



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA)

HEITOR MADALENA DA SILVA TROCA

**Perfil de expressão gênica de fêmeas de *Aedes aegypti* durante
o cortejo e acasalamento.**

Botucatu – SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA)

HEITOR MADALENA DA SILVA TROCA

**Perfil de expressão gênica de fêmeas de *Aedes aegypti* durante
o cortejo e acasalamento.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Genética).

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Botucatu - SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Troca, Heitor Madalena da Silva.

Perfil de expressão gênica de fêmeas de *Aedes aegypti* durante o cortejo e acasalamento / Heitor Madalena da Silva Troca. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Coorientador: Diego Peres Alonso

Capes: 20200005

1. Biologia molecular. 2. Comportamento. 3. Transcriptoma. 4. *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Biologia Molecular; Comportamento; Transcriptoma.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato à todos que, de alguma forma, tornaram a realização deste trabalho possível.

Obrigado, CNPq, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Obrigado, professor Paulo Ribolla, por me dar a oportunidade de trabalhar no laboratório PANGENE, por sempre confiar e acreditar no meu potencial e contribuir imensamente com meu crescimento científico, ético e profissional.

Obrigado a toda equipe do laboratório PANGENE, sou muito grato pela autonomia e confiança cedida à mim durante o projeto. Obrigado Diego Alonso, pela paciência, presença e todo o aprendizado proporcionado à mim durante todo esse período. Obrigado Rafael Kunii, por ter sido forte enquanto pode, e ter tornado possível toda a realização do trabalho de insetário e bancada durante todos esses anos. Obrigado Marcus, por ter se tornado um amigo além dos momentos de trabalho, pela paciência, por todo aprendizado que pacientemente me proporcionou sobre bioinformática. Agradeço também à Isabela Ferraz por estar sempre presente e apta a ajudar nas tarefas de bancada.

Obrigado, professores Paulo Ribolla, Samir Kadri e Margareth Capurro por comporem a banca de defesa deste trabalho. Agradeço também aos professores Celso Marino e Robson Carvalho por comporem como suplentes da banca avaliadora.

Obrigado, aos meus pais, por toda educação, valores e apoio incondicional durante todos os dias, sem vocês eu não seria capaz nem mesmo de iniciar este projeto. Agradeço também ao meu irmão, Vitor, pela presença e apoio emocional durante este período.

Obrigado, Mariana, dividir a vida e poder evoluir junto a ti tem sido a melhor experiência de toda minha vida. Seu apoio, presença e carinho, me ajudaram a enxergar que posso chegar cada vez mais longe em minha vida profissional e social.

Por fim, agradeço a todos os outros amigos, colegas e profissionais que ajudaram direta ou indiretamente na produção e conclusão deste trabalho.

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o mosquito mais sinantrópico e antropofílico da família Culicidae. Esta espécie sempre coabita com os seres humanos e é extremamente oportunista. A dispersão vetorial está diretamente relacionada à capacidade das fêmeas de encontrar um parceiro com sucesso em um cenário urbano geralmente irregular. No presente trabalho, investigamos alterações transcricionais em fêmeas de *Ae. aegypti* durante o processo de cortejo e após o acasalamento. Observamos uma alteração substancial na expressão gênica desencadeada logo após o contato com machos de *Ae. aegypti*, que por sua vez não estavam totalmente correlacionados com as alterações desencadeadas pelo contato. Após analisar genes compartilhados significativamente e diferencialmente regulados entre contato específico e inseminação, a maior parte da mudança transcriptômica observada desencadeada por contato é revertida após o acasalamento, indicando uma situação intermediária entre as condições virgens e de cortejo que supomos ser crucial para o sucesso do acasalamento. Após o contato, vários genes quimiossensoriais relacionados são reprimidos, especialmente proteínas de ligação a odorante. A maioria desses genes retorna a taxas de expressão mais altas após o acasalamento. Nenhum desses genes é significativamente regulado pelo encontro de uma espécie diferente, em nosso estudo, *Aedes albopictus*. Os resultados apresentados aqui podem ser aplicados a uma abordagem inovadora de controle, focada nos sistemas semioquímicos de mosquitos, em um esforço para interromper a interação indesejável entre inseto-hospedeiro para reduzir o risco de transmissão de patógenos aos seres humanos.

Palavras-chave: Comportamento; Genética Molecular; Transcriptoma.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the most synanthropic and anthropophilic mosquito of Culicidae. This species always cohabits with humans and is extremely opportunistic. Vector dispersal is directly related to the ability of the females on successfully finding a mate in a generally patchy urban scenario. In the present work, we investigate transcriptional changes in *Ae. aegypti* females during the courtship process and after mating. We observe a substantial alteration in gene expression triggered just upon contact with *Ae. aegypti* males, which in turn was not fully correlated to the changes triggered by the contact. After analysing shared significant differentially regulated genes between conspecific contact and insemination, the major part of the observed transcriptomic change triggered by contact is reversed after mating, indicating an intermediary situation between naive and mating conditions that we hypothesize to be crucial for mating success. Upon contact, several chemosensory related genes are repressed, especially odorant binding proteins. Most of these genes return to higher expression rates after mating. None of these genes are significantly regulated by the encounter of a different species, *Aedes albopictus*. The results presented here might be applied to an innovative control approach focusing on the semiochemical systems of mosquitoes in an effort to disrupt undesirable host–insect interaction to reduce the risk of pathogen transmission to humans.

Keywords: Behaviour; Molecular genetics; transcriptome.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	11
MATERIAL E MÉTODOS	13
Obtenção dos mosquitos (<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>)	14
Grupos experimentais	14
Experimentos por busca de alimentação sanguínea	16
Preparação e sequenciamento da biblioteca RNA-Seq	17
Processamento dos dados de RNA-Seq e análise da diferenciação das expressões gênicas	18
Ontologia genética e anotação de vias	18
Identificação da família de genes quimiossensoriais relacionados	18
RESULTADOS	20
Análise geral do sequenciamento	21
Cluster de dados não supervisionados e perfil de expressão geral	21
Genes com expressão diferencial em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> após o contato com machos	22
Genes com expressão diferencial em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> fêmeas após inseminação	25
Análise funcional de genes significativamente regulados	26
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	37

INTRODUÇÃO

O *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus é um mosquito de grande importância médica devido à sua ampla distribuição global e ao seu papel como principal vetor de várias doenças arbovirais, como dengue, chikungunya, febre amarela urbana e vírus Zika. É uma espécie cosmopolita, encontrada principalmente nos trópicos, com mais de 60% da população humana em risco de arbovírus transmitidos por essa espécie ^{1,2}.

Ae. aegypti é a espécie mais sinantrópica e antropofílica da família Culicidae. Ele sempre coabita com os seres humanos e, como resultado, é considerado uma espécie particularmente oportunista.

A falta de infraestrutura urbana que, em última análise, favorece a produção e manutenção de criadouros, um alto grau de adaptação a diferentes condições ambientais e ovos que são altamente resistentes à dessecação contribuem para a disseminação e o estabelecimento bem-sucedido desse mosquito. Sabe-se que o vetor é extremamente bem adaptado aos ambientes urbanos, com a maioria de seus criadouros encontrados perto de habitações humanas. As fêmeas de *Ae. aegypti* também preferem recipientes artificiais e artificiais para a postura de ovos, mesmo os muito pequenos, como copos de plástico, garrafas PET, latas de alumínio e pequenos vasos de plantas ³. As fêmeas também exibem, em condições de campo e de laboratório, o chamado comportamento de “oviposição pulada”, que as leva a pôr ovos em vários locais distintos ^{4, 5}. Pensa-se que esse comportamento em particular contribua para a dispersão do mosquito quando os locais de reprodução adequados não estiverem disponíveis para a fêmea, forçando-os a procurar novos locais de oviposição com base na disponibilidade de alimentos, exposição ao sol ou água ⁶.

