



# Universidade de Brasília

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**Análise proteômica comparativa da saliva entre diferentes períodos após a alimentação sanguínea de *Triatoma dimidiata*, triatomíneo vetor da doença de Chagas**

**Yanna Reis Praça**

**Brasília - DF, 2016.**



# Universidade de Brasília

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**Análise proteômica comparativa da saliva entre diferentes períodos após a alimentação sanguínea de *Triatoma dimidiata*, triatomíneo vetor da doença de Chagas**

**Yanna Reis Praça**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina-UnB como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: **Profa. Dra. Carla Nunes de Araújo**

**Brasília - DF, 2016.**

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) do Departamento de Biologia Celular da UnB.

*Apoio financeiro:*

FAPDF (193.001.053/2015)

Curso de Mestrado realizado com bolsa da CAPES

*“ Seja a mudança que você quer ver no mundo.”*

*Manhatman Gandhi*



*Dedicatória*

*Ao meu filho Kauã e aos meus pais  
Isabel Cristina e Nelson por serem os  
meus maiores incentivadores para o  
crescimento pessoal e profissional.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Carla Nunes, pela confiança e oportunidade a mim dada durante toda a realização do trabalho. Pela paciência e amizade adquirida durante todo o tempo de convivência.

Ao professor Jaime Santana pela preocupação e experiência compartilhada ao longo do projeto

À professora Flávia Nader pela ajuda, paciência, disponibilidade e pela amizade adquirida.

À professora Izabela Dourado pelo incentivo, preocupação e conselhos dados. Suas decisões foram importantes nesse projeto.

Ao professor Sébastien Charneau e Carlos Garcia pela ajuda e disponibilidade no decorrer do trabalho.

À Paula Beatriz, pela amizade, preocupação e o tempo disponibilizado para ensinar, consolar e pela maravilhosa convivência. Me espelho em você!

À Thuany pela amizade e pelo tempo disponibilizado para me ensinar e ajudar em algumas técnicas.

Aos amigos Camila, Clênia, Raquel, Milene, Grazi, Adriana, Natália Gil, Rayner, Carol pela convivência muito divertida e amizade construída.

A Adriana que sempre foi meu braço direito na manutenção da colônia de barbeiros no biotério.

À Bruna Kraus e Felipe Figueiredo pela amizade, ajuda, incentivo e disponibilidade ao longo do trabalho. Amo vocês!

Aos meus pais que abraçaram a causa junto comigo e que me ajudaram cuidando do Kauã além do incentivo, amor e paciência. Amo muito vocês!

Ao Kauã pela compreensão e as tentativas para entender a ausência e a falta de tempo da mamãe e ao amor incondicional sempre atribuído. Você é a melhor parte de mim, amo você!

À minha irmã Wlyana por ter sido a cabeça de todo esse processo e me incentivar a abraçar a oportunidade e o desafio. Amo você!

Ao amigo e namorado Henrique por sempre me incentivar e apoiar minhas escolhas, além da paciência exercida durante o processo. Amo você!

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

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	14
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
INTRODUÇÃO .....	17
Aspectos gerais dos artrópodes hematófagos.....	17
Aspectos gerais da doença de Chagas .....	17
Triatomíneos .....	21
<i>Triatoma dimidiata</i> .....	22
<i>Rhodnius neglectus</i> .....	22
O processo de alimentação dos triatomíneos.....	23
A saliva dos triatomíneos .....	24
Hemostasia.....	25
Proteomas salivares de triatomíneos hematófagos.....	26
Análise proteômica.....	27
Justificativa.....	28
OBJETIVOS .....	30
Objetivo 1 .....	30
Objetivo 2.....	30
MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
Manutenção da colônia de <i>T. dimidiata</i> .....	31
Extração das glândulas salivares .....	31
Eletroforese unidimensional – 1-DE .....	31
Eletroforese bidimensional – 2-DE .....	32
Preparação das amostras de saliva de <i>T. dimidiata</i> para a análise proteômica .....	33
LC-MS/MS e processamento dos dados .....	34
Análise de bioinformática .....	35
Análise <i>in silico</i> da sequência do antígeno 5 de <i>R. neglectus</i> (RNAV).....	38
Linhagens de <i>E. coli</i> utilizadas .....	38
Amplificação do plasmídeo contendo o gene do RNAV.....	39
Transformação de <i>E. coli</i> com pET15b_RNAV .....	39

Indução da expressão do RNAV em <i>E. coli</i> .....	40
<i>Western blot</i> .....	41
RESULTADOS.....	43
Os perfis eletroforéticos uni e bidimensional da saliva de <i>T. dimidiata</i> .....	43
Análise proteômica da saliva de <i>T. dimidiata</i> .....	45
Análises <i>in silico</i> das proteínas identificadas 5 e 10 dias após a alimentação.....	46
5 dias após alimentação.....	52
10 dias após alimentação.....	52
Análise <i>in silico</i> do RNAV.....	64
Expressão do RNAV recombinante.....	70
DISCUSSÃO .....	72
Proteoma da saliva de <i>T. dimidiata</i> .....	72
Lipocalinas.....	73
Apirases .....	75
Inibidores de serino proteases .....	76
Superfamília hemocianina - Hexamerina.....	77
Lisozima .....	78
Selenoproteína.....	79
Proteína de ligação ao heme.....	80
Esterase e lipase .....	80
Enzima conversora de angiotensina (ECA) .....	81
Antígeno 5 de <i>R. neglectus</i> .....	81
CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85

## LISTA DE ABREVIações

**2-DE** – Eletroforese bidimensional

**ABP** - *Amino binding protein*

**ADP** – Adenosina Difosfato

**ASP** - Activation-associated secreted protein

**CAP** - cysteine rich secretory proteins, antigen 5, e pathogenesis-related 1 proteins

**CDD** – Conserved Domain Database

**CID** - collision-induced dissociation

**CRISP** - cysteine-rich secretory protein

**DMAV** – Antígeno V de *Dipetalogaster maxima*

**DTT** – Ditioneitol

**FDR** - *False Discovery Rate*

**FI** – Fração Insolúvel

**FII** – Protrombina

**FT** – Fator Tecidual

**IEF** – Focalização isoelétrica

**IPTG** – *Isopropyl  $\beta$ -D-1- thiogalactopyranoside*

**LB** – Luria Bertani

**LC-MS/MS** – *Liquid chromatography–mass spectrometry*

**PI** – Ponto isoelétrico

**RNAV** – Antígeno V *Rhodnius neglectus*

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio

**RPAI** - *Rhodnius prolixus agregation inhibitor – 1*

**SDS-PAGE** – *Dodecyl sulfate polyacrimide gel electrophoresis*

**SEpro** - *Search Engine Processor*

**TBS** - *Tris buffered saline*

**TBST**- *Tris buffered saline 0,1% tween 20*

**TEAB** – *Triethylamonium bicarbonat*

**TFA** – Ácido trifluoroacético

**TIAV** – *Triatoma infestans*

**FA** – Ácido fórmico

**Dpa** – Dias após a alimentação

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi*. ❶ O triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro e libera os tripomastigotas metacíclicos (TM) do *T. cruzi* nas fezes e urina; ❷ os TM penetram em vários tipos celulares e se diferenciam em amastigotas; ❸ os amastigotas se reproduzem por divisão binária e depois se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos (TS); ❹ os TS entram na circulação sanguínea e podem invadir novas células; ❺ o triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro contendo TS; ❻ os TS se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do triatomíneo; ❼ os epimastigotas se reproduzem por divisão binária; ❽ e se diferenciam em TM no intestino posterior. Fonte: *CDC Image Library*. Modificado de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma\\_cruzi\\_LifeCycle.gif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_cruzi_LifeCycle.gif). Acessado em 30/06/2016..... 19
- Figura 2. Ciclo de vida dos triatomíneos. O ciclo de vida é constituído pelo ovo, cinco estágios ninfais (1-4) e adultos (fêmea e macho). Todos os estágios ninfais e os adultos são hematófagos. Triatomíneos: fotos de Santiago..... 23
- Figura 3. Representação esquemática dos passos envolvidos na análise proteômica das amostras de saliva de *T. dimidiata* coletadas 5, 10 e 20 dias após a alimentação sanguínea (dpa). ..... 37
- Figura 4. Representação esquemática dos passos envolvidos na expressão do antígeno 5 da saliva de *R. neglectus* (RNAV) em *Escherichia coli*. ..... 42
- Figura 5. Eletroforese unidimensional das proteínas salivares de *T. dimidiata* coletadas 5, 10 e 20 dias após a alimentação sanguínea (dpa). SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. Mw – marcadores de peso molecular. (a) 20 ug; (b) 10 ug; (c) 5 ug; e (d) 2,5 ug de proteínas..... 44
- Figura 6. Eletroforese bidimensional das proteínas salivares de *T. dimidiata* 20 dias após a alimentação sanguínea. 2-DE foi realizado sob condições desnaturantes e corado com nitrato de prata. A amostra continha 100 ug de proteínas salivares. Mw – marcadores de peso molecular..... 45
- Figura 7. Diagrama de Venn gerado a partir do número de proteínas salivares de *T. dimidiata* compartilhadas e exclusivas das amostras de saliva coletadas 5 e 10 dias após a alimentação sanguínea e utilizadas nas análises comparativas..... 46
- Figura 8. Proteínas salivares de *T. dimidiata* coletadas 5 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO..... 47
- Figura 9. Proteínas salivares de *T. dimidiata* coletadas 10 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO..... 48

Figura 10. Proteínas salivares de *T. dimidiata* encontradas apenas nas amostras coletadas 5 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO. .... 49

Figura 11. Proteínas salivares de *T. dimidiata* encontradas apenas nas amostras coletadas 10 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO..... 50

Figura 12. Proteínas salivares de *T. dimidiata* comuns nas amostras coletadas 5 e 10 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO. .... 51

Figura 13. Proteínas salivares de *T. dimidiata* 5 e 10 dias após a alimentação. (A) Predição das proteínas secretadas pela via clássica (VC) ou via não clássica (VNC), e não secretadas (NS). (B) Predição da localização celular das proteínas salivares não secretadas. TM – transmembrânica, realizada pelo programa TMHMM; S – secretada, M – mitocondrial, E – extramitocondrial, realizadas pelo programa TargetP. .... 53

Figura 14. Proteínas salivares de *T. dimidiata* secretadas pela via clássica, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO..... 57

Figura 15. Proteínas salivares de *T. dimidiata* secretadas por vias não clássicas, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO..... 63

Figura 16. (A) Sequência nucleotídica do cDNA do antígeno 5 [RnSigm-SigP-2128- *peptidase inhibitor 16-like isoform X2 (venom allergen)*] de *R. neglectus*, contendo 665 pares de bases. (B) Sequência aminoácídica do produto do cDNA do antígeno 5 de *R. neglectus*, contendo 220 resíduos de aminoácidos. .... 64

Figura 17. Alinhamento das sequências de aminoácidos do RNAV com a sequência putativa de proteína secretada por *Ancylostoma* (de *C. lectularius*) e com nove sequências putativas de alérgeno 5 do veneno de diferentes espécies de formigas e vespas. (\*) resíduos idênticos; (:) resíduos altamente conservados; (.) resíduos semiconservados; (-) marca *gap* na sequência. .... 67

