



Universidade de Brasília

Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas

Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

Sialoma do *Triatoma sordida*, triatomíneo peridomiciliar vetor da Doença de Chagas

Yanna Reis Praça

Brasília – DF

2021

YANNA REIS PRAÇA

Sialoma do *Triatoma sordida*, triatomíneo peridomiciliar vetor da Doença de Chagas

Orientadora: Professora Dr^a Carla Nunes de Araújo

Co-orientadora: Dr^a Paula Beatriz Santiago

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília - Faculdade de Medicina, como requisito parcial para obter o grau de doutor em Ciências Médicas.

Brasília - DF, 2021

Tese desenvolvida no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Processo 0193.001802/2017).

Projeto de Doutorado realizado com bolsa da CAPES.

AGRADECIMENTOS

O final de um doutorado com uma Pandemia no meio deste processo vem cheio de aprendizado, resiliência e agradecimentos, espero não esquecer de ninguém que foi essencial para a finalização desta tese.

À minha orientadora, professora Carla Nunes, pela confiança e oportunidade a mim dada. Obrigada por compartilhar suas experiências e seu conhecimento ao longo de todos esses anos. Foi um prazer te ter como orientadora no mestrado e doutorado.

À minha amiga e coorientadora Paula Beatriz Santiago, pela amizade, preocupação, tempo disponibilizado para me ensinar e me ouvir/consolar. Te admiro muito e me espelho em você!

Ao professor Jaime Santana, pelo apoio, preocupação e experiência compartilhada no desenvolver deste projeto. Você foi parte importante para a conclusão!

Aos professores Sébastien Charneau, Izabela Dourado e Flávia Nader pela disponibilidade em esclarecer dúvidas, ajuda nas tomadas de decisões e pela convivência!

Ao Kaio Bentes, pela parceria, amizade, convivência, experiências e dramas/rebeldia compartilhados, pelas figuras dos trabalhos e por ser meu “help desk” nos momentos de desespero. Muito obrigada por todos estes anos! Você foi peça fundamental e eu vou te levar para a vida! Amo você!

As “minhas crias”, Nathalia Araújo e Sofia Marcelino pela parceria, tempo disponibilizado e amizade adquirida. Aprendi muito com as duas e foi um prazer ter vocês me acompanhando no desenrolar do doutorado. Admiro muito a dedicação e empenho de vocês, certamente serão excelentes profissionais!

Aos amigos do laboratório: Allan Mascarenhas, Arthur Soares, Alessandro Zanard, Nathália Gil, Camila Lasse, Clênia Azevedo, Milene Andrade, Gabriel Santos, e Laís Garreto pela maravilhosa convivência, pelas horas de copa, pelos lanches compartilhados, pelas brincadeiras e risos pelo corredor do laboratório e pelas experiências compartilhadas. Vocês foram importantes para tornar este momento mais leve!

Aos amigos que já não estão mais no laboratório e que eu tenho um enorme carinho, Gabriel Haguihara, Marina Andrade e Graziela Figueiredo.

Ao amigo Rayner Myr. que mesmo em outro país sempre esteve presente e disponível para me ajudar na sua área de especialidade e claro pelos momentos de descontração com os memes compartilhados. Você faz falta no Brasil Raynerzinho!

Ao Weverton Fernandes, que foi meu braço direito na manutenção das colônias de barbeiro e na ajuda com as “aventuras” do galinheiro. Muito obrigada pelo tempo disponibilizado e pela amizade adquirida ao longo destes anos.

Ao Waldeyr Mendes, pelo tempo disponibilizado para me ajudar nas análises e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Raphael Igor Dias, que foi meu orientador de monografia na graduação e mesmo depois de tantos anos é um professor acessível para esclarecer dúvidas e tentar ajudar! Que tenham mais professores como você!

Ao Wellington Coelho, pela amizade e pelas fotos incríveis dos meus bichos! Você arrasa nas fotos. Muito obrigada mesmo!

Aos meus pais, Isabel Cristina e Nelson pelo apoio, incentivo, paciência e pelo colo que sempre me deram nos momentos difíceis. Vocês foram essenciais neste processo, muito obrigada! Amo muito vocês!

Ao meu filho Kauã, por ser compreensivo nos momentos de ausência e por ser meu parceiro de todas as horas. Você é a MELHOR parte de mim, tudo por você e para você! A mamãe te ama demais!

A minha irmã e amiga Wlyana por me incentivar, me ouvir e sempre ter uma palavra sábia nos momentos exatos! Você me inspira! Amo muito você!

Ao meu marido e amigo Henrique Nunes por ser um dos meus maiores incentivadores, pela parceria e paciência, em especial neste último ano, pelo amor e cuidado diário. Você é minha melhor escolha, eu amo muito você!

Aos amigos da BioHell, que são meus parceiros de vida e a tornam mais leve e prazerosa! Amo muito vocês! Um agradecimento especial a Bruna Kraus que sempre me incentivou e estimulou com o inglês, ainda não estou excelente, mas, certamente muito melhor graças a você! Obrigada por acreditar em mim neste processo. Aproveito também para agradecer ao prof. Paulo Gustavo Silva que esteve junto nesta missão, sempre foi muito interessado no meu trabalho e foi parte fundamental neste processo de aprendizado. Que tenham mais professores como você!

A todos vocês, o meu muito obrigada! Vocês foram muito importantes ao longo da conquista deste título.

“...A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.
É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte....”

Albert Einstein.

O pensamento vivo de Einstein

RESUMO

Os triatomíneos são os vetores da Doença de Chagas (DC), por serem hematófagos, desenvolveram adaptações morfológicas e moleculares para conseguirem se alimentar de sangue e assim adquirir os nutrientes necessários para a sua sobrevivência e reprodução. A saliva destes artrópodes, é constituída de moléculas que interagem com os sistemas hemostático e imune dos hospedeiros vertebrados, a fim de contrapô-los, manter o sangue fluido e garantir o sucesso no repasto. Com o intuito de compreender a complexidade das moléculas que estão envolvidas neste processo, o objetivo do presente estudo foi investigar o perfil de expressão dos genes das glândulas salivares do *Triatoma sordida*, triatomíneo peridomiciliar e importante vetor da DC no Brasil. Foi realizado o sequenciamento de alto rendimento do tipo *Illumina* com o RNA total extraído das glândulas salivares e espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS com amostra da saliva, obtivemos 57.645.372 *reads* que foram montadas em 26.670 *contigs* (CDS). Destes, 16.683 (62,6% CDS) foram anotados e separados em 7 categorias, destas, 3 se destacaram: Secretadas (FPKM= 79,5%), Proteínas constitutivas (FPKM= 12,1%) e Desconhecidas (FPKM= 7,6%). Entre os transcritos com maior expressão podemos destacar as Lipocalinas, Trialisina curta/Trialisina, Inibidor de serino protease do tipo Kazal, Antígeno 5, Tripsina Salivar, Inositol fosfato fosfatase. No proteoma, 132 proteínas foram identificadas, dentre os grupos com maior quantidade de espectros (Ce), temos: Lipocalinas (Ce= 42%), Enzimas (Ce= 22,5%), Famílias específicas de Hemípteras (Ce= 10,1%), Famílias de Proteínas Ubíquas (Ce= 5,9%), Outras proteínas salivares secretadas (Ce= 4,9%) e Inibidores de Protease (Ce= 1,4%). No proteoma também foi relatada pela primeira vez a Anexina, que pode estar envolvida coma imunidade do inseto. Neste trabalho, apresentamos o primeiro sialoma do *T. sordida*, demonstrando o padrão de expressão das proteínas salivares. Os resultados obtidos corroboram com alguns já descritos em outros sialomas de triatomíneos. O estudo dos compostos salivares auxilia a compreensão acerca da biologia dos vetores, da evolução da hematofagia, além de demonstrar o potencial biotecnológico existente nestes animais.

Palavras-chave: *Triatoma sordida*. Saliva. Hematofagia. Transcriptoma. Proteoma.

ABSTRACT

Triatomines are the vectors of Chagas disease (CD), as they are hematophagous, they have developed morphological and molecular adaptations in order to be able to feed on blood and thus acquire the nutrients necessary for their reproduction and survival. The saliva of these arthropods is composed of molecules that interact with the hemostatic and immune systems of vertebrate hosts, so as to neutralize them, maintain blood fluid and ensure a successful meal. Intending to understand the complexity of the molecules involved in this process, the aim of this study was to investigate the expression profile of genes in the salivary glands of *Triatoma sordida*, peridomiciliary triatomine and an important vector of CD in Brazil. Using high-throughput Illumina – type sequencing performed with total RNA extracted from salivary glands and LC-MS/MS type mass spectrometry with saliva sample, obtained 57,645,372 reads that were mounted in 26,670 contigs (CDS). Of these, 16,683 (62.6% CDS) were annotated and separated into 7 categories which 3 stood out: Secreted (79.5% FPKM), Housekeeping (12,1% FPKM) and Unknowns (7.6% FPKM). Among the transcripts with greater expression, we can highlight Lipocalins, Short triallysin/triallysin, Kazal type, Antigen 5, Salivary trypsin, Inositol phosphate phosphatase. In the proteome, 132 proteins were identified, among the groups with the greatest amount of spectra, we have: Lipocalins (42% Sc), Enzymes (22,5% Sc), Hemiptera specific families (10,1% Sc), Ubiquitous protein families (5,9% Sc), Other salivary secreted protein (4,9% Sc) and Protease inhibitors (1,4% Sc). Annexin was also reported for the first time in the proteome, which may be involved in the insect's immunity. The results obtained corroborate those already described in other triatomine sialomes. The study of salivary compounds helps to understand the biology of vectors, the evolution of the hematophagy, in addition to demonstrating the biotechnological potential existing in these animals.

Key words: *Triatoma sordida*. Saliva. Hematophagy. Transcriptome. Proteome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. O ciclo se inicia quando o triatomíneo realiza o repasto em um mamífero infectado e ingere as formas tripomastigotas sanguíneas (1). Ao alcançar o intestino médio, essas formas se diferenciam em epimastigotas (2) e colonizam o intestino do inseto, até que migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (3). Ao realizar um novo repasto, o triatomíneo defeca enquanto se alimenta ou após a alimentação, e nas suas fezes se encontram os tripomastigotas metacíclicos (4). Estes, ao atingirem a corrente sanguínea, podem infectar a maioria dos tipos celulares do hospedeiro vertebrado. Uma vez que infectam uma célula, se diferenciam em amastigotas (5), os quais se dividem por divisão binária, se diferenciam novamente em tripomastigotas sanguíneos (6), e lisam a célula, atingindo a corrente sanguínea podendo infectar outras células, ou serem ingeridos pelo triatomíneo, recomeçando o ciclo. 20
- Figura 2 – Ciclo biológico do *Triatoma sordida*. 1- Ovos em processo de embriogênese até a eclosão (ovo branco); 2- Ninfa de 1º estágio; 3- Ninfa de 2º estágio; 4- Ninfa de 3º estágio; 5- Ninfa de 4º estágio; 6- Ninfa de 5º estágio; 7- Fêmea adulta; e 8- Macho adulto. 23
- Figura 3 – Mapa de distribuição geográfica do *Triatoma sordida*. 26
- Figura 4 – *Triatoma infestans* adulto salivando. 28
- Figura 5 – Resumo esquemático da metodologia utilizada. 39
- Figura 6 – Número de CDS e nível de expressão dos 100 transcritos codificantes mais expressos por classificação. 50
- Figura 7 – Correlação do transcriptoma/proteoma salivar. A figura mostra a correlação entre as famílias de proteínas encontradas no transcriptoma (FPKM) e proteoma (Contagem de espectros) das amostras. Demonstra uma correlação positiva estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) nos 3 grupos testados. Em azul, todas as proteínas identificadas, em rosa todas as proteínas secretadas identificadas e em preto o grupo das lipocalinas identificadas. 55
- Figura 8 – Filograma do grupo Lipocalinas. A distância entre as sequências da árvore foi determinada pelo alinhamento das sequências de Lipocalinas encontradas em *T.sordida* com outras sequências de Lipocalinas de Triatomíneos. Os pontos coloridos identificam as espécies cujas sequências foram selecionadas: Azul-

Triatoma sordida; Magenta – *Triatoma matogrossensis*; Roxo – *Triatoma brasiliensis*; Verde- *Triatoma infestans*; Amarelo- *Triatoma dimidiata* e Cinza - *Panstrongylus chinai*. 58

Figura 9 – Trialisinas do sialotranscriptoma do *Triatoma sordida*. A) Alinhamento de múltiplas sequências de Trialisina curta retiradas do sialotranscriptoma de *T. sordida* (TRISOR_C10816_g1_i1.p1; TRISOR_c15059_g1_i2.p2; TRISOR_c15059_g1_i3.p1; TRISOR_c14763_g9_i1.p2) e outros homólogos de sequências de Trialisina das espécies: *T. infestans* (TRIINF_ABR27833.1; TRIINF_ABR27839.1; TRIINF_ABR27838.1 e TRIINF_ABR27837.1), *T. matogrossensis* (TRIMAT_tr/E2J776). B) Alinhamento de múltiplas sequências de Trialisina extraídas do sialotranscriptoma de *T. sordida* (TRISOR_c_15366_g14_i1.p1) e duas sequências de homólogos das seguintes espécies: *T. infestans* (TRIINF_ABR27943.1) que corresponde a uma trialisina e *P. rhadamanthus* (PLARHA_QHB21548.1) que corresponde a uma redulisina. Os alinhamentos indicam resíduos conservados numa escala de azul; a barra cinza marca o motivo consenso das Trialisinas; o retângulo vermelho marca os resíduos de Lys (K). O logotipo da sequência múltipla, a altura dos símbolos dentro da pilha indica a frequência relativa de cada aminoácido naquela posição. As previsões da estrutura secundária foram inferidas usando a Previsão da Estrutura JNET. A sequência para a qual a previsão foi feita é a primeira no alinhamento. 61

Figura 10 – Gráfico de hidrofobicidade de Kyte e Doolittle das Trialisinas do sialotranscriptoma do *T. sordida*. Os aminoácidos hidrofóbicos estão representados acima da linha 0 e o aminoácidos hidrofílicos abaixo da linha 0. 62

Figura 11 – Árvore filogenética das Trialisinas do sialotranscriptoma do *Triatoma sordida*. A distância entre as sequências de trialisina é derivada do alinhamento feito das sequências retiradas do sialotranscriptoma de *T. sordida* e sequências homólogas das trialisina de Hemipteras, extraídas do banco de dados NR do NCBI, aplicando o algoritmo PSI-BLAST. Os pontos coloridos, correspondem as espécies de cada sequência que foi utilizada. Azul – *T. sordida*; Laranja- *P. rhadamanthus*; Rosa – *T. matogrossensis*; e Verde – *T. infestans*. Os asteriscos em vermelho correspondem aos eventos de duplicação dos genes. O número de nós, indica os valores de *bootstrap*. A escala no canto esquerdo inferior mede a distância evolutiva em substituições por aminoácidos. 63

Figura 12 – Sequências de inibidores de serino protease do tipo-Kazal do *Triatoma sordida*. Alinhamento múltiplo das sequências de inibidores de protease do tipo Kazal retiradas do sialotranscriptoma do *T. sordida* (TRISOR_c15210_g10_i1.p1, TRISOR_15210_g10_i2.p1; TRISOR_c15210_g10_i3.p1; TRISOR_c15210_g10_i4.p1; TRISOR_c15210_g10_i6.p1; TRISOR_c15210_g10_i5.p1; TRISOR_11034_g1_i1.p1; TRISOR_15210_g10_i7.p1; TRISOR_c11377_g1_i2.p1; TRISOR_c10221_g10_i1.p1; TRISOR_c13467_g1_i1.p1) e outras sequências homólogas de inibidores de serino protease do tipo Kazal das espécies: *P. chinai* (PANCHI_BBA30649.1); *T. infestans* (TRIINF_ABR27937.1); *T. brasiliensis* (TRIBRA_ABJ96351.1); *Hybomitra bimaculata* (HYBBIM_P84843.1) e *Tabanus yao* (TABYAO_ABX80080.1). O alinhamento indica resíduos conservados em azul. A barra cinza acima do alinhamento indica a região do domínio Kazal, com asteriscos coloridos (rosa, verde e laranja) mostrando o arranjo das 6 cisteínas conservadas (C1: C5, C2:C4, C3:C6). O logotipo da sequência mostra a frequência de aminoácidos no alinhamento múltiplo, a altura dos símbolos dentro da pilha corresponde a frequência relativa de cada aminoácido naquela posição.

67

Figura 13 – Filograma dos inibidores de protease do tipo Kazal. A distância entre as sequências da árvore foi determinada pelo alinhamento dos transcritos codificantes dos inibidores de protease do tipo Kazal derivados do sequenciamento das glândulas salivares com outras sequências homólogas de inibidores de protease do tipo Kazal. Os pontos azuis são as sequências do *T.sordida*. As sequências pintadas em verde são os tipo Kazal encontradas no intestino, em vermelho os tipo Kazal encontradas nas glândulas salivares de *T. yao* as Vasotab, em azul claro

68

Figura 14 – O heatmap representando o perfil de expressão de CDS salivares. As linhas representam as famílias de proteínas salivares e as colunas as espécies de Triatomíneos. A escala azul-amarela: o azul representa uma alta quantidade de CDS e o amarelo uma baixa quantidade de CDS.

81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tribos e os gêneros dos triatomíneos.	22
Tabela 2 – Programas utilizados para realização das análises de bioinformática.	42
Tabela 3 – Classificação funcional e níveis de expressão dos <i>contigs</i> (CDS) do sialotranscriptoma do <i>T. sordida</i> .	45
Tabela 4 – Classificação funcional e níveis de expressão das proteínas <i>Housekeeping</i> .	46
Tabela 5 – Classificação funcional e níveis de expressão das proteínas putativamente secretadas.	48
Tabela 6 – Número de identificações e nível de expressão das 100 mais expressas em relação aos valores do transcriptoma geral.	50
Tabela 7 – Identificações do proteoma salivar do <i>T. sordida</i> . As classes e os valores em negrito correspondem ao valor total de espectros e porcentagem dentro de cada classe.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

- ADP** – Adenosina difosfato
- Ag5** – Antígeno 5 (*Antigen 5*)
- AMP** – Adenosina monofosfato
- ATP** – Adenosina trifosfato
- AVC**- Acidente vascular cerebral
- CA** – Corpora Allata ou *corpus allatum*
- CAP** – Proteínas secretoras ricas em cisteína, antígeno 5 e proteína relacionada a patógenos 1 (*Cysteine rich secretory proteins, antigen 5 and pathogens related 1 protein*)
- CDS** – *contigs*
- COx2** – Ciclo oxigenase 2
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DTN** - Doença Tropical Negligenciada
- DTT** – Ditioneitol
- ESI/MS** – Ionização electrospray
- FA** – Ácido fórmico
- FDR** – Taxa de descoberta falsa (*False discovery rate*)
- FPKM** – Fragmento por quilobase milhão (*Fragment per kilobase million*)
- FT** - Fator tecidual
- HSPs** – Proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*)
- Ids** – Identificações
- LC-MS/MS** – Cromatografia líquida- espectrometria de massas/ espectrometria de massas (*Liquid chromatography – mass spectrometry / mass spectrometry or in tandem*)
- LYS** – Lisina
- MALDI** – Ionização/dessorção a laser assistida por matriz
- MPI** – Metaloprotease I (*Metalloprotease I*)
- NCBI** – *National Center of Biotechnology Information*
- NGS** – Sequenciamento de próxima geração (*Next generation sequencing*)
- NR** – Não redundante
- Nt** – Nucleotídeo
- OBP** – Proteína de ligação a odorante (*Odorant binding protein*)

PARs – Receptores ativados por protease (*Protease activated receptors*)

Pb – Pares de bases

PBP – Proteína de ligação a feromônio (*Pheromone binding protein*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

Pi – Fosfato inorgânico

RNA – Ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

RNA-seq – Sequenciamento de RNA (*RNA sequencing*)

Ce – Contagem de espectros

SePro – Processador de mecanismo de busca (*Search engine processor*)

sHsps – Proteínas de choque térmico pequenas (*Small heat shock proteins*)

TEAB – Bicarbonato de trietilamônio (*Triethylammonium bicarbonat*)

TFA – Ácido trifluoracético

TXA2 – Tromboxano A2

Uniprot – *The universal protein resource*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aspectos gerais da Doença de Chagas	17
1.2. Triatomíneos, os vetores da doença de Chagas.....	20
1.2.1. Os triatomíneos, sua diversidade e distribuição	20
1.2.2. <i>Triatoma sordida</i>	22
1.2.3. A alimentação dos triatomíneos	26
1.2.4. A saliva dos triatomíneos	27
1.3. Hemostasia do hospedeiro	29
1.4. Sequenciamento do tipo RNA-seq e espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS	30
1.5. Sialoma de triatomíneos.....	35
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. METODOLOGIA	39
4.1. Desenho experimental.....	39
4.2. Triatomíneos.....	39
4.3. Extração das glândulas salivares e obtenção da saliva.....	40
4.4. Extração do RNA total e RNA-Seq.....	40
4.5. Preparação das amostras de saliva para a análise proteômica	41
4.6. Análises de bioinformática.....	41
4.6.1. Análise transcriptômica	41
4.6.2. Análise proteômica.....	42
4.6.3. Alinhamento múltiplo e análise filogenética	43
4.6.4. Correlação e análise de hidrofobicidade	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1. Análise transcriptômica da saliva do <i>T. sordida</i>	45
5.1.1. Anotação das sequências	45
5.2. Análise proteômica da saliva do <i>T. sordida</i>	52

5.3. Proteínas Secretadas	55
5.3.1. <i>Lipocalinas</i>	Erro! Indicador não definido.
5.3.2. Famílias específicas de Hemípteras	58
5.3.3. <i>Trialisina curta/ Trialisina</i>	59
5.3.4. <i>MYS/Hemolisina</i>	63
5.4. Outras proteínas salivares secretadas	64
5.4.1. <i>Triatox</i>	64
5.4.2. Inibidores de Protease	65
5.4.3. Enzimas	69
5.5. Família de proteínas ubíquas	73
5.5.1. Antígeno 5 (Ag-5)	73
5.5.2. Proteínas de ligação ao feromônio e Proteínas de ligação ao Odorante	74
5.5.3. Proteínas de ligação ao hormônio Juvenil	76
5.6. Classe Housekeeping.....	77
5.6.1. <i>Anexina</i>	77
5.6.2. Proteínas de choque térmico– HSP70s	78
5.6.3. Comparação dos Sialomas: <i>T. sordida</i> e outras espécies de triatomíneos.....	79
6. CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO	106
APÊNDICE	107

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da Doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana, popularmente chamada de Doença de Chagas é considerada uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), que acomete populações com baixo desenvolvimento socioeconômico. As DTNs estão relacionadas à pobreza, moradias precárias, desnutrição, falta de saneamento básico, comunidades com baixo ou nenhum acesso aos serviços de saúde, pouco investimento tanto para o controle vetorial quanto para o desenvolvimento de drogas e vacinas (LINDOSO; LINDOSO, 2009). Além da Doença de Chagas, outros exemplos de DTNs são: dengue, raiva, úlcera de Buruli, boubá, tracoma, hanseníase, leishmanioses, teníase e neurocisticercose, dracunculíase, tripanossomíase humana africana, equinococose, oncocercose, filariose linfática, esquistossomose, micetoma, doenças transmitidas por alimentos e helmintíases transmitidas pelo solo (OPAS, 2017). Essas doenças estão presentes em 149 países localizados em regiões tropicais e subtropicais do planeta e estima-se que acometam cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo (SAVIOLI; DAUMERIE, 2013; WHO, 2018).

A Doença de Chagas foi descrita em 1909, pelo médico pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, foi ele o responsável por identificar o agente etiológico (*Trypanosoma cruzi*), o seu vetor, os triatomíneos da família Reduviidae, que são conhecidos por diversos nomes populares a depender da região, por exemplo: barbeiro, vicunha, bicudo, chupança entre outros. Além disso, foi Carlos Chagas quem descreveu os ciclos de vida tanto do agente etiológico como do vetor da Doença de Chagas (CHAGAS, 1909; COUTINHO; DIAS, 1999; STUART; BRUN; CROFT; FAIRLAMB *et al.*, 2008). Ela é endêmica em 21 países da América Latina, entretanto a migração de pessoas tem disseminado a doença para áreas não endêmicas. Estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas vivam em áreas onde há risco de infecção e cerca de 8 milhões de indivíduos infectados, com incidência anual de 56 mil casos, considerando todas as formas de contaminação (PAHO, 2017).

As principais formas de contaminação são vetorial, através das fezes do triatomíneo infectado; por transfusão sanguínea; por transplantes de órgãos de doadores infectados; congênita ou vertical, sendo passada de mãe para filho; por ingestão acidental de alimentos contaminados; bem como por acidentes laboratoriais com amostras infectadas (AGUILAR; ABAD-FRANCH; DIAS; JUNQUEIRA *et al.*, 2007; COURA, 2015; IMAI; MAEDA; SAYAMA; MIKITA *et al.*, 2014; PAHO, 2017).

A Doença de Chagas apresenta 2 fases principais, aguda e crônica, que podem ser assintomáticas, oligossintomáticas (com sintomas discretos) ou sintomáticas. Na forma aguda é assintomática na maioria dos casos, mas quando sintomática o indivíduo pode apresentar: febre, inflamação no local da inoculação, sinal de Romaña (edema palpebral), linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Nas formas crônicas sintomáticas, que ocorrem entre 10 e 30 anos após a infecção, os indivíduos podem desenvolver principalmente cardiomiopatia ou megavísceras (cardiomegalia, megaesôfago e/ou megacólon) e em alguns raros casos, associada também a quadros de acidente vascular cerebral (AVC) cardioembólico, e polineuropatia sensorial leve, que pode não necessariamente estar associada a outro evento visceral (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; STANAWAY; ROTH, 2015).

O *T. cruzi*, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, (CAVALIER-SMITH, 2016), é um protozoário flagelado pertencente ao sub-gênero *Schizotrypanum*, classificado assim por se multiplicar de forma intracelular em vertebrados (BERN; KJOS; YABSLEY; MONTGOMERY, 2011; KIRCHHOFF; RASSI JR, 2011). Ele pode ser transmitido para inúmeras espécies de mamíferos, tanto silvestres, como domésticos incluindo os seres humanos (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

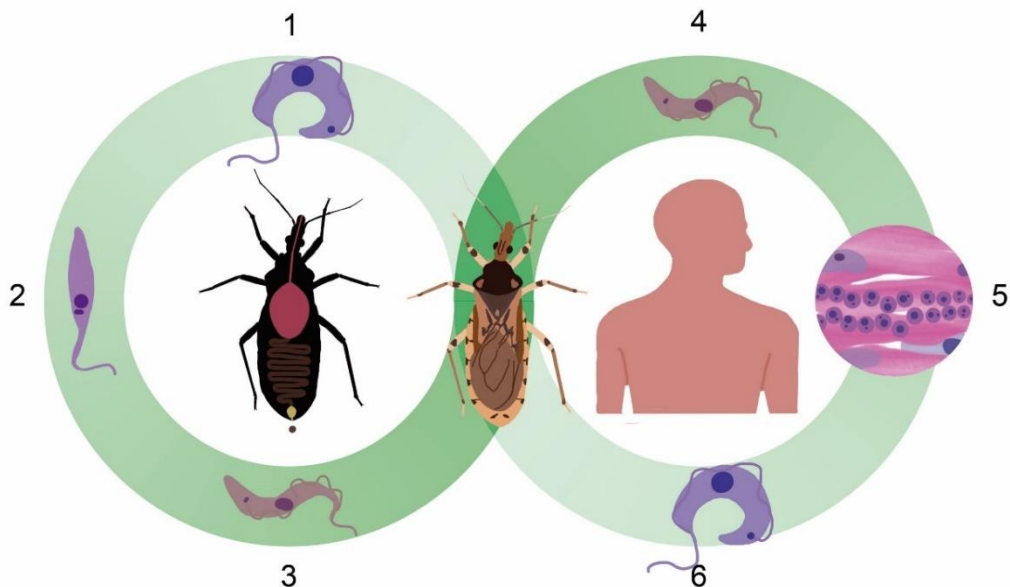
O *T. cruzi* é heteroxênico e apresenta diferentes estágios de desenvolvimento ao longo do seu ciclo de vida que intercalam entre formas replicativas (amastigota e epimastigota) e não replicativas (tripomastigota sanguíneo e tripomastigota metacíclico) (DE LIMA; POUBEL; YUAN; ROSÓN *et al.*, 2020). A forma amastigota, é arredondada, não possui flagelo aparente, é intracelular e replicativa no hospedeiro vertebrado; a forma tripomastigota, possui um formato alongado e fusiforme, com surgimento do flagelo posterior ao núcleo, encontrada tanto na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (tripomastigotas sanguíneos), quanto no intestino posterior do triatomíneo (tripomastigotas metacíclicos), não replicativa, sendo estas formas as infectantes; e epimastigota, cujo formato também é alongado e é a forma replicativa encontrada no trato digestivo do vetor (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; TEIXEIRA; HECHT; GUIMARO; SOUSA *et al.*, 2011).

O ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia quando o triatomíneo infectado, no momento do repasto, suga uma grande quantidade de sangue de um hospedeiro mamífero, e durante este processo ocorre a defecação, momento no qual são liberados os tripomastigotas metacíclicos do reto do inseto. Estes parasitas entram em contato com

a lesão no local da picada ou através da mucosa e penetram no hospedeiro vertebrado. Neste, estes parasitas invadem as células (macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, entre outras) e se diferenciam em um estágio replicativo, a forma amastigota, que após sucessivos processos de divisão celular, se diferenciam em epimastigotas intracelulares, em seguida em tripomastigotas, que rompem a célula infectada. Esta forma, tem capacidade de invadir novas células ou invadir a corrente sanguínea, disseminando para outros tecidos, ou podem ser ingeridos novamente por um triatomíneo no momento do seu repasto (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; MARCHESI; NASCIMENTO; DAMASCENO; BRINGAUD *et al.*, 2018; MELO; GUARNERI; SILBER, 2020). Dentro do inseto, ocorre uma nova diferenciação da forma do parasita. A descrição clássica sobre esta diferenciação, feita por Chagas (1909) diz que, os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam em epimastigotas no estômago e depois, passam por sucessivos processos de multiplicação no intestino até atingirem o reto e se diferenciarem em tripomastigotas metacíclicos. Entretanto, este processo não ocorre exatamente assim, pois os tripomastigotas sanguíneos, quando chegam ao estômago do inseto, encontram um local inóspito e a população é reduzida drasticamente num período de 24h por lise celular (CASTRO; SEABRA; GARCIA; SOUZA *et al.*, 2007; DIAS; GUERRA; VIEIRA; PERDOMO *et al.*, 2015). Durante este intervalo, os indivíduos que restaram, se diferenciam em formas intermediárias semelhantes a amastigotas (esferomastigota), ou em epimastigotas. Estas formas migram para o intestino, onde começam o processo de replicação, se dividem intensamente e se fixam nas células intestinais (ALVES; ALBUQUERQUE-CUNHA; MELLO; GARCIA *et al.*, 2007; GUARNERI; LORENZO, 2017; NOGUEIRA; GONZALEZ; GOMES; DE SOUZA *et al.*, 2007). Esta etapa de adesão nas células intestinais parece ser essencial para desencadear a transformação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, que são altamente infecciosos para os mamíferos. Estes já se encontram na porção final do intestino, mais próximo ao reto e acabam se despreendendo sendo liberados junto às fezes e urina, dando continuidade ao ciclo, caso entre em contato com a lesão ou com a mucosa do hospedeiro vertebrado (Figura 1) (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; GARCIA; RATCLIFFE; WHITTEN; GONZALEZ *et al.*, 2007; MELO; GUARNERI; SILBER, 2020). A intensidade da infecção por *T. cruzi* varia, conforme a cepa e a espécie de triatomíneo, sendo considerada uma interação espécie-específica, além de somar aos fatores

intrínsecos presentes no hospedeiro vertebrado (MELO; GUARNERI; SILBER, 2020; SCHAUB; MEISER; BALCZUN, 2011)

Figura 1 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. O ciclo se inicia quando o triatomíneo realiza o repasto em um mamífero infectado e ingere as formas tripomastigotas sanguíneas (1). Ao alcançar o intestino médio, essas formas se diferenciam em epimastigotas (2) e colonizam o intestino do inseto, até que migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (3). Ao realizar um novo repasto, o triatomíneo defeca enquanto se alimenta ou após a alimentação, e nas suas fezes se encontram os tripomastigotas metacíclicos (4). Estes, ao atingirem a corrente sanguínea, podem infectar a maioria dos tipos celulares do hospedeiro vertebrado. Uma vez que infectam uma célula, se diferenciam em amastigotas (5), os quais se dividem por divisão binária, se diferenciam novamente em tripomastigotas sanguíneos (6), e lisam a célula, atingindo a corrente sanguínea podendo infectar outras células, ou serem ingeridos pelo triatomíneo, recomeçando o ciclo.



Fonte: Esta tese.

1.2. Triatomíneos, os vetores da doença de Chagas

1.2.1. Os triatomíneos, sua diversidade e distribuição

Os triatomíneos são ectoparasitas, artrópodes da ordem Hemiptera e da família Reduviidae, são hemimetábolos, apresentando 5 estágios de ninfa até chegarem a fase adulta (Figura 2) (GURGEL-GONÇALVES; GALVÃO; COSTA; PETERSON, 2012; JURBERG; GALVAO, 2006). Em ambiente silvestre, é comum encontrá-los em tocas de aves e mamíferos, palmeiras, arbustos, pedras onde vivem associados a diferentes animais como: morcegos, aves, tatus, gambás, entre outros (GURGEL-

GONÇALVES; GALVÃO; COSTA; PETERSON, 2012; GURGEL-GONÇALVES; GLAVÃO; MENDONÇA; NETO, 2012).

Estes insetos estão amplamente distribuídos no Brasil e em outros países do continente americano. Algumas espécies também podem ser encontradas em outros continentes como Ásia e Oceania, são espécies do gênero *Linschcosteus* e alguns representantes do gênero *Triatoma* (GALVÃO; GURGEL-GONÇALVES, 2014; VIEIRA; PRAÇA; BENTES; SANTIAGO *et al.*, 2018). Devido a hematofagia, todas as espécies de barbeiros são potenciais vetores da Doença de Chagas ao longo da sua área de distribuição, uma vez em contato com o parasito teriam a capacidade de transmiti-lo (OTÁLORA-LUNA; PÉREZ-SÁNCHEZ; SANDOVAL; ALDANA, 2015). Até o momento, existem 154 espécies descritas, agrupadas em 17 gêneros organizados em 5 tribos (Tabela 1) (DE OLIVEIRA; ALEVI; CAMARGO; DE OLIVEIRA MENEGUETTI, 2020; VIEIRA; PRAÇA; BENTES; SANTIAGO *et al.*, 2018). Existem cerca de 95 espécies que possuem importância epidemiológica na transmissão da Doença de Chagas, pois são aquelas que colonizam o peridomicílio e/ou domicílio (VALENTE, 2011; VIEIRA; PRAÇA; BENTES; SANTIAGO *et al.*, 2018). Esta classificação é feita conforme o comportamento de cada espécie em relação a invasão e colonização de ambientes, sendo assim, espécies silvestres são aquelas que vivem em ambientes naturais, estando associadas diretamente a animais silvestres; espécies semi-domiciliadas, são aquelas que já colonizam o peridomicílio e com uma certa frequência são encontradas dentro dos domicílios e espécies domiciliadas, são aquelas que são encontradas frequentemente dentro das casas e praticamente não são mais encontradas em ambiente natural (PAHO, 2016).

