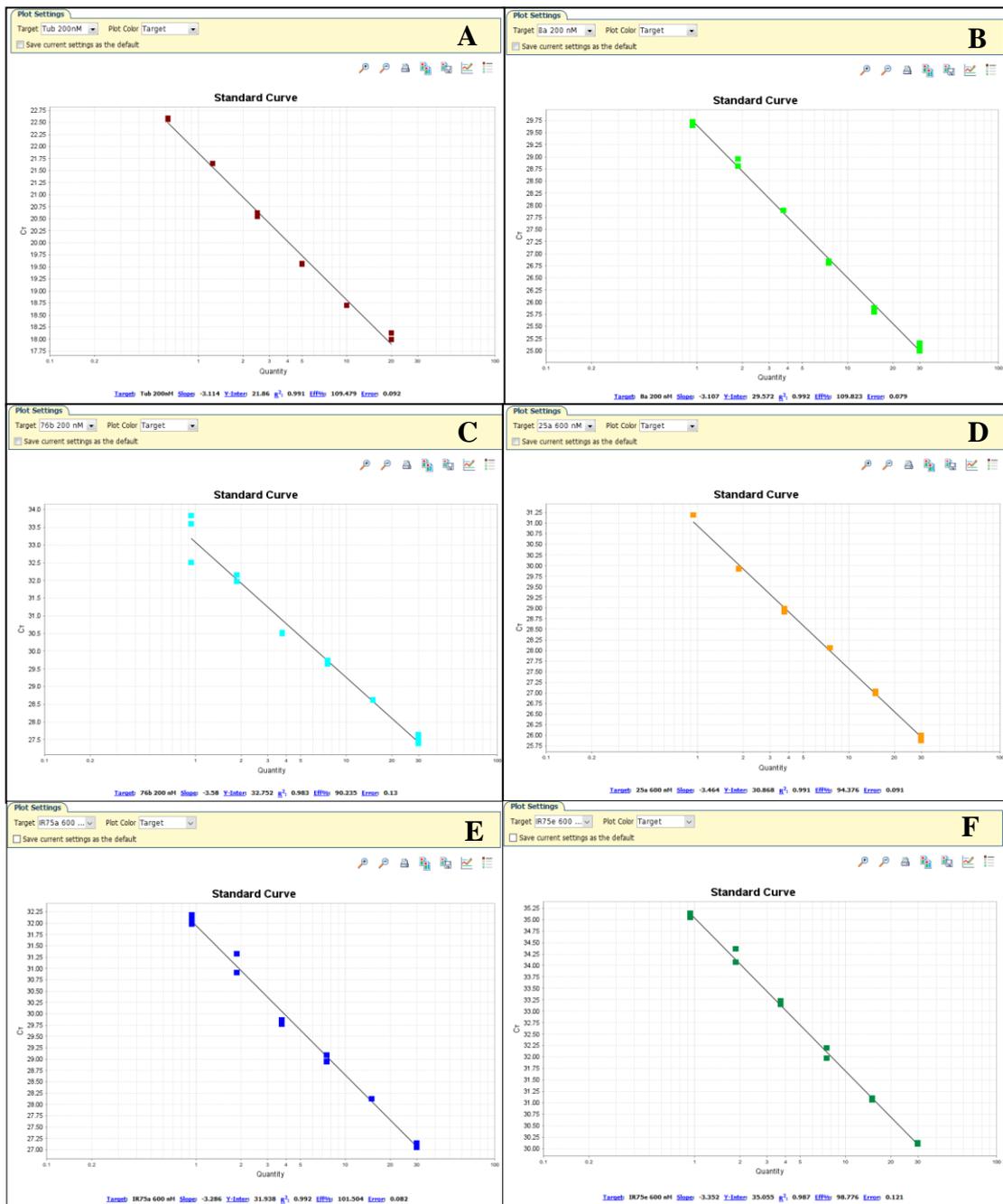


Gráfico 1. Padronização dos iniciadores α -tubulina, *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, *RproIR75a* e *RproIR75e*. A, B, C, D, E e F – Curva de eficiência dos alvos α -Tubulina, IR8a, IR25a, IR76b, IR75a e IR75e, respectivamente, construídas a partir de quantidades decrescentes de cDNA obtidas por diluição seriada (Fator de diluição: 2). O eixo Y representa o Cq (*quantification cycle*) e o eixo X a quantidade de produto amplificado.

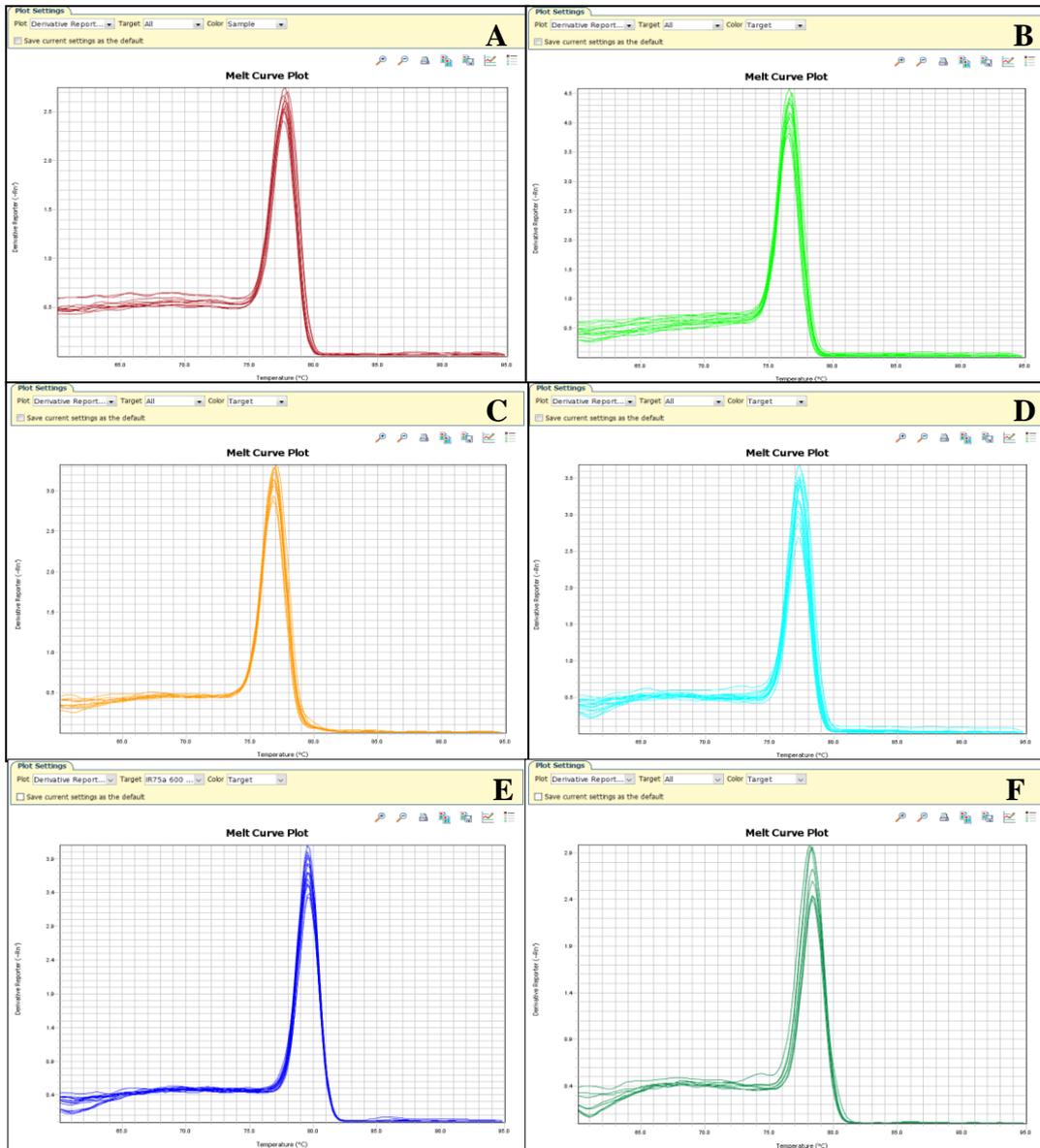


Gráfico 2. Curvas de dissociação dos iniciadores α -tu bulina, *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, *RproIR75a* e *RproIR75e*. A, B, C, D, E e F representam os alvos α -Tubulina, IR8a, IR25a, IR76b, IR75a e IR75e, respectivamente. O eixo Y representa o $\Delta F / \Delta T$ (Variação na fluorescência/Variação na Temperatura) e o eixo X representa a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Tabela 3. Valores de eficiência e coeficiente de correlação dos iniciadores padronizados.

Iniciador	Eficiência	R ²
α -Tubulina	109,6	0,99
<i>RproIR8a</i>	109,8	0,99
<i>RproIR76b</i>	94,3	0,98
<i>RproIR25a</i>	90,2	0,99
<i>RproIR75a</i>	101,5	0,99
<i>RproIR75e</i>	98,7	0,98

5.6. Ensaios de RT-qPCR - Caracterização do perfil de expressão dos alvos moleculares

5.6.1. Grupos Tratados

A expressão relativa dos co-receptores ionotrópicos *RproIR8a*, *RproIR25a* e *RproIR76B* e dos receptores ionotrópicos *RproIR75a* e *RproIR75e* para os grupos testados com a citronela, eucalipto-limão e o DEET, foi determinada por RT-qPCR. Os Cqs normalizados apresentaram distribuição normal pelo teste de Saphiro-Wilk, e a comparação dos grupos entre si foi realizada pelo teste t (paramétrico).

O alvo *RproIR8a* demonstrou diferenças estatísticas significativas para os repelentes naturais no grupo Tratado, sendo a expressão 25,1 e 28,9% menor para as ninfas expostas à Citronela ($p < 0,05$) e Eucalipto-limão ($p < 0,05$), respectivamente, quando comparados com o grupo controle (Figura 5a).

O gene *RproIR25a* apresentou redução significativa da expressão gênica para os ensaios que utilizaram o óleo de eucalipto-limão e o DEET, com uma diferença de 28,8 ($p < 0,05$) e 35,1% ($p < 0,05$), respectivamente, no grupo Tratado em relação ao grupo controle (Figura 5b).