Em um estudo recente sobre o comportamento de oviposição de *Ae. aegypti*, foi demonstrado que uma única fêmea pode distribuir ovos entre até 11 locais de reprodução diferentes ⁷. Essa é uma característica importante que molda o padrão geral da distribuição potencial do local de reprodução, levando a criadouros altamente fragmentados, pois mesmo um pequeno número de ovos originários de alguns adultos pode ser suficiente para permitir a persistência local das populações de mosquitos. Uma consequência imediata desse padrão de distribuição fragmentada dos criadouros é a dificuldade para as fêmeas de encontrarem um macho para acasalar com sucesso.

Embora os batimentos das asas sejam considerados o principal sinal acústico para atrair machos para acasalar, outros sinais podem ser importantes durante esse processo ⁸. É sabido que os sinais olfativos têm um papel determinante na detecção de hospedeiros

humanos, bem como nas fontes de néctar e na localização dos locais de oviposição. Nesse contexto, feromônios de agregação, feromônios sexuais, hidrocarbonetos cuticulares e outros sinais químicos têm um papel importante no comportamento de cortejo e acasalamento ⁹.

Neste estudo, objetivamos avaliar o impacto do cortejo, desencadeado pelo contato próximo de machos coespecíficos e heteroespecíficos (*Aedes albopictus*), sobre o perfil geral de expressão de fêmeas de *Ae. aegypti*. Também avaliamos o perfil de expressão gênica relacionado à inseminação coespecífica, a fim de comparar transcricionalmente os processos de inseminação e cortejo em fêmeas de *Ae. aegypti*. Acreditamos que obter informações sobre os processos que orientam a escolha ou a evasão de parceiros durante o cortejo e o acasalamento, além de revelar seus mecanismos subjacentes e sinais químicos, pode permitir o desenvolvimento de métodos de controle alternativos para esses mosquitos vetores.

OBJETIVOS

Objetivo geral: O objetivo do presente estudo foi realizar uma análise transcricional de fêmeas de *Ae. aegypti* durante o cortejo e inseminação, com o propósito de compreender o perfil geral de expressão gênica e suas modulações frente a situações diversas do vetor.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos mosquitos (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*)

As linhagens de laboratório de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram estabelecidas a partir de ovos coletados na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil (22 ° 53'S 48 ° 26'W) em 2015, utilizando ovitrampas. A criação foi realizada em um insetário climatizado, mantido a 28 ° C e 70% de umidade relativa, com um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Primeiramente, os ovos do campo foram transferidos para uma bandeja (27 cm × 19 cm × 7 cm) contendo 1 L de água. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com ração de peixe moída até o estágio das pupas. As espécies e o gênero foram determinados em adultos através do exame do *scutum* e das antenas. Os adultos foram colocados em gaiolas teladas (30 cm × 30 cm × 30 cm) e alimentados com solução de sacarose estéril a 10%, que foi substituída a cada 3 dias.

Grupos experimentais

Para os experimentos, machos e fêmeas de ambas as espécies foram mantidos em gaiolas diferentes desde o estágio de pupa. Quando as larvas atingiram o estágio de pupa, separamos cada pupa entre machos e fêmeas. A identificação sexual foi feita através da análise do último segmento do abdômen da parte ventral do indivíduo, com os machos tendo o último segmento alongado e largo, enquanto as fêmeas têm o mesmo último segmento, mais fino e curto ¹⁰. Vinte pupas de cada sexo e espécie foram colocadas separadamente em pequenas bandejas de 8 × 5 × 3 cm contendo água e depois transferidas para uma gaiola telada de 30 × 30 × 30 cm. Os experimentos piloto foram então realizados para determinar o tempo médio para atingir 100% de inseminação de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em cada cruzamento coespecífico, reunindo dois machos com vinte fêmeas. Nessas condições, o tempo médio para que 100% das fêmeas estivessem inseminadas foi de 90 minutos para *Ae. albopictus* e 20 min para *Ae. aegypti*. Esses resultados nos ajudaram a definir uma janela de tempo segura para as fêmeas entrarem em contato com os machos e não serem inseminadas; portanto, usamos esses tempos como padrões também para cruzamentos heteroespecíficos.

Fêmeas de *Ae. aegypti* foram submetidas a quatro condições experimentais: (i) nenhum contato com machos (virgens); (ii) contato com machos de *Ae. aegypti* (Aeg); (iii) contato com machos de *Ae. albopictus* (Alb); (iv) inseminado por machos *Ae. aegypti* (Ins)

(Fig. 1). Utilizamos três gaiolas para cada uma das quatro condições experimentais como réplicas biológicas. Todos os mosquitos nos experimentos foram utilizados 24 horas após emergirem das pupas. Além disso, todas as fêmeas foram anestesiadas em gelo e dissecadas, separando a cabeça e o tórax do abdômen. O status de inseminação foi verificado através da dissecação das espermatecas em lâminas limpas no microscópio, segundo Gary e colaboradores ¹¹.

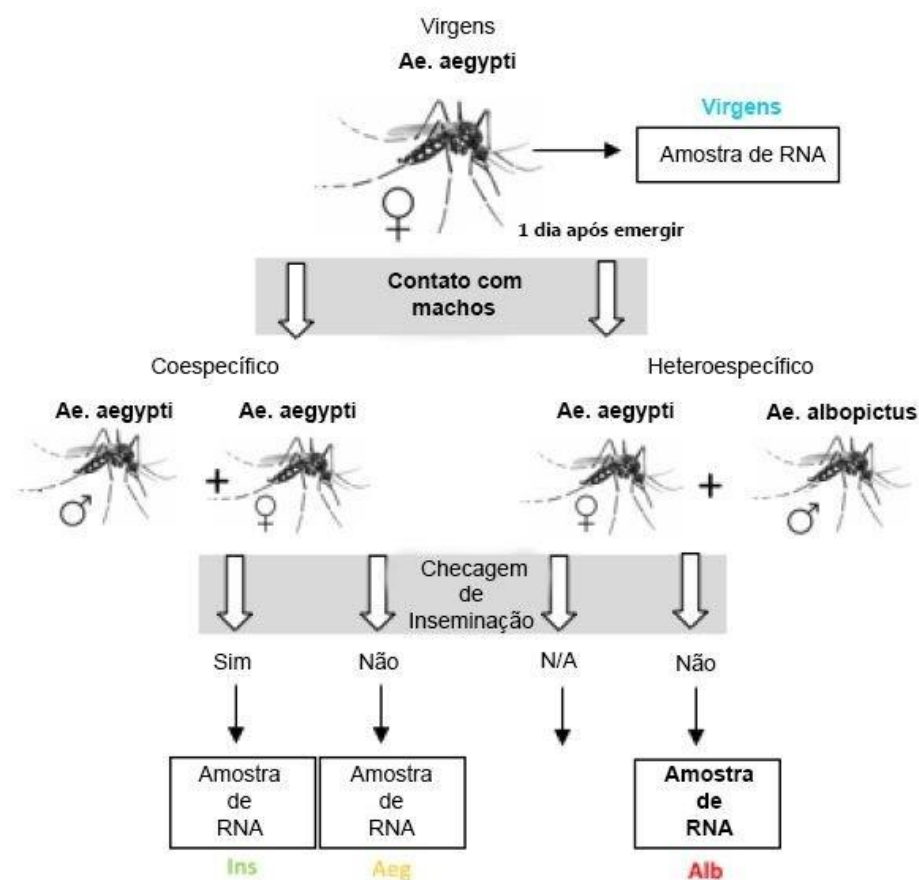


Figura 1 - Design dos grupos experimentais, mostrando o estágio e condição de quando as amostras de RNA de cabeça e tórax de fêmeas de *Ae. aegypti* foram coletadas.