Analisando este aspecto, os gêneros de maior importância epidemiológica são: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. No Brasil, espalhado por todo seu território, temos em torno de 68 espécies, destas mais da metade são endêmicas (MADEIRA; DOS REIS; DE FREITAS BITTINELLI; DELGADO *et al.*, 2019). Dentre estes gêneros citados, a espécie *Triatoma sordida* é um exemplo de vetor em potencial da Doença de Chagas no Brasil, isso quer dizer, que além da sua capacidade de transmissão do *T. cruzi* que é comum a todos os barbeiros, este, já é encontrado em domicílio e/ou peridomicílio, demonstrando sua competência vetorial (FORATTINI, 2006; FORATTINI; ROCHA E SILVA; FERREIRA; RABELLO *et al.*, 1971; GALVÃO, 2014; MADEIRA; DOS REIS; DE FREITAS BITTINELLI; DELGADO *et al.*, 2019; SILVA; SAMPAIO; POLONI; KOYANAGUI *et al.*, 2004)

Tabela 1 – Tribos e os gêneros dos triatomíneos.

Tribos	Gêneros
Aberproseniini	<i>Alberprosenia</i>
Bolboderini	<i>Bolbodera, Microtriatoma, Parabelminus e Belminus</i>
Cavernicolini	<i>Cavernicola</i>
Rhodiniini	<i>Psammolestes e Rhodnius</i>
Triatomini	<i>Dipetalogaster, Eratyrus, Hermanlenticia, Lishcosteus, Mepraia, Nesotriatoma, Panstrongylus, Paratriatoma e Triatoma</i>

1.2.2. *Triatoma sordida*

O *T. sordida* é endêmico no Brasil, característico do bioma Cerrado, onde o clima é quente e seco (Figura 2) (FORATTINI, 1980). É encontrado nos estados do Piauí, Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Goiás, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Acre, Tocantins e São Paulo (Figura 3) (DE OLIVEIRA; ALEVI; CAMARGO; DE OLIVEIRA MENEGUETTI, 2020; DIOTAIUTI; AZEREDO; BUSEK; FERNANDES, 1998; GALVÃO, 2014; GALVÃO; CARCAVALLO; ROCHA; JURBERG, 2003; GURGEL-GONÇALVES; GALVÃO; COSTA; PETERSON, 2012; PEREIRA; ALMEIDA; SOUSA; PAULA *et al.*, 2013; RAMOS; CASTRO; SOUZA; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SOUZA; RODRIGUES; ROCHA E SILVA, 1978). Esta espécie tem uma enorme capacidade de dispersão e devido a esta habilidade atingiu outras regiões do continente sul-americano, a hipótese é que o principal foco de endemismo seja no bioma Cerrado (FORATTINI, 1980). Fora do Brasil, sua presença é descrita na Bolívia, Argentina, Uruguai e Paraguai, região conhecida como Gran-Chaco (Figura 3) (PANZERA, F.; PITA, S.; NATTERO, J.; PANZERA, Y. *et al.*, 2015; SOUZA; RODRIGUES; ROCHA E SILVA, 1978).

Figura 2 – Ciclo biológico do *Triatoma sordida*. 1- Ovos em processo de embriogênese até a eclosão (ovo branco); 2- Ninfa de 1º estágio; 3- Ninfa de 2º estágio; 4- Ninfa de 3º estágio; 5- Ninfa de 4º estágio; 6- Ninfa de 5º estágio; 7- Fêmea adulta; e 8- Macho adulto.



Fonte: Esta tese.

Este amplo processo de dispersão, expõe a espécie a diferentes ambientes, condições e, portanto, pode ao longo do tempo passarem por processos evolutivos distintos, formando subcomplexos dentro desta espécie, até começar o processo de especiação (MADEIRA; DOS REIS; DE FREITAS BITTINELLI; DELGADO *et al.*, 2019). A hipótese inicial é que existiam 3 citótipos: *T. sordida sensu stricto* (s.s.), *T. sordida La Paz* e *T. sordida Argentina* (PANZERA, F.; PITA, S.; NATTERO, J.; PANZERA, Y. *et al.*, 2015). As espécies do subcomplexo *sordida* exibem o mesmo número diplóide, 22 cromossomos compostos de 20 autossomos mais os cromossomos sexuais XX/XY (PANZERA; HORNOS; PEREIRA; CESTAU *et al.*, 1997). A informação cariotípica foi descrita para espécimes brasileiras originalmente. Estudos recentes demonstraram que o *T. sordida* apresenta diferenças genotípicas e fenotípicas entre as populações da Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil (BELINTANI;

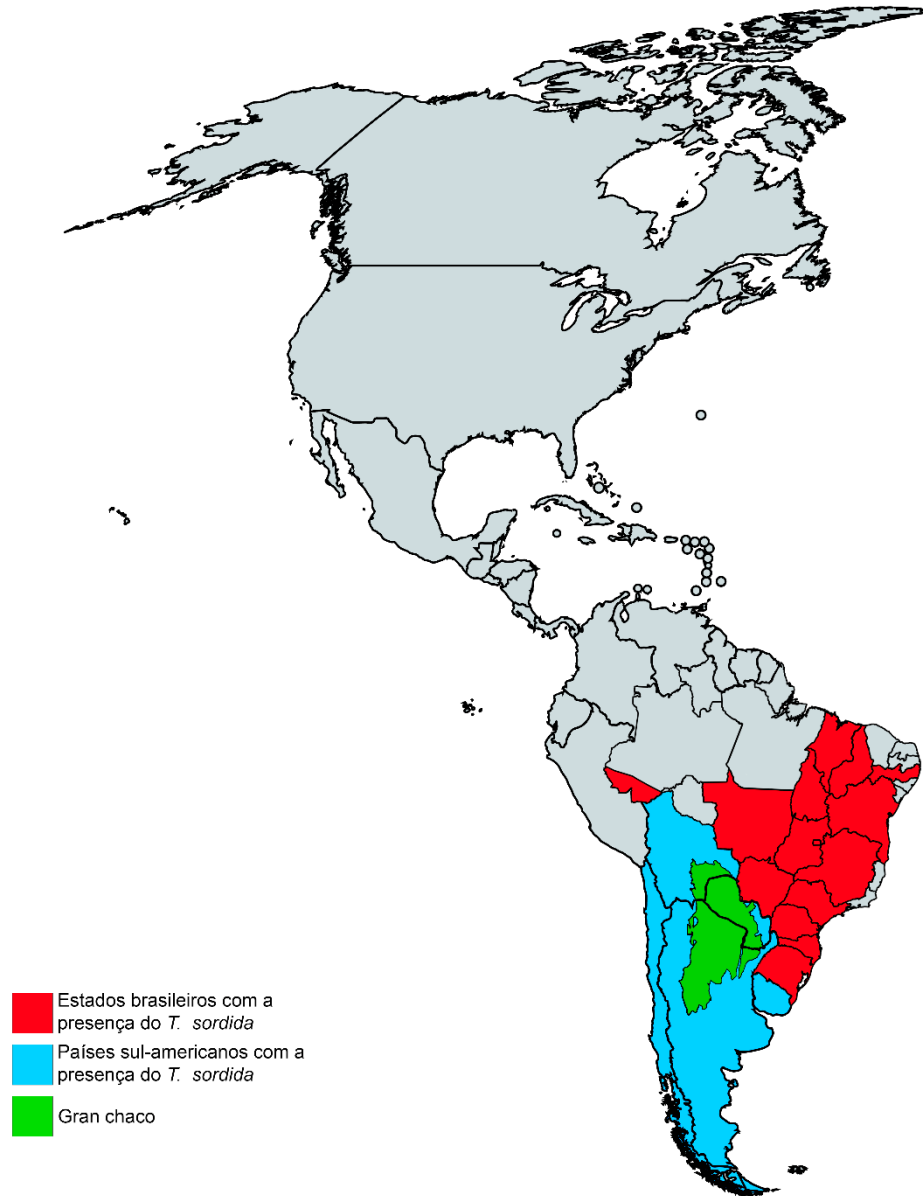
OLIVEIRA; PINOTTI; SILVA *et al.*, 2020; NATTERO; PICCINALI; LOPES; HERNÁNDEZ *et al.*, 2017; NOIREAU; GUTIERREZ; ZEGARRA; FLORES *et al.*, 1998; NOIREAU; ZEGARRA; ORDOÑEZ; GUTIERREZ *et al.*, 1999; PANZERA; HORNOS; PEREIRA; CESTAU *et al.*, 1997). Foi demonstrado que o citótipo *T. sordida Argentina* é uma nova espécie, *Triatoma rosai*, e que os citótipos *T. sordida s.s.* e *T. sordida La Paz* são apenas uma variação, polimorfismo cromossomal, já que estas se reconhecem sexualmente e apresentam descendentes férteis (ALEVI; DE OLIVEIRA; GARCIA; CRISTAL *et al.*, 2020; MADEIRA; DELGADO; BITTINELLI; DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). No Brasil, não há diferenças morfológicas e moleculares entre as populações dos diferentes estados onde é encontrado, demonstra uma baixa variabilidade genética entre elas (BELINTANI; OLIVEIRA; PINOTTI; SILVA *et al.*, 2020; MADEIRA; DELGADO; DE FREITAS BITTINELLI; SARTORI *et al.*, 2020; MADEIRA; DOS REIS; DE FREITAS BITTINELLI; DELGADO *et al.*, 2019). A baixa variabilidade genética entre as populações do Brasil pode ser explicada pelo isolamento geográfico entre as populações vizinhas, colônias pequenas e por isso restringindo o fluxo gênico, ciclo de vida longo dos indivíduos da colônia e o uso contínuo de inseticidas para controle vetorial (MADEIRA; DOS REIS; DE FREITAS BITTINELLI; DELGADO *et al.*, 2019; PESSOA; SOUSA; SONODA; DIOTAIUTI, 2016). Portanto, o processo de especiação é sugerido entre as populações encontradas em cada país onde o *T. sordida* está presente (NATTERO; PITA; CALLEROS; CROCCO *et al.*, 2016; PANZERA, FRANCISCO; PITA, SEBASTIÁN; NATTERO, JULIETA; PANZERA, YANINA *et al.*, 2015; PITA; LORITE; NATTERO; GALVÃO *et al.*, 2016).

Em ambiente silvestre, é encontrado principalmente sob cascas de árvores vivas ou mortas, troncos de palmeiras, associado com aves (GUARNERI, ALESSANDRA A; PEREIRA, MARCOS H; DIOTAIUTI, LILÉIA, 2000; LENT; WYGODZINSKY, 1979). Em ambientes artificiais, coloniza principalmente o peridomicílio de casas, sendo comum encontra-los em galinheiros (DIOTAIUTI; LOIOLA; FALCÃO; DIAS, 1993). Já foi descrito em processo de domiciliação em alguns estados brasileiros (DUARTE; PEREIRA; MARTINS; MEDEIROS *et al.*, 2017; FORATTINI; ROCHA E SILVA; FERREIRA; RABELLO *et al.*, 1971). Sendo mais comum a captura nas condições peridomiciliar e domiciliar no nordeste do estado de São Paulo, no estado de Goiás e Mato Grosso (DUARTE; PEREIRA; MARTINS; MEDEIROS *et al.*, 2017; SANTALUCIA; A BEZERRA; A CIRINO; I AVILA *et al.*, 2015).

Por um longo período, esta espécie foi considerada de menor importância epidemiológica especialmente quando comparado com espécies como: *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*. Porém, com a tentativa de erradicação do *T. infestans*, e com alta atividade antrópica no meio ambiente, o número de notificações do *T. sordida* (adultos e ninfas) no intradomicílio tem aumentado, e isso se deve, pela perda do habitat somado a grande capacidade do *T. sordida* em ocupar espaços domiciliares, atraídos pela luz e se adaptar muito bem a eles formando colônias (BRAVO; VASCONCELOS; TAVARES; GRACHETE *et al.*, 2019; CROCCO; CATALÁ, 1996; MONTEIRO; ESCALANTE; BEARD, 2001; WALECKX; GOURBIÈRE; DUMONTEIL, 2015). Sendo assim, *T. sordida* tem ganhado espaço, se destacando como uma das espécies mais importantes epidemiologicamente nas regiões onde é encontrado (DUARTE; PEREIRA; MARTINS; MEDEIROS *et al.*, 2017).

Estudos demonstram que alterações no meio ambiente devido a ação antrópica corroboram fortemente para o processo de domiciliação de triatomíneos com hábitos silvestres e/ou semi domiciliados (BRAVO; VASCONCELOS; TAVARES; GRACHETE *et al.*, 2019; COURA, 2007; DE FIGUEIREDO; DA SILVA; BOLOGNEZ, 2007; DUARTE; PEREIRA; MARTINS; MEDEIROS *et al.*, 2017; FORATTINI, 1980). Apesar do *T. sordida* ter seu comportamento descrito como ornitófilico, sua preferência pelo ambiente intradomiciliar tem sido mostrada (BRAVO; VASCONCELOS; TAVARES; GRACHETE *et al.*, 2019; DUARTE; PEREIRA; MARTINS; MEDEIROS *et al.*, 2017) .

Figura 3 – Mapa de distribuição geográfica do *Triatoma sordida*.



Fonte: Esta tese.

1.2.3. A alimentação dos triatomíneos

Os triatomíneos são artrópodes hematófagos durante todo o seu ciclo de vida e, para garantir o sucesso do repasto, desenvolveram adaptações morfológicas e

moleculares. Dentre as morfológicas, o aparelho bucal se tornou altamente especializado, contendo: lábio ou probóscida, um par de mandíbulas serrilhadas e um par de maxilas longas e flexíveis. Essas estruturas formam o canal salivar, que leva a saliva para o sítio da alimentação e o canal alimentar, onde o sangue sugado pelo inseto passa durante o processo de repasto (LAVOPIERRE; DICKERSON; GORDON, 1959).

Por serem solenofágicos, no processo de alimentação, o inseto utiliza essas estruturas para perfuração da pele e para encontrar o vaso sanguíneo. Primeiro, o triatomíneo perfura a pele com as mandíbulas, introduz suas maxilas e inicia a busca ativa por um vaso sanguíneo através de movimentos oscilatórios constantes (LAVOPIERRE; DICKERSON; GORDON, 1959). Ao final da fase de sondagem, que se dá quando o inseto perfura o vaso sanguíneo, inicia-se o ingurgitamento, momento em que o triatomíneo suga o sangue e o transfere, através do canal alimentar, para o intestino anterior (estômago), onde é estocado. O bombeamento deste sangue é feito através de contrações dos músculos associados à bomba cibarial, que se encontra na cabeça do inseto. Quando os músculos contraem, geram uma pressão negativa no interior da câmara permitindo a sucção do sangue e, quando relaxados, a câmara se fecha e empurra o sangue para o intestino (BENNET-CLARK, 1963). Esse processo de contração e relaxamento, acontece sucessivas vezes com intervalos regulares. Durante todo o processo de repasto, ocorre a salivação.

O tempo de alimentação varia de espécie para espécie e do estágio de desenvolvimento do inseto, entre outras características do hospedeiro, podendo variar de poucos minutos a mais de uma hora (ARAUJO; GONTIJO; GUARNERI; GONTIJO *et al.*, 2011).

1.2.4. A saliva dos triatomíneos

Os triatomíneos, assim como outros artrópodes hematófagos, apresentam em sua saliva moléculas que facilitam o repasto, pois, ao tentarem se alimentar, desencadeiam repostas fisiológicas do hospedeiro que interferem na obtenção do sangue, como a hemostasia, a reação inflamatória e a resposta imune (Figura 4) (GUARNERI, A. A.; PEREIRA, M. H.; DIOTAIUTI, L., 2000; RIBEIRO, J., 1995; RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M., 2003; SANT'ANNA; DIOTAIUTI; DE FIGUEIREDO GONTIJO; DE FIGUEIREDO GONTIJO *et al.*, 2001). Esta interação entre a saliva do inseto e o hospedeiro é de uma enorme complexidade e os

responsáveis por manter o sangue fluído e modular o sistema imune do hospedeiro durante este processo são as moléculas bioativas presentes na saliva (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020). Algumas destas moléculas farmacologicamente ativas já foram descritas como: anticoagulantes; vasodilatadores; anti-agregadores plaquetários para agregação induzida por diferentes agonistas (colágeno, adenosina difosfato (ADP), ácido araquidônico e trombina); anti-histamínicos; bloqueadores de canal de sódio; anestésicos; entre outras (ANDERSEN; GUDDERRA; FRANCISCHETTI; RIBEIRO, 2005; CHAMPAGNE, 2005; DE ARAÚJO; BUSSACOS; SOUSA; HECHT *et al.*, 2012; RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M., 2003; RIBEIRO, J. M. C., 1995).

Estes compostos, além de contraporem a hemostasia do hospedeiro, podem modular sua resposta imunológica, contribuindo para a transmissão do *T. cruzi*. Um estudo demonstrou que a saliva de *R. prolixus* induz a quimiotaxia de células inflamatórias e resultou no aumento da parasitemia cerca de seis vezes (MESQUITA; CARNEIRO; BAFICA; GAZOS-LOPES *et al.*, 2008). A diversidade e abundância dessas moléculas podem variar de uma espécie para outra (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008b; SANTOS, A.; RIBEIRO, J. M. C.; LEHANE, M. J.; GONTIJO, N. F. *et al.*, 2007).

Figura 4 – *Triatoma infestans* adulto salivando.



Fonte: Esta tese.

1.3. Hemostasia do hospedeiro

A hemostasia é um processo que compreende interações complexas entre vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas da coagulação e o sistema fibrinolítico que juntos levam a formação do coágulo sanguíneo a fim de conter a lesão no sistema vascular. Portanto, é definido como hemostasia, a resposta fisiológica do hospedeiro para evitar a perda sanguínea quando há uma lesão neste sistema (GARCÍA; ANDREU; BERNALTIRAPO; HERRERO, 2019; KULKARNI; DOPHEIDE; YAP; RAVANAT *et al.*, 2000; MORELLI, 2004). Esta resposta é formada por 3 grandes eventos que acontecem de forma simultânea sendo eles: vasoconstrição, agregação plaquetária e coagulação sanguínea que tem por função o reparo da lesão vascular e assim minimizar a perda de sangue (KULKARNI; DOPHEIDE; YAP; RAVANAT *et al.*, 2000; MORELLI, 2004; RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012).

A vasoconstrição é a resposta contrátil do vaso onde ocorreu a lesão, resultando na diminuição do calibre e por consequência na redução do fluxo sanguíneo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010; RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. J. A. R. O. E., 2003). Quando um vaso é danificado, as plaquetas são recrutadas e aderem ao sítio da lesão e formam um aglomerado que serve para conter o fluxo de sangue. A agregação plaquetária é um evento dinâmico dividido basicamente em 3 etapas: Na iniciação, as plaquetas se aderem ao local da lesão, formando uma película de células plaquetárias; na extensão, ocorre o recrutamento e a ativação de plaquetas adicionais formando o tampão plaquetário; e na estabilização, ocorre a deposição da fibrina sobre o tampão plaquetário, formando o coágulo sanguíneo (VERSTEEG; HEEMSKERK; LEVI; REITSMA, 2013).

A coagulação sanguínea é complexa e dependente da ativação de uma cascata de moléculas que culmina na conversão do fibrinogênio em fibrina para que ocorra a formação do coágulo. Este processo também é dividido em 3 etapas sendo elas: iniciação, amplificação e propagação. Com o rompimento da vasculatura, as células subendoteliais (células musculares lisas e fibroblastos) expõem o fator tecidual (FT) a corrente sanguínea dando início à primeira fase. O FT se liga e atua como um cofator do fator VII (FVII), ativando sua proteólise e conversão para FVII ativado (FVIIa) e formam um complexo. Este complexo FT/FVIIa cliva os fatores IX e X, convertendo-os para a forma ativada, FIXa e FXa. O FXa se junta ao FVa para formar o complexo protrombinase (MONROE; HOFFMAN, 2006), que é responsável por converter a

protrombina (FII) em trombina, então, o FV é ativado pelo FXa. Pode ocorrer a dissociação do FXa da célula que estiver expondo o FT para formar a protrombinase nas membranas celulares de células mais distantes (GILBERT; SIMS; WIEDMER; FURIE *et al.*, 1991; MARDER; AIRD; BENNETT; SCHULMAN *et al.*, 2012). Para diminuir essa difusão, no plasma existem alguns peptídeos que são inibidores de serino proteases (JESTY, 1978).

A etapa de amplificação é onde ocorre a ativação das plaquetas que estão aderidas ao sítio da lesão, através da trombina, ocorre a conversão do FV em FVa, que é responsável pela amplificação da atividade protrombinase na superfície das plaquetas, que irá converter o FVIII em FVIIIa, um cofator de FIXa, gerando mais FXa que por sua vez irá converter FXI em FXIa (VERSTEEG; HEEMSKERK; LEVI; REITSMA, 2013) Na etapa de propagação, FXIa converte FIX em FIXa, que irá se associar com o FVIIIa para catalisar a conversão de FX em FXa; o complexo formado por FXa/FVa produz a trombina, que irá converter o fibrinogênio em fibras de fibrina (ARIËNS; LAI; WEISEL; GREENBERG *et al.*, 2002). O FXIIIa catalisa a formação das ligações covalentes entre as cadeias de fibrina para dar origem ao coágulo sanguíneo (ARIËNS; LAI; WEISEL; GREENBERG *et al.*, 2002).

Qualquer falha que ocorra neste complexo sistema, ocorre um desequilíbrio que compromete o reparo da injúria tecidual, gerando hemorragia (perda excessiva de sangue) como também pode ocorrer a formação de trombos, que impedem o suprimento de sangue nos tecidos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

1.4. Sequenciamento do tipo RNA-seq e espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS

Maxam, Gilbert e Frederik Sanger (1977) foram os pioneiros no desenvolvimento do sequenciamento, a princípio com interesse na molécula de DNA. A metodologia de Sanger se tornou mais popular, por ser usada em diversos centros de pesquisas, levando a uma série de descobertas no meio científico. Ainda hoje é utilizada, porém, é mais indicada para organismos que sejam pequenos ou para fragmentos de DNA que foram amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Estas metodologias são conhecidas como “Sequenciamento de 1ª geração”, isso porque existe uma limitação da técnica, onde é possível sequenciar de forma eficaz apenas pequenas sequências entre 500-900 pares de bases (pb)

processando poucos fragmentos por vez (MAXAM; GILBERT, 1977; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Devido a estas limitações, nos anos 2000 foram desenvolvidos novos métodos de sequenciamento utilizados tanto para a molécula de DNA como para de RNA. Estas novas metodologias passaram a ser conhecidas como técnicas de sequenciamento de 2ª geração (*Next- Generation Sequencing – NGS*) ou Sequenciamento Massivo em Paralelo (*Massive ou Massively Parallel sequencing*) ou ainda Sequenciamento de alta performance (*High-throughput sequencing*). Com o NGS é possível sequenciar fragmentos curtos (50- 300 pb) o que não era possível nas técnicas anteriores. Além disso, permite sequenciar de forma muito mais rápida, pois é possível ler milhões de fragmentos ao mesmo tempo, é mais eficaz e barata quando comparado com a metodologia Sanger, conseqüentemente, o NGS mudou a dinâmica das pesquisas que o utilizam (MALJKOVIC BERRY; MELENDREZ; BISHOP-LILLY; RUTVISUTTINUNT *et al.*, 2020; METZKER, 2010).

Existem diversos equipamentos/plataformas para a realização do NGS, eles se diferenciam na tecnologia e metodologia de sequenciamento, podemos citar como exemplos: Roche/454, *Ion torrent*, *SOLid* e *Illumina*. A escolha do tipo de sequenciamento, depende do objetivo do estudo. A plataforma *Illumina*, é uma das mais populares quando se fala de NGS, pois tem capacidade de fazer grandes sequenciamentos com alta qualidade por um valor mais acessível e esta foi a utilizada neste trabalho (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Ela é baseada em uma técnica conhecida como “amplificação em ponte”, em que as moléculas de DNA (~500pb) com adaptadores apropriados ligados em cada extremidade são usadas como substratos para as reações de síntese em uma lâmina de vidro que contém sequências de oligonucleotídeos complementares ao adaptador ligado. Os oligonucleotídeos na lâmina são espaçados de modo que o DNA, que é então submetido a rodadas repetidas de amplificação, crie “agrupamentos” clonais que consistem em cerca de 1000 cópias de cada fragmento de oligonucleotídeo. Cada lâmina de vidro pode suportar milhões de reações de agrupamento paralelas. Durante as reações de síntese, nucleotídeos modificados proprietários, correspondentes a cada uma das quatro bases, cada uma com um marcador fluorescente diferente, são incorporados e então detectados. Os nucleotídeos também atuam como terminadores de síntese para cada reação, que são desbloqueados após a detecção para a próxima rodada de síntese. As reações são repetidas por 300 ou mais rodadas. O uso de detecção

fluorescente aumenta a velocidade de detecção devido à imagem direta (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018)

O sequenciamento Illumina permite a realização de uma variedade de protocolos, incluindo *RNA sequencing* (RNA-seq). RNA-seq é o termo adotado para se referir à análise transcriptômica, esta técnica é conhecida por sequenciar a molécula de RNA como o próprio nome diz ou o conjunto de transcritos de um determinado organismo em uma determinada condição e/ou estágio de desenvolvimento. Existem 2 formas de análise, a *Reference guided* que consiste na análise com um genoma de referência onde as sequências curtas de leitura (*reads*) são alinhadas contra o genoma do organismo, e a *De novo* que é utilizada quando não há um genoma de referência. Neste caso, geralmente são organismos eucarióticos não modelos. Sendo assim, as *reads* geradas são montadas em sequências consenso (*contigs* ou CDS) e estes são montados e analisados com ajuda da bioinformática, utilizando algoritmos, dados públicos para as anotações e alguns softwares para a classificação funcional (MALJKOVIC BERRY; MELENDREZ; BISHOP-LILLY; RUTVISUTTINUNT *et al.*, 2020).

Através destes dados é possível entender diferentes processos biológicos que estão sendo modulados naquele organismo e naquela determinada condição, como por exemplo o nível de expressão dos genes, alto (*up-regulated*) ou baixo (*down-regulated*), qual é o perfil de expressão destes transcritos ou como um organismo responde quando em contato com um fármaco, com aumento do stress ou qualquer outra condição delineada na pesquisa (MALJKOVIC BERRY; MELENDREZ; BISHOP-LILLY; RUTVISUTTINUNT *et al.*, 2020).

Em algumas pesquisas, o RNA-seq é somado ao proteoma, como é o caso dos sialomas (análise transcriptômica e proteômica da saliva) de artrópodes hematófagos. O proteoma é definido, como o conjunto de proteínas que estão sendo expressas por um organismo, tecido ou célula em um momento específico. Para que esta metodologia seja realizada, é necessário utilizar de técnicas de separação e identificação, como por exemplo, eletroforese, em especial a bidimensional (2D), cromatografia, espectrometria de massas e a bioinformática (HEIN; SHARMA; COX; MANN, 2013). A soma destas duas metodologias (análise transcriptômica e proteômica) no estudo dos sialomas, tem sido esclarecedora, já que respondem a várias perguntas que ajudam a entender melhor a biologia dos vetores, se tornando um complemento, uma vez que temos os transcritos identificados e as proteínas que

são realmente expressas naquela determinada condição (BENSIMON; HECK; AEBERSOLD, 2012; ZHANG; FONSLow; SHAN; BAEK *et al.*, 2013). Porém, há uma lacuna, quando se trata da correlação entre os níveis de expressão das proteínas encontradas no proteoma e o nível de RNA mensageiro (RNAm) encontrado no transcriptoma. Esta falta de correlação entre os dados pode ser justificada por alguns eventos como *splicing* alternativo e degradação (GHAZALPOUR; BENNETT; PETYUK; OROZCO *et al.*, 2011).

A identificação de proteínas, assim como a identificação de transcritos, também requer ferramentas analíticas com alta resolução, sensibilidade e seletividade (POMASTOWSKI; BUSZEWSKI, 2014). Existem 2 abordagens principais, em uma delas as proteínas do extrato total são pré-fracionadas por meio da eletroforese onde as bandas de interesse são excisadas e tratadas antes de irem para o espectrômetro de massas para a identificação e/ou caracterização. A outra estratégia é conhecida como *shotgun proteomics* que pode ser de 2 tipos: *Top down* onde as proteínas não são digeridas previamente para serem analisadas, ou seja as proteínas estão intactas e a *bottom up*, em que o extrato total proteico é digerido de forma química ou enzimática (que foi utilizada neste trabalho) antes de ser submetido à análise. Ambos os tipos são analisados por cromatografia líquida multidimensional, acoplada ao espectrômetro de massas (BRAGA EMIDIO; GIRARDI CARPANEZ; RAMOS QUELLIS; SILVA FARANI *et al.*, 2016; CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014; MALLICK; KUSTER, 2010; MCDONALD; YATES, 2003; YATES, 2004; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009; ZHANG; FONSLow; SHAN; BAEK *et al.*, 2013).

Assim como o sequenciamento a espectrometria de massas já existe há muitos anos e evoluiu ao longo do tempo. Historicamente, dois pesquisadores foram pioneiros nesta área ao final dos anos 1890 Sir. J.J. Thompson, foi o responsável pela determinação da razão massa/carga (m/z) dos elétrons, e o pesquisador Wien, estudou a deflexão magnética dos raios anódicos e confirmou que os raios eram carregados positivamente ou negativamente. Ambos receberam o prêmio Nobel por suas descobertas em 1906 e 1911, respectivamente (TANAKA; WAKI; YUTAKA; AKITA *et al.*, 1988; THOMPSON; THOMSON, 1913).

A partir destas descobertas surgiram as técnicas de ionização branda, que mantém parcialmente ou totalmente intacta a estrutura primária da cadeia polipeptídica. Como exemplo podemos citar a ionização eletrospray (ESI/MS) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), técnicas capazes de

transformar macromoléculas em íons. A diferença é que a ESI/MS tende a produzir espécies multicarregadas para proteínas e peptídeos, isto é possível pois a amostra é misturada a um solvente iônico e volátil, que após a sua evaporação os deixam ionizados e na forma gasosa. Já a MALDI produz íons monocarregados, neste caso, a amostra é misturada a uma matriz orgânica em uma placa metálica e submetida a incidência de um laser para a ionização (FENN; MANN; MENG; WONG *et al.*, 1989; GLISH; VACHET, 2003; TANAKA; WAKI; YUTAKA; AKITA *et al.*, 1988; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009). ESI/MS é uma das técnicas mais utilizadas pois tem alta sensibilidade, seletividade e precisa de pouca amostra, sendo comumente escolhida para análise de proteínas e ácidos nucleicos (HECK; VAN DEN HEUVEL, 2004).

Existem diversos analisadores de massas, estes têm como função realizar a separação dos íons que foram gerados através da razão massa/carga (m/z) e estes se diferenciam pelo princípio da medição destes íons (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; HECK; VAN DEN HEUVEL, 2004). No analisador TOF MS a separação é feita baseada no tempo de voo e na velocidade dentro do tubo de voo, no Quadrupolo MS a separação é feita através dos campos elétricos gerado por hastes metálicas e no Aprisionamento de íons (*Ion – trapping*), há a separação seletiva de íons em um campo (magnético ou eletrodinâmico) de aprisionamento (BRAGA EMIDIO; GIRARDI CARPANEZ; RAMOS QUELLIS; SILVA FARANI *et al.*, 2016; GLISH; VACHET, 2003). É importante ressaltar que para algumas análises como estruturas e sequenciamento de peptídeos, duas etapas MS podem ser realizadas em sequência, utilizando o mesmo princípio de separação duas vezes ou a combinação de dois tipos diferentes (MCLAFFERTY FRED, 1981) sendo chamada de espectrometria de massas sequencial (*tandem MS/MS*). Para realização de análises deste tipo, é essencial o emprego de equipamentos específicos. Neste trabalho foi utilizado o analisador de massas do tipo Orbitrap, que é considerado um dos mais novos analisadores (MAKAROV, 2000)

A espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS, é uma técnica analítica que mede massa/carga (m/z) de compostos que foram ionizados e para a identificação dos peptídeos, existem 2 condições obrigatórias: os peptídeos devem estar ionizados, carregados positivamente ou negativamente, e na forma gasosa (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009). O resultado é processado, com ajuda de softwares e de bancos de dados públicos.

Portanto, a tecnologia de sequenciamento somada a espectrometria de massas tem se tornado uma abordagem interessante e frequente, já que juntas, são complementares, em especial em trabalhos bioquímicos e de biologia molecular (BENSIMON; HECK; AEBERSOLD, 2012; BRAGA EMIDIO; GIRARDI CARPANEZ; RAMOS QUELLIS; SILVA FARANI *et al.*, 2016; ZHANG; FONSLow; SHAN; BAEK *et al.*, 2013)

1.5. Sialoma de triatomíneos

Os estudos sobre os triatomíneos atraem os pesquisadores há décadas, desde a descoberta da Doença de Chagas. Com intuito de entender os processos que envolviam a transmissão do parasito e como funcionava a alimentação destes insetos, estudos utilizando a saliva e as glândulas salivares passaram a ser realizados. Conforme as pesquisas iam avançando e trazendo novos resultados, baseados em metodologias mais robustas e atuais, foi percebido o potencial biotecnológico presente na saliva destes artrópodes.

As análises transcriptômica e proteômica são estratégias que têm sido utilizadas para identificar estas moléculas presentes na saliva e nas glândulas salivares dos triatomíneos. O termo “*sialo*” vem do grego e indica relação com saliva ou glândula salivar. Como a soma destas técnicas, geraram resultados satisfatórios, é comum encontrá-las juntas numa pesquisa, os chamados sialomas. Os estudos de sialomas passaram a ser mais frequentes nas diferentes espécies de artrópodes hematófagos, devido ao interesse na identificação destas proteínas, bioprospecção de moléculas com potencial farmacêutico, para fins de posterior desenvolvimento de medicamentos, bem como métodos mais efetivos para o controle vetorial e para entender melhor as relações entre vetor, parasito e hospedeiro (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020).