Figura 18. Árvore filogenética construída utilizando o programa MUSCLE versão 3.8.31 a partir da sequência do RNAV e de uma sequência putativa de proteína secretada por *Ancylostoma* (de *C. lectularius*) e de nove sequências putativas de alérgeno 5 de veneno de formigas e vespas. .... 67



Figura 19. Predição de peptídeo sinal na sequência de RNAV utilizando o programa SignalP. *C-score (raw cleavage site score)*: elevado na posição imediatamente após o sítio de clivagem – o primeiro resíduo do RNAV maduro. *S-score (signal peptide score)*. *Y-score (combined cleavage site score)*: predição do sítio de clivagem, já que distingue entre picos *C-score* pela escolha daquele onde o *S-score* declina. .... 68

Figura 20. Predição de sítios de O-glicosilações na sequência de RNAV utilizando o programa GlycoEP. Em vermelho, resíduos de serina e treonina. .... 69

Figura 21. Perfil de expressão dos clones de diferentes linhagens de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET15b\_RNAV ou com o pET19b vazio como controle. (A) SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie. 1 – lisado bacteriano anterior à indução da expressão com IPTG 0,4 mM; 2 - fração solúvel do lisado bacteriano; 3 - fração insolúvel do lisado bacteriano. (B) *Western blot*. C+ - controle positivo para o anticorpo anti-cauda de histidina (oligopeptidase B de *T. cruzi*). RNAV - fração solúvel de um clone de Rosetta2(DE3)pLysS transformada com o plasmídeo pET15b\_RNAV. Mw – marcadores de peso molecular. Esperava-se visualizar a banda do RNAV na altura de 25 kDa. .... 71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas salivares de <i>T. dimidiata</i> secretadas pela via clássica .....	55
Tabela 2. Proteínas salivares de <i>T. dimidiata</i> secretadas por vias não clássicas .....	59

## RESUMO

Os triatomíneos são artrópodes hematófagos durante todo o seu ciclo de vida e para garantir o sucesso de seu repasto, desenvolveram estratégias adaptativas que contrapõem o sistema hemostático e imune do hospedeiro, injetando moléculas farmacologicamente ativas durante esse processo. Por possuírem diversas moléculas com interesse farmacológico, a saliva desses artrópodes hematófagos passou a ser alvo de pesquisas. Para ampliar o conhecimento sobre essas moléculas, esse trabalho teve como objetivos: 1) investigar a expressão protéica na saliva de *Triatoma dimidiata* em diferentes tempos após a alimentação sanguínea, por meio da análise proteômica comparativa por LC-MS/MS, eletroforese bidimensional e análises *in silico*, e 2) caracterizar *in silico* a sequência aminoacídica do antígeno 5 salivar de *Rhodnius neglectus* (RNAV), além da expressão dessa molécula em *Escherichia coli*. A análise proteômica comparativa da saliva de *T. dimidiata* levou à identificação de 362 proteínas, das quais 65 eram específicas da amostra de cinco dias após a alimentação sanguínea (dpa) e 79 específicas da amostra de 10 dpa, além de contribuir para validar dados do transcrito dessa espécie disponível na literatura. A análise *in silico* do RNAV sugere que a molécula é secretada pela via clássica, que modificações pós-traducionais como fosforilação e glicosilação devem ocorrer na proteína, e que existem aproximadamente 25 resíduos de aminoácidos que podem estar presentes em epítomos lineares para células B. Não foi possível obter o RNAV recombinante. O conhecimento das proteínas salivares do *T. dimidiata* e sua comparação com as de outras espécies de artrópodes hematófagos pode ser útil para entender processos biológicos fundamentais como sobrevivência, adaptação e as interações desses vetores com seus hospedeiros e com os agentes infecciosos que eles são capazes de transmitir.

**Palavras-chave:** Proteoma, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius neglectus*, proteínas salivares, antígeno 5.

## ABSTRACT

Triatomine are bloodsucking arthropods throughout their life cycle and to ensure the success of their meal, they have developed adaptive strategies that counteract the hemostatic and immune system of the host, injecting pharmacologically active molecules during this process. By owning several molecules with pharmacological interest, bloodsucking arthropods saliva has become the subject of various research. To enhance our knowledge about these molecules, this study aimed 1) to investigate the protein expression in *Triatoma dimidiata* saliva at different times after the blood feeding through comparative proteomic analysis using LC-MS/MS, 2-DE electrophoresis and bioinformatics, and 2) to characterize *in silico* the salivary antigen 5 of *Rhodnius neglectus* (RNAV), beyond its expression in *Escherichia coli*. The comparative proteomic analysis of *T. dimidiata* saliva revealed 362 proteins, 65 specific of the sample collected 5 days after feeding and 79 specific of the sample collected 10 days after feeding, and aided to validate available data from *T. dimidiata* transcriptome. RNAV *in silico* analysis revealed this protein may be secreted by the classical pathway, phosphorylation and glycosylation sites, and the existence of 25 amino acid residues that may be present in linear epitopes to B cells. Our attempt failed to produce recombinant RNAV. Knowing *T. dimidiata* salivary proteins and comparison with those from other species of hematophagous arthropods may help to understand fundamental biological processes such as survival, adaptation, vector-host and vector-pathogens interactions.

**Keywords:** *Proteome, Triatoma dimidiata, Rhodnius neglectus, salivary proteins, antigen 5.*

## **INTRODUÇÃO**

### **Aspectos gerais dos artrópodes hematófagos**

Os artrópodes hematófagos compreendem principalmente os insetos e os carrapatos e desempenham um papel importante na transmissão de doenças aos animais vertebrados atuando como vetores (Balashov Yus, 1984). Eles estão distribuídos por todo o planeta, e são responsáveis pela transmissão de micro-organismos e parasitos causadores de mais de 17% de todas as doenças infecciosas, as quais causam mais de um milhão de mortes anualmente. Entre as doenças transmitidas por artrópodes hematófagos estão as infecções pelos vírus Chikungunya, Zika e Mayaro, dengue, febre amarela, encefalite japonesa, febre do Nilo, doença de Lyme, tularemia, rickettsioses, malária, leishmanioses, tripanossomíase africana, doença de Chagas, filaríase linfática, oncocercíase, entre outras (Who, 2016b)

Esses vetores de doenças são ectoparasitos (Guarneri *et al.*, 2000) que se alimentam do sangue de mamíferos, aves, répteis e, raramente, anfíbios, sendo que a maioria dos insetos e carrapatos realizam o repasto sanguíneo em espécies das duas primeiras classes (Balashov Yus, 1984). Na ocasião da alimentação em um hospedeiro infectado, os artrópodes hematófagos podem eventualmente ingerir os microorganismos causadores de doenças, e durante uma alimentação subsequente são capazes de transmiti-los para um novo hospedeiro, propagando a infecção (Who, 2016b).

### **Aspectos gerais da doença de Chagas**

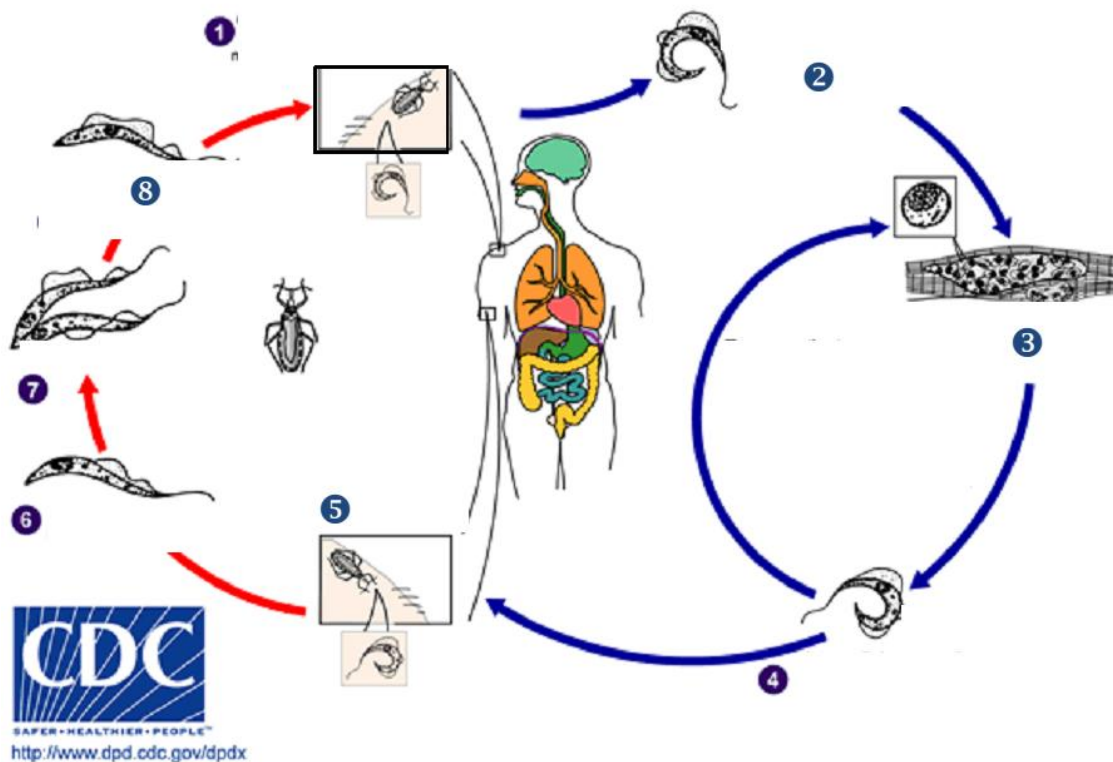
A doença de Chagas, também denominada Tripanossomíase americana, é um exemplo de doença transmitida por artrópodes hematófagos. Essa patologia foi descrita em 1909, pelo médico Carlos Chagas, que descreveu tanto as características clínicas quanto o ciclo completo da doença, relatando os triatomíneos hematófagos como os insetos vetores, e o parasito *Trypanosoma cruzi* como o agente etiológico da doença (Stuart *et al.*, 2008). Esse parasito infecta aproximadamente sete milhões de indivíduos no mundo. Essa doença era confinada ao continente americano central e latino, mas tem se disseminado para outros continentes (Who, 2016a). Ela faz parte do rol das

Doenças Tropicais Negligenciadas, conjunto de enfermidades associadas à pobreza, moradias precárias, desnutrição, falta de saneamento básico, pouco ou nenhum acesso aos serviços de saúde, para as quais há pouco investimento no desenvolvimento de drogas, vacinas e programas de controle (Lindoso e Lindoso, 2009).

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae, que pertence à ordem Kinetoplastida. Nessa ordem, os protozoários possuem uma organela denominada cinetoplasto, que é preenchida com o genoma mitocondrial e encontra-se associada à base do flagelo (Coutinho *et al.*, 1999; Stuart *et al.*, 2008). A principal forma de transmissão do *T. cruzi* é a vetorial, que ocorre por meio das fezes ou urina eliminadas durante o repasto sanguíneo de triatomíneos contaminados com as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes do protozoário. No hospedeiro vertebrado essas formas podem entrar em contato com a lesão tecidual que foi ocasionada pela picada do inseto ou até mesmo com as mucosas do nariz, olhos e boca, penetrando assim no hospedeiro (Prata, 2001). Adicionalmente, existem outras vias de transmissão, como a oral, a qual ocorre através do consumo de alimentos contendo as excretas de triatomíneos infectados com o *T. cruzi*, como por exemplo, a cana de açúcar e o açaí (Passos *et al.*, 2012), a transmissão transfusional, a transmissão devido ao transplante de órgãos advindos de doadores infectados, a congênita e, sem importância epidemiológica, existe ainda a possibilidade de transmissão devido a acidentes laboratoriais (Prata, 2001; Who, 2016a).

No ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 1), após penetrarem no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos são internalizados em vacúolos parasitóforos por uma variedade de células hospedeiras. Dentro desses vacúolos, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que são as formas replicativas no hospedeiro vertebrado. Os amastigotas escapam do interior desses vacúolos para o citoplasma, onde se replicam e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos. Quando o citoplasma está repleto de parasitos, ocorre a ruptura da membrana celular, liberando-os na corrente sanguínea para que possam infectar novas células do hospedeiro em um ciclo infectante contínuo, que resulta no aumento da parasitemia. Durante o repasto, quando o

sangue do hospedeiro vertebrado contendo parasitos circulantes é ingerido pelo triatomíneo, o mesmo pode adquirir os tripomastigotas sanguíneos, que no seu intestino se diferenciam em epimastigotas, formas replicativas que colonizam o intestino médio do hospedeiro invertebrado. Os epimastigotas migram em direção ao intestino posterior, local onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que poderão infectar novos hospedeiros mamíferos durante repastos subsequentes (Coutinho & Dias, 1999).



**Figura 1.** Ciclo de vida do *T. cruzi*. ❶ O triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro e libera os tripomastigotas metacíclicos (TM) do *T. cruzi* nas fezes e urina; ❷ os TM penetram em vários tipos celulares e se diferenciam em amastigotas; ❸ OS amastigotas se reproduzem por divisão binária e depois se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos (TS); ❹ os TS entram na circulação sanguínea e podem invadir novas células; ❺ o triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro contendo TS; ❻ os TS se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do triatomíneo; ❼ os epimastigotas se reproduzem por divisão binária; ❽ e se diferenciam em TM no intestino posterior. Fonte: CDC Image Library. Modificado de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma\\_cruzi\\_LifeCycle.gif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_cruzi_LifeCycle.gif). Acessado em 30/06/2016.

A infecção pelo *T. cruzi* pode ser curada se o indivíduo iniciar o tratamento medicamentoso logo após a contaminação (Who, 2016a). No

entanto, a maioria dos indivíduos infectados apresenta uma fase aguda assintomática, e por esse motivo não realiza o tratamento. Ao contrário do que acontece nessa fase, em que é possível observar um elevado número de parasitos na circulação sanguínea, na fase crônica os parasitos se escondem principalmente no músculo cardíaco, o que pode resultar na destruição progressiva do músculo cardíaco e de seu sistema nervoso. Na fase crônica da doença, aproximadamente 30% dos indivíduos infectados desenvolvem alterações cardíacas e 10% alterações digestivas, neurológicas ou mistas que requerem tratamento específico (Who, 2016a).

O tratamento da doença de Chagas pode ser realizado com o uso de benzonidazol ou nifurtimox, efetivos na fase aguda, no entanto, há diminuição da eficácia desses medicamentos na fase crônica da doença. Essas drogas também são indicadas para adultos infectados sem manifestações clínicas, e em casos de reativação da doença. A duração do tratamento não deve ultrapassar dois meses em decorrência da toxicidade das drogas. Cerca de 40% dos indivíduos tratados apresentam reações adversas aos medicamentos. Ambas são contraindicadas durante a gestação, em casos de doenças hepática ou renal, e o nifurtimox em casos de desordens psiquiátricas ou neurológicas (Who, 2016a).

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas (Dumonteil *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012), esse tipo de prevenção ainda não está disponível. Ainda hoje o controle vetorial por meio do uso de inseticidas, melhoria das habitações, uso de medidas preventivas pessoais (telas mosquiteiras, por exemplo), boas práticas de higiene na preparação, transporte, estoque e consumo de alimentos, é o método mais efetor de prevenção da doença de Chagas na América Latina. É importante ressaltar que existem muitos animais silvestres reservatórios do *T. cruzi*, cenário que impede a erradicação do parasito da natureza (Who, 2016a).



## Triatomíneos

Entre os artrópodes, os triatomíneos são uma subfamília da classe Insecta, ordem Hemiptera, família Reduviidae. Esses insetos são animais hemimetábolos, e durante o seu desenvolvimento passam por cinco estágios ninfais até chegarem à fase adulta (Jurberg e Galvao, 2006; Gurgel-Gonçalves, Rodrigo *et al.*, 2012). Os adultos diferem das ninfas pela presença de asas e genitália. Tanto as ninfas quanto os adultos ocupam habitat similares e possuem hábitos alimentares semelhantes. A duração do ciclo de vida, desde o ovo até o estágio adulto, depende da espécie e das condições ambientais, e varia de quatro a 24(Who, 2016a) meses.

Em ambiente silvestre, é comum encontrar membros dessa subfamília em tocas, ninhos, palmeiras, arbustos e pedras, onde vivem associados à diferente animais silvestres, como por exemplo, aves, morcegos, gambás, tatus, entre outros (Gurgel-Gonçalves, Rodrigo *et al.*, 2012; Who, 2016a). Os triatomíneos que se adaptaram ao ambiente humano, no interior ou na proximidade das casas, alimentam-se do sangue de animais domésticos, tais como galinhas, gado, cabras, cães e gatos e eventualmente do sangue humano. Esses insetos possuem diversos nomes populares e, no Brasil, são popularmente conhecidos como barbeiro devido ao hábito de picar a face do hospedeiro durante a noite (Schoefield e Galvão, 2009).

Cerca de 20 diferentes espécies de triatomíneos apresentam maior importância epidemiológica na transmissão do *T. cruzi* nas Américas do Norte, Central e do Sul, embora todas as espécies sejam consideradas potenciais transmissores deste protozoário(Otalora-Luna *et al.*, 2015). As espécies de maior importância epidemiológica na América Latina são *Triatoma infestans* (Klug), *Rhodnius prolixus* (Stål), *Triatoma dimidiata* (Latreille)(Dorn *et al.*, 2007), e *Triatoma brasiliensis* (Neiva) (Lent e Wygodzinsky, 1979)(Lent and Wygodzinsky 1979; Bargues *et al.* 2010; Rabinovich *et al.* 2011; Stevens *et al.* 2011). Gurgel e colaboradores (2012) analisaram a distribuição geográfica de 16 espécies de triatomíneos em território brasileiro, e demonstraram que existe uma associação entre os biomas analisados com a presença de determinadas espécies de triatomíneos e que, em sua maioria, habitam principalmente os

biomas Cerrado, Caatinga e Amazônia. As espécies mais frequentes nesse estudo pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (Gurgel-Gonçalves, R. *et al.*, 2012). No Distrito Federal, as principais espécies transmissoras são *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus diasi*, *Rhodnius neglectus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* (Maeda *et al.*, 2012). Abaixo estão descritas as distribuições das espécies que foram estudadas nesse projeto.

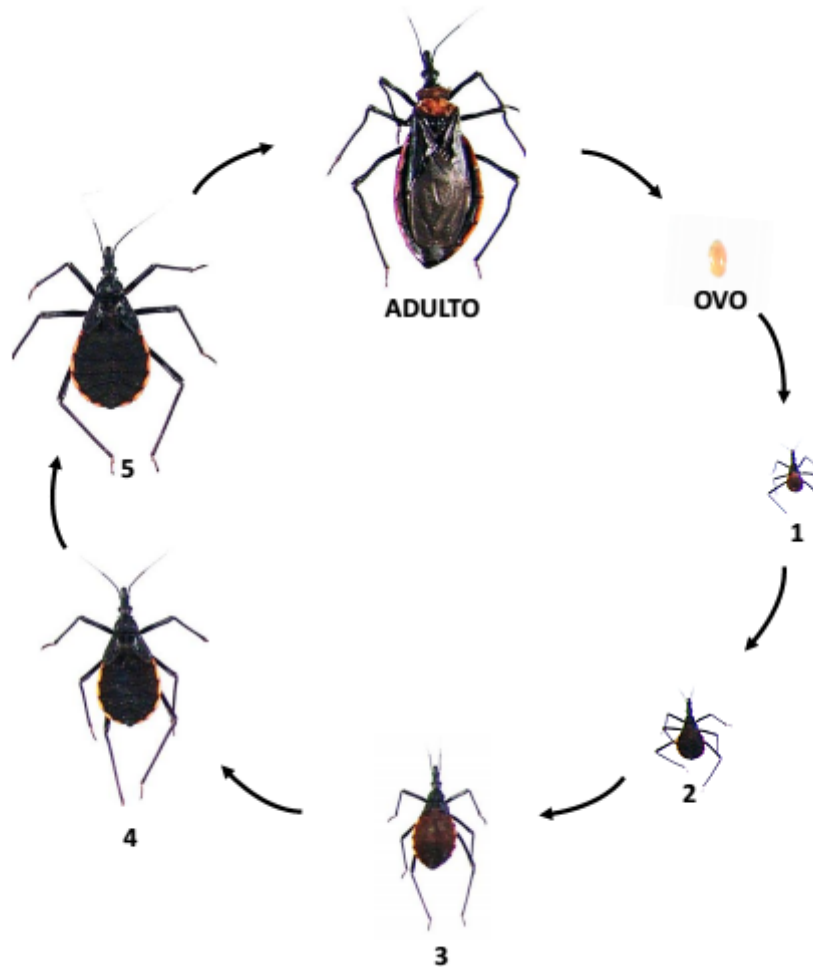
### ***Triatoma dimidiata***

*T. dimidiata* constitui um complexo de espécies que ocorre no México, Chile, Sul da Argentina (Hotez *et al.*, 2008), Guatemala, Belize, El Salvador, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Equador e Peru (Bargues *et al.*, 2008). Essa espécie é generalista quanto ao habitat, podendo ser encontrada em casas, peridomicílios e no meio silvestre, ocupando diversos locais no ecossistema, desde cavernas até árvores (Dorn *et al.*, 2007). As diferenças genotípicas e fenotípicas desse complexo variam conforme a região em que o inseto se encontra (Dorn *et al.*, 2007). Sua abundância e diversidade de populações é um importante obstáculo para o controle vetorial (Schofield *et al.*, 1999).

### ***Rhodnius neglectus***

A presença de *Rhodnius neglectus* foi relatada em vários estados brasileiros: Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (Gurgel-Gonçalves, R. *et al.*, 2012). Essa espécie é encontrada em associação a palmeiras como *Mauritia flexuosa* ou buriti (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2003) e *Livistona australis* ou palmeira australiana (Carvalho *et al.*, 2014), entre outras (Rodrigues *et al.*, 2014). A espécie já foi observada em ambientes intra e peridomiciliar no estado de Goiás (Oliveira e Silva, 2007), Tocantins (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2008), São Paulo (Silva *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2014) e Mato Grosso do Sul (Almeida *et al.*, 2008).

*R. neglectus* é considerado importante para a transmissão enzoótica do *T. cruzi* e do *Trypanosoma rangeli*, este último um protozoário flagelado avirulento, no Distrito Federal (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004; Gurgel-Gonçalves, R. *et al.*, 2012). Devido à transmissão da doença de Chagas e ao investimento necessário para a realização de seu controle, essa espécie é responsável por perdas econômicas importantes (Guarneri *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Ciclo de vida dos triatomíneos. O ciclo de vida é constituído pelo ovo, cinco estágios ninfais (1-4) e adultos (fêmea e macho). Todos os estágios ninfais e os adultos são hematófagos. Triatomíneos: fotos de Santiago.