Os quatro grupos foram obtidos da seguinte forma: (a) Virgens: cada gaiola experimental deste grupo possuía cinco fêmeas virgens que nunca tiveram contato com machos de nenhuma espécie. Verificamos a espermateca de todas as fêmeas e elas foram negativas quanto à presença de espermatozoides. Três pools, cada um contendo as cabeças e tórax de cinco indivíduos, foram colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de TRIzol® e

armazenados a -80°C em um freezer. Esta abordagem de preparação do pool foi realizada para cada grupo experimental descrito abaixo. (b) Aeg: Em cada gaiola experimental, reunimos dois machos de *Ae. aegypti* e vinte fêmeas de *Ae. aegypti* que nunca tiveram contato com machos adultos. Removemos cinco fêmeas da gaiola por quatro intervalos consecutivos de 5 minutos. Isso continuou até obtermos um total de cinco fêmeas (um pool) que foram encontradas não inseminadas após a verificação da espermateca. Portanto, um máximo de 20 minutos de contato foi permitido. Quando o esperma foi encontrado na espermateca, essas fêmeas foram descartadas e não utilizadas para compor o pool desse grupo. (c) Alb: Em cada gaiola experimental, reunimos dois machos de *Ae. albopictus* e vinte fêmeas de *Ae. aegypti* que nunca tiveram contato com machos adultos. Removemos cinco fêmeas da gaiola durante seis intervalos consecutivos de 15 minutos. Como não conseguimos encontrar nenhuma fêmea inseminada verificando a espermateca após 90 minutos de contato, usamos cinco fêmeas do primeiro intervalo para formar o pool desse grupo. (d) Ins: Em cada gaiola experimental, reunimos dois machos de *Ae. aegypti* e vinte fêmeas de *Ae. aegypti* que nunca tiveram contato com machos adultos. Removemos todas as fêmeas após 30 minutos na gaiola e verificamos a espermateca para formar um pool de cinco fêmeas inseminadas.

Experimentos por busca de alimentação sanguínea

Para os experimentos de busca por alimentação sanguínea, pupas de fêmeas e pupas de machos de *Ae. aegypti* foram colocadas separadamente em pequenas bandejas de $8 \times 5 \times 3$ cm contendo água e depois transferidas para uma gaiola telada de $30 \times 30 \times 30$ cm.

Neste experimento submetemos fêmeas de *Ae. aegypti* à duas condições: (i) fêmeas que nunca tiveram contato com machos adultos (virgens); (ii) fêmeas que foram inseminadas por machos de *Ae. aegypti* (Ins). Utilizamos três gaiolas para cada uma das duas condições experimentais como triplicatas biológicas.

Os dois grupos foram obtidos da seguinte forma: (i) Virgens: cada gaiola experimental deste grupo possuía vinte fêmeas virgens que nunca tiveram contato com machos adultos de nenhuma espécie; 48h após todos os indivíduos emergirem foi oferecido alimentação sanguínea por dez minutos e contabilizado o número de fêmeas que se alimentaram com sangue. Verificamos a espermateca de todas as fêmeas e elas foram negativas quanto à presença de espermatozoides; (ii) Inseminadas: cada gaiola experimental

deste grupo possuía cinco machos de *Ae. aegypti* e vinte fêmeas virgens que nunca tiveram contato com machos adultos de nenhuma espécie; 48h após todos os indivíduos emergirem, foi oferecido alimentação sanguínea por dez minutos e contabilizado o número de fêmeas que se alimentaram com sangue. Todos os indivíduos desse grupo foram dissecadas e tiveram a cabeça e tórax separados e foram colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de TRIzol® e armazenados a -80 ° C em um freezer.

Todos os mosquitos nos experimentos foram utilizados 48 horas após emergirem das pupas. Além disso, todas as fêmeas foram anestesiadas em gelo e dissecadas, separando a cabeça e o tórax do abdômen. O status de inseminação de todos os indivíduos foi verificado através da dissecação das espermatecas em lâminas limpas no microscópio.

Preparação e sequenciamento da biblioteca RNA-Seq

O RNA total foi extraído dos pools de cabeça e tórax de fêmeas de *Ae. aegypti* usando o protocolo de reagente TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA). As concentrações de RNA foram quantificadas em cada amostra usando um fluorômetro Qubit™ 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA). Os níveis de degradação do RNA foram avaliados por um gel de agarose a 1%. As bibliotecas de cDNA foram construídas com 200 ng de RNA total usando o Kit de Preparação para Biblioteca de RNA Específico da SureSelect Strand (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos da biblioteca foram então sequenciados usando uma plataforma Illumina Nextseq (Illumina, San Diego, EUA) em uma corrida de extremidade única de 150 pb.

Processamento dos dados de RNA-Seq e análise da diferenciação das expressões gênicas

A plataforma CLC Genomics Workbench 7.01 foi usada para remover os adaptadores e avaliar a qualidade das leituras brutas. A mesma plataforma foi usada para submeter as leituras ao mapeamento do transcriptoma previsto de *Ae. aegypti* AaegL5.2 disponível no site

VectorBase (<https://www.vectorbase.org/organisms/aedes-aegypti>). Apenas a contagem de leituras exclusivas de genes foi usada para análise posterior (Tabela Suplementar 1). A análise da expressão diferencial foi realizada com o pacote DESeq2 versão 1.24.0 ¹². Os genes com valor de p ajustado menor que 0,05 foram considerados como significativamente regulados. A visualização e plotagem dos dados da análise de componentes principais (PCA) foram realizadas em R usando o pacote pcaExplorer ¹³. A análise de agrupamento foi realizada utilizando distâncias euclidianas e método completo de ligação.

Ontologia genética e anotação de vias

A análise da ontologia genética foi realizada para as listas de genes identificados com expressão diferencial utilizando o *g:Profiler* (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). O teste exato de Fisher foi considerado o método estatístico (valor de $p < 0,05$) e o método Benjamini & Hochberg ¹⁴ foi utilizado para correção da taxa de falsa descoberta ($< 0,05$).

Identificação da família de genes quimiossensoriais relacionados

Os perfis de expressão gênica de cinco famílias de proteínas relacionadas à quimio-sensação foram analisados individualmente. A identificação do ID do gene e a classificação foram realizadas usando Interpro IDs, ou seja, para proteínas quimiossensoriais (CSPs, IPR005055), receptores ionotrópicos (IRs, IPR001320), proteínas de ligação de odorantes (OBPs, IPR006170), receptor de odorantes (ORs, IPR004117) e neurônios sensoriais proteínas de membrana (SNMPs, IPR002159).