Algumas espécies de triatomíneos já têm seu sialoma descrito, são elas: *T. infestans* (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008a), *Triatoma dimidiata* (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; CORDEIRO *et al.*, 2018), *Triatoma pallidipennis* (HERNÁNDEZ-VARGAS; GIL; LOZANO; PEDRAZA-ESCALONA *et al.*, 2017), *Rhodnius neglectus* (SANTIAGO, P. B.; ASSUMPÇÃO, T. C. F.; DE ARAÚJO, C. N.; BASTOS, I. M. D. *et al.*, 2016), *Panstrongylus megistus* (BUSSACOS; NAKAYASU; HECHT; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011), *Dipetalogaster maxima* (ASSUMPÇÃO, T. C. F.;

CHARNEAU, S.; SANTIAGO, P. B. M.; FRANCISCHETTI, I. M. B. *et al.*, 2011). Outras espécies possuem só uma das metodologias temos: *T. infestans* (CHARNEAU; JUNQUEIRA; COSTA; PIRES *et al.*, 2007), *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius robustus* (COSTA; SOUSA; RICART; SANTANA *et al.*, 2011), *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lectularia* e *Panstrongylus herreri* (MONTANDON; BARROS; VIDIGAL; MENDES *et al.*, 2016) com apenas o sialoproteoma. Já *Triatoma brasiliensis* (SANT'ANNA; ARAÚJO; PEREIRA; PESQUERO *et al.*, 2002; SANTOS, ADRIANA; RIBEIRO, JOSÉ MARCOS C.; LEHANE, MICHEL J.; GONTIJO, NELDER FIGUEIREDO *et al.*, 2007), *T. dimidiata* (KATO; JOCHIM; GOMEZ; SAKODA *et al.*, 2010), *Triatoma rubida* (RIBEIRO; ASSUMPÇÃO; PHAM; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012), *Triatoma matogrossensis* (ASSUMPÇÃO; EATON; PHAM; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012), *T. infestans* (SCHWARZ; MEDRANO-MERCADO; SCHAUB; STRUCHINER *et al.*, 2014), *Triatoma rubrofasciata* (MIZUSHIMA; TABBABI; YAMAMOTO; KATO, 2020), *Panstrongylus chinai* (KATO; JOCHIM; GOMEZ; TSUNEKAWA *et al.*, 2017), *P. megistus* (RIBEIRO, JOSÉ MC; SCHWARZ, ALEXANDRA; FRANCISCHETTI, IVO MB, 2015) e *Panstrongylus lignarius* (NEVOA; MENDES; DA SILVA; SOARES *et al.*, 2018) com apenas o sialotranscriptoma.

2. JUSTIFICATIVA

A hematofagia surgiu e evoluiu de forma independente em muitas espécies de artrópodes. Durante este processo, surgiram diversas adaptações, morfológicas, comportamentais e bioquímicas, que garantiram o sucesso do repasto e, por consequência, a sobrevivência das espécies. No caso de artrópodes hematófagos, a saliva, além de estar envolvida nos processos fisiológicos é um elemento de interação entre estes animais e seus hospedeiros vertebrados. Portanto, adquiriram uma grande diversidade de moléculas, que permitem contrapor as barreiras fisiológicas do hospedeiro, facilitando a aquisição de sangue. Para isso, atuam como moléculas anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Dentre estes artrópodes, se encontra o *T. sordida*, um triatomíneo, importante vetor da Doença de Chagas no Brasil.

As ciências Ômicas (Genômica, Transcriptômica, Proteômica, Metabolômica entre outras) permite compreender um organismo em nível sistêmico sob determinada condição, sendo uma ferramenta importante para a compreensão, descrição e bioprospecção de moléculas com potencial farmacológico. Estas técnicas têm trazido informações relevantes acerca do potencial biotecnológico presente na saliva e nas glândulas salivares de animais hematófagos, além de contribuírem para o entendimento da biologia destes animais.

Entender a biologia de vetores das doenças humanas, em especial das negligenciadas, é importante para compreender a dinâmica de interação parasito-vetor-hospedeiro, para traçar estratégias eficazes para o controle vetorial e para combater a doença em questão ou outras comorbidades com o desenvolvimento de medicamentos e/ou vacinas. Sendo assim, os triatomíneos possuem um potencial científico relevante para o desenho de moléculas terapêuticas e prevenção na transmissão de doenças por estes vetores. A descrição do sialoma do *T. sordida*, é importante pelo potencial farmacêutico, para a compreensão de sua da biologia e para saúde pública, uma vez que a partir destes dados podem ser desenvolvidas estratégias de combate específicas a este vetor nas regiões endêmicas. Vale ressaltar, que este estudo é pioneiro para esta espécie.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o perfil de expressão dos transcritos das glândulas salivares e identificar as proteínas do extrato salivar do *T. sordida*

3.2. Objetivos específicos

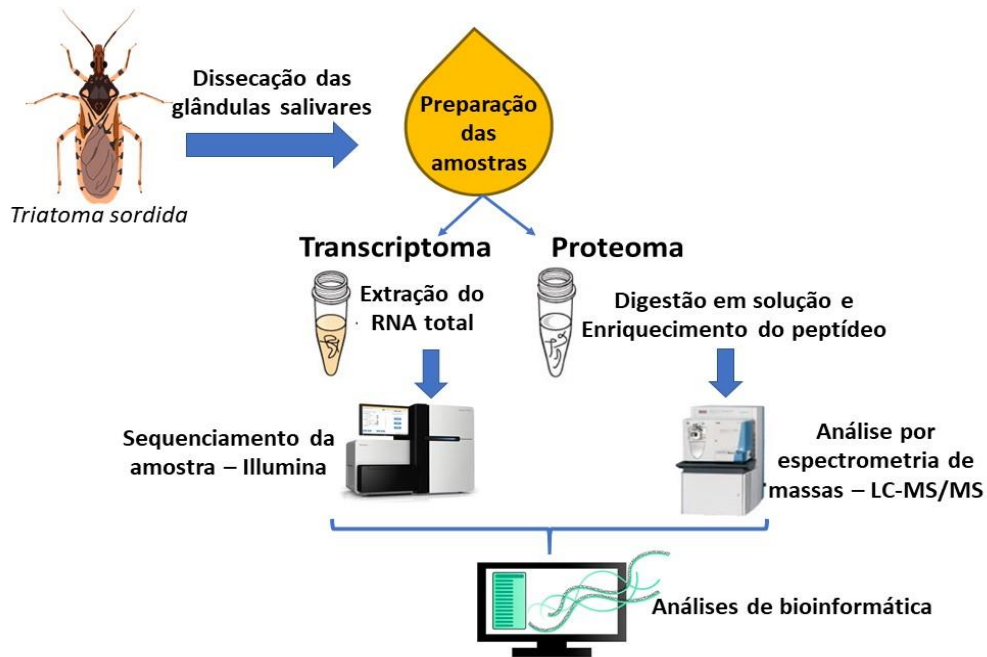
- Realizar a análise transcriptômica das glândulas salivares do *T. sordida* por meio do sequenciamento do tipo RNA-Seq;
- Realizar a análise proteômica da saliva do *T. sordida* por meio de espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS;
- Realizar a anotação funcional dos transcritos das glândulas salivares do *T. sordida*;
- Identificar as proteínas da saliva do *T. sordida* a partir das anotações funcionais do transcriptoma
- Interpretar os resultados obtidos com os dados já descritos na literatura para outras espécies de triatomíneos e outros animais hematófagos.

4. METODOLOGIA

4.1. Desenho experimental

A Figura 5 mostra a representação esquemática da metodologia empregada para realizar o estudo do sialoma do *T. sordida*.

Figura 5 – Resumo esquemático da metodologia utilizada.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.2. Triatomíneos

Duzentos e dezoito triatomíneos silvestres (adultos e ninfas) foram coletados nos municípios de Aurilândia e Itumbiara, nas localidades de Cadalzinha, Gaspar, Osvaldo Sumari, Olhos D'Água e Dr. Valdinino, em outubro de 2016. Os insetos foram encontrados no peridomicílio, em pocilgas, pilhas de tijolos e galinheiros. A coleta foi feita utilizando pinças e os insetos foram acondicionados em frascos de polietileno, cobertos com tecido de malha fina envolto por elástico na parte superior. Posteriormente, foram encaminhados para o biotério e doados pelo professor Dr. Ionizete Garcia da Silva, Universidade Federal de Goiás (UFG), para o Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro da Universidade de Brasília (LIPH-UnB).

Os triatomíneos foram mantidos em colônias no Insetário do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB (IB/UnB). No insetário, os insetos adultos e as ninfas de 1º a 5º estágios foram mantidos em câmaras climatizadas sob temperatura de 26

± 1°C e umidade relativa de 60-70 %, com ciclo de claro e escuro de 12/12h para desenvolvimento e acasalamento. Os triatomíneos foram alimentados quinzenalmente em aves (*Gallus domesticus*) em média por 30 minutos (CANAVOSO; RUBIOLO, 1995).

4.3. Extração das glândulas salivares e obtenção da saliva

A saliva dos triatomíneos foi obtida através da dissecação das glândulas salivares. A dissecação é feita com os insetos colocados em gelo, para que o metabolismo reduza e fiquem parados, com a ajuda de pinças e lupa, a cabeça do inseto é deslocada para o lado, para que as glândulas salivares fiquem aparentes, estas são lavadas com água milliQ e coletadas com ajuda de uma seringa. Para a análise transcriptômica, 50 pares de glândulas salivares (25 insetos) foram coletadas e adicionadas à parede de microtubos de 1,5 mL e perfuradas. Os microtubos continham 500 µL do reagente TRIzol® (Invitrogen, EUA) e foram mantidos a 4 °C até o fim da coleta. A amostra foi armazenada a -80 °C até o momento da extração do RNA total.

Para a análise proteômica, 50 pares de glândulas foram coletados em microtubos de 1,5 mL contendo um coquetel de inibidores de protease (Roche, USA), delicadamente perfuradas e mantidas em gelo até o término da coleta, que durou aproximadamente 35 minutos. Em seguida, a amostra foi submetida a centrifugação a 16.000 x g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante recolhido. As frações solúveis foram estocadas a -80 °C até o momento da análise proteômica.

4.4. Extração do RNA total e RNA-Seq

A extração do RNA total das glândulas salivares foi realizada utilizando o reagente TRIzol®, seguindo as instruções do fabricante. A amostra foi quantificada utilizando o Qubit 2,0 (Invitrogen, EUA). A integridade do RNA foi analisada através do equipamento 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) utilizando 1 µg da amostra (ANEXO A). A amostra foi colocada em *RNAstable* (Biomátrica, San Diego, EUA) seguindo as instruções do fabricante (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; CORDEIRO *et al.*, 2018).

A amostra foi enviada para sequenciamento do tipo RNA-seq, na plataforma NovaSeq150 pb, Illumina (Illumina, San Diego, CA, EUA) e geração de *reads paired-*

end com 150 nt de comprimento. A construção da biblioteca de cDNA foi feita utilizando o kit TruSeq® RNA, v2 (Illumina, San Diego, CA) seguindo as instruções do fabricante, feito pela empresa Macrogen.

4.5. Preparação das amostras de saliva para a análise proteômica

As amostras da saliva foram quantificadas no fluorímetro Qubit 2,0 (Invitrogen, EUA), seguindo as especificações do fabricante. A metodologia utilizada foi a mesma usada por Santiago e colaboradores (2018) no sialoma do *T. dimidiata* e será descrita a seguir. As frações solúveis contendo aproximadamente 200 µg de proteína foram precipitadas com etanol/acetona, incubadas por 2 h a -80 °C e centrifugadas a 15.000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e descartado. O pellet foi lavado três vezes com uma solução contendo 40% etanol/40% acetona. As proteínas foram ressuspensas e desnaturadas com tampão TEAB 20 mM, pH 8,5 contendo 8 M de ureia e *amberlite* 1% por 30 min. Em seguida foram filtradas, reduzidas na presença de DTT 20 mM por 40 min a 25 °C, e depois alquiladas com iodo acetamida 40 mM no escuro por 40 min.

As proteínas foram digeridas com tripsina por 17 h a 25 °C. Para cada 100 µg de proteína foi usado 1 µg de tripsina. Após a digestão, a amostra foi acidificada utilizando TFA 0,1% (concentração final) e dessalinizada. A dessalinização foi realizada em micro coluna *home made* com a resina Poros Oligo R3 (*Applied Biosystems*, CA, EUA).

Após esse procedimento, as amostras foram submetidas à espectrometria de massas utilizando o sistema de LC-MS/MS com colunas capilares em *Dionex Ultimante™ 3000 RSLCnano system* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diretamente acoplado ao espectrômetro de massas híbrido do tipo íon trap-orbitrap, Orbitrap Elite™ ETD (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Os dados obtidos a partir desse procedimento foram analisados utilizando programas de bioinformática.

4.6. Análises de bioinformática

4.6.1. Análise transcriptômica

As *reads* que foram geradas, passaram por teste de qualidade utilizando o *software* FastQC v0.11.7 (BROWN; PIRRUNG; MCCUE, 2017). Após 2 análises de qualidade, foi utilizado o programa *Trimmomatic 0.38* (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) para a remoção dos adaptadores e das sequências com baixa qualidade. Após

este procedimento, foi utilizado o programa *Trinity* versão *trinityrnaseq_r020140717*, *bowtie1.1.2* (GRABHERR; HAAS; YASSOUR; LEVIN *et al.*, 2011), utilizando os parâmetros predefinidos para a montagem das sequências e posteriormente foram agrupados formando um cluster denominado por *contigs* (CDS) estas análises foram feitas pela empresa Macrogen. Os CDS obtidos foram submetidos a um *pipeline* que contempla os bancos de dados e programas de predição de localização e anotação funcional. Os programas utilizados para a predição neste *pipeline* estão listados na Tabela 2 e os bancos de dados utilizados foram: NCBI (Hemiptera, NR-light, Refseq invertebrados, Refseq vertebrados, Refseq vírus), Uniprot e *Exosome protein database*.

Tabela 2 –Programas utilizados para realização das análises de bioinformática.

Software	Predição	Referência
Gene	Função, Localização e	(ASHBURNER; BALL; BLAKE; BOTSTEIN <i>et al.</i> , 2000)
Ontology (GO)	Processo	
SMART	Domínios proteicos	(PONTING; SCHULTZ; MILPETZ; BORK, 1999)
KOG	Grupos ortólogos de proteínas	(TATUSOV; FEDOROVA; JACKSON; JACOBS <i>et al.</i> , 2003)
KEGG	Via metabólica, genoma e substâncias químicas	(KANEHISA; GOTO, 2000; KANEHISA; GOTO; SATO; FURUMICHI <i>et al.</i> , 2012)
CDD	Domínios conservados	(LU; WANG; CHITSAZ; DERBYSHIRE <i>et al.</i> , 2020; MARCHLER-BAUER; ANDERSON; CHITSAZ; DERBYSHIRE <i>et al.</i> , 2009)
PFAM	Famílias de proteínas	(FINN; BATEMAN; CLEMENTS; COGGILL <i>et al.</i> , 2014)
SignalP	Peptídeo Sinal	(PETERSEN; BRUNAK; VON HEIJNE; NIELSEN, 2011)
TMHMM	Domínio Transmembrana	(KROGH; LARSSON; VON HEIJNE; SONNHAMMER, 2001)
NetOGlyc	O glicosilação	(STEENTOFT; VAKHRUSHEV; JOSHI; KONG <i>et al.</i> , 2013)
NetNGlyc	N glicosilação	(GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004)

4.6.2. Análise proteômica

O programa *PatternLab for Proteomics 4.1* (CARVALHO; LIMA; LEPREVOST; SANTOS *et al.*, 2016) foi utilizado para identificação das proteínas. Para as identificações, utilizaram-se espectros de massa teóricos produzidos a partir de sequências depositadas em bancos de dados. A comparação dos dados teóricos com

os dados experimentais foi analisada através da ferramenta *Comet MS/MS search engine v.2015.020* implementados no programa. O banco de dados com *target decoys* utilizado na busca por *Peptide Sequence Matches* foi feito no programa *PatternLab* a partir dos dados anotados obtidos do sequenciamento do RNA mensageiro (RNAm) das glândulas salivares do *T. sordida*, incluindo as sequências de contaminantes-padrão do *software*. Os *Decoys* foram obtidos a partir de sequências reversas do banco de dados.

Para a identificação das proteínas, os espectros de massa em formato *.raw* foram submetidos à busca utilizando como parâmetros: especificidade enzimática na hidrólise proteica como semi-tríplica com tolerância para até 2 clivagens perdidas, modificação fixa de resíduos de cisteínas carbometiladas, *Fragment bin tolerance = 0,0200%*, *Fragment bin offset = 0*, *Theoretical frag ions = M peak only*, busca na faixa de massa entre 550 e 5.500.

Os resultados da busca foram processados e filtrados estatisticamente via *Search Engine Processor (SEpro)*. O resultado de *Peptide Sequence Matches* foi obtido a partir desse processamento estatístico, que levou em conta somente os peptídeos com o valor de *False Discovery Rate (FDR)* aceitável de cada amostra. Os valores de FDR foram calculados automaticamente pelo programa ao definir como aceitável somente $FDR < 2\%$ para peptídeos e $FDR < 1\%$ para proteínas. Para cada grupo de proteínas foram utilizados valores *Primary Score*, *Secondary Score* e *DeltaCN score* para gerar automaticamente uma função de discriminador Bayesiano. As proteínas identificadas já estavam anotadas e com predições feitas pelo programa desenvolvido pelo professor Dr. José M. C. Ribeiro que inclui os softwares online presentes na Tabela 2 como descrito anteriormente.

4.6.3. Alinhamento múltiplo

Para esta análise foram utilizados os seguintes programas: Jalview (WATERHOUSE; PROCTER; MARTIN; CLAMP *et al.*, 2009) para construir, editar e integrar as análises, e *MUSCLE* (EDGAR, 2004) foi utilizado para fazer os alinhamentos múltiplos. A base de dados utilizada para a obtenção das sequências de proteínas foi NR do NCBI e são representadas por 6 letras seguidas pelo número de acesso do NCBI. As letras encontradas em cada sequência fazem referência a espécie.

4.6.4. Análise filogenética

A análise filogenética, foi feita a partir dos CDS extraídos do sequenciamento do *T. sordida* e foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados NR utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico interativo específico por posição chamada de PSI-BLAST do NCBI. A partir desse resultado foram selecionadas sequências homólogas, utilizando o *e-value* como valor de referência. O *software* MEGA (KUMAR; STECHER; LI; KNYAZ *et al.*, 2018) foi utilizado para a montagem dos alinhamentos múltiplos e construção das árvores filogenéticas. O modelo *para* a substituição de aminoácidos foi determinado usando o parâmetro “*Find best protein models*” do próprio programa. As árvores filogenéticas foram estimadas usando a seguinte ferramenta para a construção: método estatístico de máxima verossimilhança, modelo WAG de substituição de aminoácidos e distribuição gama e para a árvore filogenética Kazal-type utilizando as mesmas ferramentas somado a distribuição gama com os sítios invariantes. A confiabilidade das árvores foi testada pelo método *bootstrap* (N=1000).

4.6.5. Correlação

O grau de associação linear entre as *reads* (FPKM) e a abundância de proteínas (contagem de espectros - Ce) foi medido pelo cálculo do coeficiente de correlação de Pearson utilizando o programa *GraphPad Prism*. A correlação foi feita utilizando os valores de FPKM do transcriptoma e os valores da Ce do proteoma. Seguido pelo cálculo de \log^2 destes valores. O método de correlação amostral de Pearson, representado por *r*, assume valores entre -1 e 1. Quanto maior for o valor de *r*, maior será o grau de associação linear entre as variáveis (Forte, Moderado ou Fraco). Se *r* for positivo (+) indica uma correlação positiva e se for negativo (-) uma correlação negativa. Para estimar a força da relação entre os dados, foi utilizado o valor P (derivado do teste t), apresentando um teste estatisticamente significativo ($p < 0,0001$).

4.6.6. Análise de hidrofobicidade

A análise de hidrofobicidade foi feita utilizando a escala Kyte e Doolittle (KYTE; DOOLITTLE, 1982). Esta escala é amplamente utilizada para detectar regiões hidrofóbicas em proteínas. O plot foi criado através do programa ExPASy *ProtScale* (<http://web.expasy.org/protscale>). As regiões com valor positivo são hidrofóbicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise transcriptômica da saliva do *T. sordida*

5.1.1. Anotação das sequências

A amostra submetida ao sequenciamento de alto rendimento (*High-throughput RNA-seq*) gerou um resultado de 57.645.372 *reads* com alta qualidade e que foram agrupadas em 27.155 CDS, que após passarem por filtros geraram um total de 26.670 CDS. A partir deste resultado, foi feita a anotação, resultando em um total de 16.683 sequências que correspondem a 62,6% do número total de CDS.

Estes CDS anotados foram então classificados em 7 diferentes classes, sendo elas: Proteínas constitutivas, Secretadas, Relacionadas a imunidade, Desconhecidas, Proteassoma, Elemento transponível, e Produto viral (Tabela 3). De forma geral, a classe com o maior número de identificações é a Desconhecidas com 48,5% dos CDS e 3% das *reads*, seguida por: Proteínas constitutivas (CDS= 37,9% e *reads*= 18,3%), Elemento transponível (CDS= 5,4% e *reads*= 0,1%), Proteassoma (CDS= 3% e *reads*= 0,8%), Secretadas (CDS= 4,4% e *reads*= 77,5%), Relacionada a imunidade (CDS= 0,8% e *reads*= 0,2%) e Produto viral (CDS= 0,1% e *reads*= 0%) como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Classificação funcional e níveis de expressão dos *contigs* (CDS) do sialotranscriptoma do *T. sordida*.

Classe	Nº de CDS	Nº de reads	Cobertura		FPKM	%FPKM
			nº de reads/CDS	%reads		
Secretadas	735	9.340.897	12.709	77,5	2.714.435	79,5
Proteínas constitutivas	6.325	2.200.836	348	18,3	414.372	12,1
Desconhecidas	8.092	365.839	45	3,0	260.915	7,6
Proteassoma	501	102.188	204	0,8	18.925	0,6
Relacionada a imunidade	126	24.319	193	0,2	4.857	0,1
Elemento transponível	894	13.458	15	0,1	2.551	0,1
Produto viral	10	2.474	247	0	45	0
Total	16.683	12.050.013		100,00	3.416.099	100,00

*FPKM – *Fragment per kilobase per million*

Apesar do grande número de identificações, ao olhar para os valores das quantidades das *reads* e o valor de FPKM (*Fragment per kilobase per million*), observa-se que a maior porcentagem corresponde à classe das proteínas putativamente secretadas. Este valor determina o nível de expressão da categoria, o que é um resultado interessante visto que a maior parte das moléculas bioativas descritas até o momento se encontram nesta categoria.

5.1.1.1. Classe de Proteínas Constitutivas

Este grupo de proteínas obteve um total de 6.325 CDS distribuídos em 21 categorias, sendo elas: Extracelular ou exossômico ancorado por GPI Proteínas citoesqueléticas, Detoxificação, Metabolismo oxidante/Detoxificação, Matriz extracelular, Metabolismo de aminoácidos, Metabolismo de carboidratos, Metabolismo de energia, Metabolismo intermediário, Metabolismo de lipídios, Metabolismo de nucleotídeos, Exportação nuclear, Regulação nuclear, Exportação de proteína, Modificação de proteína, Maquinaria de síntese de proteína, Transdução de sinal, Estoque, Fator de transcrição, Maquinaria de transcrição e Transportadores e canais (Tabela 4).

Dentre estes grupos, 7 se destacaram quanto a expressão, Maquinaria de síntese de proteínas com 37,1% de FPKM e 24,2% das *reads* desta classe, seguido por Modificação de proteína (FPKM= 9,3% e *reads*= 16,6%), Metabolismo de energia (FPKM= 7,8% e *reads*= 7,2%), Metabolismo oxidante/Detoxificação (FPKM= 6,7% e *reads*= 3,3%), Transdução de sinal (FPKM= 6% e *reads*= 8,1%), Matriz extracelular (FPKM= 5,7% e *reads*= 2%) e Transportadores e canais (FPKM= 5,7% e *reads*= 7,3%). Os demais grupos apresentaram o valor de FPKM abaixo de 5% (Tabela 4).

Tabela 4 – Classificação funcional e níveis de expressão das proteínas constitutivas.

Classe de Proteínas Constitutivas	Nº de of CDS	Nº de reads	Cobertura nº de reads/CDS	% reads	FPKM	% FPKM
Maquinaria de síntese de proteína	462	533.374	1.154	24,2	153.782	37,1
Modificação de proteína	359	365.123	1.017	16,6	38.371	9,3
Metabolismo de Energia	386	158.957	412	7,2	32.260	7,8
Metabolismo oxidante/ Detoxificação	101	72.003	713	3,2	27.895	6,7
Transdução de sinal	1562	179.296	115	8,1	24.835	6

Matriz extracelular	171	43.294	253	2	23.761	5,7
Transportadores e canais	415	159.587	385	7,3	23.567	5,7
Exportação de proteínas	432	101.734	235	4,6	18.456	4,5
Maquinaria de transcrição	773	152.434	197	6,9	17.459	4,2
Metabolismo de lipídio Extracelular ou exossômico ancorado por GPI	268	89.681	335	4,1	11.836	2,9
Proteínas citoesqueléticas	30	22.510	750	1	8.704	2,1
Regulação nuclear	304	56.943	187	2,6	7.414	1,8
Metabolismo de carboidrato	299	28.771	96,	1,3	4.904	1,2
Metabolismo de aminoácido	166	48.878	294	2,2	4.459	1,1
Armazenamento	140	45.558	325	2,1	4.375	1,1
Metabolismo de nucleotídeo	26	60.704	2.335	2,8	3.078	0,7
Fator de transcrição	144	17.692	123	0,8	2.820	0,7
Detoxificação	166	20.953	126	1	2.530	0,6
Metabolismo intermediário	43	18.567	432	0,8	1842	0,4
Exportação nuclear	49	21.082	430	1	1.750	0,4
Total	29	3.697	127	0,2	275	0,1
	6.325	2.200.836		100,	414.372	100

5.1.1.2. Classe de proteínas secretadas

Dentro da classe das proteínas secretadas, foram feitas subclassificações de acordo com a sua função, dividindo em 9 grandes grupos sendo eles: Lipocalina, Famílias de proteínas ubíquas, Enzimas, Inibidores de protease, Famílias específicas de hemípteros, Outras proteínas salivares secretadas, Proteína de ligação ao hormônio juvenil, Proteína de ligação a odorante e Proteína de ligação a feromônio. Alguns destes grupos estão subdivididos como demonstrado na Tabela 5.

Os resultados mostram que o grupo mais expresso dentro da classe das secretadas é o Lipocalinas com 45,1% do valor de FPKM e 48,8% do número de *reads*. Seguindo a ordem dos grupos mais expressos, temos como o segundo mais

representativo o Famílias de proteínas específicas de hemípteros com 32% do valor de FPKM e 31,9% do número de *reads*, seguido por Inibidores de protease (FPKM= 12,9% e *reads*= 2,6%), Enzimas (FPKM= 3,8% e *reads*= 7,9%), Famílias de proteínas ubíquas (FPKM= 3,1% e *reads*= 4,9%), Outras proteínas salivares secretadas (FPKM= 3,1% e *reads*= 3,9%), Proteína de ligação a feromônio (FPKM= 0,1% e *reads*= 0,1%), Proteína de ligação a odorante (FPKM= 0% e *reads*= 0%) e Proteína de ligação ao hormônio juvenil (FPKM= 0% e *reads*= 0%) (Tabela 5).

Tabela 5 – Classificação funcional e níveis de expressão das proteínas putativamente secretadas.

Classe Secretadas	Nº de CDS	Nº de reads	Cobertura		FPKM	% FPKM
			nº de reads/CDS	%reads		
Lipocalinas						
Triabina	89	3.180.268	35.733	34	936.123	34,5
Palidipina	21	1.281.977	61.047	13,7	255.970	9,4
Outras lipocalinas	18	61.350	3.408	0,7	19.885	0,7
Triatina	5	32.225	6.445	0,3	11.353	0,4
Procalina	3	1.184	395	0	1.352	0
Total	136	4.557.004		48,8	1.224.684	45,1
Famílias específicas de hemípteros						
Trialisina curta/ Trialisina	10	2.763.272	276.327	296	821.268	30,3
MYS/Hemolisina	17	217.213	12.777	2,3	45.652	1,7
Proteínas salivares de 16kDa específicas de <i>Triatoma</i> e <i>Panstrongylus</i>	3	1.123	374	0	290	0
Peptídeo salivar básico de 8kDa de <i>T.</i> <i>sordida</i>	6	157	26	0	150	0
Proteína secretada rica em cisteína	4	16	4	0	19	0
Total	40	2.981.781		31,9	867.380	32
Inibidores de Protease						
Tipo Kazal	27	229.814	8.512	2,5	347.414	12,8
Cistatina	3	1.357	452	0	844	0
Serpina	6	7.385	1.231	0,1	618	0
Pacifastina	6	1.435	239	0	250	0
Mucinas	20	279	14	0	384	0
Tipo Kunitz	7	208	30	0	13	0

Total	69	240.478		2,6	349.523	12,9
Enzimas						
Inositol fosfato fosfatase	14	390.510	27.894	4,2	54.472	2
Tripsina salivar	8	232.304	29.038	2,5	31.074	1,1
Metaloproteases	5	78.930	15.786	0,8	10.240	0,4
Apirase salivar 79kDa	5	30.899	6.180	0,3	7.242	0,3
Nucleases	4	2.237	559	0	200	0
Carboxilesterase secretada	8	1.841	230	0	106	0
Aspártico protease lisossomal	2	888	444	0	75	0
Lipase	5	420	84	0	58	0
Total	51	738.028		7,9	103.467	3,8
Família de proteínas ubíquas						
Antígeno 5	13	438.036	33.695	4,7	77.434	2,9
Proteína conservada secretada de inseto	13	15.438	1.188	0,2	6.212	0,2
Receptor de baixa densidade lipoproteico	5	16	3	0	18	0
Total	31	453.490		4,9	83.664	3,1
Outras proteínas salivares secretadas						
Proteínas de ligação ao ferômonio	9	4.918	546	0,1	2.145	0,1
Proteínas de ligação ao odorante	25	1.608	64	0	470	0
Proteínas de ligação ao hormônio juvenil	12	1.940	162	0	307	0
Total	735	9.340.897		100,00	2.714.435	100,00

Algumas das famílias de proteínas encontradas nestes grupos têm função descrita estando envolvidas no processo de hematofagia, imunidade do inseto e outras com função ainda desconhecida. Dentro de cada categoria, o *T. sordida* apresentou uma maior expressão de algumas famílias específicas (Tabela 5). As mais expressas serão discutidas de acordo com o nível de expressão em cada um dos grupos.

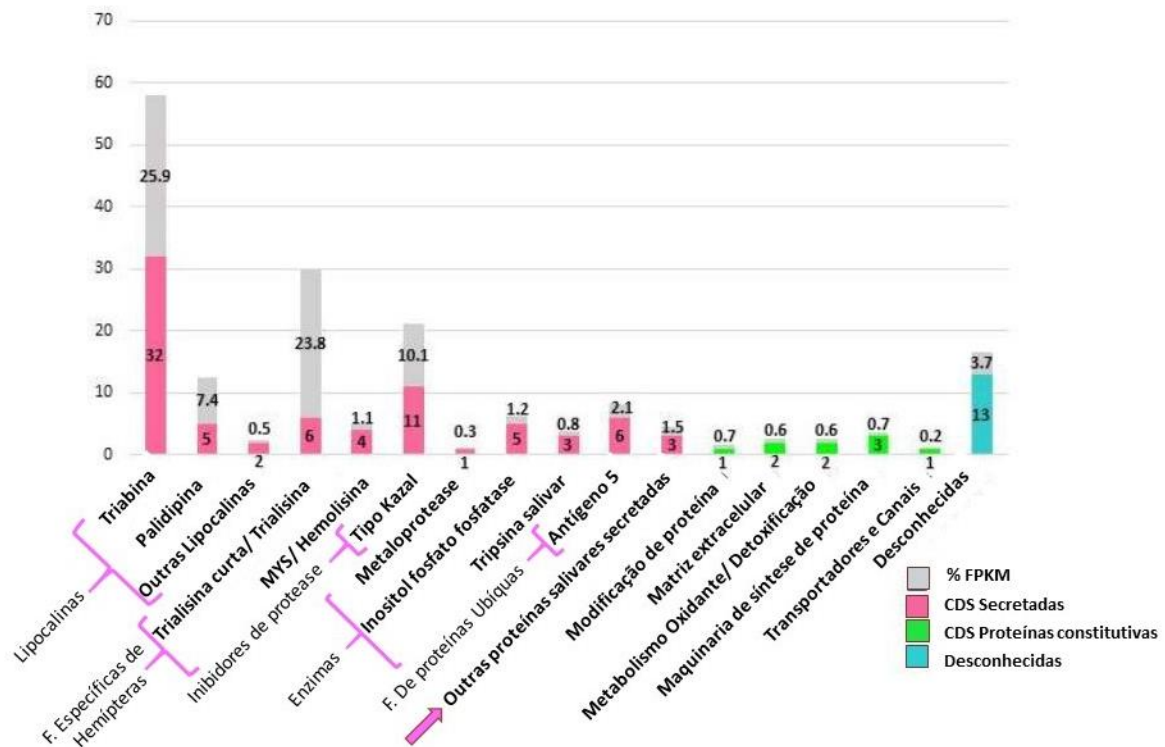
5.1.1.3. Os 100 transcritos codificantes mais expressos e suas respectivas classificações

Observando os 100 transcritos codificantes mais expressos (FPKM), percebeu-se que nem todas as classificações apresentadas na Tabela 3 foram abrangidas. Estes 100 transcritos pertenciam a 3 classes apenas: Secretadas (CDS= 78 e FPKM= 74,7%), Desconhecidas (CDS= 13 e FPKM= 3,7%) e Proteínas constitutivas (CDS= 9 e FPKM= 2,7%) que juntos somam 81% do FPKM total (Tabela 6). Este resultado demonstra que estes 100 CDS dentro das suas respectivas classificações são essenciais para o *T. sordida*. A classe Secretada apresentou 6 dos 9 grupos apresentados na Tabela 5 e a classe de Proteínas constitutivas 5 dos 21 grupos apresentados na Tabela 4, estes dados foram demonstrados na Figura 6 e serão detalhados conforme sua expressão.

Tabela 6 – Número de identificações e nível de expressão dos 100 transcritos codificantes mais expressos em relação aos valores do transcriptoma geral.

Classe	Nº CDS	Nº reads	%reads total	FPKM	%FPKM total
Secretadas	78	8.650.185	71,8	2.550.420	74,7
Desconhecidas	13	124.827	1	125.659	3,7
Proteínas constitutivas	9	367.482	3	92.010	2,7
Total	100	9.142.493	75,9	2.768.088	81

Figura 6 – Número de CDS e nível de expressão das 100 mais expressas por classificação.



Fonte: Esta tese.

Dentro da classe secretada o grupo Lipocalina apresentou 3 subgrupos, 2 deles se destacaram somando 33% do valor de FPKM total, Triabina (CDS= 32 e FPKM= 25,9%) e Palidipina (CDS= 5 e FPKM= 7,1%). O segundo grupo mais expresso foi Famílias específicas de hemípteros que também apresentou 2 subgrupos o mais expresso é o Trialisina curta/Trialisina (CDS= 6 e FPKM= 23,8%), seguido pelo grupo Inibidores de protease com o subgrupo tipo Kazal (CDS= 11 e FPKM= 10,1%), Enzimas, que apresentou 3 subgrupos e se destacou com o Inositol fosfato fosfatase (CDS= 5 e FPKM= 1,2%), Famílias de proteínas ubíquas com o subgrupo Antígeno-5 (CDS= 6 e FPKM= 2,1%), e Outras proteínas salivares secretadas (CDS= 3 e FPKM= 1,5%) (Figura 6).

Na classe das Proteínas constitutivas os grupos mais expressos foram: Maquinaria de síntese de proteína (CDS= 3 e FPKM= 0,7%), Modificação de proteína (CDS= 1 e FPKM= 0,7%), Metabolismo oxidante/Detoxificação (CDS= 2 e FPKM= 0,6%), Matriz extracelular (CDS= 2 e FPKM= 0,6%) e Transportadores e Canais (CDS= 1 e FPKM= 0,2%) (Figura 6).

