



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Alessa de Macedo Ciannella Madeira

O papel do receptor de lipoforina na fisiologia do barbeiro
Rhodnius prolixus

Rio de Janeiro

2024

Alessa de Macedo Ciannella Madeira

O papel do receptor de lipoforina na fisiologia do barbeiro *Rhodnius prolixus*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. David Majerowicz

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M181 Madeira, Alessa de Macedo Ciannella.
O papel do receptor de lipoforina na fisiologia do barbeiro *Rhodnius prolixus* / Alessa de Macedo Ciannella Madeira. - 2024.
79 f.

Orientador: Prof. Dr. David Majerowicz

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. *Rhodnius*. 2. Interferência de RNA. 3. Receptores de lipoproteínas. 4. Reação em cadeia de polimerase em tempo real - Teses. I. Majerowicz, David. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.937.3

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alessa de Macedo Ciannella Madeira

O papel do receptor de lipoforina na fisiologia do barbeiro *Rhodnius prolixus*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 03 de maio de 2024

Orientador: Prof. Dr. David Majerowicz

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Mariana Renovato Martins

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Emerson Guedes Pontes

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Rafaela Vieira Bruno

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Nossa Senhora Aparecida e aos meus pais, Vera Lúcia Ferreira de Macedo e Marcos Wagner Ribeiro da Silva, pelo apoio e por todo o investimento em minha educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora por serem minha luz e guia, sempre me concedendo força, coragem, calma, inspiração e, também, por me ajudarem em tudo aquilo que não sou capaz de resolver.

Aos meus pais, Vera e Marcos, expresso minha profunda gratidão por todo apoio. Agradeço o amor incondicional e os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse alcançar este momento, sem eles eu não chegaria tão longe. Obrigada, mãe, por todas as orações e por ser fonte de inspiração para mim.

Agradeço à minha outra metade, meu marido, Pedro, pela paciência, compreensão, pelas palavras de motivação, por sempre acreditar no meu potencial e, também, pela dedicação à nossa família. Sem dúvidas, juntos nós dois somos mais fortes.

Ao meu orientador, David, agradeço pela confiança depositada em meu trabalho, pela paciência com os meus “porquês” intermináveis e por explicar pela milésima vez a mesma coisa, sempre com amor e brilho nos olhos. Obrigada pelos puxões de orelha e por todo apoio ao longo de todos esses anos. Não poderia deixar de citar a frase icônica: “Nunca vou esquecer tudo que você fez por mim, nem com 80 anos!”

À minha amada cachorrinha, Mel, agradeço por trazer alegria e companheirismo aos meus dias, mesmo sem compreender a importância da sua presença.

Agradeço aos meus familiares e amigos, especialmente aos meus amigos de bancada Matheus e Júlia que fizeram meus dias mais felizes durante esta jornada. Ao meu irmão, Gabriel, que me incentivou a estar aqui.

Por fim, à professora Isabela Ramos e sua aluna de doutorado Thamara Rios, expresso minha sincera gratidão pela colaboração e grande contribuição neste trabalho. Agradeço também a colaboração da Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRJ em nossas análises de lipidômica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Também contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

E de repente, num dia qualquer, acordamos e percebemos que já podemos lidar com aquilo que julgávamos maior que nós mesmos. Não foram os abismos que diminuíram, mas nós que crescemos.

Fabíola Simões

RESUMO

MADEIRA, Alessa de Macedo Ciannella. **O papel do receptor de lipoforina na fisiologia do barbeiro *Rhodnius prolixus***. 2024. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Os lipídios são essenciais para os seres vivos, atuando, principalmente, como moléculas estruturais das membranas celulares e como fonte de energia. Nos insetos, os lipídios podem ser adquiridos por alimentação ou síntese *de novo*. A lipoforina é uma lipoproteína presente nos insetos e é responsável por transportar diversos tipos de lipídios entre os órgãos, através da hemolinfa. Os mecanismos de regulação desse transporte ainda são pouco conhecidos, mas os receptores de lipoforina (LpR) foram identificados em várias espécies de insetos e estão presentes na membrana plasmática de vários órgãos, pertencendo à superfamília dos receptores de lipoproteína de baixa densidade. Neste estudo, o barbeiro *Rhodnius prolixus* foi utilizado como modelo para investigar o papel do gene *RpLpR* em sua fisiologia. O gene *RpLpR* tinha sido previamente anotado no genoma do barbeiro e análises filogenéticas mostraram que o barbeiro possui apenas uma cópia desse gene. O *RpLpR* foi expresso em todos os órgãos do inseto e sua expressão diminuiu significativamente no corpo gorduroso após a alimentação com sangue. Com o objetivo de avaliar a eficácia da inibição da expressão de *RpLpR* em *R. prolixus*, fêmeas adultas foram injetadas com diferentes doses de dsRNA. Houve uma diminuição significativa na expressão do gene com a dose de 0,1 µg. A inibição da expressão do gene não afetou a sobrevivência ou o peso dos insetos. No entanto, foi observada uma diminuição significativa na taxa de eclosão dos ovos postos, além de deformações severas nas poucas ninfas que eclodiram. Além disso, foi observada uma diminuição da expressão de vitelogenina após a inibição da expressão do gene, demonstrando a importância do LpR na reprodução desses insetos. Em contrapartida, os resultados indicam que não houve alteração na quantidade e na composição de gordura estocada nos órgãos. Também não foram encontradas alterações na transferência de ácidos graxos da lipoforina para os tecidos, indicando que o *RpLpR* pode não ser o principal responsável pela transferência de lipídeos da lipoforina para os órgãos. A análise filogenética realizada traz como resultado outros genes similares a receptores de LDL em *R. prolixus*, possivelmente envolvidos nesse mecanismo. Essas descobertas reforçam a importância do receptor de lipoforina na fisiologia do inseto e abrem caminhos para novas investigações sobre a maneira como a lipoforina entrega os lipídeos para os tecidos do barbeiro.

Palavras-chave: *Rhodnius prolixus*; receptor de lipoforina; RNA de interferência. PCR em tempo real; fisiologia.

ABSTRACT

MADEIRA, Alessa de Macedo Ciannella. **The role of lipophorin receptor in the physiology of the kissing bug *Rhodnius prolixus***. 2024. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Lipids are essential for living organisms, primarily acting as structural molecules in cell membranes and as a source of energy. Insects can acquire lipids through feeding or *de novo* synthesis. Lipophorin is a lipoprotein present in insects and is responsible for transporting diverse lipids between organs through the hemolymph. The mechanisms regulating this transport still need to be better understood. However, lipophorin receptors (LpR) have been identified in various insect species and are present in the plasma membrane of several organs belonging to the low-density lipoprotein receptor superfamily. In this study, the kissing bug *Rhodnius prolixus* was used as a model to investigate the role of the *RpLpR* gene in its physiology. The *RpLpR* gene had been previously annotated in the kissing bug genome, and phylogenetic analyses showed that the kissing bug has only one copy of this gene. The *RpLpR* gene was expressed in all insect organs, and its expression significantly decreased in the fat body after blood meal. Adult females were injected with different doses of dsRNA to assess the efficacy of *RpLpR* gene knockdown in *R. prolixus*. There was a significant decrease in gene expression with the 0.1 µg dose. Gene knockdown did not affect insect survival or weight. However, a significant decrease in hatching rate and severe deformations in the few nymphs that hatched were observed. Furthermore, a decrease in vitellogenin expression was also observed after gene knockdown, demonstrating the importance of the LpR in insect reproduction. On the other hand, the results indicate that there was no change in the amount and composition of fat stored in organs, and no changes were found in the transfer of fatty acids from lipophorin to tissues, indicating that *RpLpR* may not be the main responsible of lipid transfer from lipophorin to organs. Phylogenetic analysis revealed other genes similar to LDL receptors in *R. prolixus*, possibly involved in this mechanism. These findings underscore the importance of the lipophorin receptor in insect physiology and pave the way for further investigations into how lipophorin delivers lipids to the tissues of the kissing bug.

Keywords: *Rhodnius prolixus*; lipophorin receptor; RNA interference; real-time PCR; physiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estágios de desenvolvimento do barbeiro <i>R. prolixus</i>	15
Figura 2 -	<i>R. prolixus</i> se alimentando de sangue humano.....	16
Figura 3 -	Moléculas de glicerol e TAG.....	18
Figura 4 -	Esquema dos possíveis caminhos para os ácidos graxos.....	21
Figura 5 -	Estrutura ovariana da fêmea de <i>R. prolixus</i>	23
Tabela 1 -	Sequência dos iniciadores utilizados para a reação de qPCR.....	30
Tabela 2 -	Sequência dos iniciadores utilizados para a síntese de dsRNA.....	32
Figura 6 -	Dendrograma mostrando a relação entre proteínas de diferentes espécies.....	40
Figura 7 -	Expressão de <i>RpLpR</i> em diferentes tecidos.....	41
Figura 8 -	Perfil de expressão gênica do LpR de <i>R. prolixus</i> após a alimentação, no corpo gorduroso.....	43
Figura 9 -	Expressão de <i>RpLpR</i> de acordo com as quantidades de dsRNA.....	44
Figura 10 -	Efeito da inibição da expressão de <i>RpLpR</i> no peso corporal do barbeiro	45
Figura 11 -	Efeito da inibição da expressão de <i>RpLpR</i> na sobrevivência do inseto....	46
Figura 12 -	Quantidade de acilglicerídeos nos órgãos, hemolinfa e ovos.....	48
Figura 13 -	Perfil lipídico no corpo gorduroso após a inibição da expressão de <i>RpLpR</i>	50
Figura 14 -	Perfil lipídico no músculo de voo após a inibição da expressão de <i>RpLpR</i>	52
Figura 15 -	Perfil lipídico nos ovários após a inibição da expressão de <i>RpLpR</i>	53
Figura 16 -	Incorporação de ³ H-palmitato.....	55
Figura 17 -	Expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos de <i>R. prolixus</i>	57
Figura 18 -	Ovoposição após a inibição da expressão do <i>RpLpR</i>	59

Figura 19 -	Efeito da inibição da expressão de <i>RpLpR</i> na eclosão dos ovos.....	60
Figura 20 -	Imagens dos ovários, ovos e ninfas geradas de fêmeas cuja expressão de <i>RpLpR</i> foi inibida.....	62
Figura 21 -	Microscopia eletrônica de varredura em ovos recém-postos por fêmeas <i>RpLpR/RNAi</i>	64
Figura 22 -	Fluorescência de ditirosina em ovos recém-postos por fêmeas <i>RpLpR/RNAi</i>	66
Figura 23 -	Expressão dos genes <i>RpVg1</i> e <i>RpVg2</i> após a inibição da expressão de <i>RpLpR</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

20E	20-Hidroxiecdisona
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	<i>Double-stranded</i> RNA (RNA de dupla-fita)
LDLR	Lipoproteína de baixa densidade
LpR	Receptor de lipoforina
MalE	Proteína ligadora de maltose de <i>Escherichia coli</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
SCA	Solução cuproalcalina
TAG	Triacilglicerol
U.V.	Ultravioleta
Vg	Vitelogenina
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
≥	Maior ou igual
°C	Graus celsius
β	Beta
Δ	Delta
cm	Centímetro
g	Gramma
kV	Kilovolt
M	Molar
mCi	MiliCurie
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milimetro
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
nCi	Nanocurie
nm	Nanometro
nmol	Nanomol

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1.	OBJETIVOS	26
1.1.	Objetivo geral	26
1.2.	Objetivos específicos	26
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1.	<i>Rhodnius prolixus</i>	27
2.2.	Análise evolutiva do gene <i>RpLpR</i>	27
2.3.	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo	27
2.3.1.	<u>Extração de RNA total</u>	28
2.3.2.	<u>Dosagem de RNA</u>	28
2.3.3.	<u>Remoção da contaminação por DNA genômico</u>	29
2.3.4.	<u>Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA)</u>	29
2.3.5.	<u>PCR em tempo real</u>	29
2.4.	Síntese de dsRNA para RNAi	31
2.5.	Injeção de dsRNA	33
2.6.	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo após a inibição de <i>RpLpR</i>	34
2.7.	Análise do peso, sobrevivência, postura e eclosão	34
2.8.	Quantificação de TAG	35
2.9.	Quantificação de proteína total	35
2.10.	Análise do perfil lipídico por espectrometria de massa	36
2.11.	Incorporação de palmitato	36
2.12.	Morfologia dos ovos, ovários e ninfas	37

2.12.1.	<u>Imagens dos ovários, ovos e ninfas</u>	37
2.12.2.	<u>Fluorescência de ditirosina do córion</u>	37
2.12.3.	<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	38
2.13.	Análise estatística	38
3.	RESULTADOS	39
3.1.	Análise evolutiva do gene <i>RpLpR</i> no genoma do <i>R. prolixus</i>	39
3.2.	Caracterização da expressão <i>RpLpR</i> em diferentes órgãos de <i>R. prolixus</i>	41
3.3.	Expressão do gene <i>RpLpR</i> no corpo gorduroso, ao longo do processo digestivo	42
3.4.	Expressão de <i>RpLpR</i> após a injeção de diferentes quantidades de dsRNA para duas regiões específicas do gene	44
3.5.	O efeito da inibição da expressão de <i>RpLpR</i> na digestão	45
3.6.	Taxa de sobrevivência de fêmeas após a inibição da expressão de <i>RpLpR</i>	46
3.7.	Acúmulo de gordura após a inibição da expressão de <i>RpLpR</i>	47
3.8.	O efeito da inibição da expressão de <i>RpLpR</i> no perfil lipídico em diferentes órgãos	49
3.9.	Efeito da inibição da expressão de <i>RpLpR</i> na incorporação de palmitato pelos órgãos	54
3.10.	Expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, após a inibição da expressão de <i>RpLpR</i>	56
3.11.	Efeito da inibição da expressão de <i>RpLpR</i> na fertilidade das fêmeas ...	58
3.12.	Efeito da inibição da expressão de <i>RpLpR</i> na viabilidade dos ovos postos pelas fêmeas	59
3.13.	Morfologia dos ovários, ovos e ninfas de fêmeas após a inibição de <i>RpLpR</i>	61
3.14.	Análise de ditirosina fluorescente de ovos postos por fêmeas após a inibição de <i>RpLpR</i>	65
3.15.	Expressão de genes das vitelogeninas, após a inibição da expressão de <i>RpLpR</i>	66

4	DISCUSSÃO.....	68
	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

INTRODUÇÃO

Rhodnius prolixus

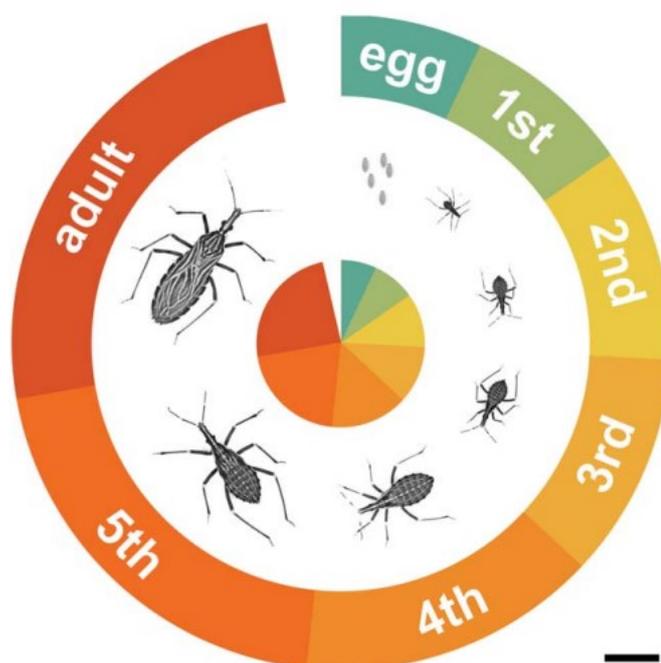
O inseto *Rhodnius prolixus*, classificado na ordem Hemiptera, pertence à família Reduviidae e à subfamília Triatominae. Comumente chamados de “barbeiros”, os triatomíneos possuem grande relevância para a saúde pública, uma vez que são reconhecidos como vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas em humanos. A doença é mais comum em países da América Latina, mas também ocorre em outros lugares do mundo, afetando de 6 a 7 milhões de pessoas (WHO, 2023). Apesar da sua notoriedade como transmissores da doença de Chagas, esses insetos também desempenham um papel importante como modelos experimentais em diversos estudos fisiológicos (NUNES-DA-FONSECA *et al.*, 2017).

Para o sucesso de seu desenvolvimento, o barbeiro precisa viver em temperaturas em torno de 27 °C e 30 °C. Além disso, o local precisa ser caracterizado por uma umidade relativa do ar situada entre 60 % e 85 %. Qualquer modificação nesses parâmetros pode resultar no surgimento de anomalias morfológicas durante o processo de desenvolvimento do inseto (GONÇALVES; COSTA, 2017).

Em sua morfologia interna, o *R. prolixus* apresenta um sistema digestivo dividido em três partes: intestino anterior, médio e posterior. Destacam-se ainda a presença de membrana peritrófica, glândulas salivares, um sistema excretor composto por quatro túbulos de Malpighi, um sistema circulatório, e um sistema respiratório. Além disso, o inseto apresenta um sistema reprodutor, com ovários nas fêmeas e testículos nos machos. O barbeiro também possui o músculo de voo, responsável pela movimentação das asas, e um corpo gorduroso, destinado ao armazenamento de lipídeos (GONÇALVES; COSTA, 2017).

O barbeiro é um inseto paurometábolo, possui metamorfose incompleta, ou seja, suas formas mais jovens apresentam consideráveis semelhanças com os adultos. Após a eclosão do ovo, o desenvolvimento do barbeiro inclui cinco estágios distintos de ninfas. A transição do quinto estágio de ninfa para a fase adulta é marcada pela formação de asas e maturação dos órgãos sexuais, concluindo assim o processo de metamorfose (WIGGLESWORTH, 1936).

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento do barbeiro *R. prolixus*.

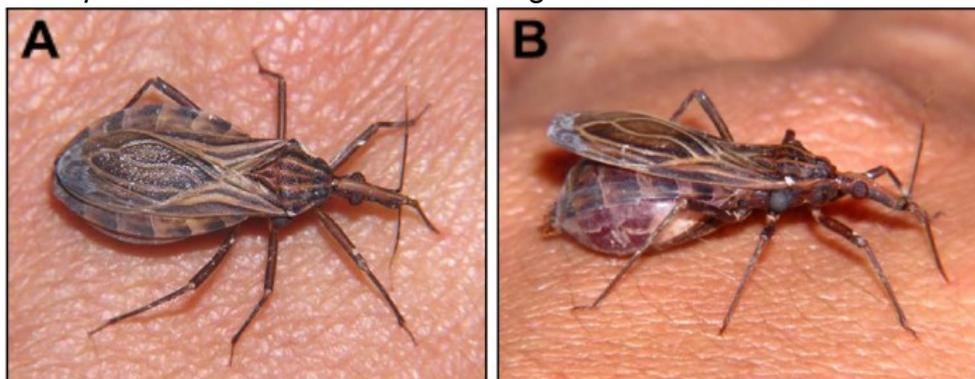


Legenda: A ninfa possui o mesmo plano corporal básico do adulto. O desenvolvimento embrionário leva cerca 14 dias, enquanto os estágios de ninfa variam entre 3 e 4 semanas. Barra de escala de 6 mm.

Fonte: NUNES-DA-FONSECA *et al.*, 2017.

O *R. prolixus* é um inseto hematófago obrigatório e não consegue passar pela ecdise sem se alimentar. Para que a ninfa passe para o estágio seguinte, ela precisa se alimentar, ao menos uma vez, em abundância (LUZ; FARGUES; GRUNEWALD, 1999). Eles têm a capacidade de ingerir uma quantidade de sangue que pode atingir nove vezes o seu peso normal, podendo a capacidade de ingestão variar a cada estágio (FRIEND, 1965). Após a alimentação, o sangue ingerido acumula-se no intestino médio, e é digerido ao longo de cerca de 15 dias (COELHO *et al.*, 1997).

Figura 2 – *R. prolixus* se alimentando de sangue humano



Legenda: (A) No início da alimentação, é possível observar que o abdome do inseto apresenta uma forma mais achatada. (B) Algum tempo após a alimentação, é possível observar uma proeminência na região abdominal. Essa distinção ocorre devido à presença do sangue proveniente do processo alimentar.

Fonte: Márcia Franco, Laboratório de Bioquímica de Insetos (IBqM/UFRJ).

A resistência ao jejum é uma relevante característica dos insetos. Os triatomíneos, em particular, conseguem passar por um longo período sob a privação de alimento. Um estudo mostrou que o *R. prolixus*, no 3º estágio de ninfa, é capaz de ficar até 164 dias sem alimento (CAILLEAUX *et al.*, 2011). Durante os longos períodos de privação alimentar, o corpo gorduroso torna-se um importante aliado. Este tecido apresenta uma alta capacidade em acumular lipídeos que, mais tarde, servirão como reserva energética, obtendo energia para diferentes processos metabólicos, como a ovogênese e o voo (COELHO *et al.*, 1997; CANAVOSO *et al.*, 2001).

O *R. prolixus* é considerado um inseto relativamente grande. Um adulto pode medir, aproximadamente, 2 cm de comprimento. Seu tamanho facilita a dissecação, manipulação dos tecidos e a realização de outros procedimentos, como a injeção de substâncias de interesse experimental (ONS, 2017). Outro fato que torna a utilização desse animal extremamente interessante foi a publicação do sequenciamento de seu genoma (MESQUITA *et al.*, 2015), facilitando a realização de análises genéticas e moleculares.