De maneira similar, o co-receptor *RproIR76b* mostrou alteração significativa na sua expressão para o repelente citronela com um decréscimo de transcritos de 22% ($p < 0,05$), e para a substância DEET, a diminuição foi de 29,6% ($p < 0,05$), também para o grupo Tratado em relação ao grupo Controle (Figura 5c).

O receptor olfativo *RproIR75a* demonstrou diferenças evidentes nos níveis de transcritos para os grupos expostos a repelentes naturais. Houve uma redução significativa da expressão gênica de 63,9 ($p < 0,001$) e 49,3% ($p < 0,001$) nos ensaios com citronela e eucalipto-limão, respectivamente (Figura 5d).

Dentre todos os alvos testados, o *RproIR75e* foi o único que apresentou mudanças de expressão para os três repelentes selecionados nos grupos Tratado. O resultado de maior destaque refere-se aos insetos expostos ao óleo de citronela, em que houve 61% ($p < 0,0001$) de redução na expressão gênica. Foi possível também observar a diminuição significativa

da expressão de 24,2 (p<0,05) e 45,9% (p<0,05), nas antenas dos *R. prolixus* expostos aos compostos eucalipto-limão e DEET, respectivamente (Figura 5e).

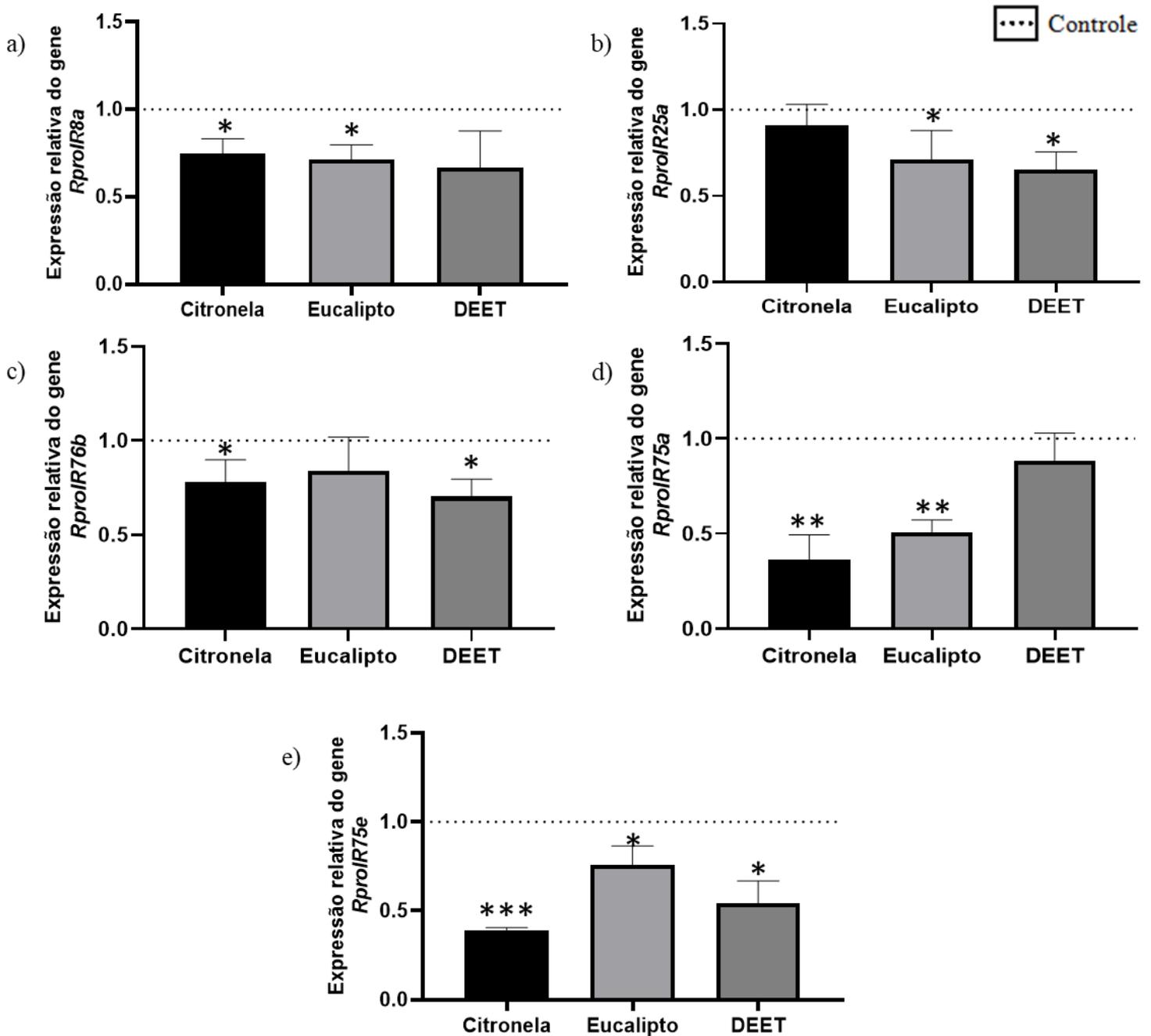


Figura 5: Avaliação da expressão relativa dos receptores ionotrópicos *RproIR8a*, *RproIR25a*; *RproIR76b*, *RproIR7* e *RproIR75* em antenas de *Rhodnius prolixus* expostos a diferentes substâncias repelentes (Citronela, Eucalipto-limão e DEET) do grupo Tratado em relação ao grupo Controle: a) *RproIR8a*; b) *RproIR25a*; c) *RproIR76b*; d) *RproIR75a*; e) *RproIR75e*. Barras pretas representam os níveis de transcritos em antenas de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* expostas a Citronela, cinza claro Eucalipto-limão e cinza escuro DEET. Acima das barras está representado o desvio padrão. Asteriscos representam diferenças estatísticas significativas: *p<0,05, **p<0,001 e *p<0,0001.**

5.6.2. Grupos Forçados

A análise dos grupos Forçados em relação ao controle demonstrou que os genes apresentaram o mesmo padrão com diminuição da expressão gênica, quando houveram alterações. Além disso, foi possível observar diferenças no nível de redução de expressão gênica entre os grupos Tratado, Forçado e Controle.

Para o alvo *RproIR8a*, apenas o grupo Forçado de *R. prolixus* exposto a citronela apresentou redução significativa da expressão quando comparado ao controle (44,3%) ($p < 0,05$) (Figura 6^a). Em comparação ao grupo Tratado para o mesmo repelente, esta redução chegou a ser 19,1% maior (Figura 7a). Ainda, não apresentou alterações para o repelente eucalipto-limão, como ocorreu nos grupos Tratado para este gene.

Nos grupos Forçado para o gene *RproIR25a* em relação ao controle, houve diminuição da expressão (31,5%) ($p < 0,05$) apenas em triatomíneos expostos ao repelente “citronela”, significativamente (Figura 6b). Em contrapartida, não foi observado o mesmo para este gene nos grupos de insetos do Tratado, em que não houveram alterações para esta substância, mas sim para os repelentes eucalipto e DEET (Figura 5b e 7b).

Em antenas de ninfas expostas aos diferentes repelentes do grupo Forçado, o receptor ionotrópico *RproIR76b* apresentou reduções significativas na expressão para os compostos citronela (36,1%), eucalipto-limão (19,6%) e DEET (25,2%) em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 6c). Sendo que nos insetos expostos ao repelente citronela, a alteração nos níveis de transcritos se mostrou ainda mais evidente em comparação ao grupo Tratado para esta substância, com uma diferença de redução 14,1% maior. Não foram observadas diferenças significativas do DEET quando grupos Tratado e Forçado foram comparados, como demonstrado na Figura 7c.

A expressão do receptor *RproIR75a* no grupo Forçado foi 28,2% ($p < 0,05$) e 49,9% ($p < 0,001$) menor em comparação ao controle, nas antenas dos insetos expostos à citronela e eucalipto-limão, respectivamente (Figura 6d). Desta vez, insetos do grupo Tratado expostos a citronela apresentaram uma diferença de redução significativa em comparação ao grupo de insetos Forçado expostos ao mesmo repelente, sendo esta de 35,7% (Figura 7d).

Finalmente, foi possível também observar a redução da expressão gênica do alvo *RproIR75e* nas antenas de insetos expostos aos três repelentes testados nos grupos Forçado,

sendo a diminuição significativa de 28,7, 34,7 e 22,7% para o óleo de citronela, eucalipto-limão e princípio ativo DEET, respectivamente ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (Figura 6e). Porém, nos insetos dos grupos Tratado, a diferença da diminuição da expressão foi mais evidente para as substâncias citronela e DEET, sendo estas 32,3 e 23,2% maiores quando comparados aos insetos expostos aos mesmos repelentes do grupo Forçado (Figura 7e).

