

**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular**

**Identificação e Análise Computacional de Transcritos Relacionados à
Olfação em Espécies de Percevejos Praga da Soja**

Luciana Ramalho de Farias

Orientadora: Prof^a Dr^a. Sônia Nair Bão

Luciana Ramalho de Farias

**Identificação e Análise Computacional de Transcritos Relacionados à
Olfação em Espécies de Percevejos Praga da Soja**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Molecular do Departamento de Biologia
Celular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do
título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Sônia Nair Bábó

Brasília 2015

“...Coragem, coragem, se o que
você quer é aquilo que pensa e faz
Coragem, coragem, eu sei que
você pode mais...” (Raul Seixas)

Agradecimentos

Agradeço ao meu marido que, durante essa longa caminhada, esteve sempre ao meu lado me encorajando para que eu chegasse até o fim. Seu companheirismo me acalma e, não importava o que acontecesse, sabia que ao chegar em casa encontraria você e tudo iria passar. Seu amor e admiração me fazem querer ser cada dia melhor como ser humano e profissional. Você é minha maior conquista. Te amo.

Agradeço aos meus pais por terem me proporcionado à educação que me permitiu caminhar até este momento. Terem me ensinado os melhores valores de conduta pessoal e tornado minha caminhada menos difícil, cercada de muito amor, sempre. Minha mãe, seu orgulho e “corujice” escancarada me fazem olhar orgulhosa tudo o que conquistei. Meu pai, mais tímido, mas muito orgulhoso das minhas vitórias ao longo desses anos. Amo vocês incondicionalmente.

Meu irmão... Minha inspiração em tantos aspectos dessa vida. Meu melhor amigo em todos os momentos. Sua serenidade e conduta me inspiram a querer ser uma pessoa melhor todos os dias. Obrigada por tudo! Minha cunhada Mônica Corcino, por transformar a vida do meu irmão ainda melhor e ter trazido tantas alegrias à nossa família.

Minha sobrinha Clara Corcino Ramalho que, mesmo sem saber, me emprestou a inocência do seu sorriso e alegria, me fazendo esquecer tudo o que me corroia, mesmo que por breves momentos. Amo você pequena serelepe da dinda.

Minha querida sogra Vanilda Ramalho de Albuquerque pelo apoio incondicional, os almoços sempre oportunos e nossas viagens fantásticas e inesquecíveis. Obrigada também por ter confiado a mim a pessoa mais importantes da sua vida: seu filho; e por seu carinho para comigo e minha família.

Aos amigos Cândido e Lúcia Gomes, por todas as sábias palavras nos momentos mais oportunos desta longa jornada e por me incentivarem a seguir em frente sempre.

Aos amigos Clarissa Gomes, Karine Vilas Boas, Ana Paula Duda e Renata Duda... Ter vocês na minha vida é um privilégio que poucos podem desfrutar. As risadas, momentos de descontração e serenidade foram muito importantes ao longo de todos os anos da nossa convivência. Quero vocês na minha vida SEMPRE.

Aos amigos Roberta Coelho e Dijair Júnior, por me ouvirem e me apoiarem sempre que necessário e por suas contribuições a este trabalho.

Aos amigos Érica e Paulo Queiroz pelos conselhos que mantiveram minha serenidade e me permitiram chegar ao final deste trabalho.

Às amigas Ingrid Graciele, Marcinha, Brígida e Yasmin, pelo acolhimento e atenção a mim dedicados e pelos muitos momentos de descontração sempre necessários e oportunos. E viva ao Outback!!!

Ao meu eterno orientador, Prof. Dr. Octávio Luiz Franco por torcer sempre pelo meu sucesso e estar ao meu lado no momento que eu mais precise no desenvolvimento deste trabalho. Quando recebo um elogio profissional tenho você na lembrança como meu melhor professor. Independente do caminho que seguirei daqui pra frente, tenho certeza de que sempre posso contar com você como profissional e amigo. Muito obrigada por tudo.

Ao querido amigo Állan Pires... Menino de coração gigante e inteligência tão grandiosa quanto. Sua dedicação a este trabalho me emociona e me faz acreditar que ainda existem boas

peessoas no meio em que vivemos. Você é brilhante e estarei sempre disposta a contribuir para seu crescimento profissional e pessoal.

Ao grupo de ecologia química da Embrapa Cenargen por fornecerem os insetos utilizados nesse estudo e por suas contribuições no desenvolvimento de alguns experimentos.

Aos membros da banca examinadora Dr. Ricardo Panizzi, Dr. Dijair Júnior, Prof^a.Dr^a. Ildinete e Prof^a. Dr^a. Sônia Freitas pela disponibilidade em participar da minha avaliação e pelas contribuições que serão dadas a este trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão, pela paciência e dedicação a este trabalho, por acreditar na minha capacidade e por sempre ter estado ao meu lado diante de todas as adversidades que enfrentei durante este processo. Saber que a senhora estava comigo me fez ter coragem de chegar até aqui. Mesmo diante do que passei, ter conquistado sua confiança permitiu que eu não olhasse tanto para trás e seguisse em frente, passando por cima de tudo aquilo. No momento que mais precisei recebi suas mãos estendidas prontas para me ajudar a levantar... E assim o fiz e aqui estamos: mais uma defesa. Obrigada por ter aceitado me receber, ainda no mestrado, mesmo não sabendo quem eu era. Espero não tê-la decepcionado muito ao longo desses seis anos de luta. A senhora é uma inspiração pessoal e profissional e uma das pessoas mais generosas e bondosas que já tive o prazer de conhecer nessa vida. Estarei sempre à disposição. Meu carinho, respeito e admiração serão dedicados a você para sempre. MUITO OBRIGADA MESTRE.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília pela oportunidade de desenvolver este trabalho e ao CNPq pelo suporte financeiro ao longo desses anos.

Identificação e Análise Computacional de Transcritos Relacionados à Olfacção Espécies de Percevejos Pragas da Soja

Resumo

Os percevejos representam uma ameaça à soja, principal cultura agrícola do país. A investigação de proteínas relacionadas à olfacção representa uma abordagem atual que visa o desenvolvimento de novas ferramentas a partir da compreensão do sistema olfativo de insetos e sua relação com o comportamento desses indivíduos no campo. O trabalho teve como objetivo identificar transcritos relacionados à olfacção em três espécies de percevejos pragas da soja - *Euschistus heros* (Fabricius, 1798), *Chinavia ubica* (Rolston, 1983) e *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851), analisar a afinidade das proteínas que se ligam a odorantes (OBPs – *Odorant Binding Proteins*) a sete moléculas odorantes testadas *in vivo* como mistura complexa de odores e analisar a ultraestrutura das sensilas das antenas do percevejo marrom *E. heros*. Os transcritos foram obtidos a partir de sequenciamento de alto desempenho de amostras de RNA extraídas das antenas dos insetos não acasalados. Os dados obtidos no sequenciamento permitiram a montagem de sequências que posteriormente, foram triadas para obtenção das sequências de interesse. As relações filogenéticas entre as OBPs com sequência completa foram estabelecidas utilizando o programa FastTree. A modelagem estrutural dessas proteínas foi realizada pelo programa MODELLER 9.10. O *docking* molecular realizado para verificar a afinidade das OBPs com os ligantes foi realizado pelo programa AutoDock Vina. A ultraestrutura das sensilas de *E. heros* foi estudada utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão. Foram identificadas nove OBPs com sequências completas, sendo quatro pertencentes às espécies *E. heros* e *C. ubica* e uma ao *D. melacanthus*. As relações filogenéticas observadas indicaram uma divergência intraespecífica e duas relações de proximidade interespecífica. Os modelos obtidos a partir de modelagem estrutural foram consistentes com aqueles resolvidos por cristalografia de raio-X e ressonância nuclear magnética. Esse estudo revelou uma maior afinidade das OBPs para odorantes relacionados aos feromônios sexuais, exceto a OBP de *D. melacanthus*, que não apresentou afinidade significativa com nenhum ligante. Em relação à ultraestrutura sensilar, os resultados demonstram uma organização semelhante à outra espécie de hemíptera e diferente da organização em lepidópteros. Este trabalho possibilitou o aprofundamento dos conhecimentos relacionados aos processos olfatórios nas espécies analisadas, bem como o levantamento de estratégias que poderão levar ao desenvolvimento de biossensores que poderão ser aplicados no campo como alternativa às estratégias de controle tradicionalmente utilizadas e, muitas vezes, ineficientes.

Palavras-Chave: *Euschistus heros*, *Chinavia ubica*, *Dichelops melacanthus*, *docking* molecular, odorantes, sensila.

Identification and Computational Analysis of Transcripts Related to Olfaction in Soybean Stink Bugs

Abstract

Stink-bugs (Pentatomidae) include a complex of species major pests of soybean in Brazil. Development of new tools to manage this pest complex is an important goal. The investigation of proteins related to olfaction presents potential to be used in monitoring and/or developing sustainable managing tools to be implemented in holistic integrated pest management (IPM) programs. This study aimed to identify transcripts related to olfaction in three species of stink bug pests of soybean - *Euschistus heros*, *Chinavia ubica* and *Dichelops melacanthus* -, and to analyze the affinity of odorant binding proteins (OBPs - Odorant Binding Proteins) to seven odorant molecules tested in live as complex mixture of odors and to analyze the ultrastructure of sensillas of the most common species, *E. heros*. The transcripts were obtained through next generation sequencing from RNA samples extracted from the antennae of unmated insects. The sequencing data obtained enabled the assembly of sequences that were screened for obtaining the sequences of interest. The phylogenetic relationships between full-length OBPs were established using the FastTree program. Structural modeling of these proteins was carried out by MODELLER 9.10 software. The molecular docking conducted to determine the affinity of ligands with OBPs was performed by Vina AutoDock program. The sensilla ultrastructure of *E. heros* was studied using electron transmission microscopy. Nine full-length OBPs were identified four belonging to the species *E. heros* and *C. ubica* each and one from *D. melacanthus*. The phylogenetic relationships observed indicated an intraspecific divergence and two relations of interspecific proximity. The models obtained from structural modeling were consistent with those solved by X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance. This study revealed a greater affinity for the OBPs odorants related to sex pheromones, except OBP *D. melacanthus*, which showed no significant affinity with any odorant molecule. Regarding to sensillar ultrastructure, the results demonstrate an organization similar to other species of Hemiptera and different organization from Lepidoptera. This work enabled the development of knowledge related to olfactory processes in the analyzed species and raising strategies that may lead to the development of biosensors that can be applied in the field as an alternative to control strategies traditionally used and often inefficient.

Keywords: *Euschistus heros*, *Chinavia ubica*, *Dichelops melacanthus*, molecular docking, odorants, sensilla.

Índice

Sumário.....	15
Objetivo Geral	16
Referências Bibliográficas	17

Capítulo 1: **Ultraestrutura das sensilas das antenas do percevejo-marrom, *Euschistus heros* (F.)**

Introdução	19
Objetivos Específicos	22
Material e Métodos	23
Resultados	24
Discussão	25
Conclusão	26
Referências Bibliográficas	26

Capítulo 2: **Prospecção de transcritos relacionados à olfação em percevejos praga da soja e relação filogenética entre proteínas ligantes de odorantes (OBPs)**

Introdução	30
Objetivos Específicos	33
Material e Métodos	33
Resultados	36
Discussão	48
Referências Bibliográficas	51

Capítulo 3: **Análise computacional da interação entre OBPs com sequência completa e seus ligantes potenciais**

Introdução	56
Objetivos Específicos	58

Material e Métodos	58
Resultados	60
Discussão	72
Conclusão	75
Referências Bibliográficas	75
Considerações Finais	79
Perspectivas	80
Material Suplementar	81

Lista de Figuras

Sumário

Figura 1. Percevejos do complexo praga da soja. A: *Euschistus heros* (Foto: Cecília Vieira); B: *Dichelops melacanthus* (Foto: Folha do fazendeiro, 09/2005); C: *Chinavia ubica* (Foto: Department of Horticulture, Oregon State University).

Capítulo 1

Figura 1. Representação esquemática da anatomia do cérebro de mariposas baseada na espécie *Agrotis ipsilon*. **(A)** Região cerebral contendo os lobos da antena (AL), nervos da antena (AN), corpos de cogumelo (MBL + MBC), complexo cortical (CC), lâmina (Lo) e lóbula (La). **(B)** Esquema do lobo da antena contendo os glomérulos individuais (OG), o complexo macrogglomerular (MGC), agrupamento de corpos celulares mediais (mCB), corpos celulares laterais (ICB). **Fonte:** (Deising *et al.*, 2014).

Figura 2. Morfologia do cérebro de hemípteros. **(A)** A área circulada representa o lobo da antena de *Trioza apicalis*, sem evidências da presença de glomérulos. A imagem foi obtida através de imunomarcagem com anti-sinapsina. **(B)** Lobo da antena de *Metapolophium dirhodum* (área circundada) cercada por interneurônios. Imagem obtida através de tratamento combinado com anti-sinapsina e sonda molecular TOTO-3. **Imagens:** Kristoffersen *et al.*, 2008.

Figura 3. Neuroanatomia do percevejo marrom *Euschistus heros*. **(A)** Glomérulos presentes no lobo da antena. Observação realizada através de imunomarcagem com antisinapsina. **(B)** Projeções dos axônios atravessando os lobos da antena e o complexo mecanosensor e motor (AMMC); imunomarcagem com neurobiotina e antisinapsina. **(C)** Glomérulo com pouca inervação das projeções dos axônios. Indicação de um possível neurônio de sensila responsável por sentir o sabor dos alimentos. **Imagens:** Kristoffersen *et al.*, 2008.

Figura 4. Morfologia das sensilas encontradas nas antenas de *Euschistus heros*. **(A)** Sensila tricóide (ST1) e sensilas basicônicas (SB1 e SB2). **(B)** Inserção da sensila basicônica. **(C)** Ponta da sensila basicônica *knob-shaped* apresentando dois poros. **(D)** Sensila *knob-shaped*. **Fonte:** Silva *et al.*, 2010.

Figura 5. Ultraestrutura sensilar de *Euschistus heros*. (d) dendrito; (c) canal de conexão; (p) poro; (pc) parede cuticular.

Figura 6. Ultraestrutura das sensilas tricóides e basicônicas. (A) Sensila tricóide contendo um dendrito ramificado (d). (B) Sensila basicônica apresentando vários dendritos não ramificados (d). Estruturas comuns: linfa sensilar (Lf), canal de conexão (c), poros (p), parede cuticular (pc).

Capítulo 2

Figura 1. Esquema da organização e morfologia da sensila da antena de um inseto. Cada sensila possui dois neurônios cujos dendritos projetam-se por meio do lúmen preenchido pela linfa sensilar. Os poros representam a porta de entrada para as moléculas odorantes. (Fonte: Sánchez– Garcia *et al.*, 2009).

Figura 2. Representação dos processos relacionados à olfação em insetos. (1) As moléculas odorantes alcançam a linfa sensilar através dos poros presentes nas sensilas; (2) ligam-se às OBPs e são transportados por elas até os OR's (3 – 4). Após desencadearem a resposta olfativa apropriada ao se ligarem aos ORs (representados pelas letras A e B), as moléculas odorantes são inativadas por uma armadilha molecular (6) ou por ação das enzimas degradantes de odorantes (7). Fonte: Leal (2013).

Figura 3. Pipeline da montagem *de novo* dos transcriptomas das antenas dos percevejos.

Figura 4. Distribuição das principais categorias de funções moleculares do nível 2 dos transcriptomas de antenas de percevejos adultos (12 dias após última muda) virgens utilizando análise por Gene Ontology (GO). (A) *E. heros* (n= 4.858), (B) *C. ubica* (n= 6.018), (C) *D. melacanthus* (n= 2.153).

Figura 5. Alinhamento múltiplo e predição da estrutura secundária das sequências deduzidas de aminoácidos das OBPs clássicas dos percevejos com sequências de diferentes espécies da ordem Hemiptera obtidas do GenBank pelo BLASTx. As estruturas secundárias (primeira linha) foram atribuídas de acordo com a estrutura cristal da Bmor_OGOBP2. Os resíduos conservados de cisteína estão destacados na cor vermelha, enquanto os resíduos de aminoácidos semi-conservados estão indicados na cor amarela. Bmor: *B. mori* GOBP2 (2WCK_A); Alin: *Adelphocoris lineolatus* OBP 5 (ACZ58031.1); Asut: *Adelphocoris suturalis* OBP 6 (AHJ81241.1), OBP 11 (AHJ81243.1); Aluc: *Apolygus lucorum* OBP 8 (AFJ54049.1); Cubi: *C. ubica* OBP 2 (KM213233), OBP 3 (KM213234), OBP4 (KM213235); Dimel: *D. melacanthus* OBP 1 (KM213236); Eher: *E. heros* OBP1 (ADJ18275.1), OBP 3 (KM213228), OBP 4 (KM213229); Llin: *Lygus lineolaris* OBP 2 (AHF71029.1), OBP19 (AHF71049.1); Sfur *Sogatella furcifera* OBP10 (AHB59661.1). O alinhamento foi obtido através do programa ESPript (Gouet *et al.*, 1999).

Figura 6. Alinhamento múltiplo e predição da estrutura secundária das sequências deduzidas de aminoácidos das OBPs plus – C de *E. heros* e *C. ubica* sequências de OBPs da mesma classe identificadas em diferentes espécies da ordem Hemiptera obtidas do GenBank pelo BLASTx. As estruturas secundárias (primeira linha) foram atribuídas de acordo com a estrutura cristal da Bmor_OGOBP2. Os resíduos conservados de cisteína estão destacados na cor vermelha, enquanto os resíduos de aminoácidos semi-conservados estão indicados na cor amarela. Agam: *Anopheles gambiae* OBP 47 (4IJ7), Alin: *Adelphocoris* OBP 3 (AEA07661.1), OBP7 (ACZ58085.1); Asut: *Adelphocoris suturalis* OBP 7 (AHJ81239.1), Aluc: *Apolygus lucorum* OBP 1 (AEA07705.1), OBP 3 (AEA07661.1), OBP 6 (AEA07664.1), Cubi: *C. ubica* OBP 1 (KM213232), Eher: *E. heros*, OBP 5 (KM213230), OBP 6 (KM213231), Llin: *Lygus lineolaris* OBP 29 (AHF71060.1), Sfur *Sogatella furcifera* OBP4 (AHB59657.1). O alinhamento foi obtido através do programa ESPript (Gouet *et al.*, 1999).

Figura 7. Relações filogenéticas entre as potenciais OBPs com sequência completa descritas neste trabalho (em vermelho) e 185 OBPs potenciais com sequência completa de hemípteros disponíveis nos bancos de dados DDBJ/EMBL/GenBank. As árvores foram construídas com o MEGA 6.06 utilizando o modelo LG + G + I. Os valores indicados nos nós são os valores das

distâncias evolutivas entre as sequências de aminoácidos estimados pelo cálculo do *bootstrep*. Os nomes das espécies estão abreviados com quatro letras, e seus nomes completos, bem como o número de acesso no banco de dados estão descritos na tabela suplementar 4.

Figura 8. Relações filogenéticas detalhadas entre as OBPs potenciais de *E. heros*, *C. ubica* e *D. melacanthus*. É possível observar a divergência intraespecífica entre as OBPs, bem como certa convergência interespecífica entre as OBPs de *E. heros* e *C. ubica*.

Capítulo 3

Figura 1. Representação das estruturas com os ligantes com as posições de menor energia obtidas através de Docking. (A) *Eher*OBP1: OBP clássica, (B) *Dime*OBP1: OBP minus – C com cinco resíduos; (C) *Cubi*OBP1: OBP plus – C com 12 resíduos de cisteína; (D) *Eher*OBP5: OBP plus – C com oito resíduos de cisteína. **Ligantes:** β-farneseno (preta), trans-2-hexenal (azul escura), 4-oxo-2-(E)-hexenal (trigo), (E)-2-octenal (rosa magenta), 2E-4Z-decadienoato de metila (vermelha), 2,6,10-trimetildecanoato de metila (lilás) e Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno (ciano). As alfa-hélices estão indicadas em negrito pela letra α , seguida do número correspondente. A provável cavidade de ligação está indicada em amarelo e as ligações dissulfeto estão indicadas pela cor laranjado.

Figura 2. Possíveis interações *Eher*OBPs/ligantes. Os aminoácidos que participam das interações com os ligantes e compõem a possível cavidade de ligação de cada OBP estão indicados em negrito em cada uma das imagens, seguidos do número que indica a posição desses aminoácidos na estrutura primária da proteína. A interação *Eher*OBP5/2,6,10-trimetildecanoato de metila está representada apenas com os aminoácidos que participam da interação para que fosse possível a observação dos mesmos.

Figura 3. Possíveis interações *Cubi*OBPs/ligantes. Os aminoácidos que participam das interações com os ligantes e compõem a possível cavidade de ligação de cada OBP estão indicados em negrito em cada uma das imagens, seguidos do número que indica a posição desses aminoácidos na estrutura primária da proteína.

Figura 4. Possíveis interações *Dime*OBP1/ligantes. Os aminoácidos que interagem com os ligantes estão indicados em negrito seguido do número que indica sua posição na estrutura primária da proteína.

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1. Número de *reads* obtidas a partir de sequenciamento de biblioteca RNA-Seq das antenas dos percevejos *E. heros*, *C. ubica* e *D. melacanthus* utilizando a plataforma Illumina GAIIx, e número de *contigs* montados para cada espécie. O comprimento mínimo de *contigs* para todas as espécies foi 300 pb. Todos os dados brutos dos transcritomas foram depositados no banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA) e podem ser acessado através do *BioProject* PRJNA246320.

Tabela 2. Predições de propriedades físico-químicas das potenciais OBP's de percevejos. AA: quantidade de resíduos de aminoácidos; pI: ponto isoelétrico; MM: massa molecular (kDa); Cys: cisteína; Peptídeo Sinal: posição do peptídeo sinal. Domínios InterPro IPR023316 e SM00708, e famílias IPR006170e PF01395.

Capítulo 3

Tabela 1. Compostos utilizados no *docking* molecular para investigação das possíveis interações OBPs/ligantes.

Tabela 2. Estruturas utilizadas como molde na predição da estrutura 3D das respectivas OBPs e parâmetros utilizados para selecionar as melhores estruturas.

Tabela 3. Conjunto modal das energias de ligação dos ligantes testados para as OBPs dos percevejos. Em verde estão representados os valores de energia livre de ligação das interações consideradas possíveis tanto pelos valores de energia quanto pela avaliação visual. Em rosa claro estão indicadas as energias que, embora consideradas favoráveis à interação OBP/ligante, a mesma não ocorria na cavidade de ligação das OBPs. Em ciano estão representados os valores de energia livre de ligação considerados desfavoráveis.

Tabela 4. Resíduos de aminoácidos que podem participar da interação com o ligante na cavidade de ligação das respectivas *Eher*OBPs. Em amarelo estão representados os resíduos que interagem com os três compostos; em vermelho estão representados os resíduos que interagem com os compostos dos feromônios sexuais de *C. ubica* e *E. heros*; em ciano estão os resíduos que interagem com o β -farneseno e 2,6,10-trimetildecanoato de metila.

Tabela 5. Resíduos de aminoácidos possivelmente envolvidos na interação com o ligante na cavidade de ligação das *Cub*OBPs. Em amarelo estão representados os resíduos que interagem com os três compostos; em vermelho estão representados os resíduos que interagem com os compostos dos feromônios sexuais de *C. ubica* e *E. heros*.

Lista de Siglas e Abreviações

AP	<i>Alkline Phosphatase</i>
°C	Grau Celsius
cDNA	DNA complementar
CSP	<i>Chemosensory Protein</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GOBP	<i>General Odorant Binding Protein</i>
h	Hora
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
M	Molar
µg	Micrograma
min	Minuto
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
RNA	Ácido Ribonucleico
OBP	<i>Odorant Binding Protein</i>
pb	Par de base
PBP	<i>Pheromone Binding Protein</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
pI	Ponto isoelétrico
%	Por cento
qPCR	Reação em cadeia da polimerase método quantitativo
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
3D	Tridimensional
UR	Umidade relativa

Sumário

No Brasil, os percevejos fitófagos da ordem Hemiptera e família Pentatomidae (Figura 1), representam as pragas da cultura da soja mais importantes, uma vez que afetam o rendimento e a qualidade dos grãos ao provocarem a murcha das vagens e o não amadurecimento, deixando as plantas imaturas na época da colheita (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999). O percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) representa a principal praga da soja; as espécies *Dichelops melacanthus* e *Chinavia ubica*, embora menos comuns, têm sido observadas em abundância crescente nos últimos anos (Corrêa-Ferreira *et al.*, 2009).



Figura 1. Percevejos do complexo praga da soja. A: *Euschistus heros* (Foto: Cecília Vieira); B: *Dichelops melacanthus* (Foto: Folha do fazendeiro, 09/2005); C: *Chinavia ubica* (Foto: Department of Horticulture, Oregon State University).

A ocorrência de percevejos pragas da soja tem se agravado com o passar dos anos, devido a não aplicação de técnicas de controle populacional e/ou à ineficiência dessas, bem como a aplicação indiscriminada de produtos que levam ao surgimento de populações resistentes (Corrêa-Ferreira *et al.*, 2009). Esses insetos iniciam a colonização da soja de meados ao final do período vegetativo ou durante a floração, seguido do aumento da população com a fase reprodutiva ocorrendo a partir do aparecimento das vagens. O enchimento dos grãos coincide com o período no qual a população de percevejos atinge sua densidade máxima, tendendo a decrescer com a soja em seu estágio de maturação fisiológica (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999).

Os percevejos que compõem o complexo praga da soja são hemimetábolos e apresentam três fases de desenvolvimento: ovo, ninfa (cinco instares) e adulto. O desenvolvimento médio a partir da fase de ninfa é de 25 dias até a fase adulta, com longevidade de 50 a 120 dias e fecundidade média de 120 a 170 ovos/fêmea (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999).

O percevejo – marrom *Euschistus heros* (Figura 1A) é a espécie mais abundante que compõe o complexo praga da soja (Corrêa-Ferreira *et al.*, 2009) na América do Sul e no Panamá (Panizzi *et al.*, 2000). Tal abundância pode ser explicada pelo seu comportamento no

período entre safras, no qual o *E. heros* permanece sem se alimentar, em estado de dormência, sobre folhas mortas e restos de cultura, utilizando a energia proveniente de lipídeos armazenados antes deste período (Corrêa-Ferreira e Panizzi, 1999, Corrêa-Ferreira *et al.*, 2009), permitindo que o *E. heros* escape do ataque de possíveis predadores e parasitoides.

Dichelops melacanthus (Figura 1B) e *Chinavia ubica* (Figura 1C) são considerados pragas secundárias da soja, porém, causam danos semelhantes às principais pragas (Panizzi *et al.*, 2007; Corrêa-Ferreira *et al.*, 2009). Podem ser encontrados em toda América do Sul, mas, diferente do *E. heros*, não adotam o estado de dormência e, no período entre safras essas espécies procuram hospedeiros secundários dos quais se alimentam como o algodão e o girassol (Panizzi *et al.*, 2007).

Uma vez que a soja representa uma importante cultura no sistema do agronegócio do país, buscar alternativas naturais e biotecnológicas que previnam e/ou minimizem os danos provocados pelos percevejos se fazem necessárias no contexto econômico e ambiental. A identificação de proteínas relacionadas à olfação, bem como a melhor compreensão funcional das mesmas, permite um maior entendimento do processo olfativo em insetos e representa uma alternativa para a aplicação destes conhecimentos no desenvolvimento de novas tecnologias que poderão ser utilizadas no controle de insetos praga ou de importância para a saúde pública como, por exemplo, o desenvolvimento de biossensores e repelentes, respectivamente.

Objetivo Geral

- Identificar transcritos relacionados à olfação em três espécies de percevejo praga da soja: *Euschistus heros*, *Dichelops melacanthus* e *Chinavia ubica*.
- Analisar as possíveis afinidades entre proteínas que se ligam a odorantes (OBPs) com sequência completa das três espécies de percevejo e moléculas odorantes através de análise *in silico*.
- Determinar a organização ultraestrutural das sensilas de *E. heros* através de técnicas de microscopia eletrônica.

Referencias Bibliográficas

Corrêa-Ferreira, B. S. e Panizzi, A. R. (1999) Percevejos da soja e seu manejo. Londrina: EMBRAP A-CNPSO. 45p. (EMBRAPA CNPSO. Circular Técnica, 24)

Corrêa-Ferreira, B. S., Krzyzanowsky, F. C. e Minami, C. A. (2009) Percevejos e a qualidade da semente de soja – Série Sementes. Londrina: Embrapa – CNPSO. 15p. (Embrapa – CNPSO. Circular Técnica, 67).

Panizzi, A. R., McPherson, J. E., James, D. G., Javahery, M. e McPherson, R. M. (2000) Stink Bugs (Pentatomidae). In: *Heteroptera of Economic Importance*. (eds. Schaefer, C. W. e Panizzi, A. R.), pp. 421-474. CR Press LCC, Flórida.

Panizzi, A. R., Duo, L. J., Bortolato, N. M. e Siqueira, F. (2007). Nymph developmental time and survivalship, adult longevity, reproduction and body weight of *Dichelops melacanthus* (Dallas) feeding on natural and artificial diets. Ver. Bras. Entomol. 51: 484 – 488.

Capítulo 1:
Ultraestrutura das sensilas das antenas do percevejo-marrom, *Euschistus*
***heros* (F.)**

1. Introdução

O sentido da olfação em insetos comanda decisões comportamentais fundamentais para a sobrevivência dos mesmos como, por exemplo, a escolha do parceiro sexual, localização do alimento e locais para oviposição, entre outros. A organização do sistema olfatório é bastante similar na maioria dos insetos, nos quais os lobos das antenas (LA) representam o centro olfatório primário (Kristoffersen *et al.*, 2008). Nesses locais ocorrem as sinapses entre os axônios dos neurônios receptores de odorantes (NRO) e os neurônios dos LA (interneurônios locais e projeções de neurônios), caracterizando o primeiro passo do processamento olfatório (Kristoffersen *et al.*, 2008).

Em mariposas e besouros, o feromônio sexual liberado pela fêmea é detectado por neurônios receptores olfatórios (NROs) especializados presentes em sensilas do tipo tricóide localizadas nas antenas desse grupo, enquanto os odorantes gerais são reconhecidos por outro tipo de neurônios receptores onde esses últimos apresentam grande variedade de especificidade química e estão localizados em diferentes tipos de sensila (Hansson *et al.*, 1999; Bengtsson *et al.*, 2011). Neste sentido, a detecção de feromônios e odorantes gerais parece acontecer de forma separada tanto espacial quanto temporal nesses insetos (Deising *et al.*, 2014).