RESULTADOS

Análise geral do sequenciamento

Compreender as alterações transcricionais das fêmeas de *Ae. aegypti* devido ao contato e inseminação por machos coespecíficos (*Ae. aegypti*) e heteroespecíficos (*Ae. albopictus*), realizamos bibliotecas de sequenciamento de RNA (Illumina) para cada condição. Aqui, fêmeas de *Ae. aegypti* sem contato com machos e, portanto, não inseminadas, foram consideradas como o grupo virgens. Não houve evidência de inseminação por *Ae. albopictus*, consequentemente, três condições foram consideradas além das fêmeas virgens: contato coespecífico (Aeg), contato heteroespecífico (Alb) e inseminação coespecífica (Ins). Foram realizadas triplicatas biológicas para cada condição e foram sequenciadas, resultando em ~ 19,3 milhões de leituras, em média, por biblioteca, das quais ~ 10,3 milhões foram mapeadas para a montagem do transcriptoma de *Ae. aegypti* (AaegL5). Um total de 16.721 genes foram identificados nas bibliotecas preparadas após a remoção de genes de baixa expressão (contagem global <12). As leituras brutas estão depositadas no banco de dados do NCBI BioProject com o número de acesso PRJNA551490.

Cluster de dados não supervisionados e perfil de expressão geral

O conjunto de dados filtrado completo foi submetido a análise do componente principal (PCA) e agrupamento hierárquico (Fig. 2a, b). Ambos mostraram resultados consistentes para as triplicatas biológicas. No geral, o primeiro eixo (PC1), responsável por 30% da variação da expressão gênica observada em fêmeas de *Ae. aegypti*, separaram as bibliotecas em dois grupos: com contato masculino (Aeg e Alb) e bibliotecas Virgens / inseminadas. O segundo eixo PCA (PC2–20%) separou as bibliotecas de contato heteroespecífico masculino (Alb) e virgens das duas outras condições. O perfil de expressão gênica após o contato masculino é representado através de um heatmap comparativo dos quatro grupos de tratamento (Fig. 2b). Juntos, esses resultados sugerem que fêmeas virgens de *Ae. aegypti*, ao entrar em contato com os machos, alteram a expressão de um determinado conjunto de genes. Este status de expressão, após inseminação, volta a um padrão muito semelhante à condição do grupo de fêmeas virgens.

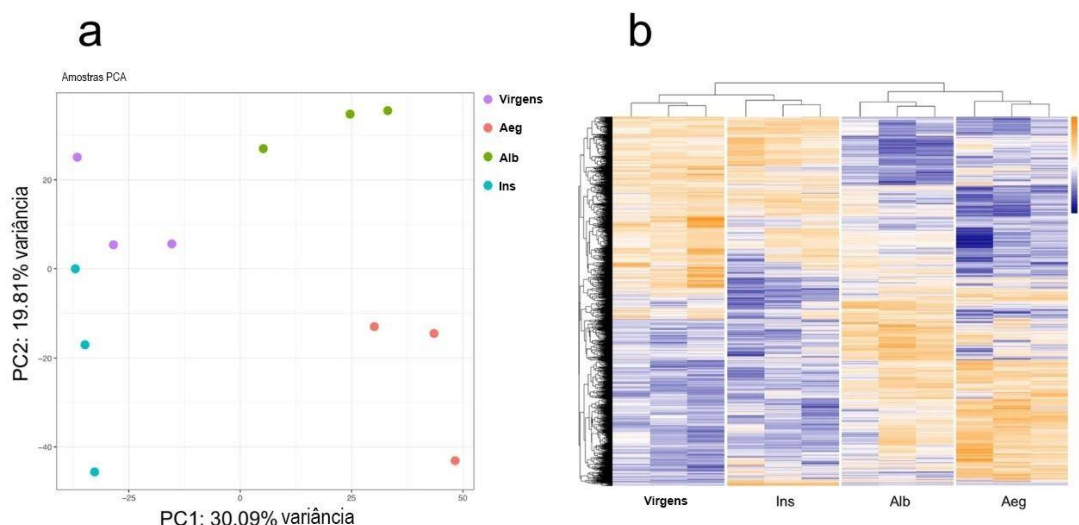


Figura 2 - Análise do componente principal (PCA) e heatmap dos valores de expressão em log. Métodos de clusterização usando o conjunto completo de dados de expressão de log das três réplicas para as quatro condições de fêmeas de *Ae. aegypti*: Virgens (Virgens), contato masculino coespecífico (Aeg), contato masculino heteroespecífico (Alb) e inseminado (Ins). **(a)** PCA das triplicatas biológicas de cada condição. **(b)** Heatmap mostrando perfil de expressão para os 1.725 genes que foram considerados significativamente regulados em pelo menos uma das comparações usando fêmeas virgens como base comparativa. Os valores de expressão foram normalizados pelos genes. A análise de agrupamento foi realizada utilizando distâncias euclidianas e método completo de ligação.

Genes com expressão diferencial em fêmeas de *Ae. aegypti* após o contato com machos

Foi realizada a identificação de genes de expressão diferencial entre os grupos de contato masculino coespecífico / heteroespecífico e os grupos de virgens. A significância foi definida usando um valor de p ajustado $<0,05$. Fêmeas de *Ae. aegypti* em contato com machos coespecíficos (Aeg vs. Virgem) apresentaram maior regulação gênica em comparação com o grupo de contato heteroespecífico *Ae. albopictus* (Alb vs. Virgem). Um total de 1.048 genes mostraram-se regulados positivamente ao contato com machos de *Ae. aegypti*, enquanto apenas 732 genes ao contato com machos de *Ae. Albopictus*. Da mesma forma, 1.140 genes foram negativamente regulados para o contato masculino coespecífico, enquanto o heteroespecífico foi responsável por 667 genes. Menos genes foram expressos de forma significativa para a comparação dos grupos Aeg vs. Alb, um total de 466 genes foram regulados positivamente e 200 foram reprimidos (Fig. 3). Curiosamente, quando comparamos o grupo de contato coespecífico com o de contato heteroespecífico (Alb vs. Aeg), podemos observar uma correlação positiva entre genes significativamente e diferencialmente expressos,

com 661 genes regulados significativos compartilhados entre os grupos. Um total de 1.527 genes foram encontrados exclusivamente no grupo Aeg e 738 no grupo Alb (Fig. 4b).