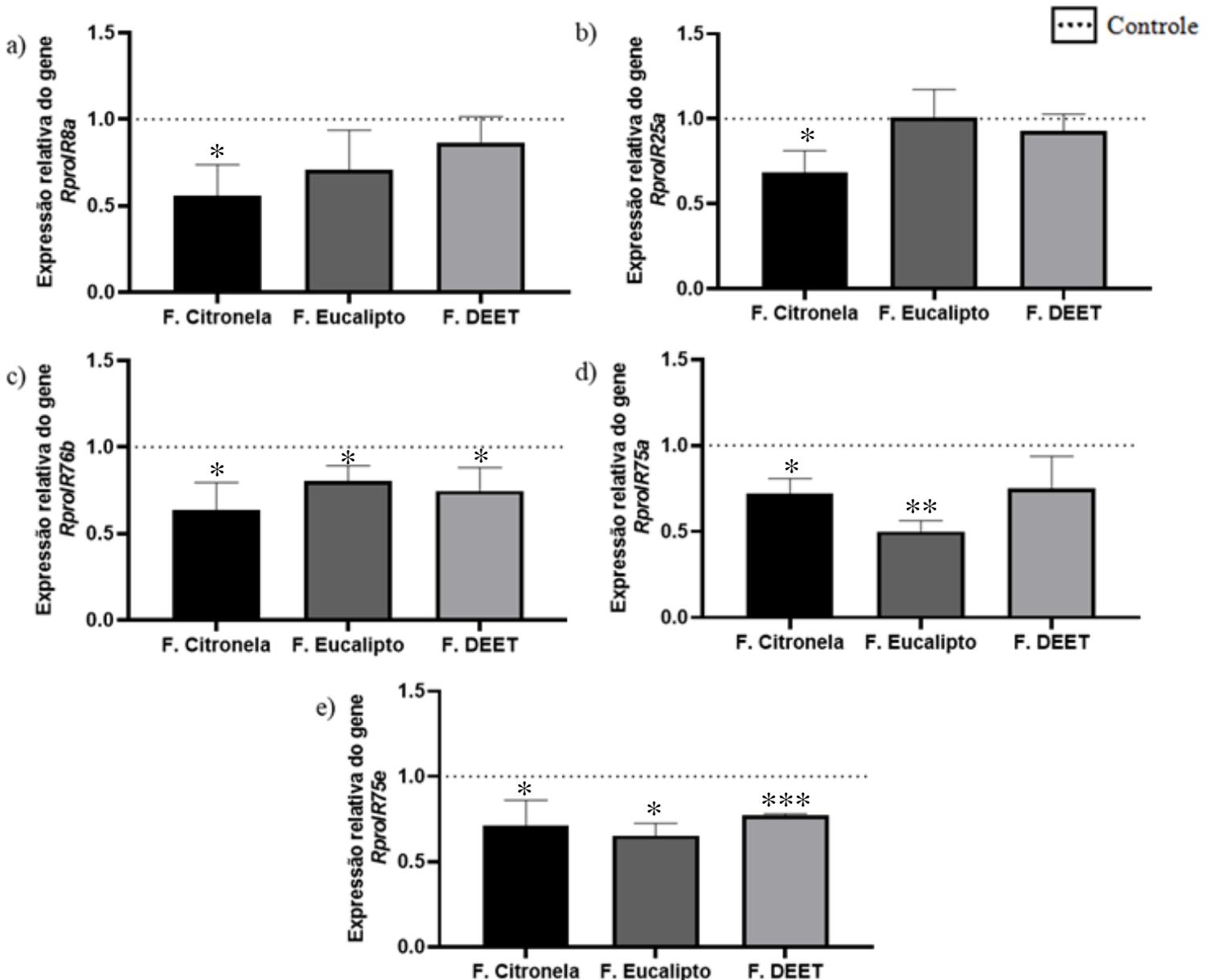


Figura 6: Avaliação da expressão relativa dos receptores ionotrópicos *RproIR8a*, *RproIR25a*; *RproIR76b*, *RproIR7* e *RproIR75* em antenas de *Rhodnius prolixus* expostas a diferentes substâncias repelentes (Citronela, Eucalipto-limão e DEET) do grupo Forçado em relação ao grupo Controle: a) *RproIR8a*; b) *RproIR25a*; c) *RproIR76b*; d) *RproIR75a*; e) *RproIR75e*. Barras pretas representam os níveis de transcritos em antenas de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* expostas a Citronela, cinza escuro

Eucalipto-limão e cinza claro DEET. Acima das barras está representado o desvio padrão. Asteriscos representam diferenças estatísticas significativas: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$. (N=30, para cada grupo).

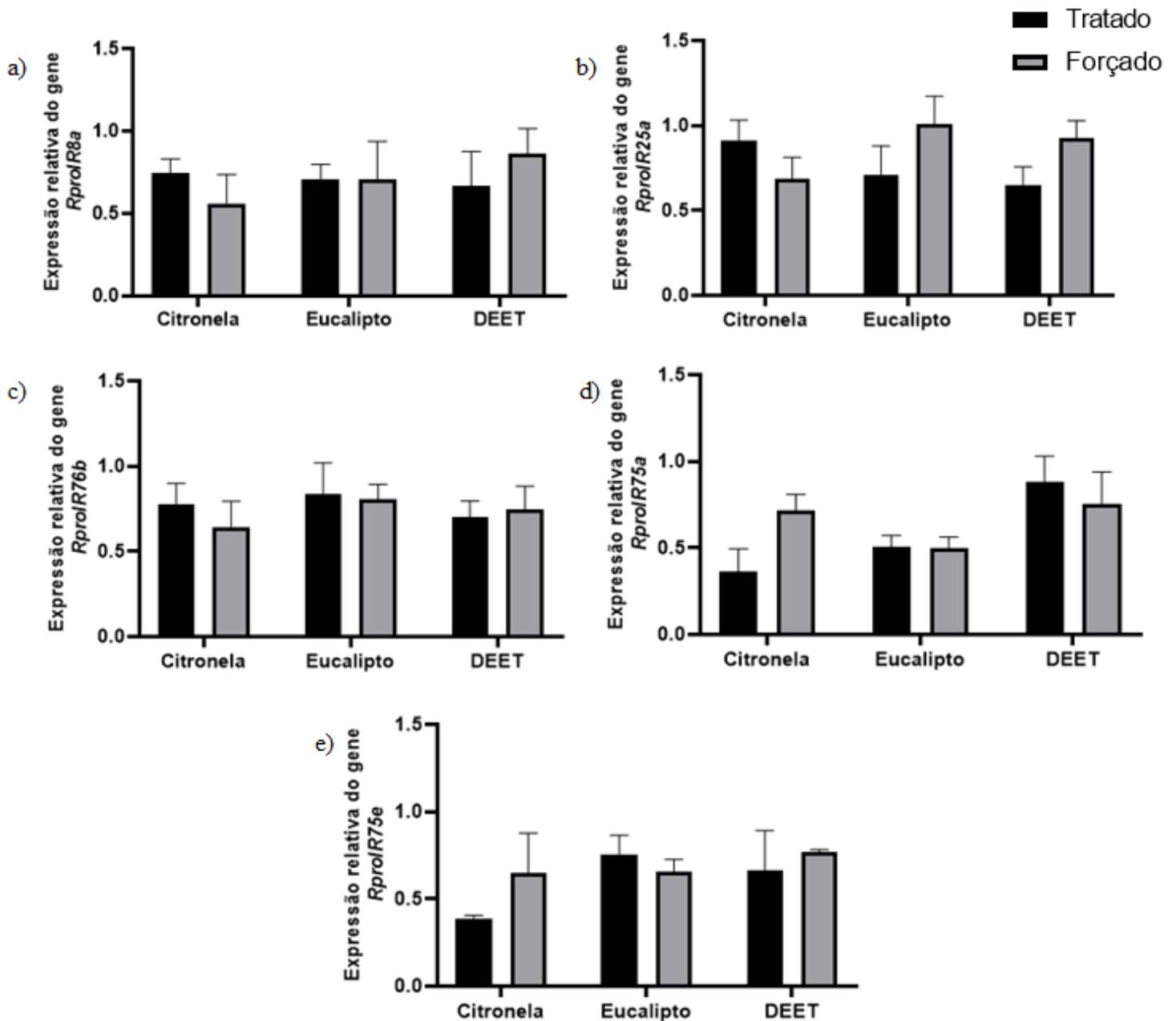


Figura 7: Avaliação da expressão relativa dos receptores ionotrópicos *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, *RproIR7* e *RproIR75* em antenas *Rhodnius prolixus* expostas a diferentes substâncias repelentes (Citronela, Eucalipto-limão e DEET) do grupo Forçado em relação ao grupo Tratado: a) *RproIR8a*; b) *RproIR25a*; c) *RproIR76b*; d) *RproIR75a*; e) *RproIR75e*. Barras pretas representam os níveis de transcritos em antenas de ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* no grupo Tratado e as cinzas no Grupo Forçado. Acima das barras está representado o desvio padrão.

6. DISCUSSÃO

Atualmente, os estudos sobre repelentes e insetos disponíveis na literatura englobam, principalmente, membros da ordem Diptera e pouco se sabe sobre o mecanismo de detecção e ação dessas substâncias. Para triatomíneos, há uma limitação ainda maior desses trabalhos, o que dificulta a compreensão deste fenômeno a nível comportamental e molecular nestes organismos frente a esses compostos. Deste modo, este estudo visou avaliar o efeito repelente de três substâncias repelentes para *Rhodnius prolixus* e conhecer melhor a correlação de receptores ionotrópicos nas respostas a repelentes nesta espécie.

Na primeira etapa deste trabalho, foram realizados bioensaios com ninfas de 5º estágio de *R. prolixus* a fim de avaliar se há efeito repelente dos óleos de citronela e eucalipto-limão, assim como o princípio ativo DEET, na concentração de 50% (diluídos em acetona). Em todos os ensaios, estas substâncias inibiram totalmente a alimentação dos insetos em comparação ao controle, em que mais de 80% das ninfas realizaram o repasto completo. Este resultado evidencia o potencial efeito repelente dessas substâncias e corrobora estudos publicados nos últimos anos sobre o seu potencial de repelência para estes insetos (ALZOGARAY et al., 2000; BAR-ZEEV, 1980; BUESCHER et al., 1985; DIAS & SILVA, 1969; DEGENNARO, 2015).

O DEET é o princípio ativo sintético mais utilizado nas formulações de repelentes mundialmente (DEGENNARO, 2015). O primeiro ensaio realizado com triatomíneos para avaliar o efeito desta substância, a partir do uso tópico em hospedeiros (camundongo, pombo e seres humanos), foi realizado por Dias & Silva (1969). Embora a concentração do DEET não tenha sido informada, os autores verificaram que ninfas e adultos das espécies *P. megistus* e *T. infestans* foram repelidos por até 60 minutos e que, diferente dos nossos resultados com *Rhodnius*, em nenhuma das fontes de alimentação houve inibição total do repasto. Posteriormente, outro estudo utilizou ninfas de 5º estágio de *P. megistus* que foram expostas à pele de coelho tratada com diferentes repelentes e compostos, incluindo extratos de plantas brasileiras. Os autores demonstraram que os repelentes não foram totalmente eficazes para essa espécie, e que até mesmo o DEET a 100% apresentou repelência por apenas 1 hora, reiterando a sua eficácia, mas também a elevada dose necessária para este efeito (BAR-ZEEV, 1980).