### O processo de alimentação dos triatomíneos

Os triatomíneos alimentam-se exclusivamente de sangue durante todo o seu ciclo de vida. O aparelho bucal desses insetos é composto pelo lábio ou probóscida, um par de mandíbulas serrilhadas e um par de maxilas longas e

flexíveis. Essas estruturas formam dois canais: o canal salivar, que conduz a saliva para o sítio da alimentação; e o canal alimentar, pelo qual o inseto ingere o sangue. No início do processo alimentar, o triatomíneo perfura a pele com as mandíbulas, introduz as maxilas e inicia a fase de sondagem de um vaso sanguíneo através de movimentos oscilatórios (Lavoipierre *et al.*, 1959). Ao término da fase de sondagem, que se dá quando as maxilas perfuram um vaso, inicia-se a fase de ingurgitamento, em que o inseto suga o sangue do vaso sanguíneo e o transfere, via canal alimentar, para o intestino anterior, onde é estocado. O bombeamento do sangue se deve a contrações periódicas dos músculos associados à bomba cibarial, localizada na cabeça do inseto. Quando os músculos contraem, geram uma pressão negativa no interior da câmara resultando na sucção do sangue, e quando relaxam, a câmara se fecha e empurra o sangue para o intestino (Bennet-Clark, 1963). Esse processo é sequencial, repetitivo e ocorre em intervalos regulares. Durante a fase de sondagem e por toda a fase de ingurgitamento ocorre a salivação.

O período de alimentação dura de poucos minutos a mais que uma hora, dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento, entre outras características do inseto e do hospedeiro (Araujo *et al.*). Entre as características do inseto que podem favorecer ou retardar a ingestão de sangue está a composição de sua saliva.

### **A saliva dos triatomíneos**

Além das adaptações mecânicas sofisticadas do aparelho bucal apresentadas acima, os triatomíneos, assim como outros artrópodes hematófagos, apresentam em sua saliva moléculas que contrapõem a hemostasia do hospedeiro com a finalidade de uma alimentação sanguínea satisfatória (Ribeiro, 1995). Além disso, podem ainda modular a resposta imunológica no hospedeiro. Mesquita e colaboradores mostraram que a saliva de *R. prolixus* induz a quimiotaxia de células inflamatórias, e o aumento da parasitemia cerca de seis vezes, contribuindo para a transmissão do *T. cruzi* (Mesquita *et al.*, 2008).

Entre as moléculas farmacologicamente ativas presentes na saliva dos triatomíneos, foram descritos anticoagulantes, vasodilatadores, anti-agregadores de plaquetas induzidos por diferentes agonistas [tais como colágeno, adenosina difosfato (ADP), ácido araquidônico ou trombina), anti-histamínicos, bloqueadores de canal de sódio, anestésicos, imunomoduladores, entre outras (Ribeiro, 1995; Ribeiro e Francischetti, 2003a; Andersen, Gudderra, Francischetti, B., *et al.*, 2005; Champagne, 2005; De Araújo *et al.*, 2012). Essas moléculas variam em abundância e diversidade de uma espécie para outra (Santos *et al.*, 2007; Assumpção *et al.*, 2008).

Os aspectos gerais da hemostasia são revisados na próxima seção.

## **Hemostasia**

A hemostasia é um importante mecanismo fisiológico do hospedeiro contra a perda de sangue em um vaso sanguíneo lesado. Esse processo pode ser dividido em três grandes etapas: vasoconstrição, agregação plaquetária e coagulação sanguínea. A vasoconstrição é a resposta contrátil do vaso lesionado, resultando em seu estreitamento e na redução do fluxo sanguíneo (Ribeiro e Francischetti, 2003a; Kumar *et al.*, 2010). Quando um vaso é danificado, as plaquetas aderem ao sítio da lesão e formam um agregado que tem como principal função conter o fluxo sanguíneo. A agregação plaquetária é um evento dinâmico, dividido em três etapas: na iniciação, as plaquetas aderem ao sítio da lesão formando uma película de células plaquetárias; na extensão, há o recrutamento e a ativação de plaquetas adicionais formando o tampão plaquetário; e na estabilização, há deposição de fibrina sobre o tampão plaquetário, formando o coágulo sanguíneo (Versteeg *et al.*, 2013).

A coagulação é um processo complexo, dependente da ativação de uma cascata de moléculas que culmina na conversão do fibrinogênio em fibrina, e por fim na formação do coágulo. Esse processo também é dividido em três etapas: iniciação, amplificação e propagação. Com a ruptura da vasculatura, as células subendoteliais (como as células musculares lisas e os fibroblastos) expõem o fator tecidual (FT) à circulação sanguínea, dando início à primeira

fase. FT se liga e atua como um cofator do fator VII (FVII), ativando sua proteólise e conversão para FVII ativado (FVIIa). O complexo TF/FVIIa cliva os fatores IX e X, convertendo-os em FIXa e FXa (ativados). Este último se associa com o FVa para formar o complexo protrombinase (Monroe e Hoffman, 2006), que converte protrombina (FII) em trombina. O fator V (FV) é ativado pelo FXa. O FXa pode se dissociar da célula que estiver expondo o FT para formar protrombinase nas membranas celulares de células distantes. Para limitar essa difusão, há no plasma peptídeos inibidores de serino proteases, por exemplo, do tipo Kunitz (Jesty, 1978).

A etapa da amplificação é caracterizada pela ativação das plaquetas, aderidas ao sítio de injúria, pela trombina, que converte FV em FVa, amplificando a atividade de protrombinase na superfície das plaquetas; converte FVIII em FVIIIa, um cofator de FIXa, gerando mais FXa; e convete FXI em FXIa (Versteeg *et al.*, 2013). Na etapa de propagação, FXIa converte FIX em FIXa, que se associa com FVIIIa para catalisar a conversão de FX a FXa; FXa/FVa produz trombina, que converte o fibrinogênio em fibras de fibrina. FXIIIa catalisa a formação de ligações covalentes entre as cadeias de fibrina adjacentes dando origem ao coágulo sanguíneo (Ariëns *et al.*, 2002). Quando há uma falha nesse sistema, e o equilíbrio desse processo é comprometido, pode ocorrer tanto hemorragia (perda excessiva de sangue) quanto a formação de trombos com componentes hematopoiéticos, que impedem o suprimento de sangue para os tecidos (Kumar *et al.*, 2010).

### **Proteomas salivares de triatomíneos hematófagos**

O estudo das funções das moléculas salivares de artrópodes hematófagos tem mobilizado muitos pesquisadores acerca desse tema. Entre as técnicas que podem ser empregadas para a realização desses estudos, as análises transcriptômicas e as análises proteômicas têm contribuído significativamente para aumentar o conhecimento sobre a composição da saliva desses organismos. São exemplos de estudos da saliva de triatomíneos hematófagos que empregaram essas análises: *R. prolixus* (Ribeiro *et al.*, 2004), *T. infestans* (Charneau *et al.*, 2007; Assumpção *et al.*, 2008), *T. brasiliensis*

(Santos *et al.*, 2007), *T. dimidiata* (Kato *et al.*, 2010), *R. brethesi*, *R. robustus* (Bussacos, A. C. *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2011), *P. megistus* (Bussacos, A. C. M. *et al.*, 2011), *Dipetalogaster maxima* (Assumpcao *et al.*, 2011), *T. rubida* (Ribeiro *et al.*, 2012) e *R. neglectus* (Santiago *et al.*, 2016). Para algumas das espécies acima foi descrito o sialoma: análise do transcrito (conjunto de completo de transcritos de uma célula, tecido ou fluido biológico em um momento preciso) e proteoma (conjunto de proteínas expressas em uma determinada célula, tecido ou fluido biológico em um momento preciso) das glândulas salivares.

O primeiro sialoma de uma espécie de triatomíneo hematófago a ser descrito foi o de *R. prolixus*, que contribuiu para o conhecimento de uma das famílias de proteínas mais abundantes na saliva dos triatomíneos, as lipocalinas (Ribeiro *et al.*, 2004). E o mais recente foi o de *R. neglectus*, que revelou elevado número de transcritos de serino proteases pela primeira vez no sialoma de um triatomíneo, sugerindo uma adaptação evolutiva para essa espécie (Santiago *et al.*, 2016).

### **Análise proteômica**

A espectrometria de massa é uma técnica que possibilita a investigação simultânea e em larga escala de diversas substâncias através da análise da relação massa/carga ( $m/z$ ) de peptídeos ionizados com o intuito de identificar proteínas ou quantificar os polipeptídeos de uma amostra. Junto com a bioinformática tem permitido a identificação de novas proteínas e/ou isoformas (Pandey e Mann, 2000). Há alguns anos, realizar esse tipo de análise era um desafio para os pesquisadores, enquanto hoje, já é possível identificar a maior parte das proteínas em um único experimento (Altelaar *et al.*, 2013). Existem dois tipos de abordagem, uma é o proteoma total que, como o próprio nome diz, é a análise de todas as proteínas expressas por um organismo. A segunda abordagem é o subproteoma, para o qual a amostra é submetida a um enriquecimento ou fracionamento celular possibilitando uma identificação minuciosa, o que resulta na detecção de proteínas pouco expressas, subrepresentadas ou não detectadas no proteoma total (Altelaar *et al.*, 2013).

Atualmente, com os avanços tecnológicos, a quantidade de proteínas identificadas após as amostras serem submetidas à espectrometria de massa é cada vez maior.

A espectrometria de massa foi utilizada em 1899 por J.J.Thompson, inventor do primeiro espectômetro de massa. Contudo, só foi realmente difundida nos estudos de biologia molecular com o desenvolvimento de técnicas de ionização que mantivessem parcialmente ou totalmente intacta a estrutura primária da cadeia polipeptídica. Dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se: a MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*), método no qual a amostra é misturada a uma matriz orgânica em uma placa metálica e submetida a um feixe de laser para ionização (Tanaka *et al.*, 1988); e a ESI (*electrospray ionization*), neste caso a amostra é misturada com um solvente iônico e volátil, que após evaporação deixa os peptídeos ionizados em fase gasosa (Fenn *et al.*, 1989). Os peptídeos ionizados são submetidos a um campo elétrico ganhando energia cinética de acordo com sua relação m/z em direção ao detector de massa. O resultado final é processado por um programa computacional e representado por um espectro de massa.

Atualmente, um dos mais modernos espectrômetros de massa é o LTQ orbitrap, um espectrômetro de massa híbrido que fornece uma plataforma versátil e minuciosa, e utiliza uma abordagem em que as amostras de peptídeos são analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS), uma técnica poderosa para a análise e identificação de proteínas em larga escala em amostras biológicas complexas.