As 2 sequências mais expressas, Hem-c15059_g2_i.p1 e Hem-c10816_g1_i1.p1, são classificadas como Triaisina curta/Triaisina representadas por 9,4% e 7,8% respectivamente do valor de FPKM total (APÊNDICE B).

5.2. Análise proteômica da saliva do *T. sordida*

Foram identificadas 132 proteínas que geraram 1.571 espectros, e foram classificadas de acordo com sua funcionalidade. As identificações foram feitas a partir do alinhamento das sequências geradas da espectrometria de massas contra as sequências do transcriptoma. Dentre as proteínas secretadas, algumas já possuem função atribuída. Como esperado, foram encontradas proteínas secretadas, proteínas constitutivas e proteínas que não possuem nenhuma descrição funcional até o momento na literatura e desconhecidas, que não possuem nenhum tipo de informação disponível. As classificações foram feitas assim como as do transcriptoma e estão apresentadas na Tabela 7.

Das proteínas identificadas com função atribuída, 55 delas aparecem entre as 100 CDS mais expressas no transcriptoma (APÊNDICE B). Além disso, 75 proteínas das 132 identificadas no proteoma, pertencem a classe das secretadas. O grupo Lipocalina, assim como no sequenciamento, aparece sendo o mais representativo com 38 identificações (Ids) e 42% da contagem de espectros (Ce). Dentre as secretadas, o segundo grupo é o Enzimas (Ce= 22,5%) seguido por Famílias específicas de hemípteros (Ce= 10,1%), Famílias de proteínas ubíquas (Ce= 5,9%), Outras proteínas salivares secretadas (Ce= 4,9%), Inibidores de protease (Ce= 1,4%). As demais categorias são representadas com menos de 1% do valor da Ce. Apesar da ordem dos grupos mais expressos no transcriptoma divergir um pouco da abundância encontrada no proteoma, as famílias de proteínas mais representativas dentro de cada grupo são exatamente as mesmas descritas no resultado do sequenciamento (Tabela 4 e Tabela 5).

Na classe proteínas constitutivas as subclasses Modificação de proteína (Ce= 2,8%), seguida por Proteína citoesquelética (Ce= 1,6%) como sendo as mais abundantes. As demais apresentam Ce menor que 1% (Tabela 7).

Tabela 7 – Identificações do proteoma salivar do *T. sordida*. As classes e os valores em negrito correspondem ao valor total de espectros e porcentagem dentro de cada classe.

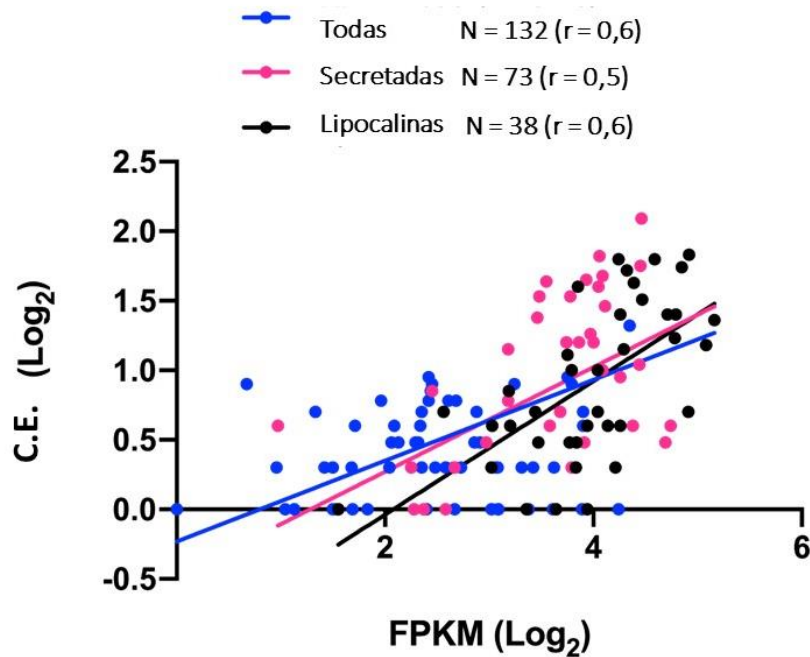
Classe	Nº proteínas	Total de espectros	% Espectros
---------------	---------------------	---------------------------	--------------------

Secretadas			
Lipocalinas			
Triabina	31	532	33,9
Palidipina	5	113	7,2
Outras lipocalinas	1	10	0,6
Triatina	1	5	0,3
Total	38	660	42
Enzimas			
Inositol fosfato fosfatase	8	252	16
Tripsina salivar	4	86	5,5
Apirase salivar 79 kDa	2	16	1
Total	14	354	22,5
Famílias específicas de hemípteros			
Trialisina curta/Trialisina	2	133	8,5
MYS/Hemolisina	2	19	1,2
Proteína salivar específica 16kDa de <i>Triatoma</i> e <i>Panstrongylus</i>	1	7	0,4
Total	5	159	10,1
Famílias de proteínas ubíquas			
Antígeno 5	4	92	5,9
Outras proteínas salivares secretadas	7	77	4,9
Inibidores de Protease			
Tipo Kazal	4	22	1,4
Relacionadas a imunidade	2	7	0,4
Proteína de ligação ao odorante	1	1	0,1
Total Secretadas	75	1372	87,3
Proteínas constitutivas			
Modificação de proteína	7	44	2,8
Proteína citoesquelética	7	25	1,6
Metabolismo de energia	5	12	0,8
Maquinaria de síntese de proteína	4	11	0,7
Transdução de Sinal	5	11	0,7
Metabolismo de Lipídios	3	10	0,6
Estoque	3	9	0,6
Matriz extracelular	1	8	0,5
Metabolismo Oxidante/ Detoxificação	3	6	0,4
Metabolismo de Aminoácido	3	6	0,4
Detoxificação	1	3	0,2
Transportadores e canais	1	2	0,1
Maquinaria de transcrição	1	2	0,1
Metabolismo de Carboidrato	1	2	0,1

Proteína de exportação	1	1	0,1
Total	44	152	9,7
Desconhecidas	13	47	3
Total	132	1571	100

Quando correlacionamos o nível de expressão dos transcritos e as identificações do proteoma, percebemos que há uma correlação (r) positiva moderada (Figura 7). Esta correlação positiva moderada dos achados sugere que os parâmetros utilizados para a identificação das proteínas no proteoma foram adequados e que se correlacionam com os achados no sialotranscriptoma do *T. sordida* e de outras espécies de triatomíneos.

Figura 7 – Correlação do transcriptoma/proteoma salivar. A figura mostra a correlação entre as famílias de proteínas encontradas no transcriptoma (FPKM) e proteoma (Contagem de espectros- Ce) das amostras. Mostra uma correlação positiva estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) nos 3 grupos testados. Em azul, todas as proteínas identificadas, em rosa todas as proteínas secretadas identificadas e em preto o grupo das Lipocalinas identificadas.



Fonte: Adaptado para esta tese.(PRAÇA; SANTIAGO; CHARNEAU; MANDACARU *et al.*, 2022).

5.3. Proteínas Secretadas

5.3.1. Lipocalinas

As lipocalinas são um grupo muito grande e heterogêneo de proteínas que estão presentes nas glândulas salivares de diversos artrópodes hematófagos, de forma bem abundante. Em triatomíneos, já foi descrita em várias espécies: *T. pallidipennis* (FUENTES-PRIOR; NOESKE-JUNGLUT; DONNER; SCHLEUNING *et al.*, 1997; HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016), *T. infestans* (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008a; CHARNEAU; JUNQUEIRA; COSTA; PIRES *et al.*, 2007), *T. rubida* (RIBEIRO; ASSUMPÇÃO; PHAM; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012), *T. dimidiata* (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; DE MOURA CORDEIRO *et al.*, 2018), *T. matogrossensis* (ASSUMPÇÃO; EATON; PHAM;

FRANCISCHETTI *et al.*, 2012b), *D. maxima* (ASSUMPÇÃO, T. C.; CHARNEAU, S.; SANTIAGO, P. B.; FRANCISCHETTI, I. M. *et al.*, 2011), *P. megistus* (RIBEIRO, J. M. C.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B., 2015), *P. chinai* (KATO; JOCHIM; GOMEZ; TSUNEKAWA *et al.*, 2017), *R. neglectus* (SANTIAGO; ASSUMPÇÃO; DE ARAUJO; BASTOS *et al.*, 2016), *R. prolixus* (RIBEIRO; ANDERSEN; SILVA-NETO; PHAM *et al.*, 2004), *R. brethesi* (COSTA; SOUSA; RICART; ROEPSTORFF *et al.*, 2011) e *R. robustus* (COSTA; SOUSA; RICART; ROEPSTORFF *et al.*, 2011). Com o *T. sordida*, este perfil também foi observado, os valores da expressão (FPKM) e da contagem de espectros (Ce) correlacionaram de forma positiva (Figura 7). Tanto no transcriptoma como no proteoma do *T. sordida*, este grupo foi o mais representado dentro da classe das proteínas secretadas (Tabela 5 e Tabela 7).

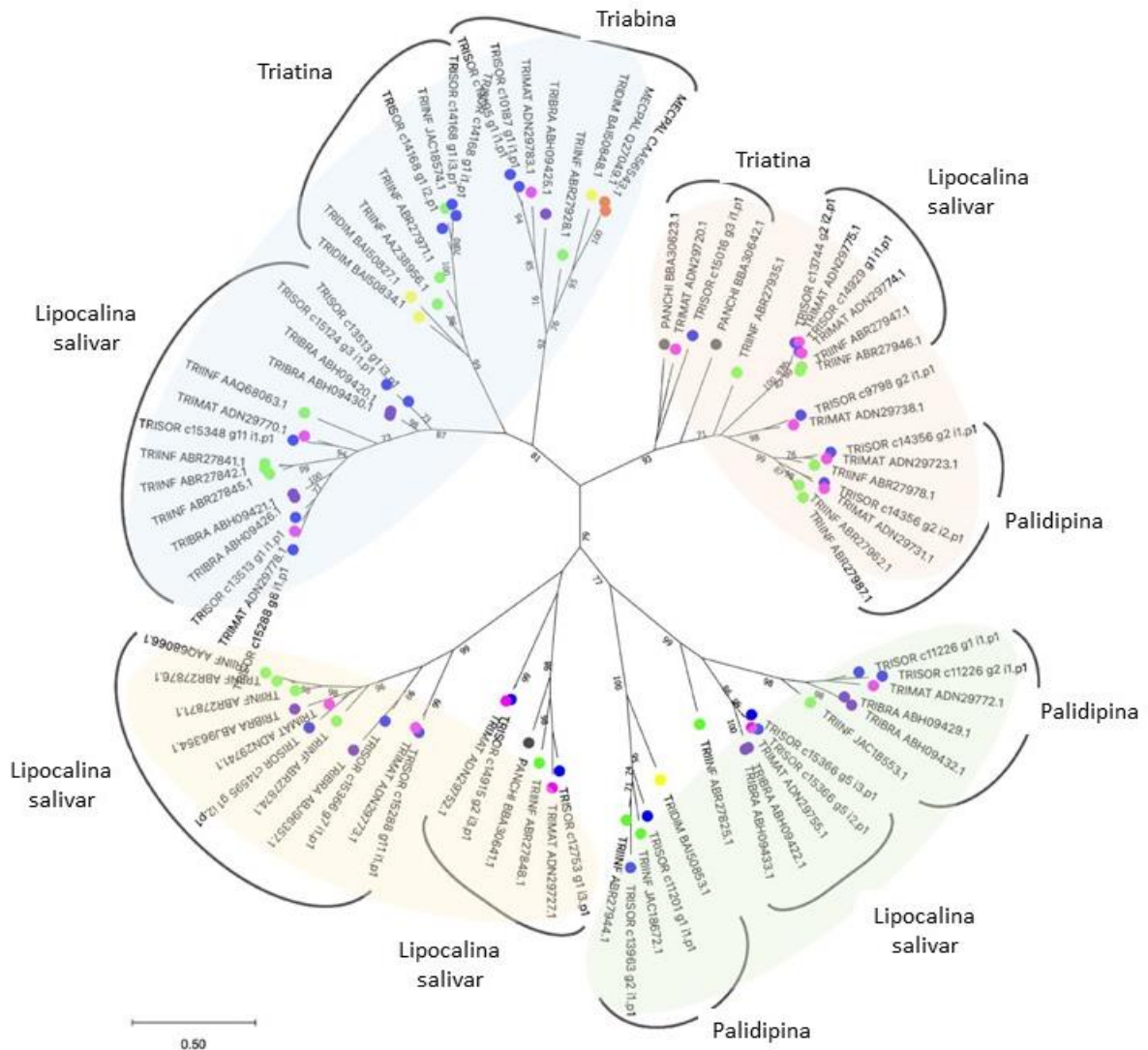
Os membros desta grande família são pequenas proteínas extracelulares, pertencentes à superfamília das calicinas. Eles possuem uma estrutura tridimensional conservada, e se apresentam em uma variedade de formas, níveis diferentes de hidrofobicidade e carga, sendo, por isso considerado um grupo heterogêneo (FLOWER; NORTH; SANSOM, 2000; HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016). Normalmente, as lipocalinas se ligam a pequenas moléculas hidrofóbicas, receptores de superfície celular ou outras proteínas, atuando em diversos pontos do sistema hemostático do hospedeiro (HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016). Portanto, estão envolvidas no processo de neutralização dos eventos de hemostasia como: vasoconstrição, coagulação e agregação plaquetária nos hospedeiros vertebrados (CHARNEAU; JUNQUEIRA; COSTA; PIRES *et al.*, 2007; FLOWER; NORTH; SANSOM, 2000; HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016). Algumas destas proteínas já possuem função descrita como, por exemplo: a triplatina que foi descrita em *T. infestans* e a palidipina em *T. pallidipennis*. Ambas inibem a agregação plaquetária induzida por colágeno (FRANCISCHETTI; RIBEIRO; CHAMPAGNE; ANDERSEN, 2000; HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016; MORITA; ISAWA; ORITO; IWANAGA *et al.*, 2006; NOESKE-JUNGBLUT; HAENDLER; DONNER; ALAGON *et al.*, 1995). O colágeno que é exposto após a lesão causada pela picada do inseto, leva a ativação das plaquetas, que secretam o tromboxano A2 (TXA2) e liberam mediadores de ativação plaquetária e inflamação como o ADP e a serotonina, e com isso potencializam a resposta da ativação (BROOS; FEYS; DE MEYER; VANHOORELBEKE *et al.*, 2011). As proteínas salivares dos artrópodes

hematófagos se ligam ao colágeno, ADP e TXA2 para reduzir de forma rápida as concentrações destas moléculas livres e assim inibir a ativação das plaquetas (ALVARENGA; FRANCISCHETTI; CALVO; SÁ-NUNES *et al.*, 2010). A triabina inibe a agregação plaquetária induzida pela trombina ao se ligar a ela por meio do exosítio de reconhecimento do fibrinogênio (NOESKE-JUNGBLUT; HAENDLER; DONNER; ALAGON *et al.*, 1995). Enquanto, a triatina apesar de relatada em várias espécies de triatomíneos, até o momento não tem sua função descrita.

Foi feita uma árvore filogenética com as sequências anotadas do *T. sordida* (Figura 8) para observar como estas sequências se agrupavam. O resultado demonstrou que as lipocalinas se agrupam em quatro clados principais que incluem diferentes subclassificações, dentre elas: Triatina, palidipina, triabina e outras lipocalinas. A forma como foram agrupadas, sugere que estas proteínas salivares evoluíram por duplicação e divergência gênica, por isso é uma família tão abundante e multigênica. Também, através desta análise, foi possível notar a semelhança entre o *T. sordida* e o *T. matogrossensis* demonstrando que estas espécies possivelmente estão intimamente relacionadas.

Os resultados demonstram que esta classe de proteínas é fundamental para o sucesso da hematofagia, uma vez que possuem funções importantes, mesmo que redundantes, para controlar as respostas hemostáticas do hospedeiro vertebrado. Além disso, a variedade somada ao alto nível de expressão pode ser uma estratégia para evitar as respostas imunes do hospedeiro uma vez que atuam em diferentes agonistas.

Figura 8 – Filograma do grupo Lipocalina. A distância entre as sequências da árvore foi determinada pelo alinhamento das sequências de lipocalinas encontradas em *T. sordida* com outras sequências de lipocalinas de Triatomíneos. Os pontos coloridos identificam as espécies cujas sequências foram selecionadas: Azul- *Triatoma sordida*; Magenta – *Triatoma matogrossensis*; Roxo – *Triatoma brasiliensis*; Verde- *Triatoma infestans*; Amarelo- *Triatoma dimidiata* e Cinza - *Panstrongylus chinai*.



Fonte: Adaptado para esta tese (PRAÇA; SANTIAGO; CHARNEAU; MANDACARU *et al.*, 2022).

5.3.2. Famílias específicas de hemípteros

Neste grupo, 40 CDS foram anotadas, correspondendo a 32% do FPKM da classe Secretadas, que foram agrupadas em: *Trialisina curta/Trialisina*, *MYS/Hemolisina*, *Proteína salivar 16kDa de Triatoma e Panstrongylus*, *Peptídeo salivar básico Tsor 8kDa* e *Proteína secretada rica em cisteína* (Tabela 5). As análises feitas utilizando a ferramenta PSI-BLAST demonstraram que estes transcritos correspondem a sequências de proteínas de hemípteros que não são semelhantes a

nenhuma outra sequência no banco de dados NR. À medida que novos estudos de transcriptoma de hemípteros sejam realizados, é possível que estas moléculas sejam relacionadas no conteúdo salivar/veneno de outras espécies.

5.3.3. Trialisina curta/Trialisina

As trialisinas são proteínas líticas que tem por função formarem poros, que permeabilizam e lisam diferentes tipos celulares como por exemplo células bacterianas e de mamíferos (AMINO; MARTINS; PROCOPIO; HIRATA *et al.*, 2002b). São proteínas pequenas, onde sua forma madura tem aproximadamente 22 kDa e a forma curta (trialisina curta) tem aproximadamente 6 kDa (RIBEIRO; ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI, 2012). Estas moléculas são sintetizadas e armazenadas como precursoras nas glândulas salivares, sendo liberadas apenas por protólise limitada, mecanismo essencial para evitar a auto lesão durante a sua síntese e secreção (MARTINS; AMINO; DAGHASTANLI; CUCCOVIA *et al.*, 2008). Esta classe de moléculas parece estar restrita a algumas espécies de triatomíneos, tendo sido descritas no sialotranscriptomas de *T. infestans*, *T. matogrossensis*, *T. rubida*, *T. dimidiata* e *P. megistus* (ASSUMPÇÃO; EATON; PHAM; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012a; ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008a; RIBEIRO; ASSUMPÇÃO; PHAM; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012; RIBEIRO, J. M. C.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B., 2015; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; CORDEIRO *et al.*, 2018) e no proteoma nas espécies *T. infestans*, *T. pallidipennis* e *P. megistus* (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008a; BUSSACOS; NAKAYASU; HECHT; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011; CHARNEAU; JUNQUEIRA; COSTA; PIRES *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ-VARGAS; GIL; LOZANO; PEDRAZA-ESCALONA *et al.*, 2017).

No sialotranscriptoma do *T. infestans*, foi descrita uma serino protease, denominada Triapsina, que tem a ativação da trialisina como função sugerida (AMINO; MARTINS; PROCOPIO; HIRATA *et al.*, 2002b). No entanto, no sialotranscriptoma do *T. sordida* não foi encontrada nenhuma sequência codante para triapsina.

Alguns homólogos das Trialisina curta/Trialisina estão presentes no veneno de hemípteros predadores, por exemplo em *Pristhesancus plagipennis*, *Platymeris biguttatus* e *Psytalla horrida*. Assim como a saliva de artrópodes hematofágos, o veneno destes insetos predadores possui uma complexa variedade de proteínas. No

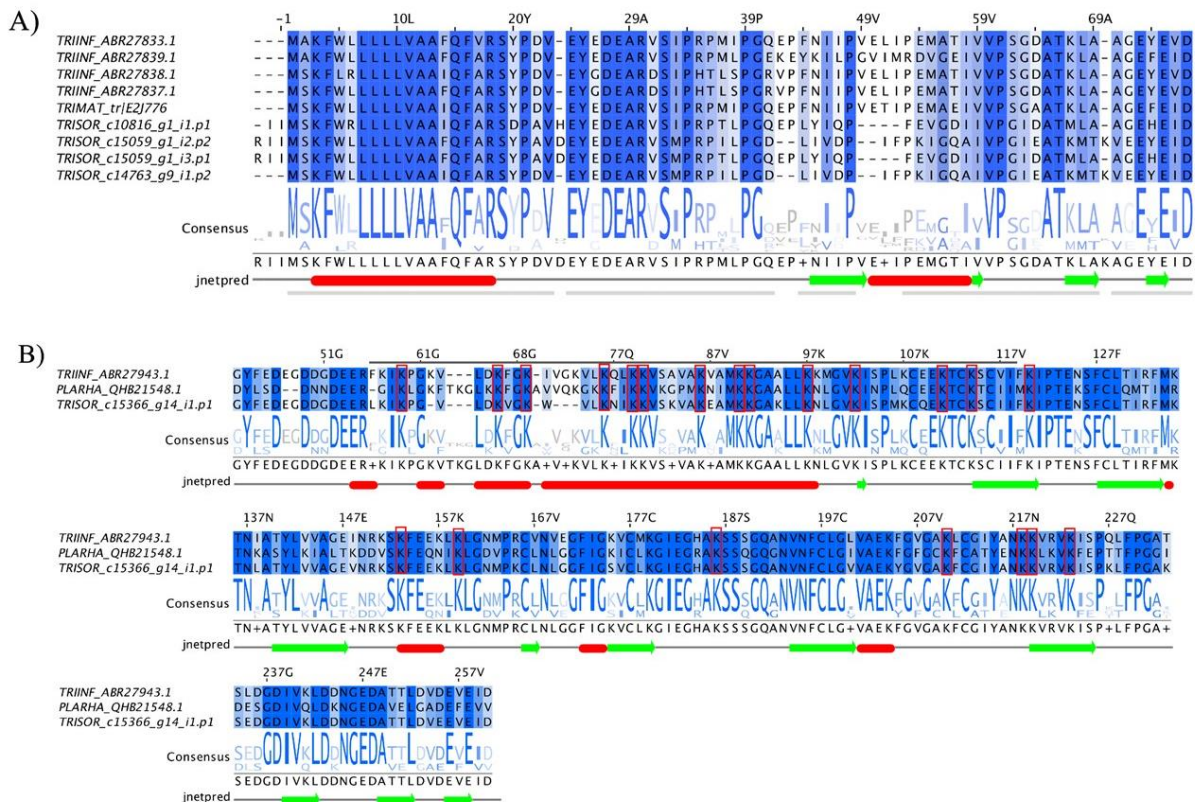
veneno destes hemípteras, a atividade citolítica pode estar relacionada com a liquefação dos tecidos da presa, facilitando a alimentação. Nestes insetos, uma sequência codante para uma toxina citolítica homóloga à trialisina foi descrita, denominada redulisina (FISCHER; WIELSCH; HECKEL; VILCINSKAS *et al.*, 2020; WALKER; MADIO; JIN; UNDHEIM *et al.*, 2017).

Apesar do potencial lítico da trialisina ser bem estabelecido, seu papel biológico na saliva dos triatomíneos permanece desconhecido. É possível, que estas proteínas tenham uma função antimicrobiana, controlando o crescimento de microrganismos na saliva ou ainda interferindo na resposta imune do hospedeiro (AMINO; MARTINS; PROCOPIO; HIRATA *et al.*, 2002a).

No sialoma do *T. sordida* foram encontradas 10 CDS que correspondem a 30,3% do FPKM total da classe Secretadas. Destas, 4 são altamente expressas, Hem-c15059_g2_i1.p1 (FPKM= 9,4%), Hem-c10816_g1_i1.p1 (FPKM= 7,8%), Hem-c15059_g1_i2.p2 (FPKM= 3,5%), Hem-c14763_g9_i1.p2 (FPKM= 1,9%). As 2 sequências mais expressas neste trabalho, fazem parte deste grupo, sendo elas Hem-c15059_g2_i1.p1 e Hem-c10816_g1_i1.p1. No proteoma foram encontradas 2 sequências, Hem-c11062_g1_i1.p2 (Ce= 0,6%) e Hem-c15366_g14_i1.p1 (Ce= 7,8%), que correspondem a 8,5% do total da Ce. Todas as sequências de trialisina citadas estão entre as 50 mais expressas, o que sugere que este grupo de proteínas é essencial para o *T. sordida*. A alta expressão das sequências Trialisina curta/Trialisina presentes nas glândulas salivares e na saliva de triatomíneos é relatada pela primeira vez no sialoma do *T. sordida*.

As sequências de Trialisina curta das espécies *T. sordida*, *T. infestans* e *T. matogrossensis* são altamente conservadas (Figura 9A), assim como a trialisina de *T. sordida*, *T. infestans* e *P. rhadamanthus* (Figura 9B).

Figura 9 – Trialisinas do sialotranscriptoma do *Triatoma sordida*. A) Alinhamento de múltiplas seqüências de trialisina curta retiradas do sialotranscriptoma de *T. sordida* (TRISOR_C10816_g1_i1.p1; TRISOR_c15059_g1_i2.p2; TRISOR_c15059_g1_i3.p1; TRISOR_c14763_g9_i1.p2) e outros homólogos das seqüências de Trialisina das seguintes espécies: *T. infestans* (TRIINF_ABR27833.1; TRIINF_ABR27839.1; TRIINF_ABR27838.1 e TRIINF_ABR27837.1), *T. matogrossensis* (TRIMAT_tr/E2J776). B) Alinhamento de múltiplas seqüências de Trialisinas extraídas do sialotranscriptoma de *T. sordida* (TRISOR-c_15366_g14_i1.p1) e duas seqüências de homólogos das seguintes espécies: *T. infestans* (TRIINF_ABR27943.1) que corresponde a uma trialisina e *P. rhadamanthus* (PLARHA_QHB21548.1) que corresponde a uma redulicina. Os alinhamentos indicam resíduos conservados numa escala de azul; a barra cinza marca o motivo consenso das Trialisinas o retângulo vermelho marca os resíduos de Lisina (K). O logotipo da seqüência múltipla, a altura dos símbolos dentro da pilha indica a frequência relativa de cada aminoácido naquela posição. As previsões da estrutura secundária foram inferidas usando a Previsão da Estrutura JNET. A seqüência para a qual a previsão foi feita é a primeira no alinhamento.



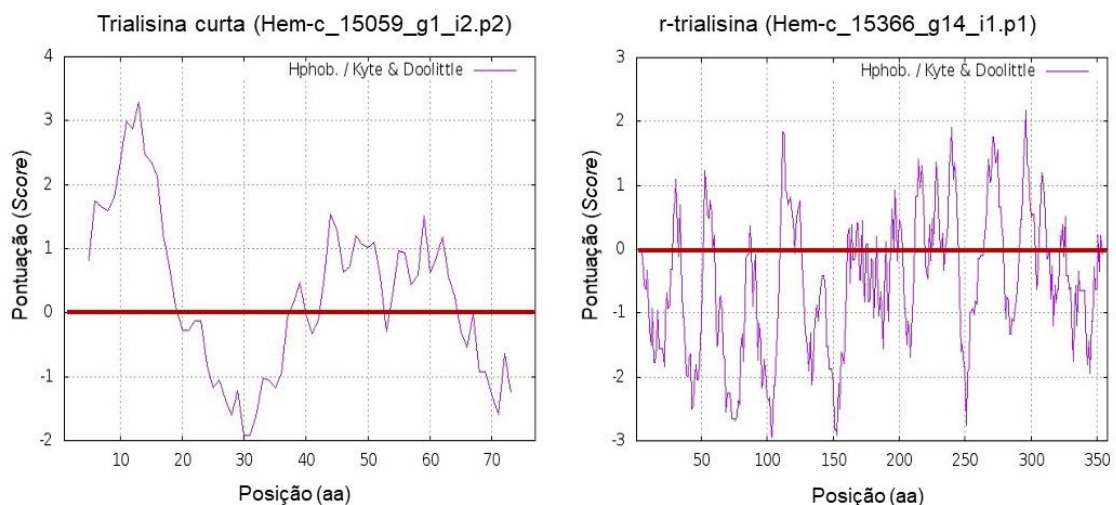
Fonte: Adaptado para esta tese (PRAÇA; SANTIAGO; CHARNEAU; MANDACARU *et al.*, 2022).

Além disso, a predição da estrutura secundária indica a presença de α -hélice no N-terminal das trialisinas curtas e r-trialisina. Também foi percebido, que as trialisinas curtas não possuem muitas lisinas (K) e são homólogas à região N terminal presente na r-trialisina encontrada no *T. infestans*. A seqüência encontrada no *T. sordida*, quando comparada com as espécies *T. infestans* e *P. rhadamanthus*,

apresentou uma predição de função lítica, conservada entre as espécies em questão, este dado está demonstrado na Figura 9B, sendo indicado por uma barra cinza acima do alinhamento. Estes padrões que são compartilhados entre as sequências, sugerem uma dobra estrutural comum e função biológica entre elas.

Realizamos a análise de hidrofobicidade de Kyte e Doolittle e como resultado, a sequência Hem-c_15059_g1_i2.p2 que corresponde a uma Trialisina curta apresentou uma região com alto nível de hidrofobicidade localizada no N terminal e uma em menor nível no C terminal da sequência (Figura 10). A sequência Hem-c_15366_g14_i1.p1 (r-trialisina) apresentou diversos trechos hidrofóbicos e hidrofílicos que podem ser percebidos no gráfico (Figura 10). Os aminoácidos que são prováveis responsáveis pela hidrofobicidade das sequências parecem compor parte das α -hélices preditas e podem dobrar em domínios que abrangem a membrana.

Figura 10 – Gráfico de hidrofobicidade de Kyte e Doolittle das Trialisinas do sialotranscriptoma do *T. sordida*. Os aminoácidos hidrofóbicos estão representados acima da linha 0 e o aminoácidos hidrofílicos abaixo da linha 0.



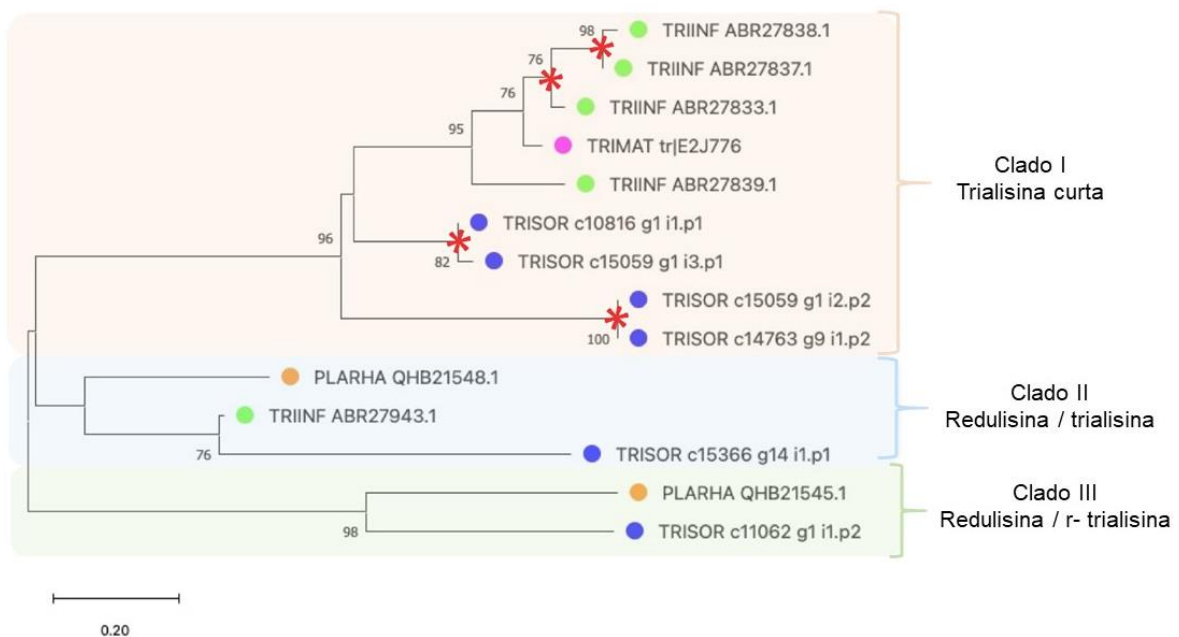
Fonte: Adaptado para esta tese (PRAÇA; SANTIAGO; CHARNEAU; MANDACARU *et al.*, 2022).

Percebendo que as sequências eram altamente conservadas entre as espécies, e em busca de relações evolutivas entre as sequências de trialisina e redulisina foi realizada uma análise filogenética. O resultado da árvore filogenética mostrou que as trialisinas curtas das espécies *T. infestans*, *T. matogrossensis* e *T. sordida* são monofiléticas e se agruparam no clado I. Também foi demonstrado na árvore que houve eventos de duplicação gênica, referenciados pelo asterisco

vermelho na Figura 11, que são os responsáveis pelos homólogos da trialisina curta encontrados nas espécies *T. infestans* e *T. sordida*.

Além disso, é possível constatar que o clado I e o clado II são ortólogos ao clado III, o que sugere, que a trialisina curta e a r-trialisina foram recrutadas para a saliva/veneno antes da separação entre hemipteras hematófagos e predadores (Figura 11).

Figura 11 – Árvore filogenética das Trialisinas do sialotranscriptoma do *Triatoma sordida*. A distância entre as sequências de trialisinas é derivada do alinhamento feito das sequências retiradas do sialotranscriptoma de *T. sordida* (CDS) e sequências homólogas das trialisinas de Hemipteras, extraídas do banco de dados NR do NCBI, aplicando o algoritmo PSI-BLAST. Os pontos coloridos, correspondem as espécies de cada sequência que foi utilizada. Azul – *T. sordida*; Laranja- *P. rhadamanthus*; Rosa – *T. matogrossensis*; e Verde – *T. infestans*. Os asteriscos em vermelho correspondem aos eventos de duplicação dos genes. O número de nós, indica os valores de *bootstrap*. A escala no canto esquerdo inferior mede a distância evolutiva em substituições por aminoácidos.



Fonte: Adaptado para esta tese (PRAÇA; SANTIAGO; CHARNEAU; MANDACARU *et al.*, 2022).

5.3.4. MYS/Hemolisina

As hemolisinas são proteínas capazes de lisar os eritrócitos para a aquisição de ferro. Elas são encontradas em vários gêneros bacterianos, sendo capazes de transpor uma enorme quantidade de células, formando poros e assim causando danos às células (ROWE; WELCH, 1994; WELCH, 1991; 2001). Existem sequências homólogas a estas proteínas, presentes no veneno de artrópodes, como por exemplo

no predador *P. plagipennis*, onde a sua expressão parece ser abundante (WALKER; MADIO; JIN; UNDHEIM *et al.*, 2017). Sua função sugerida é um papel na defesa contra uma ameaça, inibindo possíveis infecções (ROWE; WELCH, 1994). Sua presença também foi descrita nos venenos das espécies *P. biguttatus* e *P. horrida* (FISCHER; WIELSCH; HECKEL; VILCINSKAS *et al.*, 2020). Em triatomíneos, já foi descrita em alguns sialotranscriptomas (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020).