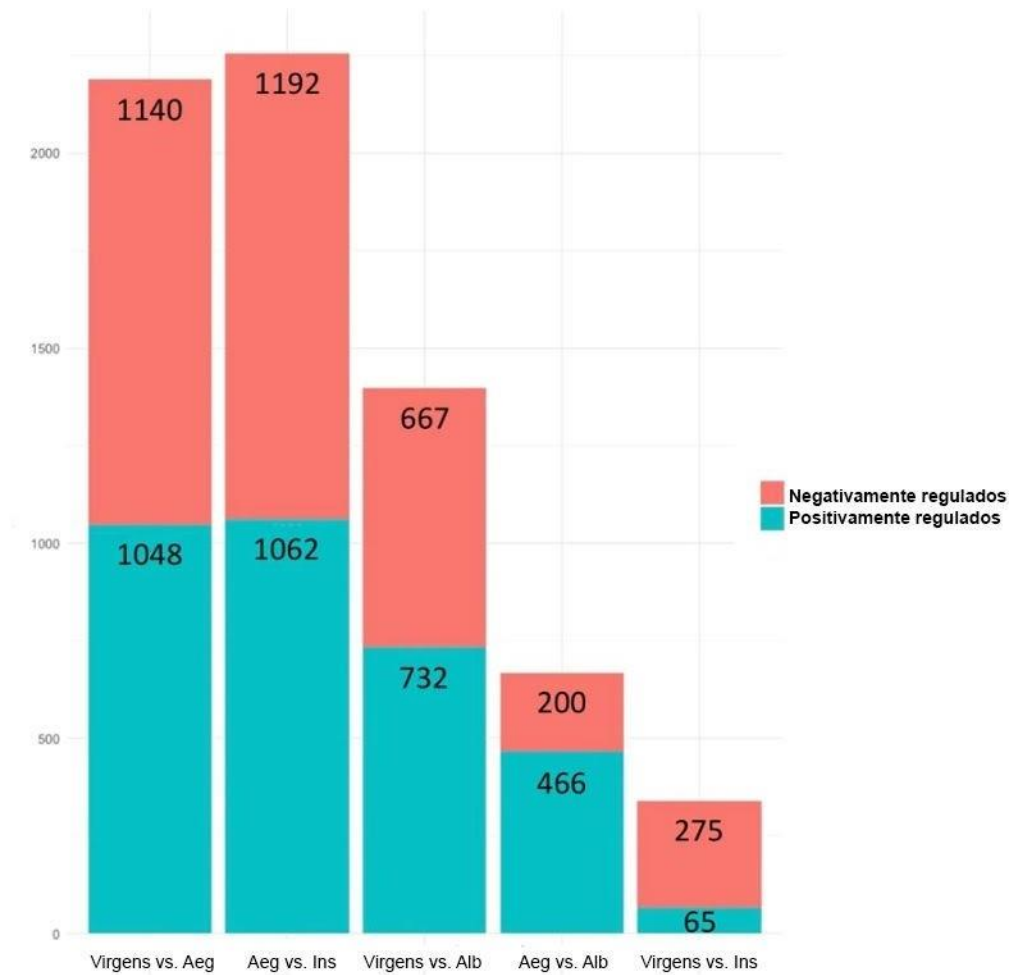


Figura 3 - Número de genes significativa e diferencialmente expressos para todas as comparações analisadas. Os números dentro das barras representam a contagem total de genes regulados diferencialmente por comparação. A barra azul representa genes regulados positivamente, a barra vermelha representa genes regulados negativamente.

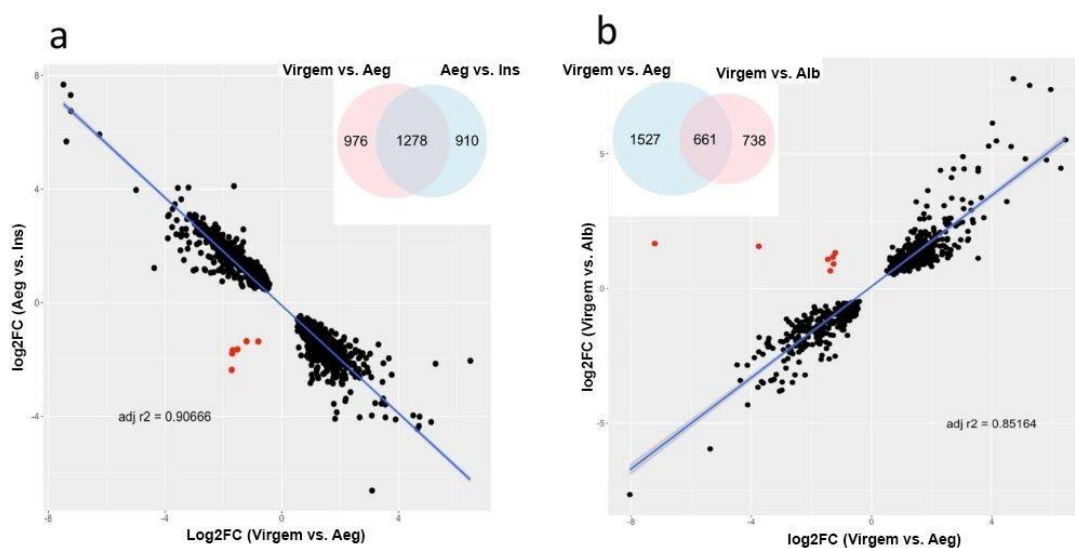


Figura 4 - Perfil de correlação do gene log2FC entre contato coespecífico e inseminadas **(a)** e contato coespecífico e heteroespecífico **(b)**. Comparação do gráfico de dispersão dos valores log2FC dos genes DE compartilhados (interseção dos diagramas de Venn) em ambos (Virgem vs. Aeg) × (Aeg vs. Ins) **(a)** e (Virgem vs. Aeg) × (Virgem vs. Alb) **(b)** As inserções mostram diagramas de Venn de genes regulados significativamente compartilhados. Pontos vermelhos indicam genes que não seguem o padrão geral de correlação observado (correlação negativa em 4a; correlação positiva em 4b).

Genes com expressão diferencial em fêmeas de *Ae. aegypti* fêmeas após inseminação

Em geral, o perfil de expressão gênica de fêmeas de *Ae. aegypti* inseminadas era semelhante ao grupo de virgens (Ins : Virgem). No entanto, o grupo de inseminadas apresentou um maior número de genes regulados do que o grupo de virgens ao usarmos o grupo de contato coespecífico como referência. Surpreendentemente, a comparação direta entre as bibliotecas Virgem e Inseminadas mostrou poucos genes regulados, com 65 regulados positivamente e 275 para negativamente. Quando o contato coespecífico é comparado a fêmeas inseminadas (Aeg vs. Ins), encontramos uma forte correlação negativa com 1.278 genes compartilhados significativamente regulados. Um total de 976 genes foram encontrados exclusivamente no grupo AEG e 910 no INS (Fig. 4a).

Análise funcional de genes significativamente regulados

Genes significativamente regulados das comparações Aeg vs. Virgem, Alb vs. Virgem e Aeg vs. Ins foram submetidos a análise usando o servidor web g: Profiler¹⁵ para análise funcional. Os genes foram ordenados por log2FC e a significância foi definida usando valores

de $p < 0,05$ após a correção de Bonferroni para as três classes de ontologia gênica (GO), que são função molecular, processo biológico e componente celular. A análise GO dos genes regulados para Aeg vs. Virgem revelou dois termos significativos: Ligação Odorante e Processo Metabólico da Arginina. Para Alb vs. Virgem, foram encontrados dez termos GO enriquecidos: constituinte estrutural da cutícula, processo metabólico de arginina, processo metabólico de alfa-aminoácido, respirossomo e seis outros relacionados à respiração celular. Para Aeg vs. Ins, foram encontrados 25 termos GO enriquecidos: Respirossomo, atividade catalítica, atuando sobre uma proteína, outros 14 relacionados à respiração celular geral e outros nove relacionados à atividade da endo e exopeptidase evidenciando proteólise geral (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise de enriquecimento da ontologia genética (GO) para genes significativamente regulados em contato coespecífico (Virgem × Aeg), contato heteroespecífico (Virgem × Alb) e inseminação (Aeg × Ins).