Os axônios dos NROs transmitem a informação desencadeada por uma molécula odorante para os centros olfatórios primários (LAs) (Figura 1A e B) os quais são compostos por subunidades funcionais esféricas denominadas glomérulos (Anton e Homberg, 1999). Cada glomérulo recebe o axônio dos NROs que expressam os mesmos receptores olfatórios (ROs) fazendo com que os glomérulos apresentem especificidade de acordo com o RO correspondente (Gao *et al.*, 2000; Vosshall *et al.*, 2000). Em insetos que utilizam feromônio sexual para localizar seu parceiro, o reconhecimento da molécula odorante acontece pelo complexo macroglomerular (CMG) (Figura 1A) enquanto os odorantes gerais são reconhecidos por glomérulos individuais (Figura 1B) (Rospars, 1988). No interior do glomérulo, os NRO estabelecem sinapses com os dendritos dos neurônios locais e com projeções de neurônios (Husch *et al.*, 2009; Seki *et al.*, 2010; Reisenman *et al.*, 2011), sendo os primeiros responsáveis por interconectar diferentes glomérulos nos lobos das antenas e as projeções de neurônios têm a tarefa de transmitir a informação olfatória para os centros cerebrais como os corpos de cogumelo e o protocérebro lateral (Anton e Homberg, 1999).

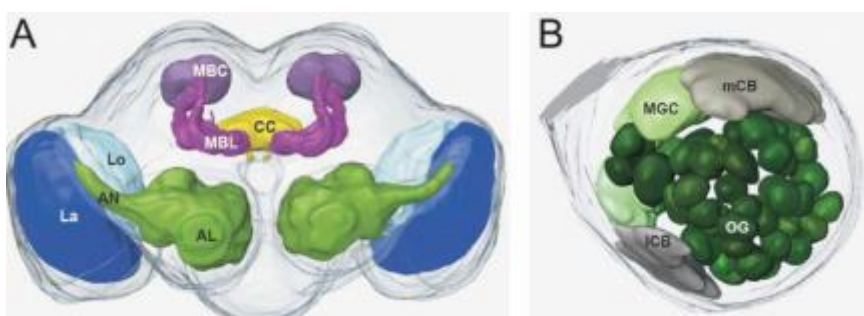


Figura 1. Representação esquemática da anatomia do cérebro de mariposas baseada na espécie *Agrotis ipsilon*. **(A)** Região cerebral contendo os lobos da antena (AL), nervos da antena (AN), corpos de cogumelo (MBL + MBC), complexo cortical (CC), lâmina (Lo) e lóbula (La). **(B)** Esquema do lobo da antena contendo os glomérulos individuais (OG), o complexo macroglomerular (MGC), agrupamento de corpos celulares mediais (mCB), corpos celulares laterais (ICB). **Fonte:** (Deising *et al.*, 2014).

Os neurônios olfatórios expressam um gene receptor específico e projetam em um único glomérulo (Hansson *et al.*, 1992; Vosshall *et al.*, 2000) e, uma vez que uma molécula odorante pode se ligar em mais de um tipo de receptor, mais de um glomérulo pode ser ativado (Joerges *et al.*, 1997; Carlsson *et al.*, 2002). Neste sentido, o número de glomérulos pode ser utilizado como referência para estimar a quantidade de neurônios olfatórios uma vez que há uma relação de 1:1 entre esses neurônios e os glomérulos (Hansson *et al.*, 1992; Vosshall *et al.*, 2000).

A maioria desses estudos foi realizada com lepidópteros, coleópteros e dípteros, porém, Kristoffersen *et al.* (2008) revelaram, através de imunomarcacão, a organização neural de quatro hemípteros: o psilídeo *Trioza apicalis* (Triozidae), os afídeos *Metapolophium dirhodum* (Aphididae), *Sitobion avenae* (Aphididae) e o percevejo *Euschistus heros* (Pentatomidae). Estes estudos revelaram que os lobos das antenas de *T. apicalis*, *M. dirhodum* e *S. avenae* não possuem glomérulos (Figuras 2A e B).

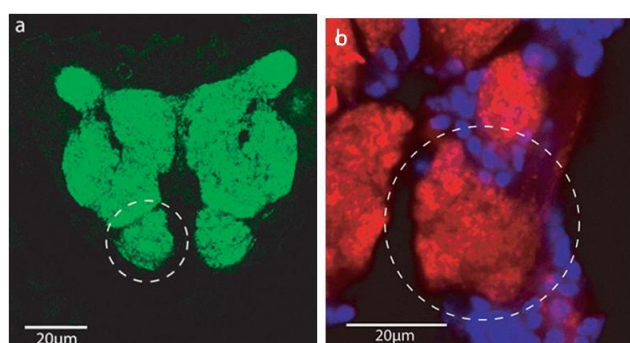


Figura 2. Morfologia do cérebro de hemípteros. **(A)** A área circulada representa o lobo da antena de *Trioza apicalis*, sem evidências da presença de glomérulos. A imagem foi obtida através de imunomarcacão com anti-sinapsina. **(B)** Lobo da antena de *Metapolophium dirhodum* (área circundada) cercada por interneurônios. Imagem obtida através de tratamento combinado com anti-sinapsina e sonda molecular TOTO-3. **Imagens:** Kristoffersen *et al.*, 2008.

Ainda de acordo com os experimentos conduzidos por Kristoffersen *et al.* (2008), a neuroanatomia do percevejo marrom *E. heros*, obtida através de imunomarcacão com anti-sinapsina, descreve a presença de lobos de antenas bem definidos contendo glomérulos individualmente delineados (Figura 3A). Em contrapartida, a imunomarcacão com neurobiotina revelou que as projeções dos axônios atravessam os lobos das antenas e o complexo mecanosensor e motor (AMMC – *Antennal Mechanosensory and Motor Complex*) (Figura 3B e C), indicando que essas podem estar associadas as sensilas com percepção de sabor, uma vez que essas são comumente encontradas em heterópteros (Brézot *et al.* 1997).

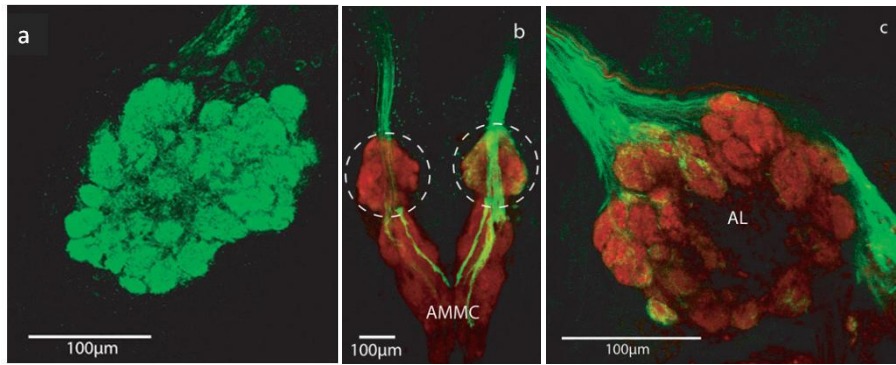
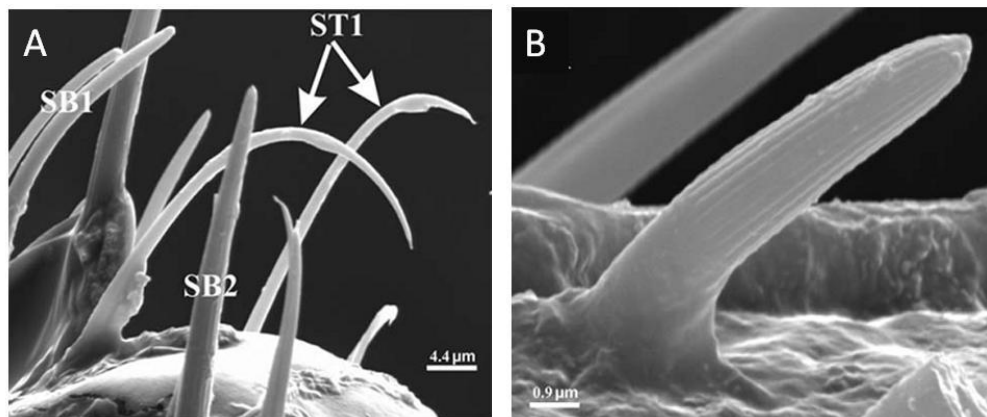


Figura 3. Neuroanatomia do percevejo marrom *Euschistus heros*. **(A)** Glomérulos presentes no lobo da antena. Observação realizada através de imunomarcagem com antisinapsina. **(B)** Projeções dos axônios atravessando os lobos da antena e o complexo mecanosensor e motor (AMMC); imunomarcagem com neurobiotina e antisinapsina. **(C)** Glomérulo com pouca inervação das projeções dos axônios. Indicação de um possível neurônio de sensila responsável por sentir o sabor dos alimentos. O círculo tracejado na figura B representa os lobos das antenas. (AL) Lobos da antena. **Imagens:** Kristoffersen *et al.*, 2008.

A morfologia das antenas do percevejo *E. heros* foi descrita por Silva *et al.*, 2010. Esses percevejos possuem antenas divididas em cinco segmentos (dois pedicelos e dois flagelos mais um escalpo) dotados de diferentes tipos de sensilas. Essa espécie apresenta dois tipos de sensilas tricóides (Figura 4A), três tipos de sensila basicônica (Figura 4B) e um tipo especial de sensila basicônica denominada *knob-shaped* (Figura 4C), todas elas classificadas de acordo com a morfologia externa e tipo de inserção na antena (Brézot *et al.*, 1997; Chinta *et al.*, 1997; Rani e Madhavendra, 2005). Devido a grande abundância das sensilas tricóides em *E. heros* essas podem ser consideradas os principais receptores sensoriais desta espécie e a presença de poros nas sensilas basicônicas as colocam como prováveis responsáveis pelas respostas olfativas em *E. heros* (Silva *et al.*, 2010).



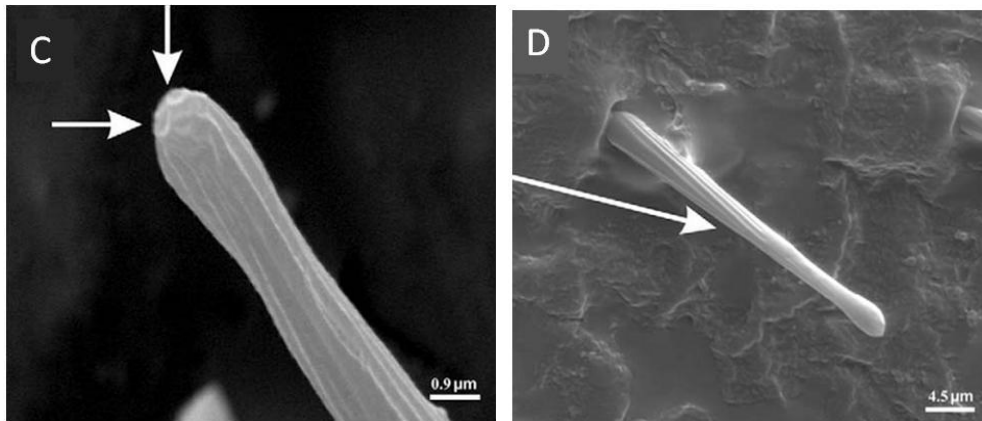


Figura 4. Morfologia das sensilas encontradas nas antenas de *Euschistus heros*. **(A)** Sensila tricóide (ST1) e sensilas basicônicas (SB1 e SB2). **(B)** Inserção da sensila basicônica. **(C)** Ponta da sensila basicônica *knob-shaped* apresentando dois poros (setas). **(D)** Sensila *knob-shaped*. **Fonte:** Silva *et al.*, 2010.

Embora a morfologia externa das sensilas de alguns percevejos tenha sido desvendada, não existem estudos que abordem a organização ultraestrutural dessas estruturas. O estudo da ultraestrutura das sensilas de *E. heros* pode contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta a estímulos olfativos provocada pela presença de moléculas odorantes liberadas no ambiente.

2. Objetivos Específicos

- Comparar a ultraestrutura dos diferentes tipos de sensila nas antenas do percevejo marrom *E. heros*;
- Estabelecer uma possível relação funcional entre os tipos de sensilas e as possíveis *EherOBPs*.

3. Material e Métodos

3.1. Insetos

As três espécies de percevejo (*E. heros*, *C. ubica* e *D. melacanthus*) utilizadas nesse estudo foram obtidas na plataforma de criação de insetos do laboratório de ecologia química da Embrapa - Cenargen originada a partir de percevejos adultos coletados em Brasília – DF. As colônias foram mantidas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 65 % H.R. e 14L:10D. Os insetos foram alimentados de acordo com Borges *et al.* (2007) e Moraes *et al.* (2008) sendo utilizadas sementes cruas de amendoim (*Arachis hypogaea*), grãos de soja (*Glycine max*), sementes de girassol (*Helianthus annuus*), vagem de feijão verde (*Phaseolus vulgaris*) e água. Os percevejos foram mantidos em gaiolas de plástico de 8 L (50-60 insetos/gaiola) com o suprimento de

alimento sendo renovado três vezes por semana. Machos e fêmeas virgens foram mantidos em gaiolas separadas e, após 12 dias, as antenas foram removidas com o uso de uma pinça entomológica e imediatamente utilizadas para extração de RNA.

3.2. Microscopia eletrônica de transmissão

As antenas foram extraídas de insetos machos e fêmeas previamente congelados e imediatamente colocadas em álcool 15% v:v e sonicadas por 30 s. O preparo das amostras consistiu de fixação em solução de glutaraldeído 3% (v:v) por 24 h em geladeira, seguido de tratamento com ácido fórmico 5% por 24h a temperatura ambiente com posterior lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1% (p:v). As amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% (p:v) e ferrocianeto de potássio 1,6% (p:v) na proporção de 1:1 por 1h a temperatura ambiente (no escuro) e em seguida lavadas com água 3 vezes. A última etapa da preparação consistiu da desidratação sequencial em acetona (30 – 100%) com troca de solução a cada 30 min, para posterior inclusão em resina plástica spurr começando com proporção 3:1 acetona:resina até a finalização com resina pura. As amostras foram montadas em cápsulas de gel e deixadas para polimerizar por 48 h a 50°C e, após este tempo, foram obtidas secções de 55 nm em ultramicrotomo sendo as mesmas posteriormente analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol, modelo 1011).

4. Resultados

A organização morfológica das sensilas de *E. heros* foi determinada através de microscopia eletrônica de varredura; a qual demonstrou a existência de seis tipos de sensila, sendo dois tipos de sensilas tricóides e quatro tipos de sensilas basicônicas (Silva *et al.*, 2010). A ultraestrutura das sensilas basicônicas e tricóides foi determinada através de análises com microscópio eletrônico de transmissão. Não foram observadas diferenças ultraestruturais entre machos e fêmeas.

Foi possível observar a presença de dendritos na linfa sensilar dos dois tipos de sensilas além de uma parede cuticular espessa contendo canais que aparentemente conectam o meio externo com a linfa sensilar através dos poros (Figura 5).

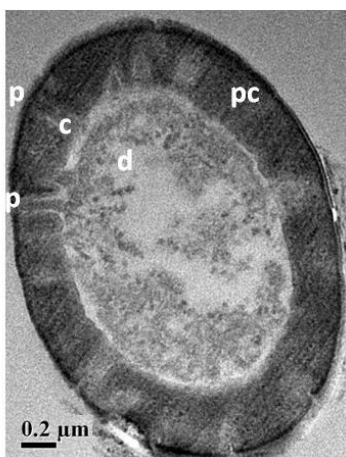


Figura 5. Ultraestrutura sensilar de *Euschistus heros*. (d) dendrito; (c) canal de conexão; (p) poro; (pc) parede cuticular.

Foi possível observar uma diferença ultraestrutural entre as sensilas tricóides e basicônicas. As sensilas tricóides apresentaram menor número de dendritos (Figura 6A) quando comparadas com as sensilas basicônicas (Figura 6B). Os dendritos observados nas sensilas tricóides parecem apresentar ramificações, enquanto que os das sensilas basicônicas não são ramificados. Infelizmente ainda não foi possível determinar os subtipos de sensilas basicônicas e tricóides correspondente a cada ultraestrutura.

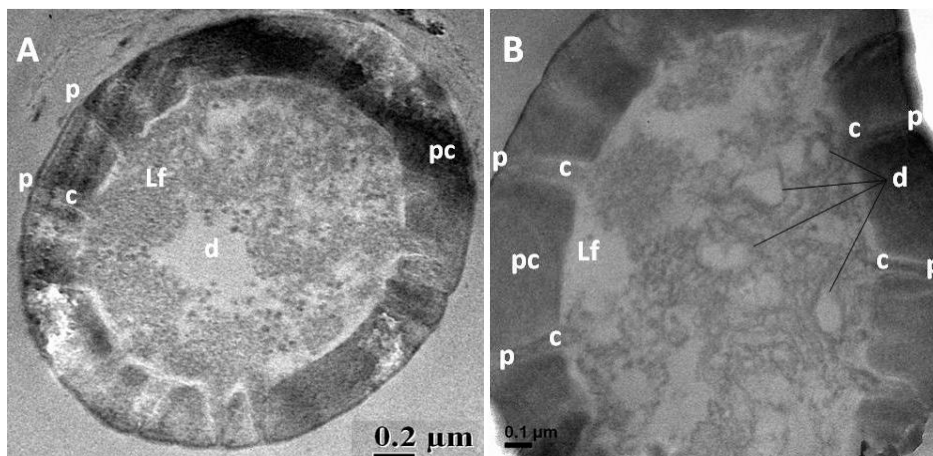


Figura 6. Ultraestrutura das sensilas tricóides e basicônicas. (A) Sensila tricóide contendo um dendrito ramificado (d). (B) Sensila basicônica apresentando vários dendritos não ramificados (d). Estruturas comuns: linfa sensilar (Lf), canal de conexão (c), poros (p), parede cuticular (pc).

Os resultados obtidos com esses estudos, além de revelar a ultraestrutura das sensilas de *E. heros* permitiu estabelecer o protocolo para tratamento das amostras de espécies de percevejos que posteriormente poderão ser submetidas a estudos semelhantes.

5. Discussão

A ultraestrutura das sensilas de hemípteros já foi demonstrada anteriormente em diferentes espécies, incluindo *Myzus persicae* (Sun *et al.*, 2013), *Lygus lineolaris* (Chinta *et al.*, 1997), *Eurigaster maura* (Romani e Stacconi, 2009) e *Adelphocoris lineolatus* (Sun *et al.*, 2014). Os resultados observados neste estudo são semelhantes aos descritos por Sun *et al.* (2014) no que diz respeito a quantidade de dendritos nas sensilas tricóides e basicônicas, mas divergiram em relação ao tipo de neurônio, uma vez que os neurônios ramificados foram observados nas sensilas basicônicas e os não ramificados associados às sensilas tricóides, resultado contrário ao obtido com o *E. heros*. Em lepidópteros, as sensilas tricóides possuem a função de reconhecimento de feromônios sexuais, enquanto as basicônicas estão relacionadas ao reconhecimento de odorantes gerais (Schneider, 1964; Steinbrecht, 1997). Gu *et al.* (2011) indicaram a possibilidade desses dois tipos de sensila reconhecerem tanto feromônio sexual quanto moléculas odorantes em geral devido a expressão de uma proteína relacionada à olfação com essa dupla afinidade ter sido observada nos dois tipos de sensila. Porém, Sun *et*

al. (2014) defendem a possibilidade de este reconhecimento estar de acordo com o tipo de sensila, obedecendo ao mesmo modelo proposto para lepdópteros.

A determinação funcional dos tipos de sensilas possibilita um maior conhecimento sobre o comportamento induzido pelo reconhecimento de moléculas odorantes. Contudo, a realização de experimentos que associam a expressão de proteínas relacionadas à olfação aos tipos de sensilas representa apenas a parte inicial do processo fisiológico que desencadeia a resposta comportamental no inseto. Por este motivo, deve-se estender essas investigações a nível glomerular, uma vez que o reconhecimento da molécula odorante pode não desencadear uma mudança de comportamento no inseto.

Diante deste cenário, a condução de experimentos que visam verificar a expressão de proteínas relacionadas à olfação nas sensilas dos percevejos abordados neste trabalho faz-se necessária, bem como a reação em nível glomerular dos estímulos olfatórios desencadeados pelo reconhecimento da molécula odorante.

6. Conclusão

A determinação da ultraestrutura das sensilas do percevejo-marrom *E. heros* representa o primeiro estudo com este tipo de abordagem em pentatomídeos. O protocolo estabelecido neste trabalho poderá ser aplicado nos estudos de outras espécies da mesma família, incluindo os outros percevejos citados neste trabalho, uma vez que a dificuldade encontrada para o preparo das amostras, a serem analisadas em microscopia eletrônica de transmissão foi superada.

Contudo, é importante destacar a necessidade de estudos que revelem maiores detalhes moleculares das sensilas, como a presença e localização de proteínas relacionadas à olfação com conseqüente estabelecimento de uma relação entre o tipo de sensila e o tipo de molécula odorante reconhecida.

7. Referências

Anton, S. e Homberg, U. (1999). Antennal lobe structure. In: Hansson BS, editor. Insect olfaction. Berlin (Germany): Springer. p. 97–124.

Bengtsson, J.B., Khbaish, H., Wolde-Hawariat, Y., Reinecke, A., Negash, M., Seyoum, E., Hansson, B.S., Hillbur, Y., and Larsson, M.C. (2011) Conserved, highly specialized olfactory receptor neurons for food compounds in 2 congeneric scarab beetles, *Pachnoda interrupta* and *Pachnoda marginata*. Chem. Senses36, 499–513.

Borges, M., Laumann, R. A., Moraes, M. C. B., Pires, C. S. S., Sujii, E. R., Correa-Ferreira, B. S., Ávila, C. J., Peixoto, M. F. (2007) Armadilhas iscadas com formulação do feromônio sexual do percevejo – marrom (*Euschistus heros*) para o monitoramento de percevejos praga da soja.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 192, 18p.

Brézot ,P., Tauban, D., Renou, M. (1997). Sense organs on the antennal flagellum of the green stink bug, *Nezara viridula*(L.) (Heteroptera: Pentatomidae): sensillum types and numerical growth during the post-embryonic development. *Int J Insect Morphol Embryol.* 25:427–441.

Carlsson, M. A., Galizia, C. G. , Hansson, B.S. (2002). Spatial representation of odours in the antennal lobe of the moth *Spodoptera littoralis*. *Chem. Senses.* 27:231–244.

Chinta, S., Dickens, J.C. and Baker, G.T. (1997) Morphology and distribution of antennal sensilla of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*(Palisot de beauvois) (Hemiptera: Miridae). *Int J Insect Morphol* 26: 21–26.

Deising, N., Dupuy, F., Anton, S., Renou, M. (2014) Responses to Pheromones in a Complex Odor World: Sensory Processing and Behavior. *Insects.* 5: 399-422

Gao, Q., Yuan, B.B., Chess, A., (2000). Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nat. Neurosci.* 3, 780–785.

Gu, S.H., Wang, W.X., Wang, G.R., Zhang, X.Y., Guo, Y.Y., Zhang, Z.D. (2011) Functional characterization and immunolocalization of odorant binding protein 1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Arch. Insect. Biochem. Physio.* 177: 81–99.

Hansson, B. S., Ljungberg, H., Hallberg, E., Lofstedt, C. (1992). Functional specialization of olfactory glomeruli in a moth. *Science.* 256:1313–1315.

Hansson, B.S., Larsson, M.C., and Leal, W.S. (1999). Green leaf volatile detecting olfactory receptor neurones display very high sensitivity and specificity in a scarab beetle. *Physiol. Entomol.*24, 121–126

Husch, A.; Paehler, M.; Fusca, D.; Paeger, L.; Kloppenburg, P. (2009) Distinct electrophysiological properties in subtypes of nonspiking olfactory local interneurons correlate with their cell type-specific Ca²⁺ current profiles. *J. Neurophysiol.* 102: 2834–2845.

Joerges, J., Kuttner, A., Galizia, C.G., Menzel, R. (1997). Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature.* 387: 285–288.

Kristoffersen, L., Hansson, B.S., Anderbrant, O., Larsson, M. C. (2008) Agglomerular Hemipteran Antennal Lobes—Basic Neuroanatomy of a Small Nose. *Chem. Senses.* 33: 771–778

Rani, U.P., Madhavendra, S.S., (2005) External morphology of antennal and rostral sensilla in four hemipteran insects and their possible role in host plant selection. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 25, 198–207.

Moraes, M.C.B., M. Borges, M. Pareja, G. H. Vieira, F.T.P. De Souza Sereno & R.A. Laumann. (2008). Food and humidity affect sex pheromone ratios in the stink bug, *Euschistus heros*. *Physiol. Entomol.* 33: 43-50.

Reisenman, C.E.; Dacks, A.M.; Hildebrand, J.G. (2011) Local interneuron diversity in the primary olfactory center of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A.* 197, 653–665.

Romani, R. e Stacconi, M.V.R. (2009) Mapping and ultrastructure of antennal chemosensilla of the wheat bug *Eurygaster maura*. *Insect Sci* 16: 193–203.

Rospars, J.P. (1988). Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 17:243–294.

Schneider, D. (1964) Insect antennae. *Annu Rev. Entomol.* 9:103–122.

Seki, Y.; Rybak, J.; Wicher, D.; Sachse, S.; Hansson, B.S. (2010) Physiological and morphological characterization of local interneurons in the *Drosophila* antennal lobe. *J. Neurophysiol.* 104: 1007–1019.

Silva C. C. A., Capdeville, G., Moraes, M. C.B., Falcão, R., Solino, L. F., Laumann, R. A., Silva, J. P., Borges, M. (2010) Morphology, distribution and abundance of antennal sensilla in three stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *Micron* 41, 289–300.

Steinbrecht, R.A. (1997) Pore structures in insect olfactory sensilla: a review of data and concepts. *Int. J. Insect Morphol.* 26: 229–245.

Sun, L., Gu, S.H., Xiao, H.J., Zhou, J.J., Guo, Y.Y., Liu, Z.W. (2013) The preferential binding of a sensory organ specific odorant binding protein of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* AlinOBP1 to biologically active host plant volatiles. *J Chem Ecol.* 39: 1221–1231.

Sun, L., Xiao, H-J., Gu, S-H., Zhou, J-J., Guo, Y-Y., Liu, Z-W., Zhang Y-J. (2014) The antenna-specific odorant-binding protein AlinOBP13 of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* is expressed specifically in basicônica sensilla and has high binding affinity to terpenoids. *Insect Mol. Biol.* 23(4): 417–434

Vosshall, L.B., Wong, A.M., and Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102, 147–159.

Capítulo 2:

Prospecção de transcritos relacionados à olfação em percevejos-praga da soja e relação filogenética entre proteínas ligantes de odorantes (OBPs)

1. Introdução

Na natureza, os insetos utilizam as informações químicas liberadas no ambiente para localizar alimento, *habitats* favoráveis, indivíduos da mesma espécie ou inimigos potenciais. Essas informações utilizadas na comunicação química dos insetos são denominadas semioquímicos que podem ser divididos em dois grupos: feromônios e aleloquímicos. Os feromônios estão envolvidos na sinalização química entre indivíduos da mesma espécie, provocando no receptor uma resposta comportamental ou de desenvolvimento (Karlson e Lüscher, 1959). Whittaker e Feeny, 1971, definiram aleloquímicos como compostos envolvidos na interação química interespecífica.

A identificação do primeiro feromônio, o bombicol, no bicho-da-seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Butenandt *et al.*, 1959) impulsionou as pesquisas para elucidar os processos envolvidos na comunicação química. Em insetos fitófagos, a localização da planta ocorre através do reconhecimento dos odores emitidos (Bruce *et al.*, 2005), entretanto, os insetos precisam lidar com dois problemas: a complexidade do odor e a especificidade da pista. A interpretação precisa dos odores liberados no ambiente é possível devido a um sistema olfatório altamente desenvolvido que permite detectar compostos com uma alta sensibilidade e decodificar a mensagem que levará ao comportamento requerido (Martin *et al.*, 2011).

A antena representa o principal órgão sensorial relacionado à olfação em insetos (von Frisch, 1921), sendo dotadas de sensilas que apresentam poros em sua superfície e são preenchidas por uma linfa sensilar aquosa que circunda os neurônios receptores olfativos (Figura 1). É através dos poros que as moléculas odorantes penetram na sensila, entretanto, a resposta comportamental ao odor captado só é possível devido à presença de proteínas que estão diretamente envolvidas nos processos relacionados à olfação. Ao todo, existem quatro classes de proteínas identificadas e relacionadas aos processos olfativos: proteínas que se ligam a odorantes (OBPs), proteínas que degradam odorantes (ODEs), proteínas receptores de odorantes (ORs) e proteínas de membrana dos neurônios sensoriais (SNMPs) (Leal, 2013).

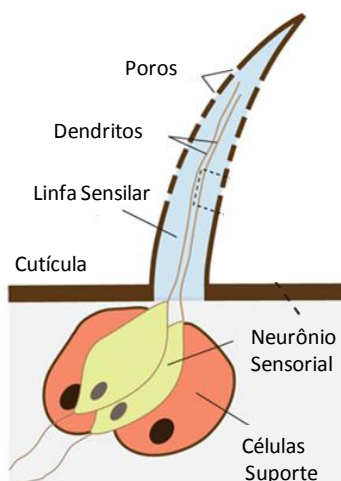


Figura 1. Esquema da organização e morfologia da sensila da antena de um inseto. Cada sensila possui dois neurônios cujos dendritos projetam-se por meio do lúmen preenchido pela linfa sensilar. Os poros representam a porta de entrada para as moléculas odorantes. (Fonte: Sánchez– Garcia *et al.*, 2009).

A natureza aquosa da linfa sensilar representa uma barreira às moléculas odorantes em seu caminho para alcançar os receptores de odor. Entretanto, este caminho é facilitado pela presença de proteínas hidrofílicas denominadas proteínas que se ligam a odorantes (OBPs). As OBPs foram identificadas pela primeira vez na mariposa gigante *Antheraea polyphemus* (Lepidoptera: Saturniidae) por Vogt e Riddiford (1981) e posteriormente caracterizadas como moléculas encontradas em altas concentrações próximas aos neurônios quimiossensores, apresentando baixa massa molecular (14 – 16 kDa), alta afinidade de ligação a pequenos ligantes e ponto isoelétrico ácido. Porém, a característica mais marcante das OBPs consiste na existência de seis resíduos de cisteína em posições conservadas na estrutura primária que formam três ligações dissulfeto estabilizando sua estrutura terciária. A partir da primeira década do ano 2000, foram identificadas duas novas classes de OBPs baseadas na quantidade e posicionamento dos resíduos de cisteína: as plus-C (Zhou *et al.*, 2004a; Largade *et al.*, 2011) e as minus-C (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002; Spinelli *et al.*, 2012). As plus-C são OBPs que apresentam dois ou mais resíduos de cisteína adicionais (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004a) e um resíduo de prolina em região conservada; enquanto as minus-C apresentam menos dois resíduos (totalizando quatro resíduos) (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002). Em relação ao tipo de molécula odorante à qual tem afinidade, as OBPs são agrupadas em duas grandes classes: proteínas ligantes à feromônio (PBP) e proteínas ligantes a odores gerais (GOBP).