A função hemolítica destas moléculas, sugerida em triatomíneos, desempenha papel fundamental quando se fala em hematofagia, pois, para que seja feita a digestão do sangue, a lise dos eritrócitos é essencial e parece razoável, que os hematófagos tenham a necessidade de moléculas como as *MYS/Hemolisina* para que estas células sejam rompidas antes de chegarem ao intestino médio. Sendo assim, a teoria, é de que estas proteínas estão envolvidas no estágio inicial da digestão do sangue e também na imunidade participando da lise de micro-organismos (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008a).

No sialotranscriptoma do *T. sordida* foram encontradas 17 CDS que correspondem a 1,7% do FPKM total da classe de proteínas secretadas. Destas, 2 CDS estão entre as 100 mais expressas (Hem-c14970_g1_i1.p1 e Hem-c14423_g1_i3.p1) e, no proteoma esta classificação foi representada por 2 sequências (Hem-c14970_g1_i4.p1 e Hem-c14970_g1_i1.p1) que correspondem a 1,2% Ce. Aplicando a ferramenta PSI-BLAST com as sequências de *MYS/Hemolisina* de *T. sordida* contra o banco de dados NR, obtivemos sequências homólogas de espécies de triatomíneos (*T. infestans*, *R. prolixus*, *P. chinai* e *T. dimidiata*) e de hemípteros predadores (*P. plagipennis* e *P. rhadamanthus*).

5.4. Outras proteínas salivares secretadas

5.4.1. Triatox

No sialoma do *T. sordida* foi encontrada 1 sequência (Hem-c12412_g1_i1.p1) que codifica para Triatox (FPKM= 0,8% Secretadas e Ce= 3,6%). Esta molécula, foi descrita em *T. infestans* e parece atuar na imunidade inata do inseto como um peptídeo antimicrobiano. Esta função foi sugerida após a predição de sua estrutura secundária, uma α -hélice anfipática (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008a; CHARNEAU; JUNQUEIRA; COSTA; PIRES *et al.*, 2007). Os peptídeos lineares que, podem assumir essa conformação anfipática estão entre os

mais abundantes na natureza, contra vários alvos microbianos (GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI, 2001).

5.4.2. Inibidores de protease

Os inibidores de protease, são amplamente distribuídos nos organismos, desempenhando papéis fundamentais em diferentes processos biológicos. Em artrópodes hematófagos, os inibidores de protease do tipo serina, são frequentemente relatados nos sialomas (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020; SANTIAGO; DE ARAÚJO; MOTTA; PRAÇA *et al.*, 2017; TANAKA-AZEVEDO; MORAIS-ZANI; TORQUATO; TANAKA, 2010). Neste trabalho, como apresentado nos resultados, este grupo apresentou 69 CDS que estão divididos em 6 subgrupos (Tabela 5).

5.4.2.1. Inibidores de serino protease do tipo Kazal

A família I1 dos inibidores de serino protease do tipo Kazal é encontrada em diferentes organismos e atua em diversos mecanismos fisiológicos (LASKOWSKI; KATO, 1980; RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2010). Em mamíferos, é conhecida por atuar na cascata de coagulação; em artrópodes no processo de coagulação da hemolinfa, na metamorfose e na cascata pro-enoloxidasas, que é responsável pela melanização de patógenos, um dos principais mecanismos de defesa em insetos (ALONSO; MARTINEZ, 2017; JIANG; KANOST, 2000; KANOST, 1999). São proteínas pequenas, onde o domínio Kazal apresenta entre 40 e 60 aminoácidos contendo 6 resíduos de cisteína conservados que se agrupam e formando pontes dissulfeto. Essas proteínas podem ter domínios únicos ou múltiplos. Além disso, apresentam especificidade contra enzimas-alvo e uma alta capacidade inibitória (FRIEDRICH; KRÖGER; BIALOJAN; LEMAIRE *et al.*, 1993; RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2010; VAN DE LOCHT; LAMBA; BAUER; HUBER *et al.*, 1995).

Dentre as funções que os inibidores de serino protease do tipo Kazal desempenham, as seguintes foram descritas nos invertebrados: ação anticoagulante (ARAÚJO; CAMPOS; TANAKA; SANTOS *et al.*, 2007; CAMPOS, I.; AMINO, R.; SAMPAIO, C.; AUERSWALD, E. *et al.*, 2002; FRIEDRICH; KRÖGER; BIALOJAN; LEMAIRE *et al.*, 1993; KATO; JOCHIM; GOMEZ; TSUNEKAWA *et al.*, 2017), antibacteriana (DONPUDSA; TASSANAKAJON; RIMPHANITCHAYAKIT, 2009; KIM;

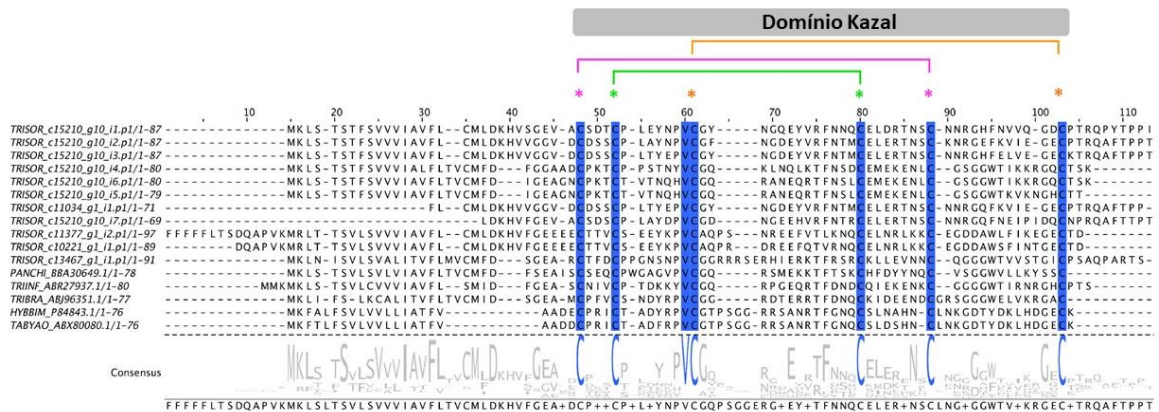
LEE; ZOU; WAN *et al.*, 2013; SOARES; BUARQUE; QUEIROZ; GOMES *et al.*, 2015), vasodilatadora (SANTOS, ADRIANA; RIBEIRO, JOSÉ MARCOS C.; LEHANE, MICHEL J.; GONTIJO, NELDER FIGUEIREDO *et al.*, 2007; TAKÁC; NUNN; MÉSZÁROS; PECHÁNOVÁ *et al.*, 2006) e anti-tripanosossoma (LOVATO; AMINO; GONZÁLEZ; MIRANDA *et al.*, 2011). Em meio aos membros da família Reduviidae, a rodinina da espécie *R. prolixus*, que possui 2 domínios do tipo Kazal descritos, apresenta afinidade pela trombina (FRIEDRICH; KRÖGER; BIALOJAN; LEMAIRE *et al.*, 1993). Em *T. infestans*, a infestina apresenta 4 domínios do tipo Kazal, e tem afinidade pela trombina, tripsina, pelos fatores -XIIa, Xa, e pela plasmina (CAMPOS, I.; AMINO, R.; SAMPAIO, C.; AUERSWALD, E. *et al.*, 2002; CAMPOS; TANAKA-AZEVEDO; TANAKA, 2004; LOVATO; NICOLAU DE CAMPOS; AMINO; TANAKA, 2006). Na espécie *D. maxima*, o gene que codifica para dipetalogastina é descrito como tendo 6 domínios do tipo Kazal, porém, sofre mudanças pós-traducionais que clivam esta sequência em 3, deixando em cada uma delas 2 domínios do tipo Kazal. Esta, possui uma alta afinidade pela trombina e uma baixa afinidade pela tripsina e pela plasmina (MENDE; LANGE; NOWAK, 2004). Porém, estes inibidores de serino protease do tipo Kazal com funções já descritas, estão presentes no intestino e não nas glândulas salivares dos barbeiros.

Como os triatomíneos ingerem grande quantidade de sangue durante a sua alimentação, uma atividade anticoagulante parece ser essencial para evitar o aumento da viscosidade no trato digestivo, durante o armazenamento do sangue, facilitando assim a digestão (ARAUJO; CAMPOS; TANAKA; SANTOS *et al.*, 2007). Além dos inibidores de serino protease do tipo Kazal terem sido descritos nas glândulas salivares dos triatomíneos, sua presença também já foi relatada em outros animais hematófagos como: mosquitos, tabanídeos e sanguessugas (CAMPOS, I. T.; AMINO, R.; SAMPAIO, C. A.; AUERSWALD, E. A. *et al.*, 2002; LOVATO; NICOLAU DE CAMPOS; AMINO; TANAKA, 2006; RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2010).

Em *T. sordida*, dentro do grupo de inibidores de protease, este foi o mais expresso no transcriptoma. Vinte e sete (reads= 2,5% e FPKM= 12,8%) foram anotadas, destas, 11 estão entre os 100 transcritos mais expressos, e 4 deles foram identificadas no proteoma (Hem-c15210_g10_i3.p1, Hem-c15210_g10_i4.p1, Hem-c15210_g10_i2.p1 e Hem-c11377_g1_i2.p1) representando 1,4% do valor total de Ce (Tabela 6).

Estas moléculas possuem um alto potencial farmacológico. A Vasotab por exemplo, é um inibidor de serino protease do tipo Kazal encontrado na saliva de uma mosca Tabanidae da espécie *Hybomitra bimaculata*, apresenta função biológica vasoativa (TAKÁC; NUNN; MÉSZÁROS; PECHÁNOVÁ *et al.*, 2006).e inibidora de agregação plaquetária (ZHANG; GAO; SHEN; RONG *et al.*, 2014), sendo um excelente candidato para o desenvolvimento de medicamentos antitrombóticos. Esses inibidores de protease do tipo Kazal também são encontrados no veneno dos hemípteros (WALKER; ROBINSON; UNDHEIM; JIN *et al.*, 2019), o que sugere que estas moléculas derivam de uma mesma linhagem ancestral. O alinhamento das sequências de inibidores tipo Kazal, revelou sequências com alta identidade nas espécies: *P. chinai*, *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *H. bimaculata* e *Tabanus yao*. Foi demonstrado que todas as espécies possuem um domínio que codifica para 6 resíduos de cisteína, bem conservados C1:C5, C2:C4, C3:C6, com alta variabilidade no restante dos aminoácidos das sequências presentes no domínio (Figura 12).

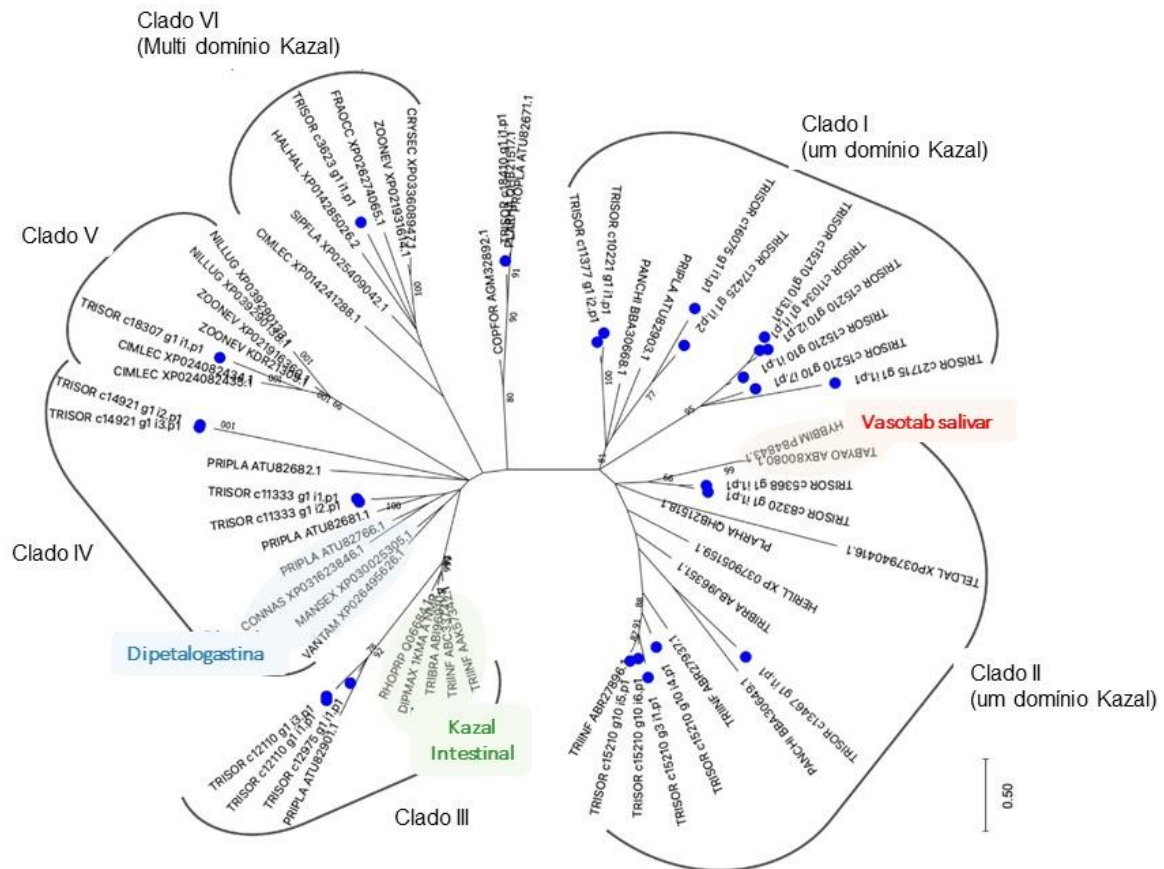
Figura 12 – Sequências de inibidores de serino protease do tipo Kazal do *Triatoma sordida*. Alinhamento múltiplo das sequências de inibidores de protease do tipo Kazal retiradas do sialotranscriptoma do *T. sordida* (TRISOR_c15210_g10_i1.p1, TRISOR_15210_g10_i2.p1; TRISOR_c15210_g10_i3.p1; TRISOR_c15210_g10_i4.p1; TRISOR_c15210_g10_i6.p1; TRISOR_c15210_g10_i5.p1; TRISOR_11034_g1_i1.p1; TRISOR_15210_g10_i7.p1; TRISOR_c11377_g1_i2.p1; TRISOR_c10221_g10_i1.p1; TRISOR_c13467_g1_i1.p1) e outras sequências homólogas de inibidores de protease do tipo Kazal das seguintes espécies: *P. chinai* (PANCHI_BBA30649.1); *T. infestans* (TRIINF_ABR27937.1); *T. brasiliensis* (TRIBRA_ABJ96351.1); *Hybomitra bimaculata* (HYBBIM_P84843.1) e *Tabanus vao* (TABYAO_ABX80080.1). O alinhamento indica resíduos conservados em azul. A barra cinza acima do alinhamento indica a região do domínio Kazal, com asteriscos coloridos (rosa, verde e laranja) mostrando o arranjo das 6 cisteínas conservadas (C1: C5, C2:C4, C3:C6). O logotipo da sequência mostra a frequência de aminoácidos no alinhamento múltiplo, a altura dos símbolos dentro da pilha corresponde a frequência relativa de cada aminoácido naquela posição.



Fonte: Adaptado para esta tese (PRAÇA; SANTIAGO; CHARNEAU; MANDACARU *et al.*, 2022).

A análise filogenética feita a partir das sequências homólogas mostra que as sequências dos inibidores do tipo Kazal encontradas no sialotranscriptoma do *T. sordida* se agrupam em clados distintos, o que indica que estas sequências são codificadas por genes diferentes e que podem se apresentar em diversas isoformas. A variedade de intradomínio e resíduos de N e C terminal, indicam que as estruturas responsáveis pelo dobramento destas proteínas são muito versáteis e permitem que diferentes sítios de ligação se encaixem em suas respectivas enzimas alvo, e assim, possam desempenhar diferentes funções. Nos clados I, II e III, é sugerido que estas sequências atuam na inibição da trombina ou com estímulos vasodilatadores, prejudicando a homeostasia do hospedeiro no local da picada, já no clado VI a sua função parece ser distinta, não estando envolvida no processo de repasto sanguíneo do *T. sordida* (Figura 13).

Figura 13 – Filograma dos inibidores de protease do tipo Kazal. A distância entre as sequências da árvore foi determinada pelo alinhamento das sequências dos inibidores de protease do tipo Kazal derivadas do sequenciamento das glândulas salivares com outras sequências homólogas de inibidores de protease do tipo Kazal. Os pontos azuis são as sequências do *T. sordida*. As sequências pintadas em verde são as Tipo Kazal encontradas no intestino, em vermelho as sequências do tipo Kazal encontradas nas glândulas salivares de *T. yao* as Vasotab, em azul claro



Fonte: Adaptado para esta tese. (PRAÇA; SANTIAGO; CHARNEAU; MANDACARU *et al.*, 2022)..

5.4.3. Enzimas

A análise do sialotranscriptoma do *T. sordida* apresentou uma diversidade de classificações neste grupo, 7 categorias que compreendem 3,8% do valor total de FPKM na classe das proteínas secretadas (Tabela 5). Estas enzimas, são comumente encontradas nos sialotranscriptomas de triatomíneos, 4 grupos foram mais representativos neste trabalho: INP5 (CDS= 14 e FPKM= 2%), Tripsina salivar (CDS= 8 e FPKM= 1,1), Metaloprotease (CDS= 5 e FPKM= 0,4) e Apirase salivar 79kDa (CDS= 5 e FPKM= 0,3%).

5.4.3.1. Inositol fosfato fosfatase – INP5

Os membros deste grupo, foram abundantes no sialoma do *T. sordida*, no proteoma, eles representam 16% Ce. A presença destas proteínas é comumente relatada nos sialomas de triatomíneos (*T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. matogrossensis*, *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. rubrofasciata*, *P. chinai*, *P. megistus*, *P. lignarius*)

(MIZUSHIMA; TABBABI; YAMAMOTO; KIEN *et al.*, 2020; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020). Com base no nível de expressão desta proteína neste trabalho, é possível inferir, que a INP-5 é secretada nas glândulas salivares e desempenha um papel importante na alimentação deste inseto, como já foi sugerido no sialoma do *T. rubrofasciata*. (MIZUSHIMA; TABBABI; YAMAMOTO; KIEN *et al.*, 2020). A função descrita destas moléculas, está relacionada a sinalização intracelular (RIBEIRO, J. M. C.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B., 2015).

As INP-5 são enzimas intracelulares que são responsáveis por hidrolisar o fosfato na posição 5', e, desempenham diversas funções como: crescimento celular, transdução de sinais e resposta ao stress de diversos organismos, como mamíferos, plantas e leveduras (HAKIM; BERTUCCI; CONDUIT; VUONG *et al.*, 2012)

5.4.3.2. Tripsina salivar

A tripsina é uma enzima do tipo serino protease, responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas em sequências específicas de aminoácidos, sendo importante em diversos processos fisiológicos e patológicos (MOTWANI; DE ROSA; ODELL; HALLBERG *et al.*, 2015). As serino proteases possuem uma variedade de funções, exercendo um papel chave em processos como: catabolismo de proteínas, liberação de peptídeos farmacologicamente ativos de proteínas precursoras, ativação de zimogênio, entre outras funções (RAO; TANKSALE; GHATGE; DESHPANDE, 1998).

Atualmente, existem 9 classificações para as principais famílias de proteases: Aspártico (A), Cisteino (C), Glutâmico (G) Metalo (M), Asparagino liase (N), Misto (P), Serino (S), Treonino (T) e Desconhecidas (U) (RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2016). As serino proteases são classificadas desta forma, por apresentarem em seu sítio ativo um resíduo de serina. A atuação catalítica destas proteases, envolve ligações covalentes de substratos a este aminoácido (BOND; BUTLER, 1987). Existem diversos tipos de serino protease e a tripsina está entre as mais importantes da categoria (PATEL, 2017). A tripsina, já foi descrita em triatomíneos, a triapsina, encontrada na espécie *T. infestans*, no qual é estocada como zimogênio no lúmen das glândulas salivares e só é ativada e liberada no momento do repasto sanguíneo (AMINO; TANAKA; SCHENKMAN, 2001). O papel sugerido para esta molécula é a hidrólise de receptores que estão acoplados a proteína G ativados por protease (PARs), que são responsáveis pela regulação da inflamação e a resposta a lesão (AMINO; TANAKA; SCHENKMAN, 2001). Porém, a presença de tripsina não é

exclusiva de *T. infestans*, já foi descrita no proteoma nas espécies: *P. megistus*, *R. neglectus*, *T. dimidiata* e agora em *T. sordida* (BUSSACOS; NAKAYASU; HECHT; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011; SANTIAGO, P. B.; ASSUMPÇÃO, T. C. F.; DE ARAÚJO, C. N.; BASTOS, I. M. D. *et al.*, 2016; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; CORDEIRO *et al.*, 2018; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020).

5.4.3.3. Metaloproteases

As metaloproteases, são enzimas dependentes de um íon metálico como: zinco, cobalto ou manganês para catalisar a proteólise. O íon metálico é responsável pela ativação da molécula de água no processo proteolítico (FERNANDO; FISCHER, 2020; MCKERROW; CAFFREY; KELLY; LOKE *et al.*, 2006). Já é sabido que várias metaloproteases estão envolvidas na remodelação ou ruptura do tecido por meio da digestão de componentes estruturais (MARKLAND JR, 1991; 1998). Este grupo de proteínas é muito diverso e pode assumir diversas funções a depender do organismo, tecido e do estágio de desenvolvimento, entre elas: evasão do sistema imune, inibição da coagulação, invasão da célula imune do hospedeiro, invasão do tecido do hospedeiro e atuando no metabolismo (FERNANDO; FISCHER, 2020; MCKERROW; CAFFREY; KELLY; LOKE *et al.*, 2006). Sua presença já foi descrita em cobras e em alguns artrópodes hematófagos como carrapatos, ácaros, piolhos, moscas e triatomíneos (FERNANDO; FISCHER, 2020; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020). As metaloproteases que são encontradas na saliva e no veneno destes animais, podem interferir no desequilíbrio da homeostasia. Em cobras, por exemplo, a presença desta enzima na peçonha é bem abundante, e são elas as responsáveis pela sua toxicidade, e sua atuação interfere diretamente na homeostasia, visto que provocam a hemorragia da presa por atuarem na coagulação sanguínea e na agregação plaquetária (DE QUEIROZ; DE SOUSA; DA CUNHA PEREIRA; MAMEDE *et al.*, 2017; KINI; KOH, 2016).

Em carrapatos, a sua presença é relatada nas glândulas salivares, ovários e intestino. As reprotinas são mais expressas nas glândulas salivares e as astacinas no intestino e nos ovários. Estas enzimas parecem ser essenciais para os carrapatos, pois estão envolvidas no processo de alimentação e reprodução, e por isso são excelentes alvos terapêuticos (BARNARD; NIJHOF; GASPARD; NEITZ *et al.*, 2012; FERNANDO; FISCHER, 2020). A metaloprotease 1 (MP1), identificada no sialoma da

espécie *Ixodes scapularis* é semelhante a reprotisina e atua hidrolisando o fibrinogênio, fibrina e fibronectina, evitando a formação dos coágulos sanguíneos ou dissolvendo os que foram gerados durante o repasto. Além disso, foi sugerido que a MP1 pode modular a transmissão da espiroqueta *Borrelia sp.* em hospedeiros vertebrados (DECREM; MARILLER; LAHAYE; BLASIOLI *et al.*, 2008; FRANCISCHETTI; MATHER; RIBEIRO, 2003). Metis 1 e 2 foram descritas na espécie *Ixodes ricinus* e têm função sugerida na digestão destes animais (DECREM; MARILLER; LAHAYE; BLASIOLI *et al.*, 2008). Em *Haemaphysalis longicornis* foi identificada a metaloprotease salivar HLMP1 que também é semelhante a reprotisina em larvas, ninfas e adultos e na falta dela, houve um aumento da mortalidade dos carrapatos (IMAMURA; DA SILVA VAZ; KONNAI; YAMADA *et al.*, 2009).

Em ácaros, as metaloproteases estão envolvidas no processo de clivagem do fibrinogênio, IgG e fibronectina, provavelmente suprimindo a coagulação e facilitando a evasão do sistema imune do hospedeiro (KENYON; KNOX, 2002). Em piolhos, *Pediculus humanus*, sua presença foi relatada atuando no processo de incubação dos ovos (BOWLES; YOUNG; BARKER, 2008) e a partir desta descoberta foi desenvolvida uma droga para controlar a infestação em humanos (BOWLES; HANEGRAAF; AHVENINEN; SIDGIDDI *et al.*, 2019; BOWLES; YOUNG; BARKER, 2008). Já em moscas, sua presença é descrita no intestino médio da espécie *Haematobia irritans* com provável atuação na digestão (RIBEIRO; DEBAT; BOIANI; URES *et al.*, 2019).

As metaloproteases apesar de serem descritas nas glândulas salivares de triatomíneos, *T. pallidipennis* (HERNÁNDEZ-VARGAS; GIL; LOZANO; PEDRAZA-ESCALONA *et al.*, 2017), *T. matogrossensis* (ASSUMPÇÃO; EATON; PHAM; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012), *T. infestans* (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008a), *T. dimidiata* (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; DE MOURA CORDEIRO *et al.*, 2018) e *R. neglectus* (SANTIAGO, P. B.; ASSUMPÇÃO, T. C. F.; DE ARAÚJO, C. N.; BASTOS, I. M. D. *et al.*, 2016), não possuem sua função definida até o momento. Pressupõe-se que estas moléculas devam ter função similar a dos carrapatos. No *T. sordida* membros desta classe de proteases foram identificados, mas com uma abundância e expressão baixas (5 CDS e 0,4% FPKM) (Tabela 5). Apesar disso, 1 sequência está entre as 100 proteínas mais expressas (Hem-

c13070_g1_i1.p1) (Figura 6 e ANEXO A). Não foi encontrada nenhuma sequência no proteoma (Tabela 7).

5.4.3.4. Apirase salivar 79 kDa

As apirases, são enzimas responsáveis pela hidrólise das moléculas de ATP (adenosina trifosfato) e ADP em AMP (adenosina monofosfato) e Pi (fosfato inorgânico). Por ter essa função, a apirase salivar é importante no repasto sanguíneo, uma vez que, hidrolisa o ADP, um importante agonista da agregação plaquetária no hospedeiro vertebrado. Em *T. infestans*, foi demonstrado que a apirase apresenta diferentes isoformas (CHARNEAU; JUNQUEIRA; COSTA; PIRES *et al.*, 2007; FAUDRY; ROCHA; VERNET; LOZZI *et al.*, 2004; FAUDRY; SANTANA; EBEL; VERNET *et al.*, 2006). A apirase salivar foi descrita em outros triatomíneos (RIBEIRO; SCHNEIDER; ISAIAS; JURBERG *et al.*, 1998; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020) e outros artrópodes hematófagos (LAW; RIBEIRO; WELLS, 1992).

Existem 3 famílias de apirases: CD39, 5'-nucleotidase e Cimex. A família 5'-nucleotidase foi descrita pela primeira vez em *Aedes aegypti* e tem como característica que seus membros são dependentes de íons de cálcio e/ou magnésio (CHAMPAGNE, 2005). A família Cimex, com o próprio nome sugere, foi descrita em um percevejo de cama denominado *Cimex lectularius*, e tem como característica serem moléculas exclusivamente dependentes de íons de cálcio (FRANCISCHETTI; CALVO; ANDERSEN; PHAM *et al.*, 2010). A família CD39 foi descrita em uma pulga, a *Xenopsylla cheopis*

Em 1998, Ribeiro e colaboradores mediram a atividade apirásica presente na saliva de 24 espécies de triatomíneos, entre eles o *T. sordida*. Este apresentou maior atividade ADPásica do que ATPásica, e dependência de íons de Manganês e Cobalto. As apirases apresentam variação quanto à dependência de cátions bivalentes, que somada ao pH ideal, sugere que sua atividade pode variar entre de moléculas não homólogas (RIBEIRO; SCHNEIDER; ISAIAS; JURBERG *et al.*, 1998).

5.5. Outras famílias de proteínas ubíquas

5.5.1. Antígeno 5 (Ag-5)

As proteínas classificadas pertencentes ao grupo do antígeno-5 (Ag-5) fazem parte da superfamília CAP (*Cysteine rich secretory proteins, Antigen-5 and*

Patogenesis-related 1 proteins), podem ser encontradas em diversas espécies de plantas e animais, estando envolvidas em diversos processos biológicos

Estas moléculas são encontradas comumente em veneno de insetos picadores e em artrópodes hematófagos, a primeira vez relatada foi no veneno de formigas e vespas (KING; SPANGFORT, 2000) estando comumente associadas com o desencadeamento de uma resposta alérgica forte em humanos (KING; ALAGON; KUAN; SOBOTKA *et al.*, 1983; KING; SOBOTKA; ALAGON; KOCHOUMIAN *et al.*, 1978). É comum o Ag-5 de diferentes espécies apresentarem reação cruzada, isto acontece porque os representantes desta família apresentam alto grau de homologia nas sequências (BLANK; BAZON; GROSCHE; SCHMIDT-WEBER *et al.*, 2020).

Dentre os artrópodes hematófagos o Ag-5 está presente na saliva de carrapatos (MANS; ANDERSEN; SCHWAN; RIBEIRO, 2008), moscas (AMERI; WANG; WILKERSON; KANOST *et al.*, 2008; CALJON; BROOS; DE GOEYSE; DE RIDDER *et al.*, 2009), flebotomíneos (CHARLAB; VALENZUELA; ROWTON; RIBEIRO, 1999) e mosquitos (CALVO; MANS; RIBEIRO; ANDERSEN, 2009; VALENZUELA; PHAM; GARFIELD; FRANCISCHETTI *et al.*, 2002). Em triatomíneos, sua presença já foi descrita na maioria dos sialotranscriptomas (DE ARAÚJO; BUSSACOS; SOUSA; HECHT *et al.*, 2012; MIZUSHIMA; TABBABI; YAMAMOTO; KIEN *et al.*, 2020; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020) e no sialoproteoma de apenas algumas espécies: *T. pallidipennis*, *T. dimidiata* (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; CORDEIRO *et al.*, 2018), *R. neglectus* (SANTIAGO, P. B.; ASSUMPÇÃO, T. C. F.; DE ARAÚJO, C. N.; BASTOS, I. M. D. *et al.*, 2016), *R. prolixus* (RIBEIRO; ANDERSEN; SILVA-NETO; PHAM *et al.*, 2004) e *D. maxima* (ASSUMPÇÃO, T. C.; CHARNEAU, S.; SANTIAGO, P. B.; FRANCISCHETTI, I. M. *et al.*, 2011).

O Ag-5 faz parte de um coquetel de proteínas presentes nas glândulas salivares que parecem estar envolvidas na supressão imunológica do hospedeiro ou atuando na inibição da agregação plaquetária induzida por baixas doses de colágeno (ASSUMPÇÃO; MA; SCHWARZ; REITER *et al.*, 2013).

5.5.2. Proteínas de ligação a feromônio (PBPs) e a Odorante (OBPs)

Proteínas de ligação ao feromônio (PBP) e Proteínas de ligação a Odorante (OBP) são proteínas de baixo peso molecular tendo entre 10-20 kDa, que possuem 6 resíduos de cisteína, formam 3 pontes dissulfeto e tem a capacidade de se ligar a

moléculas de odor e a moléculas de feromônio (TEGONI; CAMPANACCI; CABBILLAU, 2004). As PBPs são um subgrupo de OBPs que se ligam preferencialmente em moléculas de feromônio (WANG; MURPHY; NIX; JONES, 2020)

As OBPs são descritas como sendo moléculas essenciais para a transdução de sinais quimiossensoriais (KIM; REPP; SMITH, 1998; XU; ATKINSON; JONES; SMITH, 2005), e em insetos têm diversos papéis que vão além deste, pois, foi demonstrada sua expressão em outros tecidos como, por exemplo: tecido reprodutivo (LI; PICIMBON; JI; KAN *et al.*, 2008; SCOLARI; BENOIT; MICHALKOVA; AKSOY *et al.*, 2016; SIROT; POULSON; MCKENNA; GIRNARY *et al.*, 2008; SUN; HUANG; PELOSI; WANG, 2012; TAKEMORI; YAMAMOTO, 2009), hemolinfa (ROTHERMUND; LIOU; DAVIES; KRAUSE *et al.*, 1999), casca de ovos de mosquitos (AMENYA; CHOU; LI; YAN *et al.*, 2010; COSTA-DA-SILVA; KOJIN; MARINOTTI; JAMES *et al.*, 2013; MARINOTTI; NGO; KOJIN; CHOU *et al.*, 2014; SUN; HUANG; PELOSI; WANG, 2012) e nas glândulas salivares de alguns insetos (CELORIO-MANCERA; SUNDMALM; VOGEL; RUTISHAUSER *et al.*, 2012; JI; YU; FU; CHEN *et al.*, 2013). Em *A. aegypti*, a AeOBP22, é expressa em vários tecidos, assim como a OBP10 da mariposa *Helicoverpa armigera* (SUN; HUANG; PELOSI; WANG, 2012; WANG; MURPHY; NIX; JONES, 2020).

A maioria dos estudos sobre OBP reforça a hipótese sobre a percepção de compostos de feromônio e odor (FORSTNER; BREER; KRIEGER, 2009; GROSSE-WILDE; GOHL; BOUCHÉ; BREER *et al.*, 2007; GROSSE-WILDE; SVATOS; KRIEGER, 2006; LAUGHLIN; HA; JONES; SMITH, 2008; SYED; ISHIDA; TAYLOR; KIMBRELL *et al.*, 2006; XU; ATKINSON; JONES; SMITH, 2005), mas outros sugerem que sua função é regular o ganho/sensibilidade das respostas quimiossensoriais, pois seriam responsáveis por sequestrar os ligantes (HONSON; JOHNSON; OLIVER; PRESTWICH *et al.*, 2003; LARTER; SUN; CARLSON, 2016).

Na saliva de artrópodes hematófagos, as OBPs da família D7 foram descritas atuando para limitar a inflamação (CALVO; J.; C.; ANDERSEN, 2009; CALVO; MANS; ANDERSEN; RIBEIRO, 2006; MANS; CALVO; RIBEIRO; ANDERSEN, 2007) e a coagulação sanguínea, uma vez que tem a capacidade de sequestrar sinais pró-inflamatórios como as aminas biogênicas e leucotrienos (ISAWA; YUDA; ORITO; CHINZEI, 2002). Sua presença é importante no processo do repasto sanguíneo (CONWAY; LONDONO-RENTERIA; TROUPIN; WATSON *et al.*, 2016; ISAWA; YUDA; ORITO; CHINZEI, 2002; RIBEIRO, 2000). Em *Culex quinquefasciatus*, a

CxD7L1, uma proteína D7 longa, apresenta alta afinidade por ADP e ATP, uma propriedade que ainda não havia sido descrita em outros membros da família D7. O estudo dessa molécula sugere que ela evoluiu para aumentar a alimentação sanguínea em mamíferos, nos quais o ADP desempenha um papel importante na indução da agregação plaquetária (MARTIN-MARTIN; PAIGE; VALENZUELA LEON; GITTIS *et al.*, 2020). Em triatomíneos, sua presença já foi relatada nos sialotranscriptomas de algumas espécies: *P. lignarius*, *P. megistus*, *T. infestans*, *T. rubrofasciata*, *T. dimidiata* e *R. neglectus* (MIZUSHIMA; TABBABI; YAMAMOTO; KIEN *et al.*, 2020; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020). E no sialoproteoma apenas da espécie *T. dimidiata* (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; CORDEIRO *et al.*, 2018; SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; PRAÇA *et al.*, 2020).