Assim, desde o início do século passado, o *R. prolixus* vem sendo utilizado como modelo experimental em diversas análises. Essas investigações possibilitaram o conhecimento sobre aspectos importantes da fisiologia e metabolismo dos insetos. As descobertas realizadas até aqui abriram caminhos para a realização de novos estudos envolvendo o barbeiro *R. prolixus* (NUNES-DA-FONSECA *et al.*, 2017).

Levando em consideração os fatores descritos até aqui, o inseto *R. prolixus* foi escolhido como modelo experimental para este estudo.

Fisiologia: metabolismo de lipídeos

O metabolismo de lipídeos refere-se basicamente à síntese e degradação de gordura, sendo um conjunto de processos essenciais para o crescimento e a reprodução do inseto, além de fornecer a energia necessária durante longos períodos sem alimentação (ARRESE; SOULAGES, 2010). Os processos ocorrem em todas as células, mas em sua maior parte em células do fígado e do tecido adiposo de mamíferos e, nos insetos, no corpo gorduroso (ZHAO; YANG, 2012).

Os lipídeos são moléculas orgânicas caracterizadas pela baixa solubilidade em água. Nos animais, são um importante componente da membrana celular, fontes de energia obtida através da dieta, precursores de vitaminas, ácidos biliares e hormônios, e indispensáveis para órgãos especializados no armazenamento e na exportação (ZHAO; YANG, 2012). O lipídeo pode ser obtido não só através da dieta, como também das reservas energéticas presentes no tecido adiposo/corpo gorduroso ou pode ser sintetizado a partir de carboidratos ou aminoácidos.

Ao contrário de alguns insetos, como a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, cuja alimentação ocorre de maneira contínua, o *R. prolixus* consome uma quantidade substancial de sangue em uma única refeição (FRIEND, 1965). O sangue que constitui a fonte alimentar desses insetos é predominantemente composto por triacilglicerol (TAG), fosfolipídeos, ésteres de colesterol e ácidos graxos em termos de lipídeos (GONDIM *et al.*, 2018).

O corpo gorduroso compartilha características semelhantes com o fígado e os tecidos adiposos em vertebrados (AZEEZ *et al.*, 2014). Ele é um tecido mole distribuído por todo o corpo do inseto, principalmente ao redor do intestino e do órgão reprodutor (ARRESE; SOULAGES, 2010).

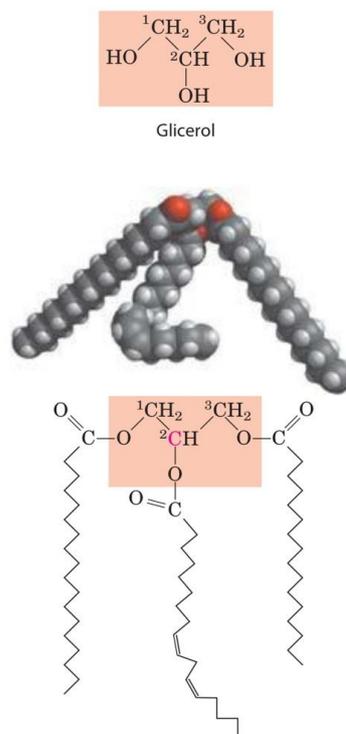
O corpo gorduroso é considerado um órgão multifuncional, não só desempenha um importante papel na síntese, armazenamento e mobilização de lipídeos, como também sintetiza importantes proteínas presentes na circulação do inseto. Exemplos disso são as lipoproteínas: lipoforina e vitelogenina. A primeira é

responsável pelo transporte de lipídeos na hemolinfa, que é o sangue dos insetos; já a segunda pelo acúmulo de nutrientes nos ovócitos e maturação dos ovos (ARRESE; SOULAGES, 2010).

O TAG assume um papel importante na reserva de energia em diferentes organismos, sendo o *R. prolixus* um deles. Os insetos podem sintetizar e armazenar uma grande quantidade de triglicerídeos nos adipócitos presentes no corpo gorduroso (PONTES *et al.*, 2008; ARRESE; SOULAGES, 2010). Além disso, destaca-se que o TAG representa mais de 90 % do total de lipídeos presentes no corpo gorduroso (BEENAKKERS; HORST; VAN MARREWIJK, 1985). Assim, o TAG assume uma importância significativa neste estudo.

Os TAGs são compostos por três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol. Esses triglicerídeos são armazenados no corpo gorduroso do inseto em forma de gotículas de lipídeos, de maneira semelhante como ocorre no tecido adiposo dos mamíferos (ATELLA; MAJEROWICZ; GONDIM, 2012).

Figura 3 - Moléculas de glicerol e TAG



Legenda: A imagem mostra uma molécula de glicerol e, abaixo, mostra três ácidos graxos ligados ao glicerol, formando um TAG.

Fonte: NELSON; COX, 2014.

Síntese de lipídeos: síntese *de novo* e síntese de TAG

A síntese *de novo* de ácidos graxos é uma via metabólica complexa e altamente regulada. Em condições fisiológicas, ela converte o excesso de carboidratos e proteínas em ácidos graxos, que, por sua vez, são usados para formar os triglicerídeos. Posteriormente, esses triglicerídeos podem servir como fonte de energia por meio da lipólise e da via de β -oxidação (AMEER *et al.*, 2014). Os insetos hematófagos possuem uma dieta altamente proteica, o que torna importante a capacidade de realizar síntese de ácidos graxos a partir de proteínas (GONDIM *et al.*, 2018). Um estudo publicado em 2021 demonstrou que a síntese *de novo* de ácidos graxos, em *R. prolixus*, é desencadeada após a alimentação com sangue (SARAIVA *et al.*, 2021). Nesses insetos, a síntese *de novo* de ácidos graxos ocorre, com maior frequência, no corpo gorduroso e em baixa quantidade no músculo de voo (ATELLA; MAJEROWICZ; GONDIM, 2012; SARAIVA *et al.*, 2021).

A síntese é estimulada quando existe uma grande quantidade de ATP e acetil-CoA na célula. Isso ocorre porque o ATP, quando em altas concentrações, inibe a isocitrato-desidrogenase e impede que o citrato siga para o Ciclo de Krebs, estimulando a síntese de lipídeos (NELSON; COX, 2014).

O substrato inicial desta via é o acetil-CoA que possui dois carbonos em sua estrutura. Os ácidos graxos são sintetizados, através de uma sequência de repetidas reações, pela ação de duas importantes enzimas: a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase. A primeira enzima é responsável por catalisar a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA. Já a segunda, trata-se de um complexo enzimático que adiciona malonil-CoA em sequência em uma cadeia para formar o ácido graxo (GONDIM *et al.*, 2018). O produto final da via é o ácido palmítico, que é um ácido graxo de dezesseis carbonos.

Os ácidos graxos sintetizados *de novo* podem ter vários destinos, um deles é a síntese de TAG (GONDIM *et al.*, 2018). Além disso, os TAGs também podem ser sintetizados a partir de ácidos graxos provenientes da dieta. Os triglicerídeos são armazenados principalmente no corpo gorduroso e podem ser mobilizados para suprir as necessidades energéticas de um indivíduo, como acontece em *R. prolixus* em longos períodos de jejum (PONTES *et al.*, 2008; ALVES-BEZERRA *et al.*, 2016).

A primeira etapa da síntese de TAG pela via do glicerol-3-fosfato ocorre com a biossíntese do ácido fosfatídico: o glicerol-3-fosfato reage com duas moléculas de acil-CoA graxo gerando o diacilglicerol (DAG)-3-fosfato, conhecido também como ácido fosfatídico. Esta reação se dá através da ação de duas enzimas da família das aciltransferases: a glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) e a ácido lisofosfatídico aciltransferase (NELSON; COX, 2014). Em *R. prolixus*, após a alimentação, a GPAT é responsável por garantir a participação do ácido graxo na síntese de TAG (ALVES-BEZERRA *et al.*, 2017).

Já na segunda etapa da biossíntese de TAG, o ácido fosfatídico, o precursor da via, é hidrolisado através da ação da enzima fosfatídico-fosfatase (lipina), dando origem ao DAG. O DAG reage com uma molécula de acil-CoA graxo e, então, é convertido em TAG. Esta reação é catalisada pela enzima DAG aciltransferase (ARRESE; SOULAGES, 2010; NELSON; COX, 2014).

Embora nos mamíferos e em alguns artrópodes existam vias alternativas para a síntese de glicerídeos, um estudo demonstrou que em *R. prolixus* o glicerol-3-fosfato é o único caminho possível para sintetizar TAG no organismo. Além disso, foi demonstrado que, nesse mesmo inseto, as enzimas da via do glicerol-3-fosfato são reguladas, à nível transcricional, pela alimentação (ALVES-BEZERRA; GONDIM, 2012).

Degradação de lipídeos: β -oxidação de ácidos graxos

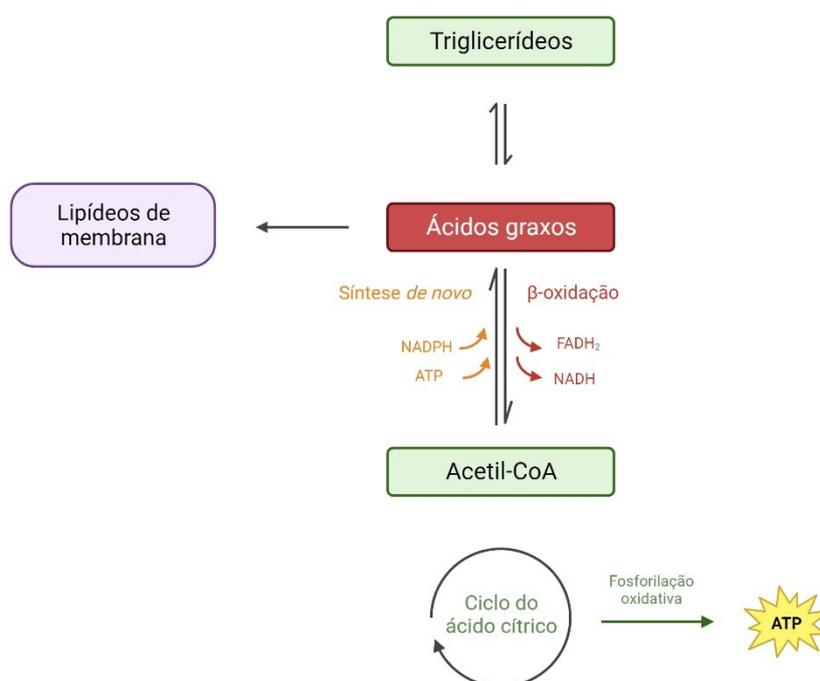
Em situações de altas demandas energéticas, os ácidos graxos armazenados podem ser mobilizados para a obtenção de energia através da β -oxidação (AMEER *et al.*, 2014). Inicialmente, os lipídeos armazenados no corpo gorduroso na forma de TAG são mobilizados através da ação da enzima TAG-lipase e transformados em DAG, que será transportado até os tecidos pela lipoforina (GONDIM *et al.*, 2018).

A enzima carnitina palmitoiltransferase I (CPT-1) está envolvida na ativação da carnitina através da sua ligação com o acil-CoA, assim, o ácido graxo que foi transformado em acil-carnitina estará pronto para ser transportado para dentro da mitocôndria para a via de β -oxidação (MCGARRY *et al.*, 1997). Resumidamente, no interior da mitocôndria, durante a reação de β -oxidação, são removidas duas unidades

de carbono de uma cadeia longa de ácido graxo, de forma consecutiva, na forma de acetil-CoA. Em seguida, as moléculas de acetil-CoA seguem para o ciclo do ácido cítrico, onde serão oxidados a CO_2 . Estas duas etapas produzem NADH e FADH_2 , transportadores de elétrons responsáveis por doar elétrons para a cadeia respiratória mitocondrial, que terá o ATP como um dos produtos finais (ADEVA-ANDANY *et al.*, 2019; NELSON; COX, 2014).

Assim, de maneira resumida, o processo de síntese *de novo* transforma o excesso de carboidratos em ácidos graxos, que, por sua vez, são esterificados em TAG e armazenados como reservas energéticas. Posteriormente, esses TAG podem ser mobilizados para fornecer energia através da via da β -oxidação, conforme ilustrado na figura abaixo.

Figura 4 - Esquema dos possíveis caminhos para os ácidos graxos



Legenda: A síntese *de novo* converte acetil-CoA em ácidos graxos, que, por sua vez, são transformados em TAG. Posteriormente, os TAGs podem ser mobilizados para fornecer energia através da via da β -oxidação.

Fonte: A autora, 2024.

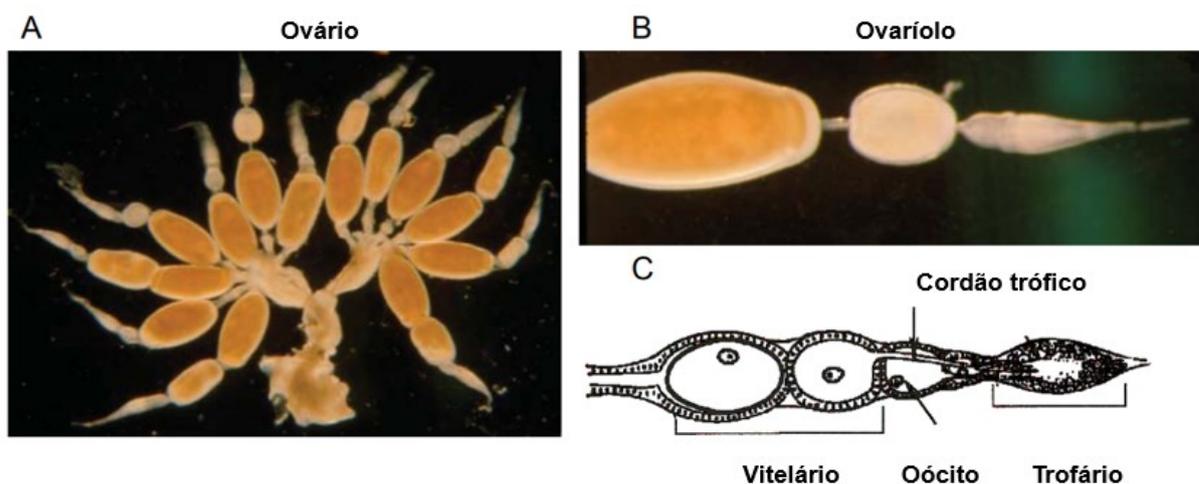
Fisiologia: ovogênese

A maioria dos insetos são considerados ovíparos. A fertilização ocorre durante a passagem do ovo pelo tubo ovariano, onde os espermatozoides são liberados da espermateca, em uma região chamada micrópila, onde os espermatozoides penetram. Logo após a fertilização, o ovo é liberado no ambiente (FONSECA *et al.*, 2012).

Uma vez que o desenvolvimento embrionário acontece fora do corpo materno, a viabilidade dos ovos está diretamente ligada à utilização de reservas previamente armazenadas para o desenvolvimento do embrião. A gema é o material responsável pela nutrição do embrião, sendo composta por proteínas, lipídeos, açúcares e outros elementos que serão gradativamente consumidos de acordo com as demandas de células específicas (ATELLA *et al.*, 2005). Sendo assim, os lipídeos são uma fonte de energia indispensável para o desenvolvimento saudável do embrião. No entanto, a capacidade do ovócito de sintetizar lipídeos *de novo* é muito limitada (ZIEGLER; VAN ANTWERPEN, 2006). Por isso, a maior parte dos lipídeos armazenados chega através de lipoproteínas circulantes, a lipoforina e a vitelogenina (CANAVOSO *et al.*, 2001; FRUTTERO *et al.*, 2017).

Em relação à estrutura ovariana, o *R. prolixus* apresenta um ovário bipartido constituído por dois hemi-ovários, os quais são subdivididos em sete estruturas denominadas ovaríolos. O trofário encontra-se no topo desses ovaríolos e é a região onde as células germinativas também estão situadas. Essas células têm a capacidade de se diferenciar em células nutridoras ou ovócitos, dando origem ao ovócito pré-vitelogênico, marcando assim o início da ovogênese (ATELLA *et al.*, 2005; NUNES-DA-FONSECA *et al.*, 2017).

Figura 5 - Estrutura ovariana da fêmea de *R. prolixus*



Legenda: (A) Dois hemi-ovários conectados por um oviduto, compondo um ovário. (B) Ovaríolo: estrutura que compõe o hemi-ovário. (C) Estruturas internas do ovaríolo.

Fonte: ATELLA *et al.*, 2005.

Receptor de lipoforina

Após a ingestão de alimentos, o intestino médio dos insetos absorve os lipídeos da dieta que devem ser entregues ao corpo gorduroso, onde serão armazenados ou direcionados para outros locais do organismo (ZHAO; KARPAC, 2020).

Nos mamíferos, o transporte de lipídeos para os órgãos é realizado por pelo menos três tipos de lipoproteínas essenciais (YING *et al.*, 2021), enquanto os insetos possuem apenas uma lipoproteína, a lipoforina, que é sintetizada no corpo gorduroso e responsável por transportar diferentes classes lipídicas para os tecidos. Dessa maneira, a lipoforina circula pelos tecidos-alvo, através da hemolinfa, carregando e descarregando sua carga lipídica, funcionando como um transporte reutilizável. A transferência de lipídeos ocorre entre a interação da lipoforina com os sítios de ligação específicos, presentes na membrana das células-alvo (CHINO *et al.*, 1981; HORST *et al.*, 2009). Entretanto, os detalhes sobre como os lipídeos são incorporados pela lipoforina e entregues aos órgãos do *R. prolixus*, bem como os mecanismos de regulação desses eventos, ainda são desconhecidos.

Em *R. prolixus*, foi demonstrado que a lipoforina transfere fosfolipídeos para os ovários vitelogênicos (GONDIM *et al.*, 1989b), e após a alimentação, ela é

carregada tanto no corpo gorduroso quanto no intestino médio (ATELLA *et al.*, 1992, 1995; COELHO *et al.*, 1997).

Para realizar o transporte de lipídeos, a lipoforina precisa interagir de forma adequada com os tecidos, em diferentes cenários fisiológicos. Além disso, a condição fisiológica do inseto também é capaz de modular a ligação da lipoforina com a superfície celular, e esse efeito é especialmente evidente em insetos hematófagos, cuja reprodução e desenvolvimento são controlados pela alimentação com sangue (COELHO *et al.*, 1997; GRILLO *et al.*, 2003).

Os receptores de lipoforina (LpR) foram identificados em várias espécies de insetos, estando presentes na membrana plasmática de vários órgãos. Esses receptores pertencem à superfamília dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) (DANTUMA *et al.*, 1999).

Estudos mostram que a ecdisona, fundamental para o desenvolvimento e reprodução dos insetos, parece estar envolvida na regulação da expressão dos LpRs. Em larvas da mariposa *Galleria mellonella*, a quantidade de LpR no corpo gorduroso aumentou na fase pré-pupal, o que sugere uma possível relação com a variação do sinal de ecdisona durante o desenvolvimento. Quando as larvas foram tratadas com 20-hidroxiecdisona (20E), houve um grande aumento na quantidade de LpR em todo o corpo do inseto (LEE *et al.*, 2003). Em *D. melanogaster* foi observado que, durante a oogênese, a ecdisona estimula a expressão de *LpR* no ovário. Essa estimulação ocorre por meio da ativação do fator de transcrição lipogênico SREBP, uma proteína ligadora de elementos responsáveis a esterol. Essa é uma estratégia geral adotada pelos folículos para acumular lipídeos (SIEBER; SPRADLING, 2015). Além disso, a inibição da expressão de LpR em *D. melanogaster* resultou em disfunção mitocondrial e contribuiu para o envelhecimento muscular do inseto (KIM *et al.*, 2021). A insulina também parece ter relação com o receptor de lipoforina em *R. prolixus*, pois a inibição da expressão do seu receptor levou a uma diminuição nos níveis de expressão de LpR no inseto (SILVA-OLIVEIRA *et al.*, 2021). A inibição da expressão de LpR por RNAi também levou a uma diminuição do conteúdo de hidrocarbonetos da cutícula do gafanhoto-migratório *Locusta migratória* e do pulgão-da-ervilha *Acyrtosiphon pisum*, demonstrando que LpR também está envolvido no transporte de hidrocarbonetos e, conseqüentemente, na permeabilidade cuticular dos insetos. Adicionalmente, após o silenciamento, também foi observada uma diminuição no conteúdo lipídico dos ovários de fêmeas de *L. migratória*, levando a um retardo no desenvolvimento ovariano, além

de uma diminuição na fecundidade de adultos de *A. pisum* (ZHAO *et al.*, 2023; QIAO *et al.*, 2020). Também foi demonstrado que o LpR é essencial para garantir o acúmulo de lipídeos e o sucesso do desenvolvimento ovariano na cigarrinha-parda *Nilaparvata lugens*. O LpR é altamente expresso no corpo gorduroso e ovário desse inseto, e a inibição da sua expressão por RNAi levou a uma diminuição no conteúdo de TAG, retardou o desenvolvimento dos ovários e diminuiu a fecundidade (LU *et al.*, 2018). Na mosca tsé-tsé *Glossina morsitans* a inibição da expressão do LpR por RNAi resultou em uma redução dos níveis de lipídeos presentes na hemolinfa, levou a um atraso no desenvolvimento dos ovócitos e prolongou o tempo de desenvolvimento larval (BENOIT *et al.*, 2011). Uma caracterização molecular de LpR no piolho-de-salmão *Lepeophtheirus salmonis* revelou que a inibição da expressão do gene por RNAi não foi capaz de interferir na morfologia e sobrevivência das fêmeas, mas levou a uma diminuição significativa na taxa de eclosão dos ovos que foram postos por elas (KHAN *et al.*, 2018).