## **Justificativa**

A abordagem proteômica permite a geração de um banco de proteínas expressas por determinadas células ou tecidos, as quais podem ser utilizadas em investigações futuras. Mais especificamente, as proteínas identificadas na saliva de triatomíneos podem contribuir na descoberta de alvos para o desenvolvimento de vacinas ou de inibidores que previnam o repasto satisfatório do triatomíneo e conseqüentemente, a transmissão do *T. cruzi* e *T.*



*rangeli*, protozoários transmitidos por esses vetores. Além disso, permite a bioprospecção de substâncias, por exemplo, marcadores de exposição, antimicrobianos, moléculas que possam ser utilizadas na prática clínica no âmbito das doenças hematológicas, entre outras. A amblyomina-X, um inibidor de serino protease do tipo Kunitz presente na saliva do carrapato *Amblyoma cajennense*, inibe a angiogênese que tem correlação direta com a metástase em pacientes com câncer (Drewes *et al.*, 2012; J. S. *et al.*, 2013; Ventura *et al.*, 2013). Dessa forma, as proteínas salivares dos triatomíneos e de outros artrópodes hematófagos são ferramentas científicas importantes para o desenho de moléculas terapêuticas e/ou para a prevenção da transmissão de doenças por esses vetores.

Com o intuito de realizar o estudo funcional de uma das proteínas salivares identificadas no sialoma de *R. neglectus* (Santiago *et al.*, 2016), um dos objetivos desse estudo foi expressar o antígeno 5 da saliva dessa espécie em *Escherichia coli*. Em carrapatos, moscas e mosquitos hematófagos, as proteínas da família do antígeno 5 parecem estar envolvidas na supressão do sistema imunológico do hospedeiro ou na prevenção da coagulação para prolongar a hematofagia (Ribeiro e Francischetti, 2003b). Essa função biológica é similar à proposta para ASP (*activation-associated secreted protein*) e para uma CRISP (*cysteine-rich secretory protein*) de lampréia do rio (Ito *et al.*, 2007).

Entretanto, em decorrência da impossibilidade de expressar o antígeno 5 de *R. neglectus* (RNAV) em *E. coli*, outro objetivo foi proposto para esse estudo: realizar, por LC-MS/MS, a análise proteômica da saliva de *T. dimidiata* comparando as proteínas identificadas cinco e dez dias após a alimentação sanguínea. Essa análise complementa a análise transcriptômica realizada para a saliva dessa espécie por Kato e colaboradores (Kato *et al.*, 2010), e mais recentemente, o sialoma realizado por Santiago em sua tese de doutorado.

## OBJETIVOS

### Objetivo 1

Investigar a expressão proteica na saliva de *Triatoma dimidiata* em diferentes tempos após a alimentação sanguínea, buscando alterações que possam contribuir para a elucidação dos mecanismos anti-hemostáticos e imunomodulatórios observados nesse inseto hematófago, além de contribuir para uma melhor compreensão do hábito hematofágico de triatomíneos.

Para alcançar este objetivo, as seguintes atividades foram desenvolvidas:

1. Manutenção da colônia de *T. dimidiata*;
2. Obtenção do extrato salivar de *T. dimidiata* 5, 10 e 20 dias após a alimentação sanguínea;
3. Verificação da integridade da fração salivar por meio de géis eletroforéticos uni e bidimensional;
4. Identificar os padrões de expressão proteica diferencial entre as amostras de saliva de *T. dimidiata* provenientes de diferentes períodos após a alimentação sanguínea, por espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS;
5. Avaliar as possíveis funções das proteínas diferencialmente expressas no triatomíneo e no hospedeiro.

### Objetivo 2

Caracterizar *in silico* a sequência aminoacídica, e expressar o antígeno 5 da saliva de *R. neglectus* (RNAV) em *Escherichia coli*.

Para alcançar este objetivo, as seguintes atividades foram desenvolvidas:

1. Caracterizar *in silico* a sequência aminoacídica do RNAV;
2. Realizar a expressão heteróloga do RNAV em *E. coli*;
3. Realizar processos de purificação da proteína recombinante expressa.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Manutenção da colônia de *T. dimidiata***

A colônia de *T. dimidiata* é descendente de insetos originários de Santander, Colômbia. Os triatomíneos são mantidos no Insetário do Biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 70–75% em um ciclo claro/escuro de 12/12 h. No insetário, os barbeiros são mantidos em frascos de polietileno para desenvolvimento e acasalamento, e alimentados quinzenalmente em aves (*Gallus gallus domesticus*) por 30 min. Insetos adultos foram usados nos experimentos.

### **Extração das glândulas salivares**

A saliva do *T. dimidiata* foi coletada através da dissecação das glândulas salivares em diferentes dias após a alimentação: 5, 10 e 20 dias. Para cada período, 15 triatomíneos adultos foram utilizados. Após a dissecação, as glândulas de cada grupo de 15 insetos foram colocadas na parede de microtubos de 1,5 mL, delicadamente perfuradas e mantidas a  $4^\circ\text{C}$  até o término da coleta, que ocorreu em aproximadamente 25 min. Em seguida, um coquetel de inibidores de protease (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) foi acrescentado, e a amostra submetida a uma centrifugação a  $16.000 \times g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . As frações solúveis foram quantificadas no fluorímetro de Qubit 2,0 (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante, analisadas em gel SDS/PAGE e estocadas a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento da análise proteômica.

### **Eletroforese unidimensional – 1-DE**

As frações solúveis contendo as proteínas salivares de 5, 10 e 20 dias após a alimentação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970). As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%,  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -ME)) fervidas por 5 min antes de serem aplicadas

no gel. A eletroforese foi realizada em sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad), a temperatura ambiente, com voltagem constante de 90 V na faixa concentradora e 120 V na região separadora. O marcador Bench Mark™ Protein Ladder (Invitrogen) foi utilizado como padrão de massa molecular. Ao término da eletroforese, o gel foi corado com Azul de Comassie (Metanol 45%, ácido acético 10%, Comassie Brilliant Blue R-250) por 2 h sob agitação constante, e posteriormente incubado com solução descorante (Ácido acético 10% e Metanol 10%).

### **Eletroforese bidimensional – 2-DE**

A fração solúvel contendo as proteínas salivares de 20 dias após a alimentação foi analisada por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE). Na primeira dimensão, foi realizada focalização isoelétrica (IEF) para separar as proteínas com base em seus pontos isoelétricos (pI) seguida, na segunda dimensão, pela separação com base no peso molecular em SDS-PAGE 12%.

A fita de gradiente de pH imobilizado [pH 3-10 (GE Healthcare – Immobiline™ DryStrip) de 13 cm pH foi reidratada com o extrato de proteínas ressuspendido em 250ul de solução de reidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, 85mM de DTT, 2,5% de Triton X-100, 0,5% de anfólitos pH 3-10, 10% de isopropanol, e azul bromofenol. A reidratação foi realizada por 1 h e 30 min a temperatura ambiente com o uso de 400 µL de óleo mineral para cobertura da tira, cuja finalidade é evitar que a amostra evapore e que se formem cristais de uréia.

A isoeletrofocalização foi realizada em sistema Ettan IPGphor3 (GE Healthcare). A programação utilizada foi: reidratação sem voltagem por 6 h, 30 V por 6h, 500 V por 1h, 1000 V por 1h, e 8000 V por 2h e 30min, totalizando 21.680 V por 16h e 30min. Após a focalização isoelétrica, a fita foi incubada com 50 ml de tampão de equilíbrio (Tris 1,5 M pH 8,8, Uréia 6 M, 30% de glicerol, 4% de SDS). Para a redução dos grupos tiólicos (-SH) das proteínas, a fita foi incubada com 3 ml de tampão de equilíbrio contendo 125 mM de DTT

por 40 min a temperatura ambiente. Para a alquilação dos grupos tiol e sua estabilização, a fita foi incubada com 3 mL de tampão de equilíbrio contendo 300 mM de acrilamida por 20 min a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada uma lavagem com tampão de corrida SDS-PAGE por 1 min.

A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, em tampão de corrida Tris-glicina 25 mM, pH 8,3 contendo SDS 0,1%. O marcador de peso molecular *Low molecular weight calibration kit* (GE healthcare) de peso molecular foi utilizado. A fita já equilibrada foi posicionada na parte superior do gel e imobilizada pela adição de uma solução de agarose 0,3% em tampão de corrida previamente aquecido, que resfriou por 5 min. A corrida eletroforética foi realizada empregando 30 mA constante entre 18 °C e 20 °C por 3h e 30min, quando a linha de azul de bromofenol chegou à parte inferior do gel.

As proteínas separadas no gel foram visualizadas por coloração com nitrato de prata. O gel foi incubado em solução fixadora (50% metanol, 12% ácido acético e 0,005% de formaldeído 37%) por 1 h. Em seguida, foi lavado por 20 min com solução de lavagem (50% etanol), depois, sensibilizado (0,002% de tiosulfato de sódio) seguido por 3 lavagens com água miliQ durante 20s cada uma. A etapa de impregnação (0,2% de nitrato de prata e 0,075% de formaldeído 37%) foi feita durante 20min seguida por 2 lavagens de 20 s cada com água miliQ e por fim, revelado com a solução reveladora (6% NaCO<sub>3</sub>, 0,05% de formaldeído 37% e 0,4mg de tiosulfato de sódio). Ao término da revelação, o gel foi lavado 2 vezes por 2 min cada lavagem com água MiliQ, a reação foi parada com a mesma solução fixadora, durante 1h e depois transferido para uma solução contendo 0,5% de ácido acético.

### **Preparação das amostras de saliva de *T. dimidiata* para a análise proteômica**

As frações solúveis contendo 200 µg de cada amostra (três replicatas biológicas: 5, 10 e 20 dpa. Para cada uma foram realizadas três replicatas técnicas) foram precipitadas com etanol/acetona. Neste procedimento foram

adicionados 4 volumes de etanol gelado, seguidos por mais 4 volumes de acetona gelada. As amostras foram incubadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 2h e centrifugadas a  $15.000 \times g$  por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi removido e descartado. O *pellet* foi lavado 3 vezes com uma solução contendo 40% etanol/40% acetona (Santiago *et al.*, 2016). As proteínas foram ressuspensas e desnaturadas em tampão TEAB 20 mM pH 8,5 contendo 8 M de uréia e amberlite 1% por 30 min, filtradas, reduzidas na presença de DTT 20 mM por 40 min a  $25^{\circ}\text{C}$ , e depois, alquiladas com iodoacetamida 40 mM no escuro por 40 min.

Em seguida, as proteínas foram digeridas com tripsina por 17h a  $25^{\circ}\text{C}$ . Para cada 100  $\mu\text{g}$  de proteína, 1 $\mu\text{g}$  de tripsina foi utilizado. Após a digestão, as amostras foram acidificadas com TFA 0,1% (concentração final) e dessalinizadas. A dessalinização foi realizada em microcoluna *home made* com a resina Poros Oligo R3 (Applied Biosystems, Califórnia EUA).

## **LC-MS/MS e processamento dos dados**

A aquisição dos dados foi realizada em sistema de LC-MS/MS com colunas capilares em Dionex Ultimate™ 3000 RSLCnano system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diretamente acoplado ao espectrômetro de massas híbrido do tipo iontrap-orbitrap, Orbitrap Elite™ ETD (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA).

As amostras dessalinizadas foram primeiramente submetidas à uma pré-coluna capilar de fase reversa ReproSil-Pur-AQ C18 de 5  $\mu\text{m}$  empacotada manualmente de dimensões 2cm x 100  $\mu\text{m}$  (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany, cat. n# r13.aq.) e então fracionadas em coluna analítica de fase reversa ReproSil-Pur-AQ C18 (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany, cat. n# r15.aq.) de 35 cm e 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro, montada manualmente.