Abordagens em biologia molecular têm sido utilizadas na identificação de OBPs em bibliotecas de cDNA (EST-based) (e.g., Liu *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2013), projetos genoma (Maleszka *et al.*, 1997; Hekmat-Scafe *et al.*, 2002; Forêt & Maleszka, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2012) e transcrito (RNA-Seq), (Yin *et al.*, 2013; He & He, 2014; Hull *et al.*, 2014). Com o advento da produção massiva desses conjuntos de dados, foram identificadas OBPs de mais de 40 espécies de insetos representando 10 ordens diferentes (Zhou *et al.*, 2010). A busca por motivos cisteína das OBPs, bem como por homologia de sequências, tem sido utilizada para identificação e anotação de genes OBPs em uma variedade de espécies de insetos com genoma ou transcrito caracterizado (Zhou *et al.*, 2004, 2008, 2010; Li *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

A função das OBPs já foi comprovada através de experimentos bioquímicos, biofísicos e estruturais (Wojtasek e Leal, 1999; Horst *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2005, 2009; Wogulis *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010, 2011) e, atualmente sabe-se que as OBPs representam o elo entre o ambiente externo e os receptores de odor nos neurônios (Leal, 2005). As moléculas odorantes penetram as sensilas através dos poros e ligam-se as OBP's na linfa sensilar, em seguida o complexo OBP-odorante atravessa a linfa e ao chegar na região próxima às OR's, o odorante é então liberado (Figura 2).

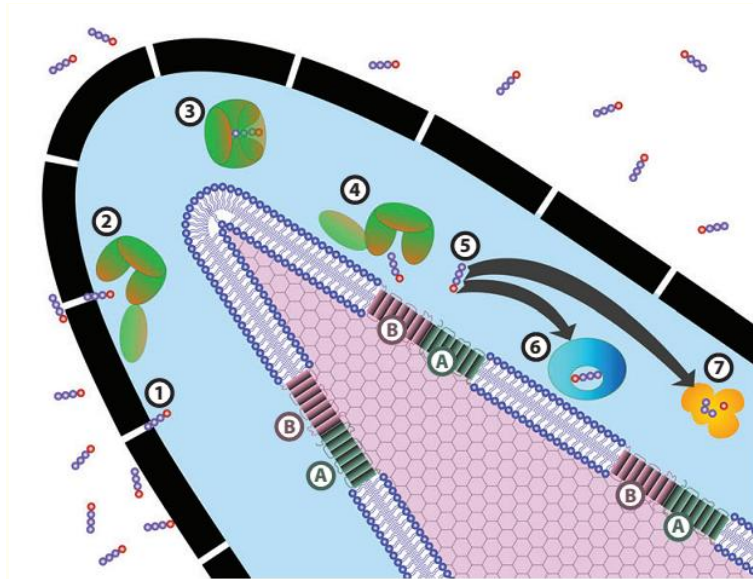


Figura 2. Representação dos processos relacionados à olfação em insetos. (1) As moléculas odorantes alcançam a linfa sensilar através dos poros presentes nas sensilas; (2) ligam-se às OBPs e são transportados por elas até os OR's (3 – 4). Após desencadear a resposta olfativa apropriada ao se ligarem aos ORs (representados pelas letras A e B), as moléculas odorantes são direcionadas (5) e inativadas por uma armadilha molecular (6) ou por ação das enzimas degradantes de odorantes (7). Fonte: Leal (2013).

O advento do sequenciamento de alto desempenho possibilitou, nos últimos anos, a identificação de uma grande quantidade de OBPs em diferentes espécies de insetos, uma vez que essa estratégia possibilita a aquisição de uma grande quantidade de dados que, posteriormente, são analisados através de ferramentas de bioinformática.

As OBPs identificadas através dessas estratégias são submetidas à caracterização molecular utilizando ferramentas de bioinformática. A utilização dessas ferramentas permite estimar características moleculares e determinar as relações filogenéticas e evolutivas entre as OBPs analisadas, reforçando a hipótese de que as sequências obtidas correspondem a OBPs funcionais nas antenas dos insetos.

1. Objetivos Específicos

- Identificar e caracterizar os transcritos relacionados à função de proteína ligante a odorante (OBP-s) em nível molecular através de ferramentas de bioinformática a partir do sequenciamento de biblioteca tipo RNA-Seq das antenas dos percevejos *E. heros*, *C. ubica* e *D. melacanthus*;
- Analisar as relações filogenéticas intra e interespecíficas existentes entre as OBPs das três espécies de percevejo e outros insetos da ordem Hemiptera.

2. Material e Métodos

2.1. Insetos

Os percevejos machos e fêmeas utilizados nas análises foram criados de acordo com o protocolo descrito no capítulo 1.

2.2. Preparo do RNA e sequenciamento RNA-Seq

Um total de 50 antenas de percevejos machos e fêmeas não acasalados foram maceradas em TRIzol® (Invitrogen, EUA) e o RNA total de cada espécie foi obtido utilizando o Pure-Link® RNA Mini Kit (Life Technologies, EUA). Imediatamente após a extração, amostras contendo cerca de 1 µg de RNA/cada foram colocadas em tubos de RNA Stable (Biomatrica®), que possibilita o envio do material liofilizado, com o objetivo de proporcionar um transporte seguro e enviadas para sequenciamento na empresa Beijing Genomics Institute (BGI). A integridade/qualidade dos RNAs foi avaliada através de análise em 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA), sendo o *RNA Integrity Number* (RIN) ≥ 7.0 (Imbeaud *et al.*, 2005, Schroeder *et al.*, 2006) considerado para classificar a amostra apta ao sequenciamento. As amostras de RNA foram utilizadas para a construção de uma biblioteca de RNA-Seq para cada espécie e sequenciamento utilizando a plataforma Illumina GAIIx (uma linha/amostra, 100 pb (*paired end*)).

2.3. Montagem *de novo* e anotação do transcrito

Os conjuntos de dados dos três transcritomas foram recebidos no formato Fastq. O controle de qualidade foi realizado através do programa Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) utilizando leading 3, trailing 3, sliding window 4:15 e comprimento mínimo de 36. Antes da montagem, as *reads* de alta qualidade, pareadas e não pareadas, foram analisadas através do VelvetOptimiser 2.2.5 (<http://bioinformatics.net.au/software.velvetoptimiser.html>) para encontrar o melhor k-mer por conjunto de dados no intervalo de 15 a 47 k-mers. A montagem foi feita utilizando o programa Velvet (versão 1.2.0.7), e em seguida o Oases (versão 0.2.0.8) foi aplicado nos resultados obtidos do Velvet (ambos K-mers). Para a busca por transcritos relacionados à olfação, os transcritos montados (*contigs*) foram analisados contra o banco de dados de proteínas não redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando o programa Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005), e em seguida anotados baseados na similaridade de sequência (E-value $\leq 1E-5$) utilizando o *Gene Ontology* (GO) (por função molecular) (Figura 3).

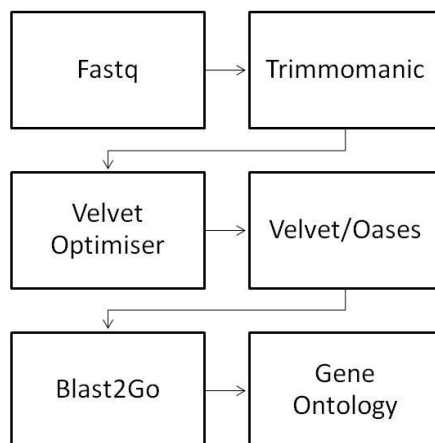


Figura 3. Pipeline da montagem *de novo* dos transcritomas das antenas dos percevejos.

As comparações entre as espécies-alvo das espécies de maior *hit* de distribuição no BLAST e a categoria de função molecular do transcritoma foram realizadas através de teste qui-quadrado para independência de classificação (SAS versão 9.3) normalizando cada conjunto de dados pelo total de hits em uma espécie alvo e classificando por todas as espécies com maiores hits e funções para as espécies alvo combinadas. Os *contigs* hipotéticos de OBPs foram selecionados por fase de leitura aberta (ORFs) utilizando o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) no intuito de identificar a região codante. Adicionalmente, o domínio OBP (SM00708) e a família gênica (PF01395) foram conferidos através do InterProScan 5 (Jones *et al.*, 2014). Os dados brutos do transcritoma, bem como os resultados da montagem foram depositados nos bancos de dados *Sequence Read Archive* (SRA) e no *Transcriptome Shotgun Assembly* (TSA) DDBJ/EMBL/GenBank, respectivamente.

2.4. Caracterização computacional e análises de alinhamento

As potenciais sequências de cDNA completas das OBPs foram submetidas a uma série de análises *in silico* para predição de: (1) sequência deduzida de aminoácidos (*Expasy Translate Tool*, <http://web.expasy.org/translate/>); (2) ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) (Compute pI/Mw, http://web.expasy.org/compute_pi/); e (3) provável peptídeo sinal (SignalP 4.1, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011).

As sequências completas previstas de aminoácidos das potenciais OBPs foram alinhadas com OBPs de outras espécies disponíveis no GenBank utilizando o programa MAFFT 7.017 (Kato *et al.*, 2002) com algoritmo automático, matriz BLOSUM62, 1,53 de penalidade para *gap* de abertura, e 0,123 de valor de compensação através do programa Geneious 7.0.5. As sequências de OBPs ortólogas foram selecionadas utilizando o BLASTx obedecendo aos seguintes critérios: similaridade mínima de Valor - $E < 10^{-7}$ com identidade de 26% e cobertura de no mínimo 77%. Para a construção da árvore filogenética com as OBPs dos percevejos e as OBPs de 185 hemípteros disponíveis no DDBJ/EMBL/GenBank o programa MEGA 6.06 foi utilizado para determinar o melhor modelo baseado na Máxima Verossimilhança (MV). O modelo de cálculo de distância evolutiva entre as sequências de aminoácidos das OBPs potenciais foi o *bootstrap*. Este método utiliza a reamostragem com

reposição para estimar e o erro-padrão das distâncias evolutivas (Nei e Kumar, 2000). Em seguida, as árvores foram construídas utilizando o modelo LG+G+I com replicação de 1000 *bootstraps*, deleção parcial de *gaps*, 95% de cobertura e o método heurístico *Nearest-Neighbor Interchange* (NNI) para gerar uma árvore não enraizada.

3. Resultados

3.1. Estatística da biblioteca, montagem e anotação do transcrito

A Tabela 1 apresenta o número total de *reads* obtidas no sequenciamento dos percevejos, bem como o número e o comprimento máximo dos *contigs*. O número total de *reads* nas três bibliotecas foi equivalente, entretanto, após controle de qualidade, o número total de *reads* nas três bibliotecas apresentou-se desigual, resultando em uma cobertura de transcrito desigual entre as espécies, com a maior quantidade e tamanho dos *contigs* encontrados na espécie *C. ubica*, seguida de *E. heros* e *D. melacanthus*.

Tabela 1. Número de *reads* obtidas a partir de sequenciamento de biblioteca RNA-Seq das antenas dos percevejos *E. heros*, *C. ubica* e *D. melacanthus* utilizando a plataforma Illumina GAIIx, e número de *contigs* montados para cada espécie. O comprimento mínimo de *contigs* para todas as espécies foi 300 pb. Todos os dados brutos dos transcritomas foram depositados no banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA) e podem ser acessado através do *BioProject* PRJNA246320.

Espécies	Número de <i>Reads</i>		BioProject Accession	<i>Contig</i>		Acesso TSA
	Pareada	Não Pareada		Total	Comprimento Máximo (pb)	
<i>Euschistus heros</i>	4.891.510	5.783.001	PRJNA246225	19.520	6.867	GBER01000000
<i>Chinavia ubica</i>	9.194.804	7.554.025	PRJNA246250	41.529	12.263	GBFA01000000
<i>Dichelops melacanthus</i>	3.254.542	4.921.482	PRJNA246259	8.684	4.229	GBES01000000

Os dados do transcrito foram analisados em relação à função molecular baseada na classificação da *Gene Ontology* (GO) (Figura 4), indicando uma grande representação para processos de ligação a íons e odores, bem como para atividades catalíticas. Onze funções moleculares são compartilhadas entre as três espécies alvo e aparecem na seguinte ordem decrescente: ligação, catálise, transportador, transdutor molecular, estrutural, receptor, fator de ligação às proteínas transcricionais, regulador enzimático, carreador de elétrons, proteína de ligação a fator de transcrição, atividade antioxidante. *C. ubica* apresenta uma atividade diferencial de regulador de canal que não foi identificada nas outras duas espécies de percevejos. Apesar dessas particularidades, o número e a proporção das funções moleculares entre as espécies comparadas não diferem significativamente ($X^2 = 6,668$, gl = 39, P = 1,0).

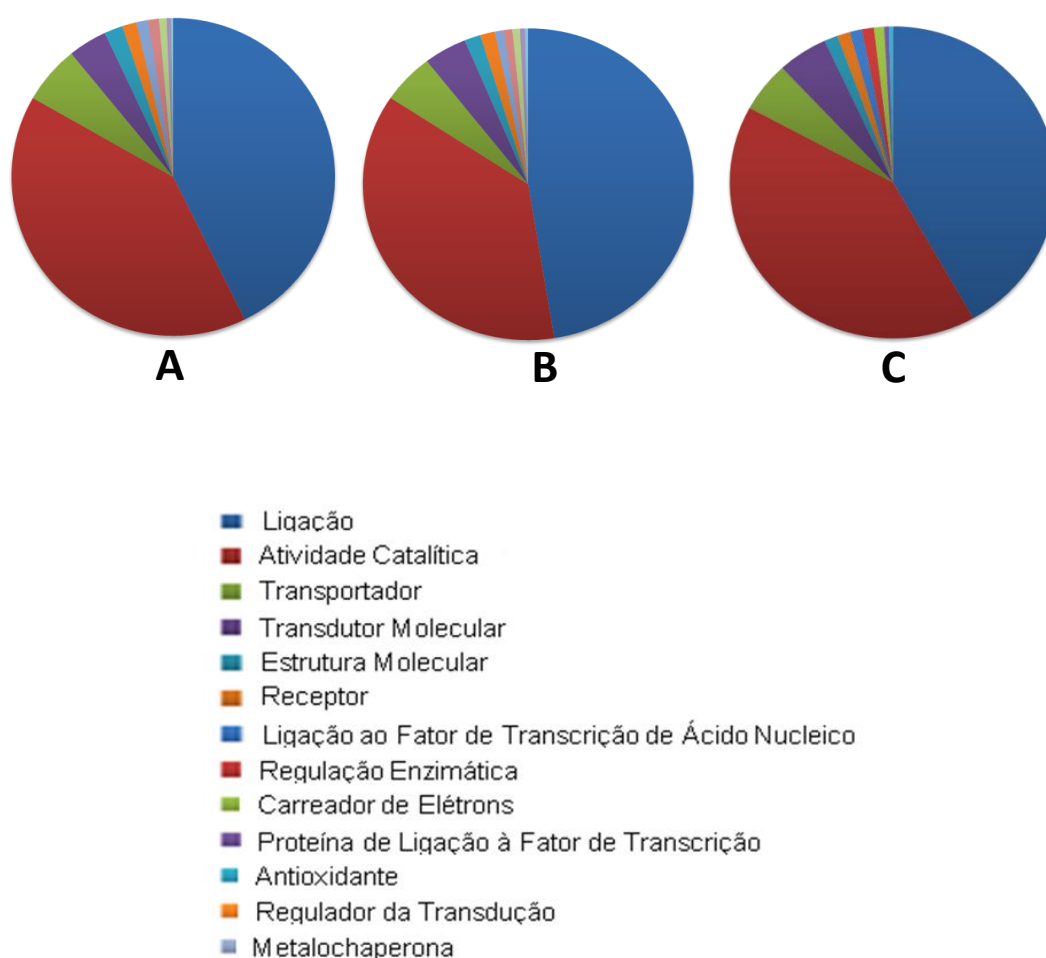


Figura 4. Distribuição das principais categorias de funções moleculares do nível 2 dos transcritomas de antenas de percevejos adultos (12 dias após última muda) virgens utilizando análise por Gene Ontology (GO). (A) *E. heros* (n= 4.858), (B) *C. ubica* (n= 6.018), (C) *D. melacanthus* (n= 2.153).

Foram consideradas *contigs* com pelo menos uma combinação com uma proteína com o valor de $E \leq 1E-5$. A desigualdade no número de contigs obtidos para as três espécies teve consequência tanto nos resultados do BLAST quanto no processo de anotação no qual, para um total de 7.370 resultados do BLAST foram anotadas 4.594 *contigs* em *C. ubica*, 3.812 anotações de um total de 5.142 em *E. heros*, e 1.680 anotações para 2.346 resultados do

BLAST em *D. melacanthus*. As predições dos transcritos relacionados à olfação estão descritas nas tabelas suplementares 1 a 3. O número total de transcritos relacionados à olfação foi semelhante entre os percevejos *E. heros* (23 OBPs, 12 CSPs e 5 ORs) e *C. ubica* (25 OBPs, 14 CSPs e 11 ORs), e menor no percevejo *D. melacanthus* (9 OBPs e 7 CSPs). Uma vez que duas OBPs de *E. heros* foram previamente identificadas através da construção de uma biblioteca de cDNA (*EherOBP1*, ADJ18275.1, e *EherOBP2*, ADO24165.1) (Farias *et al.*, 2014), o número total de OBPs nessa espécie é igual ao encontrado em *C. ubica*. CSPs correspondem à outra categoria de proteínas quimiorreceptoras que parecem apresentar propriedades semelhantes de ligação e transporte de odores, porém, sua função específica ainda não foi completamente compreendida (McKenna *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1999).

O baixo número de potenciais OBPs encontrado no transcrito de *D. melacanthus*, bem como a ausência de ORs, era esperado devido a menor cobertura do seu transcrito, como evidenciado pelo número e comprimento dos contigs obtidos.

A maioria dos transcritos OBP estava incompleta, sem a extremidade correspondente ao N ou C - terminal e, em alguns casos, sem as duas extremidades. Entretanto, foi possível obter quatro sequências completas de potenciais OBPs em *E. heros* e *C. ubica*, e uma em *D. melacanthus*, as quais foram utilizadas nas análises descritas neste capítulo. As potenciais OBPs foram nomeadas utilizando a primeira letra do gênero seguida pelas três primeiras letras do nome da espécie acrescida do número em ordem crescente de identificação. A potencial OBP de *D. melacanthus* é a exceção neste caso, uma vez que foi nomeada utilizando as duas primeiras letras do gênero para que não fosse confundida com a espécie *Drosophila melanogaster*.

3.2. Caracterização *in silico*

A caracterização *in silico* das potenciais OBPs com sequência completa (Tabela 2) revelou propriedades químicas que incluem o pequeno tamanho (136-212 resíduos de aminoácidos, 14 – 23 kDa), a presença de um peptídeo sinal na extremidade N-terminal (resíduos 1 – 20) acompanhado do domínio PBP/GOBP que se estende até pouco antes da extremidade C-terminal, e um $pI < 6$ para a maioria das OBPs, exceto pela *DimeOBP1*, cujo pI apresentado foi de 6,57.

As potenciais OBPs dos percevejos possuem seis resíduos de cisteína (Cys) em posições conservadas, entretanto, a *DimeOBP1* apresenta cinco resíduos conservados (ausência do sexto resíduo) e, de acordo com Hekmat-Scafe *et al.* (2002) pode ser classificada como OBP *minus* – C. De acordo com Xu *et al.* (2009) na maioria dos insetos o típico padrão do *motif-C* das OBPs possui três resíduos de aminoácidos entre o segundo (C2) e terceiro (C3) resíduo de cisteína, e oito resíduos de aminoácidos entre o quinto (C5) e sexto (C6) resíduos. Estes autores levantaram a hipótese da existência de uma ordem específica no padrão dos motivos de cisteína para OBPs que, em Hemiptera seria C1-X₂₂₋₃₂-C2-X₃-C3-X₃₆₋₄₆-C4-X₈₋₁₄-C5-X₈-C6, onde X representa qualquer resíduo de aminoácido. Neste trabalho, todas as potenciais OBPs apresentam três resíduos de aminoácidos conservados entre C2-C3, entretanto, em

relação ao padrão do motivo – C, algumas sequências apresentaram um padrão diferente: *Eher*OBP5 com C1-X₄₁-C2; *Eher*OBP5, *Eher*OBP6 e *Cubi*OBP1 com C4-X₂₂-C5 e C5-X₉-C6. Ainda neste sentido, *Eher*OBP6 e *Cubi*OBP1 apresentam um número maior de resíduos de cisteína conservados: C1a, C1b, C1c, C6a, C6b e C6c, um resíduo de prolina (P) imediatamente após C6a, e uma região C-terminal extensa. Essas características indicam a possibilidade de que *Eher*OBP6 e *Cubi*OBP1 são OBPs *Plus-C* (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002). Sendo assim, das seis potenciais OBPs encontradas nos *E. heros*, cinco são OBPs clássicas e uma é *Plus-C*, enquanto em *C. ubica*, das quatro potenciais OBPs, três são clássicas e uma *Plus-C*.

Tabela 2. Predições de propriedades físico-químicas das potenciais OBP-s de percevejos. AA: quantidade de resíduos de aminoácidos; pI: ponto isoelétrico; MM: massa molecular (kDa); Cys: cisteína; Peptídeo Sinal: posição do peptídeo sinal. Domínios InterPro IPR023316 e SM00708, e famílias IPR006170e PF01395.

OBP	Código de Acesso	AA	pI	MM (kDa)	Cys Conservada	Peptídeo Sinal	Características de Domínios PBP/GOBP
<i>Eher</i> OBP3	KM213228	155	4,79	17,529	6	1-19	PBP/GOBP 18-130 e PBP 28-131
<i>Eher</i> OBP4	KM213229	151	5,79	17,033	6	1-19	PBP/GOBP 17-135 e PBP 31-135
<i>Eher</i> OBP5	KM213230	172	5,37	18,967	8	1-15	26-167
<i>Eher</i> OBP6	KM213231	211	5,44	23,669	12 (Plus-C)	1-19	48-135
<i>Cubi</i> OBP1	KM213232	212	5,43	23,783	12 (Plus-C)	1-19	47-136
<i>Cubi</i> OBP2	KM213233	143	5,57	15,943	6	1-20	PBP/GOBP 23-130 e PBP 28-131
<i>Cubi</i> OBP3	KM213234	140	4,59	15,406	6	1-19	PBP/GOBP 18-127 e PBP 28-131
<i>Cubi</i> OBP4	KM213235	152	5,29	17,031	6	1-15	PBP/GOBP 15-137 e PBP 32-137
<i>Dimel</i> OBP1	KM213236	141	6,57	15,710	5 (minus-C)	1-23	PBP/GOBP 37-137 e PBP 21-127

3.3. Comparação entre OBPs potenciais com sequência completa

A análise de similaridade das hipotéticas OBPs clássicas submetidas à varredura dos percevejos com as OBPs ortólogas de diferentes espécies de insetos está representada na Figura 5. Em todos os alinhamentos, a maioria das regiões conservadas está localizada próximo aos resíduos conservados de cisteínas, que são responsáveis pela formação das pontes de dissulfeto que compõem as α -hélices características da estrutura terciária de alta estabilidade das OBPs. É possível observar uma baixa similaridade de sequências tanto entre as *Eher*OBPs quanto entre as *Cubi*OBPs. Contudo, foi observada uma alta similaridade de sequências nas análises de comparação interespecífica, onde *E. heros* e *C. ubica* apresentaram dois casos de alta similaridade entre *Eher*OBP6 e *Cubi*OBP1, e *Eher*OBP3 e *Cubi*OBP3.

As OBPs plus – C foram alinhadas com sequências pertencentes à mesma classe (Figura 6). De maneira geral, essa classe de proteínas caracteriza-se pela estrutura secundária composta por oito α -hélices, das quais duas (N-terminal e C-terminal) participam diretamente da formação da região de reconhecimento do ligante (Lagarde *et al.*, 2011). Embora as OBPs *Eher*OBP6 e *Cubi*OBP1 representem as duas sequências identificadas como plus – C (12 resíduos de cisteína e uma prolina em região conservada), a *Eher*OBP5 foi agrupada nessa classe. Esta sequência apresenta oito resíduos de cisteína (mas não apresenta o resíduo conservado de prolina), afastando-se do padrão das OBPs clássicas – que contém seis resíduos – e se aproximando das OBPs plus – C devido ao maior conteúdo de resíduos conservados desses aminoácidos.

$\alpha 1$ $\eta 1$ $\alpha 2$ $\eta 2$ $\alpha 3$
Bmor_GOBP2 1 10 20 30 40 50
Bmor_GOBP2 M T A E V M S H V T A H F G K T L E E C R E E S G L S V D I L D E F K H F W S D D . F D V V H R E L G C A
Sfur_OBP10 . C S Y S E A I P A L T E A Q I E Q V G K A M A N M C I S S S G V Q . . . R S L I T K A M T G E . . I E D D R K L K C F
DimeI_OBP1 C A L I E E S E A A M S E A Q M K N A M K T L R N M C M P K S G V S . . . K E A L A S M K E G N . F D D D D R K L K C Y
Alin_OBP5 Q V F F S V T E A A M S Q A M K Q A M K T V R N M C I P K S G V D . . . K E A L A K M V N G E . F D E S D Q K L K C Y
Aluc_OBP8 Q V L I S T T E A V M T Q A Q M K Q A M K T V R N M C I P K S G V D . . . K E A L A K M V E G E . F D E S D Q K L K C Y
Llin_OBP2 Q V L I S T T E A Y M S Q A Q M K Q A M K T V R N M C I P K S G V A . . . K E A L A K M V E G E . F D D S D Q K L K C Y
Eherē_OBP1 . . . L A T . . . I E A E E N V K A K I M K V F N T C K E K H P V T . . . D D E L A A F R K A D I G F G Y S H D A K C M
Cubi_OBP2 . . . C I F S C N G L S P E I K V A V D E C K N Q H N I D . . . S D Q I K T A F D K K . K I P E T A N G K C F
Llin_OBP19 . . . E F A . . . S A V T K E Y H D R A V A A K D K C A K E H N I K . . . E S E I Q E F V K K H . K L P E T E D G K C M
Alin_OBP7 . . . E F A . . . S A I S K E Y H D K A I E A K N T C A K L H N V D . . . D E T I M T Y W K N H . Q L P E K E P E T C I
Asut_OBP11 . . . E F A . . . S A V R A A Y H D K A I A A K N T C A K L H N V D . . . D E T I M K F W K A H . Q L P E K E P E T C I
Cubi_OBP4 . C Y A F A A D D K E E S K L L Q L E H K I F L K C M A D G N I T . . . E S A V E S I F K K L . E I P D T R S I K C L
Eher_OBP4 . . . C L S . . . W A A T P E Y K A K V I T A V T T C A K E H N A E . . . L K D I L E I M R Q N . K L P E T K E Q K C V
Asut_OBP6 . . . C I Q I K A K E L T D E Q K E Q I F A E I K N C M E S T K L T . . . D E E F E S I M A K K . E L P T S K E G K C F
Cubi_OBP3 G F V G A D V K D E L R S Q L E E C R S S F N V T . . . D D E V K G I T L K Q . . A P A S Q E G K C Y
Eher_OBP3 G F V S A D V Q D E L R S Q L E E C K S S F N V S . . . E D E I K G I T L K Q . . P P S S H E G K C Y

$\alpha 4$ $\alpha 5$
Bmor_GOBP2 60 70 80 90 100 110
Bmor_GOBP2 I I C M S N K F S L M D D D V R M H H V N M D E Y I K S F P N . G Q V L A E K M V K L I H N C E K Q F D T E T . D D C T
Sfur_OBP10 F G C I M E A V Q V T K N G . K M Q P E V L K R R A N A M L P . . K T M R E M I L P T I D S C S H I E N E . . . D K C E
DimeI_OBP1 L G C I M N M Q V V K N G . K I S M T M V K N Q I T K M V D . . P T W G A K L V A T F E S C S N V E G S . . . D N C D
Alin_OBP5 L G C V L G M M Q A V K N N . K I N L T M V R N Q I T K M L A . . P E R G Q R I L A A F E S C A T V T G D . . . D N C G
Aluc_OBP8 L G C V L G M M Q A V K N N . K I N L T M V K N Q I S K M L A . . P E Q G Q R I L A A F E G C A T V T G D . . . D N C D
Llin_OBP2 L G C V L G M M Q A V K N N . K I N L T M V R N Q I S K M L A . . P E Q G Q R I L T A F E G C A T V T G D . . . D N C D
Eherē_OBP1 L A C M L E E G K M L K D G K Y L K E N A L I M A D V F H I D . D F D E A A K A R K V I E N C S A E V S E V G P D Q C E
Cubi_OBP2 M S C V M E K M G V L K D G . K V D L D R I L E L N R K K F K . D P E N L G K A D E I A N R C A N V E S P D N . K E C S
Llin_OBP19 I A C Y M E E M K L I T D G . K V N V D E W K K S N K E K W D . E E A H V A M A D E I V D K C N E Q V S P D G L A K C E
Alin_OBP7 V I C Y L K E M K L V V D G . K V D A D A W K A S N K E K W D . D E K H V A A A D E I V D K C S A E V P P T E . N E C E
Asut_OBP11 I I C Y L K E M K L V V D G . K V D A D A W K A S N K E K W D . D E K H V A A A D E I V D K C S A E V P P T E . N E C E
Cubi_OBP4 L G C Y M K G M G Y L A D D G K I D W K K L D E I N K V E Y L . D P E Q E K K A L E V S V T C S K S V P Q N L G N I C D
Eher_OBP4 V G C F F E K M E Y V T D N . K V D W E K V K A L N P Q K Y D . T P E L V E K V N Q V T D E C A K V V T G K Y S D I C E
Asut_OBP6 T K C L M E K M E Y L E E G G K I N V I A V Q A G L E E N M E . K E S E I T K A K E I I Q Q C A D T V P P E . N E C E
Cubi_OBP3 L H C I F S R M D V M T E E G Q M N S E G M K G L V R E I P D I K E T E L K K L E Q V A D K C G E V P L G E . . D R C E
Eher_OBP3 L H C I F S R M D V M T E E G K M N A E G M K G V V R E I P N I K E S D L K K L E K V A D K C S E V S L G E . . D R C E

$\alpha 6$ $\alpha 7$
Bmor_GOBP2 120 130 140
Bmor_GOBP2 R V V K V A A C F K E D S R K E G I A P E V A M V E A V I E K Y
Sfur_OBP10 L A Y S I V K C H F S V N G K N P F F F N F
DimeI_OBP1 L A Y . I S E S F M K L T K M H L
Alin_OBP5 L A F R F A K C I Y D T D K E A F I V P
Aluc_OBP8 L A F K F A K C I Y D T D K E L L F Q A F I V P
Llin_OBP2 L A F K F A K . I Y D T D K E L L F Q A F I V P
Eherē_OBP1 F A Y K M A V C G A N E S K K L G M K . . E H D F F E
Cubi_OBP2 L A T E L A K C A L K N A F E L K L E . . V P K D E I
Llin_OBP19 Y G F K L T E C G L K H R L E K G L P . . A P N M D D V K R R
Alin_OBP7 W G L A L T K C A L K H G K E A G I P . . P P D M E H P K R R
Asut_OBP11 W G L A L T K C A L K H G K E A G I P . . P P D M E H P K R R
Cubi_OBP4 A G Y A A G K C F L D E A K K I G L H I F T P E A V Q E
Eher_OBP4 L G T P A I K C L K E E A E K I Q L P . . K P D V K F D L K H
Asut_OBP6 Y A Y G I S Q C M Y T K M K E A G I S . . G G P
Cubi_OBP3 N A V T I Y D C I N S V A D E L G V K . . G S A
Eher_OBP3 N A V T I Y N C I N T E S D Q L G V K . . G P E E N W C T Q Q T Y R R P V C D

Figura 5. Alinhamento múltiplo e predição da estrutura secundária das seqüências deduzidas de aminoácidos das OBP-s clássicas dos percevejos com seqüências de diferentes espécies da ordem Hemiptera obtidas do GenBank pelo BLASTx. As estruturas secundárias (primeira linha) foram atribuídas de acordo com a estrutura cristal da *Bmor_OGOBP2*. Os resíduos conservados de cisteína estão destacados na cor vermelha, enquanto os resíduos de aminoácidos semi-conservados estão indicados na cor amarela. *Bmor*: *B. mori* GOBP2 (2WCK_A); *Alin*: *Adelphocoris lineolatus* OBP 5 (ACZ58031.1); *Asut*: *Adelphocoris suturalis* OBP 6 (AHJ81241.1), OBP 11 (AHJ81243.1); *Aluc*: *Apolygus lucorum* OBP 8 (AFJ54049.1); *Cubi*: *C. ubica* OBP 2 (KM213233), OBP 3 (KM213234), OBP 4 (KM213235); *DimeI*: *D. melacanthus* OBP 1 (KM213236); *Eher*: *E. heros* OBP1 (ADJ18275.1), OBP 3 (KM213228), OBP 4 (KM213229); *Llin*: *Lygus lineolaris* OBP 2 (AHF71029.1), OBP19 (AHF71049.1); *Sfur* *Sogatella furcifera* OBP10 (AHB59661.1). O alinhamento foi obtido através do programa ESPript (Gouet *et al.*, 1999).