Apesar de os estudos sobre o metabolismo lipídico dos insetos terem avançado significativamente desde a descoberta da lipoforina, muitos aspectos ainda requerem investigação, e várias questões permanecem sem resposta. Os detalhes sobre como os lipídeos são incorporados pela lipoforina e entregues aos órgãos, bem como os mecanismos de regulação desses eventos, ainda são desconhecidos.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar o papel do LpR na fisiologia do *barbeiro Rhodnius prolixus*.

1.2. Objetivos específicos

- a) Realizar análise evolutiva do gene *RpLpR* no genoma do *R. prolixus*;
- b) Avaliar a expressão do gene *RpLpR* em diferentes órgãos e no corpo gorduroso ao longo do processo digestivo;
- c) Inibir a expressão do gene *RpLpR* por RNAi;
- d) Avaliar o efeito da inibição da expressão de *RpLpR* no peso dos insetos;
- e) Avaliar a sobrevivência dos insetos *RpLpR/RNAi*;
- f) Quantificar os estoques de TAG em diferentes órgãos nos insetos *RpLpR/RNAi*;
- g) Analisar o perfil lipídico em insetos *RpLpR/RNAi*;
- h) Investigar a transferência de lipídeos da lipoforina para diferentes órgãos em insetos *RpLpR/RNAi*;
- i) Avaliar a quantidade de ovos postos pelas fêmeas *RpLpR/RNAi* e quantificar a eclosão dos ovos;
- j) Analisar a morfologia dos ovos e ovário em insetos *RpLpR/RNAi*;
- k) Avaliar a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e carboidratos, da vitelogenina nos insetos *RpLpR/RNAi*;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. *Rhodnius prolixus*

Os insetos utilizados foram o *R. prolixus*, mantidos em colônia a 28 °C e umidade relativa de 80-90 %. Foram utilizadas fêmeas adultas em jejum ou alimentadas com sangue de coelho em intervalos de três semanas. Os insetos foram fornecidos pelo Prof. Dr. Hatisaburo Masuda, do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O protocolo para utilização de coelhos na alimentação de artrópodes hematófagos foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o número de protocolo 155/13.

2.2. Análise evolutiva do gene *RpLpR*

Proteínas da família Pfam (FINN *et al.*, 2014) PF00058 (Low-density lipoprotein receptor repeat class B) foram obtidas através do banco de dados Ensembl Metazoa usando o BioMart (SMEDLEY *et al.*, 2015). Foram incluídas proteínas da maior quantidade de Ordens de insetos disponíveis. As proteínas do crustáceo *Daphnia pulex* foram incluídas com grupos externos. As proteínas foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW 2.0 (LARKIN *et al.*, 2007) e o dendrograma foi construído usando o método de máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981) com 500 repetições de bootstrap usando o programa MEGA 11 (TAMURA *et al.*, 2021).

2.3. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo

Com o intuito de avaliar o perfil de expressão do LpR em diferentes órgãos, fêmeas de *R. prolixus* foram alimentadas e dissecadas quatro dias após a

alimentação, pois nesse dia os órgãos analisados estão metabolicamente mais ativos (GONDIM *et al.*, 2018). Foram obtidos os ovários, os intestinos médios anterior e posterior, o corpo gorduroso e o músculo voo.

Para a análise da expressão do gene *RpLpR* ao longo do processo digestivo, foram coletados os corpos gordurosos de fêmeas em jejum e em diferentes dias após a alimentação: 1, 2, 4 e 15 dias.

Todas as amostras obtidas foram submetidas aos seguintes experimentos:

2.3.1. Extração de RNA total

Para a extração de RNA total, os tecidos foram homogeneizados em 500 µl de reagente TriReagent (Sigma-Aldrich) em tubos de microcentrífuga e incubados a temperatura ambiente por 5 min. Depois, as amostras foram centrifugadas a 14000 *g* por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e a eles foram adicionados 200 µl de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram incubadas por 2 min a temperatura ambiente e depois novamente centrifugadas a 14000 *g* por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e foram adicionados de 1 volume de isopropanol (Merck). As amostras foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente e depois centrifugadas a 14000 *g* e 4 °C por mais 15 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados em 200 µl de etanol absoluto (Merck) e depois as amostras foram centrifugadas a 14000 *g* e 4 °C por mais 15 min, e os sobrenadantes foram descartados. As amostras de RNA foram ressuspensas em 50 µl de H₂O-DEPC 0,1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

2.3.2. Dosagem de RNA

As amostras de RNA foram dosadas com Nanodrop Lite (Thermo Fischer Scientific). A qualidade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de

agarose 1 % (Kasvi) corado com Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega) em tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM; pH 8).

2.3.3. Remoção da contaminação por DNA genômico

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich). Em um tubo de 0,2 mL foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µl de tampão para DNase I (10 x), 1 µl de DNase I (1U/µl) e H₂O-DEPC 0,1% até completar um volume final de 10 µl. As reações foram incubadas por 30 min a 37 °C e depois foi adicionado 1 µl de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 50 mM. As reações foram então incubadas a 65 °C por 10 min.

2.3.4. Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reserve Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Aos 11 µl obtidos no tratamento das amostras com DNase foram adicionados 2,2 µl do tampão de reação (10 x), 0,88 µl de dNTP (100 mM), 2,2 µl de iniciadores aleatórios (10 x), 1,1 µl da transcriptase reversa (50 U/µl) e H₂O-DEPC 0,1% para completar um volume final de 22 µl. As reações foram incubadas 10 min a 25 °C e depois a 37 °C por 2 h. As amostras de cDNA foram estocadas a -20 °C até o uso.

2.3.5. PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um termociclador Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems) usando qPCRBIO SyGreen Mix Separate-ROX (PCR Biosystems Ltd, London, UK) de acordo com o seguinte protocolo: adicionaram-se em cada poço de uma placa ótica de 96 poços, 7,5 µl de

qPCRBIO SyGreen Mix Separate ROX, 3 µl da amostra de cDNA, iniciadores senso e anti-senso específicos (3,0 pmol) para os genes de interesse (Tabela 1) e para um volume final de 15 µl foi utilizada H₂O-DEPC 0,1%. A amplificação experimental e o controle endógeno foram realizados em poços independentes. Nos brancos, o cDNA foi substituído por H₂O-DEPC 0,1%. Tanto os brancos como os pontos experimentais foram realizados em duplicata. O programa de variação de temperatura utilizado foi: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 seg. e 60 °C por 45 seg., seguido por uma curva de dissociação. Os iniciadores utilizados foram desenhados com auxílio do programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). O gene *RpEF-1* foi utilizado como controle endógeno (MAJEROWICZ *et al.*, 2016). Os valores de ΔCq foram calculados a partir dos valores de Cq obtidos (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Esses valores foram usados para análises estatísticas específicas para cada experimento, conforme indicado nas legendas das figuras.

TABELA 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para a reação de qPCR.

GENE	INICIADOR	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>RpLpR</i>	Senso (5' - 3')	TTTATAGACAGCCGGATGGTG	(Presente trabalho)
	Anti-senso (5' - 3')	GCGAACGTGGGTTTATTTGT	
<i>RpEF-1</i>	Senso (5' - 3')	GATTCCACTGAACCGCCTTA	(MAJEROWICZ <i>et al.</i> , 2016)
	Anti-senso (5' - 3')	GCCGGGTTATATCCGATTTT	
<i>RpDGAT</i>	Senso (5' - 3')	ATGCAACTGGCATAGCTCCG	(ALVES-BEZERRA; GONDIM, 2012)
	Anti-senso (5' - 3')	GCGATTGGCTTTCCAACACTACAG	
<i>RpACC</i>	Senso (5' - 3')	TGGGCTGGAACCGTAGTTGCG	(SARAIVA <i>et al.</i> , 2021)
	Anti-senso (5' - 3')	TGCGGGATCGGCTGGAAGTTGT	
<i>RpACLY</i>	Senso (5' - 3')	CCACCAAACCTGTGCGCTAT	(NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2021)
	Anti-senso (5' - 3')	CAGTCTCTGGTGCCACAAT	
<i>RpACSL-1</i>	Senso (5' - 3')	GTGGTTAAAAGCTGGGCTGT	(ALVES-BEZERRA <i>et al.</i> , 2016)
	Anti-senso (5' - 3')	CCCCAAGTTATCAAATCATGCA	
<i>RpACSL-2</i>	Senso (5' - 3')	TAGCCGTAATGGCAGAACGC	(ALVES-BEZERRA <i>et al.</i> , 2016)
	Anti-senso (5' - 3')	CCATGGGCAGCTAATTCTGC	
<i>RpcME</i>	Senso (5' - 3')	CAATTGGCGGCGCTTTTACT	(NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2021)
	Anti-senso (5' - 3')	TGCCTTGCTTGTGGATTGC	

<i>RpCPT-1</i>	Senso (5' - 3')	AAACACCACATGGCCAAACT	(MAJEROWICZ <i>et al.</i> , 2017)
	Anti-senso (5' - 3')	ATGCGTCGCTCAGTACGACAGC	
<i>RpFASN-3</i>	Senso (5' - 3')	TCACCACGGAGCAGGGAGTGAA	(NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2021)
	Anti-senso (5' - 3')	ATGCGTCGCTCAGTACGACAGC	
<i>RpG6PDH</i>	Senso (5' - 3')	AGGAGCTTCGGGTGATTTGG	(NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2021)
	Anti-senso (5' - 3')	CATACCCACGAACACCACA	
<i>RpBmm</i>	Senso (5' - 3')	ACATGGATGGAGGATTCAGTG	(MAJEROWICZ <i>et al.</i> , 2017)
	Anti-senso (5' - 3')	GGGCATATATCGGTTTCACC	
<i>RpATPSynα</i>	Senso (5' - 3')	TGGCCCATATTCTGGCTGCGCT	(ALMEIDA-OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2023)
	Anti-senso (5' - 3')	TCTGTAGGCAACGGCTGTTTGGACA	
<i>RpATPSynβ</i>	Senso (5' - 3')	GGAAAATCCGCCATAAACCC	(ALMEIDA-OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2023)
	Anti-senso (5' - 3')	GAACATCTACTACGGCACCA	
<i>RpVg1</i>	Senso (5' - 3')	CGCAGCTACCAAACATGA	(ARÉDES <i>et al.</i> , 2024)
	Anti-senso (5' - 3')	TGTGCTTGTTGAGGCTGG	
<i>RpVg2</i>	Senso (5' - 3')	CGCTAAGATTTCCCCATG	(ARÉDES <i>et al.</i> , 2024)
	Anti-senso (5' - 3')	CCCTGAAACACCTTGGAGC	

2.4. Síntese de dsRNA para RNAi

Para a realização da técnica de RNAi, foram produzidos dois dsRNAs com sequências distintas, que visam como alvo diferentes regiões do gene *RpLpR*. Como controle não-relacionado, foi produzido um dsRNA homólogo a uma proteína ligadora de maltose de *Escherichia coli* (MalE).

Para a produção de molde para a síntese do dsRNA para o gene MalE, as reações de PCR utilizaram PCR Supermix (Thermo Fisher). As misturas de reação para PCR continham 2 μ l do iniciador T7minimal (5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG G - 3') (15 μ M), 0,2 μ l do plasmídeo 28iMal (0,5 μ g/ μ l) (New England BioLabs, Ipswich, EUA) e PCR Supermix para completar um volume final de 50 μ l. As amostras foram levadas ao termociclador sob o programa: 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 seg., 44 °C por 30 seg. e 72 °C por 1 min; e 72 °C por 10 min.

Para a produção do molde para a síntese do dsRNA para o gene *RpLpR*, as reações de PCR utilizaram a enzima Taq DNA Polimerase (*Thermo Scientific*). As

misturas de reação para PCR continham 5 µl de tampão para Taq DNA Polimerase, 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 0,4 µl do iniciador senso (15 µM), 0,4 µl do iniciador anti-senso, 0,2 µl da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1 µl de cDNA produzido a partir de RNA de *R. prolixus*, conforme descrito nas seções anteriores, e H₂O-DEPC 0,1% para completar um volume final de 50 µl.

As amostras foram levadas ao termociclador sob o programa: 94 °C por 2 min; 5 ciclos de 94 °C por 30 seg., 45 °C por 30 seg. e 72 °C por 30 seg.; 30 ciclos de 94 °C por 30 seg., 62 °C por 30 seg. e 72 °C por 30 seg.; e 72 °C por 10 min. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2 - Sequência dos iniciadores utilizados para a síntese de dsRNA.

GENE	INICIADOR	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>RpLpR-A - RNAi</i>	Senso (5' - 3')	TAATACGACTCACTATAGGGGAGAG ACTTATGTGTACAGATCAA	(Presente trabalho)
	Anti-senso (5' - 3')	TAATACGACTCACTATAGGGGAGAT GTACAATAGCAATCATGAA	
<i>RpLpR-B - RNAi</i>	Senso (5' - 3')	TAATACGACTCACTATAGGGGAGAT ATAGAACTGGCAAACATATG	(Presente trabalho)
	Anti-senso (5' - 3')	TAATACGACTCACTATAGGGAAGAC CATCAAATTTATTGGCTTT	

A qualidade de ambos os produtos de PCR foi checada por eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com Diamond™ Nucleic Acid Dye em tampão TAE. Após a eletroforese, as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta em transiluminador e o gel foi fotografado. Os produtos de PCR só foram utilizados como molde para a síntese de dsRNA caso não fossem detectadas bandas não-específicas ou dímeros de iniciadores.

Os dsRNAs foram produzidos com o kit MEGAScript® RNAi Kit (Ambion, Austin, EUA), conforme descrito abaixo:

Primeiro, o dsRNA foi produzido por uma reação de transcrição utilizando uma T7 RNA Polimerase. Em um tubo de 0,2 mL no gelo, foram adicionados de 1 a 2 µg de produto de PCR como molde do gene a ter sua expressão inibida, 2 µl de tampão para T7 RNA Polimerase (10x), 2 µl de ATP (75 mM), 2 µl de UTP (75 mM), 2 µl de CTP (75 mM), 2 µl de GTP (75 mM), 2 µl da enzima T7 RNA Polimerase e H₂O-DEPC

0,1% suficiente para completar um volume final de 20 µL. A reação foi incubada por 16 horas a 37 °C. Após a incubação, a reação foi aquecida a 75 °C por 5 min e resfriada a temperatura ambiente, para maximizar a formação de dupla-fita.

Depois, foi adicionado ao tubo 1 µL da enzima Turbo DNase (1 U/µL). A reação foi então incubada a 37 °C por 15 min. Após a digestão com as nucleases, a reação foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e a ela foram adicionados dois volumes de etanol absoluto e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 para a precipitação do dsRNA. O volume foi misturado com o auxílio de uma pipeta e o material foi colocado a -20 °C por pelo menos 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes contendo etanol e acetato de sódio foram descartados, e os precipitados foram ressuspensos em 100 µL de H₂O-DEPC 0,1%. A qualidade do dsRNA produzido foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com Diamond™ Nucleic Acid Dye em tampão TAE. Depois, as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta em transiluminador e o gel foi fotografado. As amostras de dsRNA foram dosadas com Nanodrop Lite.

As amostras de dsRNA foram então evaporadas totalmente em liofilizador a vácuo, ressuspensas em H₂O-DEPC 0,1% até a concentração de 10 µg/µl e conservadas a -20 °C até o uso.

2.5. Injeção de dsRNA

Inicialmente, para definir o melhor protocolo a ser utilizado, as injeções foram realizadas em diferentes quantidades para os três dsRNAs produzidos: *dsMal* (controle), *dsRpLpR-A* e *dsRpLpR-B*. As fêmeas foram injetadas com 1 µL de H₂O-DEPC 0,1% contendo 0,1 µg, 1 µg ou 10 µg de dsRNA.

Posteriormente, o protocolo então escolhido para este estudo foi a utilização do dsRNA produzido com base na sequência de *dsRpLpR-A* (*dsRpLpR*) na quantidade de 0,1 µg. Como controle, foi utilizado 1 µL de H₂O-DEPC 0,1% contendo 0,1 µg do dsRNA produzido a partir do gene *MalE* (*dsMal*).

A injeção foi sempre realizada em fêmeas adultas em jejum, utilizando uma seringa de 10 µL (Hamilton Company, Reno, EUA). No terceiro dia após a injeção, as

fêmeas receberam uma alimentação natural, com sangue de coelho. Apenas insetos bem alimentados, que estavam visivelmente maiores, como mostrado na figura 2-B, foram utilizados nos experimentos.

Para as análises de bioquímica e biologia molecular, os insetos foram dissecados no quarto dia após a alimentação, enquanto as análises fisiológicas foram realizadas no sétimo dia após a alimentação.

2.6. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo após a inibição de *RpLpR*

Fêmeas em jejum foram submetidas à injeção de 0,1 µg de *dsRpLpR* ou *dsMal* e alimentadas três dias depois. No quarto dia após a alimentação tiveram seus corpos gordurosos ou ovários retirados. Foi avaliada, nesses órgãos, a expressão dos genes envolvidos com o metabolismo de lipídeos, carboidratos e com a síntese de vitelogenina. A análise foi feita por meio de PCR em tempo real, conforme descrito nas seções anteriores.

2.7. Análise do peso, sobrevivência, postura e eclosão

As fêmeas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para o gene *RpLpR* ou *MalE*. Foram alimentadas três dias após a injeção e isoladas, individualmente, em frascos de vidro mantidos a 28 °C, com umidade relativa de 80-90 %. As fêmeas foram pesadas antes da alimentação e, aproximadamente, 3 horas após a alimentação, em dias específicos. Os ovos postos foram coletados e contabilizados nos mesmos dias em que os animais foram pesados e, aproximadamente 15 dias depois, foi realizada a contagem das ninfas que eclodiram dos ovos postos. Por fim, a longevidade das fêmeas foi avaliada observando-se o dia em que cada inseto morreu.

2.8. Quantificação de TAG

A quantificação de TAG e DAG contida nas amostras foi feita através de ensaio colorimétrico enzimático, conforme descrito na literatura (MAJEROWICZ *et al.*, 2016). As amostras (10 µl) foram misturadas com 200 µl do reagente presente no kit clínico Triglicérides Monoreagente (Bioclin) e incubadas a 37 °C por 30 min. As incubações foram realizadas em placas de 96 poços. A absorbância foi medida a 540 nm e a quantidade de TAG/DAG foi calculada comparando a absorbância com a de uma curva padrão de glicerol.

Os níveis de TAG no intestino médio posterior foram mensurados por cromatografia em camada fina (TLC). Os lipídios das amostras foram extraídos (BLIGH; DYER, 1959), e separados por TLC em placas de sílica gel (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As placas foram coradas com reagente de cobre conforme descrito por Majerowicz *et al.* (2013). Os lipídios foram identificados por comparação com padrões comerciais (Sigma-Aldrich Co.) e a composição relativa de lipídios foi determinada por densitometria usando o Image Master Total Lab 1.11 (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra).

2.9. Quantificação de proteína total

A dosagem de proteínas segue o protocolo Lowry, proposto em 1951 (Lowry *et al.*, 1951), fazendo o uso de solução cuproalcalina (SCA) (2% Na₂CO₃ em 0,1N NaOH e 0,5 % CuSO₄ em 1 % de tartarato de sódio), tartarato de sódio, sulfato cuproso, água destilada e reagente de Folin-Ciocalteu. A quantificação de proteínas foi feita com as amostras pipetadas em uma placa de 96 poços, sendo adicionados 40 µl de água destilada no branco, reduzindo esta quantidade em 1 µl para cada ponto da curva padrão até o limite de 36 µl de água total. Desta forma, também foi adicionado respectivamente de 0 µl a 4 µl de albumina bovina sérica (BSA) 1 % p/v para completar o volume de 40µl, quando somado com a quantidade de água destilada que foi pipetada. Foram pipetados mais 200 µl da SCA em cada poço e, no final, 20 µl de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada na proporção de 1:2). Para

os poços com as amostras são pipetados 39 μL de água destilada, e apenas 1 μL de amostra, seguindo a mesma quantidade de SCA e Folin. Em seguida foi feita incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, e então a placa com as amostras foi lida através de espectrofotometria com absorvância de 660 nm e a quantidade de proteína foi calculada comparando a absorvância com a curva padrão de albumina de soro bovino. A quantidade de proteína total, medida pelo método de Lowry, foi usada para normalizar os resultados das amostras de TAG.

2.10. Análise do perfil lipídico por espectrometria de massa

O corpo gorduroso, músculo de voo e ovários dos insetos foram homogeneizados em 2 mL de uma solução de metanol:clorofórmio:água (2:1:0,8). Os lipídeos foram extraídos (BLIGH; DYER, 1959), secados, ressuspensos em 500 μL de metanol:clorofórmio (2:1) e centrifugados a 4500 g por 10 min. Posteriormente, alíquotas de 436,7 μL foram adicionadas a 56 μL de acetato de amônio 1,33 mM em álcool propílico e 507,3 μL de álcool propílico. Foram aplicadas 10 μL de cada amostra, em injeção direta, em um espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific) acoplado a um Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) e equipado com uma fonte de ionização química de pressão atmosférica. As amostras foram processadas nos modos positivo e negativo. Por fim, os resultados foram analisados com o software MzMine 3 (SCHMID *et al.*, 2023).