Grupo		Nome do Termo	ID do termo	P _{Ajustado}
Virgem × Aeg	MF	odorant binding	GO:0005549	8.70E-03
	BP	arginine metabolic process	GO:0006525	2.85E-03
Virgem × Alb	MF	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	GO:0008137	1.54E-03
	MF	oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, quinone or similar compound as acceptor	GO:0016655	1.54E-03
	MF	NADH dehydrogenase (quinone) activity	GO:0050136	1.54E-03
	MF	NADH dehydrogenase activity	GO:0003954	2.50E-03
	MF	structural constituent of cuticle	GO:0042302	4.68E-03
	MF	oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H	GO:0016651	1.97E-02
	BP	arginine metabolic process	GO:0006525	8.00E-03
	BP	alpha-amino acid metabolic process	GO:1901605	1.55E-02
	BP	ATP metabolic process	GO:0046034	1.61E-02
	CC	respirasome	GO:0070469	4.29E-02
Aeg × Ins	MF	proton transmembrane transporter activity	GO:0015078	6.94E-06
	MF	peptidase activity, acting on L-amino acid peptides	GO:0070011	1.41E-05
	MF	peptidase activity	GO:0008233	1.67E-05
	MF	endopeptidase activity	GO:0004175	1.67E-04
	MF	serine-type endopeptidase activity	GO:0004252	7.36E-04
	MF	serine-type peptidase activity	GO:0008236	1.24E-03
	MF	serine hydrolase activity	GO:0017171	1.24E-03
	MF	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, rotational mechanism	GO:0044769	2.32E-03
	MF	catalytic activity, acting on a protein	GO:0140096	2.92E-03
	MF	monooxygenase activity	GO:0004497	4.30E-03
	MF	exopeptidase activity	GO:0008238	6.19E-03
	MF	carboxypeptidase activity	GO:0004180	3.07E-02
	MF	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	GO:0016705	3.69E-02
	BP	ATP metabolic process	GO:0046034	2.97E-06
	BP	proton transmembrane transport	GO:1902600	5.75E-04
	BP	respiratory electron transport chain	GO:0022904	4.54E-03
	BP	proteolysis	GO:0006508	4.71E-03
	BP	cellular respiration	GO:0045333	1.24E-02
	BP	oxidative phosphorylation	GO:0006119	1.59E-02
	BP	ATP biosynthetic process	GO:0006754	3.50E-02
	BP	energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	GO:0015985	3.50E-02
	BP	ATP synthesis coupled proton transport	GO:0015986	3.50E-02
	CC	respirasome	GO:0070469	5.30E-07
	CC	proton-transporting two-sector ATPase complex	GO:0016469	2.04E-03
	CC	respiratory chain complex	GO:0098803	3.27E-03

MF: Função Molecular, BP: Processo Biológico and CC: Conteúdo Celular.

Perfil de expressão das famílias quimiossensoriais

Assumindo que a quimiossensibilidade é um fator sensorial essencial nos mosquitos para localizar parceiros e hospedeiros, investigamos o perfil de expressão de cinco famílias de proteínas relacionadas a quimiossensação, nomeadas, CSPs, IRs, OBPs, ORs e SNMPs (Fig. 5). Um total de 65 OBPs foram identificadas dos 16.721 genes expressos aqui caracterizados. Além de dois genes (OBP22 e o putativo OBP56a), todos os genes sugeriram uma regulação negativa significativa entre o grupo que teve contato coespecífico com machos e o grupo das fêmeas virgens. Entre eles, 24 genes mostraram log2FC significativo após a correção de múltiplos testes. No entanto, o grupo de contato com machos de *Ae. albopictus* não alterou esse conjunto de genes da mesma maneira. Para os SNMPs, nove genes foram identificados; um foi encontrado significativamente e negativamente regulado no contato masculino coespecífico com o grupo de virgens (AAEL027927); um no grupo de fêmeas inseminadas (SCRBQ1) e um no grupo de contato heteroespecífico (SCRB8). Identificamos 38 genes na família CSP, entre eles, dois foram significativamente e positivamente regulados em relação ao grupo de contato coespecífico e negativamente regulados após a inseminação; (AAEL005694 e AAEL002011). O AAEL005694 também é positivamente regulado de forma significativa por contato heteroespecífico. Dois outros genes (AAEL005687 e AAEL001985), que são supostamente serina / treonina quinase, apresentaram uma regulação negativa significativa na comparação Aeg vs. Virgens. AAEL005687 é encontrado para ser significativamente regulada positivamente nas fêmeas inseminadas. Dois outros genes putativos de serina / treonina quinase (AAEL12383 e AAEL002022) foram significativamente regulados apenas após contato heteroespecífico. Vinte e dois IRs foram identificados, dentre eles, três (Ir8a, glur5 (AAEL002922) e AAEL02757) foram significativamente regulados por contato coespecífico, mas não por contato heteroespecífico, com Ir8a também sendo regulado por inseminação. Outro glur5 (AAEL002538) é regulado apenas por contato heteroespecífico. Pudemos identificar 63 ORs, mas nenhum deles foi significativamente regulado em qualquer comparação (Fig. 5).