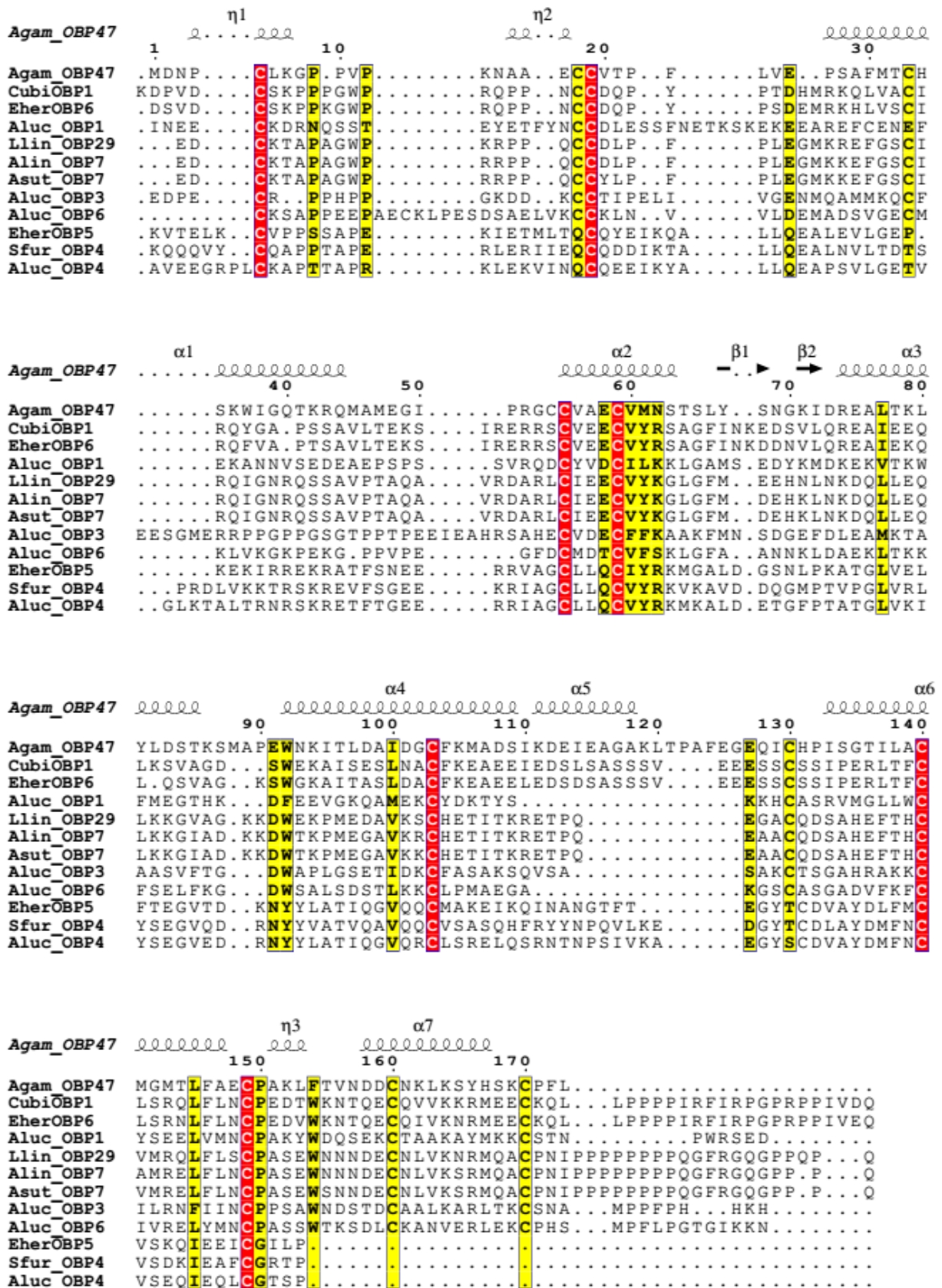


Figura 6. Alinhamento múltiplo e predição da estrutura secundária das sequências deduzidas de aminoácidos das OBP-s plus - C de *E. heros* e *C. ubica* sequências de OBPs da mesma classe identificadas em diferentes espécies da ordem Hemiptera obtidas do GenBank pelo BLASTx. As estruturas secundárias (primeira linha) foram atribuídas de acordo com a estrutura cristal da Bmor_OGOBP2. Os resíduos conservados de cisteína estão destacados na cor vermelha, enquanto os

resíduos de aminoácidos semi-conservados estão indicados na cor amarela. Agam: *Anopheles gambiae* OBP 47 (4IJ7), Alin: *Adelphocoris* OBP 3 (AEA07661.1), OBP7 (ACZ58085.1); Asut: *Adelphocoris suturalis* OBP 7 (AHJ81239.1), Aluc: *Apolygus lucorum* OBP 1 (AEA07705.1), OBP 3 (AEA07661.1), OBP 6 (AEA07664.1), Cubi: *C. ubica* OBP 1 (KM213232), Eher: *E. heros*, OBP 5 (KM213230), OBP 6 (KM213231), Llin: *Lygus lineolaris* OBP 29 (AHF71060.1), Sfur *Sogatella furcifera* OBP4 (AHB59657.1). O alinhamento foi obtido através do programa ESPript (Gouet et al, 1999).

A análise filogenética das OBPs dos percevejos com 185 sequências de OBP-s de 28 espécies de Hemiptera confirmou a divergência intraespecífica previamente observada para OBPs de *E. heros* e *C. ubica* (Figura 7). Estes resultados reforçam a ideia de que essas proteínas são produtos de diferentes genes e não de um mesmo gene que sofreu diferentes *splices*. A filogenia das OBPs não corresponde à filogenia dos hemípteros. As OBPs intraespecíficas não formam um clado único. Três OBPs de *E. heros* e *C. ubica* apresentam agrupamento, sendo as *Eher*OBP1 e *Cubi*OBP6, bem como *Eher*OBP3 e *Cubi*OBP3 consideradas irmãs com *bootstrap* de 99 e 98, respectivamente. Intraespecificamente, tanto para *E. heros* quanto para *C. ubica*, as OBPs apontam para filogenias significativamente diferentes (Figura 8). Por outro lado, quando consideradas as relações interespecíficas entre as OBPs de *E. heros* e *C. ubica*, observa-se a existência de convergência ou o compartilhamento de características derivadas. Este resultado pode indicar que essas cinco OBPs reconhecem os mesmos ou odores muito similares, entretanto, as relações filogenéticas entre essas OBPs poderão ser melhor esclarecidas através de experimentos computacionais que investiguem a relação OBPs/ligantes associada à validação funcional *in vitro* das mesmas.

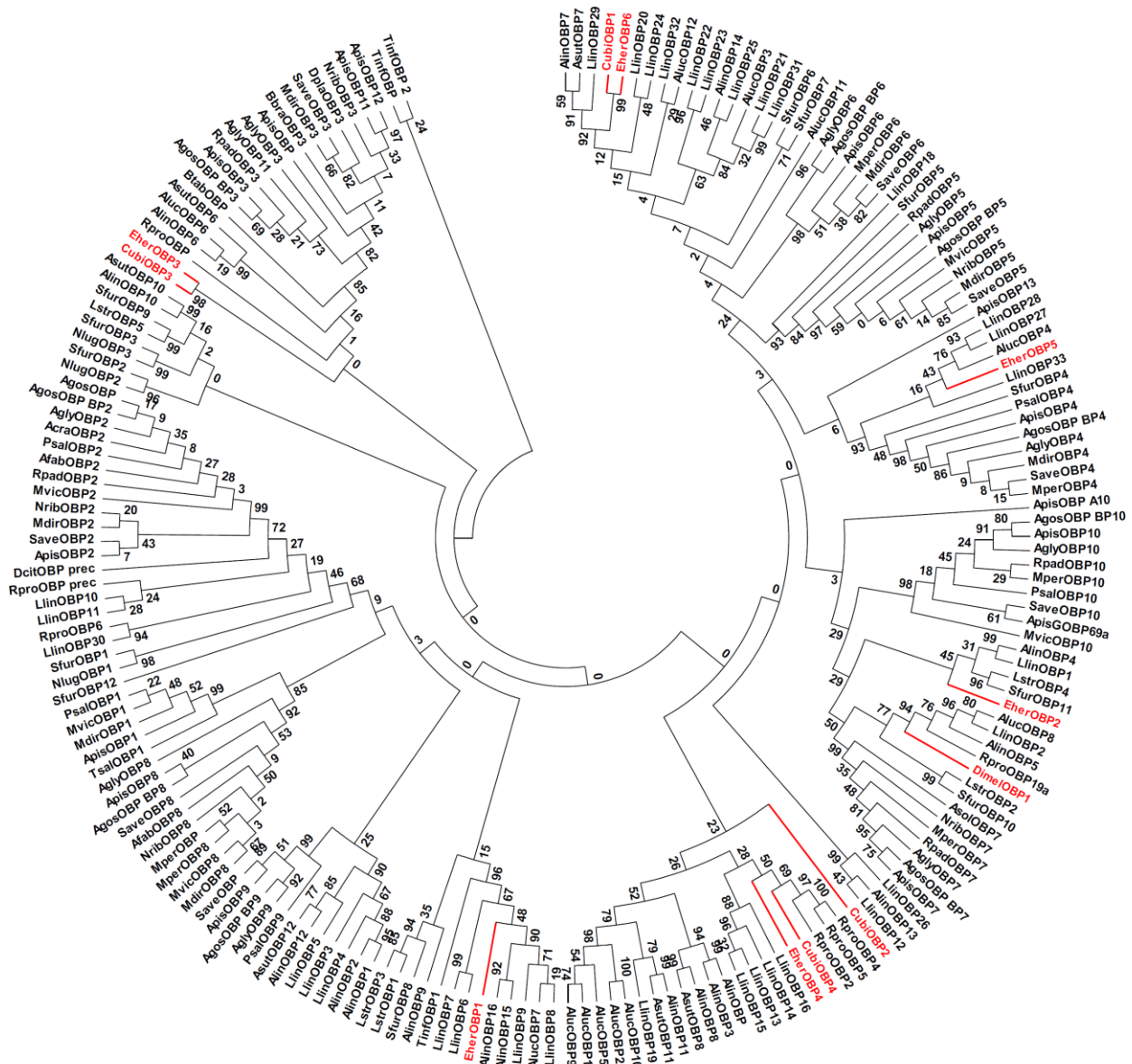


Figura 7. Relações filogenéticas entre as potenciais OBPs com sequência completa descritas neste trabalho (em vermelho) e 185 OBPs potenciais com sequência completa de hemípteros disponíveis nos bancos de dados DDBJ/EMBL/GenBank. As árvores foram construídas com o MEGA 6.06 utilizando o modelo LG + G + I. Os valores indicados nos nós são os valores das distâncias evolutivas entre as sequências de aminoácidos estimados pelo cálculo do *bootstrep*. Os nomes das espécies estão abreviados com quarto letras, e seus nomes completos, bem como o número de acesso no banco de dados estão descritos na tabela suplementar 4.

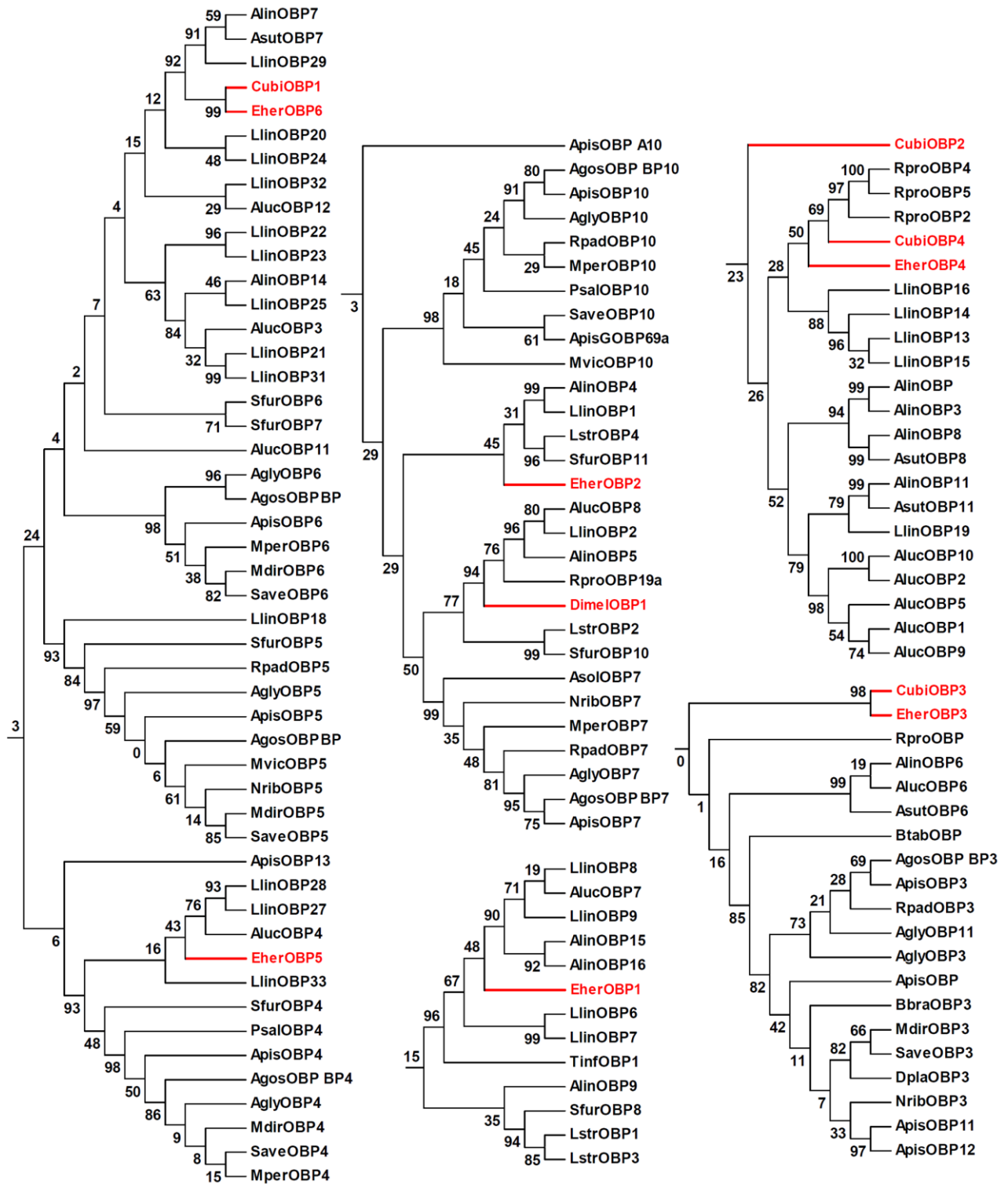


Figura 8. Relações filogenéticas detalhadas entre as OBPs potenciais de *E. heros*, *C. ubica* e *D. melacanthus*. É possível observar as divergências intraespecíficas entre as OBPs, bem como certa convergência interespecífica entre as OBPs de *E. heros* e *C. ubica*.

4. Discussão

Neste trabalho foram prospectados transcritos relacionados à olfação através do sequenciamento de alto desempenho das antenas de três percevejos: *E. heros*, *C. ubica* e *D. melacanthus*.

Como resultado das análises do transcrito da antena de percevejos adultos (12 dias), foram montados 19.520 contigs para *E. heros*, 41.529 para *C. ubica* e 8.684 contigs para *D. melacanthus*, sendo esses números maiores do que para outras espécies de Hemiptera como, por exemplo, *A. pisum* (Zhou *et al.*, 2010). Os contigs montados apresentaram funções moleculares semelhantes, com alta representatividade para atividades relacionadas a processos catalíticos e de ligação. Baseado nas similaridades de sequências com outras OBPs, os contigs foram anotados com a seguinte distribuição: 23 OBPs (quatro com sequência completa), 12 CSPs e cinco ORs em *E. heros*; 25 OBPs (quatro com sequência completa), 14 CSPs e 11 ORs em *C. ubica*; e nove OBPs e sete CSPs em *D. melacanthus*. Gu *et al.* (2011a) construiu uma biblioteca de cDNA das antenas de machos e fêmeas do percevejo da alfafa, *Adelphocoris lineolatus* (Hemiptera: Miridae), na qual foi possível selecionar 2.915 EST's com a obtenção de 1.423 unigenes (contendo 215 contigs) com comprimento médio de 552 pb, dos quais foram anotados 14 OBPs potenciais, com distribuição e representação da função molecular semelhante à encontrada para os percevejos analisados em nosso estudo. Para a biblioteca de cDNA da antena do percevejo da planta verde *A. lucorum* (Hemiptera: Miridae), Ji *et al.* (2013) obtiveram 5.018 EST's, com montagem de 3.881 unigenes (783 contigs) com comprimento médio de 143 pb, dos quais foram anotadas 12 potenciais OBPs. Uma vez que as amostras de RNA apresentaram similaridade de qualidade (RIN \geq 7.0), é possível que o pequeno número de reads de alta qualidade encontrado no *D. melacanthus* seja devido a algum erro na construção da biblioteca ou no sequenciamento.

O número de potenciais OBPs encontradas nas antenas dos percevejos *E. heros* e *C. ubica* foi maior do que o encontrado no percevejo da alfafa e da planta verde, contudo os transcritomas dessas espécies foram gerados através do método Sanger ao invés de uma plataforma de alto desempenho e o número de contigs/unigenes utilizados para buscar transcritos de OBPs foi muito menor. A heterogeneidade das OBPs mineradas dos percevejos neotropicais *E. heros* e *C. ubica* também foi maior do que aquela identificada para outros hemípteros como, por exemplo, os afídeos *A. pisum* com 15 potenciais OBPs identificadas através de sequenciamento genômico (Zhou *et al.*, 2010) e *Aphis gossypii* com 10 OBPs utilizando uma plataforma de sequenciamento de alto desempenho (de um total de 54.547 unigenes) (Gu *et al.*, 2013), o piolho do corpo humano com apenas cinco genes obtidos do seu projeto genoma (Kirkness *et al.*, 2010), a praga do arroz *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) com 12 OBP's obtidas de um projeto transcrito (He e He, 2014). A única exceção foi encontrada no percevejo manchado *Lygus lineolaris*, no qual foram encontradas 33 potenciais OBPs utilizando uma plataforma de sequenciamento de alto desempenho; contudo, ao invés de utilizar apenas as antenas e um estágio de vida para gerar a biblioteca, foi utilizado todo o corpo em todos os estágios de vida. Nenhuma comparação com outras espécies de

pentatomídeos foi feita uma vez que este trabalho representa a segunda vez que espécies pertencentes a esta família são reportadas, e no primeiro trabalho com esta família, nosso grupo identificou duas potenciais OBPs através da análise dos resultados da construção de biblioteca de cDNA de *E. heros* (Farias *et al.*, 2014).

Considerando que foi utilizado somente um estágio de vida de apenas um tecido olfatório dos percevejos, é possível que o número e diversidade de OBPs tenha sido subestimado. Uma vez que *E. heros* possui pelo menos dois feromônios principais (sexual e alarme, com três e dois componentes cada) (Aldrich *et al.*, 1991) e é capaz de reconhecer e diferenciar pelo menos cinco diferentes plantas hospedeiras, com uma mistura de no mínimo 10 compostos voláteis que são compartilhados por cada planta hospedeira e no mínimo três compostos exclusivos de cada planta, seria esperado que o percevejo marrom tivesse pelo menos 30 OBPs, no mínimo cinco a mais das que foram mineradas até agora.

A caracterização *in silico* das potenciais OBPs com sequência completa demonstrou que, de maneira geral, elas são similares às OBPs conhecidas (Vogt *et al.*, 1991; Pikielny *et al.*, 1994; Pelosi e Maida, 1995; Pelosi., 1996; Maibeche-Coisne *et al.*, 1998) em relação as propriedades físico-químicas: pequeno tamanho (<24 kDa), peptídeo sinal na região N-terminal, domínio PBP/GOBP e a maioria com pl ácido (a exceção foi a *Dime*/OBP1 com um pl de 6,57). Em relação padrão de cisteínas, as potenciais OBPs dos percevejos apresentam os resíduos de cisteína conservados nas localizações características, com a maioria sendo classificada como clássica OBP e as exceções representadas pelas *Dime*/OBP1 com características das Menos-C, e *Eher*OBP6, *Eher*OBP5 e *Cubi*OBP1 com características Plus-C. O número de OBPs Plus-C encontrado foi menor do que para outras espécies de hemípteros, nas quais foram encontradas duas no *A. lineolatus* (Gu *et al.*, 2011); quatro a seis no *A. lucorum* (Gu *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2013); 12 no *L. lineolaris* (Hull *et al.*, 2014); duas no afídeo da ervilha *A. pisum* (Zhou *et al.*, 2010) e três na *S. furcifera* (He e He, 2014).

Comparando a similaridade entre as sequências deduzidas de aminoácidos das potenciais OBPs dos percevejos e as sequências ortólogas, foi observada uma baixa similaridade intraespecífica indicando uma baixa probabilidade de essas sequências serem originadas a partir de diferentes processos de *splice* em um mesmo gene, bem como a uma maior probabilidade dessas OBPs reconhecerem diferentes odores. Por outro lado, a alta similaridade entre algumas OBPs interespecíficas, pode indicar que elas reconhecem o mesmo ou odores similares.

As OBPs similares nas duas espécies de percevejo intimamente relacionadas, as quais apresentam ampla sobreposição das plantas hospedeira e nicho ecológico semelhante, sugere que essas espécies podem reconhecer o componente do feromônio uma da outra (Laumann *et al.*, 2009), evitando a competição por recurso com outras espécies ou melhorando a localização da planta hospedeira ao utilizar as pistas de outras espécies se a OBP detectar seu 'perfume'. Para esta última possibilidade, a OBP compartilhada não seria espécie-específica, mas sim, ligante específica, o que implicaria que qualquer espécie que compartilhe a planta hospedeira poderia ter uma OBP altamente similar, não importando como essas espécies são

relacionadas. As análises filogenéticas se expandem a essas inferências.

A hipótese de compartilhamento de OBPs pode ser considerada para outras espécies uma vez que foi observada alta similaridade no alinhamento de sequências de espécies pertencentes à mesma ordem de insetos e que apresentam sobreposição de plantas hospedeiras. Essas OBPs incluem: AlinOBP11 e AlucOBP6 (99,3% de similaridade), AlinOBP7 e AsutOBP7 (98%), AosaPBP e AcorPBP (97,4%), AlinOBP11 e AlucOBP3 (97,3%), AlinOBP1 e AlinOBP16 (95,9%), AlinOBP11 e AsutOBP11 (94%), LlinOBP2 e AlucOBP8 (93,3%), HpicOBP1 e AcorPBP (92,1%), AlinOBP7 e LlinOBP29 (92,1%), e LlinOBP29 e AsutOBP7 (91,6%).

Este capítulo apresentou a análise do transcrito de três espécies de percevejos pragas da agricultura. Os transcritos relacionados à olfação foram identificados e a análise de similaridade demonstrou a existência do compartilhamento de OBPs entre os percevejos. Este compartilhamento de OBPs entre as espécies é um caminho para a evolução de uma rica, refinada e seletiva comunicação química interespecífica através de aleloquímicos.

5. Referências Bibliográficas

Aldrich J.R. (1991) Testing the "new associations" biological control concept with a tachinid parasitoid (*Euclytia flava*). *Journal of Chemical Ecology* 21 (7): 1031-1042.

Bruce TJA, Wadhams LJ, Woodcock CM (2005) Insect host location: A volatile situation. *Trends Plant Sci* 10: 269–274.

Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D. e Hecker, E. (1959) About the sexual pheromone of the silkworm *Bombyx mori*: Purification and constitution. Reindarstellung und Konstitution. *Z Naturforschung*. 14b:283–284.

Conesa, A., Gotz, S., Garcia – Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualisation and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674 – 3676.

Corrêa-Ferreira B. S., Krzyzanowski F. C., Minami C. A. (2009) Percevejos e a qualidade da semente da soja. *Circular Técnica – Embrapa*.

Corrêa-Ferreira B. S., Panizzi A. R. (1999) Percevejos da soja e seu manejo. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, Circular Técnica 24. 45p.

Farias L.R., Paula D.P., Zhou J.-J., Liu R., Pappas G.J., Moraes M.C.B., Laumann R.A., Borges M., Birkett M.A., Pickett J.A., Field L.M., Bào S.N. (2014) Identification and expression profile of two putative odorant-binding proteins from the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology* 43: 106-114.

Forêt S., Maleszka R. (2006) Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Res*. 16: 1404–1413.

Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. e Metz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*. 15:305 – 308.

Gu S.-H., Wang S.-P., Zhang X.-Y., Wu K.-M., Guo Y.-Y., Zhou J.-J., Zhang Y.-J. (2011) Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect. Biochem. And Mol. Biol.* 41: 254e263.

Gu S.-H., Wu K.-M., Guo Y.-Y., Field L.M., Pickett J.A., Zhang Y.-J., Zhou J.-J. (2013)

Identification and expression profiling of odorant binding proteins and chemosensory proteins between two wingless morphs and a winged morph of the cotton aphid *Aphis gossypii* Glover. *PLoS One* 8, e73524.

He M., He P. (2014) Molecular characterization, expression profiling, and binding properties of odorant binding protein genes in the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 174: 1–8.

Hekmat-Scafe D.S., Scafe C.R., McKinney A.J., Tanouye M.A. (2002) Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 12(9): 1357-1369.

Horst, R., Damberger, F., Luginbuhl, P., Guntert, P., Peng, G., Nikonova, L., Leal, W.S. e Wuthrich, K. (2001) NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14374 –14379

Hull J.J., Perera O.P., Snodgrass G.L. (2014) Cloning and expression profiling of odorant-binding proteins in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Mol. Biol.* 23: 78–97.

Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E., Mueller, O., Schroeder, A. e Auffray, C. (2005) Toward standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucl. Acids Res.* 33 (6): e56.

Ji P., Gu S.-H., Liu J.-T., Zhu X.-Q., Guo Y.-Y., Zhou J.-J., Zhang, Y.-J. (2013) Identification and expression profile analysis of odorant-binding protein genes in *Apolycygnus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Appl. Entomol. Zool.* 48: 301–311.

Jones P., Binns D., Chang H.-Y., Fraser M., Li W., McAnulla C., McWilliam H., Maslen J., Mitchell A., Nuka G., Pesseat S., Quinn A.F., Sangrador-Vegas A., Scheremetjew M., Yong S.-Y., Lopez R., Hunter S. (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30 (9): 1236-1240.

Katoh K., Kuma K., Toh H. e Miyata T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 33:511–518.

Karlson, O. e Lüscher, M. (1959). Pheromones: A new term for a class of biologically active substance. *Nature* 183, 55–56.

Kirkness E.F., Haas B.J., Sun W., Braig H.R., Perotti M.A., Clark J.M. *et al.* (2010) Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 12168–12173.

Lagarde A., Spinelli S., Qiao H., Tegoni M., Pelosi P., Cambillau C. (2011) Crystal structure of a novel type of odorant binding protein from *Anopheles gambiae*, belonging to the C-Plus class. *Biochem J.* 437: 423–430.

Laumann R.A., Aquino M.F.S., Moraes M.C.B., Pareja M., Borges M. (2009) Response of the egg parasitoids *Trissolcus basalis* and *Telenomus podisi* to compounds from defensive secretions of Stink Bugs. *Journal of Chemical Ecology* 35: 8-19.

Leal W.S. (2003) Proteins that make sense. In: Blomquist GJ, Vogt RG, eds. *Insect pheromone biochemistry and molecular biology, the biosynthesis and detection of pheromone and plant volatiles*. London: Elsevier Academic Press. pp 447–476.

Leal WS. (2005). Pheromone reception. *Top. Curr. Chem.* 240:1–36.

Leal, W. S. (2013) Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 58:373–91.

Leal, W.S. (2005) Pheromone reception. *Top. Curr. Chem.* 240:1 – 36

Leal, W.S., Ishida, Y., Pelletier, J., Xu, W., Rayo, J., Xu, X. e Ames, J. B. (2009) Olfactory proteins mediating chemical communication in the navel orangeworm moth, *Amyelois transitella*. *PLoS ONE.* 4:e7235.

Li Z.-X., Pickett J.A., Field L.M., Zhou J.-J. (2005) Identification and expression of odorant-binding proteins of the malaria-carrying mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 58: 175– 189.

Liu R.H., Lehane S., He X.L., Lehane M., Hertz-Fowler C., Berriman M., Pickett J.A., Field L.M., Zhou J.J. (2010) Characterizations of odorant-binding proteins in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 919e929.

Maibeche-Coisne, M., Jacquin-Joly, E., Francois, M.C., Nagnan-Le Meillour, P. (1998) *Molecular cloning of two pheromone binding proteins in the cabbage armyworm Mamestra brassicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 815–818.