Buescher et al (1985) demonstraram, em encontro aos nossos resultados, que o DEET inibiu mais de 95% dos repastos de insetos adultos de *R. prolixus*, em um ensaio com papel filtro tratado com substâncias repelentes, colocado na área abdominal de coelhos. Porém, é importante ressaltar que isto só foi possível a partir de doses altas da substância (16,7 mg/cm²). Em função disso, discute-se que o uso do DEET como repelente por viajantes para áreas endêmicas seria inviável para proteção contra picadas de triatomíneos, mesmo sendo uma recomendação de uso advinda de instituições de saúde, como a Associação Internacional de Assistência Médica a Viajantes (IAMAT). A nível comercial, a concentração utilizada nos nossos experimentos também seria considerada alta, o que abre precedentes para a realização de ensaios com concentrações mais baixas e com efeito repelente eficiente no futuro.

Diante de estudos que destacam as concentrações altas necessárias do DEET para a sua eficácia, juntamente aos seus possíveis efeitos tóxicos (ATSDR, 2019; BAR-ZEEV, 1980; BUESCHER et al., 1985; CORBEL, 2009; TICE & BREVARD, 1999), a busca por alternativas a este princípio ativo tornou-se cada vez mais frequente, assim como o interesse pelos repelentes de origem natural. Por serem considerados mais seguros para humanos e para o meio ambiente, mais baratos e de fácil acesso, além de proporcionar repelência comprovada em vários trabalhos (ILIOU et al., 2019; DA SILVA & RICCI-JÚNIOR, 2020), os repelentes naturais são excelentes candidatos para proteção individual contra picadas de insetos hematófagos de importância médica.

O óleo de citronela é frequentemente encontrado nas formulações comerciais de repelentes mundialmente (MAYA & MOORE, 2011), e neste contexto, representa o composto natural de maior importância econômica, além de melhor representado na literatura em comparação à outras substâncias naturais.

O resultado obtido com o óleo de citronela neste trabalho demonstrou inibição total do repasto sanguíneo das ninfas, e corrobora o trabalho de Lutz et al (2014), em que vários monoterpenos (princípios ativos presentes em óleos naturais) foram testados para *R. prolixus*, em uma arena experimental com papel filtro tratado. O geraniol, composto ativo presente em uma parcela significativa do óleo de citronela e eucalipto-limão, demonstrou repelência significativa aos triatomíneos, iniciando em uma concentração de 74 µg/cm². Com uma metodologia semelhante, Moretti et al (2013) demonstrou que os componentes

geraniol e citronellol produziram efeito repelente significativo em ninfas de primeiro estágio de *R. prolixus* na concentração de 39g/cm² e 390g/cm², respectivamente.

O efeito repelente do óleo de citronela foi também evidenciado para outras espécies de triatomíneos. Em 2013, um estudo realizou testes em que ninfas de quarto e quinto estágio, e adultos de *Triatoma rubida* foram expostas a camundongos contidos em um tubo de acrílico acima de um papel filtro tratado com óleo de citronela a 0.165%. Das cinco substâncias repelentes testadas (incluindo o DEET a 10%) a citronela foi a única capaz de inibir completamente a alimentação dos insetos (TERRIQUEZ et al. 2013). Com uma metodologia semelhante, outro trabalho recente realizou ensaios com a finalidade de avaliar o efeito repelente do óleo de citronela e seus componentes ativos em três espécies de triatomíneos. A substância foi capaz de reduzir totalmente a alimentação de *T. rubida* e drasticamente a de *Triatoma protacta* e *Triatoma recurva*. Dentre os compostos ativos, o geraniol e o citronellol (0.165%) apresentaram repelência significativa para todos os grupos testados (ZAMORA et al., 2015).

O óleo de eucalipto-limão bem como o seu princípio ativo PMD (para-Menthane-3,8-diol), apesar de comumente utilizado na medicina tradicional Chinesa (MAYA & MOORE, 2011) e apresentar alto potencial repelente em diversos trabalhos para Dipteros, como para *Anopheles stephensi* (proteção por 6-7 horas) (TRIGG, 1996), *Aedes aegypti* (2h) (FRADIN & DAY, 2002) e *Anopheles arabiensis* (6h) (GOVERE et al., 2000), ainda não foi testado para nenhum hemíptero de importância médica, tornando este trabalho pioneiro em ensaios de repelência com esta substância. Ainda, é importante reiterar que esta substância foi totalmente eficaz como repelente, juntamente ao óleo de citronela e ao DEET nos nossos ensaios, evitando a aproximação das ninfas da fonte alimentar durante os 30 minutos do experimento.

A explicação para efeito semelhante encontrado para os dois óleos naturais testados pode ser consequência da concentração dos principais componentes ativos presentes em suas formulações: citronellol, citronellal e geraniol (SILVA et al., 2011; ALVES et al., 2018). Estes compostos, individualmente, como explicitados anteriormente, contêm propriedades repelentes para triatomíneos (LUTZ et al., 2014; MORETTI et al., 2013; ZAMORA et al., 2015), sendo ainda mais eficazes isolados do que quando comparados aos óleos naturais (ZAMORA et al., 2015).

A utilização de carreadores junto às substâncias repelentes podem representar um desafio para desenhos experimentais, uma vez que estes também podem apresentar propriedades repelentes, o que altera o resultado comportamental. Os nossos ensaios evidenciaram que a acetona não apresenta, e tão pouco afeta o efeito repelente das substâncias testadas. Este solvente foi utilizado por quase todos os trabalhos que avaliam a repelência em triatomíneos em “grupos controle” e não influenciaram na atração/repelência dos insetos (LUTZ et al., 2014; ALZOGARAY et al., 2000; ALZOGARAY, 2016; ZAMORA et al., 2015), tornando-a ideal para a diluição dos repelentes utilizados neste estudo.

Apesar do efeito repelente comprovado, agências reguladoras, como a Agência de Proteção Ambiental (EPA), nos EUA, recomenda o DEET para proteção individual em áreas endêmicas em detrimento aos óleos naturais devido à alta taxa de evaporação e consequente perda das propriedades repelentes dos mesmos, acentuadas pelo ar, umidade, transpiração e temperatura, além do número limitado de trabalhos que abordem estas substâncias (MAYA & MOORE, 2011). Porém, a etapa inicial do presente trabalho evidenciou que o DEET apresentou o mesmo efeito repelente que os óleos naturais para o modelo empregado.

Mesmo que o tempo do bioensaio possa representar um fator limitante, é importante destacar que em todas as réplicas houve inibição total do repasto das ninfas pelas três substâncias testadas, todas sob as mesmas condições. Além disso, há estudos que demonstram que estes compostos naturais desempenham alta eficácia repelente para triatomíneos, ainda que expostos por um tempo maior. Em um trabalho recente desenvolvido pelo nosso grupo, o óleo de citronela e o óleo de eucalipto-limão na concentração de 50%, apresentaram efeito repelente para ninfas de segundo estágio de *R. neglectus*, com inibição da alimentação dos insetos por até 7 horas (CANEDO et al., 2019).

Outro estudo realizado pelo nosso grupo, utilizando diferentes formulações e ingredientes ativos presentes em repelentes disponíveis comercialmente, demonstrou que somente os produtos contendo DEET a 6,79% associado à citronela, e DEET na concentração de 14,55%, foram capazes de inibir 100% o contato entre hospedeiros (camundongo) e triatomíneos (OLIVEIRA, 2018). É plausível supor que a associação da citronela potencializou o efeito do DEET na menor concentração, uma vez que em outra formulação contendo apenas o DEET a 6,79%, não foi observado inibição total do contato.

Os repelentes naturais de fato apresentam uma taxa de evaporação elevada, mas isto não é motivo para descartá-los no contexto de proteção individual. O fato dos óleos naturais frequentemente não passarem por processos que assegurem a integridade dos seus princípios ativos, como ocorre com produtos contendo DEET, estabelecem uma comparação muitas vezes injusta. Há diversos procedimentos que permitem o aprimoramento desses compostos, sendo o uso de nanotecnologia o mais conhecido deles (TAWATSIN et al., 2001).

A formulação do óleo de citronela em uma nanoemulsão, com glicerol por exemplo, cria gotículas que eleva a retenção e desacelera a liberação da substância natural, o que está relacionado ao aumento do tempo de proteção contra mosquitos (TAWATSIN et al., 2001). Outra técnica conhecida é a microencapsulação, método utilizado comumente pela indústria de cosméticos e perfumaria, com componentes como a goma arábica (uma resina natural composta por polissacarídeos e glicoproteínas) que mantém o efeito repelente da citronela por até 30 dias em temperatura ambiente (SPECOS et al., 2010).

A adesão aos repelentes naturais está crescendo à medida que os consumidores procuram meios de se protegerem de artrópodes nocivos à saúde humana. Além disso, substâncias naturais já são utilizadas por populações locais há anos com a finalidade de repelir insetos (dentre outras) e por isso são consideradas mais seguras e de fácil acesso em comparação a formulações comerciais. Portanto, a consideração mais importante nesse sentido seria encontrar e aplicar novas formas de assegurar a eficácia de compostos naturais juntamente à produção de conhecimentos que expliquem o mecanismo de repelência.

Há uma lacuna no conhecimento sobre como os repelentes interagem e desencadeiam modificações fisiológicas/comportamentais em insetos. Ainda assim, os estudos que evidenciam o papel de receptores quimiossensoriais e a sua interação com substâncias repelentes indicam que o modo de detecção desses compostos realmente ocorre a nível molecular. Em *Drosophila melanogaster*, o receptor olfativo DmOR42a, parece ser responsável pela detecção das três substâncias químicas mais utilizadas em formulações comerciais atualmente: DEET, IR3535 e Picaridina (SYED et al., 2011). Em *Ostrinia furnacalis*, um inseto lepidóptero típico de plantações de milho, sabe-se que o OR OfurOR27 é sensível ao nonanal, octanal e 1-octanol, voláteis de plantas que repelem e inibem a oviposição na espécie (YU et al., 2020). Xu et al. (2014) demonstraram a partir de ensaios eletrofisiológicos e comportamentais após o silenciamento do gene *CquiOR136* na

espécie *Culex quinquefasciatus*, que o DEET e o methyl jasmonato (molécula de origem natural) são percebidos por este receptor olfativo. De maneira semelhante, DeGennaro e seus colaboradores em 2013, evidenciaram o papel genético por trás no processo de repelência, quando fêmeas de *A. aegypti* silenciadas para o co-receptor olfativo *Orco* sentiram atração por humanos, mesmo na presença do DEET, substância na qual já havia demonstrado ser um eficiente repelente à indivíduos selvagens (WT) da espécie.