2.11. Incorporação de palmitato

Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 μg de *dsRpLpR* ou *dsMal* e alimentadas três dias depois. No quarto dia após a alimentação, foi realizado o experimento de incorporação de palmitato, conforme descrito por PONTES, *et al.* (2008):

As fêmeas foram injetadas com 25 nCi de ^3H -palmitato (32 mCi/nmol; PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) em 1 μL de etanol. Duas horas após a injeção a

hemolinfa foi coletada. Os insetos foram dissecados e o ovário, intestino médio posterior, músculo de voo e corpo gorduroso foram obtidos. Os órgãos foram lavados em solução salina e homogeneizados em NaCl 0,15 M. As amostras obtidas foram usadas para determinação da radioatividade incorporada, por contagem de cintilação líquida.

2.12. Morfologia dos ovos, ovários e ninfas

2.12.1. Imagens dos ovários, ovos e ninfas

Após o tratamento com o dsRNA, uma parte das fêmeas teve seus ovários dissecados quatro dias após a alimentação, enquanto a outra parte teve seus ovos recém-postos coletados sete dias após a alimentação. Os ovos foram então fotografados em três momentos diferentes: 0 a 2 dias após a postura, 12 a 13 dias após a postura e 22 a 23 dias após a postura (pós-eclosão). As ninfas de primeiro estágio que eclodiram desses ovos também foram fotografadas. Foi utilizada uma lupa Zeiss Axiozoom V.16.

2.12.2. Fluorescência de ditirosina do córion

Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de *dsRpLpR* ou *dsMal* e alimentadas três dias depois. Foram coletados ovos recém-postos (entre 0h e 24h) com o objetivo de detectar e comparar os níveis de fluorescência de tirosina, conforme o protocolo previamente descrito por DIAS *et al.* (2013). Uma lupa Zeiss Axiozoom V.16 foi utilizada para fotografar os ovos, com um conjunto de filtros padrão para DAPI (4900 ET- DAPI- EX D350/50X; BS 400DCL; EM ET460/50Chroma), além de objetivas e tempos de exposição idênticos. Para a análise quantitativa da fluorescência, foram examinadas imagens de 9-10 ovos de cada grupo por meio do software ImageJ, onde fluorescência aproximada do córion (FC) foi calculada, através da seguinte fórmula:

FC = densidade integrada – (área selecionada do ovo x fluorescência média das leituras do background).

2.12.3. Microscopia eletrônica de varredura

Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de *dsRpLpR* ou *dsMal*, alimentadas três dias depois. Os ovos recém-postos (entre 0 e 24h) foram coletados e mantidos a 4 °C, sem a necessidade de qualquer procedimento de fixação química. Os ovos foram cuidadosamente depositados em *stubs* e metalizados com uma fina camada de ouro com 10 nm de espessura. Em seguida, as superfícies das amostras foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss EVO 10 kV) operando a 10 kV.

2.13. **Análise estatística**

Para analisar a expressão do gene em diferentes órgãos foi utilizado o teste ANOVA de uma via. O teste ANOVA de Welch foi utilizado para avaliar a expressão do gene *RpLpR* dias após a alimentação. O ANOVA de duas vias foi utilizado para determinar se houve diferença no peso dos insetos e na quantidade de ovos postos ao longo dos dias. Além disso, este mesmo teste também foi utilizado para avaliar a expressão do gene *RpLpR* em relação as quantidades e os tipos de dsRNAs injetados. Através do teste de Log-Rank foram analisadas as possíveis diferenças na curva de sobrevivência. As diferenças entre os perfis lipídicos foram analisadas pela análise de componente principal. Os testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e teste *t* não-pareado foram utilizados de acordo distribuição de normalidade dos dados. Por fim, o teste binominal foi utilizado para analisar se houve ou não diferença na eclosão de ovos provenientes de fêmeas silenciadas para o *RpLpR*. As diferenças encontradas foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Para realizar a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 9.0.0.

3. RESULTADOS

3.1. Análise evolutiva do gene *RpLpR* no genoma do *R. prolixus*

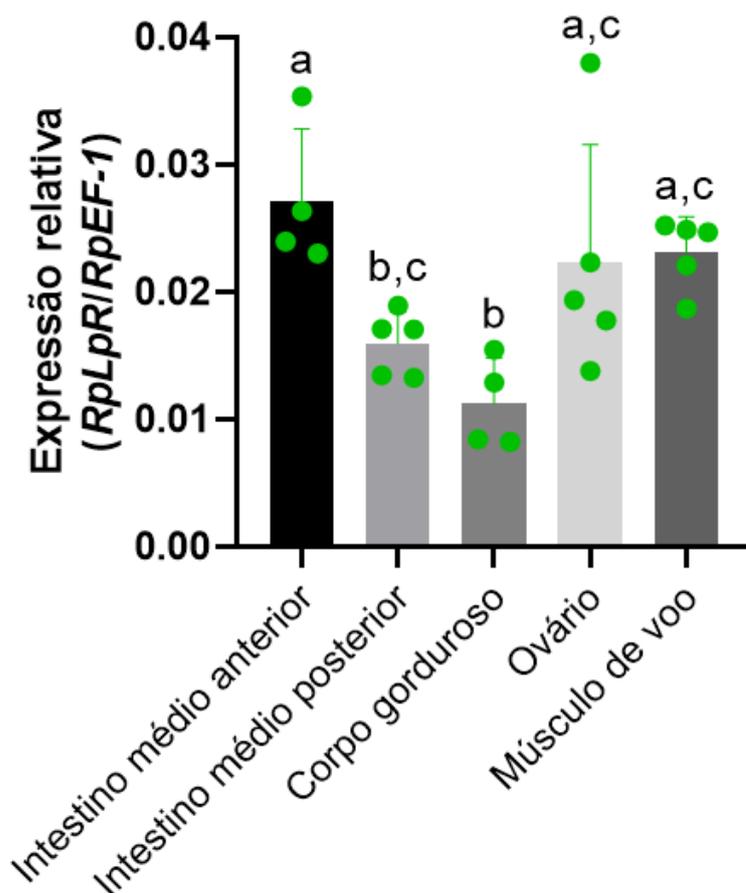
O levantamento de genes com domínio semelhante aos receptores de LDL em *R. prolixus* foi realizado por meio da construção de um dendrograma (Figura 6). Foram identificados os genes *Lipophorin receptor (RpLpR)*, *LDL receptor protein 1 (RpLRP1)*, *Cueball (RpCue)*, *Nidogen (RpNdg)* e *Megalin (Rpmgl)*, todos pertencentes à família Pfam PF00058 (FINN *et al.*, 2014). Entretanto, é relevante destacar que, embora pertencentes à mesma família, "LDL receptor protein 4" e o gene Arrow não foram localizados neste organismo. Essa análise ressalta tanto a presença dos genes identificados quanto as ausências específicas em *R. prolixus*.

ATELLA *et al.*, 1992, 1995). Dessa maneira, nesse estudo foi analisado, especificamente, o papel do gene *RpLpR* na fisiologia do barbeiro.

3.2. Caracterização da expressão *RpLpR* em diferentes órgãos de *R. prolixus*

Para caracterizar o perfil de expressão do gene *RpLpR* em diferentes órgãos do barbeiro, foi realizada uma avaliação por meio de PCR quantitativo (Figura 7). Foram avaliados os seguintes tecidos: intestinos médios anterior e posterior, corpo gorduroso, ovários e músculo de voo.

Figura 7 - Expressão de *RpLpR* em diferentes tecidos



Legenda: Fêmeas adultas foram dissecadas quatro dias após a alimentação, e os órgãos obtidos foram homogeneizados em TRI Reagent. O RNA total foi extraído, tratado com DNase I e utilizado como molde para síntese de cDNA. A expressão gênica foi medida por PCR quantitativo usando iniciadores específicos. A expressão do gene *RpEF-1* foi usada como controle endógeno (MAJEROWICZ *et al.*, 2011). $n \geq 4$. As barras representam as médias \pm desvio

padrão, e cada ponto representa uma réplica biológica. Letras diferentes indicam diferença estatística. ANOVA de uma via, $p = 0.0005$.

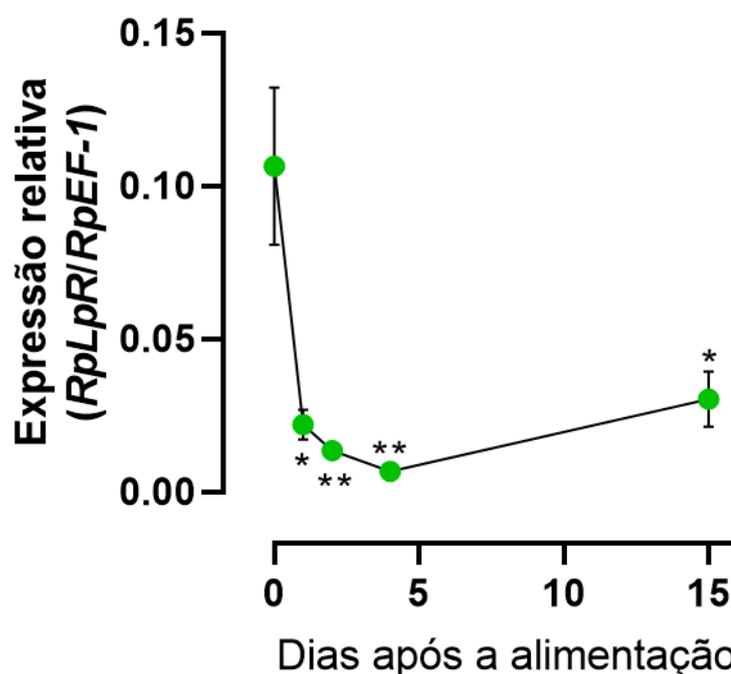
Fonte: A autora, 2024.

Os resultados demonstraram que o gene *RpLpR* está presente em todos os órgãos analisados, com diferentes níveis de expressão. O intestino médio anterior apresentou um nível de expressão maior do que o intestino médio posterior e o corpo gorduroso. Além disso, o ovário e o músculo de voo também apresentaram uma expressão de *RpLpR* mais alta que o corpo gorduroso.

3.3. Expressão do gene *RpLpR* no corpo gorduroso, ao longo do processo digestivo

Para avaliar se o processo digestivo é capaz de influenciar na expressão de *RpLpR* no corpo gorduroso, foram realizadas análises por PCR quantitativo, em diferentes momentos: no jejum (0) e em diferentes dias após a alimentação (1º, 2º, 4º e 15º dias) (Figura 8).

Figura 8 - Perfil de expressão gênica do LpR de *R. prolixus* após a alimentação, no corpo gorduroso



Legenda: Fêmeas adultas foram dissecadas em jejum (dia 0) e nos dias 1, 2, 4 e 15 após a alimentação. Os órgãos obtidos foram homogeneizados em TRI Reagent. O RNA total foi extraído, tratado com DNase I e utilizado como molde para síntese de cDNA. A expressão gênica foi medida por PCR quantitativo usando iniciadores específicos. A expressão do gene *RpEF-1* foi usada como controle endógeno (MAJEROWICZ *et al.*, 2011). $n \geq 5$. Os símbolos representam as médias \pm desvio padrão. (*) e (**): significativamente diferente dos valores de jejum, $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. ANOVA de Welch, $p = 0.0003$.

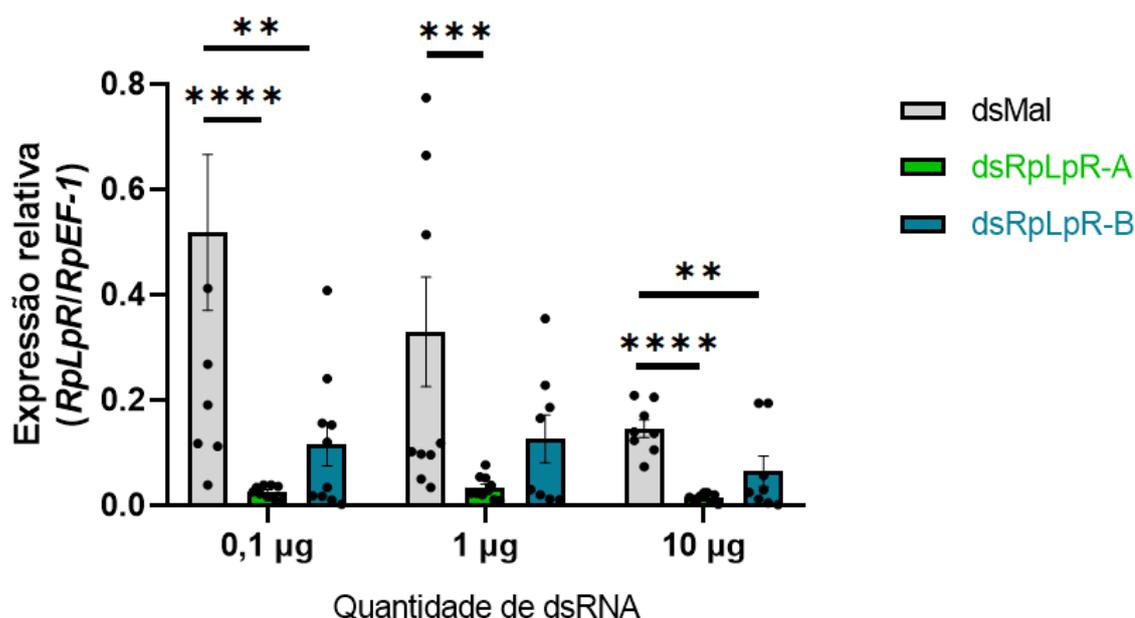
Fonte: A autora, 2024.

O resultado mostra que após a alimentação houve uma queda significativa na expressão de *RpLpR*. Dessa maneira, é possível observar que o gene tem sua maior expressão durante o jejum e é menos expresso após a alimentação. Esses dados mostram que a expressão de *RpLpR* pode estar sendo regulada pela alimentação nesse órgão.

3.4. Expressão de *RpLpR* após a injeção de diferentes quantidades de dsRNA para duas regiões específicas do gene

Para inibir a expressão do LpR, foram realizadas injeções com diferentes quantidades de dsRNA no inseto (0,1 µg, 1 µg e 10 µg). Foram testadas duas sequências de dsRNA distintas (*dsRpLpR-A/dsRpLpR-B*), que visam como alvo diferentes regiões do gene. A eficácia da inibição foi avaliada por meio de PCR quantitativo para o gene *RpLpR* (Figura 9).

Figura 9 - Expressão de *RpLpR* de acordo com as quantidades de dsRNA



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com diferentes quantidades de *dsRpLpR* e *dsMal*, e dissecadas três dias após a injeção. O corpo gorduroso foi obtido e homogeneizado em TRI Reagent. O RNA total foi extraído, tratado com DNase I e utilizado como molde para síntese de cDNA. A expressão gênica foi medida por PCR quantitativo usando iniciadores específicos. A expressão do gene *RpEF-1* foi usada como controle endógeno (MAJEROWICZ *et al.*, 2011). As barras representam as médias \pm desvio padrão, e cada ponto representa uma réplica biológica. (**), (***) e (****): significativamente diferente dos valores de dsMal, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente. $n \geq 8$; ANOVA de duas vias, Interação: $p = 0,1786$; dsRNA: $p < 0,0001$; Quantidade de dsRNA: $p < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2024.

As duas sequências de dsRNA se mostraram eficazes na inibição da expressão de *RpLpR*. No entanto, ao longo desse estudo será utilizado apenas o

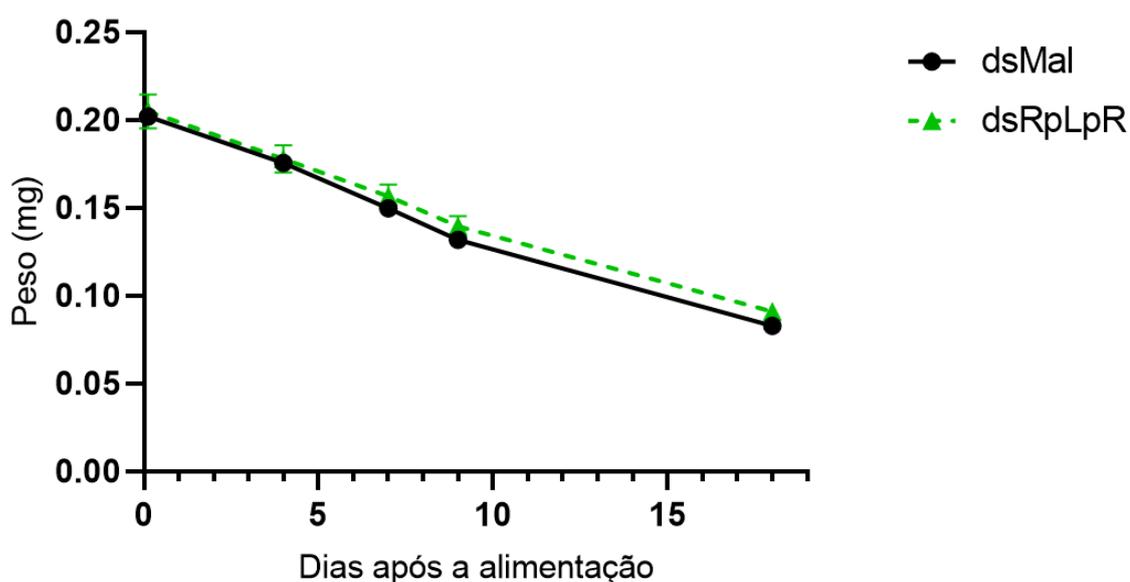
dsRNA que contém a sequência de *dsRpLpR-A*, na quantidade de 0,1 µg. Esse protocolo se mostrou eficaz ao inibir significativamente expressão do gene, utilizando uma quantidade bem pequena de dsRNA.

3.5. O efeito da inibição da expressão de *RpLpR* na digestão

Para avaliar se a inibição da expressão de *RpLpR* tem efeito sob a digestão do barbeiro, o dsRNA foi injetado em fêmeas em jejum. Três dias após a injeção, os insetos foram alimentados (dia 0) e pesados ao longo de 18 dias (Figura 10).

Como resultado, é possível observar a queda do peso ao longo dos dias, devido ao processo de digestão que ocorre naturalmente após o repasto sanguíneo. Se comparados o peso do animal cuja expressão de *LpR* foi inibida (*RpLpR*) com o peso do grupo controle (*dsMal*), não são observadas diferenças significativas no peso dessas fêmeas.

Figura 10 - Efeito da inibição da expressão de *RpLpR* no peso corporal do barbeiro



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para o gene *RpLpR* ou *Mal*, alimentadas três dias após a injeção e isoladas individualmente. O peso das fêmeas foi registrado por 18 dias após a alimentação. Os símbolos representam as médias ± desvio padrão. $n \geq 16$; ANOVA de duas vias, Interação: $p = 0,9183$; Dias: $p < 0,0001$; dsRNA: $p = 0,4173$.

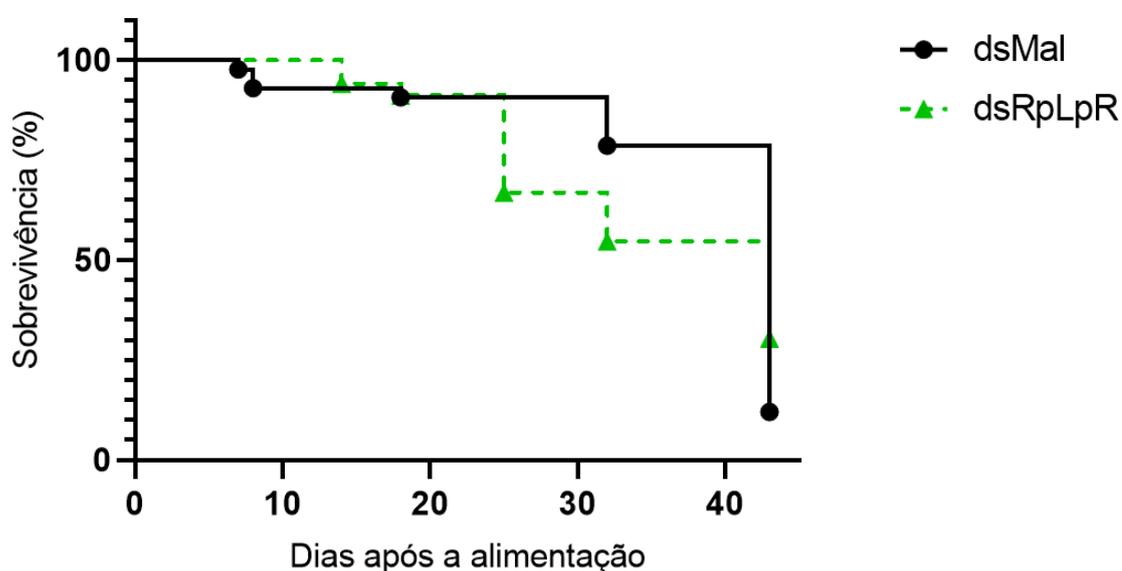
Fonte: A autora, 2024.

Dessa maneira, os resultados mostram que a inibição de *RpLpR* não exerceu impacto significativo no processo de digestão do inseto, devido à semelhança do peso em relação ao grupo de controle.