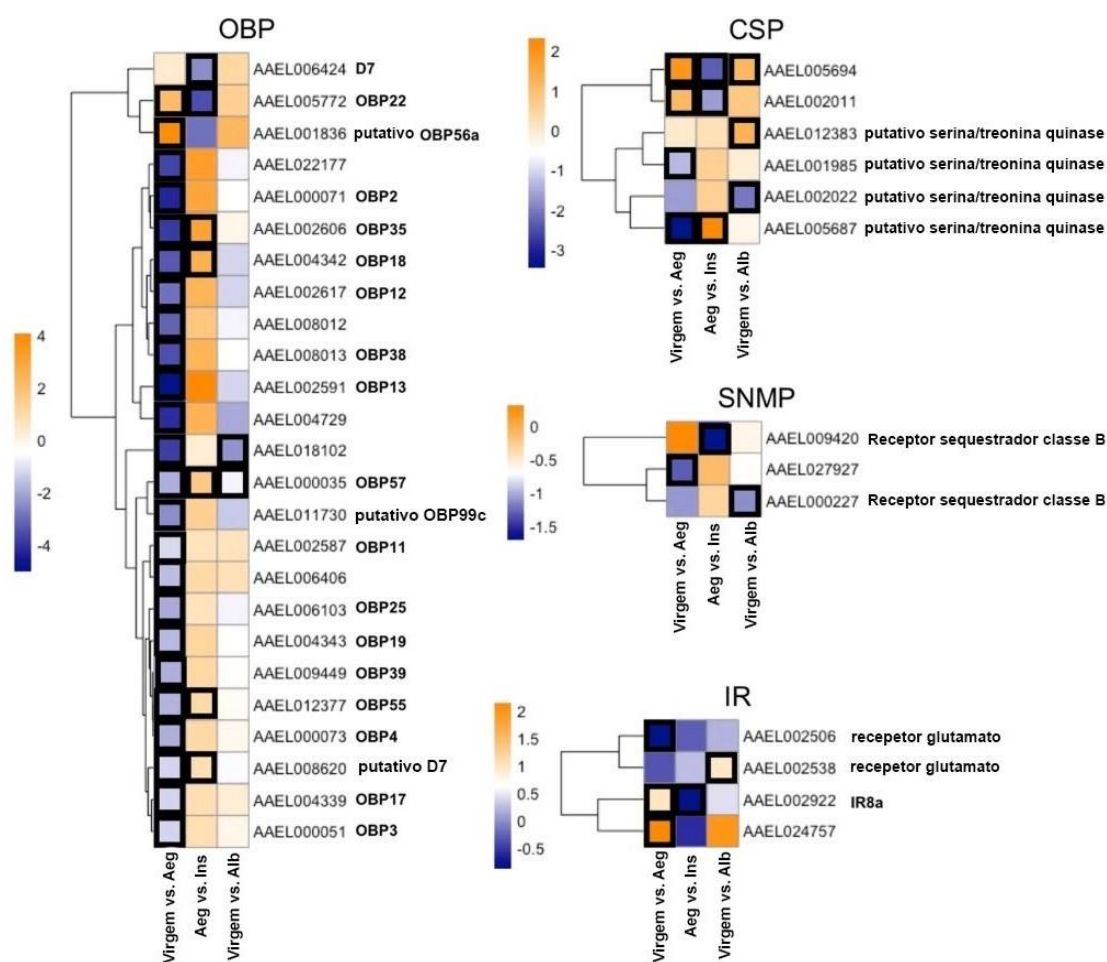


Figura 5 - Heatmap do log2FC de famílias de genes quimiosensoriais relacionados. Quadros em negrito representam genes significativamente regulados em cada comparação. Apenas genes que foram encontrados regulados significativamente para pelo menos uma das comparações são mostrados. OBP - proteína de ligação do odorante; CSP - proteína quimiosensorial; SNMP - proteína da membrana neuronal sensorial; IR - receptor ionotrópico.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, investigamos alterações transcricionais em fêmeas de *Ae. aegypti* durante o processo de cortejo e acasalamento com machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e após acasalamento coespecífico. Seguindo nossa abordagem experimental para cruzamentos heteroespecíficos, não foi possível observar acasalamento heteroespecífico (satirização) após 90 minutos de contato. Está bem documentado que, em condições de laboratório e de campo, *Ae. albopictus* machos são capazes de inseminar fêmeas de *Ae. aegypti*; no entanto, esse processo parece ocorrer apenas após longos períodos de contato heteroespecífico (~ 3 semanas) em condições de laboratório. Além disso, a origem geográfica dos *Ae. albopictus* podem determinar o potencial de satirização, o que pode ser o caso da nossa população de campo ¹⁶.

Observamos uma alteração substancial na expressão gênica desencadeada logo após o contato com machos de *Ae. aegypti*, que por sua vez eram distintos das mudanças desencadeadas pelo contato com machos de *Ae. albopictus* (Fig. 2a, b). Curiosamente, um número significativo de genes regulados desencadeados por contato coespecífico são revertidos após o acasalamento de maneira comutada: quando um gene é encontrado regulado positivamente em uma condição, na outra condição ele está presente com a regulação negativa e vice-versa. Dos 1.278 genes significativamente regulados e compartilhados entre contato coespecífico (Aeg) e inseminadas (Ins), apenas seis não seguem esse padrão (Fig. 4a). Por outro lado, quando comparamos o contato coespecífico com o contato heteroespecífico (Alb vs. Aeg), observamos apenas 661 genes significativamente regulados compartilhados, com 1.527 genes encontrados exclusivamente em Aeg e 738 em Alb (Fig. 4b). Vale ressaltar que o padrão de expressão mostra uma correlação positiva para esses dois conjuntos de dados; com exceção de 7 de 661, os genes compartilhados são regulados de maneira semelhante: quando um gene é encontrado com regulação positiva em uma condição, na outra condição, ele também é encontrado com regulação positiva, sendo o mesmo válido para a regulação negativa dos genes. Esses resultados sugerem uma sobreposição do perfil de expressão gênica entre essas duas condições, refletindo os principais genes que são regulados ao contato, independentemente da espécie masculina.

Para investigar melhor o perfil geral de expressão gênica, realizamos uma análise GO para o contato heteroespecífico (Virgem vs. Alb), inseminadas (Aeg vs. Ins) e contato coespecífico (Virgem vs. Aeg) (Tabela 1). A análise GO de genes significativamente regulados no conjunto de dados de contato heteroespecífico revelou dez termos enriquecidos,

sendo sete deles relacionados à respiração celular geral, dois relacionados ao bioprocessamento de aminoácidos e um termo denominado constituinte estrutural da cutícula. Curiosamente, os hidrocarbonetos cuticulares desempenham um papel central na comunicação química dos insetos. Por serem geralmente não voláteis, são detectados principalmente por contato ⁹. Embora esses termos estejam relacionados às características estruturais da cutícula, eles podem ter um papel na detecção eficiente de hidrocarbonetos cuticulares específicos pelo macho heteroespecífico. Na análise GO do processo de inseminadas, encontramos 25 termos enriquecidos, 15 deles relacionados à respiração celular geral e dez deles relacionados à atividade da endo e exopeptidase evidenciando proteólise geral. Esse resultado está de acordo com um estudo anterior que avaliou alterações no transcriptoma induzido pelo acasalamento no trato reprodutivo da fêmea *Ae. aegypti* ¹⁷. Embora não tenhamos analisado tecidos reprodutivos em nosso estudo, o perfil de proteólise foi muito similar. Na análise GO do contato coespecífico, encontramos dois termos enriquecidos: ligação odorante e processo metabólico da arginina. O termo ligação de odorante é composto por genes que codificam proteínas relacionadas à olfação que geralmente estão envolvidas em forrageamento, cortejo, acasalamento e escolha de oviposição. Como um grupo representativo importante dessas moléculas, as OBPs têm sido descritas como componentes importantes no reconhecimento de odores ¹⁸. O termo do processo metabólico da arginina é composto por genes relacionados ao bioprocessamento geral da arginina com um papel importante no ciclo da uréia e também foi encontrado no contato heteroespecífico.

Tomados em conjunto, esses achados apontam para um estado intermediário entre as condições de virgens e de acasalamento. Até onde sabemos, é a primeira vez que uma condição intermediária é divulgada e podemos supor que ela é crucial para o sucesso do acasalamento. Uma vez que encontramos o termo de Ligação Odorante enriquecido em todo esse estado intermediário, que por sua vez reflete o contato específico, decidimos investigar os perfis de expressão de cinco famílias de proteínas quimiossensoriais relacionadas para os processos acima mencionados (Fig. 5).

A partir da análise geral, podemos supor que, após o contato, vários genes que podem estar relacionados à busca pelo hospedeiro sejam reprimidos, especialmente os OBPs. A maioria desses genes retorna a taxas de expressão mais altas após o acasalamento. Dos vinte e cinco genes OBP diferencialmente expressos, apenas dois foram significativamente regulados

ao encontro de um macho de uma espécie diferente, no caso, *Ae. albopictus*. Curiosamente, as fêmeas inseminadas apresentaram um perfil geral de expressão gênica muito semelhante ao de virgens, o que também é verdadeiro para os genes relacionados ao OBP. Por outro lado, encontramos um co-receptor de IR (IR8a) significativamente regulado de forma positiva por contato coespecífico e regulado negativamente por inseminação, mas não regulado significativamente por contato heteroespecífico. Esses tipos de co-receptores formam um canal de íons responsivos ao odor com outros IRs sintonizados por odores e são relatados para detectar produtos químicos voláteis no ambiente. O IR8a parece estar fortemente associado ao comportamento de busca do hospedeiro, uma vez que recentemente foi demonstrado que esse co-receptor é necessário para a atração do mosquito ao ácido láctico, um componente importante do suor humano ¹⁹. Nesse caso, a regulação positiva sobre o contato coespecífico parece contribuir para o início precoce das fêmeas para uma futura busca por hospedeiros, refletindo uma interação mais complexa entre genes relacionados ao contato e acasalamento em *Ae. aegypti*.