Estudos moleculares relacionados à detecção e modo de ação dos repelentes para triatomíneos estão em seus passos iniciais. Porém, alguns autores já evidenciaram o papel de receptores e detecção de moléculas repelentes nestes insetos. Zermoglio et al. (2015) demonstrou que *R. prolixus* percebe repelentes diretamente, com possível interação com receptores quimiossensoriais, uma vez que mesmo sem a presença de um hospedeiro vertebrado, houve efeito repelente das substâncias testadas, incluindo o DEET. Franco e seus colaboradores em 2018, em ensaios utilizando o sistema de óocitos de *Xenopus*, descobriram que o receptor olfativo *RproOR80*, de *R. prolixus* foi sensível ao 4-methylcyclohexanol, um composto repelente para a espécie. Interessantemente, os insetos silenciados para este gene não foram mais repelidos pela substância. Outros estudos ainda indicam que, para agir como repelente, o DEET interage com a família de ORs de forma *Orco*-dependente (DEGENNARO et al., 2013; DITZEN et al., 2008).

Desta forma, a visualização do comportamento das ninfas que se aproximaram do centro da arena e se afastaram assim que perceberam os repelentes (tornando improvável a hipótese do bloqueio dos odores do hospedeiro), juntamente às modificações geradas no nível de expressão dos genes avaliados nos nossos ensaios, mostram que o processo pelo qual os triatomíneos percebem os repelentes pode se dar ao nível molecular e estar associado à ligação de moléculas olfativas a receptores específicos.

Todavia, devido as especializações do repertório olfativo e sua conseqüente variedade nos modos de interação com o ambiente, deve-se considerar o envolvimento de múltiplos fatores no processo de detecção de repelentes nos insetos. Há evidências que repelentes interagem diretamente com neurônios sensoriais olfativos (SYED & LEAL, 2008; XIA et al., 2008), receptores gustativos (SANFORD et al., 2013) e até mesmo inibindo a resposta a odores atrativos (BOHBOT & DICKENS, 2012).

Na segunda etapa deste trabalho, caracterizamos o perfil de expressão de cinco alvos moleculares: *RproIR8a*, *RproIR25a*, *Rpro76b*, *Rpro75a* e *Rpro75e*, com a finalidade de compreender o envolvimento destes receptores ionotrópicos no mecanismo de detecção de substâncias repelentes em *R. prolixus*.

A escolha dos alvos para este trabalho está diretamente ligada à estrutura molecular dos IRs. Os receptores ionotrópicos são expressos em neurônios sensoriais e estão relacionados à percepção de diversos estímulos quimiossensoriais, além de representarem genes bem conservados em bactérias, plantas e animais. Sabe-se também que eles agem na forma de dímeros ou trímeros co-expressos no mesmo neurônio (BENTON et al., 2009). Segundo Abuin et al. (2011), o complexo desses receptores é composto por um ou dois co-receptores (*IR8a*, *IR25a* e/ou *IR76b*) juntamente a um receptor de odor específico. Portanto, os co-receptores estão expressos em todos os IR presentes no organismo, tornando-os excelentes candidatos para a avaliação de fatores genéticos envolvidos na repelência desta família de receptores. Os alvos *IR75a* e *IR75e* por sua vez, apresentam expressão significativa em antenas de *R. prolixus*, em todos os estádios ninfais e adulto (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2016).

O nível de expressão relativa dos genes analisados que demonstraram alteração diminuiu significativamente em relação ao grupo controle em todos os ensaios. Modificações no comportamento de insetos pelo decréscimo da expressão de genes específicos já foram observadas por Fox et al. (2001) em que o gene *AgOR1*, de *Anopheles gambiae* reduziu a sua expressão após a alimentação, levando a incapacidade dos insetos em detectar odores do hospedeiro humano 12h após o repasto. Posteriormente, Ditzen et al. (2008) observou após análises eletrofisiológicas, que o DEET inibe a atividade do receptor olfativo *OR83b* em *D. melanogaster*.

Em triatomíneos, Franco e seus colaboradores em 2016, observaram que a redução drástica da expressão do co-receptor *Orco* resultou na incapacidade do inseto em encontrar o hospedeiro vertebrado, ingurgitar, além da diminuição das taxas de oviposição e ecdise, e aumento das taxas de mortalidade. Portanto, a redução da expressão de determinados genes devido às substâncias repelentes pode estar relacionada à incapacidade do inseto se guiar ou mesmo ao ato de repulsão à fonte alimentar.

A busca em desvendar geneticamente o modo de ação dos repelentes frequentemente está aliada à expectativa de se encontrar um alvo candidato que fosse universal, tanto para a resposta à várias substâncias, quanto em estar presente em diferentes espécies de insetos. De fato, encontrar um gene que pudesse atender a todos esses requisitos facilitaria imensamente o design inteligente de repelentes que pudessem atender de forma generalista os agravos causados por artrópodes de importância médica mundialmente. Todavia, a complexidade do sistema olfativo desses organismos evidenciados em estudos publicados nos últimos anos indica que tal achado seria realmente difícil.

Há uma grande diversidade nos insetos. Logo, diferentes espécies provavelmente encontraram soluções variadas para os mesmos estímulos. Apesar de compartilharem genes olfativos homólogos, sabe-se que receptores quimiossensoriais divergiram em milhões de anos entre os grupos da classe (AUER et al., 2020; MCBRIDE et al., 2014 YAN et al., 2020), caracterizando tempo suficiente para estes complexos moleculares evoluírem independentemente, e responder distintamente ao ambiente. O princípio ativo DEET, por exemplo, repele mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex*, e em contrapartida, não age diretamente em adultos do gênero *Anopheles* (AFIFY et al., 2019).

No nosso trabalho foi possível observar tais diferenças, em que o modo como os genes sofreram alterações dependeu da substância submetida nos ensaios. Os receptores ionotrópicos *RproIR8a* e *IRpro75a* responderam significativamente apenas aos óleos naturais e, por isso, possivelmente são especializados na detecção de odores de origem natural em antenas de *R. prolixus*. Já o gene *RproIR75e* apresentou alteração na sua expressão para todos os compostos repelentes testados, independente do grupo de exposição. Em relação ao receptor *RproIR25a*, modificações quanto aos níveis de transcritos ocorreram frente ao DEET e eucalipto-limão, enquanto que o alvo *RproIR76b* apresentou alterações na expressão quando exposto ao DEET e a citronela.

A explicação para estes resultados, provavelmente está na detecção diferencial por afinidade dos receptores quimiossensoriais a moléculas olfativas. Isto já foi observado por Xu et al. (2014), em que em *C. quinquefasciatus* o receptor olfativo *OR136* demonstrou responder significativamente ao DEET, mas não ao ácido jasmônico ou eucalipto, também substâncias repelentes. Quanto aos receptores ionotrópicos, Benton e seus colaboradores em 2016, constataram que os domínios de acoplamento de ligantes em

D. melanogaster divergem dentre os diferentes IRs, o que sugere que eles reconhecem ligantes distintos e de maneira preferencial.

O estudo que mais avançou na possível relação dos receptores ionotrópicos na detecção de repelentes, foi publicado por Kain e seus colaboradores em 2013, no qual indicaram que o gene *IR40a+* em *Drosophila* é responsável pela detecção do DEET e como este receptor é bem conservado entre espécies de insetos, poderia representar um candidato generalista no contexto da proteção individual.

Trabalhos posteriores utilizaram o artigo de Kain et al. (2013) para orientar a discussão de base genética dos repelentes quanto aos receptores ionotrópicos. Xu et al. (2014) observaram que para *C. quinquefasciatus* o gene *IR40a+* não apresenta resposta ao DEET, sendo o receptor olfativo *CquiOr136* responsável por sua detecção. Zermoglio et al. (2015) também evidenciaram em um ensaio utilizando três substâncias repelentes que apresentam alta afinidade pelo receptor *IR40a+* na espécie *R. prolixus*, que este alvo não está envolvido na repelência neste triatomíneo, sendo possível constatar que o modo de interação dos insetos de fato é diferencial a depender da espécie e substância testada.

Em 2016, o trabalho de Kain foi retratado por defasagens metodológicas indicadas pelos próprios autores. Este acontecimento abriu uma nova lacuna no que tange a participação dos IRs no panorama da repelência. Adicionalmente, não há na literatura outros estudos que mostrem o efeito direto de repelentes em receptores ionotrópicos para triatomíneos e, portanto, esta pesquisa abre um novo foco para o manejo inteligente de repelentes com base molecular para estes insetos.

Apesar do gene *RproIR75e* responder tanto ao repelente sintético quanto aos naturais, não cabe a este trabalho a tentativa de delimitar um alvo universal que atenda a diversas situações epidemiológicas (uma vez que tal tarefa se mostra impossível pelo o disposto na literatura atualmente), mas sim abrir um caminho para novos experimentos e discussões que possam encontrar funcionalidade no manejo inteligente de repelentes com uma abordagem genética.

Por isso, seria interessante a tentativa de se estabelecer futuramente, como os receptores quimiossensoriais deste trabalho estão relacionados a alterações comportamentais a partir de estudos de silenciamento. Franco et al. (2018), por exemplo, demonstraram que em *R. prolixus* silenciados por RNA de interferência para o gene

RproOR80, houve a perda da repelência pela substância 4- Methylcyclohexanol, composto que já havia demonstrado ser eficaz em insetos selvagens (WT), evidenciando o potencial papel deste gene na percepção direta de moléculas repelentes, além da importância do direcionamento de pesquisas neste sentido.