3.6. Taxa de sobrevivência de fêmeas após a inibição de *RpLpR*

Com o objetivo de avaliar se a inibição da expressão do LpR é capaz de alterar a expectativa de vida do barbeiro, fêmeas em jejum foram injetadas com *dsRpLpR* ou *dsMal* e alimentadas três dias depois. Em seguida, os insetos foram separados individualmente e a sobrevivência foi monitorada ao longo de aproximadamente 40 dias (Figura 11).

Figura 11 - Efeito inibição da expressão de *RpLpR* na sobrevivência do inseto



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para o gene *RpLpR* ou *MalE*, alimentadas três dias após a injeção e isoladas individualmente. A sobrevivência foi registrada por até 40 dias após a alimentação. n ≥ 30; Teste de log-rank; p = 0,9882.

Fonte: A autora, 2024.

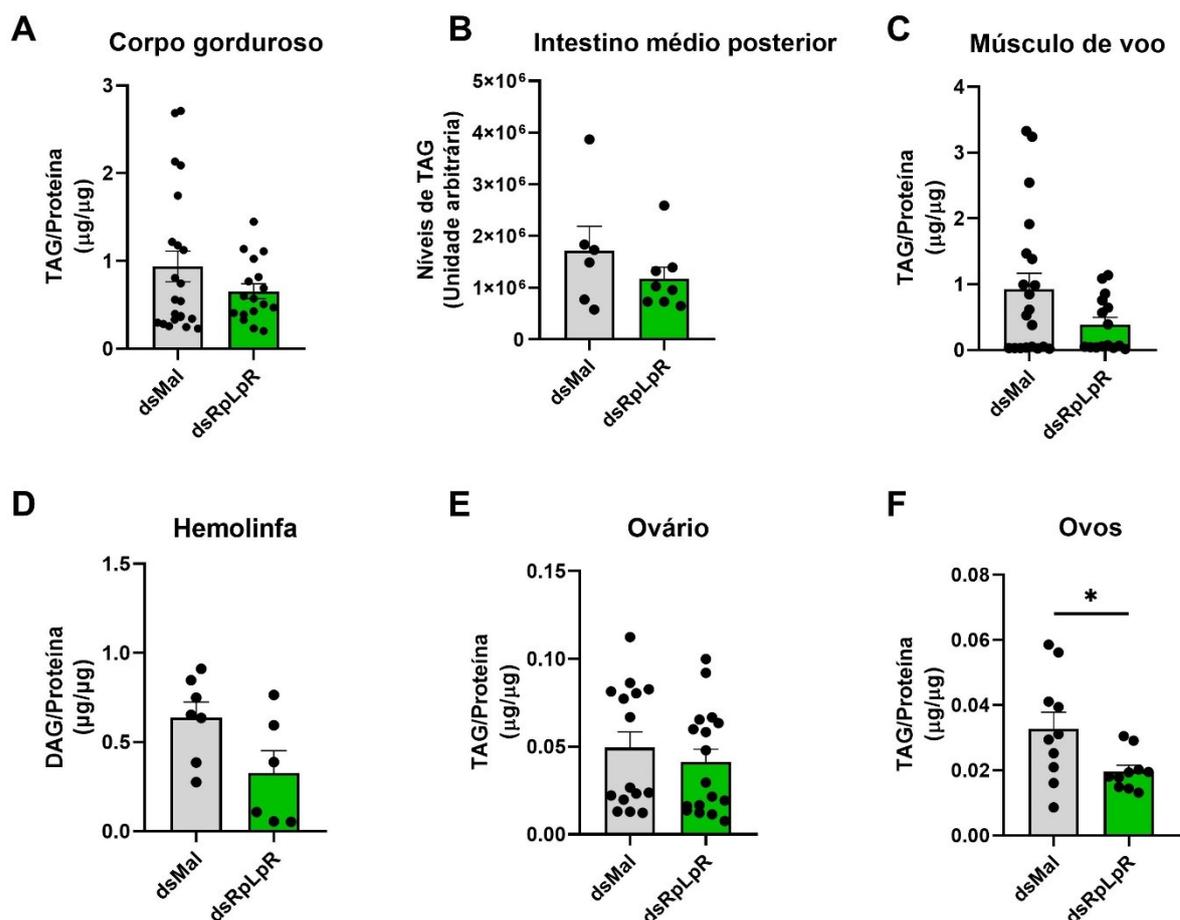
Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e experimental, indicando uma taxa de sobrevivência semelhante, independentemente

da inibição da expressão de *RpLpR*. Ao fim das observações, próximo ao dia 40, praticamente todos os insetos estavam mortos. Sendo assim, apesar da grande importância do LpR para a fisiologia do inseto, a inibição da expressão do gene *RpLpR* não foi capaz de alterar a sobrevivência dos insetos.

3.7. Acúmulo de gordura após a inibição da expressão de *RpLpR*

Levando em consideração a importância do LpR na captação e incorporação de lipídeos, a quantidade de gordura armazenada em diferentes órgãos e em ovos recém-postos, após a inibição da expressão de *RpLpR*, foi avaliada. Para isso, foram analisadas as quantidades de TAG nos ovários, corpo gorduroso, intestino médio posterior, músculo de voo e nos ovos recém-postos pelas fêmeas. Além disso, foram avaliados os níveis de DAG na hemolinfa, uma vez que essa é a forma de lipídeo predominante na circulação do *R. prolixus* (Figura 12).

Figura 12 - Quantidade de acilglicerídeos nos órgãos, hemolinfa e ovos



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para gene *RpLpR* ou *MalE* e alimentadas três dias após a injeção. Os tecidos e a hemolinfa foram obtidos no quarto dia após a alimentação. Já os ovos, foram obtidos 7 dias após a alimentação, logo após a postura. Os níveis de TAG ou DAG foram medidos por método enzimático colorimétrico, e o conteúdo de proteína foi determinado usando o método de Lowry. Os níveis de triacilglicerol (TAG) no intestino médio posterior foram mensurados por cromatografia em camada fina (TLC). As barras representam as médias \pm desvio padrão, e cada ponto representa uma réplica biológica. (A) Corpo gorduroso: $n \geq 17$, Kruskal-Wallis, $p = 0,0389$. (B) Intestino médio posterior: $n \geq 6$, Mann-Whitney, $p = 0,3450$. (C) Músculo de voo: $n \geq 15$, Kruskal-Wallis, $p = 0,3930$. (D) Hemolinfa: $n \geq 6$, teste t não pareado, $p = 0,0618$. (E) Ovário: $n \geq 15$, Kruskal-Wallis, $p = 0,4339$. (F) Ovos: $n \geq 10$, teste t não-pareado, $p = 0,0294$.

Fonte: A autora, 2024.

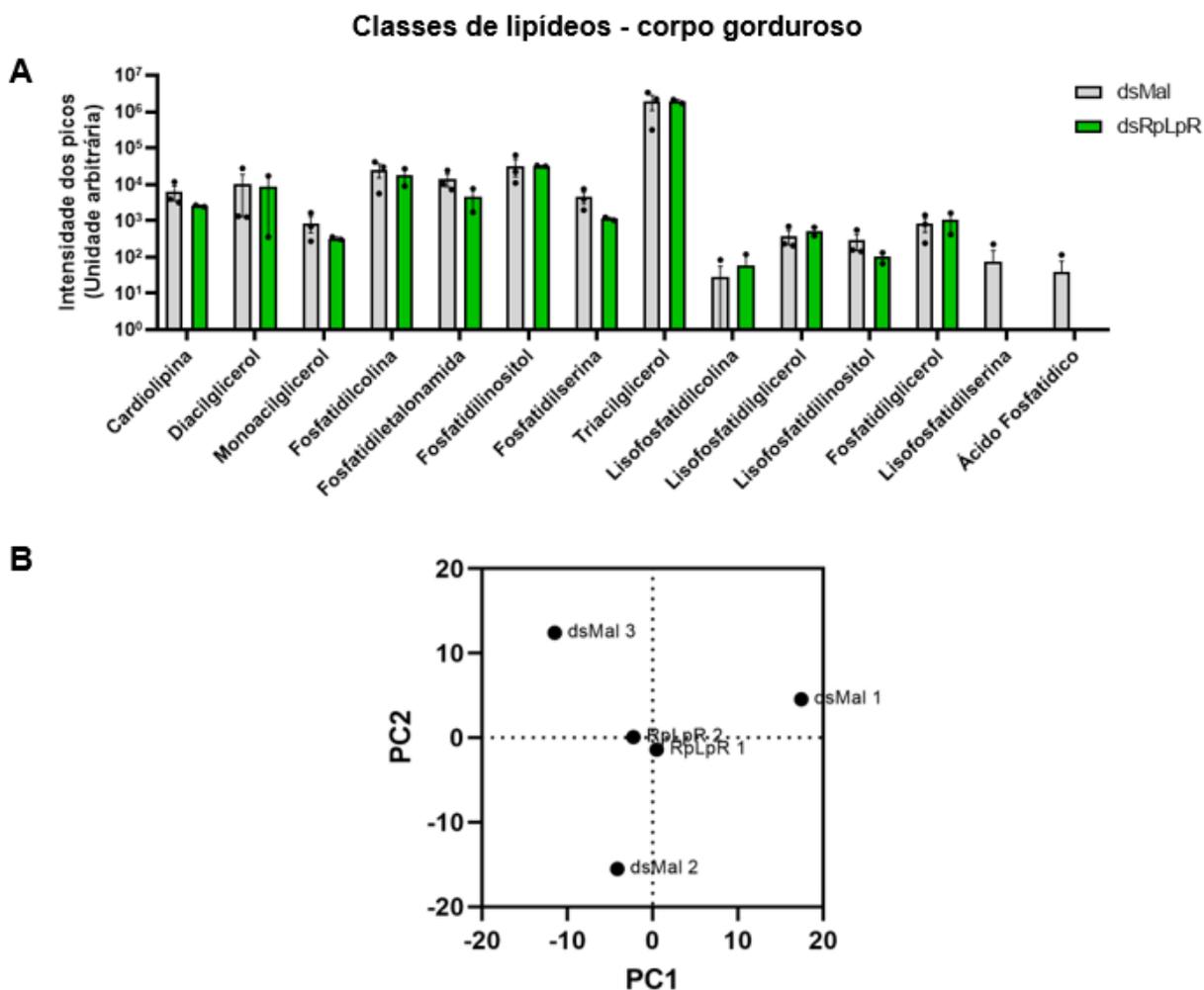
Curiosamente, o silenciamento do gene não foi capaz de alterar significativamente a quantidade de TAG ou DAG em nenhum dos órgãos e na hemolinfa, sugerindo a possibilidade de que mecanismos compensatórios possam estar atuando para manter a homeostase lipídica ou de que o *RpLpR*, sozinho, não seja essencial para regular o armazenamento de lipídeos no *R. prolixus*. Apesar desse

resultado, a inibição de *RpLpR* por RNAi foi capaz de alterar a quantidade de lipídeos em ovos-recém postos por fêmeas silenciadas.

3.8. O efeito da inibição da expressão de *RpLpR* no perfil lipídico em diferentes órgãos

Com o objetivo de compreender se a inibição da expressão de *RpLpR* é capaz de alterar a composição lipídica dos órgãos, as fêmeas foram injetadas com *dsRpLpR* ou *dsMal* e alimentadas três dias depois. Os órgãos foram obtidos quatro dias após a alimentação, submetidos a extração lipídica e, então, analisados por espectrometria de massa.

Na figura 13, o órgão analisado foi o corpo gorduroso, reconhecido por sua alta capacidade em acumular lipídeos que poderão ser utilizados como fonte de energia.

Figura 13 - Perfil lipídico no corpo gorduroso após a inibição da expressão de *RpLpR*

Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para gene *RpLpR* ou *MalE* e alimentadas três dias após a injeção. No quarto dia após a alimentação os corpos gordurosos das fêmeas foram obtidos. As amostras tiveram seus lipídeos extraídos e analisados por espectrometria de massa. (A) Quantidade total das diferentes classes lipídicas encontradas nas amostras de corpo gorduroso. As barras representam as médias ± desvio padrão, e cada ponto representa uma réplica biológica. $n \geq 2$. Mann-Whitney, $p > 0,05$. (B) PCA - Análise de principal componente. Cada ponto representa uma amostra: *dsMal* amostras 1, 2 e 3 ou *dsRpLpR* amostras 1 e 2.

Fonte: A autora, 2024.

A figura 13-A apresenta as classes lipídicas e as respectivas quantidades encontradas neste tecido. Nos insetos controle (*dsMal*), foram identificadas: cardiolipina, DAG, monoacilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidiletalonamida, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, TAG, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilglicerol, lisofosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, lisofosfatidilserina e ácido fosfatídico. Por outro lado, nos insetos cuja expressão de LpR foi inibida apenas duas das classes mencionadas não foram encontradas: a lisofosfatidilserina e o ácido fosfatídico. No

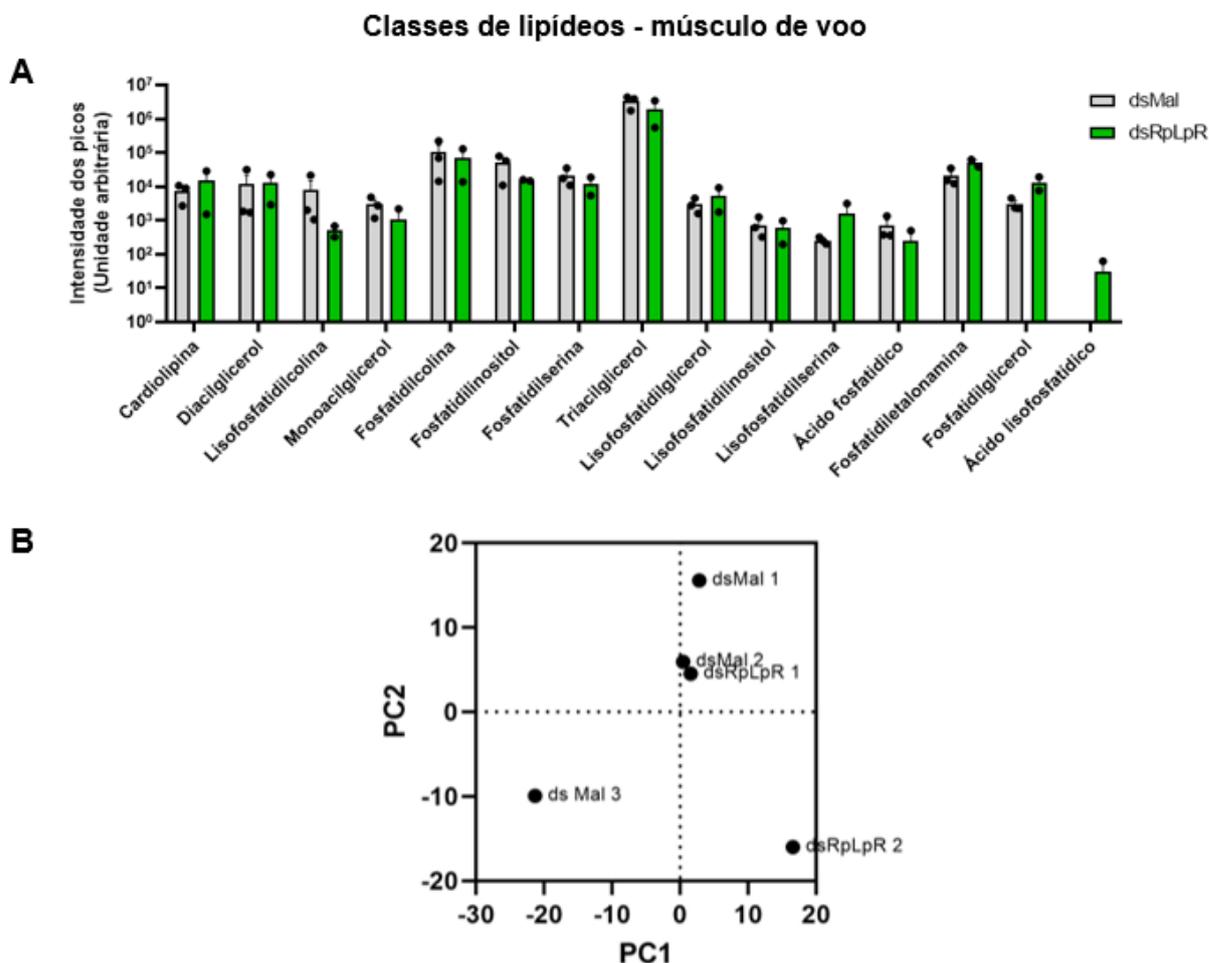
entanto, não houve diferença estatística quando comparado com o controle. Por fim, como esperado, o TAG apareceu como a classe lipídica mais abundante neste órgão.

Já a figura 13-B traz uma análise de componentes principais, que permite avaliar a variabilidade entre as amostras analisadas. O resultado indica que, de maneira geral, não há uma variação significativa entre os grupos *dsMal* e *dsRpLpR*. Sendo assim, não é possível afirmar que a inibição da expressão de *RpLpR* por RNAi leve a uma diferença no perfil lipidômico geral no corpo gorduroso do barbeiro.

Na figura 14-A são apresentadas as classes lipídicas e suas respectivas quantidades encontradas no músculo de voo, órgão responsável pela movimentação das asas. Nos insetos controle (*dsMal*), foram identificadas as seguintes classes: cardiopina, DAG, lisofosfatidilcolina, monoacilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, TAG, lisofosfatidilglicerol, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidiletalona, fosfatidilglicerol. Já nos insetos em que o LpR teve sua expressão inibida, as mesmas classes do grupo controle foram identificadas, com a adição do ácido lisofosfatídico. Apesar desse resultado, não houve diferença estatística entre os dois tratamentos.

Assim como no corpo gorduroso, o TAG apareceu como a classe lipídica mais abundante no músculo de voo. Esse é um resultado esperado, já que o tecido precisa armazenar lipídeos para fornecer energia necessária para o movimento das asas.

A figura 14-B traz a análise de componentes principais. Assim como no corpo gorduroso, não há uma variação significativa no músculo de voo entre os grupos *dsMal* e *dsRpLpR*. Sendo assim, não é possível afirmar que a inibição da expressão de *RpLpR* por RNAi leve a uma diferença no perfil lipidômico geral no músculo de voo do barbeiro.

Figura 14 - Perfil lipídico no músculo de voo após a inibição da expressão de *RpLpR*

Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para gene *RpLpR* ou *MalE* e alimentadas três dias após a injeção. No quarto dia após a alimentação os músculos de voo das fêmeas foram obtidos. As amostras tiveram seus lipídeos extraídos e analisados por espectrometria de massa. (A) Quantidade total das diferentes classes lipídicas encontradas nas amostras de músculo de voo. As barras representam as médias \pm desvio padrão, e cada ponto representa uma réplica biológica. $n \geq 2$. Mann-Whitney, $p > 0,05$. (B) PCA - Análise de principal componente. Cada ponto representa uma amostra: *dsMal* amostras 1, 2 e 3 ou *dsRpLpR* amostras 1 e 2.

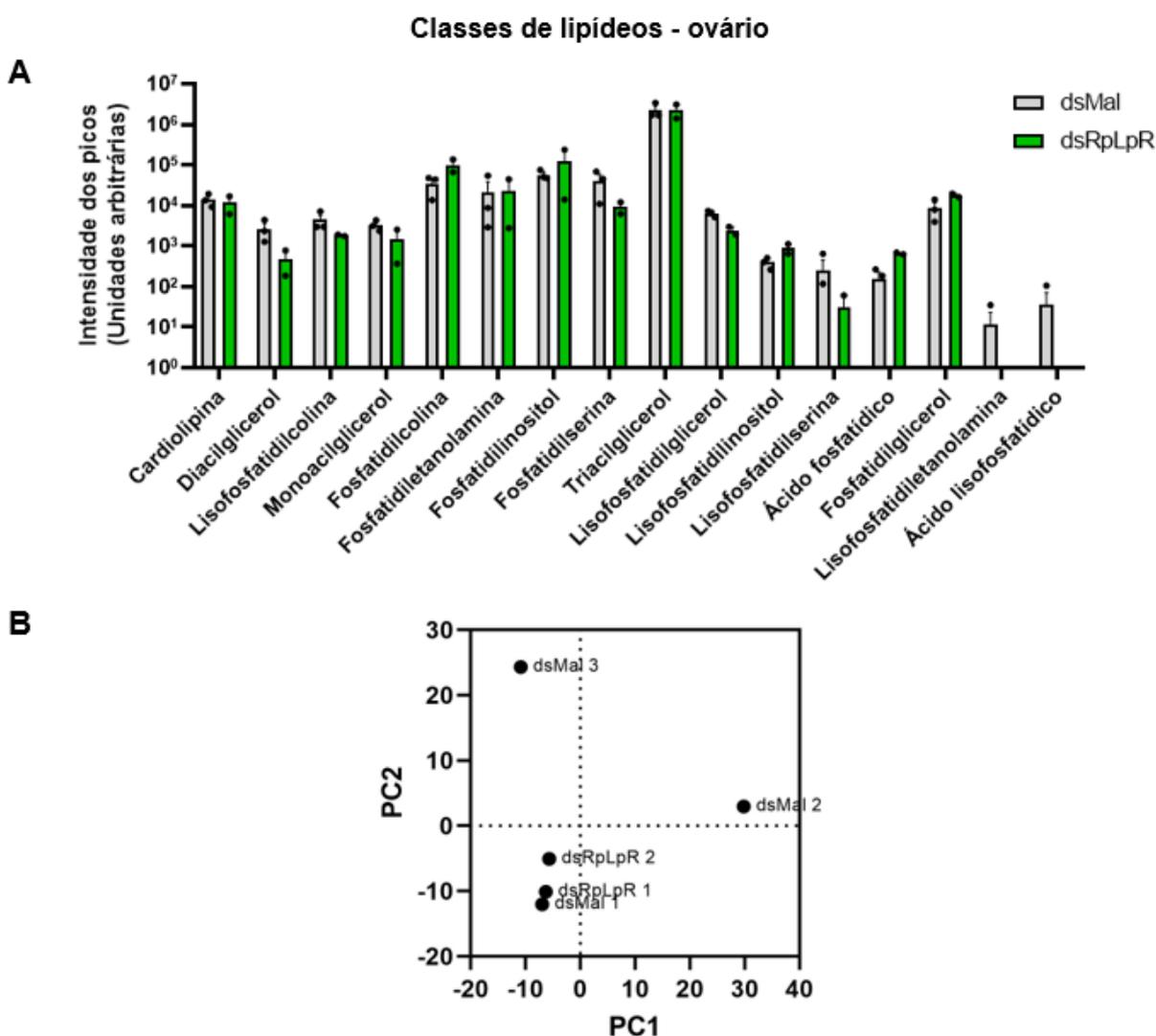
Fonte: A autora, 2024.