Maleszka R, Stange G (1997) Molecular cloning, by a novel approach, of a cDNA encoding a putative olfactory protein in the labial palps of the moth *Cactoblastis cactorum*. *Gene* 202 (1-2): 39-43.

Martin, J. P., Beyerlein, A., Dacks, A. M., Reisenman, C. E., Riffel, J. A., Lei, H., Hidelbrand, J. G. (2011) The neurobiology of insect olfaction: sensory processing in a comparative context. *Prog. Neurobiol.* 95: 427 – 447.

McKenna M.P., Hekmat-Scafe D.S., Gaines P., Carlson J.R. (1994) Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J Biol Chem* 23: 16340–16347.

Nei, M. e Kumar, S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press.

Pelosi, P. and Maida, R. (1995) *Odorant-binding proteins in insects*. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B: 503–514.

Pelosi, P. (1996) *Perireceptor events in olfaction*. *J. Neurobiol.* 30: 3–19.

Petersen, T. N., Brunak, S., Heijne, G. H. e Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786

Pikielny C.W., Hasan G., Rouyer F., Rosbash M. (1994) Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron* 12: 35-49.

Robertson H.M., Martos R., Sears C.R., Todres E.Z., Walden K.K.O., Nardi J.B. (1999) Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol. Biol.* 8: 501–518.

Sánchez-Gracia, A., Vieira, F. G. e Rozas, J. (2009) Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity* 103: 208–216.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. e Ragg, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7: 3.

Spinelli S., Lagarde A., Iovinella I., Legrand P., Tegoni M., Pelosi P. e Cambillau C. (2012) Crystal structure of *Apis mellifera* OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42:41–50.

Vieira F.G, Foret S., He X., Rozas J., Field L.M., Zhou J.-J (2012) Unique Features of odorant-binding proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* revealed by genome annotation and comparative analyses. *PLoS ONE* 7 (8), e43034.

Vogt R.G., Riddiford L.M. (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293 (5828): 161–163.

Vogt, R. G., Prestwich, G. D. e Lerner, M. R. (1991) Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J. Neurobiol.* 22:74–84

Von Frisch, K. (1921). Over the seat of smell in insects. *Zool. Physiol.* 38: 449-514.

Xu, P.X., Zwiebel, L.J., Smith D.P. (2003) Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 12, 549e560.

Xu, W., Leal, W.S. (2008) Molecular switches for pheromone release from a moth pheromone-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 559–564.

Xu, Y.L., He, P., Zhang, L., Fang, S.Q., Dong, S.L., Zhang, Y.J., Li, F. (2009) Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomics* 10, 632e645.

Xu, X., Xu, W., Rayo, J., Ishida, Y., Leal, W. S. e Ames, J.B. (2010) NMR structure of navel orangeworm moth pheromone-binding protein (AtraPBP1): implications for pH-sensitive pheromone detection. *Biochemistry.* 2010;49:1469–1476.

Xu, W., Xu, X., Leal, W.S. e Ames, J.B. (2011) Extrusion of the C-terminal helix in navel orangeworm moth pheromone-binding protein (AtraPBP1) controls pheromone binding. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 404: 335–338.

Yin, X.-W., Iovinella I., Marangoni R., Cattonaro F., Flamini G., Sagona S., Zhang L., Pelosi P., Felicioli A. (2013) Odorant-binding proteins and olfactory coding in the solitary bee *Osmia cornuta*. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 3029–3039.

Whittaker, R. e Feeny, P. (1971) Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* 171: 757-770.

Wogulis M, Morgan T, Ishida Y, Leal WS, *et al.* (2006). The crystal structure of an odorant binding protein from *Anopheles gambiae*: evidence for a common ligand release mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339: 157-164.

Wojtasek, H. e Leal, W.S. (1999) Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes. *J. Biol. Chem.* 274: 30950–30956.

Zhou, J.J., He, X.L., Pickett, J.A., Field, L.M. (2008) Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses. *Insect Mol Biol*, 17(2): 147-163.

Zhou, J.J., Huang, W.S., Zhang, G.A., Pickett, J.A., Field, L.M. (2004) “Plus-C” odorant-binding protein genes in two *Drosophila* species and the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Gene* 327, 117e129.

Zhou, J.J., Vieira, F.G., He, X.L., Smadja, C., Liu, R.H., Rozas, J., Field, L.M. (2010) Genome annotation and comparative analyses of the odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol. Biol.* 19 (Suppl. 2), 113e122.

Capítulo 3:

Análise computacional da interação entre OBPs com sequência completa e seus ligantes potenciais

1. Introdução

O papel das OBPs na olfação de insetos tem sido investigado desde a descoberta da primeira proteína desta classe na mariposa gigante *Antheraea polyphemus* (Vogt e Riddiford, 1981). O estudo da interação entre OBPs/ligantes permite uma melhor compreensão de como essas proteínas contribuem para a especificidade e seletividade da olfação em insetos.

Estudos envolvendo a resolução da estrutura 3D das OBPs através de cristalografia de raio-x e ressonância nuclear magnética permitiram elucidar o mecanismo de ação de determinadas OBPs e suas interações com alguns ligantes (Lartigue *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 2004; Laughlin *et al.*, 2008; Lescop *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2010; Tsitsanou *et al.*, 2013). Esses estudos revelaram que as OBPs possuem em comum uma estrutura predominantemente formada por alfa-hélices (6 – 8) estabilizada por ligações dissulfeto (3 – 6) entre resíduos conservados de cisteína que podem variar em número, determinando a classificação das OBPs.

Até o momento sabe-se que uma mudança conformacional dependente de pH associada a afinidade de ligação estão relacionadas ao comportamento das OBPs em diferentes insetos como, por exemplo, em mariposas (Sandler *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2010) e dípteros (Wogulis *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2009 e Mao *et al.*, 2010). Em mariposas a protonação dos resíduos de histidina em pH ácido (4,5) promove a organização de uma sétima alfa-hélice que ocupa a cavidade de ligação liberando o ligante na OR (Wojtasek e Leal, 1999), entretanto, a desprotonação dos resíduos de histidina em pH neutro na linfa sensilar desfaz a alfa-hélice, fazendo com que a cavidade de ligação torne-se disponível à ocupação de outra molécula odorante (Damberger *et al.*, 2000). Em dípteros a alfa-hélice extra funciona como um portão que se abre ao se aproximar da OR, onde o pH é baixo, liberando a molécula odorante que irá desencadear a resposta comportamental do mosquito. Ao contrário do que é observado em mariposas e dípteros, na abelha *Apis mellifera* a ligação da molécula odorante ocorre em pH ácido e sua liberação em pH neutro (Pesenti *et al.*, 2008, 2009). Essas observações indicam que a dependência do pH nos mecanismos de interação e liberação entre OBPs e seus odorantes parece ter se adaptado ao pH encontrado no ambiente onde as OBPs desempenham suas funções (Fan *et al.*, 2011).

Os ligantes interagem com as OBPs através de interações não covalentes como pontes de hidrogênio, interações iônicas e de Van der Waals. Essas interações contam com a participação de diferentes aminoácidos devido à estrutura e posicionamento destes na cavidade de ligação (Ventur *et al.*, 2014). O estudo da especificidade e força dessas interações é abordado principalmente através da resolução da estrutura 3D das OBPs associadas aos seus respectivos ligantes (Ravna e Sylte, 2012). Embora representem técnicas de alto custo financeiro e grande demanda de tempo, a cristalografia de raio-X e a ressonância nuclear magnética apresentam um alto poder de resolução e, por este motivo, são as melhores técnicas empregadas no estudo das interações entre OBPs/ligantes. Entretanto, muitas vezes

não é possível obter o cristal na presença do ligante e, neste sentido, a utilização de técnicas que utilizam abordagens computacionais representa uma alternativa no estudo da predição da estrutura 3D das OBPs (Paas *et al.*, 2000).

Neste sentido, a modelagem comparativa é um método baseado no conceito de que proteínas que pertencem a uma determinada família estrutural apresentam maior conservação em seus padrões de dobramento do que em sua estrutura primária. A predição estrutural é baseada nas relações evolutivas entre a proteína de interesse e a proteína que servirá como molde estrutural, uma vez que essa última apresenta estrutura determinada através de cristalografia de raio-X ou ressonância nuclear magnética. A porcentagem de identidade das sequências é um indicador importante na escolha do melhor molde, sendo 30% a porcentagem mínima de homologia para obtenção de um modelo preciso (Schwede *et al.*, 2007). Contudo, como descrito por Gu *et al.* (2011), é possível obter modelos mesmo havendo uma baixa identidade de sequência. Para este fim é indicada a análise do valor do Z-score que informa sobre a presença de dobramentos comuns entre a proteína alvo e o molde (Shi *et al.*, 2001), bem como o valor de DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*), que avalia a qualidade da estrutura predita com base nos potenciais estatísticos (quanto menor o DOPE score, melhor o modelo predito) (Fiser *et al.*, 2003).

A obtenção de um bom modelo estrutural possibilita a realização de *docking* molecular para ensaios *in silico* que podem determinar a predição de como e onde as moléculas de odorantes interagem com as OBPs (Venthur *et al.*, 2014). Este método permite prever sobre a presença de uma cavidade de interação na proteína, bem como os aminoácidos que participam das interações na cavidade (Jiang *et al.*, 2009). Embora centenas de OBPs tenham sido identificadas através de diferentes estratégias, somente uma pequena fração dessas proteínas tiveram sua estrutura 3D elucidada, sendo 13 delas resolvidas em alta resolução. Diante das dificuldades enfrentadas na obtenção da estrutura 3D das OBPs, estudos utilizando modelagem por homologia têm sido amplamente abordados (por exemplo, Honson *et al.*, 2003; Spineli *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014) na tentativa de prever a estrutura dessas proteínas, bem como as possíveis interações e relações de especificidade com seus ligantes.

1. Objetivos Específicos

- Prever a estrutura 3D das OBPs identificadas nas três espécies de percevejo: *E. heros*, *C. ubica* e *D. melacanthus*;
- Determinar a possível especificidade de interação das OBPs com sete ligantes correspondentes a feromônios sexuais e de alarme e um volátil de planta.

2. Material e Métodos

2.1. Modelagem Molecular

Os modelos estruturais das OBPs com sequência completa foram desenvolvidos através do programa MODELLER 9.10 (Fiser *et al.*, 2003) com o uso da classe *automodel* para

único molde. Para a seleção das estruturas moldes, por sua vez, foi utilizada a plataforma HHPred (Söding *et al.*, 2005; <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). Essa abordagem proporciona a comparação entre estruturas elucidadas disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB; <http://www.rcsb.org>) e a estrutura predita da sequência de interesse. Esse tipo de metodologia se aplica pela baixa similaridade encontrada em níveis de sequência, proporcionando maior acurácia da modelagem mesmo na ausência de semelhança de sequência. As estruturas obtidas foram usadas como molde para a modelagem das sequências de interesse utilizando o programa MODELLER 9.10. Foram gerados 100 modelos, os quais foram avaliados pelo DOPE score (*Discrete Optimized Protein Structure*), que indica a estrutura mais provável baseado na energia potencial da mesma, sendo selecionado o modelo de menor score. Os modelos selecionados foram avaliados através do software PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993, 1996), que avalia a qualidade estereoquímica do modelo através do mapa de Ramachandran e pelo ProSAII (Weiderstein e Sippl, 2007). Além disso, as estruturas da *EherOBP6* e *CubiOBP1* foram submetidas a um refinamento de loop utilizando o *script Loop Refinement* do MODELLER 9.10, sendo selecionada a estrutura de menor DOPE score.

2.2. Docking molecular

Após a modelagem, as estruturas geradas foram utilizadas como receptores para *docking* molecular. Essa metodologia é utilizada para simular a interação Proteína-ligante, proporcionando avaliações *in silico* de tais interações. Os compostos utilizados no *docking* molecular (Tabela 1) foram selecionados devido sua utilização em ensaios de olfação *in vivo* (esses ensaios são realizados com misturas de compostos) e *in vitro* (utilizados isoladamente). Inicialmente foram obtidas as estruturas 3D dos compostos através dos bancos de dados PubChem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) e ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>). Essas estruturas foram tratadas para a conversão de formato pelo PRODRG Server (Schüttelkopf e Aalten, 2004; <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg>). Para os *dockins* foi utilizado o programa AutoDock Vina (Trott e Olson, 2010). Foram feitas 100 simulações para cada par (OBP-Ligante), cada uma com nove posições. Para análise dos dados gerados foi confeccionado um *script* em Perl, o qual selecionou as menores energias livres de ligação para cada um dos 100 *dockins* de cada par.

Tabela 1. Compostos utilizados no *docking* molecular para investigação das possíveis interações OBPs/ligantes.

Composto	Função	Espécie
2,6,10-trimetildecanoato de metila	Sexual	<i>Euschistus heros</i>
2E-4Z-decadienoato de metila	Sexual	<i>Euschistus heros</i>
Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno	Sexual	<i>Chinavia ubica</i>
4-oxo-(E)-2-hexenal	Defesa	<i>Chinavia ubica</i>
(E)-2-octenal	Defesa	<i>Dichelops melacantus</i>
β -farneseno	Alarme	<i>Myzus persicae</i>
Trans-2-hexenal	Volátil de folha	<i>Glycine max</i>

2.3. Predição da Possível Cavidade de Ligação e Análise estatística

Após o *docking* molecular das OBPs com os ligantes, foram selecionadas as estruturas que melhor representavam as análises realizadas. Para esta finalidade, as estruturas foram selecionadas de acordo com a moda do valor de energia livre de ligação para cada par OBP/ligante e, posteriormente, através de inspeção manual/visual. O menor valor de energia livre de ligação indica a maior probabilidade de a ligação acontecer no ambiente natural. Neste sentido, o valor de -4,5 kcal/mol foi utilizado como o maior valor de energia livre de ligação aceitável para este estudo (Jayanthi *et al.*, 2014). A predição da possível cavidade de ligação foi determinada a partir da sobreposição dos sete ligantes na melhor posição (selecionada como dito anteriormente) com cada uma das OBPs, e determinação da distância de interação dos ligantes com os aminoácidos, sendo a máxima distância de interação 3,6Å (Brandl *et al.*, 2001).

3. Resultados

3.1. Modelagem Molecular

A metodologia utilizada para a criação dos modelos estruturais *in silico* possibilitou a predição da estrutura de todas as OBPs com sequência completa analisadas nesse estudo, porém, foram observadas diferenças estruturais entre as estruturas preditas. As estruturas foram selecionadas com base nos menores valores de DOPE score. Além disso, os modelos foram avaliados pelo mapa de Ramachandran e pelo Z-score calculados pelo PROCHECK e ProSAIL, respectivamente. Essas metodologias são utilizadas na avaliação da qualidade estereoquímica do modelo, proporcionando maior confiabilidade. As estruturas foram consideradas confiáveis quando apresentavam um valor de Z-score equiparado a de estruturas

resolvidas no PDB e uma distribuição de resíduos em zonas favoráveis e mais favoráveis no mapa de Ramachandran maior ou igual a 90% (Tabela 2). Todos os modelos apresentaram boa qualidade pelas avaliações feitas.

Tabela 2. Estruturas utilizadas como molde na predição da estrutura 3D das respectivas OBPs e parâmetros utilizados para selecionar as melhores estruturas.

	PDB ID da Estrutura Molde	DOPE	Valor de Z-score	Regiões Mais Favoráveis (%)
<i>EherOBP1</i>	1DQE	-11.458	-5,78	100
<i>EherOBP3</i>	1DQE	-10.973	-4,94	98,3
<i>EherOBP4</i>	1DQE	-12.091	-5,29	100
<i>EherOBP5</i>	1DQE	-13.503	-3,22	98,6
<i>EherOBP6</i>	3PM2	-17.057/- 2.071 ^a	-5,76	98,2
<i>CubiOBP1</i>	3PM2	-16.872/- 1.480 ^a	-5,66	99,4
<i>CubiOBP2</i>	1DQE	-10.817	-6,42	100
<i>CubiOBP3</i>	1DQE	-10.636	-4,92	100
<i>CubiOBP4</i>	1DQE	-12.729	-5,44	100
<i>DimeOBP1</i>	3V2L	-12.164	-6,23	99,1

As OBPs clássicas são caracterizadas por apresentarem estrutura terciária contendo seis alfa-hélices estabilizadas por três ligações dissulfeto. Esta caracterização foi observada na modelagem molecular das OBPs *EherOBP1* (Fig. 1A), *EherOBP4*, *CubiOBP2*, *CubiOBP3* e *CubiOBP4*. As OBPs *EherOBP3* e *DimeOBP1* (Fig. 1B), embora contenham assinatura das OBPs clássicas com seis resíduos de cisteína em posições conservadas, apresentaram uma estrutura predita diferente do esperado, com 5 alfa-hélice e 3 ligações dissulfeto e 6 alfa-hélices e duas ligações dissulfeto, respectivamente. As OBPs *plus-C*, por sua vez, apresentam oito alfa-hélices estabilizadas por seis ligações dissulfeto formadas por doze resíduos de cisteína. As OBPs *plus-C* identificadas nesse estudo apresentam uma estrutura predita com sete alfa-hélices e cinco ligações dissulfeto para a *EherOBP6* e oito alfa-hélices com cinco

ligações dissulfeto para a *Cubi*OBP1 (Fig. 1C). A *Eher*OBP5 (Fig. 1D) não se enquadra em nenhuma das classificações das OBPs, sendo considerada uma OBP atípica contendo sete resíduos de cisteína. Tal fato pode ter influenciado na modelagem estrutural, sendo esta a OBP com o menor número de ligações dissulfeto (apenas duas), porém, com o mesmo número de alfa-hélices da *Eher*OBP6. Todas as demais estruturas estão disponível no material suplementar (Figura Suplementar 1).

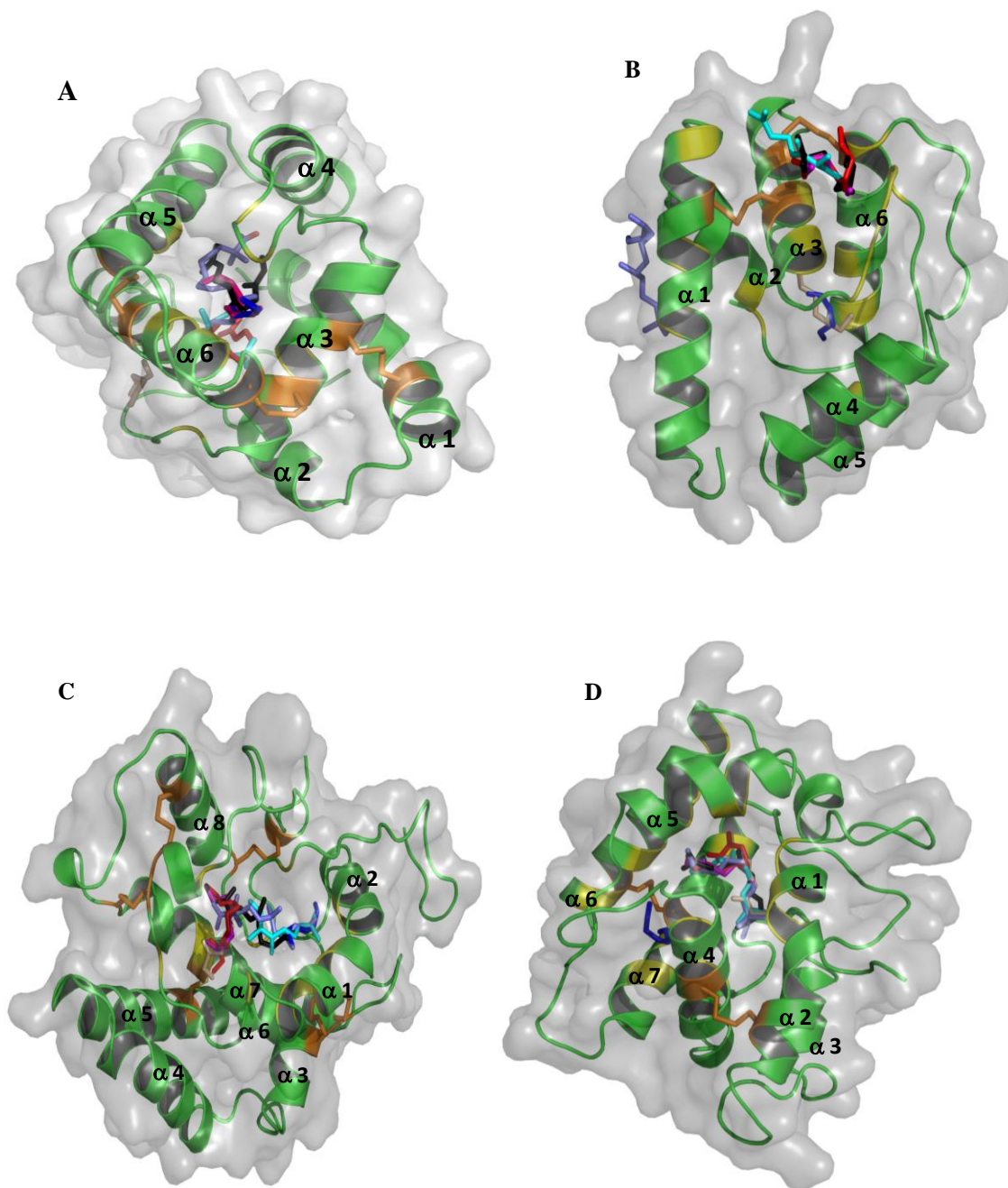


Figura 1. Representação das estruturas com os ligantes com as posições de menor energia obtidas através de Docking. (A) *Eher*OBP1: OBP clássica, (B) *Dime*/OBP1: OBP minus – C com cinco resíduos; (C) *Cubi*OBP1: OBP plus – C com 12 resíduos de cisteína; (D) *Eher*OBP5: OBP plus – C com oito resíduos de cisteína. **Ligantes:** β -farneseno (preta), trans-2-hexenal (azul escura), 4-oxo-2-(E)-hexenal (trigo), (E)-2-octenal (rosa magenta), 2E-4Z-decadienoato de metila (vermelha), 2,6,10-trimetildecanoato de metila (lilás) e Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno (ciano). As alfa-hélices estão indicadas em negrito pela

letra α , seguida do número correspondente. A provável cavidade de ligação está indicada em amarelo e as ligações dissulfeto estão indicadas pela cor laranja.

3.2. Docking Molecular

As análises de *docking in silico* indicaram as possíveis interações das OBPs com os ligantes testados. A determinação dessas interações foi baseada tanto na avaliação visual quanto na distância máxima de interação entre um composto e os aminoácidos que compõem a provável cavidade de ligação (3,6 Å; Brandl *et al.*, 2001). As estruturas foram selecionadas de acordo com o conjunto modal de cada interação OBP – ligante (Tabela 3), bem como através da avaliação visual das interações. Esta última se faz necessária uma vez que a energia livre de ligação indica a possibilidade de interação entre proteína/ligante no ambiente natural, porém, não infere sobre a posição da interação, ou seja, a análise visual permite avaliar se a interação está ocorrendo na cavidade de ligação ou não. Neste sentido, os ligantes que apresentaram conjunto modal maior do que as menores energias de ligação determinadas para este estudo (-4,5 kcal/mol) e/ou visualmente não aprovados, foram desconsiderados. Assim, as análises indicaram que os prováveis ligantes que interagem com as OBPs testadas são: β -farneseno, 2,6,10-trimetildecanoato e Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno. Porém, a análise visual e das distâncias de interação indicaram que o β -farneseno não interagiu com todas as OBPs testadas.

Tabela 3. Conjunto modal das energias de ligação dos ligantes testados para as OBPs dos percevejos. Em verde estão representados os valores de energia livre de ligação das interações consideradas possíveis tanto pelos valores de energia quanto pela avaliação visual. Em rosa claro estão indicadas as energias que, embora consideradas favoráveis à interação OBP/ligante, a mesma não ocorria na cavidade de ligação das OBPs. Em ciano estão representados os valores de energia livre de ligação considerados desfavoráveis.

	<i>E. heros</i> OBP					<i>C. ubica</i> OBP				<i>D. melacanthus</i> OBP
	1	3	4	5	6	1	2	3	4	1
β -Farneseno	-4,8	-5,9	-6	-6,9	-7	-5,8	-5,7	-6	-6,4	-3,9
Trans-2-hexenal	-3,6	-4,2	-4,4	-4,3	-4,7	-4	-4	-4,3	-4,2	-3,7
4-oxo-(E)-2-hexenal	-3,7	-4,5	-4,8	-4,7	-5,1	-4,2	-4,4	-4,7	-4,3	-4
(E)-2-octenal	-3,9	-4,8	-4,8	-4,9	-5,2	-4,4	-4,3	-4,5	-4,6	-3,4
2E-4Z-decadienoato de metila	-4,4	-5,4	-5,4	-5,7	-6	-5,2	-5	-5,4	-5,6	-3,7
2,6,10-trimetildecanoato de metila	-5,4	-6,4	-6,5	-6,7	-7,4	-6,3	-6	-6,7	-7,4	-4,5
Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno	-5,9	-6,8	-6,6	-6,3	-7,2	-7,1	-6,7	-7,2	-7,3	-5

Na análise das possíveis interações *Eher*OBPs/ligantes foi possível identificar que os aminoácidos que estão na cavidade de ligação mediando a interação pertencem às classes dos apolares (tirosina, isoleucina, alanina, glicina, prolina, valina e leucina), aromáticos (triptofano e fenilalanina), polares sem carga (treonina, glutamina e serina) e polares carregados positivamente (arginina e histidina) e polares carregados negativamente (glutamato) (Tabela 4). A maioria dos aminoácidos presentes na cavidade de ligação são hidrofóbicas e tendem a formar interações de Van der Waals com seus ligantes (Lautenschlager *et al.*, 2005) e esse mesmo tipo de interação hidrofóbica pode ser observada com os resíduos de triptofano devido ao anel benzeno presente nesse aminoácido. A fenilalanina pode estar envolvida na formação de interações π - π entre as duplas ligações nas moléculas dos ligantes e o anel aromático dos resíduos deste aminoácido (Sandler *et al.*, 2000; di Luccio *et al.*, 2013). A determinação da provável especificidade das OBPs com os ligantes testados pode ser baseada no número de interações com os aminoácidos da cavidade de ligação associada à distância dessas interações.

Tabela 4. Resíduos de aminoácidos que podem participar da interação com o ligante na cavidade de ligação das respectivas *Eher*OBPs. Em amarelo estão representados os resíduos que interagem com os três compostos; em vermelho estão representados os resíduos que interagem com os compostos dos feromônios sexuais de *C. ubica* e *E. heros*; em ciano estão os resíduos que interagem com o β -farneseno e 2,6,10-trimetildecanoato de metila.

<i>Eher</i> OBP					
	1	3	4	5	6
β-Farneseno	Tyr61 ^{AR}	Gln3 ^{P0}	Tyr5 ^{AR}	Pro17 ^{AP}	Gln22 ^{AP}
			Pro122 ^{AP}	Arg51 ^{P+}	Pro23 ^{AP}
				Tyr74 ^{AR}	Pro25 ^{AP}
				Val112 ^{AP}	Ile83 ^{AP}
				Tyr133 ^{AR}	Glu84 ^{P-}
					Leu140 ^{AP}
2,6,10-trimetildecanoato de metila	Tyr61 ^{AR}	Ser112 ^{P0}	Val9 ^{AP}	Ala16 ^{AP}	Gln22 ^{AP}
	Ile88 ^{AP}		Thr11 ^{P0}	Ile20 ^{AP}	Pro23 ^{AP}
	Ala110 ^{AP}		Tyr55 ^{AR}	Glu21 ^{P-}	Pro25 ^{AP}
			Leu130 ^{AP}	Ile50 ^{AP}	Ser26 ^{P0}
				Arg51 ^{P+}	Glu28 ^{P-}
				Leu70 ^{AP}	Leu33 ^{AP}
				Tyr74 ^{AR}	Ile99 ^{AP}
				Gli90 ^{AP}	Leu140 ^{AP}
				Fen95 ^{AR}	Arg179 ^{P+}
				Val112 ^{AP}	
				Tyr133 ^{AR}	

Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno	Arg123 ^{P+}	NA	Tyr5 ^{AR}	Ile20 ^{AP}	Pro25 ^{AP}
			Val9 ^{AP}	Arg51 ^{P+}	Pro23 ^{AP}
			Val13 ^{AP}	Tyr74 ^{AR}	Leu33 ^{AP}
				Leu94 ^{AP}	Leu140 ^{AP}
				Fen95 ^{AR}	Arg179 ^{P+}
				Val112 ^{AP}	
				Tyr133 ^{AR}	

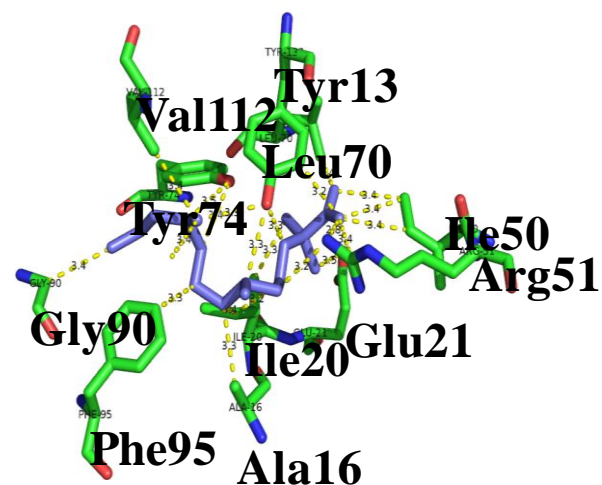
AR: aromático
AP: Apolar
P0: polar não carregado
P+: polar carregado positivamente
P-: polar carregado negativamente

Na *EherOBP1* o resíduo Tyr⁶¹ parece ser necessário na interação com o β-farneseno (Figura 2) e o 2,6,10-trimetildecanoato de metila, enquanto a arginina faz interação com o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno. Entretanto, devido ao número de possíveis interações entre o 2,6,10-trimetildecanoato de metila envolver três resíduos de aminoácidos em detrimento de apenas um resíduo para os outros dois compostos, é possível que esta OBP tenha uma maior especificidade para o principal composto do feromônio sexual do percevejo *E. heros*. Uma maior afinidade de interação com o 2,6,10-trimetildecanoato de metila é também observada para a *EherOBP4* seguida do Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno (Figura 2) e β-farneseno. Neste caso, foi observada a presença da Val⁹ como sendo comum à interação com os dois principais compostos dos feromônios sexuais de *E. heros* e *C. ubica*, respectivamente.