Na etapa seguinte, realizamos ensaios para a comparação entre os grupos Forçado, em que os insetos permaneceram durante 30 minutos em uma placa de petri expostos de maneira constante e concentrada aos repelentes selecionados, com os grupos Tratado. Durante o desenho experimental, pensou-se a metodologia empregada nos grupos Forçado, garantiria a observação de modificações na expressão gênica dos alvos selecionados frente aos repelentes, caso houvessem. Uma vez que no grupo tratado, a presença do hospedeiro juntamente a fatores abióticos na arena aberta (temperatura, umidade e circulação de ar) pudessem afetar de alguma forma o padrão de expressão destes genes. Especulou-se ainda, que se houvessem alterações na expressão dos receptores ionotrópicos selecionados, estas seriam ainda mais evidentes.

De fato, alguns genes apresentaram uma diminuição ainda maior da expressão gênica nos grupos Forçado em comparação aos Tratado. O alvo *RproIR8a* demonstrou uma redução de 44,3% quando os insetos foram expostos à citronela nos grupos Forçado, em relação ao controle, enquanto que nos ensaios nas arenas experimentais (Tratado), houve uma diminuição de 25,1%. O mesmo ocorreu para o gene *RproIR76b*, em que o grupo Forçado em relação ao Tratado, mostrou uma diferença na redução de 14,1%.

Entretanto, é importante ressaltar que esta evidência não se aplicou para todos os receptores testados. O alvo *RproIR75e*, por exemplo, apresentou uma maior redução da expressão para os insetos expostos à citronela e ao DEET, de 32,3% e 23,2%, respectivamente, nos grupos Tratado em relação aos Forçado. De maneira semelhante, o alvo *RproIR75a* demonstrou uma diminuição 63,9% nos ensaios na arena com o óleo de citronela, enquanto que para aqueles realizados na placa de petri, este valor foi de 28,2%.

Interessantemente, foram observados grupos que exibiram diferenças significativas para determinados repelentes a depender do modo de exposição. Para o gene *RproIR8a*, enquanto houve redução na expressão no grupo Tratado exposto ao eucalipto-limão (28,9%), nenhuma alteração foi demonstrada para o mesmo gene e repelente no Forçado. Verificou-se ainda, que o alvo *RproIR25a* apresentou variações para os repelentes

eucalipto-limão e DEET no Tratado, enquanto que nos ensaios dos grupos Forçado, mudanças na expressão ocorreram apenas para o repelente citronela.

Estas variações possivelmente estão atreladas, novamente, à complexidade do processo de detecção de moléculas repelentes em insetos. A explicação para esta resposta diferencial a depender do modo de exposição torna-se uma tarefa difícil diante das especializações dos receptores quimiossensoriais e demanda novos experimentos que busquem esclarecer este fenômeno.

Ressalta-se que a presença do hospedeiro, por exemplo, pode alterar a percepção de outros odores e conseqüentemente o padrão de expressão gênica. O fato dos repelentes interagirem com odores humanos, diminuindo a sua volatilidade (AFIFY et al., 2019; SYED & LEAL et al., 2008) já representa uma alteração na sua detecção por si só.

DeGennaro et al. (2015) demonstraram em um ensaio que utilizou um braço humano tratado com DEET, que após o silenciamento do gene ORCO (correceptor dos receptores olfativos), a espécie *A. aegypti* perdeu a repelência pelo composto. Porém, Guda et al. (2015) em experimentos utilizando uma fonte de calor artificial, os insetos silenciados continuaram a ser repelidos pelo princípio ativo. Desta forma, sugere-se que tanto a atuação de odores da fonte alimentar, quanto de constituintes do sistema olfativo, como ativação de vias alternativas de receptores olfativos, ionotrópicos e/ou gustativos, podem atuar na percepção diferencial de insetos em situações diversas, resultando em respostas também variadas.

Deve-se considerar também que as interações entre os componentes do sistema olfativo ainda são não claras, e que a permanência das ninfas nas placas poderia causar, por exemplo, a saturação de receptores ocasionando na ativação de vias alternativas compensatórias. Neste sentido, ainda há a possibilidade do aumento (ou diminuição) da expressão de enzimas degradadoras de odor (EDOs) resultando nas diferenças entre os grupos experimentais. Estas proteínas desempenham um papel crucial no maquinário olfativo, pois evitam o acúmulo de moléculas e conseqüentemente uma adaptação sensorial, permitindo uma resposta rápida do organismo em relação ao ambiente (VOGT & RIDDIFORD, 1981; YOUNUS et al., 2014).

Enzimas degradadoras como as do complexo citocromo P450, por exemplo, que além de participarem no metabolismo de odores, sugere-se que também protegem os

neurônios olfativos de “toxinas” naturais e inseticidas (DING & KAMINSKY, 2003), podem estar diretamente relacionadas com o fato de observarmos alterações na expressão dos alvos *RproIR8a* e *RproIR25a* frente ao eucalipto-limão no grupo Tratado, mas não no Forçado.

Curiosamente, os alvos *RproIR25a* e *RproIR76b* apresentaram diminuição significativa da sua expressão para os repelentes citronela e eucalipto-limão, respectivamente, no grupo Forçado o que não ocorreu no grupo Tratado. Estes acontecimentos também podem estar relacionados a alterações na expressão gênica devido a condições anormais no ambiente (placa de petri) nas quais os insetos foram submetidos. Sabe-se que fatores bióticos e abióticos influenciam diretamente a dinâmica fisiológica e morfológica de insetos, seja prolongando estádios metamórficos, sobrevivência e/ou reprodução (KHALIQ et al., 2014). Mais importante, admite-se que o estresse ambiental modifica o comportamento deste grupo frente à estímulos olfativos, formando padrões complexos e desafiadores de se entender.

É importante admitir que o controle estabelecido na comparação com o grupo Forçado não foi ideal, mas que ainda assim permitiu o estabelecimento de algumas hipóteses interessantes a serem discutidas. Reiteramos a necessidade da realização de mais experimentos no futuro, visando o aumento do N amostral após a observação do alto desvio padrão que alguns grupos experimentais apresentaram.

Os insetos apresentam uma incrível capacidade de perceber diversos estímulos olfativos com alta especificidade e sensibilidade, graças à neurônios quimiossensoriais que desencadeiam comportamentos provocados por odores. Porém, mesmo após os avanços significativos na área, os mecanismos moleculares responsáveis por converter um sinal químico em uma resposta comportamental não são totalmente claros (BREER et al., 2019). Até mesmo para o repelente padrão-ouro DEET, que apesar da sua longa história e comprovação do seu potencial repelente para vários insetos de importância médica, permanece carente de informações quanto ao seu modo de ação (ZERMOGLIO et al., 2015). Desta forma, torna-se necessária a realização de experimentos que tentem desvendar melhor este fenômeno.

Por fim, a maquinaria sensorial de vetores deveria ser considerada na formulação e discussão de um repelente. O design inteligente, com embasamento molecular de uma

substância repelente poderia elevar a efetividade e modificar completamente o modo como conhecemos e aplicamos a proteção individual no combate a enfermidades transmitidas por artrópodes mundialmente.

7. CONCLUSÕES

- As três substâncias repelentes testadas (citronela, eucalipto-limão e DEET) apresentaram repelência total para ninfas de *Rhodnius prolixus* nos ensaios comportamentais;
- O efeito repelente dos óleos naturais avaliados demonstrou a mesma eficácia que o DEET, padrão-ouro utilizado nas formulações de repelentes mundialmente;
- A concentração ideal de cDNA para estudos com antenas de triatomíneos com a finalidade de avaliar os receptores ionotrópicos em ensaios de RT-qPCR se dá a partir de 30 ng/ μ L;
- Os experimentos de expressão gênica relativa dos receptores ionotrópicos *RproIR8a*, *RproIR25a*, *RproIR76b*, *RproIR75a* e *RproIR75e* demonstraram redução da expressão em todos os ensaios que apresentaram alterações, quando comparado aos grupos controle;
- Os receptores ionotrópicos *RproIR8a* e *RproIR75a* responderam apenas aos compostos de origem natural;
- O alvo *RproIR75e* apresenta redução da expressão gênica quando exposto aos três repelentes selecionados, independente do grupo de exposição;
- Alguns genes apresentaram uma redução mais significativa nos grupos Tratado em comparação aos Forçado, a exemplo dos receptores *RproIR25a* e *RproIR76b* nas ninfas expostas ao óleo de citronela;
- As diferenças entre os grupos Tratado e Forçado foram variadas, a exemplo do gene *RproIR8a*, que apresentou alterações para o repelente eucalipto-limão no grupo Tratado, mas não no Forçado.
- As variações encontradas entre os dois grupos é reflexo da complexidade do sistema olfativo dos insetos.

8. REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F *et al.* *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 92-99, 2013.
- ABBOTT, WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.
- ABUIN, L *et al.* Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. *Neuron*, v. 69, n. 1, p. 44-60, 2011.
- ABUIN, L *et al.* Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. *Neuron*, v. 69, n. 1, p. 44-60, 2011.
- AFIFY, A *et al.* Commonly used insect repellents hide human odors from *Anopheles* mosquitoes. *Curr. Biol*, v. 29, p. 3669–3680, 2019.
- AGUILAR, HM *et al.* Chagas disease in the Amazon region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 47-55, 2007.
- ALVES, TJ *et al.* Composition and Toxicity of a Mixture of Essential Oils Against Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Journal of economic entomology*, v. 112, n. 1, p. 164-172, 2019.
- ALZOGARAY, RA; FONTAN, A; ZERBA, EN. Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. *Medical and veterinary entomology*, v. 14, n.1, p. 6-10, 2000.
- ALZOGARAY, RA. Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) to the insect repellents DEET and IR3535. *Journal of medical entomology*, v. 53, n. 2, p. 387-393, 2016.
- ANGIONI, A *et al.* Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. *spp. stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 54, n. 12, p. 4364-4370, 2006.
- ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*), DEET, 3. Health Effects. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=201>. Acessado em Janeiro de 2020.
- AUER, TO *et al.* Olfactory receptor and circuit evolution promote host specialization. *Nature*, v. 579, p. 402–8, 2020.
- BAKKALI, F *et al.* Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BAR-ZEEV. M. Studies of repellents against *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 17, n. 1, p. 70-74, 1980.