Na figura 15-A são apresentadas as classes lipídicas e suas respectivas quantidades encontradas nos ovários, órgão responsável pela reprodução em fêmeas de *R. prolixus*. Nos insetos controle (*dsMal*), foram identificadas as seguintes classes: cardioplipina, DAG, lisofosfatidilcolina, monoacilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, TAG, lisofosfatidilglicerol, lisofosfatidillinositol, lisofosfatidilserina, ácido fosfatídico, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e ácido lisofosfatídico. Já nos insetos em que o receptor de lipoforina

foi silenciado, as mesmas classes do grupo controle foram identificadas, com a exceção da lisofosfatidiletanolamina e do ácido lisofosfatídico. Apesar desse resultado, não houve diferença estatística entre os dois tratamentos.

Assim como no corpo gorduroso e músculo de voo, o TAG apareceu como a classe lipídica mais abundante nos ovários. Esse é um resultado esperado, já que o tecido precisa armazenar lipídeos para o desenvolvimento e maturação dos ovos.

Figura 15 - Perfil lipídico nos ovários após a inibição da expressão de *RpLpR*



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para gene *RpLpR* ou *MalE* e alimentadas três dias após a injeção. No quarto dia após a alimentação os ovários foram obtidos. As amostras tiveram seus lipídeos extraídos e analisados por espectrometria de massa. (A) Quantidade total das diferentes classes lipídicas encontradas nas amostras de ovários. As barras representam as médias \pm desvio padrão, e cada ponto representa uma réplica biológica. $n \geq 2$. Mann-Whitney, $p > 0,05$. (B) PCA - Análise de principal componente. Cada ponto representa uma amostra: *dsMal* amostras 1, 2 e 3 ou *dsRpLpR* amostras 1 e 2.

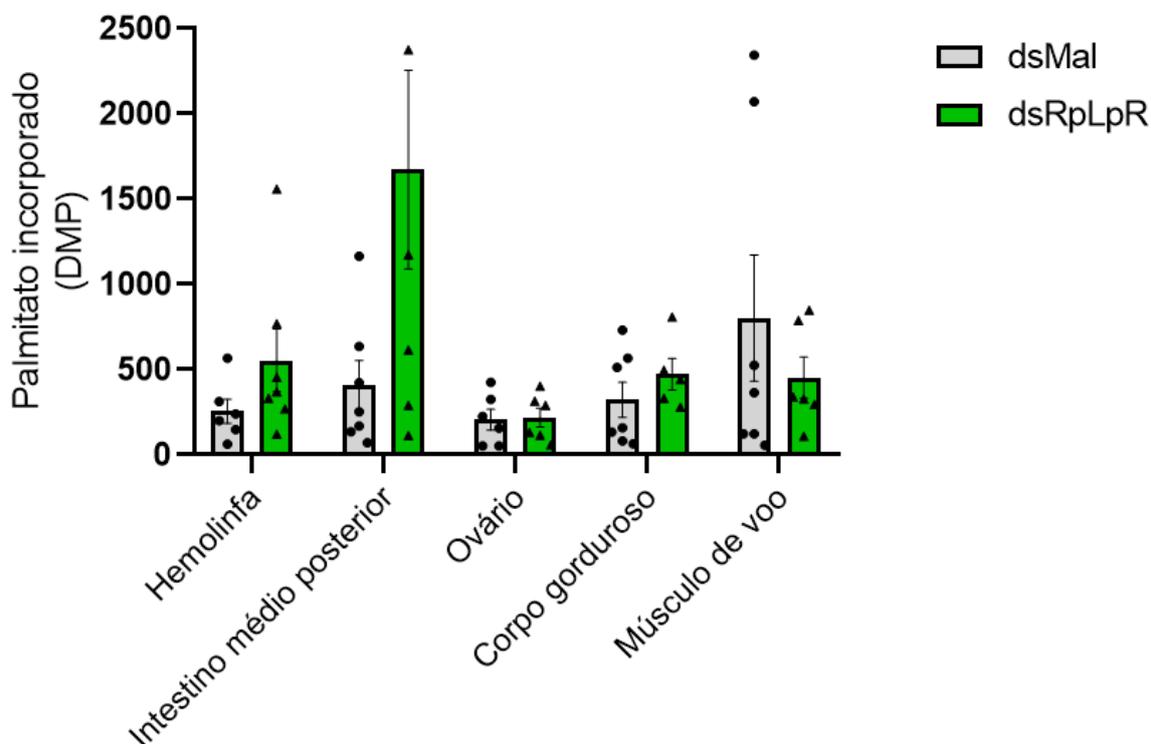
Fonte: A autora, 2024.

A figura 15-B traz a análise de componentes principais. Assim como no corpo gorduroso e no músculo de voo, não há uma variação significativa nos ovários entre os grupos *dsMal* e *dsRpLpR*. Sendo assim, não podemos afirmar que a inibição da expressão de *RpLpR* por RNAi leve a uma diferença no perfil lipidômico geral no ovário das fêmeas de *R. prolixus*.

3.9. O efeito da inibição da expressão de *RpLpR* na incorporação de palmitato pelos órgãos

Com o objetivo de avaliar a capacidade da lipoforina em transferir lipídeos para os órgãos, em insetos onde o gene *RpLpR* teve sua expressão inibida, um ácido graxo marcado radioativamente (^3H -palmitato) foi injetado na hemocele do inseto (Figura 16).

Este experimento foi realizado com base na observação prévia de que os ácidos graxos são rapidamente incorporados e associados às partículas de lipoforina presentes na hemolinfa (ATELLA *et al.*, 2000).

Figura 16 - Incorporação de ^3H -palmitato

Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 μg de dsRNA para *RpLpR* ou *MalE* (controle) e três dias depois foram alimentadas. No quarto dia após a alimentação, as fêmeas receberam uma injeção com ^3H -palmitato. Duas horas depois da injeção a hemolinfa foi coletada, os insetos foram dissecados, o ovário, intestino médio posterior, músculo de voo e corpo gorduroso foram obtidos. A radioatividade presente nos lipídeos foi determinada. $n \geq 3$. As barras representam as médias \pm erro padrão, e cada ponto representa uma replicata biológica. Teste t não pareado com correção de Welch, Hemolinfa: $p = 0,0014$; intestino: $p = 0,5839$; ovário: $p = 0,0310$; corpo gorduroso: $p = 0,3784$; músculo de voo: $p = 0,2207$.

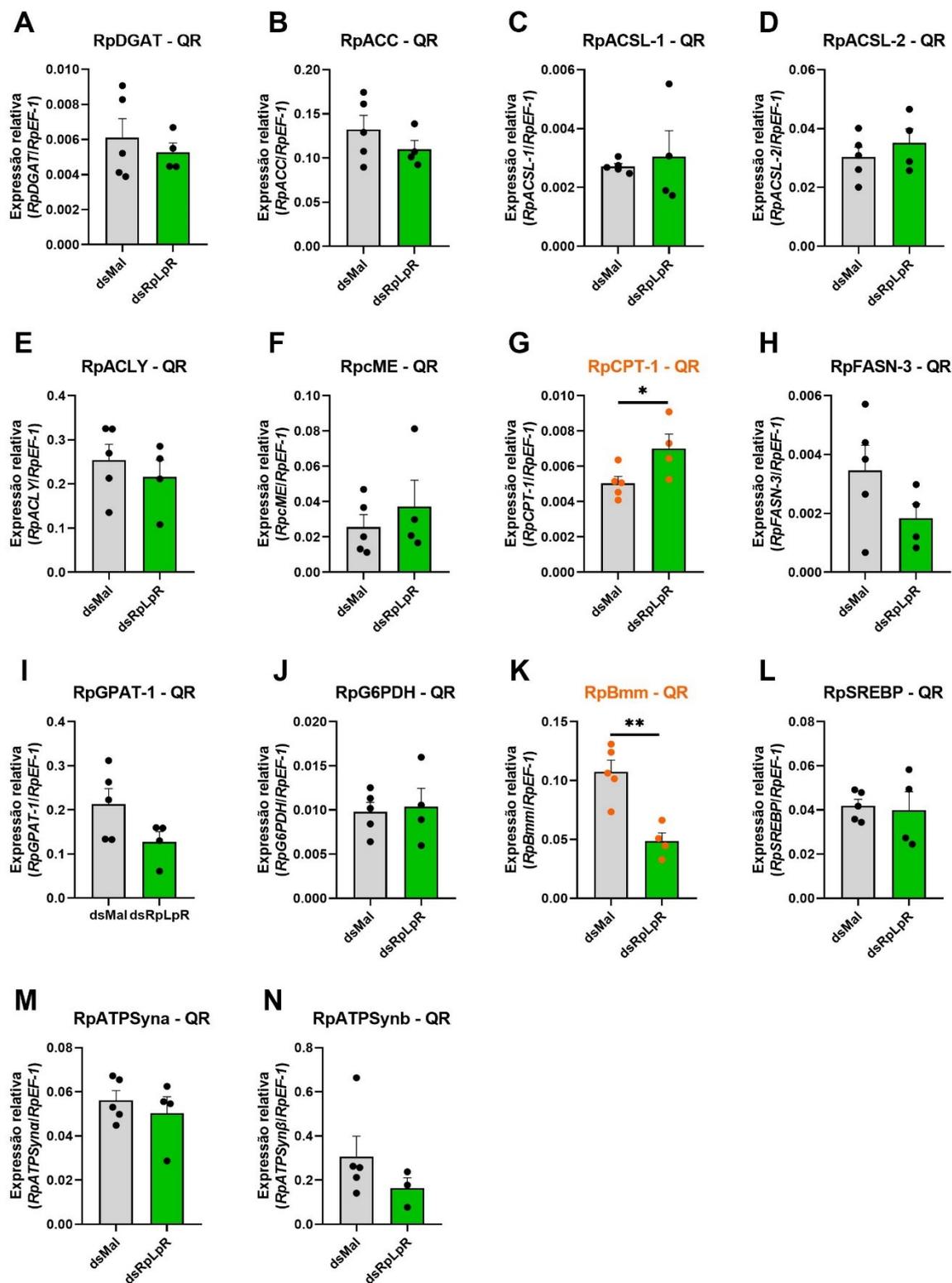
Fonte: A autora, 2024.

Curiosamente, não foram observadas diferenças significativas na incorporação de palmitato entre os insetos controle (*dsMal*) e os que tiveram o *RpLpR* com expressão inibida. Este fato ocorreu em todos os órgãos analisados e na hemolinfa.

Os resultados indicam que a inibição da expressão do LpR por RNAi não afeta a capacidade da lipoforina em entregar lipídeos para os órgãos do barbeiro.

3.10. Expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, após a inibição da expressão de *RpLpR*

Para avaliar a influência da inibição da expressão de *RpLpR* na expressão de alguns genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, fêmeas foram injetadas com *dsRpLpR* ou *dsMal* e alimentadas três dias depois. Os órgãos foram obtidos quatro dias após a alimentação, submetidos a análise de PCR quantitativo. Foram avaliados os níveis de expressão dos seguintes genes: *RpDGAT* (DAG aciltransferase), *RpACC* (acetil-CoA carboxilase), *RpACSL-1* (acil-CoA sintetase-1), *RpACSL-2* (acil-CoA sintetase-2), *RpACLY* (ATP citrato liase), *RpcME* (enzima málica citoplasmática), *RpCPT-1* (carnitina palmitoiltransferase 1), *RpFASN-3* (ácido graxo sintase-3), *RpGPAT-1* (glicerol 3-fosfato aciltransferase 1), *RpG6PDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *RpBmm* (lipase Brummer), *RpSREBP* (proteína ligadora de elementos de resposta a esteróis), *RpATPSyn α* (subunidade alfa da ATP sintase) e *RpATPSyn β* (subunidade beta da ATP sintase) (Figura 17).

Figura 17 - Expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos de *R. prolixus*.

Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 μ g de *dsRpLpR* e *dsMal*, alimentadas três dias após a injeção e dissecadas quatro dias após a alimentação. O corpo gorduroso foi obtido e homogeneizado em TRI Reagent. O RNA total foi extraído, tratado com DNase I e utilizado como molde para síntese de cDNA. A expressão gênica foi medida por PCR quantitativo usando iniciadores específicos. A expressão do gene *RpEF-1* foi usada como controle

endógeno (MAJEROWICZ *et al.*, 2011). As barras representam as médias \pm erro padrão, e cada ponto representa uma replicata biológica $n \geq 4$, teste *t* não pareado. **(A) RpDGAT** - DAG aciltransferase: $p = 0,6574$. **(B) RpACC** - Acetil-CoA carboxilase: $p = 0,3293$. **(C) RpACSL-1** - Acil-CoA sintetase-1: $p = 0,9748$. **(D) RpACSL-2** - Acil-CoA sintetase-2: $p = 0,4433$. **(E) RpACLY** - ATP citrato liase: $p = 0,5305$. **(F) RpcME**: $p = 0,4925$. **(G) RpCPT-1** - Carnitina palmitoiltransferase 1: $p = 0,0429$. **(H) RpFASN-3** - Sintase de ácido graxo-3: $p = 0,3081$. **(I) RpGPAT-1** - Glicerol 3-fosfato aciltransferase 1: $p = 0,1070$. **(J) RpG6PDH** - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase: $p = 0,9211$. **(K) RpBmm** - Lipase Brummer: $p = 0,0023$. **(L) RpSREBP** - Fator de transcrição de ligação a elementos regulatórios de esterol: $p = 0,8199$. **(M) RpATPSyn α** - Subunidade alfa da ATP sintase: $p = 0,4670$. **(N) RpATPSyn β** - Subunidade beta da ATP sintase: $p = 0,2120$.

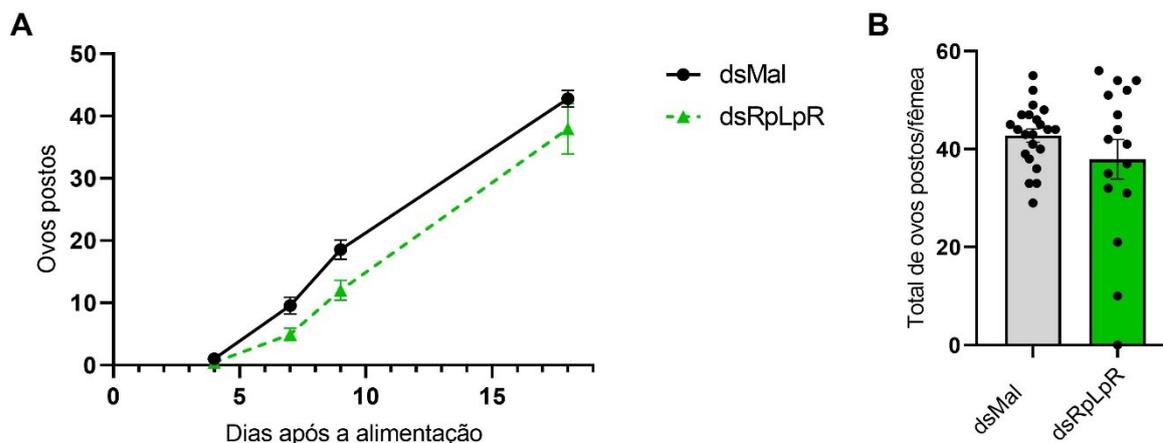
Fonte: A autora, 2024.

A inibição da expressão de *RpLpR* por RNAi alterou de maneira significativa a expressão de dois genes envolvidos no metabolismo de lipídeos dos insetos. Foi observada uma diminuição na expressão da *RpBmm*, uma enzima envolvida no processo de lipólise e, em contrapartida, houve um aumento da expressão de *RpCPT-1*, enzima envolvida na etapa limitante da β -oxidação de ácidos graxos.

3.11. Efeito da inibição da expressão de *RpLpR* na fertilidade das fêmeas

Para avaliar o efeito da inibição da expressão de *RpLpR* na fertilidade das fêmeas, os insetos, em jejum, foram injetados com *dsRpLpR* ou *dsMal* e alimentados três dias depois. Em seguida, as fêmeas foram separadas individualmente e a quantidade de ovos postos foi contada manualmente ao longo de 18 dias (Figura 18).

Figura 18 - Ovoposição após o a inibição da expressão de *RpLpR*.



Legenda: Fêmeas foram injetadas com 0,1 μ g de *dsRpLpR* ou *dsMal* e alimentadas três dias depois. Em seguida, foram isoladas individualmente em frascos de vidro. Os ovos postos foram coletados e contabilizados por 18 dias. (A) Total de ovos postos por grupo ao longo dos dias. Os símbolos representam as médias \pm desvio padrão. $n \geq 16$. ANOVA de duas vias, Interação: $p = 0,3435$; Dias: $p < 0,0001$; dsRNA: $p = 0,0446$. (B) Total de ovos postos por fêmea ao final dos 18 dias. $n \geq 16$. As barras representam as médias \pm erro padrão, e cada ponto representa uma réplica biológica. Teste t não pareado, $p = 0,2102$.

Fonte: A autora, 2024.

Na figura 18-A, o gráfico mostra a quantidade de ovos postos pelas fêmeas de cada grupo (*dsMal* ou *dsRpLpR*) ao longo de 18 dias após a alimentação. Como resultado, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos.

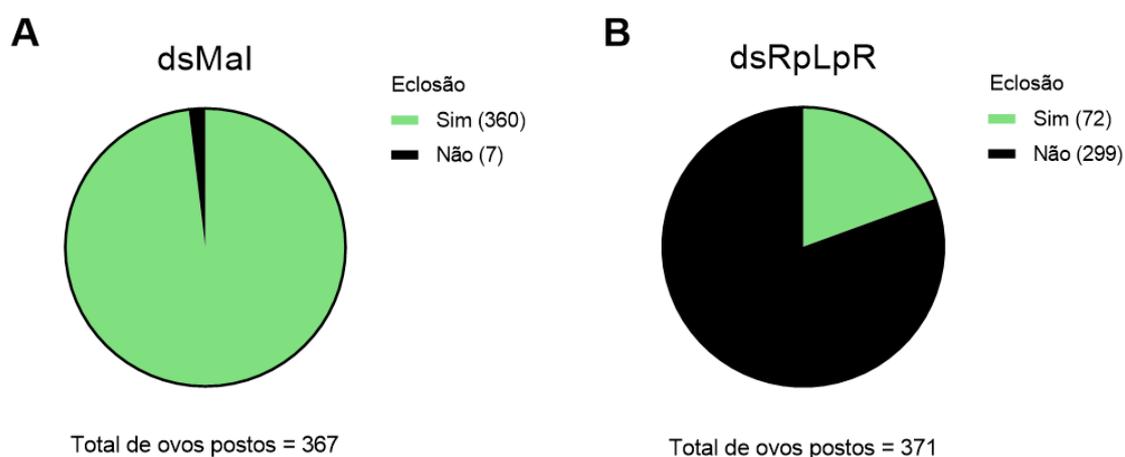
Já a figura 18-B mostra o total de ovos postos pelas fêmeas de cada grupo ao final da contagem. Assim como não houve diferença na quantidade de ovos postos ao longo dos dias, também não houve uma variação significativa na quantidade de ovos postos por fêmeas de cada grupo, mostrando que a inibição da expressão de *RpLpR* por RNAi não tem impacto significativo na quantidade de ovos postos.

3.12. Efeito da inibição da expressão de *RpLpR* na viabilidade dos ovos postos pelas fêmeas

Apesar de não existir diferença significativa na quantidade de ovos postos pelas fêmeas após o tratamento com *dsRpLpR*, foi observado que os ovos depositados por essas mesmas fêmeas exibiram um fenótipo anormal se comparados

com os ovos provenientes de fêmeas controle. Dessa maneira, foi avaliada a taxa de eclosão dos ovos provenientes de fêmeas tratadas com dsRNA. Para isso, ovos recém postos foram coletados, mantidos em frascos separados em colônia a 28 °C e analisados 15 dias após a data de postura (Figura 19).