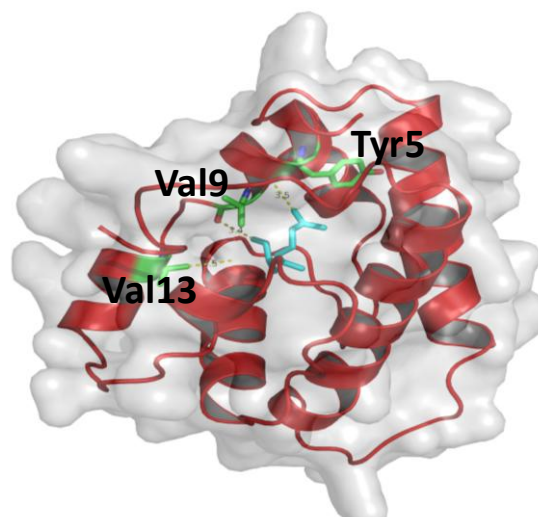
A *EherOBP5* foi a OBP que apresentou o maior número de aminoácidos comuns que interagem com os três ligantes: Arg⁵¹, Tyr⁷⁴, Val¹¹² e Tyr¹³³. As interações entre a *EherOBP5*/2,6,10-trimetildecanoato de metila (Figura 2) e Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno incluem também os aminoácidos Ile²⁰ e Fen⁹⁵. Quanto ao número de possíveis interações, foram observadas 11, 7 e 5 para o 2,6,10-trimetildecanoato de metila, Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno e β-farneseno, respectivamente, sendo esta a possível ordem de especificidade aos ligantes. Os resíduos Pro²³, Pro²⁵ e Leu¹⁴⁰ são comuns às interações com os três ligantes, porém, β-farneseno e 2,6,10-trimetildecanoato de metila ainda fazem interação comum com o Gln²², enquanto os resíduos de Leu³³ e Arg¹⁷⁹ também estão presentes nas interações com 2,6,10-trimetildecanoato de metila e Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno. Como observado para as outras *EherOBPs* citadas anteriormente, parece haver uma maior especificidade da *EherOBP6* com o 2,6,10-trimetildecanoato de metila (nove interações), seguida seis interações com o β-farneseno e 5 interações com o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno.

As *EherOBPs* apresentam uma predominância dos aminoácidos apolares e aromáticos nas respectivas cavidades de ligação, exceto a *EherOBP3* cuja a possível interação na

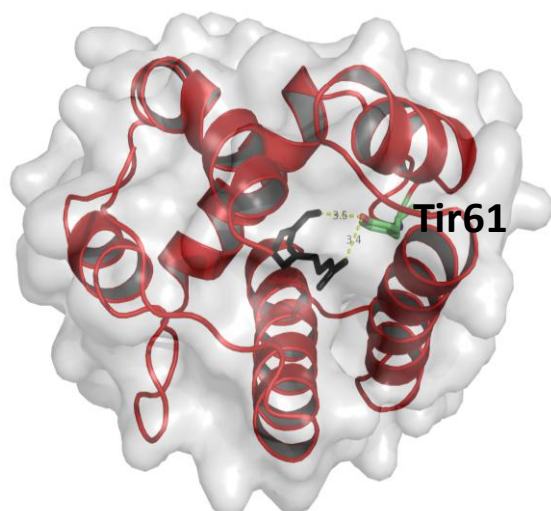
cavidade de ligação parece acontecer com aminoácidos polares sem carga, sendo a glutamina observada na interação com o β -farneseno e a serina possivelmente interage com o 2,6,10-trimetildecanoato de metila. A mesma *Eher*OBP3 foi a única que não apresentou possível interação com um dos compostos testados, não sendo observada para o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno (Figura 2), o principal composto do feromônio sexual da espécie *C. ubica*. Todas as demais possíveis interações entre as *Eher*OBPs e os três principais ligantes considerados neste estudo estão apresentadas como figuras que compõem o material suplementar. Os resultados observados para as *Eher*OBPs sugerem que essas proteínas podem apresentar maior especificidade de ligações a feromônios sexuais em detrimento de feromônios de alarme e defesa e do volátil de folhas verdes analisados nesse estudo.



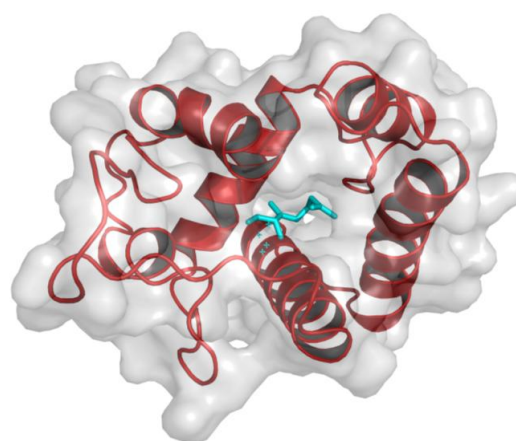
EherOBP5/2,6,10-trimetildecanoato de metila



EherOBP4/Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno



EherOBP1/Farneseno



EherOBP3/Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno

Figura 2. Possíveis interações *EherOBPs*/ligantes. Os aminoácidos que participam das interações com os ligantes e compõem a possível cavidade de ligação de cada OBP estão indicados em negrito em cada uma das imagens, seguidos do número que indica a posição desses aminoácidos na estrutura primária da proteína. A interação *EherOBP5*/2,6,10-trimetildecanoato de metila está representada apenas com os aminoácidos que participam da interação para que fosse possível a observação dos mesmos. A figura da estrutura completa está disponível no material suplementar.

As possíveis cavidades de ligação das *CubiOBPs* apresentaram aminoácidos apolares, polares não carregados e polares carregados positivamente (Tabela 5). O único aminoácido aromático identificado foi a Phe²⁷ na cavidade de ligação da *CubiOBP2*. De maneira geral, os aminoácidos apolares predominaram na cavidade de ligação das *CubiOBPs*, exceto para a *CubiOBP4*, na qual foi observada uma predominância de aminoácidos polares não carregados e carregados positivamente.

Os padrões de interação entre as *CubiOBPs* e os ligantes indicam que as *CubiOBP2* e 4 possivelmente interagem especificamente com feromônios sexuais, uma vez que não foram observadas interações entre o β -farneseno (Figura 3) (composto do feromônio de alarme) e essas *OBP*s. Ainda neste sentido, é possível observar que para a *CubiOBP2* a presença dos aminoácidos Ala²⁶ e Ile²³ parece ser fundamental para a interação com o 2,6,10-trimetildecanoato de metila e o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno, apresentando o primeiro uma aparente maior especificidade em detrimento do segundo, uma vez que este interage com quatro resíduos de aminoácidos, enquanto o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno interage com cinco resíduos. Em relação à *CubiOBP4*, há uma interação comum na cavidade de ligação entre os aminoácidos Ser⁷⁰, His²⁸ e Ile¹²⁹ e os ligantes 2,6,10-trimetildecanoato de metila e o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno (Figura 3). Porém, diferente da especificidade apresentada pela *CubiOBP3*, neste caso foi observada uma provável maior afinidade da *CubiOBP4* com o ligante o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno interagindo com 4 resíduos de aminoácidos, enquanto o 2,6,10-trimetildecanoato de metila interage apenas com três resíduos.

As interações observadas para a *CubiOBP1* indicam que os resíduos de aminoácidos Ser⁴² e Leu¹⁷³ participam diretamente das interações com os três ligantes citados anteriormente e, considerando a quantidade de interações com os aminoácidos da possível cavidade de ligação, a *CubiOBP1* apresenta uma maior especificidade para o 2,6,10-trimetildecanoato de metila (Figura 3), seguido do Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno e β -farneseno, cada um apresentando cinco, quatro e duas interações, respectivamente. Para as interações observadas entre a *CubiOBP3* e os três ligantes, os aminoácidos que possivelmente participam das interações não são comuns entre os ligantes. Ainda na *CubiOBP3*, esta não parece apresentar uma maior especificidade entre os compostos 2,6,10-trimetildecanoato de metila e o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno, cada um apresentando duas interações, sendo o β -farneseno (Figura 3) o ligante de menor especificidade com apenas uma interação.

Tabela 5. Resíduos de aminoácidos possivelmente envolvidos na interação com o ligante na cavidade de ligação das *CubiOBPs*. Em amarelo estão representados os resíduos que interagem com os três compostos; em vermelho estão representados os resíduos que interagem com os compostos dos feromônios sexuais de *C. ubica* e *E. heros*.

	<i>CubiOBP</i>			
	1	2	3	4
β-Farneseno	Ser142 ^{P0}	NA	Ala85 ^{AP}	NA
	Leu173 ^{AP}			
2,6,10-trimetildecanoato de metila	Pro17 ^{AP}	Ala26 ^{AP}	Met51 ^{AP}	Ser7 ^{P0}
	Gln23 ^{P0}	Fen27 ^{AR}	Ile108 ^{AP}	His128 ^{P+}
	Ile38 ^{AP}	Thr35 ^{P0}		Ile129 ^{AP}
	Ser142 ^{P0}	Ile123 ^{AP}		
	Leu173 ^{AP}			
Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno	Leu34 ^{AP}	Ser2 ^{P0}	Val2 ^{AP}	Ser7 ^{P0}
	Val61 ^{AP}	Ala26 ^{AP}	Leu81 ^{AP}	Ala122 ^{AP}
	Ser142 ^{P0}	Ile123 ^{AP}		His128 ^{P+}
	Leu173 ^{AP}			Ile129 ^{AP}

AR: aromático
 AP: Apolar
 P0: polar não carregado
 P+: polar carregado positivamente

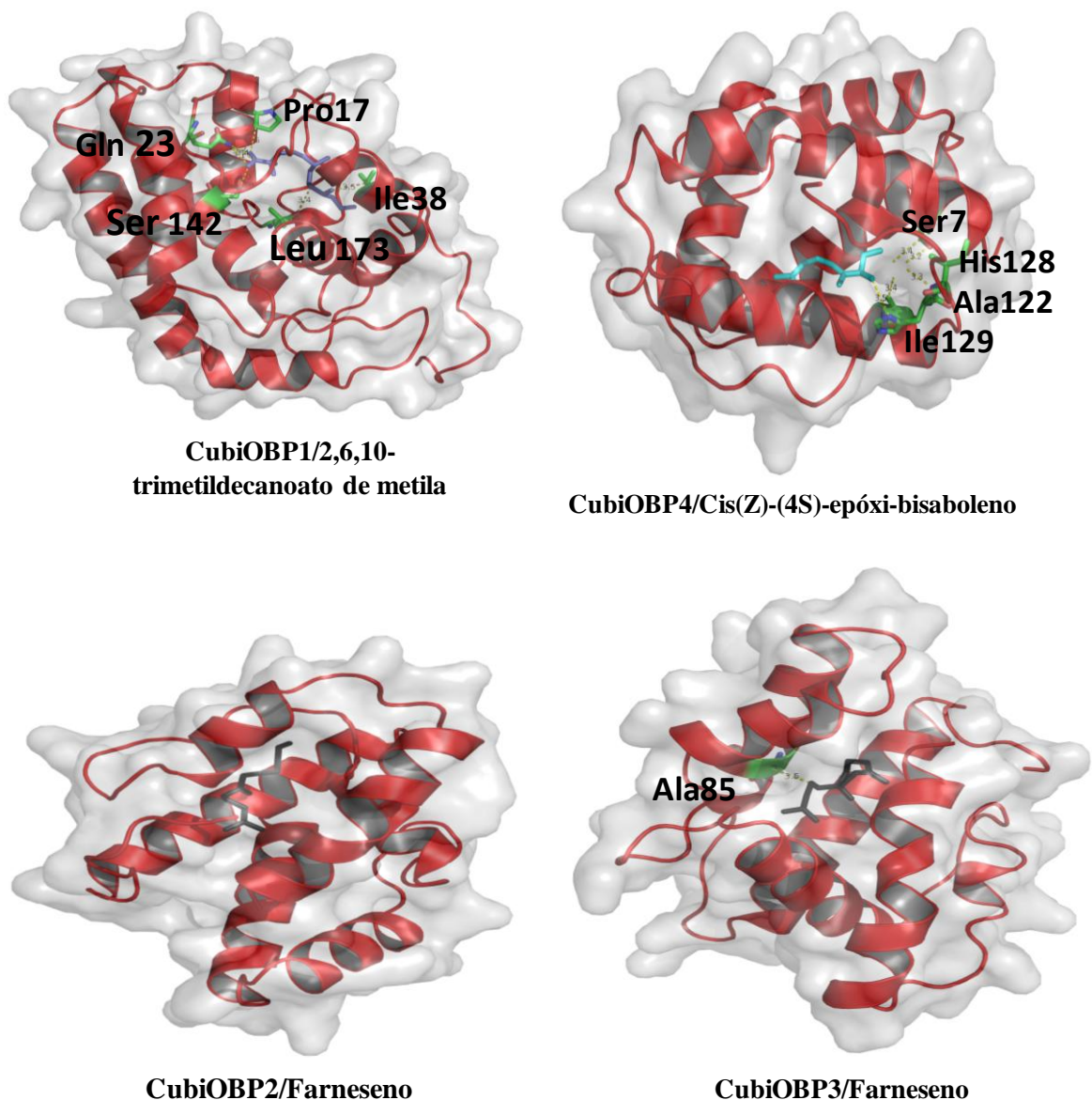


Figura 3. Possíveis interações *CubiOBPs*/ligantes. Os aminoácidos que participam das interações com os ligantes e compõem a possível cavidade de ligação de cada OBP estão indicados em negrito em cada uma das imagens, seguidos do número que indica a posição desses aminoácidos na estrutura primária da proteína.

A *Dime*OBP1 apresentou as maiores energias livres de ligação para todos os ligantes analisados nesse estudo (Tabela 2). Mesmo as menores energias observadas para o 2, 6,10-trimetildecanoato de metila (-4,5 kcal/mol) e o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno (-5 kcal/mol) não correspondem à interação desses ligantes com a cavidade da ligação da *Dime*OBP1, ficando os mesmos acomodados na superfície externa da proteína (Figura 4 A e B). Outro fator de destaque foi a característica dos aminoácidos que parecem interagir com os ligantes, sendo os mesmos polares carregados positivamente (Lisina e Arginina) e polar não carregado (Asparagina). O único aminoácido apolar que parece interagir com o Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno é uma glicina (Figura 4B).

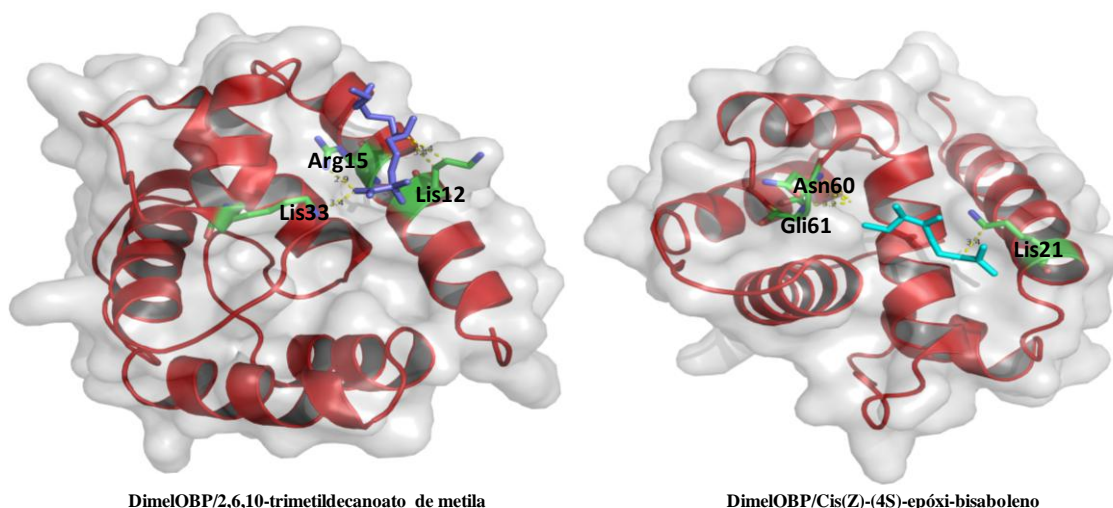


Figura 4. Possíveis interações *DimeIOBP1*/ligantes. Os aminoácidos que interagem com os ligantes estão indicados em negrito seguido do número que indica sua posição na estrutura primária da proteína.

4. Discussão

A modelagem estrutural possibilitou uma melhor compreensão das possíveis interações das OBPs com moléculas odorantes e as relações comportamentais envolvidas nessas interações. O principal molde utilizado na predição da estrutura 3D foi o da *BmorPBP* (*Bombix mori* Pheromone Binding Protein) (ID PDB: 1DQE) caracterizado pela presença de seis alfa-hélices estabilizadas por três ligações dissulfeto (Sandler *et al.*, 2000) e com uma longa região C-terminal que é convertida em sétima alfa-hélice quando em pH ácido. Entre as OBPs modeladas tendo como molde a 1DQE (*EherOBPs* 1, 3, 4 e 5; *CubiOBPs* 2, 3 e 4), foram observadas diferenças apenas na *EherOBP5* – que contém sete alfa-hélices – e nas *CubiOBP2* e *CubiOBP3* – não apresentam uma região terminal longa. O mesmo molde utilizado na modelagem das OBPs de percevejos citadas acima foi utilizado na predição da estrutura da OBP1 do percevejo da alfafa, o hemitera *Adelphocoris lineolatus* (Gu *et al.*, 2011).

As duas OBPs plus-C identificadas nesse estudo tiveram a predição dos modelos 3D baseada no molde ID PDB 3PM2 (*Anopheles gambiae* OBP47). A *CubiOBP1* apresentou uma estrutura contendo oito alfa-hélices mantidas por seis ligações dissulfeto, uma longa região C-terminal sem estrutura secundária definida, além da presença de um *hairpin* entre as hélices 3 e 4 (característica bem conservada entre as OBPs), um longo *loop* conectando as hélices 6 e 7 e um trecho longo de resíduos conectando as hélices 7 e 8. Em contrapartida, a *EherOBP6* também classificada como *plus-C*, não compartilhou as mesmas características estruturais do molde e da *CubiOBP1*. A presença de sete alfa-hélices e seis ligações dissulfeto na estrutura predita da *EherOBP6* não representou um impedimento às análises de *docking* molecular, uma vez que essa proteína apresentou alta similaridade de sequência com a *AgamOBP47* e foi considerada irmã da *CubiOBP6* de acordo com a análise filogenética descrita no capítulo anterior.

O molde utilizado para a predição da estrutura 3D da *DimeIOBP1* foi o da OBP20 identificada na espécie *Anopheles gambiae* (Xu *et al.*, 2003). A estrutura modelada apresenta

seis alfa-hélices e uma longa cauda na região C-terminal que se insere no centro da proteína, formando uma borda na cavidade de ligação (Ziemba *et al.*, 2013). Contudo, diferente das OBPs citadas neste trabalho, a *DimeIOBP1* apresenta apenas 5 resíduos de cisteína, sendo este o motivo desta proteína apresentar apenas duas ligações dissulfeto em sua estrutura predita.

A presença de aminoácidos hidrofóbicos na cavidade de interação com o ligante tem sido uma característica marcante das OBPs e está diretamente relacionada com sua capacidade de interação com moléculas voláteis liberadas no ambiente, uma vez que essas são predominantemente hidrofóbicas (Streinbrecht, 1997). Os aminoácidos mais comuns relacionados às cavidades de ligação das OBPs são alanina, isoleucina, leucina, valina, metionina, além dos aromáticos tirosina e fenilalanina e os polares serina, lisina, histidina, aspartato e glutamato, estando esse últimos relacionados à formação de pontes de hidrogênio com grupos funcionais de alguns ligantes (Sandler *et al.*, 2000; Kruse *et al.*, 2003; Damberguer *et al.*, 2007; Lescop *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2010; Tsitsanou *et al.*, 2013; Mutis *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014). A capacidade de se ligar a moléculas odorantes com certa afinidade e especificidade proporcionou às OBPs o reconhecimento como elementos importantes no processo de quimiodeteção e reconhecimento de moléculas odorantes em insetos. As evidências indicam que essas proteínas podem sofrer mudanças conformacionais provocadas por diferentes componentes de feromônios (Mohl *et al.*, 2002), são essenciais à resposta fisiológica desencadeada pela presença da molécula odorante (Pophof, 2002), conferem alta sensibilidade e especificidade ao sistema olfatório da mariposa gigante *A. polyphemus* (Grosse - Wilde *et al.*, 2006; Forstner *et al.*, 2009), são responsáveis por decodificar a informação química contida na molécula odorante (Sun *et al.*, 2012) e, em termos biotecnológicos, representam os melhores alvos de intervenção no sistema olfatório de insetos para o desenvolvimento de ferramentas de controle de pragas e insetos de interesse sanitário (Pelosi *et al.*, 2013). A seletividade das OBPs a diferentes compostos químicos pode ser bastante distinta e, embora muitas OBPs apresentem estreita afinidade a algumas estruturas de odorantes, uma alta ou exclusiva afinidade nunca foi descrita para OBPs até o momento (Sun *et al.*, 2012; Calvello *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2015). Como essas proteínas podem ou não discriminar diferentes grupos de compostos químicos e, conseqüentemente, contribuir para a seletividade olfatória dos insetos é uma questão ainda a ser resolvida (Leal, 2012).

Através da modelagem molecular das OBPs identificadas em *E. heros*, *C. ubica* e *D. melacanthus*, seguida de *docking* molecular das estruturas preditas com sete compostos odorantes, foi possível identificar uma possível afinidade dos ligantes testados às OBPs. Neste sentido, as OBPs de *E. heros* e *C. ubica* aparentemente apresentam uma maior afinidade às moléculas correspondentes aos principais compostos dos feromônios sexuais das duas espécies, 2, 6,10-trimetiltridecanoato de metila e Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno, respectivamente. Esses compostos nunca foram submetidos individualmente a ensaios de olfação *in vitro* ou *in silico*, entretanto, são utilizados como mistura de compostos para ensaios *in vivo* (Borges *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2000; Laumann *et al.*, 2007). O composto β -farneseno

é um feromônio de alarme liberado por algumas espécies de insetos, incluindo o afídeo *A. lineolatus* (Hemiptera: Miridae). De acordo com os resultados do *docking* molecular, este composto parece ser o que apresenta menor afinidade para as OBPs testadas, não havendo nenhuma interação com as OBPs 2 e 4 de *C.ubica* e uma possível fraca interação com as demais OBPs. Os resultados com o β -farneseno divergem das observações feitas por Sun *et al.* (2014) na qual a OBP13 do *A. lineolatus* apresentou alta afinidade por terpenóides, incluindo o β -farneseno. Segundo os autores, essa afinidade pode estar relacionada com a presença de muitos aminoácidos hidrofílicos na cavidade de ligação, o que não foi observado em nenhuma das OBPs de percevejos descritas nesse estudo (Sun *et al.*, 2014).

A não observação de interações entre as moléculas odorantes testadas e a *Dime*/OBP1 pode ser devido a essa espécie apresentar a predominância de comunicação vibracional (Moraes *et al.*, 2013). A preferência por este tipo de comunicação é reforçada pela ausência de identificação, até o momento, de qualquer composto relacionado à feromônio sexual em *D. melacanthus*, sendo os voláteis identificados associados à defesa desses insetos (Marques *et al.*, 2007; Pareja *et al.*, 2007).

5. Conclusão

Os resultados obtidos com os experimentos desenvolvidos nesse trabalho podem representar uma ferramenta útil na predição de compostos com habilidade de desencadear respostas comportamentais em percevejos. Essas informações podem ser utilizadas no desenvolvimento de ferramentas alternativas à utilização de inseticidas como, por exemplo, novas armadilhas de captura e/ou biosensores no campo.

6. Referências

- Borges, M., K. Mori, M.L.M. Costa & E.R. Sujii. 1998. Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros*(Het., Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.* 122: 335-338.
- Brandl, M., Weiss, M. S., Jabs, A., Sühnel, J. e Hilgenfeld, R. (2001). C-H... π interactions in proteins. *J. Mol. Biol.* 307: 357-377.
- Calvello, M., Guerra, N., Brandazza, A., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Dani, F.R., Turillazzi, S. e Pelosi, P. (2003) Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 1933–1943.
- Costa, M.L.M., M. Borges & E.F. Vilela. 2000. Effect of stereoisomers of the main component of the sex pheromone of *Euschistus heros*(F.) (Heteroptera: Pentatomidae) in the attractiveness of female. *An. Soc. Entomol. Bras.* 29: 413-422
- Damberger F, Nikonova L, Horst R, Peng G, *et al.* (2000). NMR characterization of a pH-dependent equilibrium between two folded solution conformations of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori*. *Protein Sci.*9: 1038-1041.

- Damberger, F. F., Ishida, Y., Leal, W. S. e Wuthrich, K. (2007) Structural basis of ligand binding and release in insect pheromone-binding proteins: NMR structure of *Antheraea polyphemus* PBP1 at pH 4.5. *J Mol Biol* 373: 811–819.
- Deng, Y., Yan, H., Gu, J. *et al.* (2013) Molecular and functional characterization of odorant-binding protein genes in an invasive vector mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*, 8, e68836. DOI:10.1371/journal.pone.0068836
- Di Luccio, E., Ishida, Y., Leal, W. S. e Wilson, D. K. (2013) Crystallographic Observation of pH-Induced Conformational Changes in the *Amyelois transitella* Pheromone-Binding Protein AtrPBP1. *PLoS ONE* 8(2): e53840
- Fan, J., Francis, F., Liu, Y., Chen, J. L. E Deng, D. F. (2011) An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. *Genet. Mol. Res.* 10 (4): 3056 – 3069.
- Fiser, A. E Sali, A. (2003) ModLoop: automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics*. V.19, n. 18, p. 2500-2501.
- Forstner, M., Breer, H. and Krieger, J. (2009) A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkworm *Antheraea polyphemus*. *Int J. Biol. Sci.*, 5: 745–757.
- Grosse-Wilde, E., Svatos, A. e Krieger, J. (2006) A pheromone-binding protein mediates the bombykol-induced activation of a pheromone receptor in vitro. *Chem Senses*. 31:547–55
- Gu, S., Wang, W., Wang, G. *et al.* (2011) Functional characterization and immunolocalization of odorant binding protein 1 in the lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Archives of Biochemistry and Physiology*, 77, 81–98
- Honson, N., Johnson, M.A., Oliver, J.E. *et al.* (2003) Structure–activity studies with pheromone-binding proteins of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Chemical Senses*, 28, 479–489
- Jayanthi, P.D.K., Kempraj, V., Aurade, R.M., Roy, T. K., Shivashankara, K. e Abraham, V. (2014) Computational reverse chemical ecology: virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis*. *BMC Genomics*. 15: 209.
- Jiang QY, Wang WX, Zhang ZD, Zhang L. 2009. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:440–447.
- Kruse, S. W., Zhao, R., Smith, D. P., and Jones, D. N. (2003) Structure of a specific alcohol-binding site defined by the odorant-binding protein LUSH from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Struct. Biol.* 10,694–700
- Lartigue, A., Gruez, A., Spinelli, S. *et al.* (2003) The crystal structure of a cockroach pheromone-binding protein suggests a new ligand binding and release mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 30213–30218.
- Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Crystallography*. V. 26, n.2, p. 283–291.
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., Macarthur, M. W., Kaptein, R., Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR*. V.8, p.477–486.
- Laughlin, J.D., Ha, T.S., Jones, D.N.M. & Smith, P. (2008) Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell*, 133, 1255–1265.
- Laumann, R. A., M. Borges, M.C.B. Moraes, C.S.S. Pires, E.R. Sujii, B.S. Correa-Ferreira & C.J. Ávila. (2007). Formulação do feromônio sexual do percevejo-marrom *Euschistus*

heros:eficiência de atração, vida útil e raio de ação. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 198, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. 17p.

Leal, W. S. (2012). An acute olfactory system is essential for reproduction—the raison d'être for adult insects¹. Proc. Am. Philos. Soc. 156, 295–302.

Leite, N.R., Krogh, R., Xu, W. *et al.* (2009) Structure of an odorant-binding protein from the mosquito *Aedes aegypti* suggests a binding pocket covered by a pH-sensitive 'Lid'. PLoS ONE, 4, e8006. DOI:10.1371/journal.pone.0008006.

Lescop, E., Briand, L., Pernollet, J. & Guittet, E. (2009) Structural basis of the broad specificity of a general odorant-binding protein from honeybee. Biochemistry, 48, 2431–2441

Lu, Y., Li, H., Zhuang, S. *et al.* (2014) Olfactory biosensor using odorant-binding proteins from honeybee: ligands of floral odors and pheromones detection by electrochemical impedance. Sensors and Actuators B: Chemical, 193, 420–427

Mao, Y., Xu, X., Xu, W., Ishida, Y., Leal, W. S., Ames, J. B., and Clardy, J. (2010) Crystal and solution structures of an odorant-binding protein from the southern house mosquito complexed with an oviposition pheromone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 19102–19107

Marques, F.A., Wendler, E.P., Maia, B.H.L.N., Ventura, M.U., and Gatti, I.C. 2007. Identification of defensive compounds in metathoracic glands of adults of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae). J. Braz. Chem. Soc. 18:1242-1246

Mohanty S, Zubkov S, Gronenborn AM (2004) The solution NMR structure of *Antheraea polyphemus* PBP provides new insight into pheromone recognition by pheromone-binding proteins. J Mol Biol 337: 443–451

Mohl C, Breer H, Krieger J (2002) Species-specific pheromonal compounds induce distinct conformational changes of pheromone binding protein subtypes from *Antheraea polyphemus*. Invert Neurosci 4: 165–174.

Moraes, M. C. B., Magalhães, D. M., Cokl, A., Laumann, R. A., Silva, J.P., Silva, C. C., Borges, M. (2013) Vibrational communication and mating behaviour of *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) recorded from loudspeaker membranes and plants. Physiol. Entomol. 39 (1): 1 – 11. DOI: 10.1111/phen.12041

Mutis, A., Palma, R., Venthur, H., Iturriaga-Vasquez, P., Faundez-Parraguez, M., Mella-Herrera, R., Kontodimas, D., Lobos, C. e Quiroz, A. (2014) Molecular Characterization and In Silico Analysis of the Pheromone-Binding Protein of the European Grapevine Moth *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Tortricidae). Neotrop. Entomol. DOI 10.1007/s13744-014-0212-2

Paas, Y., Devillers-Thiéry, A., Teichberg, V.I. *et al.* (2000) How well can molecular modeling predict the crystal structure: the case of the ligand-binding domain of glutamate receptors. Trends in Pharmacological Sciences, 21, 87–92.

Pareja, M., Borges, M., Laumann, R.A., and Moraes, M.C.B. 2007. Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five neotropical stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). J. Insect Physiol. 53:639-648.

Pelosi, P., Immacolata, I., Felicioli, A. e Dani, F. R. (2014) Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. Front Physiol. 5: 320.

Pesenti ME, Spinelli S, Bezirard V, Briand L, *et al.* (2008). Structural basis of the honey bee PBP pheromone and pH-induced conformational change. J. Mol. Biol. 380: 158-169.