Os peptídeos foram solubilizados em ácido fórmico 0,1%, injetados na pré-coluna pela técnica *Partial loading injection* e lavados em solução contendo 98% do solvente A (ácido fórmico 0,1%) e 2% solvente B (ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 95%) em fluxo de 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ . A cromatografia foi realizada a um fluxo de 250 nL/min por 200 min, dividida em gradientes de 5-25% do solvente B por

130 min; 45-85% até 181 min; 85% por 10 min, até 191 min; e finalmente, 2% até 200 min. A amostra fracionada foi ionizada a 2,5 kV pela fonte de ionização Nanospray Flex™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e temperatura de capilar a 275 °C.

Os dados foram adquiridos por espectrometria de massas em modo positivo por *Data-Dependent Acquisition*, operado pelo programa Xcalibur 2.2 SP 1.78 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). O escaner de varredura foi ajustado para utilizar resolução de 120.000 FWHM, m/z de 400, valor alvo de controle de ganho automático de  $1 \times 10^6$  íons para todas as leituras no FTMS e tempo máximo de preenchimento de 200 ms, faixa de m/z de 300 a 1650 e seleção dos 20 picos mais intensos com carga diferente de +1 a cada ciclo de trabalho para fragmentação por MS2 por *collision-induced dissociation* (CID), e energia de colisão normalizada de 35% e valor alvo de íons igual a  $1 \times 10^4$  no *ion trap linear*.

Os eventos de leitura para isolamento do pico monoisotópico tiveram janela de 2 Th e carga padrão de 2. Não foi habilitada a função de massas fixas. Tempo de ativação de 0,1ms. Filtragem de estado de carga foi habilitada com as configurações de repetição de contagem = 1; duração da repetição = 90 s; exclusão de tamanho da lista de exclusão = 500. Parâmetro de ativação q = 0,25.

### **Análise de bioinformática**

O programa *PatternLab for Proteomics 4.0* (Carvalho *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 elaborado no programa *PatternLab* a partir dos dados do *Triatoma dimidiata* depositados no banco *The Universal Protein Resource* (UniProt), baixado no formato FASTA

no dia 30/05/2016, totalizando 4153 sequências, incluindo 127 sequências de contaminantes-padrão oferecidas pelo programa. 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 protéica como semi-trípica com tolerância para até 2 clivagens perdidas, modificação fixa de resíduos de cisteínas carbometiladas, *Fragment bin tolerance* = 1,0005%, *Fragment bin offset* = 0,40, *Theoretical fragmentions* = *M peak only*, busca na faixa de massa entre 550 e 5500.

Os resultados da busca foram pós-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 *False Discovery Rate* (FDR) de cada amostra. O FDR para a amostra com cinco dias após a alimentação foi de 0,16% para peptídeos e 0,66% para proteínas. Para a amostra com 10 dias após a alimentação o FDR foi de 0,14% para peptídeos e 0,66% para proteínas. 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.

Utilizando a ferramenta computacional Blast2GO 3.3 básico, as sequências polipeptídicas das proteínas identificadas foram analisadas, em relação aos processos biológicos, componentes celulares e função molecular (Conesa et al., 2005). Outras análises *in silico* foram realizadas utilizando como arquivo de entrada um arquivo multi-fasta contendo as sequências resultantes do pré-processamento: primeiramente, para a predição das proteínas secretadas pela via clássica, o *programa SignalP* foi utilizado para averiguar a presença de peptídeo sinal e a localização dos sítios de clivagem, A partir do resultado, as proteínas que putativamente contêm peptídeo sinal N-terminal, foram removidas dando origem ao subconjunto 1, o qual foi submetido ao *programa SecretomeP 2.0* (Bendtsen et al., 2005) para a predição de secreção



por vias não clássicas. As proteínas preditas como secretadas por essas vias foram removidas, dando origem ao subconjunto 2, que foi submetido ao programa TMHMM, em sua versão 2.0 para a realização da predição de domínios  $\alpha$ -hélices transmembrânicos. Não existem parâmetros que alterem a sensibilidade ou a especificidade das predições nesse programa, já que os parâmetros existentes se referem à forma de apresentação do resultado. A opção padrão de apresentação de resultados chamada *Extensive, with graphics* foi utilizada. As proteínas que apresentaram domínio transmembrana foram filtradas do subconjunto 2, originando o subconjunto 3. Por fim, este último subconjunto foi submetido ao programa *TargetP*, em sua versão 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2007) para a realização das predições de localização subcelular. Para a execução do *TargetP*, os seguintes parâmetros foram considerados: *Non-plant*, que realiza predições para organismos não vegetais, e inclusão da predição de sítios de clivagem (Emanuelsson *et al.*, 2007). O diagrama de Venn foi gerado com a utilização do programa Venny. Os gráficos foram gerados com a utilização do programa GraphPad Prism versão 7(Oliveiros, 2007-2015).

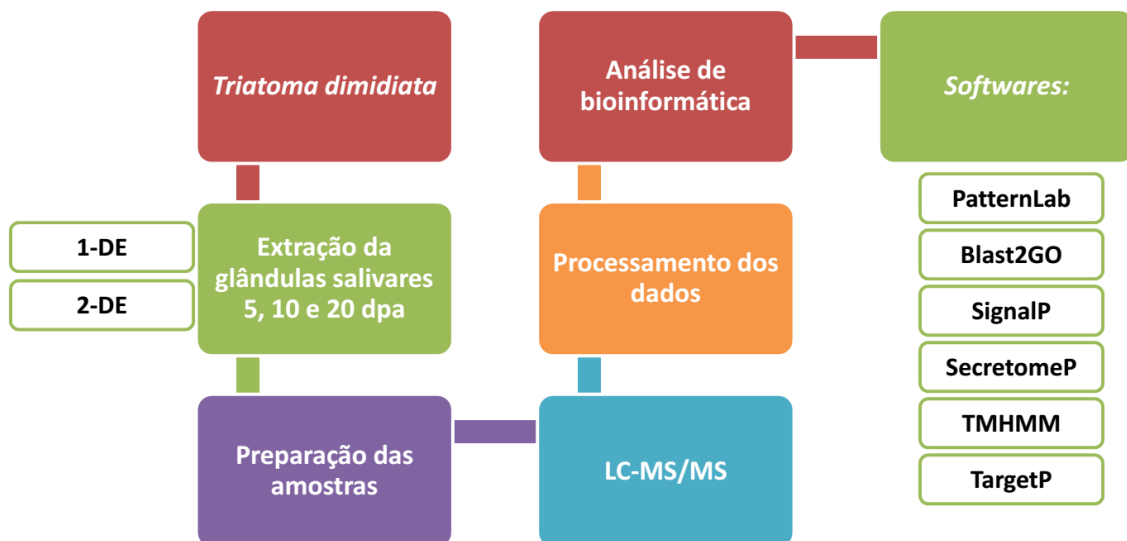


Figura 3. Representação esquemática dos passos envolvidos na análise proteômica das amostras de saliva de *T. dimidiata* coletadas 5, 10 e 20 dias após a alimentação sanguínea (dpa).

### **Análise *in silico* da sequência do antígeno 5 de *R. neglectus* (RNAV)**

A busca da sequência codificadora para o antígeno 5 de *R. neglectus* (RNAV) foi realizada no transcrito salivar dessa espécie (Santiago *et al.*, 2016). O alinhamento simples da sequência de aminoácidos com o objetivo de verificar dados de similaridade e identidade desta proteína em outros organismos foi realizado usando o algoritmo *Protein Blast* (Blastp, NCBI, Bethesda, MD, USA). Para o alinhamento múltiplo, sequências de aminoácidos de antígenos 5 de outras espécies foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW (EMBL, Heildeberg, Alemanha). Para a identificação dos domínios conservados na sequência do RNAV foi utilizado o banco de dados CDD via BLAST (NCBI). Os seguintes programas também foram utilizados: *TargetP* 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2007) para predição da localização, *SignalP* 4.0 (Emanuelsson *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 2011) para predição de peptídeo sinal, *NetPhos* 2.0 para a predição de sítios de fosforilação, *GlycoEP* para a predição de sítios de glicosilação e *BepiPred* 1.0b para a predição de possíveis epítomos lineares para os linfócitos B.

### **Linhagens de *E. coli* utilizadas**

Quatro linhagens de *E. coli* foram utilizadas: uma (TOP10) apenas para a amplificação do plasmídeo contendo a sequência do RNAV, e três na tentativa de expressar o RNAV recombinante: BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS e Rosetta2(DE3)pLysS. Ambas podem ser utilizadas para expressões de proteínas recombinantes utilizando o promotor T7 que está presente no vetor pET utilizado (pET15b), e são lisógenos do fago  $\lambda$ DE3, ou seja, carregam uma cópia do gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor indutível por IPTG *lacUV5* em seu cromossomo. O plasmídeo pLysS carrega o gene que codifica para a lisozima T7 que diminui a expressão basal do gene alvo antes da adição de IPTG ao meio de cultura. Esse plasmídeo induz resistência ao cloranfenicol.

## **Amplificação do plasmídeo contendo o gene do RNAV**

A sequência codificadora do RNAV foi clonada no vetor de expressão em bactérias pET15b (Novagen) entre os sítios de clonagem 5' NdeI e 3' BamHI (pET15b\_RNAV) pela empresa Genecust (Dudelange, Luxemburgo). Esse plasmídeo contém uma cauda de seis histidinas na porção N-terminal e confere resistência à ampicilina. O plasmídeo foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* da linhagem TOP10 e amplificado utilizando o *kit PureLink HiPure Plasmid Midiprep* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, uma cultura de TOP10 foi centrifugada a 4.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi homogeneizado em 4 mL de tampão R3 (ressuspensão, contém RNase). Em seguida, 4 mL de tampão de lise (L7) foram adicionados à solução, o tubo foi invertido gentilmente 5 vezes e incubado por mais 5 min a temperatura ambiente. 4 mL do tampão de precipitação (N3) foram adicionados e o tubo invertido para homogeneização. A solução foi centrifugada a 12.000 x g por 10 min à temperatura ambiente e aplicada à coluna de purificação previamente equilibrada com 10 mL de tampão EQ1. A passagem dos tampões na coluna se deu por gravidade. A coluna foi lavada duas vezes com 10 mL de tampão de lavagem (W8) cada, e a eluição do DNA purificado foi realizada com 5 mL do tampão de eluição (E4) em tubo do tipo falcon de 15 mL. Para a lavagem e precipitação do DNA, adicionou-se 3,5 mL de isopropanol e centrifugou-se a 12.000 x g por 30 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento acrescentou-se 3 mL de etanol 70%. Foi realizada nova centrifugação a 12.000 x g por 5 min à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi deixado para secar por 10 min, resuspendido em 100 µL de água milliQ e estocado à -20°C.

## **Transformação de *E. coli* com pET15b\_RNAV**

Para a síntese do RNAV recombinante (RNAVr), BL21(DE3) e Rosetta2(DE3)plysS competentes foram transformadas com 1 µL (100 ng/µL) do plasmídeo pET15b\_RNAV, seguindo as instruções do manual *pET system*. Resumidamente, o plasmídeo foi adicionado ao microtubo contendo as células hospedeiras, que foi deixado por 30 min no gelo. Em seguida, o tubo foi

colocado a 42° C por 45 seg para o choque térmico e deixado por mais 2 min no gelo. Após esse procedimento, foram adicionados 250 µL de meio SOC a temperatura ambiente e incubado a 37°C por 1 h sob agitação de 250 rpm. 100 µL da cultura foram estricados em uma placa de meio Luria-Bertani-ágar (LB-ágar) contendo 100 µg/mL de ampicilina no caso de BL21(DE3), e no caso da Rosetta2(DE3)pLysS, 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C *overnight* para o crescimento das colônias.