Figura 19 - Efeito da inibição de *RpLpR* na eclosão dos ovos



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de (A) *dsMal* ou (B) *RpLpR*, alimentadas três dias após a injeção e isoladas individualmente. A eclosão de ovos foi calculada subtraindo o número de ninfas de primeiro estágio eclodidas do número de ovos postos pela fêmea. A contagem foi realizada 15 dias após a data de postura dos ovos. n = 371, Teste binomial, $p < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2024.

Conforme apresentado na Figura 19-B, de um total de 371 ovos postos por fêmeas silenciadas para *RpLpR*, apenas 72 eclodiram, representando uma taxa de eclosão de aproximadamente 19 %. Já as fêmeas tratadas com *dsMal*, depositaram 367 ovos, dos quais 360 eclodiram, cerca de 98 %.

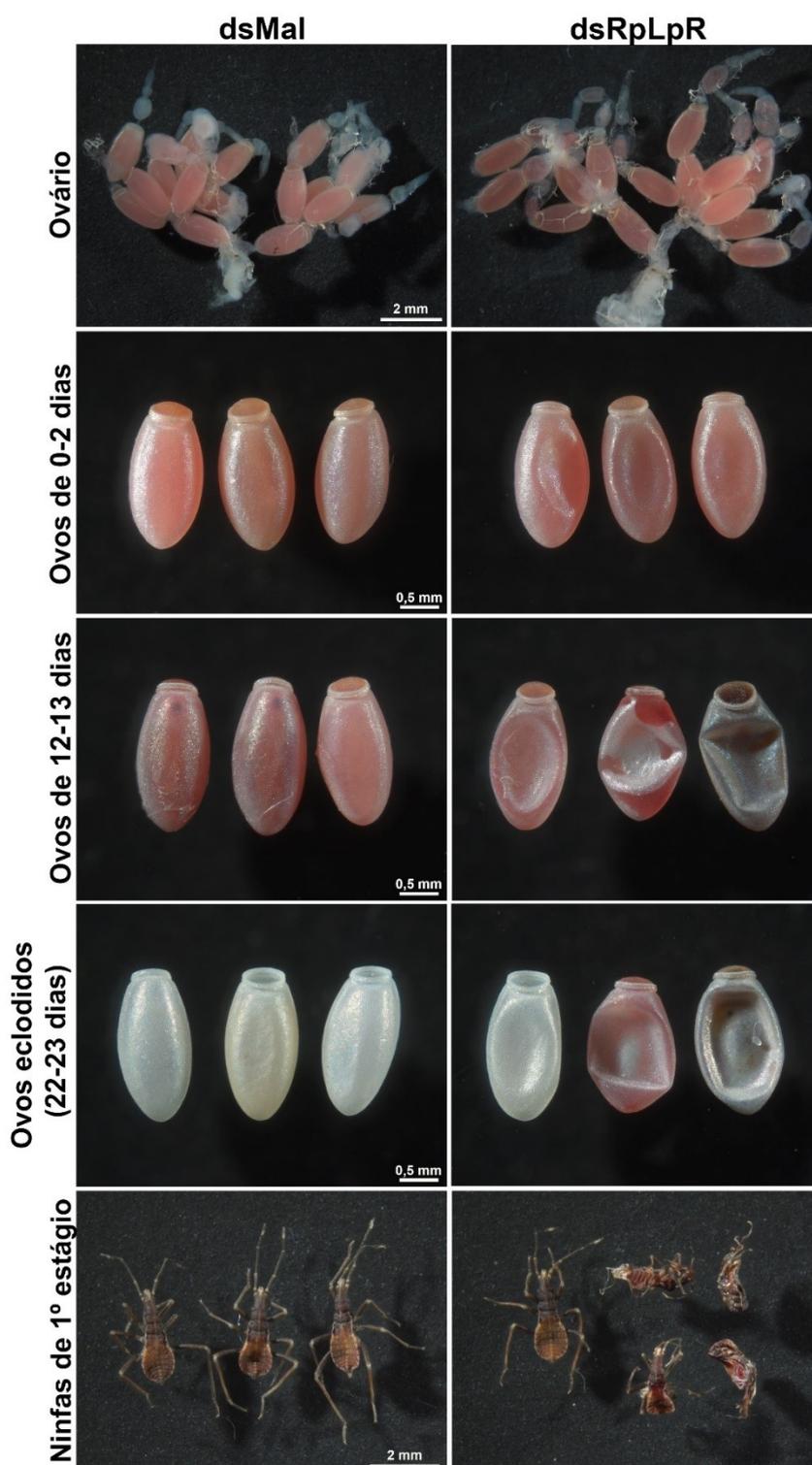
Estes resultados indicam uma diferença substancial na taxa de eclosão entre os ovos provenientes de fêmeas cuja expressão de *RpLpR* foi inibida e as fêmeas do grupo controle, destacando a importância do LpR na viabilidade dos ovos e, conseqüentemente, na reprodução desses insetos.

3.13. Morfologia dos ovários, ovos e ninfas de fêmeas após a inibição de *RpLpR*

Fêmeas tratadas com dsMal ou dsRpLpR foram distribuídas em grupos nos quais algumas tiveram seus ovários dissecados e fotografados, enquanto outras foram mantidas em frascos para ovoposição. Os ovos recém-postos foram então separados e fotografados em três intervalos de tempo: 0-2 dias, 12-13 dias e 22-23 dias após a postura. As ninfas que eclodiram desses ovos também foram fotografadas.

A segunda coluna da figura 20 revela os fenótipos encontrados nos ovos depositados pelas fêmeas cuja expressão de *RpLpR* foi inibida. Esses ovos apresentaram deformações na casca (0-2 dias) que se agravavam ao longo do tempo (12-13 dias). Alguns outros ovos também apresentaram uma coloração amarronzada com o passar dos dias. Além disso, próximo ao dia 22-23 que é considerada uma data pós-eclosão, as poucas ninfas de 1º estágio que conseguiram eclodir apresentaram uma deformidade severa que inviabilizava sua sobrevivência.

Figura 20 - Imagens dos ovários, ovos e ninfas geradas de fêmeas cuja expressão de *RpLpR* foi inibida



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para *RpLpR* ou *Mal* (controle) e três dias depois foram alimentadas. Os ovos recém-postos (0-24h) foram coletados 7 dias após a alimentação e avaliados durante 23 dias, as ninfas resultantes desses ovos também foram avaliadas. Barra de escala: ovários (2 mm), ovos (0,5 mm) e ninfas (2 mm).

Fonte: A autora, 2024.

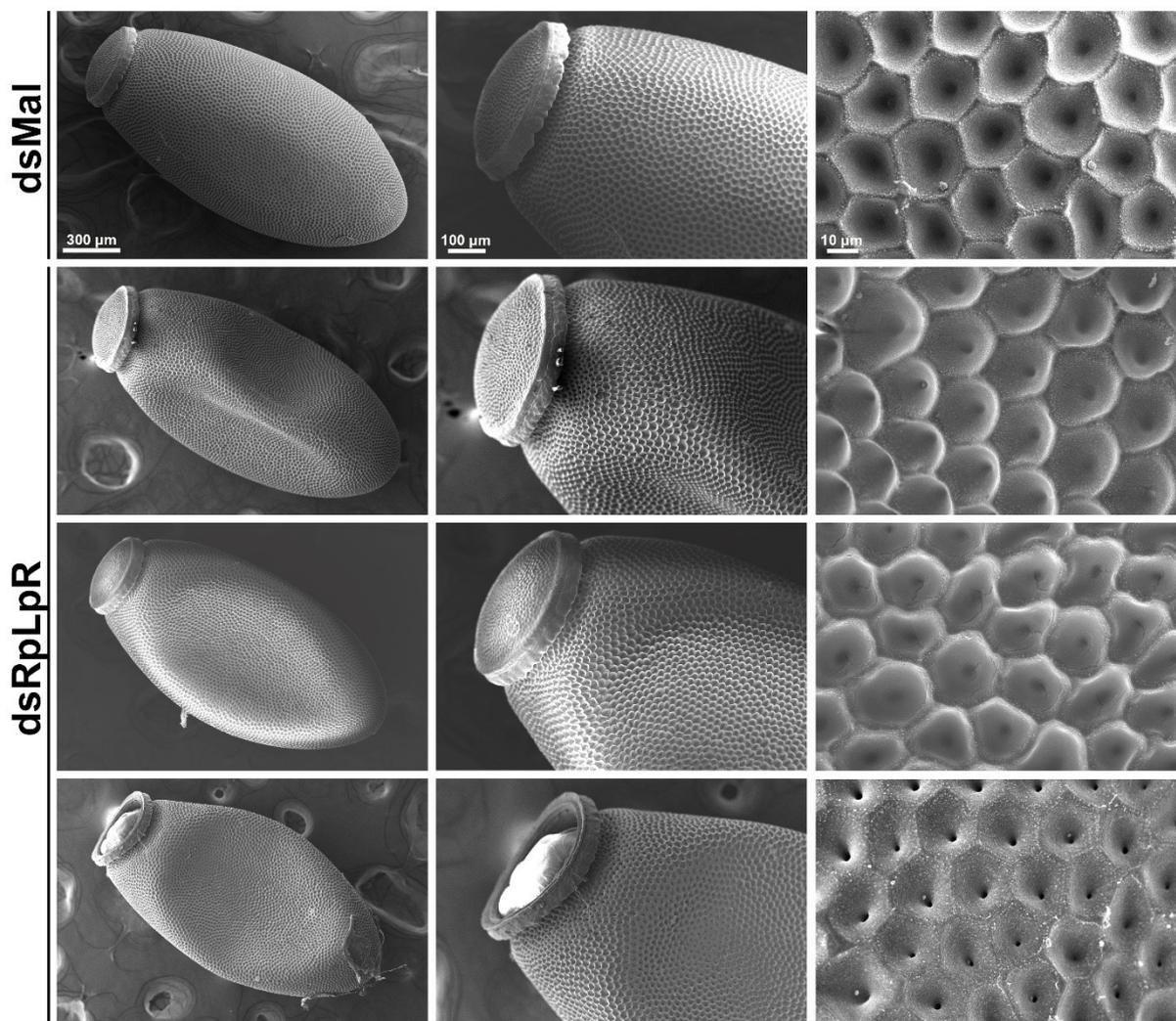
Em contrapartida, os ovos provenientes das fêmeas do grupo controle, como mostrado na primeira coluna da figura 20, exibiram uma morfologia normal e conseguiram eclodir antes do período de 22-23. A maioria das ninfas também sobreviveram e apresentaram um aspecto saudável.

Esses achados reforçam a importância do LpR para a viabilidade dos ovos e no desenvolvimento embrionário do barbeiro.

Devido aos fenótipos encontrados nos ovos postos por fêmeas cuja expressão de *RpLpR* foi inibida, a ultraestrutura do córion (casca do ovo) foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 21).

Foram encontradas distorções nos padrões hexagonais das células do epitélio folicular, além de pequenas rachaduras na estrutura. Um dos ovos analisados foi encontrado sem o opérculo, local por onde as ninfas emergem durante a eclosão.

Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura em ovos recém-postos por fêmeas *RpLpR/RNAi*



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para *RpLpR* ou *Mal* (controle) e três dias depois foram alimentadas. Os ovos recém-postos (0-24h) foram coletados 7 dias após a alimentação. As amostras foram processadas e analisadas por microscopia eletrônica de varredura, na qual a ultraestrutura da superfície foi examinada.

Fonte: A autora, 2024.

As análises por MEV mostraram que a inibição da expressão do receptor de lipoforina causou modificações na ultraestrutura do córion, quando comparadas ao controle. No entanto, essas alterações foram diversificadas e não seguiram um padrão específico.

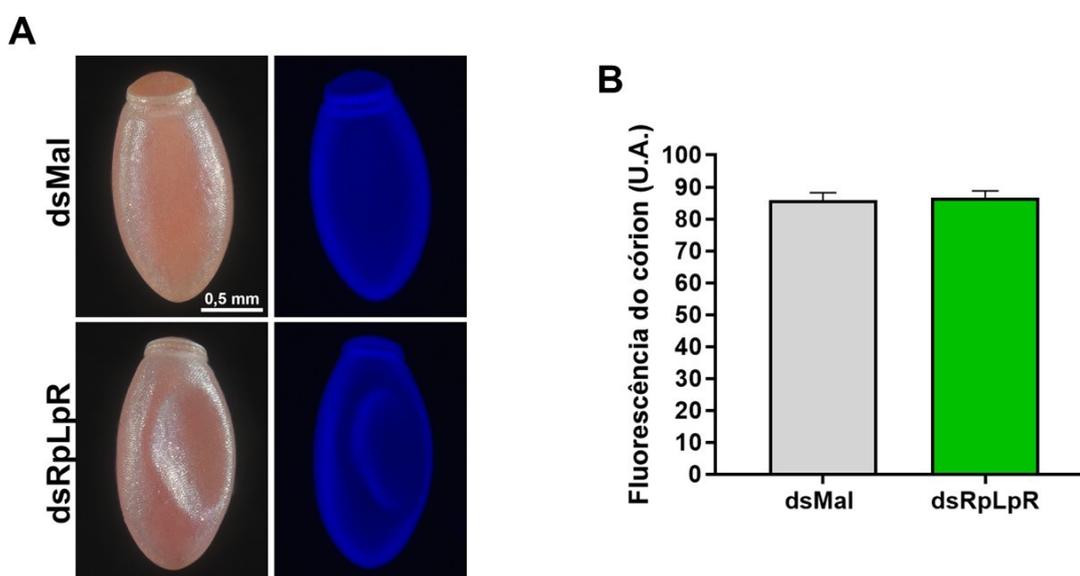
Essas diferenças destacam o impacto da inibição da expressão do gene na morfologia e integridade da estrutura correta do córion, essencial para a proteção e desenvolvimento embrionário nos ovos de *R. prolixus*.

3.14. Análise de ditirosina fluorescente de ovos postos por fêmeas após a inibição de *RpLpR*

Devido ao fenótipo colabado encontrado nas cascas dos ovos postos pelas fêmeas, foi investigado se a inibição da expressão de *RpLpR* estava afetando o *crosslinking* proteico.

Em *R. prolixus*, o endurecimento da casca do ovo está diretamente relacionado ao *crosslinking* de proteínas, que ocorre em resíduos de tirosina, formando a ditirosina, fluorescente sob a luz U.V. (DIAS *et al.*, 2013). Dessa forma, os níveis de fluorescência de ditirosina foram medidos em ovos postos por fêmeas tratadas com *dsMal* ou *dsRpLpR* (Figura 22).

Figura 22 - Fluorescência de ditirosina em ovos recém-postos por fêmeas *RpLpR/RNAi*



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de dsRNA para *Mal* (controle) ou *RpLpR* e alimentadas três dias depois. Os ovos recém-postos (0-24h) foram coletados 7 dias após a alimentação. (A) Fluorescência de ditirosina nos ovos (imagens representativas). (B) Quantificação dos níveis de fluorescência do córion através do software *ImageJ*. $n \geq 9$. As barras representam as médias \pm desvio padrão. teste *t* não pareado, $p = 0,8375$.

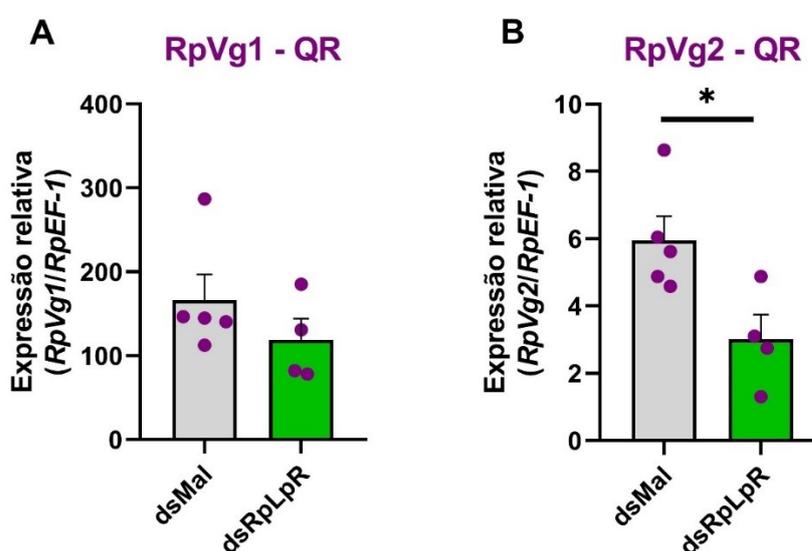
Fonte: A autora, 2024.

Apesar das alterações morfológicas observadas nos resultados anteriores, não houve diferença significativa no *crosslinking* de proteínas responsáveis pela formação e endurecimento da casca do ovo, de acordo com os níveis de ditirosina obtidos entre os dois grupos (*dsMal* e *dsRpLpR*), demonstrado na figura 22-B.

3.15. Expressão de genes das vitelogeninas, após a inibição da expressão de *RpLpR*

A Vitelogenina (Vg) é uma proteína responsável pela formação e maturação dos ovos. Em *R. prolixus*, dois genes de Vg estão presentes no genoma: o *RpVg1* e o *RpVg2* (LEYRIA *et al.*, 2020). Diante disso, foi avaliado por meio de PCR quantitativo se a inibição da expressão do LpR seria capaz de interferir na expressão de *RpVg1* ou *RpVg2* no corpo gorduroso das fêmeas.

Figura 23 - Expressão dos genes *RpVg1* e *RpVg2* após a inibição da expressão do LpR



Legenda: Fêmeas adultas foram injetadas com 0,1 µg de *dsRpLpR* e *dsMal*, alimentadas três dias após a injeção e dissecadas quatro dias após a alimentação. Os corpos gordurosos foram obtidos e homogeneizados em TRI Reagent. O RNA total foi extraído, tratado com DNase I e utilizado como molde para síntese de cDNA. A expressão gênica foi medida por PCR quantitativo usando iniciadores específicos. A expressão do gene *RpEF-1* foi usada como controle endógeno (MAJEROWICZ *et al.*, 2011). As barras representam as médias ± erro padrão, e cada ponto representa uma réplica biológica. n ≥ 4, teste *t*. **(A) *RpVg1*** - Vitelogenina 1: *p* = 0,2181; **(B) *RpVg2*** - Vitelogenina 2: *p* = 0,0265.

Fonte: A autora, 2024.

Os resultados mostraram que a inibição da expressão de *RpLpR* por RNAi não foi capaz de alterar significativamente a expressão de *RpVg1* no corpo gorduroso da fêmea. No entanto, a figura 23-B mostra que houve uma redução significativa na expressão de *RpVg2* em fêmeas cuja expressão foi inibida, demonstrando a relação do LpR com a expressão de vitelogenina no corpo gorduroso.

4 DISCUSSÃO

A análise da expressão de *RpLpR* revelou sua presença em todos os órgãos do barbeiro, no entanto, a expressão do receptor variou significativamente. Essas diferenças reforçam a importância funcional do *RpLpR* em órgãos específicos. Dessa forma, a alta expressão nos ovários sugere a importância do receptor nesse órgão, com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento dos ovos, enquanto a expressão aumentada no músculo de voo pode estar relacionada à captação de lipídeos para fornecer energia durante o voo. Por outro lado, a baixa expressão no corpo gorduroso surpreende, considerando que, no quarto dia após a alimentação este tecido deveria estar captando mais lipídeos. Analisamos, então, a expressão de *RpLpR* em diferentes dias após a alimentação no corpo gorduroso. Observamos uma queda significativa na expressão do gene poucos dias após a alimentação. Este resultado ocorreu de forma contrária às nossas expectativas, pois, segundo Pontes *et al*, 2008, no quarto dia após a alimentação ocorre um aumento considerável nos níveis de TAG no corpo gorduroso, seguida por uma diminuição progressiva ao longo dos dias. Dessa forma, esperávamos que *RpLpR* acompanhasse a mesma tendência já observada na quantidade de TAG, com uma maior expressão dias após a alimentação para captar lipídeos da lipoforina, seguida de uma redução gradual devido à diminuição de lipídeos provenientes do intestino. Esse resultado reforça a hipótese de que talvez o receptor de lipoforina não esteja atuando de forma exclusiva no recebimento de lipídeos vindos do intestino após a alimentação. Talvez, o aumento gradual na expressão de *RpLpR*, ao longo dos dias, possa ser atribuído à ideia de que o receptor possa ter um papel mais significativo na transferência dos lipídeos do corpo gorduroso para outros órgãos do que no recebimento em si.

Estudos recentes em *R. prolixus*, envolvendo a técnica de RNAi, utilizaram uma quantidade de 1 µg/µl de dsRNA para alcançar uma inibição eficaz na expressão do gene alvo (ARÊDES *et al.*, 2024; FINETTI *et al.*, 2023; PEREIRA *et al.*, 2023). Entretanto, neste estudo, conseguimos inibir consideravelmente a expressão do receptor de lipoforina utilizando apenas 0,1 µg/µl de dsRNA. Estes resultados além de mostrarem a eficácia do dsRNA utilizado, também mostraram que é possível obter uma inibição significativa da expressão genica com uma quantidade de dsRNA 10 vezes menor que a usual, contribuindo para uma minimização dos recursos utilizados

durante a execução dos experimentos. Dessa maneira, optamos por utilizar a quantidade 0,1 µg/µl de dsRNA, utilizando apenas a sequência de *dsRpLpR-A* ao longo desse trabalho.