- BENTON, R; VANNICE, K; GOMEZ-DIAZ, C; VOSSHALL, L. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, v. 136, p 149-162, 2009.
- BOHBOT, JD; DICKENS, JC. Insect repellents: Modulators of mosquito odorant receptor activity. *PLoS ONE*, v. 5, n. 8. p, 12138, 2010.
- BOHBOT, JD; DICKENS, JC. Odorant receptor modulation: ternary paradigm for mode of action of insect repellents. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 5-6, p. 2086-2095, 2012.
- BREER, H *et al.* Molecular Mechanism of Insect Olfaction: Olfactory Receptors. In: Picimbon JF. (eds) *Olfactory Concepts of Insect Control - Alternative to insecticides*. Springer, Cham, 2019.
- BRITO, RN *et al.* Transcriptome-based molecular systematics: *Rhodnius montenegrensis* (Triatominae) and its position within the *Rhodnius prolixus*–*Rhodnius robustus* cryptic–species complex. *Parasites & vectors*, v. 12, n. 1, p. 305, 2019.
- BROWN, M; HERBERT, AA. Insect repellents: an overview. Clinical review. *J Am Acad Dermatol*, v. 36, p. 243-9, 1997.
- BUESCHER, MD *et al.* Laboratory repellent tests against *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 22, n. 1, p. 49-53, 1985.
- BUSTIN, SA *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, v. 55, p. 611–22, 2009.
- CANEDO, ISD; DIOTAIUTI, L; SOUZA, RCM. Avaliação da ação de repelência dos óleos naturais de andiroba, citronela e copaíba como estratégia para proteção individual contra picadas de triatomíneos. 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, MEDTROP 2019, XXVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2019.
- CARROLL, SP; LOYE, J. PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy. *J Am Mosq Control Assoc*, v. 22, p. 507-514, 2006.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). West Nile Virus. Disponível em <https://www.cdc.gov/dotw/westnilevirus/>. Acessado em janeiro de 2020a.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Preventing Tick Bites on People. Disponível em: https://www.cdc.gov/lyme/prev/on_people.html. Acessado em janeiro de 2020b.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 15, p. 98–103, 2017.

- CORBEL, V *et al.* Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent DEET. *BMC biology*, v. 7, n. 1, p. 47, 2009.
- COSTA, J; PETERSON, T. Ecological niche modeling as a tool for understanding distributions and interactions of vectors, hosts and etiologic agentes of Chagas disease. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 59-70, 2012.
- COURA, JR. Chagas, disease as endemic to the Brazilian Amazon: risk or hypotesis? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 23, p. 67-70, 1990.
- COVELL, G. Anti-mosquito Measures with special Reference to India. *Health Bulletin*, n. 11, Fifth Edition, 1940.
- CROSET, V *et al.* Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS Genetics*, v. 6, n. 8, p. 1001064, 2010.
- DA SILVA, MRM; RICCI-JÚNIOR, E. An approach to natural insect repellent formulations: from basic research to technological development. *Acta Tropica*, p. 105419, 2020.
- DEGENNARO, M. The mysterious multi-modal repellency of DEET. *Fly*, v. 9, n. 1, p. 45-51, 2015.
- DIAS, JCP. A doença de Chagas e seu controle na América Latina. Uma análise de possibilidades. *Cad Saúde Pública*, v. 9, n. 2, p. 201-209, 1993.
- DIAS, JCP. Chagas disease: successes and challenges. Editorial. *Cadernos de Saúde* Editorial. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 22, n.10, p. 2020, 2006.
- DIAS, JCP. Os primórdios do controle da doença de Chagas. (Em homenagem a Emmanuel Dias, pioneiro do controle, no centenário de seu nascimento). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 2, p. 12-18, 2011.
- DIAS, JCP. Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. *Cad Saúde Pública*, v. 16, n. 2, p. 43-59, 2000.
- DIAS, JCP *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, p. 7-86, 2016.
- DIAS, JCP; SILVA, JC. Sobre alguns aspectos da profilaxia defensiva em doença de Chagas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 11, n. 4, p. 236-244, 1969.
- DIAS, JCP; PRATA, A; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 2, p. 193-196, 2008.
- DITZEN, M; PELLEGRINO, M; VOSSHALL, LB. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science*, v. 319, n. 5871, p. 1838-1842, 2008.

- DORN, PL *et al.* Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, v. 69, p. 775, 2018.
- DUJARDIN, JP *et al.* The rising importance of *Triatoma rubrofasciata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 319-323, 2015.
- ELLENHORN, MJ; BARCELOUX, DG. Diagnosis and treatment of human poisoning. *Medical toxicology*, p. 609-610, 1997.
- EPA (*United States Environmental Protection Agency*). Find the repellent that is right for you. Disponível em <https://www.epa.gov/insect-repellents/find-repellent-right-you> em janeiro de 2020a.
- EPA (*United States Environmental Protection Agency*). DEET. Disponível em: <https://www.epa.gov/insect-repellents/deet>. Acessado em janeiro de 2020b.
- FERREIRA, ILM; SILVA, TCP. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.
- FOX, AN *et al.* Candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* and evidence of down-regulation in response to blood feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 25, p. 14693-14697, 2001.
- FRADIN, MS; DAY, JF. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 1, p. 13-18, 2002.
- FRANCO, TA; Oliveira DS; Moreira MF; Leal WA; Melo ACA. Silencing the odorant receptor co-receptor RproOrco affects the physiology and behavior of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, n. 69, p. 82-90, 2016.
- FRANCO, TA *et al.* Reverse chemical ecology-based approach leading to the accidental discovery of repellents for *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas diseases refractory to DEET. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 103, p. 46-52, 2018.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Manual de utilização de animais/FIOCRUZ. Rio de Janeiro, p. 54, 2008.
- GASCON, J; BERN, C; PINAZO, MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*, v. 115, p. 22-7, 2010.
- GOVERE, J *et al.* Efficacy of three insect repellents against the malaria vector *Anopheles arabiensis*. *Med Vet Entomol*, v. 14, p. 441-444, 2000.
- GUDA, T *et al.* Repellent compound with larger protective zone than DEET identified through activity-screening of Ir40a neurons, does not require Or function. *bioRxiv*, p. 017145, 2015.
- HALLBERG, E; HANSSON, BS. Arthropod sensilla: morphology and phylogenetic considerations. *Microsc Res Tech*, v. 47, p. 428-439, 1999.

- HARREWIJN, P; MINKS, AK; MOLLEMA, C. Evolution of plant volatile production in insect-plant relationships. *Chemoecology*, v. 5, p. 55-73, 1995.
- ILIOU, K *et al.* Citronella oil-loaded electrospun micro/nanofibrous matrices as sustained repellency systems for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Pest Manag*, v. 75, n. 8, p. 2142-2147, 2019
- JACKSON, Y; PINTO, A; PETT, S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Trop Med Int Health*, v. 19, p. 212–8, 2014.
- JURBERG, J; GALVÃO, C. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) vectors of Chagas disease and implications for human health. *Denisia*, v. 19, p. 1096-116, 2006.
- KAIN, P *et al.* Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. *Nature*, v. 502, n. 7472, p. 507-12, 2013.
- KHALIQ, A *et al.* Environmental effects on insects and their population dynamics. *Journal of Entomology and Zoology studies*, v. 2, n. 2, p. 1-7, 2014.
- KLOTZ, J *et al.* “Kissing bugs”: Potential disease vectors and cause of anaphylaxis. *Clin. Infect. Dis*, v. 50, p. 1629-1634, 2010.
- KOREN, G; MATSUI, D; BAILEY, B. DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. *CMAJ*, v. 169, n. 3, p. 209-12, 2003.
- KRAJICK, K. Medical entomology - Keeping the bugs at bay. *Science*, v. 313, p. 36–38, 2006.
- LARSSON, MC *et al.* Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, v. 43, p. 703-714, 2004.
- LATORRE-ESTIVALIS, JM *et al.* Patterns of expression of odorant receptor genes in a Chagas disease vector. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 69, p. 71-81, 2016.
- LEAL, WS. The enigmatic reception of DEET - the gold standard of insect repellents. *Insect Science*, v. 6, p. 93-98, 2014.
- LEE, BY *et al.* Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*, v. 13, n. 4, p. 342–8, 2013.
- LEE, Y; KIM, SH; MONTELL, C. Avoiding DEET through insect gustatory receptors. *Neuron*, v. 67, n. 4, p. 555-561, 2010.
- 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, 1979.

- LIMA-CORDÓN, RA *et al.* Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, v. 820, p. 51, 2019.
- LIU, Q *et al.* First records of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773)(Hemiptera, Reduviidae) in Foshan, Guangdong Province, Southern China. *Infectious diseases of poverty*, v. 6, n. 1, p. 129, 2017.
- LORENZO, MG; MELO, ACA. Olfacção e comportamento. In: *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, cap. 9, 2012.
- LUTZ, A; SFARA, V; ALZOGARAY, RA. Repellence produced by monoterpenes on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) decreases after continuous exposure to these compounds. *Journal of Insect Science*, v. 14, n. 1, 2014.
- DEGENNARO, M *et al.* Orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature*, v. 498, p. 487-491, 2013.
- MAIA, MF; MOORE, SJ. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria journal*, v. 10, n. 1, p. 11, 2011.
- MCBRIDE, CS *et al.* Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature*, v. 515, n. 7526, p. 222-227, 2014.
- MCGREADY, R *et al.* Safety of the insect repellent N, N-diethyl-M-toluamide (DEET) in pregnancy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 65, n. 4, p. 285-289, 2001.
- MESQUITA, *et al.* Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 48, p. 14936-14941, 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Boletim Epidemiológico*, v. 46, n. 21, p. 1-9, 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. *Boletim Epidemiológico*, v. 50, p. 1-10, 2019.
- MISNI, N; NOR, ZM; AHMAD, R. Repellent effect of microencapsulated essential oil in lotion formulation against mosquito bites. *Journal of vector borne diseases*, v. 54, n. 1, p. 44, 2017.
- MOFFITT, JE *et al.* Allergic reactions to *Triatoma* bites. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, v. 91, n. 2, p. 122-128, 2003.
- MONTEIRO, FA *et al.* Evolution, systematics, and biogeography of the Triatominae, vectors of Chagas disease. In *Advances in parasitology*, v. 99, p. 265-344. Academic Press, 2018.