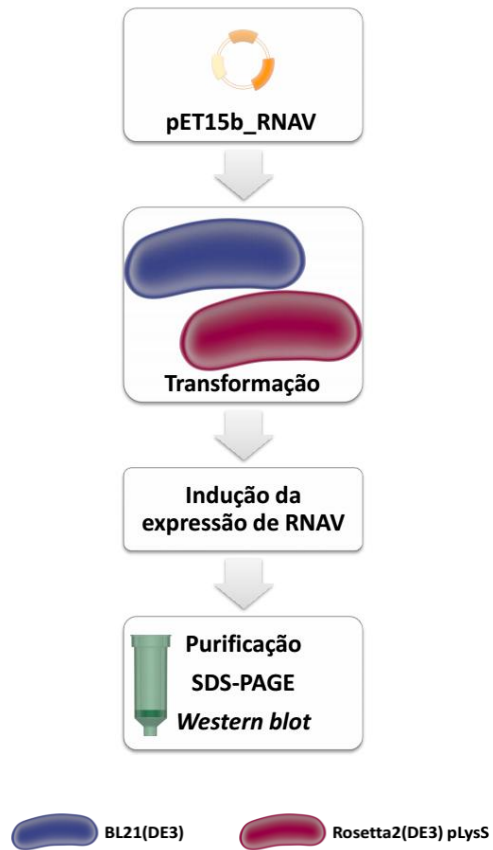
### **Indução da expressão do RNAV em *E. coli***

Cada clone de BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS ou Rosetta2(DE3)pLysS transformado foi cultivado em 5 mL de meio LB líquido contendo antibióticos apropriados, sob agitação a 250 rpm (Shaker TE424, Tecnal), por aproximadamente 16 h. No dia seguinte, o pré-inóculo foi diluído em 50 mL de meio LB contendo os antibióticos apropriados e incubado a 37 °C, sob a mesma agitação, até atingir OD600 de aproximadamente 0,4-0,6 (multi-leitora de placas para fluorescência Spectra-Max M5). A expressão do RNAVr foi induzida pela adição de 0,25 mM a 1 mM de IPTG. A cultura foi incubada inicialmente por 3h, a 37 °C, sob agitação (250 rpm). Outras condições testadas foram: 6 h a temperatura ambiente, *overnight* a 20 °C. Ao término da incubação, a cultura foi centrifugada a 2.500 x g por 20 min e o sedimento foi homogeneizado em BugBuster (Novagen), reagente usado para lisar as bactérias, seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, para cada g de sedimento, foram acrescentados 5 mL do reagente contendo DNase. O sedimento foi ressuscitado e agitado a temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, foi centrifugado a 16.000 x g (CF16RXII, Hitachi) por 20 min a 4 °C. O sobrenadante ou fração solúvel (FS) foi transferido para um novo tubo. O sedimento ou fração insolúvel (FI) foi ressuscitado em água milliQ. Essas frações foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970), corado com azul de Coomassie.

### **Western blot**

As frações FS e FI descritas acima foram separadas em um gels SDS-PAGE 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amershan™ Potran® Supported, GE Healthcare) em sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad), em sistema resfriado, com amperagem constante de 350 mA por 1h, para serem analisadas por *western blot*. O marcador de peso molecular pré-corado *Color Burst Markers* (Sigma- Aldrich) foi utilizado. A membrana foi bloqueada com TBS (*Tris buffered saline*- 50mM Tris e 150mM NaCl) contendo leite 5% por 1 h. Em seguida, adicionou-se TBS leite 1% contendo o anticorpo anti-cauda de histidina (SIGMA) diluído 1:1000, e incubou-se durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, a membrana foi lavada 4 vezes com TBS contendo 0,1% de Tween 20 por 5 min cada lavagem a temperatura ambiente e incubada com TBS leite 1% contendo o anticorpo secundário goat-anti mouse IgG horseradish peroxidase conjugated diluído 1:30000, por 2 h a temperatura ambiente. As etapas de lavagem foram repetidas e a revelação foi feita com o substrato quimioluminescente de peroxidase (ECL™ Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare) no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).



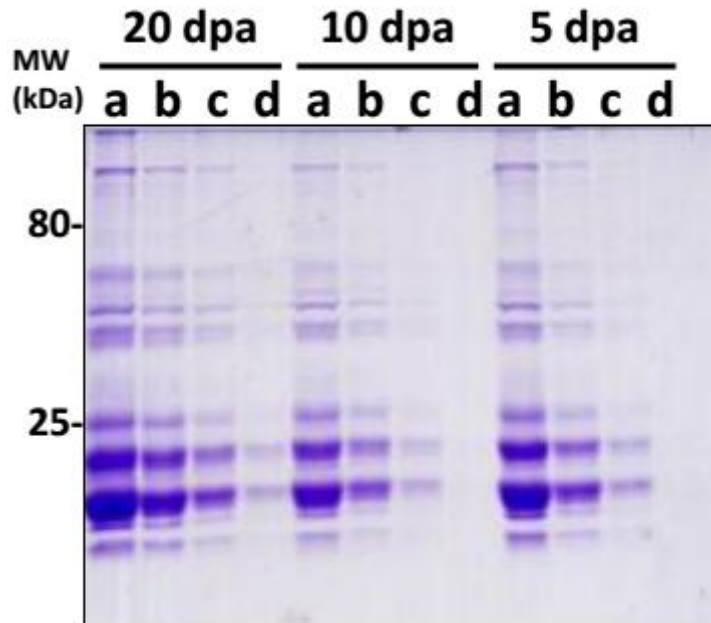
**Figura 4.** Representação esquemática dos passos envolvidos na expressão do antígeno 5 da saliva de *R. neglectus* (RNAV) em *Escherichia coli*.

## RESULTADOS

Utilizando a metodologia proposta anteriormente , uma análise dos produtos secretados pelas glândulas salivares do triatomíneo *T. dimidiata* em diferentes tempos após o repasto foi realizada. Resumidamente, a integridade da saliva coletada foi investigada por eletroforese e em seguida a amostra foi submetida à espectrometria de massa para identificação das proteínas secretadas. Posteriormente diferentes programas computacionais foram utilizados para analisar os resultados da espectrometria.

### **Os perfis eletroforéticos uni e bidimensional da saliva de *T. dimidiata***

Para verificar a integridade das amostras de saliva de *T. dimidiata* coletadas 5, 10 e 20 dias após a alimentação, as amostras foram submetidas à análise em gel SDS-PAGE. O perfil eletroforético das bandas das proteínas salivares observadas na Figura 5 mostra que as amostras não parecem estar degradadas já que possuem o mesmo padrão e, portanto, eram adequadas para a realização do gel bidimensional (Figura 6) e para a análise proteômica.



**Figura 5.** Eletroforese unidimensional das proteínas salivares de *T. dimidiata* coletadas 5, 10 e 20 dias após a alimentação sanguínea (dpa). SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. Mw – marcadores de peso molecular. (a) 20 ug; (b) 10 ug; (c) 5 ug; e (d) 2,5 ug de proteínas.

Com o intuito de comparar o perfil eletroforético bidimensional da saliva de *T. dimidiata* com o da saliva de *T. infestans*, realizou-se um gel bidimensional usando focalização isoelétrica na faixa de pH 3-10, a mesma utilizada por Charneau e colaboradores (Charneau *et al.*, 2007) em seu estudo. Assim como observado para a saliva de *T. infestans*, a maioria dos *spots* protéicos concentrou-se na região alcalina do gel. O perfil eletroforético bidimensional indicou que proteínas distribuídas na faixa de 14,4 kDa a 30 kDa são abundantemente expressas na saliva de *T. dimidiata*. Adicionalmente, é possível observar outros *spots* entre 68 kDa e 97 kDa, uma faixa menos abundante.