Neste estudo, foram encontradas 25 CDS de OBPs e 9 de PBP (Tabela 5), além disso, 1CDS (Hem-c14678_g1_i1.p1), foi também encontrada no proteoma de *T. sordida* (Tabela 6).

5.5.3. Proteína de ligação ao hormônio juvenil

As proteínas hormônio juvenil (HJ) foram descritas pela primeira vez como “hormônios inibitórios” que atrapalhavam a metamorfose das ninfas em *R. prolixus*. Nestes trabalhos, foi visto que estes hormônios eram secretados pelas glândulas Corpora Allata (CA) que são pequenas e ficam conectadas ao cérebro do inseto, geralmente 1 par (NORIEGA, 2014; TOBE; STAY, 1985). Os JH são entregues aos tecidos alvos pela hemolinfa e estão envolvidos em diversos processos associados ao desenvolvimento e à reprodução (VILLALOBOS-SAMBUCARO; NOUZOVA; RAMIREZ; EUGENIA ALZUGARAY *et al.*, 2020; WIGGLESWORTH, 1948; WIGGLESWORTH, 1940). Os HJ junto com os ecdisteroides são responsáveis pela expressão de genes específicos, durante o desenvolvimento cada vez que o inseto faz muda e quando adulto (JONES, 1995). Outros efeitos desses hormônios são: determinação e diferenciação de casta em artrópodes sociais, estimulação de voo e migração, regulação da reprodução, controle da diapausa, resistência ao estresse e imunidade, envelhecimento e senescência, dureza e cor das cutículas (ADAMS, 2009; NORIEGA; NOUZOVA, 2020; ZHU; NORIEGA, 2016). Portanto, o HJ é um regulador crítico do desenvolvimento e fisiologia do inseto, atuando em nível molecular como moléculas de sinalização não apenas no papel de hormônio esteroide clássico, mas

em vários níveis, sendo conhecido, principalmente, pela sua capacidade de retardar a metamorfose (DUBROVSKY; BERNARDO, 2014; WHEELER; NIJHOUT, 2003).

Eles fazem parte da família de sesquiterpenoides acíclicos e foram identificados em 8 formas diferentes sendo o JHIII é o mais comum e o mais estudado em insetos (NORIEGA, 2014). Sua estrutura é de frágil manipulação e este é um dos desafios para estudar e compreender como os HJ funcionam. São relativamente apolares, lipofílicos, insolúveis em solução aquosa. Estas moléculas têm sido alvo de pesquisa para explorar sua capacidade como inseticida buscando o controle de pragas, onde os organismos modelo são baratas, gafanhotos e mariposas (NORIEGA, 2014; NORIEGA; NOUZOVA, 2020).

Os triatomíneos são hematófagos obrigatórios e é sabido que para completar a oogênese é necessário um repasto, e este processo é controlado pelo JH. Recentemente, *D. maxima* foi utilizado como um modelo experimental para entender a atuação deste hormônio neste processo, com o foco principal no papel dos JH no controle do recrutamento de lipídios e proteínas pelos oócitos (RAMOS; LEYRIA; NOUZOVA; FRUTTERO *et al.*, 2021). O JHSB3 é a forma molecular presente na hemolinfa, descrito em *R. prolixus* (VILLALOBOS-SAMBUCARO; NOUZOVA; RAMIREZ; EUGENIA ALZUGARAY *et al.*, 2020). Nas glândulas salivares, até o momento não foi descrita sua função. Neste trabalho, foram encontradas 12 CDS com baixa expressão (0% FPKM) (Tabela 5).

5.6. Classe de Proteínas constitutivas

Esta classe é formada por grupos de proteínas altamente especializadas que são responsáveis pelas funções básicas e essenciais das células, estando envolvidas em diversos processos biológicos, onde os níveis de expressão podem variar conforme o tecido, estágio de desenvolvimento e respostas às condições do meio (MOURA; LAZZARI; AGNES; ALMEIDA *et al.*, 2014). Algumas proteínas específicas serão discutidas a seguir.

5.6.1. Anexina

As anexinas são um grupo de proteínas conservadas em eucariotos, tendo sido descritas desde eucariotos unicelulares como a *Giardia* (RAYNAL; POLLARD, 1994) até em seres humanos (GERKE; MOSS, 2002; LIZARBE; BARRASA; OLMO; GAVILANES *et al.*, 2013). Sendo assim, estão envolvidas em diversos processos

biológicos como tráfego de vesículas intracelulares, interação com membranas, ligação de cálcio, liberação de ácido araquidônico, migração de leucócitos, responsáveis por afetar mediadores envolvidos na resposta inflamatória tal qual ciclo oxigenase 2 (Cox2) e óxido nítrico sintase induzível (FERLAZZO; D'AGOSTINO; MILANO; CARUSO *et al.*, 2003; GAVINS; HICKEY, 2012; LIZARBE; BARRASA; OLMO; GAVILANES *et al.*, 2013; MINGHETTI; NICOLINI; POLAZZI; GRECO *et al.*, 1999; RESCHER; GERKE, 2004). Porém, em insetos, sua função não é bem conhecida.

Em artrópodes hematófagos, a sequência da anexina foi descrita na glândula salivar de *Anopheles gambiae* (DAS; RADTKE; CHOI; MENDES *et al.*, 2010) e no intestino de triatomíneos, com função sugerida na imunidade. Nestes últimos, a anexina parece estar envolvida no controle da população da microbiota intestinal (GUMIEL; DE MATTOS; VIEIRA; MORAES *et al.*, 2020).

Apesar de não ser muito abundante, no sialoproteoma de *T. sordida* foi encontrada uma sequência de anexina (Hem-c7033_g1_p1) classificada como Proteína de exportação dentro da classe das proteínas constitutivas.

5.6.2. Proteínas de choque térmico– HSP70s

As proteínas de choque térmico (HSP- *Heat shock protein*), também denominadas chaperonas moleculares, são conhecidas por auxiliarem na manutenção da homeostase proteica celular. As chaperonas reconhecem os resíduos hidrofóbicos que ficam expostos em proteínas que estão mal enoveladas e auxiliam no enovelamento correto sem alterar a estrutura final da proteína que está sendo reparada (BALCH WILLIAM; MORIMOTO RICHARD; DILLIN; KELLY JEFFERY, 2008; JULIO, 2005; KIM; HIPPEL; BRACHER; HAYER-HARTL *et al.*, 2013)

As HSP são classificadas de acordo com sua massa molecular sendo chamadas de: HSP40, HSP60, HSP70, HSP100 e sHSP (*small heat shock protein*), ou de acordo com as interações com o substrato. Nesta última classificação, existem 3 tipos: *holders* atuam como co-chaperonas, que irão se ligar a proteína que precisa ser reparada, sem precisar do uso de ATP; enovelases que atuam diretamente no enovelamento proteico, e precisam da energia advinda da hidrólise do ATP; e as desagregases, que são capazes de interagir com as proteínas em agregação e ao hidrolisarem o ATP, liberam as proteínas do agregado para o re-enovelamento ou

degradação (FINK, 1999; KIM; HIPPI; BRACHER; HAYER-HARTL *et al.*, 2013; O. TIROLI-CEPEDA; H.I. RAMOS, 2011).

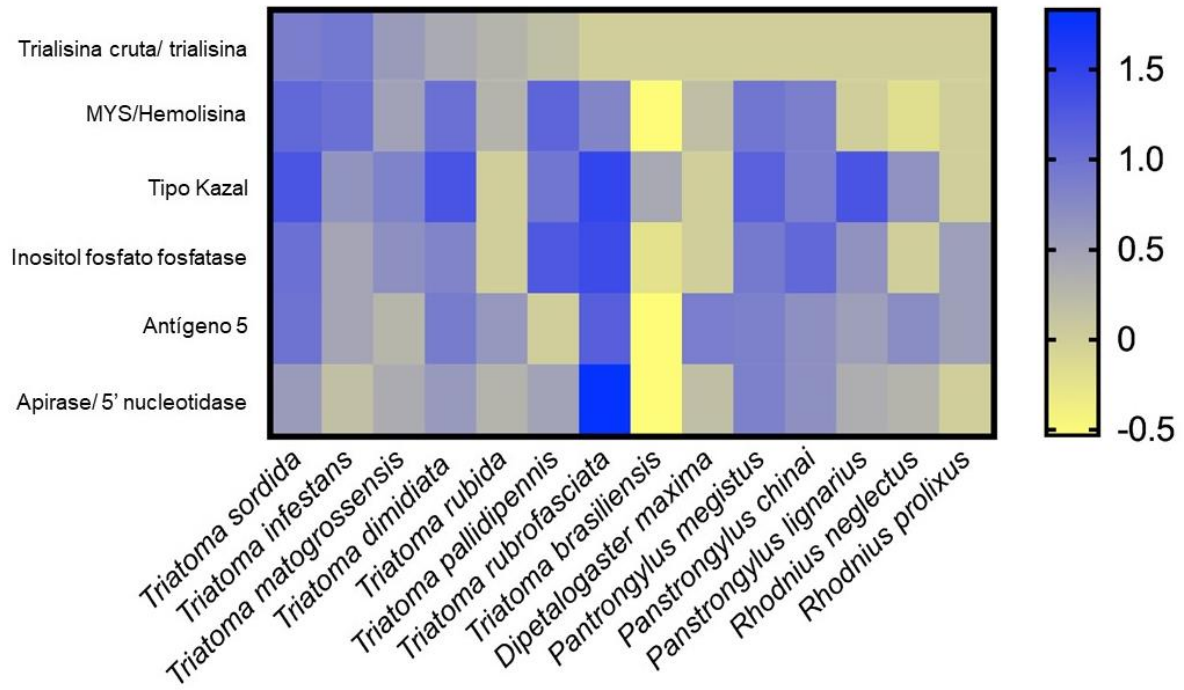
A presença dessa proteína no sialoma de triatomíneos foi relacionada a uma provável contaminação advinda do tecido celular no processo de dissecação das glândulas salivares, não sendo considerada uma proteína secretada com potencial envolvimento no processo de hematofagia (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; CORDEIRO *et al.*, 2018). Em uma pesquisa realizada com uma espécie de carrapato, *Ixodes scapularius*, foi sugerido que a HSP70, interfere na fibrinogênese do hospedeiro durante a alimentação, a hipótese é que as HSP70 são secretadas na saliva do carrapato e podem ajudar no dobramento adequado das proteínas que estão envolvidas no processo de degradação do fibrinogênio no local da picada (VORA; TAANK; DUTTA; ANDERSON *et al.*, 2017). É sabido, que os exossomos salivares podem exercer a função de entregar proteínas que exerçam funções biológicas específicas nos hospedeiros vertebrados (HACKENBERG; KOTSYFAKIS, 2018). Em nosso trabalho, 2 HSP70 foram encontradas no proteoma (Hem-c12994_g1_i1.p1 e Hem-c12645_g1_i1.p1) que foram classificadas como Proteínas de modificação na classe Proteínas constitutivas. Portanto, levando em consideração a função sugerida em carrapatos, é possível que elas possam também desempenhar uma função no processo de hematofagia. em triatomíneos.

5.6.3. Comparação dos Sialomas: *T. sordida* e outras espécies de triatomíneos

A fim de comparar a diversidade das proteínas que foram encontradas no sialoma do *T. sordida* com de outras espécies de triatomíneos, foram selecionadas a quantidade de CDS das principais famílias salivares nos sialotranscriptomas, sem distinção das técnicas (*Illumina* ou Sanger) usadas em cada trabalho, das seguintes espécies: *T. infestans* (ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI; ANDERSEN; SCHWARZ *et al.*, 2008a), *T. matogrossensis* (ASSUMPÇÃO; EATON; PHAM; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012), *T. dimidiata* (SANTIAGO; DE ARAÚJO; CHARNEAU; BASTOS; ASSUMPÇÃO; QUEIROZ; PRAÇA; CORDEIRO *et al.*, 2018), *T. rubida* (RIBEIRO; ASSUMPÇÃO; PHAM; FRANCISCHETTI *et al.*, 2012), *T. pallidipennis* (HERNÁNDEZ-VARGAS; GIL; LOZANO; PEDRAZA-ESCALONA *et al.*, 2017), *T. rubrofasciata* (MIZUSHIMA; TABBABI; YAMAMOTO; KIEN *et al.*, 2020), *T. brasiliensis* (SANTOS, ADRIANA; RIBEIRO, JOSÉ MARCOS C.; LEHANE, MICHEL J.; GONTIJO, NELDER

FIGUEIREDO *et al.*, 2007), *D. maxima* (ASSUMPÇÃO, T. C. F.; CHARNEAU, S.; SANTIAGO, P. B. M.; FRANCISCHETTI, I. M. B. *et al.*, 2011), *P. megistus* (RIBEIRO, J. M.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M., 2015), *P. chinai* (KATO; JOCHIM; GOMEZ; TSUNEKAWA *et al.*, 2017), *P. lignarius* (NEVOA; MENDES; DA SILVA; SOARES *et al.*, 2018), *R. neglectus* (SANTIAGO, P. B.; ASSUMPÇÃO, T. C.; DE ARAÚJO, C. N.; BASTOS, I. M. D. *et al.*, 2016) e *R. prolixus* (RIBEIRO; CHARLAB; PHAM; GARFIELD *et al.*, 2004) (Figura 14).

Figura 14 – Heatmap representando o perfil de expressão de CDS salivares. As linhas representam as famílias de proteínas salivares e as colunas as espécies de Triatomíneos. A escala azul-amarela: o azul representa uma alta quantidade de CDS e o amarelo uma baixa quantidade de CDS.



Fonte: Adaptado para esta tese (PRAÇA; SANTIAGO; CHARNEAU; MANDACARU *et al.*, 2022)..

A diferença das contagens de CDS das espécies foram estatisticamente significativas ($P < 0,001$), quando analisadas pelo teste Qui-quadrado. O resultado desta comparação, mostra que a família *Kazal Type* é abundante em diversas espécies (*T. sordida*, *T. matogrossensis*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *P. megistus* e *P. lignarius*). Mas, se destaca em 4, isso pode ser visto pela escala azul na figura 14. A família *MYS/hemolysin* foi observada em *T. sordida*, *T. infestans*, *T. matogrossensis*, *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *P. megistus* e *P. chinai*. As *Short tryalisin/trialysin* são proteínas muito abundantes no *T. sordida* e apenas em mais 2 espécies, *T. infestans* e *T. matogrossensis*.

Estes resultados sugerem que cada espécie possui uma “assinatura” de expressão salivar diferente.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, o perfil de expressão das proteínas presentes nas glândulas salivares e na saliva do *T. sordida*, coletado em ambiente peridomiciliar, foi descrito pela primeira vez. As famílias de proteínas relacionadas à hematofagia foram as mais abundantes. Assim como em sialomas de outras espécies de triatomíneos, em *T. sordida*, a família mais abundante é a Lipocalina. Esta família, evoluiu por meio expansão específica de linhagem, duplicação gênica. Uma característica interessante neste sialoma é a abundância das Trialisinas curtas/Trialisinas. Também, foi relatada pela primeira vez, apesar do baixo nível de expressão a presença da proteína Anexina que não havia sido relatada em nenhum outro sialoma de triatomíneos. É possível que esta proteína esteja envolvida no processo de imunidade do inseto. As proteínas de choque térmico também estão presentes, apesar de estarem classificadas como *housekeeping*

Portanto, nosso trabalho revelou uma diversidade de proteínas salivares que possuem um potencial farmacológico, uma vez que são descritas atuando no sistema imune e hemostático do hospedeiro. Diante do exposto, este trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento sobre estas moléculas, trazendo informações específicas da espécie, e para o entendimento da evolução de algumas famílias de proteínas em hemípteros e no processo de hematofagia, entendimento da biologia destes vetores, podendo traçar estratégias mais assertivas para o controle vetorial além dos potenciais fármacos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. E. Chapter 146 - Juvenile Hormones. *In*: RESH, V. H. e CARDÉ, R. T. (Ed.). **Encyclopedia of Insects (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 541-546.
- AGUILAR, H. M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J. C. P.; JUNQUEIRA, A. C. V. *et al.* Chagas disease in the Amazon region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102, p. 47-56, 2007.
- ALEVI, K. C.; DE OLIVEIRA, J.; GARCIA, A. C.; CRISTAL, D. C. *et al.* *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): A New Species of Argentinian Chagas Disease Vector Described Based on Integrative Taxonomy. **Insects**, 11, n. 12, 2020.
- ALONSO, J.; MARTINEZ, M. Insights into the molecular evolution of peptidase inhibitors in arthropods. **PLoS one**, 12, n. 11, p. e0187643, 2017.
- ALVARENGA, P. H.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; CALVO, E.; SÁ-NUNES, A. *et al.* The Function and Three-Dimensional Structure of a Thromboxane A2/Cysteinyl Leukotriene-Binding Protein from the Saliva of a Mosquito Vector of the Malaria Parasite. **PLOS Biology**, 8, n. 11, p. e1000547, 2010.
- ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, 116, n. 1, p. 44-52, 2007/05/01/ 2007.
- AMENYA, D. A.; CHOU, W.; LI, J.; YAN, G. *et al.* Proteomics reveals novel components of the *Anopheles gambiae* eggshell. **Journal of insect physiology**, 56, n. 10, p. 1414-1419, 2010.
- AMERI, M.; WANG, X.; WILKERSON, M.; KANOST, M. *et al.* An immunoglobulin binding protein (antigen 5) of the stable fly (Diptera: Muscidae) salivary gland stimulates bovine immune responses. **Journal of medical entomology**, 45, n. 1, p. 94-101, 2008.
- AMINO, R.; MARTINS, R. M.; PROCOPIO, J.; HIRATA, I. Y. *et al.* Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. **Journal of Biological Chemistry**, 277, n. 8, p. 6207-6213, 2002a.
- AMINO, R.; MARTINS, R. M.; PROCOPIO, J.; HIRATA, I. Y. *et al.* Trialysin, a Novel Pore-forming Protein from Saliva of Hematophagous Insects Activated by Limited Proteolysis *. **Journal of Biological Chemistry**, 277, n. 8, p. 6207-6213, 2002b.
- AMINO, R.; TANAKA, A. S.; SCHENKMAN, S. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochem Mol Biol**, 31, n. 4-5, p. 465-472, Mar 2001.
- ANDERSEN, J. F.; GUDDERRA, N. P.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; RIBEIRO, J. M. C. The role of saivary Lipocalins in Blood Feeding by *Rhodnius prolixus*. **Archives of insect Biochesmistry and Physiology**, 58, p. 97-105, 2005.
- ARAUJO, R. N.; CAMPOS, I. T.; TANAKA, A. S.; SANTOS, A. *et al.* Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. **Int J Parasitol**, 37, n. 12, p. 1351-1358, Oct 2007.

ARAUJO, R. N.; GONTIJO, N. F.; GUARNERI, A. A.; GONTIJO, A. F. *et al.* Electromyogram of the cibarial pump and the feeding process in hematophagous Hemiptera. *In: Advances in applied electromyography*: IntechOpen, 2011.

ARIËNS, R. A.; LAI, T. S.; WEISEL, J. W.; GREENBERG, C. S. *et al.* Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. **Blood**, 100, n. 3, p. 743-754, Aug 2002.

ASSUMPÇÃO, T. C.; EATON, D. P.; PHAM, V. M.; FRANCISCHETTI, I. M. *et al.* An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with fogo selvagem in South America. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 86, n. 6, p. 1005-1014, 2012.

ASSUMPÇÃO, T. C.; CHARNEAU, S.; SANTIAGO, P. B.; FRANCISCHETTI, I. M. *et al.* Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. **J Proteome Res**, 10, n. 2, p. 669-679, Feb 2011.

ASSUMPÇÃO, T. C.; MA, D.; SCHWARZ, A.; REITER, K. *et al.* Salivary antigen-5/CAP family members are Cu²⁺-dependent antioxidant enzymes that scavenge O₂⁻ and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst. **J Biol Chem**, 288, n. 20, p. 14341-14361, May 2013.

ASSUMPÇÃO, T. C. F.; CHARNEAU, S.; SANTIAGO, P. B. M.; FRANCISCHETTI, I. M. B. *et al.* Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of *Dipetalogaster maxima*. **Journal of Proteome Research**, 10, n. 2, p. 669-679, 2011/02/04 2011.

ASSUMPÇÃO, T. C. F.; EATON, D. P.; PHAM, V. M.; FRANCISCHETTI, I. M. B. *et al.* An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with fogo selvagem in South America. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 86, n. 6, p. 1005-1014, 2012/06// 2012a.

ASSUMPÇÃO, T. C. F.; EATON, D. P.; PHAM, V. M.; FRANCISCHETTI, I. M. B. *et al.* An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with fogo selvagem in South America. **Am J Trop Med Hyg.** 86(6): 1005-1014. p. 2012b.

ASSUMPÇÃO, T. C. F.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; ANDERSEN, J. F.; SCHWARZ, A. *et al.* An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 38, n. 2, p. 213-232, 2008/02/01/ 2008a.

ASSUMPÇÃO, T. C. F.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; ANDERSEN, J. F.; SCHWARZ, A. *et al.* An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* a vector of Chagas' disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 38, p. 213-232, 2008b.

BALCH WILLIAM, E.; MORIMOTO RICHARD, I.; DILLIN, A.; KELLY JEFFERY, W. Adapting Proteostasis for Disease Intervention. **Science**, 319, n. 5865, p. 916-919, 2008/02/15 2008.

BARNARD, A.-C.; NIJHOF, A. M.; GASPAR, A. R. M.; NEITZ, A. W. H. *et al.* Expression profiling, gene silencing and transcriptional networking of metzincin metalloproteases in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, 186, n. 3, p. 403-414, 2012/05/25/ 2012.

BELINTANI, T.; OLIVEIRA, J.; PINOTTI, H.; SILVA, L. A. *et al.* Phylogenetic and phenotypic relationships of the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Acta Tropica**, 212, p. 105679, 2020.

BENNET-CLARK, H. C. Negative pressures produced in the cibarial pump of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. **J. Exp. Biol**, 40, p. 223-229, 1963.

BENSIMON, A.; HECK, A. J. R.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry–Based Proteomics and Network Biology. **Annual Review of Biochemistry**, 81, n. 1, p. 379-405, 2012/07/07 2012.

BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, 373, n. 5, p. 456-466, 2015.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. **Clinical microbiology reviews**, 24, n. 4, p. 655-681, 2011.

BLANK, S.; BAZON, M. L.; GROSCH, J.; SCHMIDT-WEBER, C. B. *et al.* Antigen 5 allergens of hymenoptera venoms and their role in diagnosis and therapy of venom allergy. **Current Allergy and Asthma Reports**, 20, n. 10, p. 1-13, 2020.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BOND, J. S.; BUTLER, P. E. Intracellular proteases. **Annu Rev Biochem**, 56, p. 333-364, 1987.

BOWLES, V. M.; HANEGRAAF, S.; AHVENINEN, T.; SIDGIDDI, S. *et al.* Effect of a New Head Lice Treatment, Abametapir Lotion, 0.74%, on Louse Eggs: A Randomized, Double-Blind Study. **Glob Pediatr Health**, 6, p. 2333794x19831295, 2019.

BOWLES, V. M.; YOUNG, A. R.; BARKER, S. C. Metalloproteases and egg-hatching in *Pediculus humanus*, the body (clothes) louse of humans (Phthiraptera: Insecta). **Parasitology**, 135, n. 1, p. 125-130, 2008.

BRAGA EMIDIO, N.; GIRARDI CARPANEZ, A.; RAMOS QUELLIS, L.; SILVA FARANI, P. *et al.* Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, 41, n. 3 e 4, 04/19 2016.

BRAVO, G. R. F.; VASCONCELOS, A. A. R.; TAVARES, F. S.; GRACHETE, G. T. *et al.* FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DE *Triatoma sordida* (STAL, 1859)(HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE) SEGUNDO NOTIFICAÇÃO FEITA PELA POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE RONDONÓPOLIS, MT. **Biodiversidade**, 18, n. 1, 2019.

BROOS, K.; FEYS, H. B.; DE MEYER, S. F.; VANHOORELBEKE, K. *et al.* Platelets at work in primary hemostasis. **Blood reviews**, 25, n. 4, p. 155-167, 2011/07// 2011.

BROWN, J.; PIRRUNG, M.; MCCUE, L. A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. **Bioinformatics**, 33, n. 19, p. 3137-3139, 2017.

BUSSACOS, A. C.; NAKAYASU, E. S.; HECHT, M. M.; ASSUMPÇÃO, T. C. *et al.* Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures

prolonged procurement for blood meals. **J Proteomics**, 74, n. 9, p. 1693-1700, Aug 2011.

CALJON, G.; BROOS, K.; DE GOEYSE, I.; DE RIDDER, K. *et al.* Identification of a functional Antigen5-related allergen in the saliva of a blood feeding insect, the tsetse fly. **Insect biochemistry and molecular biology**, 39, n. 5-6, p. 332-341, 2009.

CALVO, E.; J., M. B.; C., R. J. M.; ANDERSEN, J. F. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein **PNAS**, 106(10), p. 3728-3733, 2009.

CALVO, E.; MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. **J Biol Chem**, 281, n. 4, p. 1935-1942, Jan 2006.

CALVO, E.; MANS, B. J.; RIBEIRO, J. M.; ANDERSEN, J. F. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 10, p. 3728-3733, Mar 2009.

CAMPOS, I.; AMINO, R.; SAMPAIO, C.; AUERSWALD, E. *et al.* Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. **Insect biochemistry and molecular biology**, 32, n. 9, p. 991-997, 2002.

CAMPOS, I. T.; AMINO, R.; SAMPAIO, C. A.; AUERSWALD, E. A. *et al.* Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. **Insect Biochem Mol Biol**, 32, n. 9, p. 991-997, Sep 2002.

CAMPOS, I. T. N.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; TANAKA, A. S. Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **FEBS Letters**, 577, n. 3, p. 512-516, 2004/11/19 2004. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.052>.

CANAVOSO, L. E.; RUBIOLLO, E. R. Interconversions of lipophorin particles by adipokinetic hormone in hemolymph of *Panstrongylus megistus*, *Dipetalogaster maximus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 112, n. 1, p. 143-150, 1995.

CARVALHO, P. C.; LIMA, D. B.; LEPREVOST, F. V.; SANTOS, M. D. *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nat Protoc**, 11, n. 1, p. 102-117, Jan 2016.

CASTRO, D. P.; SEABRA, S. H.; GARCIA, E. S.; SOUZA, W. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Experimental Parasitology**, 117, n. 2, p. 201-207, 2007/10/01/ 2007.

CATHERMAN, A. D.; SKINNER, O. S.; KELLEHER, N. L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 445, n. 4, p. 683-693, 2014/03/21/ 2014.

CAVALIER-SMITH, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **Eur J Protistol**, 56, p. 250-276, Oct 2016.

CELORIO-MANCERA, M. D. L. P.; SUNDMALM, S. M.; VOGEL, H.; RUTISHAUSER, D. *et al.* Chemosensory proteins, major salivary factors in caterpillar mandibular glands. **Insect biochemistry and molecular biology**, 42, n. 10, p. 796-805, 2012/10// 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiol Haemost Thromb**, 34, n. 4-5, p. 221-227, 2005.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96, n. 26, p. 15155-15160, 1999.

CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA, M.; COSTA, C. M.; PIRES, D. L. *et al.* The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. 268, n. 2-3, p. 265-276, 2007.

CONWAY, M. J.; LONDONO-RENTERIA, B.; TROUPIN, A.; WATSON, A. M. *et al.* *Aedes aegypti* D7 Saliva Protein Inhibits Dengue Virus Infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v.10, n. 9, p. e0004941, DOI: 10.1371/journal.pntd.0004941. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/27632170>. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004941>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC5025043>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC5025043?pdf=render>. Acesso em: 2016/09//.

COSTA, C. M.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A.; SANTANA, J. M. *et al.* 2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*. **J Proteomics**, 74, n. 9, p. 1652-1663, Aug 2011.

COSTA, C. M.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O.; ROEPSTORFF, P. *et al.* 2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*. **Journal of Proteomics**, 74, p. 1652-1663, 2011.

COSTA-DA-SILVA, A. L.; KOJIN, B. B.; MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. *et al.* Expression and accumulation of the two-domain odorant-binding protein AegOBP45 in the ovaries of blood-fed *Aedes aegypti*. **Parasites & vectors**, 6, n. 1, p. 1-6, 2013.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

COUTINHO, M.; DIAS, J. C. P. A descoberta da doença de Chagas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, 16, n. 2, p. 11-51, 1999.

CROCCO, L.; CATALÁ, S. Feeding and defaecation patterns in *Triatoma sordida*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 91, p. 409-413, 1996.

DAS, S.; RADTKE, A.; CHOI, Y.-J.; MENDES, A. M. *et al.* Transcriptomic and functional analysis of the *Anopheles gambiae* salivary gland in relation to blood feeding. **BMC genomics**, 11, n. 1, p. 1-14, 2010.

DE ARAÚJO, C. N.; BUSSACOS, A. C.; SOUSA, A. O.; HECHT, M. M. *et al.* Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **J Proteomics**, 75, n. 13, p. 3829-3841, Jul 2012.

DE FIGUEIREDO, J. F.; DA SILVA, L. C.; BOLOGNEZ, C. A. Influência das agressões ecológicas na migração de triatomíneos (hemiptera: reduviidae), para os ecótopos artificiais criados pelo homem em municípios do estado de Mato Grosso. **Biodiversidade**, 6, n. 1, 2007.

DE LIMA, L. P.; POUBEL, S. B.; YUAN, Z.-F.; ROSÓN, J. N. *et al.* Improvements on the quantitative analysis of *Trypanosoma cruzi* histone post translational modifications: Study of changes in epigenetic marks through the parasite's metacyclogenesis and life cycle. **Journal of Proteomics**, 225, p. 103847, 2020/08/15/ 2020.

DE OLIVEIRA, J.; ALEVI, K. C. C.; CAMARGO, L. M. A.; DE OLIVEIRA MENEGUETTI, D. U. Atualidades em medicina tropical no Brasil: vetores. 2020.

DE QUEIROZ, M. R.; DE SOUSA, B. B.; DA CUNHA PEREIRA, D. F.; MAMEDE, C. C. N. *et al.* The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. **Toxicon**, 133, p. 33-47, 2017/07/01/ 2017.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, 2010, p. 295394, 2010/07/29 2010.

DECREM, Y.; MARILLER, M.; LAHAYE, K.; BLASIOLI, V. *et al.* The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. **International Journal for Parasitology**, 38, n. 5, p. 549-560, 2008/04/01/ 2008.

DIAS, F. D. A.; GUERRA, B.; VIEIRA, L. R.; PERDOMO, H. D. *et al.* Monitoring of the Parasite Load in the Digestive Tract of *Rhodnius prolixus* by Combined qPCR Analysis and Imaging Techniques Provides New Insights into the Trypanosome Life Cycle. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 9, n. 10, p. e0004186, 2015.

DIOTAIUTI, L.; AZEREDO, B. V. D. M.; BUSEK, S. C. U.; FERNANDES, A. J. Controle do *Triatoma sordida* no peridomicílio rural do município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 3, p. 21-25, 1998.

DIOTAIUTI, L.; LOIOLA, C.; FALCÃO, P.; DIAS, J. C. P. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 35, n. 3, p. 237-245, 1993.

DONPUDSA, S.; TASSANAKAJON, A.; RIMPHANITCHAYAKIT, V. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Dev Comp Immunol**, 33, n. 4, p. 481-488, Apr 2009.

DUARTE, C. L.; PEREIRA, E. A. A.; MARTINS, M.; MEDEIROS, M. O. *et al.* ESTUDO DOS TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) RECEBIDOS NO LABORATÓRIO

DE ENTOMOLOGIA DO CENTRO DE CONTROLE DE ZONÓSES NO MUNICÍPIO DE RONDONÓPOLIS, MT. **Biodiversidade**, 16, n. 1, 2017.

DUBROVSKY, E. B.; BERNARDO, T. J. Chapter Four - The Juvenile Hormone Receptor and Molecular Mechanisms of Juvenile Hormone Action. *In*: COHEN, E. (Ed.). **Advances in Insect Physiology**: Academic Press, 2014. v. 46, p. 305-388.

EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC bioinformatics**, 5, n. 1, p. 1-19, 2004.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, 44, n. 3, p. 210-230, 2009/04/01 2009.

FAUDRY, E.; ROCHA, P. S.; VERNET, T.; LOZZI, S. P. *et al.* Kinetics of expression of the salivary apyrases in *Triatoma infestans*. **Insect biochemistry and molecular biology**, 34, n. 10, p. 1051-1058, 2004/10// 2004.

FAUDRY, E.; SANTANA, J. M.; EBEL, C.; VERNET, T. *et al.* Salivary apyrases of *Triatoma infestans* are assembled into homo-oligomers. **The Biochemical journal**, 396, n. 3, p. 509-515, 2006/06// 2006.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F. *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large molecules. **Science**, 246(4926), p. 64-71, 1989.

FERLAZZO, V.; D'AGOSTINO, P.; MILANO, S.; CARUSO, R. *et al.* Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. **International immunopharmacology**, 3, n. 10-11, p. 1363-1369, 2003.

FERNANDO, D. D.; FISCHER, K. Proteases and pseudoproteases in parasitic arthropods of clinical importance. **The FEBS Journal**, 287, n. 19, p. 4284-4299, 2020/10/01 2020. <https://doi.org/10.1111/febs.15546>.

FINK, A. L. Chaperone-Mediated Protein Folding. **Physiological Reviews**, 79, n. 2, p. 425-449, 1999/04/01 1999.

FISCHER, M. L.; WIELSCH, N.; HECKEL, D. G.; VILCINSKAS, A. *et al.* Context-dependent venom deployment and protein composition in two assassin bugs. **Ecology and evolution**, 10, n. 18, p. 9932-9947, 2020.

FLOWER, D. R.; NORTH, A. C.; SANSOM, C. E. The lipocalin protein family: Structural and sequence overview. **Biochim. Biophys. Acta**, 1482(1-2), p. 9-24, 2000.

FORATTINI, O. P. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliaryity in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, 14, n. 3, p. 265-299, 1980.

FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 40, p. 964-998, 2006.

FORATTINI, O. P.; ROCHA E SILVA, E. O. D.; FERREIRA, O. A.; RABELLO, E. X. *et al.* Ecological aspects of South American trypanosomiasis: III-local dispersion of triatomids, with special reference to *Triatoma sordida*. **Revista de saude publica**, 5, n. 2, p. 193-205, 1971.

FORSTNER, M.; BREER, H.; KRIEGER, J. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkworm *Antheraea polyphemus*. **International journal of biological sciences**, v.5, n. 7, p. 745-757, DOI: 10.7150/ijbs.5.745. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/20011135>. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.745>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC2793307>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC2793307?pdf=render>. Acesso em: 2009/12//.