- MOORE, SJ *et al.* A low-cost repellent for malaria vectors in the Americas: results of two field trials in Guatemala and Peru. *Malar J*, v. 6, p. 101, 2007.
- MORETTI, AN; ZERBA, EN; ALZOGARAY, RA. Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to 10 monoterpene alcohols. *Journal of Medical Entomology*, v. 50, n. 5, p. 1046-1054, 2013.
- MULATIER, M *et al.* DEET efficacy increases with age in the vector mosquitoes *Anopheles gambiae* ss and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, p. 55, n. 6, p. 1542-1548, 2018.
- NASCIMENTO, EB *et al.* *Cavernicola pilosa* Barber, 1937 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): first record in Amazonas state, Brazil. *Check List*, v. 16, p. 387, 2020.
- NERIO, LS; OLIVERO-VERBEL, J; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource technology*, v. 101, n. 1, p. 372-378, 2010.
- OLIVEIRA, NCW. Avaliação da ação repelente de substâncias sintéticas como estratégia de proteção contra picada de triatomíneos e a identificação de receptores quimiosensoriais responsáveis pela detecção de moléculas repelentes em *Rhodnius prolixus*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Instituto René Rachou, Fiocruz, 2018.
- OMONDI, BA *et al.* Evaluation of reference genes for insect olfaction studies. *Parasites & vectors*, v. 8, n. 1, p. 243, 2015.
- PAULA JP. Estudo da ação repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth contra o *Anopheles braziliensis* Chagas. 69f. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública, Ponta Grossa, 2002.
- PÉREZ-MOLINA, JA; MOLINA, I. Chagas disease. *Lancet*, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.
- PRATA, A; DIAS, JCP; COURA, JR. Os primórdios da doença. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 2, p. 6-11, 2011.
- RASSI, JR, A; RASSI, A; MARIN-NETO, JA. Chagas disease. *The Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.
- RIBAS, J; CARREÑO, AM. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. *An Bras Dermatol*, v. 85, n. 1, p. 33, 2010.
- SAKULKU, U *et al.* Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *Int J Pharm*, v. 372, p. 105-111, 2009.
- SANFORD, JL; SHIELDS, VDC; DICKENS, JC. Gustatory receptor neuron responds to DEET and other insect repellents in the yellow-fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Naturwissenschaften*, v. 100, n. 3, p. 269-273, 2013.

- SANTANA IB. Modelagem comparativa e triagem virtual hierárquica para identificação de moduladores das OBPS de *Lutzomyia longipalpis*. 91f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.
- SCHNEIDER, D. Insect antennae. Annual review of entomology, v. 9, n. 1, p. 103-122, 1964.
- SCHOFIELD, CJ; DIOTAIUTI, L; DUJARDIN, JP. The process of domestication in Triatominae. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, n. 1, p. 375-378, 1999.
- SHAW, JJ; LAINSON, R; FRAIHA, H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. Revista de Saúde Pública, v. 3, p. 153-157, 1969.
- SILVA, CF *et al.* Extraction of citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil using supercritical CO₂: Experimental data and mathematical modeling. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 28, n. 2, p. 343-350, 2011.
- SPECOS, MM *et al.* Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. Trans R Soc of Trop Med Hyg, v. 104, p. 653-658, 2010.
- SUETH-SANTIAGO, V *et al.* Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. World journal of biological chemistry, v. 8, n. 1, p. 57, 2017.
- SYED, Z; LEAL, WS. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. Proc Natl Acad Sci USA, v. 105, p. 13598–13603, 2008.
- SYED, Z *et al.* Generic insect repellent detector from the fruit fly *Drosophila melanogaster*. PLoS One, v. 6, n. 3, 2011.
- TAWATSIN, A *et al.* Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. J Vector Ecol, v. 26, p. 76-82, 2001.
- TEO, SK; CHEAH, JS. Severe reaction to the bite of the triatomid bug (*Triatoma rubrofasciata*) in Singapore. The Journal of tropical medicine and hygiene, v. 76, n. 7, p. 161, 1973.
- TERRIQUEZ, JA *et al.* Repellency of DEET, Picaridin, and Three Essential Oils to *Triatoma rubida* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Journal of Medical Entomology, v. 50, n. 3, p. 664-667, 2013.
- TICE R; BREVARD B. N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET). Review of Toxicological Literature. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/deet_508.pdf. Acessado em Janeiro de 2020.
- TRIGG, JK. Evaluation of a eucalyptus-based repellent against *Anopheles* spp. in Tanzania. J Am Mosq Control Assoc, v. 12, p. 243-246, 1996.
- TRONGTOKIT, Y; RONGSRIYAM, Y; KOMALAMISRA, N; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytotherapy

Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, v. 19, n. 4, p. 303-309, 2005.

TRUONG, LX; DUJARDIN, JP. Epidemiological status of blood sucking bugs *Triatoma rubrofasciata* (Triatominae: Reduviidae) and risk of parasitosis in Hanoi, Vietnam. Proceedings of the Epidemiological Status of Kissing Bugs in Vietnam Workshop, Jun 17-21, Hanoi, Vietnam, NAFOSTED, Hanoi, p. 28-34, 2013.

VECCHIO, FL; Van Tran, T. Allergic reactions from insect bites. The American journal of emergency medicine, p. 22, n. 7, p. 631, 2004.

VERPOORTE, R. Antimicrobially Active Alkaloids. In: Alkaloids; Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications (M.F. ROBERTS & M. WINK). New York: Plenum Press, p. 397-433, 1998.

VIEGAS JÚNIOR, C; BOLZANI, VS. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. Química Nova, São Paulo. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VOGT, RG; RIDDIFORD, LM. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. Nature, v. 293, n. 5828, p. 161-163, 1981.

VOSSHALL, LB; HANSSON, BS. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. Chemical senses, v. 36, n. 6, p. 497-498, 2011.

WALTER, J *et al.* Do bites of kissing bugs cause unexplained allergies? Results from a survey in triatomine-exposed and unexposed areas in southern California. PLoS One, v. 7, n. 8, 2012.

WANG LY; PENG, LF. Four cases of anaphylactic shocks caused by triatomine bugs Clin. Focus, v. 21, p. 1059-1601, 2006.

WONG, KK *et al.* Citronella as an insect repellent in food packaging. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4633- 4636, 2005.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. The Weekly Epidemiological Record. v. 90, n. 6, p. 33-44, 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Chagas' disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, janeiro de 2020.

XIA, Y *et al.* The molecular and cellular basis of olfactory-driven behavior in *Anopheles gambiae* larvae. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 17, p. 6433-6438, 2008.

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

YOUNUS, F *et al.* Identification of candidate odorant degrading gene/enzyme systems in the antennal transcriptome of *Drosophila melanogaster*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 53, p. 30-43, 2014.

- YAN, H *et al.* Evolution, developmental expression and function of odorant receptors in insects. *Journal of Experimental Biology*, v. 223, n. 1, 2020.
- YU, J *et al.* Identification of a General Odorant Receptor for Repellents in the Asian Corn Borer *Ostrinia furnacalis*. *Frontiers in physiology*, v. 11, p. 176, 2020.
- ZACHARUK, RY. Ultrastructure and Function of Insect Chemosensilla. *Annual Review of Entomology*, v. 25, p. 27-47, 1980.
- ZAMORA, D *et al.* Repellency of the components of the essential oil, citronella, to *Triatoma rubida*, *Triatoma protracta*, and *Triatoma recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Journal of Medical Entomology*, v. 52, n. 4, p. 719-721, 2015.
- ZERMOGLIO, PF *et al.* *Rhodnius prolixus* smells repellents: behavioural evidence and test of present and potential compounds inducing repellency in Chagas disease vectors. *Journal of insect physiology*, v. 81, p. 137-144, 2015.

9. ANEXO

9.1. Extração de RNA de antenas de *Rhodnius prolixus*, 5º estágio.

- 1) Ligar o fluxo e UV. Limpar o fluxo e pipetas com álcool e aguardar 30 min;
- 2) Separar potes com insetos experimentais, microtesoura e micropinça;
- 3) Pegar nitrogênio líquido ou gelo seco e armazenar em um isopor com tampa;
- 4) Colocar eppendorfs no isopor para resfriar;
- 5) Passar RNase away na bancada, luvas e instrumentos de trabalho;
- 6) Retirar as antenas e colocar no eppendorf;
- 7) Ir para capela de fluxo;
- 8) Colocar 50 µl de trizol no eppendorf e macerar as antenas com pistilo de plástico;
- 9) Adicionar mais 450 µl de trizol no eppendorf;
- 10) Deixar 5 minutos em temperatura ambiente; (Pode ser armazenado no -80° por até 3 dias);
- 11) Adicionar 100 µl de clorofórmio;
- 12) Vortexar por 20 segundos e deixar 5 minutos em temperatura;
- 13) Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente;
- 14) Centrifugar a 13500rpm/ 15min/ 4°C;
- 15) Identificar novos eppendorfs e adicionar 250 µl de isopropanol gelado;
- 16) Pipetar 60% (cerca de 200 µl) da fase aquosa superior e transferir para o eppendorf com isopropanol – puxar cuidadosamente apenas a parte transparente;
- 17) Tampar e inverter 10 vezes para misturar;
- 18) Overnight no freezer (-20);
- 19) Centrifugar a 17000g/ 15min/ 4°C;
- 20) Descartar o sobrenadante;
- 21) Adicionar 500 µl de etanol 70%, centrifugar 17000g/ 10 min/ 4°C e descartar etanol;
- 22) Adicionar 500 µl de etanol 70%, centrifugar 17000g/ 10 min/ 4°C e descartar etanol;
- 23) Secar o sedimento – virar os tubos em um lenço de papel próprio por 15 minutos (a cada 5 min dar uma leve batida para ajudar a evaporar);
- 24) Re-suspender com 20 µl de água estéril (usar a pipeta para homogeneizar 10 vezes. Utilize a ponta da ponteira e “raspe” o fundo algumas vezes enquanto homogeneiza)
- 25) Adicionar 1 µl de RNase inhibitor na parede do eppendorf, vortexar e dar spin;
- 26) Aquecer por 10 minutos a 37°C para facilitar a re-suspensão;
- 27) Seguir com o protocolo de tratamento com DNase e produção de cDNA.