Pesenti ME, Spinelli S, Bezirard V, Briand L, *et al.* (2009). Queen bee pheromone binding protein pH-induced domain swapping favors pheromone release. J. Mol. Biol. 390: 981-990

- Pophof B (2002) Moth pheromone binding proteins contribute to the excitation of olfactory receptor cells. *Naturwissenschaften* 89: 515–518.
- Ravna, A.W. e Sylte, I. (2012) Homology Modeling of transporter proteins (carriers and ion channels). In: *Homology Modeling: Methods and Protocols*(ed. by A. J. W. Orry and R. Abagyan), pp. 281-299. Molsoft L.L.C., San Diego, California.
- Sandler, B. H., Nikonova, L., Leal, W. S., and Clardy, J. (2000) Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-bindingprotein-bombykol complex. *Chem. Biol.*7,143–151
- Schwede, T., Sali, A., Eswar, N. & Peitsch, M.C. (2007) Protein structure modeling. *Computational Structural Biology – Methods and Applications*(ed. by T. Schwede and M. C. Peitsch), pp. 3-35. World Scientific, Danvers, Massachusetts.
- Shi, J., Blundell, T.L. & Mizuguchi, K. (2001) FUGUE: sequencestructure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. *Journal of Molecular Biology*,310, 243–257.
- Söding J., Bierget, A. e Lupas, A. N. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acid Res.* 33: 244 – 248.
- Spinelli, S., Lagarde, A., Iovinella, I. (2012) Crystal structure of *Apis mellifera*OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*,42, 41–50
- Steinbrecht, R.A. (1997) Pore structures in insect olfactory sensilla: a review of data and concepts. *Int J Insect Morphol.* 26: 229–245
- Sun YF, De Biasio F, Qiao HL, Iovinella I, Yang SX, *et al.* (2012) Two Odorant-Binding Proteins Mediate the Behavioural Response of Aphids to the Alarm Pheromone (E)- β -Farnesene and Structural Analogues. *PLoS ONE* 7(3): e32759. doi:10.1371/journal.pone.0032759
- Trott, O. e Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31 (2): 455 – 461.
- Tsitsanou, K. E., Drakou, D.E., Gruber, A. V., Kythreoti, G., Azem, A., Fessas, D., Eliopoulos, E., Iatrou, K., Zographos, S. E. (2013) Crystal and Solution Studies of the “Plus-C” Odorant-binding Protein 48 from *Anopheles gambiae*: CONTROL OF BINDING SPECIFICITY THROUGH THREE-DIMENSIONAL DOMAINS WAPPING. *Jour. Biol.Chem.* 288 (46), 33427 – 33438.
- Venthur, H., Mutis, A., Zhou, J.-J., Quiroz, A. (2014) Ligand binding and homology modelling of insect odorant-binding proteins. *Physiol. Entomol.*, 39, 183-198.
- Vogt, R.G. & Riddiford, L.M. (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*,293, 161–163.
- Wogulis M, Morgan T, Ishida Y, Leal WS, *et al.* (2006). The crystal structure of an odorant binding protein from *Anopheles gambiae*: evidence for a common ligand release mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*339: 157-164.
- Wojtasek H and Leal WS (1999). Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes. *J. Biol. Chem.*274: 30950-30956.
- Yin, J., Zhuang, X., Wang, Q., Cao, Y., Zhang, S., Xiao, C., Li, K. (2015) Three amino acid residues of an odorant-binding protein are involved in binding odours in *Loxostege sticticalis* L. *Insect. Mol. Biol.* DOI: 10.1111/imb.12179
- Zhou, J.-J., Robertson, G., He, X. *et al.* (2009) Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *Journal of Molecular Biology*,389, 529–545.

Ziemba, B. P., Murphy, E. J., Edlin, H. T., and Jones, D. N. (2013) A novel mechanism of ligand binding and release in the odorant-binding protein 20 from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Protein Sci.*22,11–21

Xu PX, Zwiebel LJ, Smith DP. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol.* 2003;12:549–560.

Xu W., Cornel A. J. e Leal W. S. (2010). Odorant-binding proteins of the malaria mosquito *Anopheles funestus sensu stricto*. *PLoS ONE* 5:e15403

Considerações Finais

Os resultados obtidos neste trabalho representam o primeiro estudo de proteínas relacionadas à olfação em hemípteros da família Pentatomidae. A identificação de transcritos relacionados à olfação nessas espécies contribuiu para uma melhor avaliação da importância da relação entre o sistema olfatório desses insetos e o comportamento desses no ambiente. Ao que tudo indica, as OBPs parecem ter afinidade com moléculas relacionadas ao feromônio sexual de duas espécies avaliadas (*E. heros* e *C. ubica*), indicando uma prioridade ao processo reprodutivo. Este resultado pode estar relacionado ao estado fisiológico dos indivíduos utilizados na extração de RNA que permitiu a identificação dos transcritos, sendo a mesma realizada com insetos não acasalados. Contudo, para a espécie *D. melacanthus* foi levantada a hipótese dessa espécie apresentar um tipo de resposta ambiental baseada em vibrações em detrimento de pistas olfativas, uma vez que uma quantidade significativamente menor de transcritos relacionados à olfação foi identificada nessa espécie e a única OBP com sequência completa não apresentou afinidade significativa pelas moléculas odorantes avaliadas nos testes *in silico*. As técnicas computacionais abordadas no capítulo dois deste trabalho fazem parte de uma nova abordagem denominada Ecologia Química Reversa Computacional (Jayanthi *et al.*, 2014), cujo objetivo é identificar prováveis moléculas odorantes *in silico* com o objetivo de diminuir os gastos de dinheiro e tempo demandados nas análises *in vivo* e/ou *in vitro*.

Quanto aos estudos da ultraestrutura sensilar em *E. heros*, este trabalho também é pioneiro neste tipo de abordagem. Os resultados observados nesses estudos representam um passo inicial importante no detalhamento estrutural das unidades olfativas dos insetos Pentatomídeos. Além do estabelecimento de um protocolo para processamento das amostras, foi possível observar a organização ultraestrutural das sensilas dessa espécie e inferir a existência de grande semelhança com a do hemíptero da família Miridae *Adelphocoris lineolatus*.

As contribuições levantadas nesse estudo abrem caminhos para a condução de novas análises que permitirão desvendar por completo o sistema olfativo das três espécies de percevejos abordadas neste trabalho.

Referência

Jayanthi, P.D.K., Kempraj, V., Aurade, R.M., Roy, T. K., Shivashankara, K. e Abraham, V. (2014) Computational reverse chemical ecology: virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis*. BMC Genomics. 15: 209.

Perspectivas

A realização de experimentos que permitam a observação *in vitro* e/ou *in vivo* da afinidade das OBPs com moléculas odorantes poderá confirmar nossas observações. Esses experimentos podem incluir a expressão *in vitro* dessas OBPs com posterior validação funcional e o bloqueio da expressão desses genes através de RNA de interferência e análise da resposta do indivíduo *in vivo*.

Observar a expressão das OBPs identificadas nesse estudo na ultraestrutura sensilar através de técnicas de microscopia com imunomarcacão também faz-se relevante para melhor avaliação funcional dessas proteínas.

Utilizar os conhecimentos obtidos no desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas para aplicacão no campo, sendo os biossensores as principais promessas nessa área de pesquisa.

Material Suplementar

Tabela Suplementar 1. Contigs das antenas de machos e fêmeas adultos (12 dias) virgens do percevejo marrom *E. heros* com similaridade a genes relacionados à olfação. Os contigs que representam OBP-s com sequência completa estão representados pelo número de acesso em negrito.

Código de Acesso	Similaridade	Comprimento (pb)	Hits	Valor mínimo de E	Média da Similaridade (%)
GBER01005583	CSP	629	10	4,1E-24	70,4
GBER01005618	CSP	536	10	1,9E-25	77,1
GBER01012184	CSP	407	1	6,3E-9	59,0
GBER01018566	CSP	399	10	9,8E-34	81,0
GBER01001032	CSP1	690	10	2,6E-34	75,1
GBER01011255	CSP 1 e 3	574	10	1,5E-17	80,3
GBER01009771	CSP1 e 2	447	10	5,4E-24	65,1
GBER01010357	CSP2	319	10	1,7E-17	66,0
GBER01010544	CSP2	527	10	2,2E-15	62,8
GBER01014200	CSP2	443	8	2,9E-25	70,0
GBER01016775	CSP2	487	10	4,9E-33	80,8
GBER01017174	CSP2	334	10	9,6E-34	75,7
GBER01000567	OBP	726	9	1,8E-15	53,4
GBER01001615	OBP	557	1	2,3E-11	55,0
GBER01001803	OBP	828	6	1,0E-15	48,8
GBER01003358	OBP	373	1	1,8E-11	57,0
GBER01005551	OBP	718	6	3,5E-14	58,3
GBER01006153	OBP	859	10	3,3E-20	51,6
GBER01006190	OBP	490	10	1,6E-28	62,4
GBER01007924	OBP	1039	10	1,4E-49	69,1
GBER01014089	OBP	338	3	6,7E-27	78,3
GBER01016586	OBP	617	10	2,1E-44	67,0
GBER01018275	OBP	425	10	1,6E-15	52,5
GBER01000050	OBP1	476	2	4,8E-9	63,5
GBER01017348	OBP1	387	3	6,7E-27	78,3
GBER01004408	OBP2	542	3	6,1E-26	71,7
GBER01010977	OBP2	384	4	2,1E-35	79,6
GBER01011319	OBP2 e 4	341	3	3,2E-13	82,0
GBER01008196	PBP3 e OBP5	726	10	1,7E-32	70,0
GBER01008711	OBP3	652	8	1,2E-16	52,6

GBER01010155	OBP3	532	1	9,2E-9	48,0
GBER01003441	OBP5	351	7	5,4E-14	50,7
GBER01006133	OBP6	514	8	5,2E-11	50,2
GBER01013326	OBP7	736	1	2,3E-26	52,0
GBER01006979	OR1-like	1096	10	4,3E-16	48,9
GBER01018823	OR10	341	1	4,8E-9	62,0
GBER01018766	OR43a	650	10	5,4E-12	46,5
GBER01000496	OR47	1191	10	7,9E-14	41,9
GBER01017355	OR85b	845	10	2,6E-14	43,6

Tabela Suplementar 2. *Contigs* das antenas de machos e fêmeas adultos (12 dias) virgens do percevejo *C. ubica* com similaridade a genes relacionados à olfação. Os *contigs* que representam OBPs com sequência completa estão representados pelo número de acesso em negrito.

Código de Acesso	Similaridade	Comprimento (pb)	Hits	Valor mínimo de E	Média da Similaridade (%)
GBFA01009672	CSP	510	10	1,7E-38	75,0
GBFA01015066	CSP	396	10	6,5E-22	68,5
GBFA01011367	CSP1	481	5	7,3E-12	69,2
GBFA01030507	CSP1	395	10	4,9E-25	82,1
GBFA01013124	CSP1	537	10	1,7E-29	76,0
GBFA01015075	CSP1	442	10	6,6E-30	76,3
GBFA01015168	CSP1	432	10	3,3E-37	78,7
GBFA01033041	CSP1	387	10	4,2E-29	81,7
GBFA01029042	CSP2	375	10	3,4E-42	75,5
GBFA01038670	CSP2	501	10	4,6E-20	55,3
GBFA01041041	CSP2	507	10	6,1E-94	73,8
GBFA01018326	CSP3	340	10	6,6E-35	77,6
GBFA01035760	CSP4	840	10	7,3E-17	64,6
GBFA01009611	CSP11	763	10	1,4E-29	76,8
GBFA01026402	CSP receptor	656	10	3,2E-12	98,2
GBFA01004332	OBP	1257	5	7,4E-10	58,4
GBFA01004415	OBP	717	3	3,8E-31	73,0
GBFA01008431	OBP	615	4	6,6E-20	60,8
GBFA01013912	OBP	390	3	9,7E-10	58,0
GBFA01014515	OBP	306	5	4,1E-16	65,8
GBFA01015561	OBP	582	7	1,3E-13	62,3
GBFA01018695	OBP	650	7	1,8E-12	50,1

GBFA01019136	OBP	364	1	4,6E-20	71,0
GBFA01021331	OBP2	846	10	4,8E-40	59,6
GBFA01022585	OBP2	417	1	1,3E-9	52,0
GBFA01020472	OBP	563	10	2,5E-17	65,3
GBFA01031739	OBP	857	10	3,5E-46	67,3
GBFA01032703	OBP	777	10	4,2E-13	50,8
GBFA01033237	OBP	714	1	6,3E-11	68,0
GBFA01034469	OBP	820	1	1,5E-11	65,0
GBFA01025424	OBP1	443	2	1,7E-9	59,0
GBFA01004357	OBP2	479	2	3,3E-10	56,0
GBFA01032915	OBP2	560	4	6,3E-17	55,2
GBFA01015182	OBP2	521	1	2,1E-10	66,0
GBFA01020615	OBP3	441	5	4,2E-13	54,4
GBFA01024842	OBP2	583	3	1,0E-17	80,7
GBFA01035284	OBP3	532	1	4,3E-9	56,0
GBFA01016877	OBP6	928	2	7,1E-11	52,5
GBFA01004373	OBP7	877	1	3,8E-27	53,0
GBFA01004328	OBP14	786	5	4,5E-10	57,0
GBFA01029530	OR	351	2	2,2E-9	55,0
GBFA01010571	OR	993	10	3,5E-14	48,2
GBFA01035378	OR	521	10	1,5E-13	45,1
GBFA01006113	OR1-like	1207	2	1,1E-10	58,5
GBFA01025843	OR2a-like	503	9	6,7E-11	47,8
GBFA01010627	OR17	711	10	3,3E-11	51,8
GBFA01025450	OR25	609	3	1,7E-9	51,7
GBFA01037414	OR38	426	10	8,1E-12	60,8
GBFA01040723	OR82	498	10	3,8E-14	52,7
GBFA01002375	OR92a	566	5	1,7E-9	51,0

Tabela Suplementar 3. *Contigs* das antenas de machos e fêmeas adultos (12 dias) virgens do percevejo *D. melacanthus* com similaridade a genes relacionados à olfação. Os *contigs* que representam OBPs *com sequência completa* estão representados pelo número de acesso em negrito.

Código de Acesso	Similaridade	Comprimento (pb)	Hits	Valor de E mínimo	Média da Similaridade (%)
GBES01005338	CSP	331	10	4,7E-33	85,9
GBES01006562	CSP	564	10	2,0E-10	57,0
GBES01000905	CSP1	440	10	1,1E-40	79,4
GBES01007090	CSP	311	10	3,0E-19	74,8
GBES01000993	CSP2	325	10	2,0E-10	62,3
GBES01001189	CSP2	333	10	1,9E-13	65,0
GBES01007172	CSP2	326	10	3,5E-23	78,6
GBES01000338	OBP	441	8	2,9E-14	56,8
GBES01000353	OBP	313	1	5,0E-18	80,0
GBES01000912	OBP	351	6	2,4E-16	67,5
GBES01000970	OBP	492	4	3,5E-31	70,0
GBES01002143	OBP	469	10	9,4E-29	63,9
GBES01002865	OBP	556	10	2,4E-32	76,0
GBES01004331	OBP	667	2	5,0E-16	61,5
GBES01007180	OBP	460	4	4,4E-10	60,2
GBES01006465	OBP2	441	10	2,7E-41	60,1

Tabela Suplementar 4. Código de acesso e nome das espécies correspondentes às sequências de aminoácidos das OBPs utilizadas na construção da árvore filogenética.

Espécies	Nome Abreviado da OBP	Código de acesso no GenBank
<i>Apis cerana</i>	AcerOBP_ASP1	ABD97847.1
	AcerOBP_ASP2	ABD97844.1
	AcerOBP_ASP3	ABD97846.2
	AcerOBP_ASP4	AAR83081.1
	AcerOBP1	AEZ65022.1
	AcerOBP3	AHN15444.1
	AcerOBP10	AEY59710.1
	AcerOBP11	AGQ03796.1
	AcerOBP16	AEY59889.1
	AcerOBP21	AEY61867.1
<i>Anomala corpulenta</i>	AcorPBP	AGZ93682.1
<i>Aphis craccivora</i>	AcraOBP2	CAR85658.1
<i>Apis dorsata</i>	AdorGOBP56a	XP_006609096.1
	AdorGOBP99b	XP_006616939.1
<i>Acromyrmex echinator</i>	AechOBP_A10	EGI64540.1
<i>Aphis fabae</i>	AfabOBP2	CAR85656.1
	AfabOBP8	CAR85657.1
<i>Apis florea</i>	AfloGOBP_LUSH	XP_003690412.1
<i>Aphis glycines</i>	AglyOBP2	AHJ80888.1
	AglyOBP3	AHJ80889.1
	AglyOBP4	AHJ80890.1
	AglyOBP5	AHJ80891.1
	AglyOBP6	AHJ80892.1
	AglyOBP7	AHJ80893.1
	AglyOBP8	AHJ80894.1

	AglyOBP9	AHJ80895.1
	AglyOBP10	AHJ80896.1
	AglyOBP11	AHJ80897.1
<i>Aphis gossypii</i>	AgosOBP	ACI30678.1
	AgosOBP BP2	AGP04985.1
	AgosOBP BP3	AGP04977.1
	AgosOBP BP4	AGP04978.1
	AgosOBP BP5	AGP04983.1
	AgosOBP BP6	AGP04979.1
	AgosOBP BP7	AGP04980.1
	AgosOBP BP8	AGP04981.1
	AgosOBP BP9	AGP04984.2
	AgosOBP BP10	AGP04982.1
<i>Adelphocoris lineolatus</i>	AlinOBP	ACT83085.1
	AlinOBP1	ACT83086.1
	AlinOBP2	ACZ58028.1
	AlinOBP3	ACZ58029.1
	AlinOBP4	ACZ58030.1
	AlinOBP5	ACZ58031.1
	AlinOBP6	ACZ58032.1
	AlinOBP7	ACZ58085.1
	AlinOBP8	ACZ58079.1
	AlinOBP9	ACZ58080.1
	AlinOBP10	ACZ58081.1
	AlinOBP11	ACZ58082.1
	AlinOBP12	ACZ58083.1
	AlinOBP13	ACZ58084.1
	AlinOBP14	ACZ58086.1
	AlinOBP15	ACZ58033.1
	AlinOBP16	ACZ58034.1

Apolygus lucorum

AlucOBP1	AEA07705.1
AlucOBP2	AEA07706.1
AlucOBP3	AEA07661.1
AlucOBP4	AEP95761.1
AlucOBP5	AEP95759.1
AlucOBP6	AEA07664.1
AlucOBP7	AFJ54048.1
AlucOBP8	AFJ54049.1
AlucOBP9	AFJ54050.1
AlucOBP10	AFJ54051.1
AlucOBP11	AFJ54052.1
AlucOBP12	AFJ54053.1

Apis mellifera

AmelGOBP	1TUJJA
AmelOBP	AF339140_1
AmelOBP_ASP1	AF393494_1
AmelOBP_ASP2	AF393493_1
AmelOBP_ASP4	AF393492_1
AmelOBP_ASP5	AF393497_1
AmelOBP_ASP6	AF393496_1
AmelOBP1	NP_001011590.1
AmelOBP2	NP_001011591.1
AmelOBP3	ABD92639.1
AmelOBP4	NP_001011589.1
AmelOBP5	NP_001011588.1
AmelOBP6	XP_006567383.1
AmelOBP7	NP_001035310.1
AmelOBP8	NP_001164515.1
AmelOBP9	ABD92641.1
AmelOBP10	ABD92642.1
AmelOBP11	NP_001035316.1

	AmelOBP12	ABD92644.1
	AmelOBP13	ABD92645.1
	AmelOBP14	ABD92646.1
	AmelOBP15	ABD92647.1
	AmelOBP16	ABD92648.1
	AmelOBP17	ABD92649.1
	AmelOBP18	ABD92650.1
	AmelOBP19	ABD92651.1
	AmelOBP20	ABD92652.1
	AmelOBP21	ABD92653.1
	AmelPBP_ASP1	AAD51944.1
<i>Anomala osakana</i>	AosaPBP	AAC63437.1
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ApisGOBP69a	XP 008182417.1
	ApisOBP	ACI30694.1
	ApisOBP A10	XP 001947629.1
	ApisOBP1	CAR85628.1
	ApisOBP2	CAR85629.1
	ApisOBP3	AGE97633.1
	ApisOBP4	NP 001153530.1
	ApisOBP5	AGE97635.1
	ApisOBP6	XP 008181869.1
	ApisOBP7	AGE97637.1
	ApisOBP8	CAR85635.1
	ApisOBP9	NP 001153535.1
	ApisOBP10	AGE97640.1
	ApisOBP11	CAX63068.1
	ApisOBP12	CAX63069.1
	ApisOBP13	CAX63070.1
<i>Aulacorthum solani</i>	AsolOBP7	AHH34994.1
<i>Adelphocoris suturalis</i>	AsutOBP6	AHJ81241.1

	AsutOBP7	AHJ81239.1
	AsutOBP8	AHJ81242.1
	AsutOBP10	AHJ81240.1
	AsutOBP11	AHJ81243.1
	AsutOBP12	AHJ81244.1
<i>Brevicoryne brassicae</i>	BbraOBP3	AEX65667.1
<i>Bombus ignitus</i>	BignOBP	ACA64427.1
<i>Bemisia tabaci</i>	BtabOBP	AER27564.1
<i>Camponotus floridanus</i>	CfloOBP_A10	EFN64584.1
<i>Copidosoma floridanum</i>	CfloOBP1	ABB58734.1
	CfloOBP2	ABB58735.1
	CfloOBP3	AHE40945.1
	CfloOBP4	AHE40946.1
	CfloOBP5	AHE40947.1
	CfloOBP6	AHE40948.1
	CfloOBP7	AHE40949.1
	CfloOBP8	AHE40950.1
<i>Camponotus japonicus</i>	CjapOBP11	BAO48209.1
<i>Diaphorina citri</i>	DcitOBP prec	ABG81983.1
<i>Drepanosiphum platanoidis</i>	DplaOBP3	AEX65663.1
<i>Euschistus heros</i>	<i>Eher</i> OBP1	ADJ18275.1
	<i>Eher</i> OBP2	ADO24165.1
<i>Frankliniella occidentalis</i>	FoccPBP	AEP27187.1
<i>Harpegnathos saltator</i>	HsalGOBP56d	EFN84434.1
	HsalOBP_A10	EFN75075.1
<i>Heptophylla picea</i>	HpicOBP1	BAC07270.1
<i>Lygus lineolaris</i>	LlinOBP1	AHF71028.1
	LlinOBP2	AHF71029.1
	LlinOBP3	AHF71030.1

	LlinOBP4	AHF71031.1
	LlinOBP5	AHF71032.1
	LlinOBP6	AHF71033.1
	LlinOBP7	AHF71034.1
	LlinOBP8	AHF71035.1
	LlinOBP9	AHF71036.1
	LlinOBP10	AHF71037.1
	LlinOBP11	AHF71038.1
	LlinOBP12	AHF71039.1
	LlinOBP13	AHF71040.1
	LlinOBP14	AHF71041.1
	LlinOBP15	AHF71042.1
	LlinOBP16	AHF71043.1
	LlinOBP18	AHF71046.1
	LlinOBP19	AHF71049.1
	LlinOBP27	AHF71058.1
	LlinOBP29	AHF71060.1
	LlinOBP30	AHF71061.1
	LlinOBP31	AHF71062.1
	LlinOBP32	AHF71063.1
	LlinOBP33	AHF71054.1
<i>Locusta migratoria</i>	LmigOBP5	AEX33161.1
<i>Laodelphax striatella</i>	LstrOBP1	AEQ19907.1
	LstrOBP2	AEQ19908.1
	LstrOBP3	AEQ19909.1
	LstrOBP4	AEQ19910.1
	LstrOBP5	AEQ19911.1
<i>Macrocentrus cingulum</i>	McinOBP1	AHL25274.1
<i>Metopolophium dirhodum</i>	MdirOBP1	CAR85638.1
	MdirOBP2	CAR85639.1

	MdirOBP3	CAX63256.1
	MdirOBP4	CAR85640.1
	MdirOBP5	CAR85641.1
	MdirOBP6	CAR85642.1
	MdirOBP8	CAR85643.1
<i>Microplitis mediator</i>	MmedOBP1	ABM05968.2
	MmedOBP10	AEO27860.1
	MmedOBP2	ABM05969.1
	MmedOBP3	ABM05970.1
	MmedOBP4	ABM05971.2
	MmedOBP5	ABM05972.1
	MmedOBP56_1	EZA45198.1
	MmedOBP56_3	EZA45302.1
	MmedOBP56_4	EZA45303.1
	MmedOBP6	ABO15559.1
	MmedOBP8	AEF14409.1
	MmedPBP1	ABM05973.2
<i>Myzus persicae</i>	MperOBP	ACI30684.1
	MperOBP4	CAR85645.1
	MperOBP6	CAR85646.1
	MperOBP7	CAR85647.1
	MperOBP8	CAR85648.1
	MperOBP10	CAR85649.1
<i>Megachile rotundata</i>	MrotGOBP56d	XP_003708550.1
<i>Megoura viciae</i>	MvicOBP1	CAR85650.1
	MvicOBP2	CAR85651.1
	MvicOBP5	CAR85652.1
	MvicOBP8	CAR85653.1
	MvicOBP10	CAX63260.1
<i>Nilaparvata lugens</i>	NlugOBP1	ACI30679.1

	NlugOBP2	ACI30680.1
	NlugOBP3	ACI30681.2
<i>Nylanderia pubens</i>	NpubGOBP	ADX36426.1
	NpubOBP1	ADE27967.1
<i>Nasonovia ribisnigri</i>	NribOBP2	CAR85654.1
	NribOBP3	CAX63257.1
	NribOBP5	CAX63258.1
	NribOBP7	CAX63259.1
	NribOBP8	CAR85655.1
<i>Nasonia vitripennis</i>	NvitGOBP_LUSH	XP_001603472.2
	NvitGOBP28a	XP_001601182.1
	NvitGOBP56d	XP_001600573.1
	NvitGOBP56h	XP_008207799.1
	NvitGOBP69a	XP_001600769.1
	NvitGOBP83a	XP_001603497.1
	NvitOBP	ADK73604.1
	NvitOBP_A10	XP_001600111.2
	NvitOBP1	CCD17770.1
	NvitOBP2	CCD17771.1
	NvitOBP4	CCD17773.1
	NvitOBP5	CCD17774.1
	NvitOBP6	CCD17775.1
	NvitOBP7	CCD17776.1
	NvitOBP8	CCD17777.1
	NvitOBP9	CCD17778.1
	NvitOBP10	CCD17779.1
	NvitOBP11	CCD17780.1
	NvitOBP12	CCD17781.1
	NvitOBP13	CCD17782.1
	NvitOBP14	CCD17783.1

NvitOBP15	CCD17784.1
NvitOBP16	CCD17785.1
NvitOBP17	CCD17786.1
NvitOBP18	CCD17787.1
NvitOBP19	CCD17788.1
NvitOBP20	CCD17789.1
NvitOBP21	CCD17790.1
NvitOBP22	CCD17791.1
NvitOBP23	CCD17792.1
NvitOBP24	CCD17793.1
NvitOBP25	CCD17794.1
NvitOBP26	CCD17795.1
NvitOBP27	CCD17796.1
NvitOBP28	CCD17797.1
NvitOBP29	CCD17798.1
NvitOBP30	CCD17799.1
NvitOBP31	CCD17800.1
NvitOBP32	CCD17801.1
NvitOBP33a	CCD17802.1
NvitOBP33b	CCD17861.1
NvitOBP34b	CCD17862.1
NvitOBP35	CCD17804.1
NvitOBP36	CCD17805.1
NvitOBP37	CCD17806.1
NvitOBP38	CCD17807.1
NvitOBP39	CCD17808.1
NvitOBP3a	CCD17772.1
NvitOBP3b	CCD17860.1
NvitOBP40	CCD17809.1
NvitOBP41	CCD17810.1

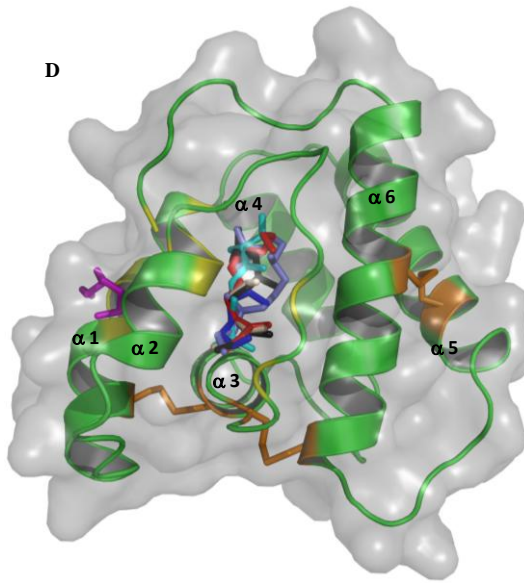
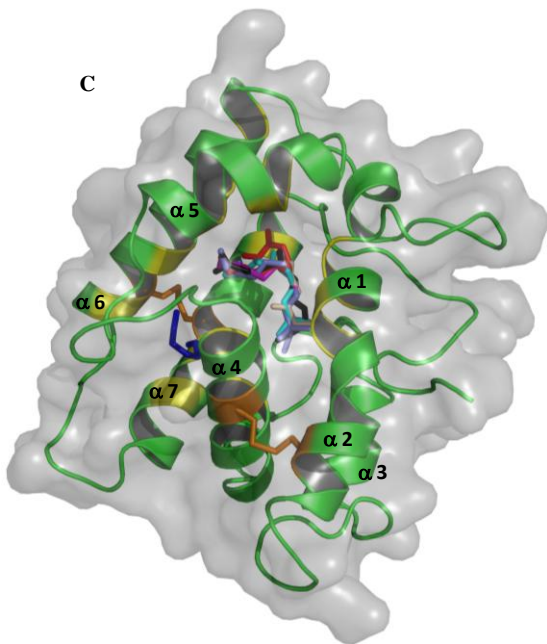
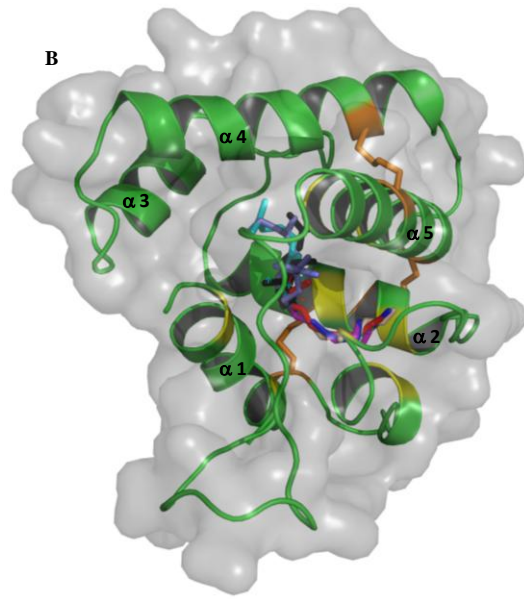
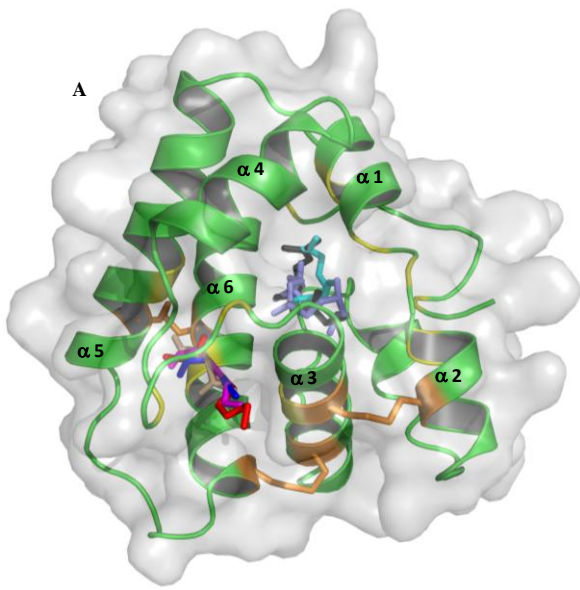
NvitOBP42	CCD17811.1
NvitOBP43	CCD17812.1
NvitOBP44	CCD17813.1
NvitOBP45	CCD17814.1
NvitOBP46	CCD17815.1
NvitOBP47	CCD17816.1
NvitOBP48	CCD17817.1
NvitOBP49	CCD17818.1
NvitOBP50	CCD17819.1
NvitOBP51	CCD17820.1
NvitOBP52	CCD17821.1
NvitOBP53	CCD17822.1
NvitOBP54	CCD17823.1
NvitOBP55	CCD17824.1
NvitOBP56	CCD17825.1
NvitOBP57	CCD17826.1
NvitOBP58	CCD17827.1
NvitOBP59	CCD17828.1
NvitOBP60	CCD17829.1
NvitOBP61	CCD17830.1
NvitOBP62	CCD17831.1
NvitOBP63	CCD17832.1
NvitOBP64	CCD17833.1
NvitOBP65	CCD17834.1
NvitOBP66	CCD17835.1
NvitOBP67	CCD17836.1
NvitOBP68	CCD17837.1
NvitOBP69	CCD17838.1
NvitOBP70	CCD17839.1
NvitOBP71	CCD17840.1