Em geral, os insetos podem usar uma miríade de sinais químicos, como odores e feromônios de animais, para se encontrarem e também para detectar néctar de plantas ou hospedeiros de vertebrados ²⁰. Esses compostos são geralmente pequenas moléculas hidrofóbicas, que entram nos órgãos sensoriais que passam através da linfa ao redor dos neurônios olfativos. Pensa-se que esta passagem seja facilitada pelos OBPs, que são capazes de transportar esses compostos para as ORs dos insetos ^{21, 22}. Curiosamente, Cabrera e Jaffe ²³ mostraram isso em condições de laboratório, enxames de machos de *Ae. aegypti* foram colocados a favor do vento em um olfatômetro, e provocaram atividade de voo feminina. Mais importante, observou-se que as fêmeas de teste reagiram em fuga aos odores produzidos pelos mosquitos machos, mas não à presença de odores de ratos. Quando as fêmeas detectaram os odores de um rato, voaram contra o vento e se aglomeraram na área do olfatômetro onde a corrente de ar atingiu a gaiola e tentaram sondar para encontrar uma refeição de sangue. Se ambos os odores estavam presentes ao mesmo tempo, as fêmeas apresentavam o voo característico, sugerindo que o odor do macho provocava um comportamento que substituíria o produzido pelo hospedeiro. Isso indica claramente que, quando as fêmeas conseguem sentir a presença de um macho, elas mudam do comportamento de busca do hospedeiro para o comportamento de acasalamento, independentemente da percepção das sugestões do hospedeiro. Levando em consideração os presentes resultados,

podemos traçar a hipótese de que o contato heteroespecífico com os machos, ou pelo menos a percepção do mesmo por fêmeas de *Ae. aegypti*, é um sinal importante para desencadear uma resposta de acasalamento e preparar as fêmeas para inseminação. Do nosso ponto de vista, isso pode ser conseguido pela regulação negativa dos OBPs capazes de desativar o comportamento de busca por hospedeiros.

Extrapolando esses resultados para as condições de campo, apresentamos um cenário para ilustrar a importância do contato e cortejo no comportamento de acasalamento de fêmeas de *Ae. aegypti*. Sabendo que fêmeas de *Ae. aegypti* possuem o comportamento chamado de oviposição pulada, isso pode moldar o padrão de distribuição dos locais potenciais de criação de mosquitos, levando a criadouros altamente fragmentados. Como consequência direta desse padrão, os encontros entre machos e fêmeas tendem a ser mais raros, comprometendo o processo de acasalamento. Assim, as fêmeas precisam ser capazes de responder aos estímulos masculinos de maneira obrigatória e direta, ignorando quaisquer outros sinais químicos que não estejam relacionadas à percepção de machos.

A ecologia química dos mosquitos é geralmente aceita como um tema importante de investigação em que as futuras estratégias de controle de doenças transmitidas por vetores podem se basear. Os resultados apresentados aqui podem ser aplicados a uma abordagem inovadora de controle baseada nas comunicações químicas dos mosquitos, onde poderíamos desenvolver estratégias moleculares (isto é, mutagênese alvo em genes relacionados às OBPs) para prender as fêmeas no "modo de acasalamento", tornando-as menos eficazes na busca de um hospedeiro para alimentação sanguínea e consequentemente reduzindo a transmissão de arboviroses transmitidas por esses vetores.

CONCLUSÃO

A análise do transcriptoma de fêmeas de *Ae. aegypti* durante o cortejo, contato e inseminação por machos, mostrou modulações nos níveis de expressão de diversos genes importantes no comportamento e sobrevivência do mosquito.

Compreender os resultados de nossa pesquisa de forma precisa, foi de grande valor científico e sustenta nossas hipóteses sobre os perfis de expressão serem modulados significativamente durante as diversas exposições e momentos da vida das fêmeas de *Ae. aegypti*.

Por fim, esperamos que esse conjunto de dados sirva como um recurso importante para orientar a seleção de genes candidatos envolvidos no contato e comportamento de acasalamento de mosquitos, para que sejam precisamente desenvolvidas mutações com as ferramentas de engenharia genética modernas como CRISPR-Cas9 agora disponíveis, permitindo o desenvolvimento de linhagens de mosquitos precisamente mutados e estáveis para testar a função dos genes candidatos.

REFERÊNCIAS

1. BRADY, Oliver J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 8, 2012.
2. BHATT, Samir et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.
3. CARVALHO, Fabiano Duarte; MOREIRA, Luciano Andrade. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species?. **Neotropical entomology**, v. 46, n. 3, p. 243-255, 2017.
4. COLTON, Y. M.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Natural skip oviposition of the mosquito *Aedes aegypti* indicated by codominant genetic markers. **Medical and veterinary entomology**, v. 17, n. 2, p. 195-204, 2003.
5. CHADEE, Dave D.; RITCHIE, Scott A. Oviposition behaviour and parity rates of *Aedes aegypti* collected in sticky traps in Trinidad, West Indies. **Acta tropica**, v. 116, n. 3, p. 212-216, 2010.
6. WONG, Jacklyn et al. Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 4, 2011.
7. ABREU, Filipe Vieira Santos de et al. Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 669-676, 2015.
8. FAWAZ, Emadeldin Y. et al. Swarming mechanisms in the yellow fever mosquito: aggregation pheromones are involved in the mating behavior of *Aedes aegypti*. **Journal of Vector Ecology**, v. 39, n. 2, p. 347-354, 2014.
9. VANÍČKOVÁ, Lucie; CANALE, Angelo; BENELLI, Giovanni. Sexual chemoeology of mosquitoes (Diptera, Culicidae): current knowledge and implications for vector control programs. **Parasitology international**, v. 66, n. 2, p. 190-195, 2017.
10. CARVALHO, Danilo O. et al. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 83, p. e3579, 2014.
11. GARY, Richard E.; CANNON, James W.; FOSTER, Woodbridge A. Effect of sugar on male *Anopheles gambiae* mating performance, as modified by temperature, space, and body size. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 19, 2009.
12. LOVE, Michael I.; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.
13. MARINI, Federico; BINDER, Harald. pcaExplorer: an R/Bioconductor package for interacting with RNA-seq principal components. **BMC bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 331, 2019.
14. BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

15. RAUDVERE, Uku et al. g: Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W191-W198, 2019.
16. HONÓRIO, Nildimar A. et al. Male origin determines satyriization potential of *Aedes aegypti* by invasive *Aedes albopictus*. **Biological invasions**, v. 20, n. 3, p. 653-664, 2018.
17. ALFONSO-PARRA, Catalina et al. Mating-induced transcriptome changes in the reproductive tract of female *Aedes aegypti*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 2, 2016.
18. DENG, Yuhua et al. Molecular and functional characterization of odorant-binding protein genes in an invasive vector mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.
19. RAJI, Joshua I. et al. *Aedes aegypti* mosquitoes detect acidic volatiles found in human odor using the IR8a pathway. **Current Biology**, v. 29, n. 8, p. 1253-1262. e7, 2019.
20. ZWIEBEL, L. J.; TAKKEN, W. Olfactory regulation of mosquito–host interactions. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 7, p. 645-652, 2004.
21. XU, PingXi et al. *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. **Neuron**, v. 45, n. 2, p. 193-200, 2005.
22. SYED, Zainulabeuddin et al. Pheromone reception in fruit flies expressing a moth's odorant receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 44, p. 16538-16543, 2006.
23. CABRERA, Maira; JAFFE, Klaus. An aggregation pheromone modulates lekking behavior in the vector mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2007.