Levando em consideração que os barbeiros têm a capacidade de ingerir uma quantidade de sangue capaz de alterar até nove vezes o seu peso corporal e, que após a alimentação, o sangue ingerido é digerido ao longo de cerca de 15 dias (FRIEND, 1965; COELHO *et al.*, 1997), avaliamos se a inibição do receptor de lipoforina seria capaz de alterar, de alguma forma, o processo digestivo e resultar na perda ou manutenção do peso corporal. Como resultado, por mais que a lipoforina seja importante no transporte de lipídeos nesses insetos (ATELLA *et al.*, 1992, 1995; COELHO *et al.*, 1997), a figura 10 mostra que a inibição do LpR por RNAi não resultou em um efeito significativo sob peso corporal das fêmeas após a alimentação, constatando que o *RpLpR* não tem uma influência visível na digestão.

Os lipídeos são moléculas essenciais para a sobrevivência dos insetos, fornecendo energia durante os longos períodos sem alimentação (ARRESE; SOULAGES, 2010), dessa maneira, avaliamos se a inibição de *RpLpR* por RNAi seria capaz de interferir na sobrevivência dos insetos. A figura 11 mostra que a inibição da expressão não teve influência na sobrevivência das fêmeas, assim como já foi observado no piolho-de-salmão (KHAN *et al.*, 2018).

Na figura 12 investigamos o efeito da inibição da expressão no acúmulo de lipídeos nos órgãos e ovos postos, devido a possível importância do LpR na captação e incorporação de lipídeos. Curiosamente, após a inibição da expressão não houve alteração no conteúdo de TAG, no quarto dia após a alimentação no corpo gorduroso. Era esperado que a inibição da expressão do LpR levasse a uma diminuição na quantidade de lipídeos neste tecido, pois conforme descrito por Pontes *et al.*, 2008, em *R. prolixus* os TAG são armazenados no corpo gorduroso logo após a alimentação, atingindo valores mais altos em torno do quarto dia após a alimentação. Para realizar o transporte de lipídeos, a lipoforina precisa interagir de forma adequada com os tecidos (COELHO *et al.*, 1997), sendo assim, ela precisaria interagir adequadamente com seu receptor. Acreditávamos que com a inibição da expressão do LpR, essa interação seria prejudicada, levando a uma diminuição no conteúdo de TAG no corpo gorduroso do barbeiro. Além disso, em outros insetos, a inibição da expressão de LpR por RNAi levou a uma diminuição no conteúdo lipídico presente no ovário e um atraso no seu desenvolvimento (LU *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2023). Em contrapartida, em *R.*

prolixus não foi observada uma alteração significativa no conteúdo de lipídeos do ovário após a inibição da expressão por RNAi. Na mosca tsé-tsé também foi observada uma diminuição dos níveis de lipídeos encontrados na hemolinfa (BENOIT *et al.*, 2011), entretanto, não observamos alterações na quantidade de DAG presente na hemolinfa do barbeiro após o a inibição da expressão. Surpreendentemente, encontramos uma diminuição significativa na quantidade de triacilglicerol nos ovos postos por fêmeas silenciadas. Os resultados mostrados na figura 12 indicam que talvez o LpR não seja uma peça fundamental na incorporação de lipídeos pelos órgãos em geral, mas a diminuição na quantidade de TAG nos ovos pode estar apontando para a importância do receptor na transferência de lipídeos para os ovócitos durante sua maturação, pois conforme descrito por GONDIM *et al.*, 1989b, a lipoforina fornece lipídeos do intestino ou do corpo gorduroso, que são incorporados pelos ovócitos em desenvolvimento.

Apesar da inibição da expressão não alterar a quantidade de gordura estocada nos órgãos, resolvemos avaliar se o RNAi seria capaz de alterar a composição lipídica nos principais órgãos de armazenamento (corpo gorduroso, ovário e músculo de voo). Como esperado, as figuras 13, 14 e 15-A mostram que o lipídeo encontrado em maior abundância nos três órgãos foi o TAG. Além disso, a inibição da expressão não foi capaz de alterar o conteúdo lipídico desses órgãos e, segundo a análise de componentes principais, também não houve variabilidade entre as amostras analisadas.

Ao avaliar se a inibição da expressão de *RpLpR* seria capaz de afetar a transferência de ácidos graxos da lipoforina para os órgãos do barbeiro, levando em consideração que os ácidos graxos são rapidamente incorporados e associados as partículas de lipoforina presentes na hemolinfa (ATELLA *et al.*, 2000), não foram encontradas diferenças significativas na incorporação de palmitato após o a inibição da expressão por RNAi. Esses resultados, ainda que preliminares, reforçam que talvez o LpR não seja o principal responsável na incorporação de lipídeos pelos órgãos de *R. prolixus*, o que vai de encontro com outros resultados mostrados nesse estudo.

De acordo com a análise filogenética realizada (figura 6), em *R. prolixus* existem outros cinco genes com domínios semelhantes a receptores de LDL, supomos que o LpR não esteja atuando de forma isolada na incorporação de lipídeos pelos órgãos, nem que seja o principal responsável por essa função em *R. prolixus*. Nossa hipótese é de que esses genes possam estar envolvidos nesse processo. Além disso,

já se sabe que a inibição da expressão de *RpATPSynβ* reduziu a transferência de lipídios para a lipoforina, demonstrando seu papel como um receptor ou co-receptor de lipoforina, evidenciando que o LpR não é o único responsável por essa função. Entretanto, o silenciamento de *RpATPSynβ* não teve efeito sob a transferência de ácidos graxos para os órgãos, deixando a dúvida de quem estaria envolvido nessa parte do processo (ALMEIDA-OLIVEIRA *et al.*, 2023). Aqui também mostramos que a inibição da expressão do LpR não causou alteração na expressão da *RpATPSynβ*. Além disso, ao avaliar a expressão de outros genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, após a inibição da expressão de *RpLpR*, foi encontrada uma diferença significativa na expressão da Bmm e da enzima CPT-1 no corpo gorduroso. A Brummer apresentou uma queda significativa na expressão após a inibição da expressão de *RpLpR*. Foi demonstrado anteriormente que essa lipase está envolvida no processo de lipólise e a diminuição da sua expressão leva a um aumento no conteúdo de TAG do corpo gorduroso de *R. prolixus*, além de reduzir a eclosão de ovos postos por fêmeas cuja expressão foi inibida (ARÊDES *et al.*, 2024). Já a CPT-1 apresentou um aumento na sua expressão.

Conhecendo a importância da lipoforina na transferência de fosfolipídeos para os ovários vitelogênicos de *R. prolixus* (GONDIM *et al.*, 1989b), avaliamos se a inibição da expressão do LpR seria capaz de alterar a postura de ovos pelas fêmeas. Não observamos uma diferença significativa na quantidade de ovos postos, entretanto, constatamos uma enorme diferença na taxa de eclosão dos ovos postos por fêmeas cuja expressão foi inibida: enquanto o controle apresentou uma taxa de eclosão de cerca de 98 %, os insetos cuja expressão de *RpLpR* foi inibida tiveram apenas 19 % de seus ovos eclodidos. Esse resultado também já foi observado no piolho-de-salmão (KHAN *et al.*, 2018). Além da enorme diferença encontrada na quantidade de ovos eclodidos, também observamos que, com o passar dos dias, esses ovos apresentavam coloração e aspectos diferentes dos ovos de fêmeas-controle (figura 20). As poucas ninfas que conseguiam eclodir desses ovos apresentavam deformações severas, que inviabilizaram sua sobrevivência. Devido aos fenótipos encontrados nos ovos, avaliamos se a inibição da expressão de *RpLpR* causou alterações na ultraestrutura do córion. Encontramos modificações diversificadas, sem um padrão específico, mas que mostram o impacto da inibição da expressão do gene na morfologia e integridade da estrutura correta do córion (figura 21). Avaliamos também se a inibição da expressão de *RpLpR* estava afetando o

crosslinking proteico da casca do ovo. No entanto apesar das alterações morfológicas observadas nos resultados anteriores, não encontramos diferença no *crosslinking* de proteínas (figura 22).

Conforme descrito anteriormente, os lipídeos são indispensáveis para o desenvolvimento adequado do embrião e a maior parte deles chega através da lipoforina e vitelogenina (CANAVOSO *et al*, 2001; FRUTTERO *et al.*, 2017). Na figura 23 observamos uma queda na expressão de vitelogenina 2 (Vg2) diante da inibição da expressão de *RpLpR*. Nos insetos, a vitelogenina é responsável pela formação e maturação dos ovos, e a queda na expressão dessa proteína pode ser o motivo pela má formação do embrião. Esses resultados indicam a importância de *RpLpR* que, após a inibição da sua expressão, foi capaz de diminuir a quantidade de TAG nos ovos postos (figura 12-F), diminuiu a taxa de eclosão (figura 19-B) e inviabilizou a sobrevivência das poucas ninfas que eclodiram (figura 20). Além disso, a inibição da expressão desse gene por RNAi foi capaz de modular negativamente a expressão de vitelogenina (figura 23-B).

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelam importantes informações sobre o papel do LpR na fisiologia do barbeiro *R. prolixus*. A inibição da expressão desse receptor foi capaz de interferir no desenvolvimento dos ovos e alterar significativamente taxa de eclosão das ninfas, além de causar deformações severas nas poucas ninfas que eclodiram. Dessa forma, fica evidente a importância do receptor na reprodução desses insetos e, conseqüentemente, mostrando que a inibição da sua expressão não foi capaz de interferir apenas na fisiologia do barbeiro, mas também em sua dinâmica populacional. Também foi demonstrado que o LpR talvez não seja o único ou o principal receptor responsável pela entrega de lipídeos pela lipoforina em *R. prolixus*, indicando a existência de outros receptores envolvidos nesse mecanismo. Além disso, foi demonstrada a eficácia da inibição da expressão de *RpLpR* por RNA de interferência usando uma quantidade reduzida de dsRNA, o que sugere um protocolo capaz de minimizar o uso de recursos experimentais.

Em conjunto, essas descobertas mostram que embora a inibição da expressão do LpR por RNAi não cause impactos diretos na dinâmica de acúmulo de lipídeos, a presença desse receptor é indispensável para a reprodução dos insetos, fornecendo informações interessantes para o controle populacional desse vetor. No entanto, ainda existem lacunas no conhecimento e informações a serem esclarecidas nessa área.

REFERÊNCIAS

ADEVA-ANDANY, María M. *et al.* Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. **Mitochondrion**, [S.L.], v. 46, p. 73-90, maio 2019.

ALMEIDA-OLIVEIRA, Fernanda *et al.* ATP synthase affects lipid metabolism in the kissing bug *Rhodnius prolixus* beyond its role in energy metabolism. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 158, p. 103956, jul. 2023.

ALVES-BEZERRA, M. *et al.* Long-chain acyl-CoA synthetase 2 knockdown leads to decreased fatty acid oxidation in fat body and reduced reproductive capacity in the insect *Rhodnius prolixus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1861, n. 7, p. 650–662, 2016.

ALVES-BEZERRA, M.; DE PAULA, I. F.; MEDINA, J. M.; *et al.* Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 51–60, 2016.

ALVES-BEZERRA, M.; GONDIM, K. C. Triacylglycerol biosynthesis occurs via the glycerol-3-phosphate pathway in the insect *Rhodnius prolixus*. **Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 12, p. 1462–1471, 2012.

ALVES-BEZERRA, M.; RAMOS, I. B.; DE PAULA, I. F.; *et al.* Deficiency of glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 decreases triacylglycerol storage and induces fatty acid oxidation in insect fat body. **Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 3, p. 324–336, 2017.

AMEER, Fatima *et al.* De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, [S.L.], v. 63, n. 7, p. 895-902, jul. 2014.

ARÊDES, Daniela Saar *et al.* Deficiency of Brummer lipase disturbs lipid mobilization and locomotion, and impairs reproduction due to defects in the eggshell ultrastructure in the insect vector *Rhodnius prolixus*. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [S.L.], v. 1869, n. 2, p. 159442, mar. 2024.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.

ATELLA, G. C. *et al.* Fatty Acid Incorporation by *Rhodnius prolixus* Midgut. **Insect Biochemistry And Physiology**, v. 43, p. 99-107. 2000.

ATELLA, G. C.; GONDIM, K. C. Loading of Lipophorin Particles With Phospholipids at the Midgut of *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 30, p. 337-350, 1995.

AELLA, G. C.; GONDIM, K. C.; MASUDA, H. Transfer of Phospholipids From Fat Body to lipophorin in *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 19, p. 133-144, 1992.

AELLA, G. C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Capítulo 6: Metabolismo de Lipídeos. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012.

AELLA, Georgia C. *et al.* Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.], v. 77, n. 3, p. 405-430, set. 2005.

AZEEZ, Odunayo Ibraheem; MEINTJES, Roy; CHAMUNORWA, Joseph Panashe. Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus. **Lipids In Health And Disease**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-13, 23 abr. 2014.

BEENAKKERS, Ad M.Th.; HORST, Dick J. Van Der; VAN MARREWIJK, Wil J.A. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. **Progress In Lipid Research**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 19-67, jan. 1985.

BENOIT, Joshua B. *et al.* Lipophorin acts as a shuttle of lipids to the milk gland during tsetse fly pregnancy. **Journal Of Insect Physiology**, [S.L.], v. 57, n. 11, p. 1553-1561, nov. 2011.

BLIGH, E.G. AND DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification, **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, 1959.

CAILLEAUX, Solange Ribeiro Peixoto *et al.* Resistência ao jejum de *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) em condições de laboratório. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 39- 43, jun. 2011.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 23-46, 2001.

CHINO, H. *et al.* Lipophorins, a major class of lipoproteins of insect haemolymph. **Insect Biochemistry**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 491, jan. 1981.

COELHO, H. S. L.; AELLA, G. C.; MOREIRA, M. F.; GONDIM, K. C.; MASUDA, H. Lipophorin Density Variation During Oogenesis in *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 35, p. 301-313, 1997.

DANTUMA, Nico P. *et al.* An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins. **Journal Of Lipid Research**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 973-978, mai. 1999.

DIAS, F. A.; GANDARA, A. C. P.; QUEIROZ-BARROS, F. G.; *et al.* Ovarian Dual Oxidase (Duox) activity is essential for insect eggshell hardening and waterproofing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 49, p. 35210–35221, 2013.

FELSENSTEIN, Joseph *et al.* Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal Of Molecular Evolution**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 368-376, nov. 1981.

FINETTI, Luca *et al.* The octopamine receptor O α 1 influences oogenesis and reproductive performance in *Rhodnius prolixus*. **Plos One**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. e0296463, 29 dez. 2023.

FINN, R. D. *et al.* Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D222-30, 2014.

FONSECA, Rodrigo Nunes da *et al.* **Aspectos Morfofuncionais da Embriologia dos Artrópodes**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012.

FRIEND, W. G. The gorging response in *Rhodnius prolixus* Stahl. **Canadian Journal of Zoology**, v. 43, p. 125-132, 1965.

FRUTTERO, Leonardo L. *et al.* Lipids in Insect Oocytes: from the storage pathways to their multiple functions. **Results And Problems In Cell Differentiation**, [S.L.], p. 403-434, 2017.

GONÇALVES, Teresa Cristina Monte; COSTA, Jane. Morfologia. 2017. FIOCRUZ. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/morfologia/#morf-interna>. Acesso em: 07 de dezembro 2023.

GONDIM, K. C.; ATELLA, G. C.; PONTES, E. G.; MAJEROWICZ, D. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 101, p. 108–123, 2018.

GONDIM, K. C.; OLIVEIRA, P. L.; MASUDA, H. Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: Transfer of phospholipids. **Journal of Insect Physiology**, v. 35, n.1, p. 19-27, 1989b.

GRILLO, L.A.M. *et al.* Lipophorin interaction with the midgut of *Rhodnius prolixus*: characterization and changes in binding capacity. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 429-438, abr. 2003.

HORST, Dick J. van Der *et al.* Circulatory lipid transport: lipoprotein assembly and function from an evolutionary perspective. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 326, n. 1-2, p. 105-119, 8 jan. 2009.

KHAN, Muhammad Tanveer *et al.* Molecular characterization of the lipophorin receptor in the crustacean ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 1-23, 12 abr. 2018.

KIM, Ae-Kyeong *et al.* Lipophorin receptor 1 (LpR1) in *Drosophila* muscle influences life span by regulating mitochondrial aging. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 568, p. 95-102, set. 2021.

LARKIN, M.A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 10 set. 2007.

LEE, C.S *et al.* Wax moth, *Galleria mellonella*, high density lipophorin receptor: alternative splicing, tissue-specific expression, and developmental regulation. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 33, n. 8, p. 761-771, ago. 2003.

LEYRIA, Jimena *et al.* What happens after a blood meal? A transcriptome analysis of the main tissues involved in egg production in *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 1-35, 15 out. 2020.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LU, Kai *et al.* Lipophorin receptor regulates *Nilaparvata lugens* fecundity by promoting lipid accumulation and vitellogenin biosynthesis. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [S.L.], v. 219-220, p. 28-37, mai. 2018.

LUZ, Christian; FARGUES, Jacques; GRUNEWALD, Jörg. Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: reduviidae) under constant and cyclic conditions of temperature and humidity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 403-409, mai. 1999.

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

MAJEROWICZ, D. *et al.* The ACBP gene family in *Rhodnius prolixus*: Expression, characterization and function of RpACBP-1. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 72, p. 41–52, 2016.

MAJEROWICZ, David *et al.* *Rhodnius prolixus* LIPOPHORIN: lipid composition and effect of high temperature on physiological role. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 82, n. 3, p. 129-140, 29 jan. 2013.

MCGARRY, J. Denis *et al.* The Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase System — From Concept to Molecular Analysis. **European Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 244, n. 1, p. 1-14, fev. 1997.

MESQUITA, Rafael D. *et al.* Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 112, n. 48, p. 14936-14941, 16 nov. 2015.

NASCIMENTO, P. V. P. *et al.* Gene annotation of nuclear receptor superfamily genes in the kissing bug *Rhodnius prolixus* and the effects of 20-hydroxyecdysone on lipid metabolism. **Insect Molecular Biology**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 297-314, 29 jan. 2021.

NELSON, David L.; COX, Michael M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6 ed. São Paulo: Artmed Editora S.A., 2014.

NUNES-DA-FONSECA, Rodrigo *et al.* *Rhodnius prolixus*: From classical physiology to modern developmental biology: from classical physiology to modern developmental biology. **Genesis**, [S.L.], v. 55, n. 5, p. 1-11, 22 abr. 2017.

ONS, Sheila. Neuropeptides in the regulation of *Rhodnius prolixus* physiology. **Journal Of Insect Physiology**, [S.L.], v. 97, p. 77-92, fev. 2017.

PEREIRA, Jéssica *et al.* Gene identification and RNAi-silencing of p62/SQSTM1 in the vector *Rhodnius prolixus* reveals a high degree of sequence conservation but no apparent deficiency-related phenotypes in vitellogenic females. **Plos One**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 0287488, 24 jul. 2023.

PONTES, E. G. *et al.* Dynamics of lipid accumulation by the fat body of *Rhodnius prolixus*: The involvement of lipophorin binding sites. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 5, p. 790–797, 2008.

QIAO, Jian-Wen *et al.* Lipophorin receptor regulates the cuticular hydrocarbon accumulation and adult fecundity of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Insect Science**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 1018-1032, 25 jul. 2020.

ROZEN, S. E. H. J. SKALETSKY. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**, v. 132, p. 365-386, 2000.

SARAIVA, F. B.; ALVES-BEZERRA, M.; MAJEROWICZ, D.; *et al.* Blood meal drives de novo lipogenesis in the fat body of *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 133, 103511, 2021.

SCHMID, Robin *et al.* Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 447-449, 1 mar. 2023.

SIEBER, Matthew H. *et al.* Steroid Signaling Establishes a Female Metabolic State and Regulates SREBP to Control Oocyte Lipid Accumulation. **Current Biology**, [S.L.], v. 25, n. 8, p. 993-1004, abr. 2015.

SILVA-OLIVEIRA, Gleidson *et al.* Insulin receptor deficiency reduces lipid synthesis and reproductive function in the insect *Rhodnius prolixus*. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [S.L.], v. 1866, n. 2, p. 158851, fev. 2021.

SMEDLEY, Damian *et al.* The BioMart community portal: an innovative alternative to large, centralized data repositories. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 589-598, 20 abr. 2015.

TAMURA, Koichiro *et al.* MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology And Evolution**, [S.L.], v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 23 abr. 2021.

WIGGLESWORTH, Vincent B. Memoirs: The function of the corpus Allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **Journal of Cell Science**, v. 2, n. 313, p. 91-121, 1936.

World Health Organization, WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) Epidemiology. Unpublished document. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em 07 de dezembro de 2023.

YING, Qidi *et al.* Unravelling lipoprotein metabolism with stable isotopes: tracing the flow. **Metabolism**, [S.L.], v. 124, p. 154887, nov. 2021.

ZHAO, Xiao; KARPAC, Jason. The *Drosophila* midgut and the systemic coordination of lipid-dependent energy homeostasis. **Current Opinion In Insect Science**, [S.L.], v. 41, p. 100-105, out. 2020.

ZHAO, Xiaoping; YANG, Fajun. Regulation of SREBP-Mediated Gene Expression. **Acta Biophysica Sinica**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 287, 2012.

ZHAO, Yiyang *et al.* Lipophorin receptor is required for the accumulations of cuticular hydrocarbons and ovarian neutral lipids in *Locusta migratoria*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 236, p. 123746, mai. 2023.

ZIEGLER, R; VANANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 264-272, abr. 2006.