	NvitOBP72	CCD17841.1
	NvitOBP73	CCD17842.1
	NvitOBP74	CCD17843.1
	NvitOBP75	CCD17844.1
	NvitOBP76	CCD17845.1
	NvitOBP77	CCD17846.1
	NvitOBP78	CCD17847.1
	NvitOBP79	CCD17848.1
	NvitOBP80	CCD17849.1
	NvitOBP81	CCD17850.1
	NvitOBP82	CCD17851.1
	NvitOBP83	CCD17852.1
	NvitOBP84	CCD17853.1
	NvitOBP85	CCD17854.1
	NvitOBP86	CCD17855.1
	NvitOBP87	CCD17856.1
	NvitOBP88	CCD17857.1
	NvitOBP89	CCD17858.1
	NvitOBP90	CCD17859.1
<i>Osmia cornuta</i>	OcorOBP1	AGI05200.1
	OcorOBP2	AGI05201.1
	OcorOBP3	AGI05202.1
	OcorOBP4	AGI05203.1
	OcorOBP5	AGI05204.1
	OcorOBP6	AGI05205.1
<i>Polistes dominula</i>	PdomOBP1	AAP55718.1
<i>Pterocomma salicis</i>	PsalOBP1	CAR85660.1
	PsalOBP2	CAR85661.1
	PsalOBP4	CAR85662.1
	PsalOBP9	CAR85663.1

	PsalOBP10	CAX63261.1
<i>Rhopalosiphum padi</i>	RpadOBP2	CAX63253.1
	RpadOBP3	AHL30242.1
	RpalOBP4	AAQ96921.1
	RpadOBP5	CAX63254.1
	RpadOBP7	AHL30243.1
	RpadOBP10	CAX63255.1
<i>Rhodinus prolixus</i>	RproOBP	JAA76648.1
	RproOBP2	CAX63262.1
	RproOBP4	CAX63263.1
	RproOBP5	CAX63264.1
	RproOBP6	CAX63265.1
	RproOBP19a	JAA75415.1
	RproOBP prec	JAA75160.1
<i>Solenopsis amblychila</i>	SambOBP_prec	AAL51115.1
<i>S. aurea</i>	SaurOBP_prec	AAL51116.1
<i>Sitobion avenae</i>	SaveOBP	ACW03675.2
	SaveOBP2	AER92705.1
	SaveOBP3	AER92706.1
	SaveOBP4	AER92707.1
	SaveOBP5	AER92708.1
	SaveOBP6	CAX63251.1
	SaveOBP8	ACX32010.2
	SaveOBP10	CAX63252.1
<i>S. daguerrei</i>	SdagOBP_prec	AAW80693.1
<i>S. electra</i>	SeleOBP_prec	AAW80692.1
<i>Sogatella furcifera</i>	SfurOBP1	AHB59655.1
	SfurOBP2	AHB59653.1
	SfurOBP3	AHB59656.1
	SfurOBP4	AHB59657.1

	SfurOBP5	AHB59658.1
	SfurOBP6	AHB59663.1
	SfurOBP7	AHB59659.1
	SfurOBP8	AHB59654.1
	SfurOBP9	AHB59660.1
	SfurOBP10	AHB59661.1
	SfurOBP11	AHB59662.1
	SfurOBP12	AHJ61048.1
<i>S. geminate</i>	SgemOBP_prec	AAL51131.1
<i>S. globularia</i>	SgloOBP_prec	AAL51132.1
<i>Sclerodermus guani</i>	SguaOBP1	ABE68830.1
	SguaOBP2	ABE68831.1
<i>S. interrupta</i>	SintOBP	ABX25616.1
<i>S. invicta</i>	SinvOBP	ACI30690.1
	SinvOBP1	ADX94398.1
	SinvOBP2	ADX94399.1
	SinvOBP4	ADX94400.1
	SinvOBP5	ADX94401.1
	SinvOBP6	ADX94402.1
	SinvOBP7	ADX94403.1
	SinvOBP8	ADX94404.1
	SinvOBP9	ADX94405.1
	SinvOBP10	ADX94406.1
	SinvOBP11	ADX94407.1
	SinvOBP12	ADX94408.1
	SinvOBP13	ADX94409.1
	SinvOBP14	ADX94410.1
	SinvOBP15	ADX94411.1
	SinvOBP16	ADX94412.1
<i>S. macdonaghi</i>	SmacOBP	ABX25634.1

<i>S. megergates</i>	SmegOBP	ABX25630.1
	SmegOBP_prec	AAW80696.1
<i>S. nigella</i>	SnigOBP_prec	AAW80682.1
<i>S. pusillignis</i>	SpusOBP_prec	AAW80691.1
<i>S. quinquecuspis</i>	SquiOBP	ABX25622.1
<i>S. richteri</i>	SricOBP	ABX25625.1
<i>S. saevissima</i>	SsaeOBP	ABX25618.1
<i>S. substituta</i>	SsubOBP_prec	AAW80683.1
<i>S. tridens</i>	StriOBP_prec	AAW80684.1
<i>S. xyloni</i>	SxyIOBP_prec	AAW80690.1
<i>Tribolium castaneum</i>	TcasOBP6	EFA04594.1
	TcasOBP7	EFA04593.1
	TcasOBP8	EFA04687.1
<i>Triatoma infestans</i>	TinfOBP	JAC17535.1
	TinfOBP1	JAC16578.1
<i>Tuberolachnus salignus</i>	TsalOBP1	CAR85659.1



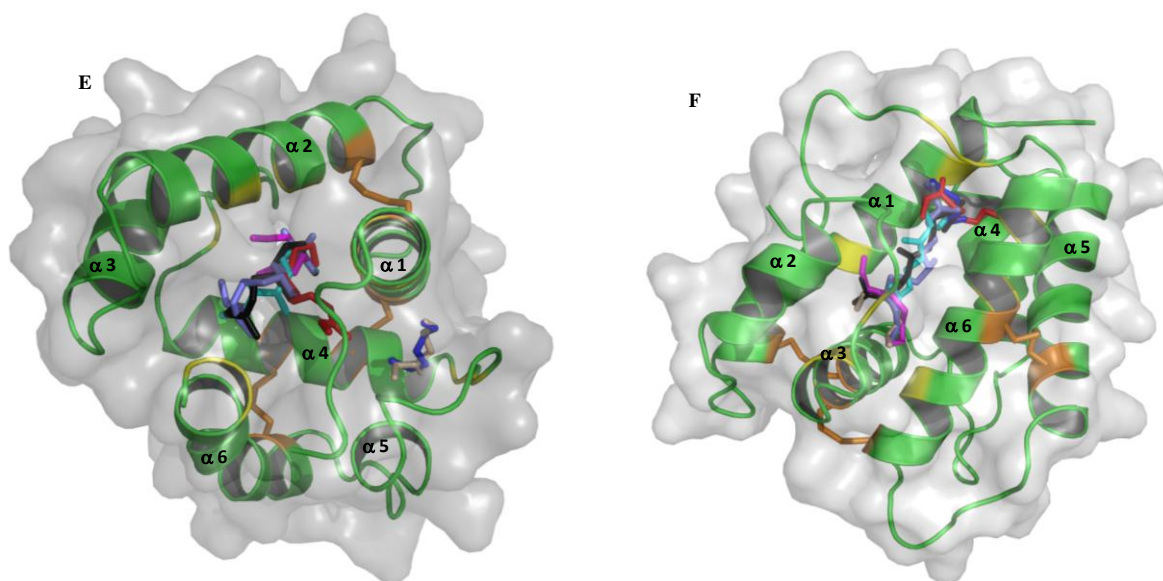
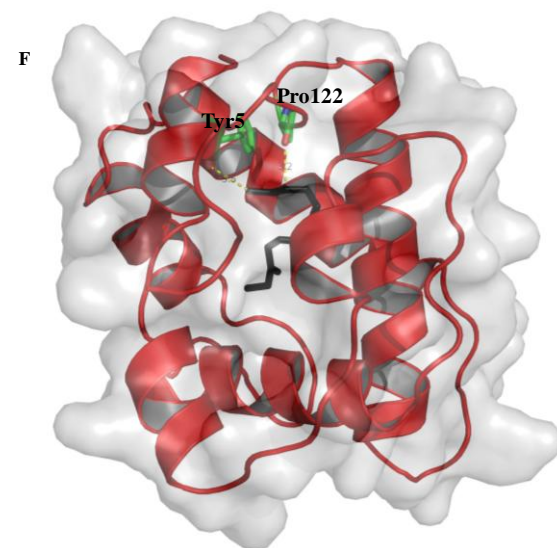
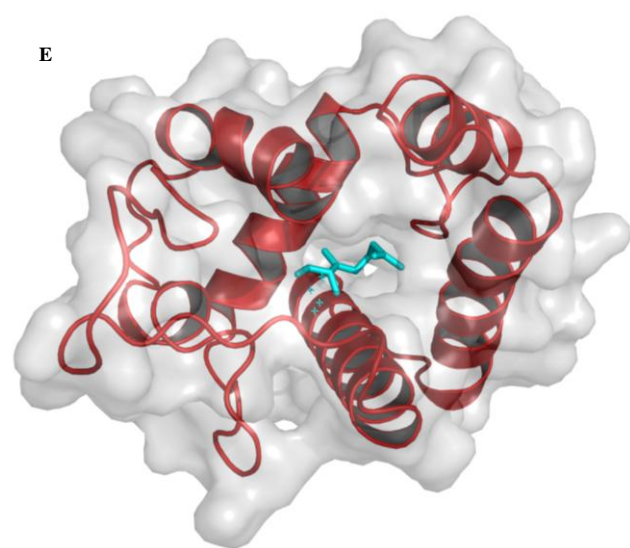
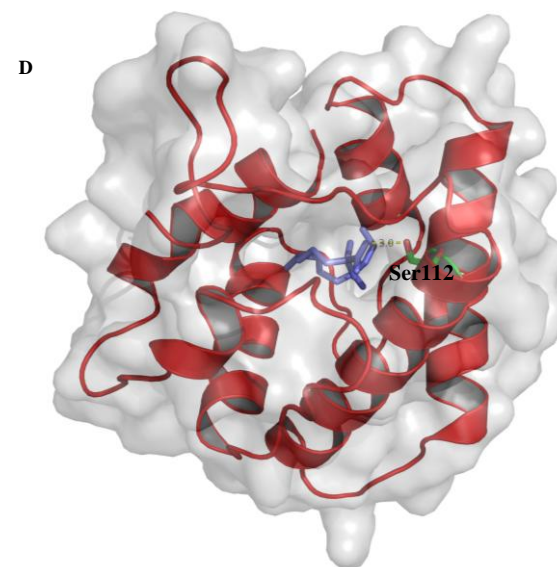
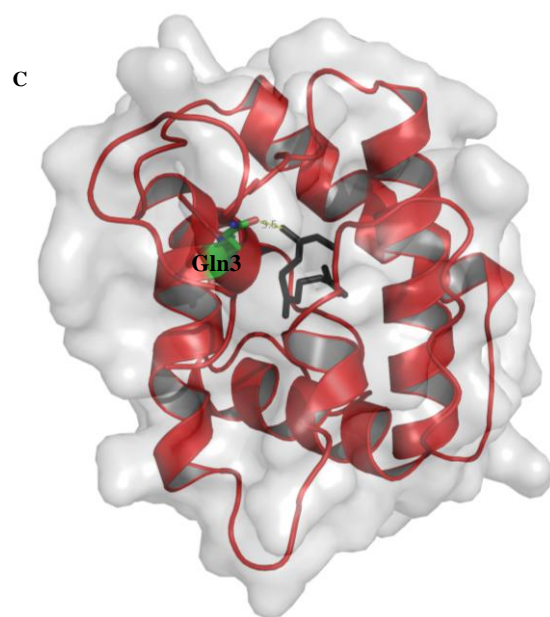
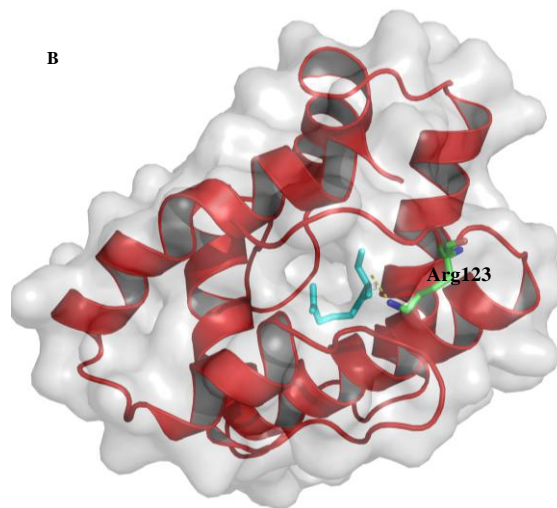
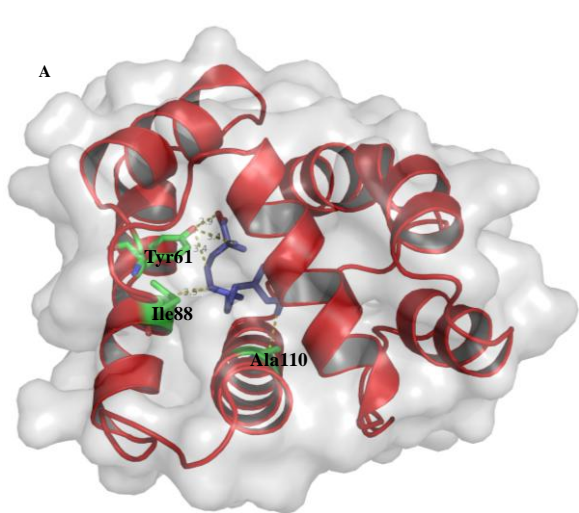


Figura Suplementar 1. Representação das estruturas das OBPs com os ligantes nas posições de menor energia obtidas através de Docking. (A) *Eher*OBP3, (B) *Eher*OBP4, (C) *Eher*OBP6, (D) *Cubi*OBP2, (E) *Cubi*OBP3, (F) *Cubi*OBP4. **Ligantes:** β -farneseno (preta), trans-2-hexenal (azul escura), 4-oxo-2-(E)-hexenal (trigo), (E)-2-octenal (rosa magenta), 2E-4Z-decadienoato de metila (vermelha), 2,6,10-trimetildecanoato de metila (lilás) e Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno (ciano). As alfa-hélices estão indicadas em negrito pela letra α , seguida do número correspondente. A provável cavidade de ligação está indicada em amarelo e as ligações dissulfeto estão representadas pela cor laranja.



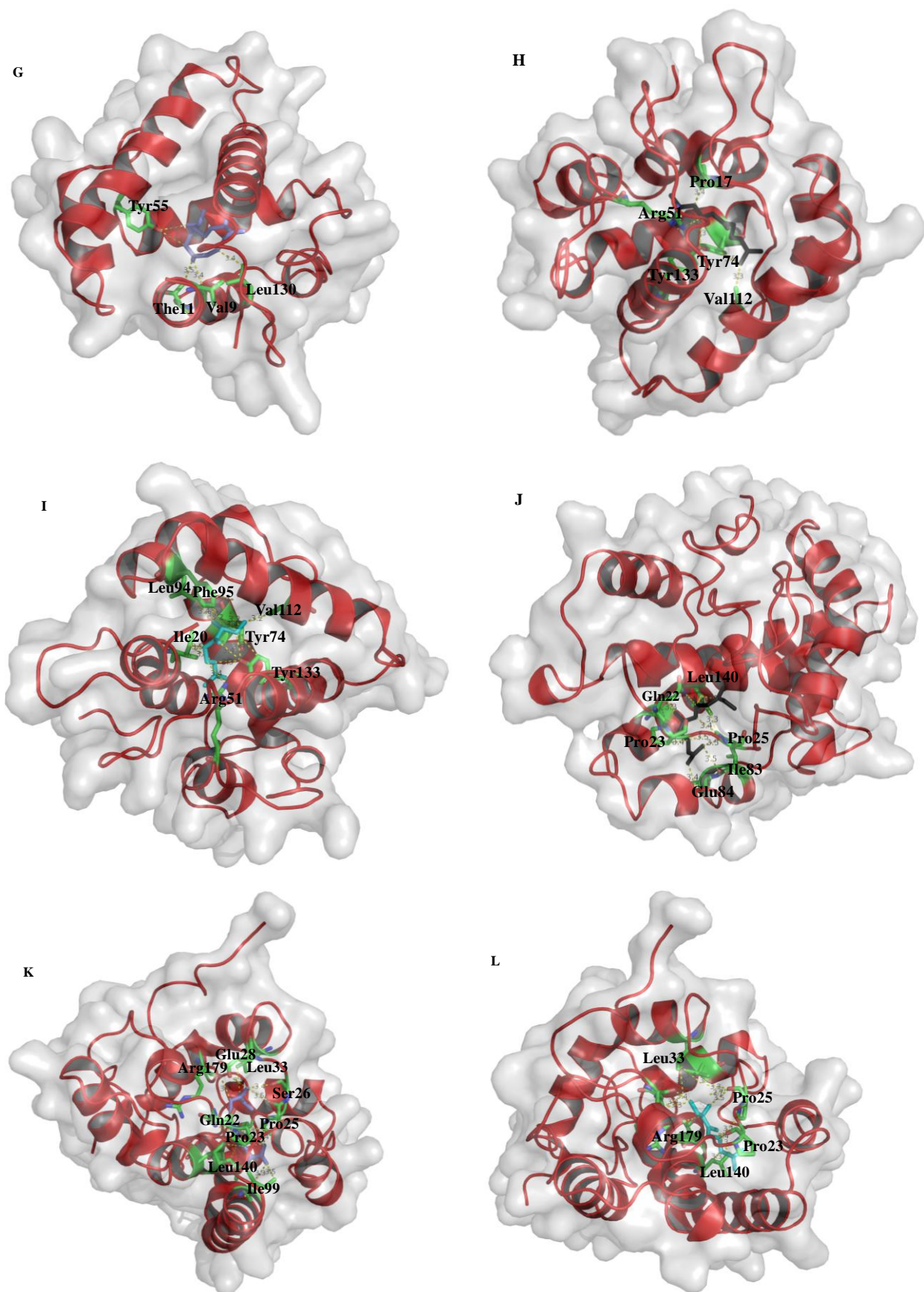
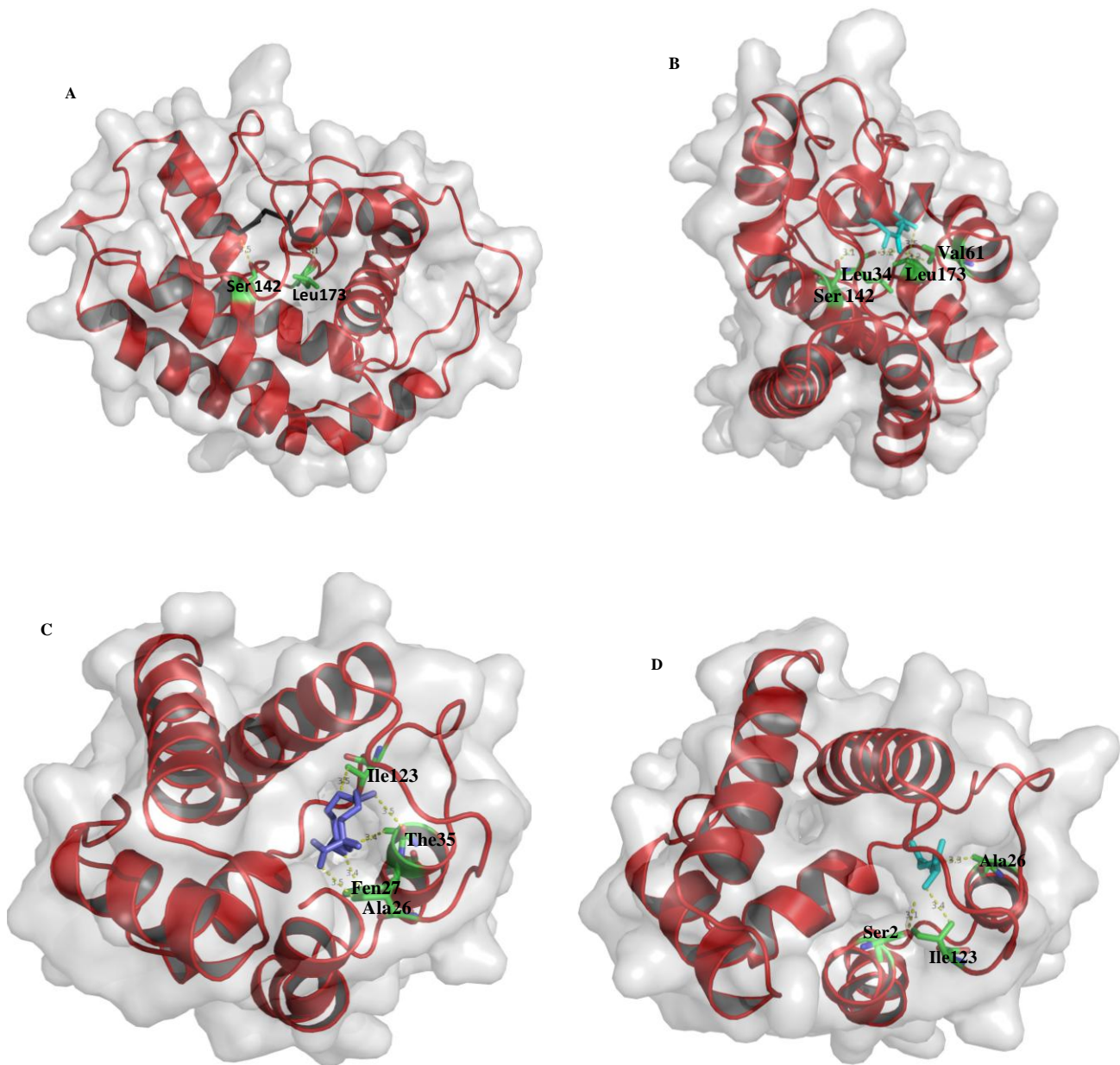


Figura Suplentar 2. Possíveis interações *EherOBPs*/ligantes. **C, F, H e J:** β -Farneseno como ligante da *EherOBP3*, *EherOBP4*, *EherOBP5* e *EherOBP6*, respectivamente. **A, D, G e K:** 2,6,10-trimetildecanoato de metila como ligante da *EherOBP1*, *EherOBP3*, *EherOBP4* e *EherOBP6*, respectivamente. **B, E, I e L.**

Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno como ligante da *EherOBP1*, *EherOBP3*, *EherOBP5* e *EherOBP6*, respectivamente. Os aminoácidos que participam das interações com os ligantes e compõem a possível cavidade de ligação de cada OBP estão indicados em negrito em cada uma das imagens, seguidos do número que indica a posição desses aminoácidos na estrutura primária da proteína.



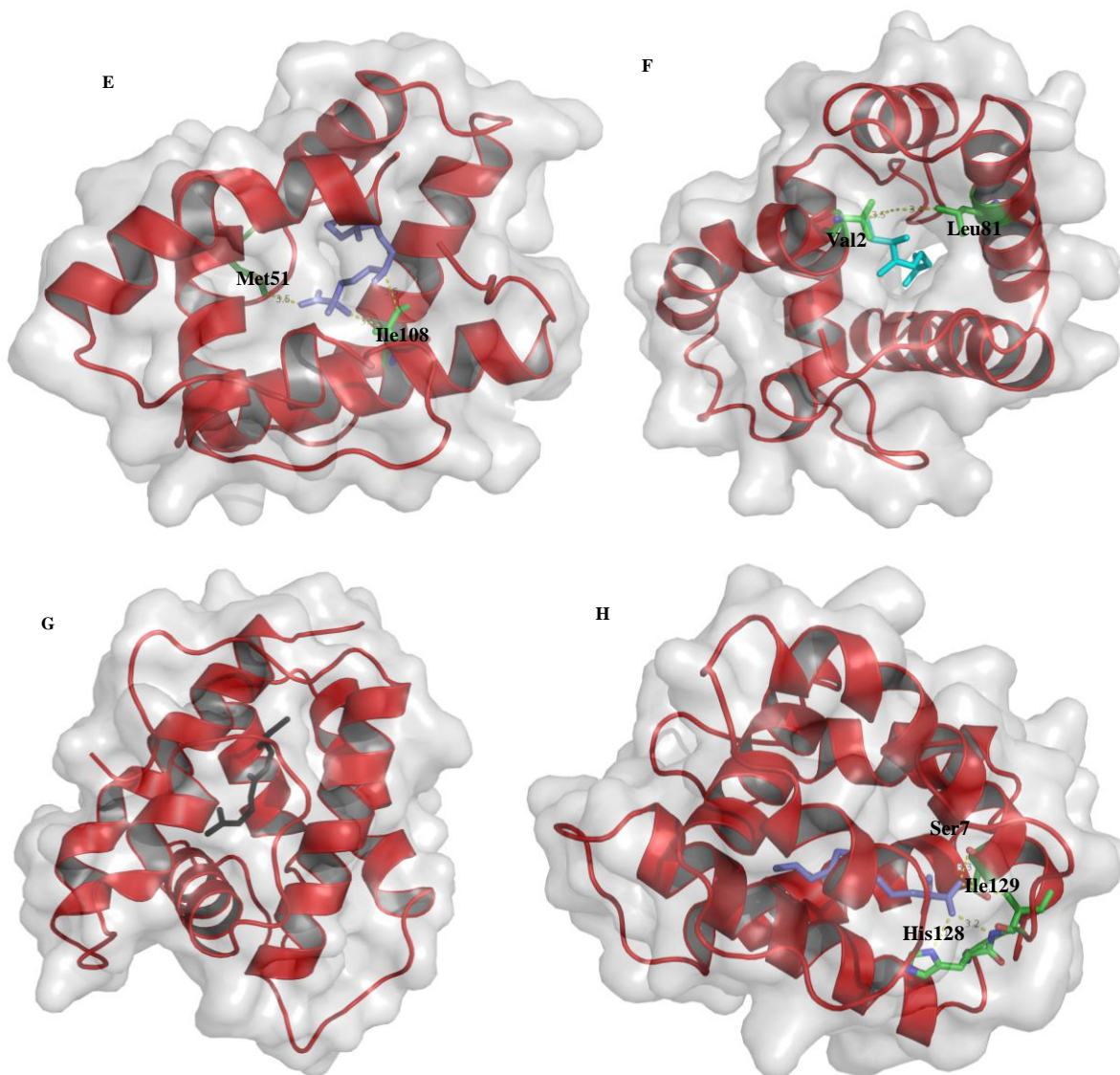


Figura Suplementar 3. Possíveis interações *CubiOBPs*/ligantes. **A** e **D**: β -Farneseno como ligante da *CubiOBP1* e *CubiOBP4*, respectivamente. **C**, **E** e **H**: 2,6,10-trimetildecanoato de metila como ligante da *CubiOBP2*, *CubiOBP3* e *CubiOBP4*, respectivamente. **B**, **D** e **F**. Cis(Z)-(4S)-epóxi-bisaboleno como ligante da *CubiOBP1*, *CubiOBP2* e *CubiOBP3*, respectivamente. Os aminoácidos que participam das interações com os ligantes e compõem a possível cavidade de ligação de cada OBP estão indicados em negrito em cada uma das imagens, seguidos do número que indica a posição desses aminoácidos na estrutura primária da proteína.

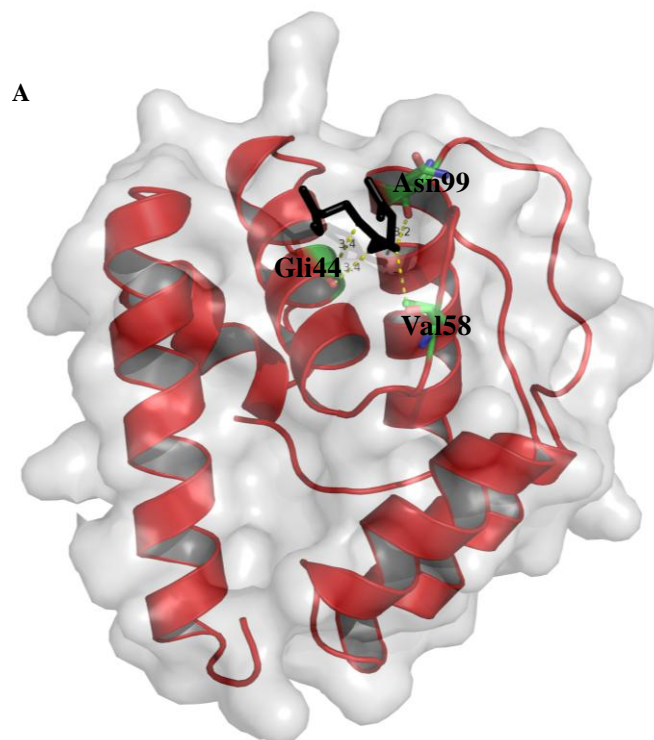


Figura Suplementar 4. Possíveis interações *Dime*/OBP1/ β -Farneseno. Os aminoácidos que interagem com os ligantes estão indicados em negrito seguido do número que indica sua posição na estrutura primária da proteína.