FRANCISCHETTI, I. M.; CALVO, E.; ANDERSEN, J. F.; PHAM, V. M. *et al.* Insight into the sialome of the bed bug, *Cimex lectularius*. **Journal of proteome research**, 9, n. 8, p. 3820-3831, 2010.

FRANCISCHETTI, I. M.; RIBEIRO, J. M.; CHAMPAGNE, D.; ANDERSEN, J. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, 275, n. 17, p. 12639-12650, Apr 2000.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 305, n. 4, p. 869-875, 2003/06/13/ 2003.

FRIEDRICH, T.; KRÖGER, B.; BIALOJAN, S.; LEMAIRE, H. G. *et al.* A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, 268, n. 22, p. 16216-16222, Aug 1993.

FUENTES-PRIOR, P.; NOESKE-JUNGBLUT, C.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W. D. *et al.* Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, n. 22, p. 11845-11850, Oct 1997.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. SciELO-Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. 8598203092.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D. D. S.; JURBERG, J. J. Z. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. 202, n. 1, p. 1-36, 2003.

GALVÃO, C.; GURGEL-GONÇALVES, R. Vetores conhecidos no Brasil. Curitiba Sociedade Brasileira de Zoologia: 88-170 p. 2014.

GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; WHITTEN, M. M.; GONZALEZ, M. S. *et al.* Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology**, 53, n. 1, p. 11-21, 2007/01/01/ 2007.

GARCÍA, P. Y.; ANDREU, M. G.; BERNALTIRAPO, J.; HERRERO, E. F. 2.1. Hemostasia Fisiológica Hemostasia primaria. **Manual de Utilización de Hemostáticos y Sellantes en Cirugía Experimental**, 2019.

GAVINS, F. N. E.; HICKEY, M. J. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. **Frontiers in immunology**, 3, p. 354, 2012.

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. **Physiological reviews**, 82, n. 2, p. 331-371, 2002.

GHAZALPOUR, A.; BENNETT, B.; PETYUK, V. A.; OROZCO, L. *et al.* Comparative Analysis of Proteome and Transcriptome Variation in Mouse. **PLOS Genetics**, 7, n. 6, p. e1001393, 2011.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic α helical antimicrobial peptides. **European Journal of Biochemistry**, 268, n. 21, p. 5589-5600, 2001/11/01 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.02494.x>.

GILBERT, G. E.; SIMS, P.; WIEDMER, T.; FURIE, B. *et al.* Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. **Journal of Biological Chemistry**, 266, n. 26, p. 17261-17268, 1991.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2, n. 2, p. 140-150, 2003/02/01 2003.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z. *et al.* Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature biotechnology**, 29, n. 7, p. 644, 2011.

GROSSE-WILDE, E.; GOHL, T.; BOUCHÉ, E.; BREER, H. *et al.* Candidate pheromone receptors provide the basis for the response of distinct antennal neurons to pheromonal compounds. **The European journal of neuroscience**, 25, n. 8, p. 2364-2373, 2007/04// 2007.

GROSSE-WILDE, E.; SVATOS, A.; KRIEGER, J. A pheromone-binding protein mediates the bombykol-induced activation of a pheromone receptor in vitro. **Chemical senses**, 31, n. 6, p. 547-555, 2006/07// 2006.

GUARNERI, A. A.; LORENZO, M. G. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. **Journal of Insect Physiology**, 97, p. 66-76, 2017/02/01/ 2017.

GUARNERI, A. A.; PEREIRA, M. H.; DIOTAIUTI, L. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). **Journal of medical entomology**, 37, n. 3, p. 373-379, 2000.

GUARNERI, A. A.; PEREIRA, M. H.; DIOTAIUTI, L. Influence of the Blood Meal Source on the Development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*. 37 373–379 p. 2000.

GUMIEL, M.; DE MATTOS, D. P.; VIEIRA, C. S.; MORAES, C. S. *et al.* Proteome of the Triatomine Digestive Tract: From Catalytic to Immune Pathways; Focusing on Annexin Expression. **Frontiers in molecular biosciences**, 7, 2020.

GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVÃO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A. T. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **J Trop Med**, 2012, p. 705326, 2012.

GURGEL-GONÇALVES, R.; GLAVÃO, C.; MENDONÇA, J.; NETO, E. C. M. **Guia de Triatomíneos da Bahia**. Feira de Santana - BA: 2012. 113 p. (UEFS Editora. 978-85-99799-47-5.

HACKENBERG, M.; KOTSYFAKIS, M. Exosome-Mediated Pathogen Transmission by Arthropod Vectors. **Trends in Parasitology**, 34, n. 7, p. 549-552, 2018/07/01/ 2018.

HAKIM, S.; BERTUCCI, M. C.; CONDUIT, S. E.; VUONG, D. L. *et al.* Inositol polyphosphate phosphatases in human disease. **Phosphoinositides and Disease**, p. 247-314, 2012.

HECK, A. J. R.; VAN DEN HEUVEL, R. H. H. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, 23, n. 5, p. 368-389, 2004/09/01 2004. <https://doi.org/10.1002/mas.10081>.

HEIN, M. Y.; SHARMA, K.; COX, J.; MANN, M. Proteomic analysis of cellular systems. *In: Handbook of systems biology: concepts and insights*: Academic Press, 2013. p. 3-25.

HERNÁNDEZ-VARGAS, M. J.; GIL, J.; LOZANO, L.; PEDRAZA-ESCALONA, M. *et al.* Proteomic and transcriptomic analysis of saliva components from the hematophagous reduviid *Triatoma pallidipennis*. **J Proteomics**, 162, p. 30-39, 06 2017.

HERNÁNDEZ-VARGAS, M. J.; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E.; CORZO, G. An Insight into the Triabin Protein Family of American Hematophagous Reduviids: Functional, Structural and Phylogenetic Analysis. **Toxins (Basel)**, 8, n. 2, p. 44, Feb 2016.

HONSON, N.; JOHNSON, M. A.; OLIVER, J. E.; PRESTWICH, G. D. *et al.* Structure-activity studies with pheromone-binding proteins of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Chemical senses**, 28, n. 6, p. 479-489, 2003/07// 2003.

IMAI, K.; MAEDA, T.; SAYAMA, Y.; MIKITA, K. *et al.* Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. **Emerging infectious diseases**, 20, n. 1, p. 146, 2014.

IMAMURA, S.; DA SILVA VAZ, I.; KONNAI, S.; YAMADA, S. *et al.* Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. **Experimental and Applied Acarology**, 48, n. 4, p. 345, 2009/01/29 2009.

ISAWA, H.; YUDA, M.; ORITO, Y.; CHINZEI, Y. A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. **J Biol Chem**, 277, n. 31, p. 27651-27658, Aug 2002.

JESTY, J. The inhibition of activated bovine coagulation factors X and VII by antithrombin III. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 185, n. 1, p. 165-173, 1978/01/15/ 1978.

JI, R.; YU, H.; FU, Q.; CHEN, H. *et al.* Comparative transcriptome analysis of salivary glands of two populations of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, that differ in virulence. **PloS one**, 8, n. 11, p. e79612, 2013.

JIANG, H.; KANOST, M. R. The clip-domain of serine proteinases in arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 30, p. 95-105, 2000.

JONES, G. Molecular Mechanisms of Action of Juvenile Hormone. **Annual Review of Entomology**, 40, n. 1, p. 147-169, 1995/01/01 1995.

JULIO, C. B. A. C. H. I. R. Protein Folding Assisted by Chaperones. **Protein & Peptide Letters**, 12, n. 3, p. 257-261, 2005.

JURBERG, J.; GALVAO, C. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) vectors of Chagas disease and implications for human health. . *Denisia* 19: 1095–1116 p. 2006.

KANOST, M. R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, 23, n. 4-5, p. 291-301, 1999.

KATO, H.; JOCHIM, R. C.; GOMEZ, E. A.; SAKODA, R. *et al.* A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. . **Infection, Genetics and Evolution**, 10, p. 184-191, 2010.

KATO, H.; JOCHIM, R. C.; GOMEZ, E. A.; TSUNEKAWA, S. *et al.* Salivary gland transcripts of the kissing bug, *Panstrongylus chinai*, a vector of Chagas disease. **Acta Trop**, 174, p. 122-129, Oct 2017.

KENYON, F.; KNOX, D. The proteinases of *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite—their diversity and substrate specificity. **Veterinary Parasitology**, 105, n. 4, p. 317-325, 2002/05/10/ 2002.

KIM, B. Y.; LEE, K. S.; ZOU, F. M.; WAN, H. *et al.* Antimicrobial activity of a honeybee (*Apis cerana*) venom Kazal-type serine protease inhibitor. **Toxicon**, 76, p. 110-117, Dec 2013.

KIM, M.-S.; REPP, A.; SMITH, D. P. LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 150, n. 2, p. 711-721, 1998.

KIM, Y. E.; HIPPEL, M. S.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. *et al.* Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. **Annual Review of Biochemistry**, 82, n. 1, p. 323-355, 2013/06/02 2013.

KING, T.; ALAGON, A.; KUANG, J.; SOBOTKA, A. *et al.* Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins. **Molecular immunology**, 20, n. 3, p. 297-308, 1983.

KING, T.; SOBOTKA, A.; ALAGON, A.; KOCHOUMIAN, L. *et al.* Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet, and yellow jacket venoms. **Biochemistry**, 17, n. 24, p. 5165-5174, 1978.

KING, T. P.; SPANGFORT, M. D. Structure and biology of stinging insect venom allergens. **Int Arch Allergy Immunol**, 123, n. 2, p. 99-106, Oct 2000.

KINI, R. M.; KOH, C. Y. Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites. **Toxins**, v.8, n. 10, DOI: 10.3390/toxins8100284. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/27690102>. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins8100284>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC5086644>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC5086644?pdf=render>. Acesso em: 2016/09//.

KIRCHHOFF, L. V.; RASSI JR, A. Chagas' disease and trypanosomiasis. **Harrison's principles of internal medicine. 18th edition. New York: McGraw-Hill**, p. 1716-1721, 2011.

KULKARNI, S.; DOPHEIDE, S. M.; YAP, C. L.; RAVANAT, C. *et al.* A revised model of platelet aggregation. **The Journal of clinical investigation**, 105, n. 6, p. 783-791, 2000.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C. *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, 35, n. 6, p. 1547, 2018.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças**. 10^a ed. 2010.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, 157, n. 1, p. 105-132, 1982/05/05/ 1982.

LARTER, N. K.; SUN, J. S.; CARLSON, J. R. Organization and function of Drosophila odorant binding proteins. **Elife**, 5, p. e20242, 2016.

LASKOWSKI, M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annu Rev Biochem**, 49, p. 593-626, 1980.

LAUGHLIN, J. D.; HA, T. S.; JONES, D. N. M.; SMITH, D. P. Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. **Cell**, 133, n. 7, p. 1255-1265, 2008/06// 2008.

LAVOIEPIERRE, M.; DICKERSON, G.; GORDON, R. Studies on the Methods of Feeding of Blood-sucking Arthropods: I—The Manner in Which Triatomine Bugs Obtain Their Blood-Meal, as Observed in the Tissues of the Living Rodent, with Some Remarks on the Effects of the Bite on Human Volunteers. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, 53, n. 2, p. 235-250, 1959.

LAW, J. H.; RIBEIRO, J. M.; WELLS, M. A. Biochemical insights derived from insect diversity. **Annual review of biochemistry**, 61, p. 87-111, 1992 1992.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, 163, p. 125-520, 1979.

LI, S.; PICIMBON, J.-F.; JI, S.; KAN, Y. *et al.* Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 372, n. 3, p. 464-468, 2008.

LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 51, n. 5, p. 247-253, 2009 Sep-Oct 2009.

LIZARBE, M. A.; BARRASA, J. I.; OLMO, N.; GAVILANES, F. *et al.* Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. **International journal of molecular sciences**, 14, n. 2, p. 2652-2683, 2013.

LOVATO, D. V.; AMINO, R.; GONZÁLEZ, Y.; MIRANDA, A. *et al.* Infestin 1R, an intestinal subtilisin inhibitor from *Triatoma infestans* able to impair mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, 129, n. 4, p. 362-367, 2011.

LOVATO, D. V.; NICOLAU DE CAMPOS, I. T.; AMINO, R.; TANAKA, A. S. The full-length cDNA of anticoagulant protein infestin revealed a novel releasable Kazal domain, a neutrophil elastase inhibitor lacking anticoagulant activity. **Biochimie**, 88, n. 6, p. 673-681, Jun 2006.

MADEIRA, F. F.; DELGADO, L. M. G.; BITTINELLI, I. D. F.; DE OLIVEIRA, J. *et al.* *Triatoma sordida* (Hemiptera, Triatominae) from La Paz, Bolivia: an incipient species or an intraspecific chromosomal polymorphism? **Parasites & Vectors**, 14, n. 1, p. 553, 2021/10/27 2021.

MADEIRA, F. F.; DELGADO, L. M. G.; DE FREITAS BITTINELLI, I.; SARTORI, R. Q. *et al.* Revisiting the genetic variability of Brazilian peridomestic populations of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera, Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**, 85, p. 104568, 2020.

MADEIRA, F. F.; DOS REIS, Y. V.; DE FREITAS BITTINELLI, I.; DELGADO, L. M. G. *et al.* Genetic Structure of Brazilian Populations of *Triatoma sordida* (Stål, 1859)(Hemiptera, Triatominae) by Means of Chromosomal Markers. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 100, n. 4, p. 907-910, 2019.

MAKAROV, A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. **Analytical Chemistry**, 72, n. 6, p. 1156-1162, 2000/03/01 2000.

MALJKOVIC BERRY, I.; MELENDREZ, M. C.; BISHOP-LILLY, K. A.; RUTVISUTTINUNT, W. *et al.* Next Generation Sequencing and Bioinformatics Methodologies for Infectious Disease Research and Public Health: Approaches, Applications, and Considerations for Development of Laboratory Capacity. **The Journal of Infectious Diseases**, 221, n. Supplement_3, p. S292-S307, 2020.

MALLICK, P.; KUSTER, B. Proteomics: a pragmatic perspective. **Nature Biotechnology**, 28, n. 7, p. 695-709, 2010/07/01 2010.

MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; SCHWAN, T. G.; RIBEIRO, J. M. Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family. **Insect Biochem Mol Biol**, 38, n. 1, p. 22-41, Jan 2008.

MANS, B. J.; CALVO, E.; RIBEIRO, J. M.; ANDERSEN, J. F. The crystal structure of D7r4, a salivary biogenic amine-binding protein from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **J Biol Chem**, 282, n. 50, p. 36626-36633, Dec 2007.

MARCHESE, L.; NASCIMENTO, J. D.; DAMASCENO, F. S.; BRINGAUD, F. *et al.* The Uptake and Metabolism of Amino Acids, and Their Unique Role in the Biology of Pathogenic Trypanosomatids. **Pathogens**, 7, n. 2, 2018.

MARDER, V. J.; AIRD, W. C.; BENNETT, J. S.; SCHULMAN, S. *et al.* **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**. Lippincott Williams & Wilkins, 2012. 1451177690.

MARINOTTI, O.; NGO, T.; KOJIN, B. B.; CHOU, S.-P. *et al.* Integrated proteomic and transcriptomic analysis of the *Aedes aegypti* eggshell. **BMC developmental biology**, 14, n. 1, p. 1-11, 2014.

MARKLAND JR, F. S. Inventory of α - and β -fibrinogenases from snake venoms. **Thrombosis and haemostasis**, 65, n. 04, p. 438-443, 1991.

MARKLAND JR, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. **Thrombosis and haemostasis**, 79, n. 03, p. 668-674, 1998.

MARTIN-MARTIN, I.; PAIGE, A.; VALENZUELA LEON, P. C.; GITTIS, A. G. *et al.* ADP binding by the *Culex quinquefasciatus* mosquito D7 salivary protein enhances blood feeding on mammals. **Nature Communications**, 11, n. 1, p. 2911, 2020/06/09 2020.

MARTINS, R. M.; AMINO, R.; DAGHASTANLI, K. R.; CUCCOVIA, I. M. *et al.* A short proregion of trialysin, a pore-forming protein of *Triatoma infestans* salivary glands, controls activity by folding the N-terminal lytic motif. **The FEBS journal**, 275, n. 5, p. 994-1002, 2008/03// 2008.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 74, n. 2, p. 560, 1977.

MCDONALD, W. H.; YATES, J. R. Shotgun proteomics: integrating technologies to answer biological questions. **Current opinion in molecular therapeutics**, 5, n. 3, p. 302-309, 2003/06// 2003.

MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P. N. *et al.* PROTEASES IN PARASITIC DISEASES. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 1, n. 1, p. 497-536, 2006/02/01 2006.

MCLAFFERTY FRED, W. Tandem Mass Spectrometry. **Science**, 214, n. 4518, p. 280-287, 1981/10/16 1981.

MELO, R. D. F. P.; GUARNERI, A. A.; SILBER, A. M. The Influence of Environmental Cues on the Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae Vector. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10, n. 27, 2020-February-21 2020. Review.

MENDE, K.; LANGE, U.; NOWAK, G. Three recombinant serine proteinase inhibitors expressed from the coding region of the thrombin inhibitor dipetalogastin. **Insect Biochem Mol Biol**, 34, n. 9, p. 971-979, 2004.

MESQUITA, R. D.; CARNEIRO, A. B.; BAFICA, A.; GAZOS-LOPES, F. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infection and immunity**, 76, n. 12, p. 5543-5552, 2008.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nat Rev Genet**, 11, n. 1, p. 31-46, Jan 2010.

MINGHETTI, L.; NICOLINI, A.; POLAZZI, E.; GRECO, A. *et al.* Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. **British journal of pharmacology**, 126, n. 6, p. 1307-1314, 1999.

MIZUSHIMA, D.; TABBABI, A.; YAMAMOTO, D. S.; KATO, H. Salivary gland transcriptome of the Asiatic *Triatoma rubrofasciata*. **Acta Tropica**, 210, p. 105473, 2020.

MIZUSHIMA, D.; TABBABI, A.; YAMAMOTO, D. S.; KIEN, L. T. *et al.* Salivary gland transcriptome of the Asiatic *Triatoma rubrofasciata*. **Acta tropica**, 210, p. 105473, 2020/10// 2020.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 26, n. 1, p. 41-48, Jan 2006.

MONTANDON, C. E.; BARROS, E.; VIDIGAL, P. M.; MENDES, M. T. *et al.* Comparative proteomic analysis of the saliva of the *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* and *Panstrongylus herreri* triatomines reveals a high interespecific functional biodiversity. **Insect Biochem Mol Biol**, 71, p. 83-90, Apr 2016.

MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A.; BEARD, C. B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **TRENDS in Parasitology**, 17, n. 7, p. 344-347, 2001.

MORELLI, V. Estrutura e funções das plaquetas e das células endoteliais. **Hematologia: fundamentos e prática**. Editora Atheneu, p. 731, 2004.

MORITA, A.; ISAWA, H.; ORITO, Y.; IWANAGA, S. *et al.* Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. **The FEBS journal**, 273, n. 13, p. 2955-2962, 2006.

MOTWANI, H. V.; DE ROSA, M.; ODELL, L. R.; HALLBERG, A. *et al.* Aspartic protease inhibitors containing tertiary alcohol transition-state mimics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 90, p. 462-490, 2015/01/27/ 2015.

MOURA, A. C. D.; LAZZARI, V. M.; AGNES, G.; ALMEIDA, S. *et al.* Transcriptional expression study in the central nervous system of rats: what gene should be used as internal control? **Einstein (Sao Paulo)**, 12, n. 3, p. 336-341, 2014.

NATTERO, J.; PICCINALI, R. V.; LOPES, C. M.; HERNÁNDEZ, M. L. *et al.* Morphometric variability among the species of the Sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. **Parasites & vectors**, 10, n. 1, p. 1-14, 2017.

NATTERO, J.; PITA, S.; CALLEROS, L.; CROCCO, L. *et al.* Morphological and Genetic Differentiation within the Southernmost Vector of Chagas Disease: *Triatoma patagonica* (Hemiptera–Reduviidae). **PLoS One**, 11, n. 12, p. e0168853, 2016.

NEVOA, J. C.; MENDES, M. T.; DA SILVA, M. V.; SOARES, S. C. *et al.* An insight into the salivary gland and fat body transcriptome of *Panstrongylus lignarius* (Hemiptera: Heteroptera), the main vector of Chagas disease in Peru. **PLoS Negl Trop Dis**, 12, n. 2, p. e0006243, 2018.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; HAENDLER, B.; DONNER, P.; ALAGON, A. *et al.* Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **J Biol Chem**, 270, n. 48, p. 28629-28634, 1995.

NOGUEIRA, N. F. S.; GONZALEZ, M. S.; GOMES, J. E.; DE SOUZA, W. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, 116, n. 2, p. 120-128, 2007/06/01/ 2007.

NOIREAU, F.; GUTIERREZ, T.; ZEGARRA, M.; FLORES, R. *et al.* Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, 3, n. 5, p. 364-372, 1998.

NOIREAU, F.; ZEGARRA, M.; ORDOÑEZ, J.; GUTIERREZ, T. *et al.* Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) domestic populations from Bolivia:

application on control interventions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94, n. 3, p. 347-351, 1999.

NORIEGA, F. G. Juvenile hormone biosynthesis in insects: what is new, what do we know, and what questions remain? **International scholarly research notices**, 2014, 2014.

NORIEGA, F. G.; NOUZOVA, M. Approaches and Tools to Study the Roles of Juvenile Hormones in Controlling Insect Biology. **Insects**, 11, n. 12, 2020.

O. TIROLI-CEPEDA, A.; H.I. RAMOS, C. An Overview of the Role of Molecular Chaperones in Protein Homeostasis. **Protein and Peptide Letters**, 18, n. 2, p. 101-109, // 2011.

OPAS. **Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas.**, 2017. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contra-doencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812. Acesso em: March 27.

OTÁLORA-LUNA, F.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A. J.; SANDOVAL, C.; ALDANA, E. Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). **Revista chilena de historia natural**, 88, n. 1, p. 4, 2015.

PAHO. **Módulo 3 - Estudo dos Triatomíneos.** 2016. Disponível em: https://www.paho.org/bra/dmdocuments/modulo_3.pdf.

PAHO. **Enfermedad de Chagas.** 2017. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370(=es. Acesso em: March, 27.

PANZERA, F.; HORNOS, S.; PEREIRA, J.; CESTAU, R. *et al.* Genetic variability and geographic differentiation among three species of Triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 57, n. 6, p. 732-739, 1997/12// 1997.

PANZERA, F.; PITA, S.; NATTERO, J.; PANZERA, Y. *et al.* Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. **Parasites & vectors**, 8, n. 1, p. 1-10, 2015.

PANZERA, F.; PITA, S.; NATTERO, J.; PANZERA, Y. *et al.* Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. **Parasit Vectors**, 8, p. 495, Sep 2015.

PATEL, S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. **Allergol Immunopathol (Madr)**, 45, n. 6, p. 579-591, 2017 Nov - Dec 2017.

PEREIRA, J. M.; ALMEIDA, P. S. D.; SOUSA, A. V. D.; PAULA, A. M. D. *et al.* Climatic factors influencing triatomine occurrence in Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 108, n. 3, p. 335-341, 2013.

PESSOA, G. C. D. Á.; SOUSA, T. N. D.; SONODA, I. V.; DIOTAIUTI, L. Assessing the mitochondrial DNA diversity of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 111, p. 322-329, 2016.

PITA, S.; LORITE, P.; NATTERO, J.; GALVÃO, C. *et al.* New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera-Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**, 43, p. 225-231, 2016.

POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 53, p. 167-177, 2014/01/01/ 2014.

PRAÇA, Y. R.; SANTIAGO, P. B.; CHARNEAU, S.; MANDACARU, S. C. *et al.* An Integrative Sialomic Analysis Reveals Molecules From *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 11, 2022-January-03 2022. Original Research.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

RAMOS, F. O.; LEYRIA, J.; NOUZOVA, M.; FRUTTERO, L. L. *et al.* Juvenile hormone mediates lipid storage in the oocytes of *Dipetalogaster maxima*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 133, p. 103499, 2021/06/01/ 2021.

RAMOS, L. J.; CASTRO, G. V. D. S.; SOUZA, J. L. D.; OLIVEIRA, J. D. *et al.* First report of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from the State of Acre, Brazil, and the Brazilian Western Amazon Region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 51, n. 2, p. 212-214, 2018.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, 62, n. 3, p. 597-635, Sep 1998.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, 44, n. D1, p. D343-D350, 2016.

RAYNAL, P.; POLLARD, H. B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, 1197, n. 1, p. 63-93, 1994.

RESCHER, U.; GERKE, V. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions. **Journal of cell science**, 117, n. 13, p. 2631-2639, 2004.

RIBEIRO, J. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious agents and disease**, 4, n. 3, p. 143-152, 1995.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Medical and veterinary entomology**, 14, n. 2, p. 142-148, 2000/06// 2000.

RIBEIRO, J. M.; ASSUMPÇÃO, T. C.; PHAM, V. M.; FRANCISCHETTI, I. M. *et al.* An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma rubida* (Hemiptera: Heteroptera). **J Med Entomol**, 49, n. 3, p. 563-572, May 2012.

RIBEIRO, J. M.; DEBAT, H. J.; BOIANI, M.; URES, X. *et al.* An insight into the sialome, mialome and virome of the horn fly, *Haematobia irritans*. **BMC Genomics**, 20, n. 1, 2019.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol**, 48, p. 73-88, 2003.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. J. A. R. O. E. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. 48, n. 1, p. 73-88, 2003.

RIBEIRO, J. M.; SCHNEIDER, M.; ISAIAS, T.; JURBERG, J. *et al.* Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). **Journal of medical entomology**, 35, n. 4, p. 599-610, 1998/07// 1998.

RIBEIRO, J. M.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. A Deep Insight Into the Sialotranscriptome of the Chagas Disease Vector, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Heteroptera). **J Med Entomol**, 52, n. 3, p. 351-358, May 2015.

RIBEIRO, J. M.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. A deep insight into the sialotranscriptome of the Chagas disease vector, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Heteroptera). **Journal of medical entomology**, 52, n. 3, p. 351-358, 2015.

RIBEIRO, J. M. C. How ticks make a living. *Parasitology today*. 11: 91-93 p. 1995.

RIBEIRO, J. M. C.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M. A. C.; PHAM, V. M. *et al.* Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34, n. 1, p. 61-79, 2004/01/01/ 2004.

RIBEIRO, J. M. C.; ASSUMPÇÃO, T. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. An Insight into the Sialomes of Bloodsucking Heteroptera. **Psyche**, 2012, p. 470436, 2012/07/05 2012.

RIBEIRO, J. M. C.; CHARLAB, R.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M. *et al.* An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Insect biochemistry and molecular biology**, 34(6), p. 543-563, 2004.

RIBEIRO, J. M. C.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B. A Deep Insight Into the Sialotranscriptome of the Chagas Disease Vector, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Heteroptera). **Journal of Medical Entomology**, 52, n. 3, p. 351-358, 2015.

RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. **Developmental and comparative immunology**, 34, n. 4, p. 377-386, 2010/04// 2010.

RODRIGUES, E. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; FONTES, A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

ROTHERMUND, S.; LIOU, Y.-C.; DAVIES, P. L.; KRAUSE, E. *et al.* A new class of hexahelical insect proteins revealed as putative carriers of small hydrophobic ligands. **Structure**, 7, n. 11, p. 1325-1332, 1999.

ROWE, G. E.; WELCH, R. A. [53] Assays of hemolytic toxins. *In: Methods in Enzymology*: Academic Press, 1994. v. 235, p. 657-667.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 74, n. 12, p. 5463, 1977.

SANT'ANNA, M. C. R. V.; DIOTAIUTI, L.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, A.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N. *et al.* Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. **Journal of Insect Physiology**, 47, n. 12, p. 1459-1465, 2001.

SANT'ANNA, M. R.; ARAÚJO, J. G.; PEREIRA, M. H.; PESQUERO, J. L. *et al.* Molecular cloning and sequencing of salivary gland-specific cDNAs of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Mol Biol**, 11, n. 6, p. 585-593, Dec 2002.

SANTALUCIA, M.; A BEZERRA, W.; A CIRINO, B.; I AVILA, R. *et al.* Nota sobre as espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) encaminhados para o controle de qualidade no Lacen-GO em Goiás. **Ars Vet.**, 2015.

SANTIAGO, P. B.; ASSUMPÇÃO, T. C.; DE ARAÚJO, C. N.; BASTOS, I. M. D. *et al.* A deep insight into the sialome of *Rhodnius neglectus*, a vector of Chagas disease. 10, n. 4, p. e0004581, 2016.

SANTIAGO, P. B.; ASSUMPÇÃO, T. C.; DE ARAÚJO, C. N.; BASTOS, I. M. D. *et al.* A Deep Insight into the Sialome of *Rhodnius neglectus*, a Vector of Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 4, p. e0004581, 2016.

SANTIAGO, P. B.; ASSUMPÇÃO, T. C. F.; DE ARAÚJO, C. N.; BASTOS, I. M. D. *et al.* A Deep Insight into the Sialome of *Rhodnius neglectus*, a Vector of Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v.10, n. 4, p. e0004581, DOI: 10.1371/journal.pntd.0004581. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/27129103>. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004581>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC4851354>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC4851354?pdf=render>. Acesso em: 2016/04//.

SANTIAGO, P. B.; DE ARAÚJO, C. N.; CHARNEAU, S.; BASTOS, I. M. D. *et al.* Exploring the molecular complexity of *Triatoma dimidiata* sialome. **Journal of proteomics**, 174, p. 47-60, 2018/03// 2018.

SANTIAGO, P. B.; DE ARAÚJO, C. N.; CHARNEAU, S.; BASTOS, I. M. D. *et al.* Exploring the molecular complexity of *Triatoma dimidiata* sialome. **Journal of proteomics**, 174, p. 47-60, 2018.

SANTIAGO, P. B.; DE ARAÚJO, C. N.; CHARNEAU, S.; PRAÇA, Y. R. *et al.* The Pharmacopeia within Triatomine Salivary Glands. **Trends Parasitol**, 36, n. 3, p. 250-265, Mar 2020.

SANTIAGO, P. B.; DE ARAÚJO, C. N.; MOTTA, F. N.; PRAÇA, Y. R. *et al.* Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity - a review. **Parasit Vectors**, 10, n. 1, p. 79, Feb 2017.

SANTOS, A.; RIBEIRO, J. M. C.; LEHANE, M. J.; GONTIJO, N. F. *et al.* The Sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 37, p. 702-712, 2007.

SANTOS, A.; RIBEIRO, J. M. C.; LEHANE, M. J.; GONTIJO, N. F. *et al.* The sialotranscriptome of blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 37, p. 702-712, 2007.

SAVIOLI, L.; DAUMERIE, D. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases.** World Health Organization, 2013. 9241564547.

SCHAUB, G. A.; MEISER, C. K.; BALCZUN, C. Interactions of *Trypanosoma cruzi* and triatomines. *In: Progress in parasitology*: Springer, 2011. p. 155-178.

SCHWARZ, A.; MEDRANO-MERCADO, N.; SCHAUB, G. A.; STRUCHINER, C. J. *et al.* An updated insight into the Sialotranscriptome of *Triatoma infestans*: developmental stage and geographic variations. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 12, p. e3372, 2014.

SCOLARI, F.; BENOIT, J. B.; MICHALKOVA, V.; AKSOY, E. *et al.* The spermatophore in *Glossina morsitans morsitans*: insights into male contributions to reproduction. **Scientific reports**, 6, n. 1, p. 1-17, 2016.

SILVA, R. A. D.; SAMPAIO, S. M. P.; POLONI, M.; KOYANAGUI, P. H. *et al.* Pesquisa sistemática positiva e relação com conhecimento da população de assentamento e reassentamento de ocupação recente em área de *Triatoma sordida* (Hemiptera, Reduviidae) no Estado de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 20, p. 555-561, 2004.

SIROT, L. K.; POULSON, R. L.; MCKENNA, M. C.; GIRNARY, H. *et al.* Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction. **Insect biochemistry and molecular biology**, 38, n. 2, p. 176-189, 2008.

SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. **Current Protocols in Molecular Biology**, 122, n. 1, p. e59, 2018/04/01 2018. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>.

SOARES, T. S.; BUARQUE, D. S.; QUEIROZ, B. R.; GOMES, C. M. *et al.* A Kazal-type inhibitor is modulated by *Trypanosoma cruzi* to control microbiota inside the anterior midgut of *Rhodnius prolixus*. **Biochimie**, 112, p. 41-48, 2015.

SOUZA, J. M. P. D.; RODRIGUES, V. L. C.; ROCHA E SILVA, E. O. D. *Triatoma sordida*: considerações sobre o tempo de vida das formas adultas e sobre a oviposição das fêmeas. **Revista de Saúde Pública**, 12, p. 291-296, 1978.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Global Heart**, 10, n. 3, p. 139-144, 2015.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.* 118: 1301-1310 p. 2008.

SUN, Y. L.; HUANG, L. Q.; PELOSI, P.; WANG, C. Z. Expression in antennae and reproductive organs suggests a dual role of an odorant-binding protein in two sibling *Helicoverpa* species. **PLoS One**, 7, n. 1, p. e30040, 2012.

SYED, Z.; ISHIDA, Y.; TAYLOR, K.; KIMBRELL, D. A. *et al.* Pheromone reception in fruit flies expressing a moth's odorant receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, n. 44, p. 16538, 2006.

TAKEMORI, N.; YAMAMOTO, M. T. Proteome mapping of the *Drosophila melanogaster* male reproductive system. **Proteomics**, 9, n. 9, p. 2484-2493, 2009.

TAKÁČ, P.; NUNN, M. A.; MÉSZÁROS, J.; PECHÁNOVÁ, O. *et al.* Vasotab, a vasoactive peptide from horse fly *Hybomitra bimaculata* (Diptera, Tabanidae) salivary glands. **J Exp Biol**, 209, n. Pt 2, p. 343-352, Jan 2006.

TANAKA, K.; WAKI, H.; YUTAKA, I.; AKITA, S. *et al.* Protein and polymer analyzes up m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, 2(8), p. 151-153, 1988.

TANAKA-AZEVEDO, A. M.; MORAIS-ZANI, K.; TORQUATO, R. J. S.; TANAKA, A. S. Thrombin inhibitors from different animals. **Journal of biomedicine & biotechnology**, 2010, p. 641025, 2010 2010.

TEGONI, M.; CAMPANACCI, V.; CABBILLAU, C. Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. **Trends Biochem Sci**, 29, n. 5, p. 257-264, 2004.

TEIXEIRA, A. R.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical microbiology reviews**, 24, n. 3, p. 592-630, 2011.

THOMPSON, J. J.; THOMSON, J. **Rays of positive electricity and their application to chemical analyses**. Longmans, Green, 1913.

TOBE, S. S.; STAY, B. Structure and Regulation of the Corpus Allatum. *In*: BERRIDGE, M. J.; TREHERNE, J. E., *et al* (Ed.). **Advances in Insect Physiology**: Academic Press, 1985. v. 18, p. 305-432.

VALENTE, V. D. C. Estudo genotípico de trypanosoma cruzi: epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão. 2011.

VALENZUELA, J.; PHAM, V.; GARFIELD, M.; FRANCISCHETTI, I. *et al.* Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, 32, n. 9, p. 1101-1122, 2002.

VAN DE LOCHT, A.; LAMBA, D.; BAUER, M.; HUBER, R. *et al.* Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin. **EMBO J**, 14, n. 21, p. 5149-5157, 1995.

VERSTEEG, H. H.; HEEMSKERK, J. W.; LEVI, M.; REITSMA, P. H. New fundamentals in hemostasis. **Physiol Rev**, 93, n. 1, p. 327-358, Jan 2013.

VIEIRA, C. B.; PRAÇA, Y. R.; BENTES, K. L. D. S.; SANTIAGO, P. B. *et al.* Triatomines: trypanosomatids, bacteria and viruses potential vectors? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 8, p. 405, 2018.

VILLALOBOS-SAMBUCARO, M. J.; NOUZOVA, M.; RAMIREZ, C. E.; EUGENIA ALZUGARAY, M. *et al.* The juvenile hormone described in *Rhodnius prolixus* by Wigglesworth is juvenile hormone III skipped bisepoxide. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 3091, 2020/02/20 2020.

- VORA, A.; TAANK, V.; DUTTA, S. M.; ANDERSON, J. F. *et al.* Ticks elicit variable fibrinogenolytic activities upon feeding on hosts with different immune backgrounds. **Scientific reports**, v.7, p. 44593, DOI: 10.1038/srep44593. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/28300174>. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep44593>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC5353578>. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC5353578?pdf=render>. Acesso em: 2017/03//.
- WALECKX, E.; GOURBIÈRE, S.; DUMONTEIL, E. Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110, n. 3, p. 324-338, 2015.
- WALKER, A. A.; MADIO, B.; JIN, J.; UNDHEIM, E. A. *et al.* Melt with this kiss: Paralysing and liquefying venom of the assassin bug *Pristhesancus plagipennis* (Hemiptera: Reduviidae). p. mcp. M116. 063321, 2017.
- WALKER, A. A.; ROBINSON, S. D.; UNDHEIM, E. A.; JIN, J. *et al.* Missiles of mass disruption: Composition and glandular origin of venom used as a projectile defensive weapon by the assassin bug *Platyeris rhadamanthus*. **Toxins**, 11, n. 11, p. 673, 2019.
- WANG, J.; MURPHY, E. J.; NIX, J. C.; JONES, D. N. Aedes aegypti Odorant Binding Protein 22 selectively binds fatty acids through a conformational change in its C-terminal tail. **Scientific reports**, 10, n. 1, p. 1-15, 2020.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, 10, n. 1, p. 57-63, 2009/01/01 2009.
- WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M.; CLAMP, M. *et al.* Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.
- WELCH, R. A. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. **Molecular microbiology**, 5, n. 3, p. 521-528, 1991/03// 1991.
- WELCH, R. A. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. **Current topics in microbiology and immunology**, 257, p. 85-111, 2001 2001.
- WHEELER, D. E.; NIJHOUT, H. F. A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. **BioEssays**, 25, n. 10, p. 994-1001, 2003/10/01 2003. <https://doi.org/10.1002/bies.10337>.
- WHO, W. A. H. O. **Chagas Disease (American Trypanosomiases). What is Chagas Disease?**, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/disease/en/>. Acesso em: 22 fevereiro.
- WIGGLESWORTH, V. The functions of the corpus allatum in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **Journal of Experimental Biology**, 25, n. 1, p. 1-15, 1948.
- WIGGLESWORTH, V. B. The Determination of Characters at Metamorphosis in *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera). **Journal of Experimental Biology**, 17, n. 2, p. 201-223, 1940.
- XU, P.; ATKINSON, R.; JONES, D. N.; SMITH, D. P. Drosophila OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. **Neuron**, 45, n. 2, p. 193-200, 2005.

YATES, J. R. Mass Spectral Analysis in Proteomics. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, 33, n. 1, p. 297-316, 2004/06/09 2004.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 11, n. 1, p. 49-79, 2009/08/01 2009.

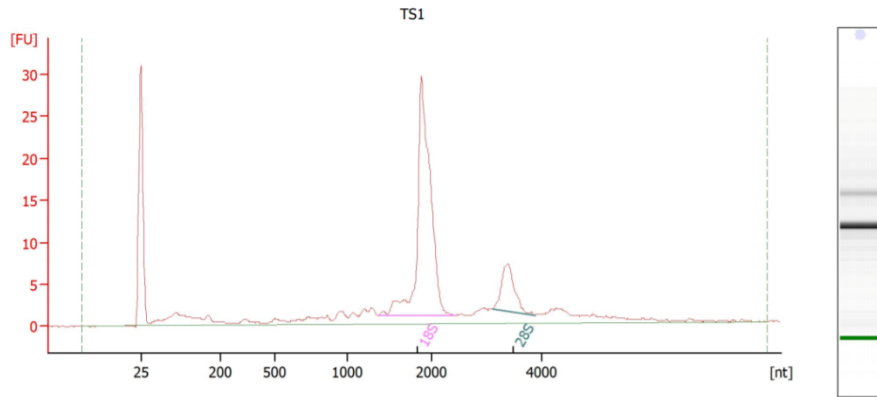
ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M.-C. *et al.* Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Chemical Reviews**, 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013/04/10 2013.

ZHANG, Z.; GAO, L.; SHEN, C.; RONG, M. *et al.* A potent anti-thrombosis peptide (vasotab TY) from horsefly salivary glands. **Int J Biochem Cell Biol**, 54, p. 83-88, Sep 2014.

ZHU, J.; NORIEGA, F. G. Chapter Four - The Role of Juvenile Hormone in Mosquito Development and Reproduction. *In*: RAIKHEL, A. S. (Ed.). **Advances in Insect Physiology**: Academic Press, 2016. v. 51, p. 93-113.

ANEXO

ANEXO A – Eletroferograma. Análise de integridade do RNA. A – Número de Integridade do RNA 9,4. B – Número de Integridade do RNA 9.

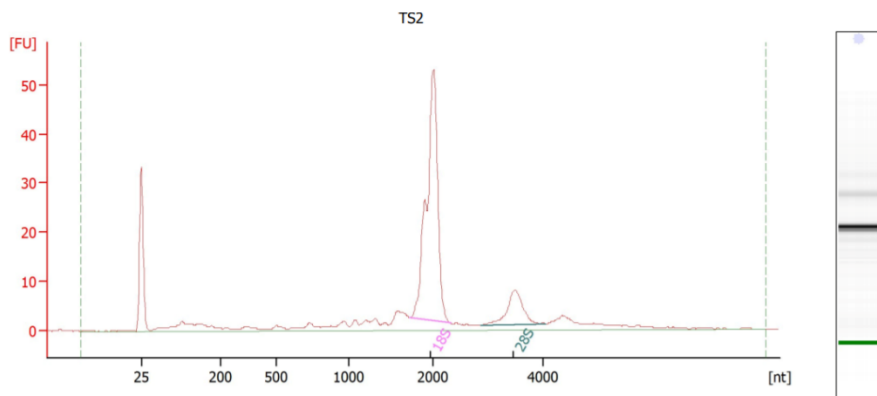


Overall Results for sample 5 : TS1

RNA Area:	163,5	RNA Integrity Number (RIN):	9.4 (B.02.07, Anomaly Threshold(s) manually adapted)
RNA Concentration:	433 pg/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,2	Result Flagging Label:	RIN: 9.40

Fragment table for sample 5 : TS1

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.361	2.435	70,1	42,9
28S	3.117	3.888	12,4	7,6



Overall Results for sample 6 : TS2

RNA Area:	233,6	RNA Integrity Number (RIN):	9 (B.02.07, Anomaly Threshold(s) manually adapted)
RNA Concentration:	619 pg/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,2	Result Flagging Label:	RIN:9

Fragment table for sample 6 : TS2

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.726	2.323	105,8	45,3
28S	2.864	4.046	18,6	8,0

Fonte: Católica.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Lista dos 100 transcritos codificantes mais expressos do sialotranscriptoma do *T. sordida*. Os transcritos são apresentados por ordem de expressão dos mais expressos para os menos expressos baseado nos respectivos valores de FPKM. Em negrito estão as sequências que também foram identificadas no proteoma do *T. sordida*.

Nº	Locus	Nº de Reads	FPKM	Código de acesso	Classificação
1	Hem-c15059_g2_i1.p1	2178384,11	320339,47	JAC18620.1	Trialisina curta/ Trialisina
2	Hem-c10816_g1_i1.p1	147054	267346,97	ABR27833.1	Trialisina curta/ Trialisina
3	Hem-c11226_g1_i1.p1	542860,79	144231,33	ADN29772.1	Palidipina
4	Hem-c15348_g11_i1.p1	465290,32	119050,72	ADN29770.1	Triabina
5	Hem-c15059_g1_i2.p2	55068,43	118842,81	ABR27835.1	Trialisina curta/ Trialisina
6	Hem-c15210_g10_i5.p1	49189,41	94464,78	ABR27896.1	Tipo Kazal
7	Hem-c15366_g5_i2.p1	168100,55	82540,27	ADN29755.1	Triabina
8	Hem-c15366_g5_i3.p1	325768,36	80379,58	ADN29755.1	Triabina
9	Hem-c13513_g1_i1.p1	287471,35	70930,23	ADN29778.1	Triabina *
10	Hem-c14763_g9_i1.p2	22747,57	64139,88	ABR27835.1	Trialisina curta/ Trialisina
11	Hem-c14356_g2_i1.p1	455988,85	61798,1	ADN29723.1	Palidipina
12	Hem-c15124_g3_i1.p1	46482,98	60743,61	ABH09420.1	Triabina
13	Hem-c15210_g10_i3.p1	41721,62	54521,5	ADN29812.1	Tipo Kazal
14	Hem-c13513_g1_i3.p1	196794,63	51788,78	ABH09420.1	Triabina
15	Hem-c15210_g10_i4.p1	26688	48519,29	JAC18583.1	Tipo Kazal
16	Hem-c15288_g8_i1.p1	90266,84	46775,02	ADN29778.1	Triabina
17	Hem-c14466_g2_i3.p1	147846,66	38541,12	ADN29757.1	Triabina
18	Hem-c12753_g1_i3.p1	163800,04	33786,86	ADN29727.1	Triabina
19	Hem-c14985_g1_i2.p1	187661,28	30161,95	ADN29901.1	Antígeno-5
20	Hem-c15288_g11_i1.p1	133327,87	29479,6	ADN29773.1	Triabina
21	Hem-c15366_g14_i1.p1	299740,89	28579,69	ADN29793.1	Trialisina curta/ Trialisina
22	Hem-c13428_g1_i2.p1	139444,88	28353,7	ADN29735.1	Triabina
23	Hem-c10221_g1_i1.p1	23448,26	28274	ADN29811.1	Tipo Kazal
24	Hem-c12412_g1_i1.p1	88347,22	28046,31	AAZ38957.1	Outras proteínas salivares secretadas
25	Hem-c11377_g1_i2.p1	30008,74	27435,32	ADN29811.1	Tipo Kazal
26	Hem-c13699_g1_i2.p1	111356,46	246211,59	ADN29773.1	Triabina
27	Hem-c15210_g10_i2.p1	18198,06	23781,09	ADN29806.1	Tipo Kazal
28	Hem-c17453_g1_i1.p1	206752	22595,33	ADN29815.1	Modificação de proteína
29	Hem-c15210_g10_i1.p1	16934	22129,22	JAC18682.1	Tipo Kazal
30	Hem-c14356_g2_i2.p1	153897,15	21063,39	ADN29731.1	Palidipina
31	Hem-c13977_g1_i1.p1	91466,49	19446,69	ABR27920.1	Triabina
32	Hem-c10792_g1_i1.p1	81695	18356,67	ADN29804.1	Outras proteínas salivares secretadas

33	Hem-c13428_g1_i1.p1	93434,08	18187,62	ADN29727.1	Triabina
34	Hem-c14595_g1_i2.p1	99585,04	17992,22	ADN29741.1	Triabina
35	Hem-c14528_g1_i1.p1	83567,51	17366,87	ABR27920.1	Triabina
36	Hem-c4328_g1_i1.p2	4396	17194,27	ATU83054.1	Desconhecidas
37	Hem-c14938_g1_i4.p2	8347	16971,7		Desconhecidas
38	Hem-c15288_g1_i1.p1	51402,23	16317,92	ABR27850.1	Triabina
39	Hem-c7587_g1_i1.p1	4175	14945,13	ABR27944.1	Desconhecidas
40	Hem-c13744_g2_i2.p1	67107,04	14378,13	ADN29775.1	Triabina
41	Hem-c15210_g10_i6.p1	7902,59	14367,06	ABR27896.1	Tipo Kazal
42	Hem-c13963_g4_i1.p1	98442,48	14324,03	ABR27944.1	Palidipina
43	Hem-c12753_g1_i2.p1	68155,77	13651,26	ABR27852.1	Triabina
44	Hem-c15210_g10_i7.p1	3469	13568,46	ADN29813.1	Tipo Kazal
45	Hem-c11966_g1_i1.p1	45600	13122,76	ATU83054.1	Desconhecidas
46	Hem-c14985_g1_i1.p1	79288,49	12818,16	ADN29901.1	Antígeno-5
47	Hem-c14929_g1_i1.p1	59504,33	12749,19	ADN29774.1	Triabina
48	Hem-c14906_g1_i1.p1	95067,33	12398,07	ADN29816.1	Tripsina salivar
49	Hem-c11062_g1_i1.p2	43940	12262,74	ADN29795.1	Trialisina curta/ Trialisina
50	Hem-c10831_g1_i1.p4	11499	11576,72		Matriz extracelular
51	Hem-c15141_g1_i2.p1	109583,75	11520,88	ADN29821.1	Inositol fosfato fosfatase
52	Hem-c15141_g1_i1.p1	107487,29	11215,22	ADN29823.1	Inositol fosfato fosfatase
53	Hem-c6608_g1_i1.p1	3621	1109,62	ABR27944.1	Desconhecidas
54	Hem-c11226_g2_i1.p1	12781,21	11004,1	JAC18553.1	Palidipina
55	Hem-c13699_g1_i1.p1	48746,67	10953,26	ADN29773.1	Triabina
56	Hem-c12655_g1_i1.p1	2536	10896,85	ADN29873.1	Metabolismo oxidante
57	Hem-c14528_g2_i1.p1	16355	10375,85	ADN29739.1	Outras lipocalinas
58	Hem-c13467_g1_i1.p1	9044	10112,72	ADN29809.1	Tipo Kazal
59	Hem-c14970_g1_i1.p1	63111,97	10085,1	ADN29802.1	MYS /Hemolisina
60	Hem-c14423_g1_i3.p1	49479,17	9982,71	ADN29802.1	MYS /Hemolisina
61	Hem-c3132_g1_i1.p1	10667	9752,35	ADN29894.1	Desconhecidas
62	Hem-c13070_g1_i1.p1	72716	9573,43	ADN29820.1	Metaloproteases
63	Hem-c13420_g2_i1.p1	43992,14	9425,61	ADN29873.1	Metabolismo Oxidante
64	Hem-c12481_g1_i1.p1	79140	9311,2	ADN29817.1	Tripsina salivar
65	Hem-c9469_g1_i1.p1	41732	8872,64	JAC18562.1	Triabina
66	Hem-c7784_g1_i1.p1	9916	8794,08	ADN29786.1	Triabina
67	Hem-c9453_g1_i2.p1	15319,96	8741,29	ADN29726.1	Triabina
68	Hem-c14466_g2_i4.p1	35801,17	8678,76	ADN29736.1	Triabina
69	Hem-c14970_g1_i3.p1	53417,81	8635,78	ADN29802.1	MYS /Hemolisina
70	Hem-c15124_g6_i1.p1	52497,61	8437,7	ADN29901.1	Antígeno-5
71	Hem-c11034_g1_i1.p1	2325,32	8323,87	ADN29806.1	Tipo Kazal
72	Hem-c14985_g2_i1.p1	50522,07	8264,25	ADN29828.1	Antígeno-5
73	Hem-c14970_g1_i4.p1	11311,7	8067,78	ADN29802.1	MYS/Hemolisina

74	Hem-c13505_g2_i1.p1	15374,63	7966,92	JAC14796.1	Matriz extracelular
75	Hem-c27539_g1_i1.p1	2821	7954,19	ADN29857.1	Maquinaria de síntese proteica
76	Hem-c21986_g1_i1.p1	4111	7894,88	ADN29781.1	Desconhecidas
77	Hem-c5749_g1_i1.p1	13211	7854,21	ADN29855.1	Maquinaria de síntese proteica
78	Hem-c7727_g1_i1.p1	29307,95	7786,76	JAC18028.1	Maquinaria de síntese proteica
79	Hem-c15124_g8_i1.p1	8987,95	7309,05	JAC18593.1	Antígeno-5
80	Hem-c13977_g1_i2.p1	23777	7062,68	JAC18577.1	Triabina
81	Hem-c11756_g1_i2.p1	20643,15	6867,78	ADN29748.1	Triabina
82	Hem-c15124_g12_i1.p1	5788	6716,82	JAC18668.1	Triabina
83	Hem-c15345_g1_i1.p4	4771	6234,71	ASK39792.1	Desconhecidas
84	Hem-c11666_g1_i1.p1	23512,18	6129,23	ATU82827.1	Desconhecidas
85	Hem-c15345_g1_i1.p2	8582	6120,89		Desconhecidas
86	Hem-c15124_g7_i1.p1	36666,84	6106,18	JAC18655.1	Antígeno-5
87	Hem-c10164_g1_i1.p1	31577	6103,74	ADN29751.1	Outras lipocalinas
88	Hem-c15388_g8_i2.p1	21551,68	6075,86	ADN29821.1	Inositol fosfato fosfatase
89	Hem-c1027_g1_i2.p1	41987,83	5952,93	ABR27934.1	Transportadores e canais
90	Hem-c13010_g1_i2.p1	8520,23	5929,89	ADN29719.1	Triabina
91	Hem-c15141_g1_i3.p1	12272,53	5725,1	ADN29821.1	Inositol fosfato fosfatase
92	Hem-c11056_g1_i1.p3	11774	5681,77	JAS15678.1	Outras proteínas salivares secretadas
93	Hem-c15366_g7_i1.p1	24371,97	5613,08	JAW13198.1	Triabina
94	Hem-c13513_g1_i2.p1	21181,88	5574,26	ABH09420.1	Triabina
95	Hem-c25597_g1_i1.p1	1692	5569,81	ADN29743.1	Desconhecidas
96	Hem-c15140_g1_i2.p1	24810,67	5529,98	ADN29819.1	Tripsina salivar
97	Hem-c2788_g1_i1.p1	1045	5519,95	JAR99245.1	Desconhecidas
98	Hem-c15388_g8_i5.p1	35230,32	5208,44	ADN29821.1	Inositol fosfato fosfatase
99	Hem-c13505_g1_i1.p2	4307,37	5193,84	JAC14796.1	Desconhecidas
100	Hem-c13582_g1_i1.p1	9326,02	5114,76	AER92489.1	Triabina

APÊNDICE B – Lista de proteínas identificadas no sialoproteoma do *T. sordida*. As proteínas foram separadas conforme suas respectivas classificações. Em negrito estão as sequências que aparecem entre as 100 mais expressas no sialotranscriptoma.

Família	Locus	Código de Acesso	Ce	Peptídeo único	Descrição
Palidipina	Hem-c14356_g2_i2.p1	ADN29731	53	8	<i>pallidipin-like lipocalin precursor [Triatoma matogrossensis].</i>
	Hem-c11226_g1_i1.p1	ADN 29772.1	23	7	<i>pallidipin-like lipocalin precursor [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c14356_g2_i1.p1	ADN29723.1	25	7	<i>pallidipin-like lipocalin precursor [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c11201_g1_i1.p1	JAC18672.1	2	1	<i>putative pallidipin-like salivary lipocalin lipocalin, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c11226_g2_i1.p1	JAC18553.1	10	3	<i>Pallidipin-like lipocalin precursor [Triatoma matogrossensis]</i>
Triabina	Hem-c14595_g1_i2.p1	ADN29741.1	4	4	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15425_g1_i1.p1	ABR27846.1	5	3	<i>salivary lipocalin [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c7844_g1_i1.p1	ABR27870.1	1	1	<i>salivary lipocalin [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c9453_g1_i2.p1	ADN29726.1	1	1	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15016_g5_i1.p1	ADN29724.1	3	2	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15288_g1_i1.p1	ABR27850.1	2	11	<i>salivary lipocalin [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c13428_g1_i1.p1	ADN29727.1	25	10	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c13513_g1_i1.p1	ADN29778.1	55	10	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c14915_g1_i1.p1	ADN29762.1	4	3	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c9381_g2_i1.p1	ADN29780.1	1	1	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c12069_g1_i2.p1	ADN29720.1	4	3	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c11756_g1_i2.p1	ADN29748.1	3	2	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15348_g11_i1.p1	ADN29767.1	15	2	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>

	Hem-c12753_g1_i2.p1	ABR27852.1	4	2	<i>salivary lipocalin [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c15366_g7_i2.p1	ABJ96357.1	1	1	<i>salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]</i>
	Hem-c15366_g5_i2.p1	ADN29755.1	68	7	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c14466_g2_i3.p1	ADN29757.1	63	9	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15288_g11_i1.p1	ADN29743.1	32	7	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c13699_g1_i1.p1	ADN29773.1	5	3	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c13699_g1_i2.p1	ADN29743.1	43	8	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c14528_g1_i1.p1	ABR27920.1	63	6	<i>salivary lipocalin [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c13977_g1_i1.p1	ABR27920.1	14	3	<i>salivary lipocalin [Triatoma infestans]</i>
Triabina	Hem-c13977_g1_i2.p1	JAC18577.1	40	5	<i>salivary lipocalin [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c14466_g2_i4.p1	ADN29736.1	4	1	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15366_g5_i3.p1	ADN29755.1	5	1	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c13010_g1_i2.p1	ADN29719.1	3	1	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c13513_g1_i3.p1	ABH09430.1	25	3	<i>salivary lipocalin 5 [Triatoma brasiliensis]</i>
	Hem-c15124_g3_i1.p1	ABH09420.1	17	3	<i>salivary lipocalin 2 [Triatoma brasiliensis]</i>
	Hem-c13513_g1_i2.p1	ABH09420.1	13	2	<i>salivary lipocalin 2 [Triatoma brasiliensis]</i>
	Hem-c15124_g12_i1.p1	JAC18668.1	2	1	<i>putative salivary lipocalin lipocalin, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c13010_g3_i1.p1	BBA30643.1	7	2	<i>hypothetical protein [Triatoma rubida]</i>
Outras lipocalinas	Hem-c10164_g1_i1.p1	ADN29751.1	10	3	<i>rhodnius biogenic aminebinding-like protein [Triatoma matogrossensis]</i>
Triatina	Hem-c15016_g3_i1.p1	ADN29720.1	5	1	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>
Inositol fosfato fosfatase	Hem-c15388_g8_i2.p1	ADN29821.1	34	1	<i>salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15388_g8_i6.p1	ADN29823.1	34	2	<i>salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma matogrossensis]</i>

	Hem-c15141_g1_i2.p1	ADN29821.1	66	11	<i>salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma matogrossensis]</i>
Inositol fosfato	Hem-c15299_g3_i1.p1	ADN29905.1	6	4	<i>salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma matogrossensis]</i>
fosfatase	Hem-c15141_g1_i4.p1	ADN29823.1	44	4	<i>salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c21523_g1_i1.p1	ABR27973.1	24	6	<i>salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15141_g1_i1.p1	ADN29823.1	40	1	<i>salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c13561_g1_i1.p1	JAR99852.1	4	1	<i>skeletal muscle kidney enriched inositol 5-phosphatase, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c12481_g1_i1.p1	ADN29817.1	18	5	<i>secreted salivary trypsin [Triatoma matogrossensis]</i>
Tripsina salivar	Hem-c15140_g1_i2.p1	ADN29819.1	16	2	<i>salivary trypsin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c14906_g1_i1.p1	ADN29816.1	48	9	<i>salivary trypsin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c13125_g1_i1.p1	ADN29818.1	4	1	<i>salivary trypsin [Triatoma matogrossensis]</i>
Apirase salivar	Hem-c15219_g2_i1.p1	JAW09282.1	14	6	<i>putative cd73 ecto-5'-nucleotidase [Panstrongylus lignarius].</i>
79kDa	Hem-c15390_g1_i1.p1	ADN29824.1	2	2	<i>salivary apyrase precursor [Triatoma matogrossensis]</i>
Trialisina curta/	Hem-c11062_g1_i1.p2	ADN29795.1	10	4	<i>trialysin precursor [Triatoma matogrossensis]</i>
Trialisina	Hem-c15366_g14_i1.p1	ADN29793.1	123	24	<i>trialysin [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c14970_g1_i4.p1	ADN29802.1	3	3	<i>hemolysin-like secreted salivary protein 1 [Triatoma matogrossensis]</i>
MYS/ Hemolisina	Hem-c14970_g1_i1.p1	ADN29802.1	16	6	<i>hemolysin-like secreted salivary protein 1 [Triatoma matogrossensis]</i>
Proteína salivar específica 16kDa de	Hem-c12196_g1_i1.p1	ABR27988.1	7	5	<i>putative salivary secreted protein [Triatoma infestans]</i>

<i>Triatoma e Panstrongylus</i>					
Antígeno 5	Hem-c15124_g7_i1.p1	JAC18655.1	2	2	<i>putative scp-like extracellular protein [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c14985_g1_i1.p1	ADN29901.1	29	3	<i>antigen5-like protein precursor, partial [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15124_g8_i1.p1	JAC18593.1	16	6	<i>putative scp-like extracellular protein, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c15124_g6_i1.p1	ADN29901.1	45	7	<i>antigen5-like protein precursor, partial [Triatoma matogrossensis]</i>
Outras proteínas salivares secretadas	Hem-c15220_g2_i1.p1	AQM58424.1	1	1	<i>venom s1 protease with cub domain 1 [Pristhesancus plagipennis]</i>
	Hem-c9215_g1_i3.p1	JAP02418.1	2	2	<i>putative multifunctional chaperone 14-3-3 family [Triatoma dimidiata]</i>
	Hem-c13444_g2_i1.p1	ADN29832.1	5	5	<i>hypothetical secreted protein [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c10792_g1_i1.p1	ADN29804.1	9	4	<i>hemolysin-like secreted salivary protein 1 [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c670_g1_i1.p1	JAC17300.1	1	1	<i>putative conserved secreted protein precursor, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c12412_g1_i1.p1	AAZ38957.1	56	7	<i>triatox [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c25117_g1_i1.p1	ADN29825.1	3	2	<i>salivary apyrase precursor [Triatoma matogrossensis]</i>
Inibidores de serino protease do tipo Kazal	Hem-c11377_g1_i2.p1	ADN29811.1	11	4	<i>salivary secreted kazaltype proteinase inhibitor [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15210_g10_i2.p1	ADN29806.1	4	3	<i>salivary kazaltype proteinase inhibitor [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15210_g10_i3.p1	ADN29812.1	4	2	<i>salivary kazaltype proteinase inhibitor [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c15210_g10_i4.p1	JAC18583.1	3	1	<i>putative salivary kazal-type proteinase inhibitor [Triatoma infestans]</i>
Relacionada a imunidade	Hem-c12046_g1_i1.p1	JAW10517.1	5	4	<i>putative calreticulin [Panstrongylus lignarius]</i>
	Hem-c7529_g1_i1.p1	JAC17118.1	2	2	<i>putative gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase precursor [Triatoma infestans]</i>

Proteína de ligação a Odorante	Hem-c14678_g1_i1.p1	JAS00753.1	1	1	<i>odorant-binding protein 2, partial [Triatoma infestans]</i>
Metabolismo de aminoácido	Hem-c8741_g1_i1.p1	JAS02729.1	6	3	<i>aminopeptidase isoform x1 [Triatoma infestans]</i>
Metabolismo energético	Hem-c23562_g1_i1.p1	JAC86699.1	6	4	<i>putative 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [Panstrongylus megistus]</i>
	Hem-c5889_g1_i1.p1	JAS02168.1	2	1	<i>cytochrome c [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c14922_g1_i2.p1	JAC18443.1	1	1	<i>putative malate dehydrogenase, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c10552_g1_i1.p1	AHE57675.1	1	1	<i>ATP synthase beta subunit, partial [Panstrongylus megistus]</i>
	Hem-c15126_g1_i1.p1	JAP02679.1	2	2	<i>putative 3-oxoacyl coa thiolase [Triatoma dimidiata]</i>
Metabolismo de Lipídios	Hem-c1038_g1_i1.p1	JAC17746.1	2	2	<i>putative fatty acid-binding protein fabp [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c15300_g1_i1.p1	JAC18447.1	2	2	<i>putative vigilin [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c8318_g1_i1.p1	JAC15909.1	6	4	<i>putative gnl-cdd-187611 cd05353 hydroxyacyl-coa-like dh sdr c-like protein, partial [Triatoma infestans]</i>
Metabolismo de carboidrato	Hem-c5845_g1_i1.p1	JAC17686.1	2	2	<i>putative fructose-biphosphate aldolase [Triatoma infestans]</i>
Metabolismo oxidante/ Detoxificação	Hem-c9013_g1_i1.p1	JAC18458.1	3	3	<i>putative catalase-like isoform x1 [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c17458_g1_i1.p1	ABR27983.1	2	1	<i>superoxide dismutase [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c1610_g1_i1.p1	ADN29867.1	1	1	<i>peptide methionine sulfoxide reductase MsrA [Triatoma matogrossensis]</i>
Proteínas citoesqueléticas	Hem-c14171_g2_i1.p1	JAR99405.1	8	4	<i>tubulin beta-1 chain, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c3917_g1_i1.p1	JAA77497.1	2	2	<i>putative actin-depolymerizing factor 1, partial [Rhodnius prolixus]</i>
	Hem-c15297_g1_i4.p1	JAW07581.1	1	1	<i>putative myosin tail, partial [Panstrongylus lignarius]</i>
	Hem-c11276_g1_i1.p1	JAC18011.1	2	2	<i>putative profilin [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c14219_g1_i1.p1	JAS01617.1	7	3	<i>gelsolin isoform x2, partial [Triatoma infestans]</i>

Proteínas	Hem-c21450_g1_i1.p1	ABE27979.1	4	4	<i>putative muscle actin [Lygus lineolaris]</i>
citoesqueléticas	Hem-c15382_g1_i8.p1	JAW07530.1	1	1	<i>putative microtubule-associated protein futsch [Panstrongylus lignarius]</i>
	Hem-c374_g1_i1.p1	JAS00445.1	6	3	<i>protein disulfide-isomerase a3 [Triatoma infestans].</i>
	Hem-c14308_g1_i1.p1	JAS00446.1	9	4	<i>protein disulfide-isomerase, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c6962_g1_i1.p1	JAS00681.1	1	1	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, partial [Triatoma infestans]</i>
Modificação de proteína	Hem-c9021_g1_i1.p1	JAI55743.1	2	2	<i>putative transitional endoplasmic reticulum atpase ter94 [Rhodnius neglectus]</i>
	Hem-c17453_g1_i1.p1	ADN29815.1	21	10	<i>salivary serine protease [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c12994_g1_i1.p1	JAC18140.1	2	1	<i>putative heat shock 70 kda protein cognate 4 [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c12645_g1_i1.p1	JAS01476.1	3	1	<i>heat shock 70 kda protein cognate 3, partial [Triatoma infestans]</i>
Maquinaria de Transcrição	Hem-c11000_g1_i1.p1	JAS03020.1	4	2	<i>4-hydroxybutyrate coenzyme a transferase [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c8534_g1_i1.p1	JAC18501.1	2	1	<i>putative enzyme that catalyze nonsubstrate specific conversion [Triatoma infestans]</i>
Estoque	Hem-c15261_g1_i1.p1	JAS02153.1	1	1	<i>cytoplasmic aconitate hydratase-like protein isoform x2, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c12824_g1_i1.p1	JAS02664.1	3	2	<i>arginine kinase, partial [Triatoma infestans]</i>
Detoxificação	Hem-c14625_g1_i1.p1	ADN29835.1	1	1	<i>hypothetical secreted protein [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c10475_g1_i1.p1	JAS01434.1	2	2	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k isoform x1 [Triatoma infestans]</i>
Maquinaria de síntese proteica	Hem-c11503_g1_i1.p1	JAR99553.1	1	1	<i>transferrin, partial [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c13109_g1_i1.p1	JAC17113.1	3	3	<i>putative vitellogenin-1 precursor [Triatoma infestans]</i>
	Hem-c14361_g1_i1.p1	JAW07479.1	5	4	<i>putative apolipoporphins, partial [Panstrongylus lignarius]</i>
Matriz extracelular	Hem-c13254_g1_i1.p1	JAS01574.1	3	3	<i>glutathione s-transferase, partial [Triatoma infestans]</i>

Transportadores e canais	Hem-c10256_g1_i1.p1	JAW13375.1	4	2	<i>putative peroxiredoxin posttranslational modification [Panstrongylus lignarius]</i>	
Proteína de exportação	Hem-c7727_g1_i1.p1	JAC18028.1	1	1	<i>putative translationally controlled tumor protein [Triatoma infestans]</i>	
Desconhecidas	Hem-c27539_g1_i1.p1	ADN29857.1	5	1	<i>putative elongation factor 1-alpha [Triatoma matogrossensis]</i>	
	Hem-c1741_g1_i1.p1	AYO45250.1	1	1	<i>elongation factor 1-alpha, partial [Melissoaspis formicaria]</i>	
	Hem-c13788_g1_i1.p1	JAP02667.1	8	5	<i>putative basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein, partial [Triatoma dimidiata]</i>	
	Hem-c12186_g1_i1.p1	JAC17585.1	2	1	<i>putative dehydrogenase [Triatoma infestans]</i>	
	Hem-c7033_g1_i1.p1	JAC86725.1	1	1	<i>putative annexin [Panstrongylus megistus]</i>	
	Hem-c6869_g1_i1.p1	ADN29825.1	8	4	<i>salivary apyrase precursor [Triatoma matogrossensis]</i>	
	Hem-c25597_g1_i1.p1	ADN29743.1	9	4	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>	
	Hem-c11666_g1_i1.p1	ATU82827.1	8	4	<i>secreted venom family 2 protein [Pristhesancus plagipennis]</i>	
	Hem-c11518_g1_i1.p1	ADN29835.1	2	2	<i>hypothetical secreted protein [Triatoma matogrossensis]</i>	
	Hem-c11246_g1_i1.p1	JAC18663.1	5	3	<i>putative salivary lipocalin, partial [Triatoma infestans].</i>	
	Hem-c21986_g1_i1.p1	ADN29781.1	4	1	<i>salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]</i>	
	Hem-c23432_g1_i1.p1	JAW07481.1	1	1	<i>putative apolipoporphins [Panstrongylus lignarius]</i>	
	Hem-c21273_g1_i1.p1	JAC18707.1	2	1	<i>putative 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [Triatoma infestans]</i>	
	Hem-c11056_g1_i1.p1			3	2	
	Hem-c4659_g1_i1.p1	ADN29878.1		1	1	<i>CRAL/TRIO domain containing protein [Triatoma matogrossensis]</i>
	Hem-c4328_g1_i1.p2	ATU83054.1		1	1	<i>secreted venom family 2 protein [Pristhesancus plagipennis]</i>
Hem-c14231_g1_i1.p1	JAC18279.1		2	2	<i>hypothetical protein [Triatoma infestans]</i>	
Hem-c15012_g1_i1.p2			1	1		

TOTAL	132	1571	417
--------------	------------	-------------	------------