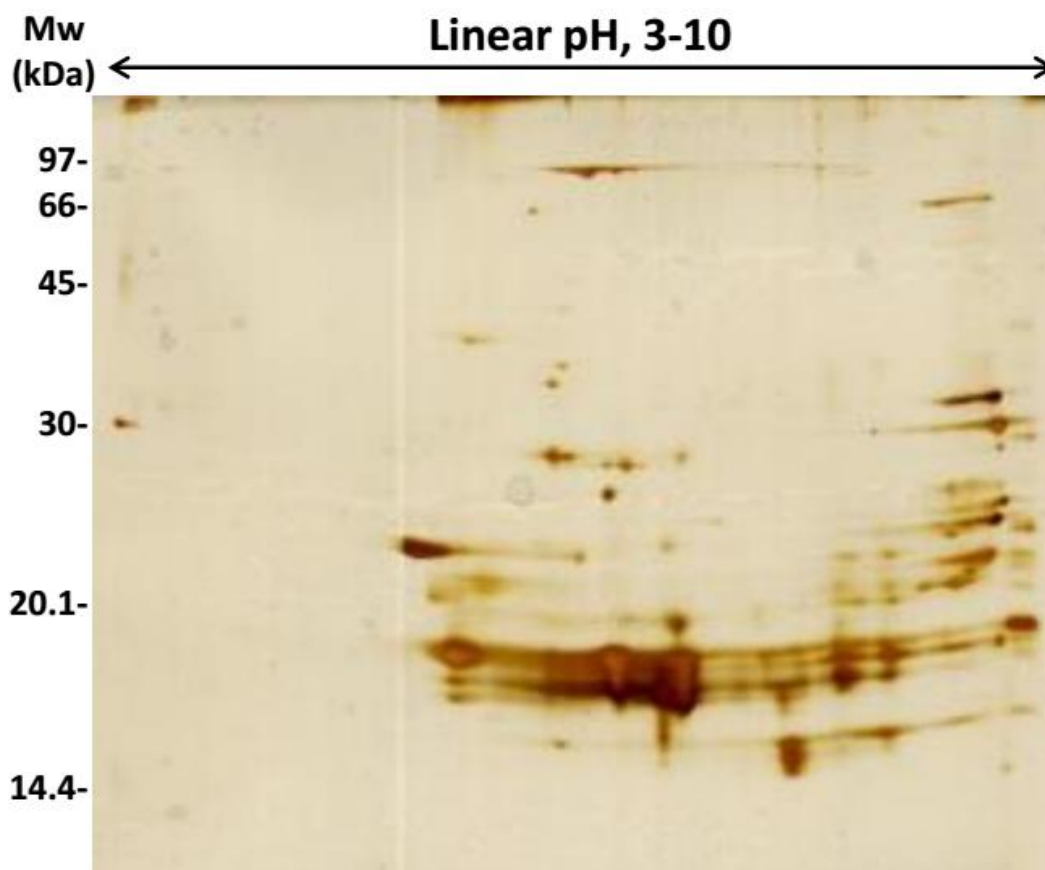


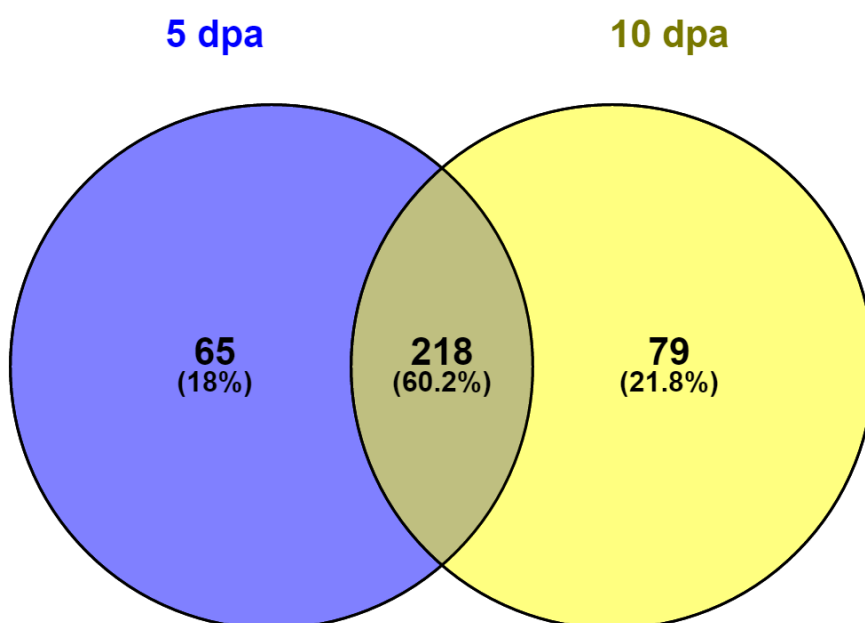
Figura 6. Eletroforese bidimensional das proteínas salivares de *T. dimidiata* 20 dias após a alimentação sanguínea. 2-DE foi realizado sob condições desnaturantes e corado com nitrato de prata. A amostra continha 100 ug de proteínas salivares. Mw – marcadores de peso molecular.

### **Análise proteômica da saliva de *T. dimidiata***

Os dados obtidos pela espectrometria de massas foram analisados no programa *PatternLab*. A identificação das proteínas foi possível mediante busca no banco de dados UniProt, o resultado pode ser observado em 2 tabelas contendo o número de acesso da sequência de maior *score* e a descrição putativa de cada proteína identificada nas amostras (Anexo 1).

Na amostra de 5dpa foram identificadas 283 proteínas a partir de 1167 peptídeos. Outras 297 proteínas foram identificadas de 1411 peptídeos na amostra de 10 dpa. O FDR para a amostra com 5 dias após a alimentação foi de 0,16% para peptídeos e 0,66% para proteínas. Para a amostra com 10 dias após a alimentação o FDR foi de 0,14% para peptídeos e 0,66% para proteínas.

A análise dos resultados permitiu observar que a maioria das proteínas encontradas está presente tanto em 5, quanto em 10 dias após a alimentação. Apenas 18% das proteínas identificadas em 5 dias são exclusivas deste período, enquanto 21,8% das proteínas da amostra de 10 dias são exclusivas desta (Figura 7). Em ambos os períodos, diferentes proteínas secretadas e intracelulares foram identificadas.



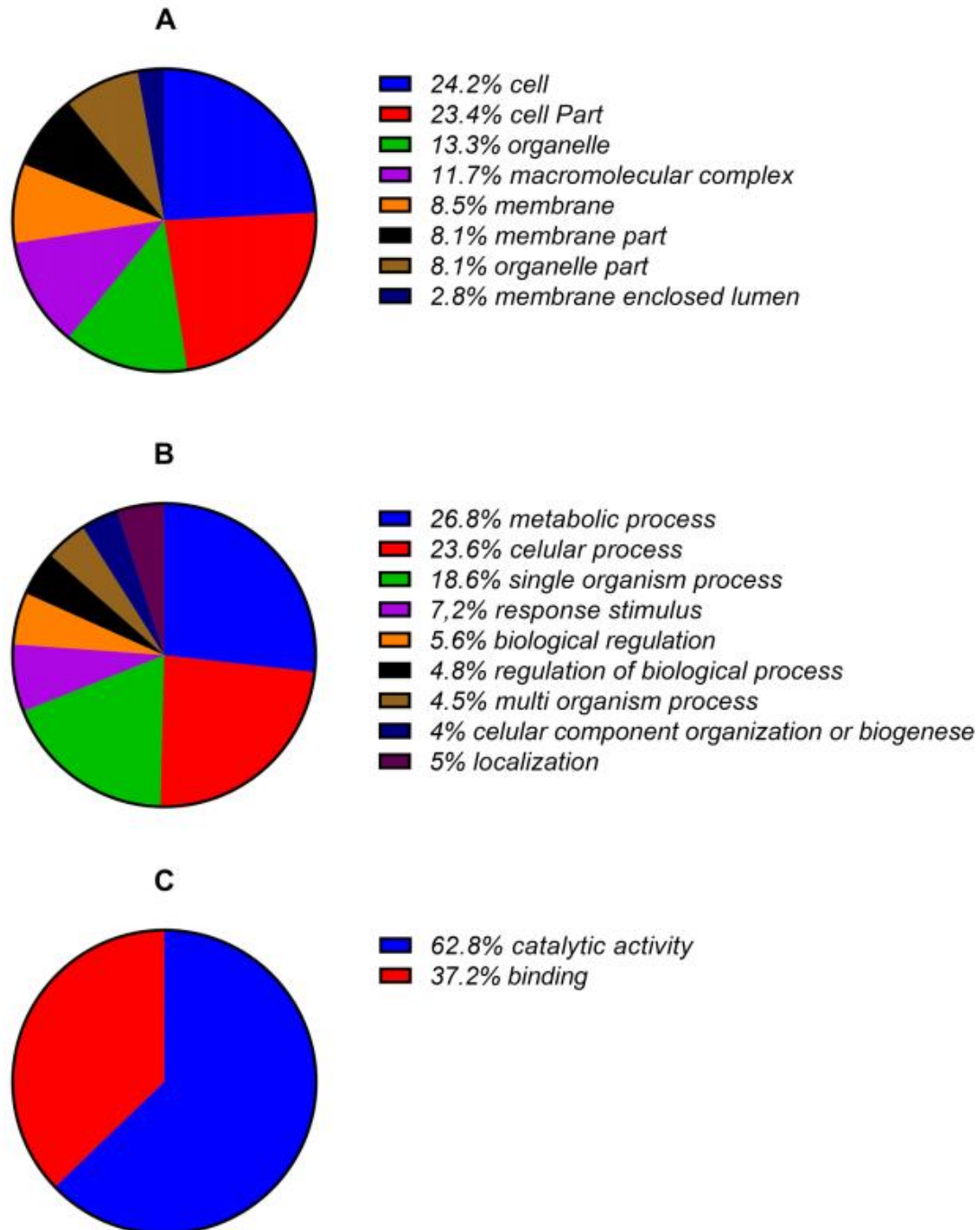
**Figura 7.** Diagrama de Venn gerado a partir do número de proteínas salivares de *T. dimidiata* compartilhadas e exclusivas das amostras de saliva coletadas 5 e 10 dias após a alimentação sanguínea e utilizadas nas análises comparativas.

### **Análises *in silico* das proteínas identificadas 5 e 10 dias após a alimentação**

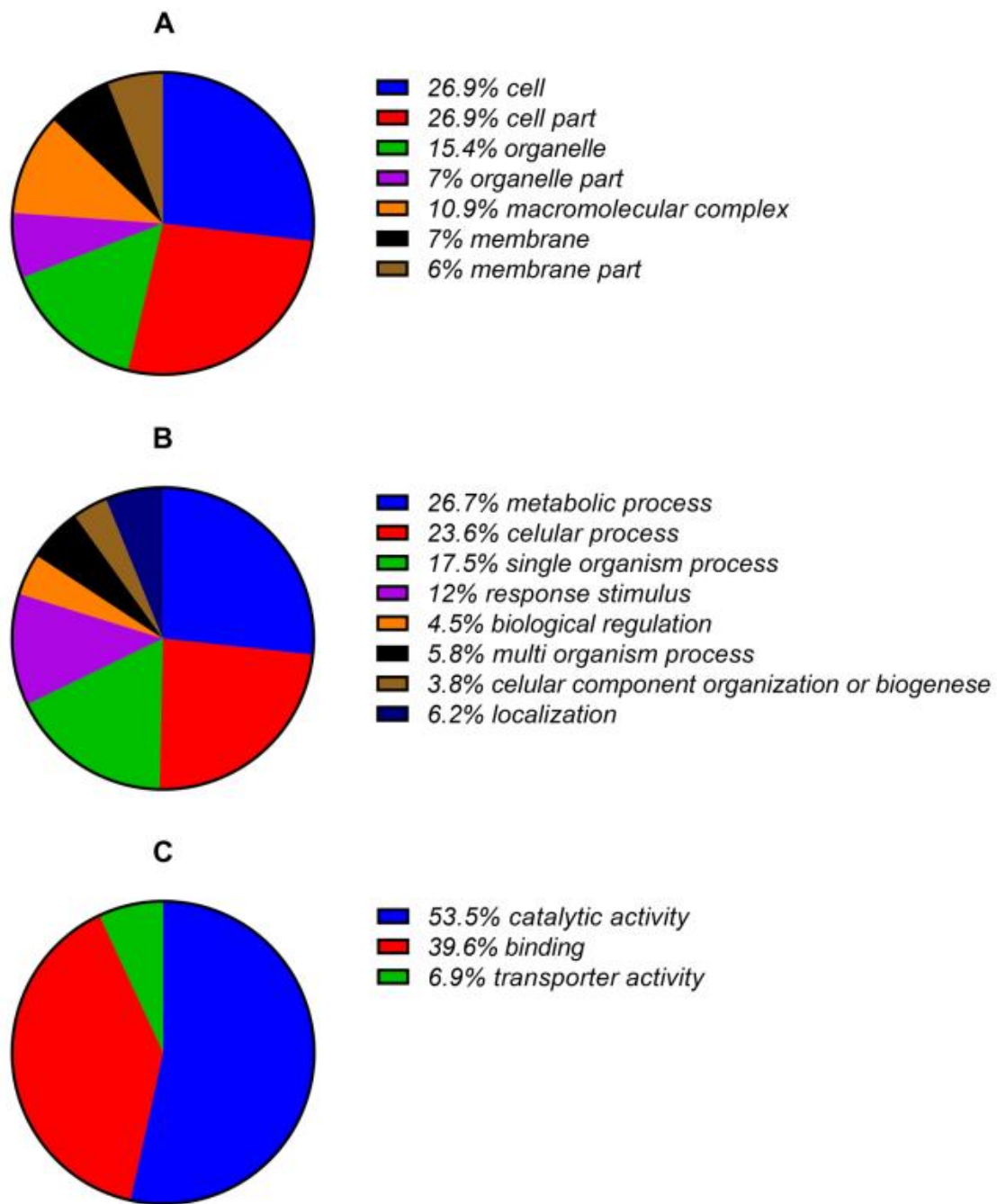
As sequências das proteínas identificadas foram submetidas a análises *in silico* em programas disponíveis *online* conforme descrito anteriormente na metodologia.

Primeiramente, utilizando o programa Blast2go, as sequências obtidas foram submetidas ao Gene Ontology Consortium. Para as análises, as sequências foram agrupadas da seguinte maneira: proteínas de 5 dias após a alimentação (dpa); proteínas de 10 dpa; proteínas específicas de 5 dpa;

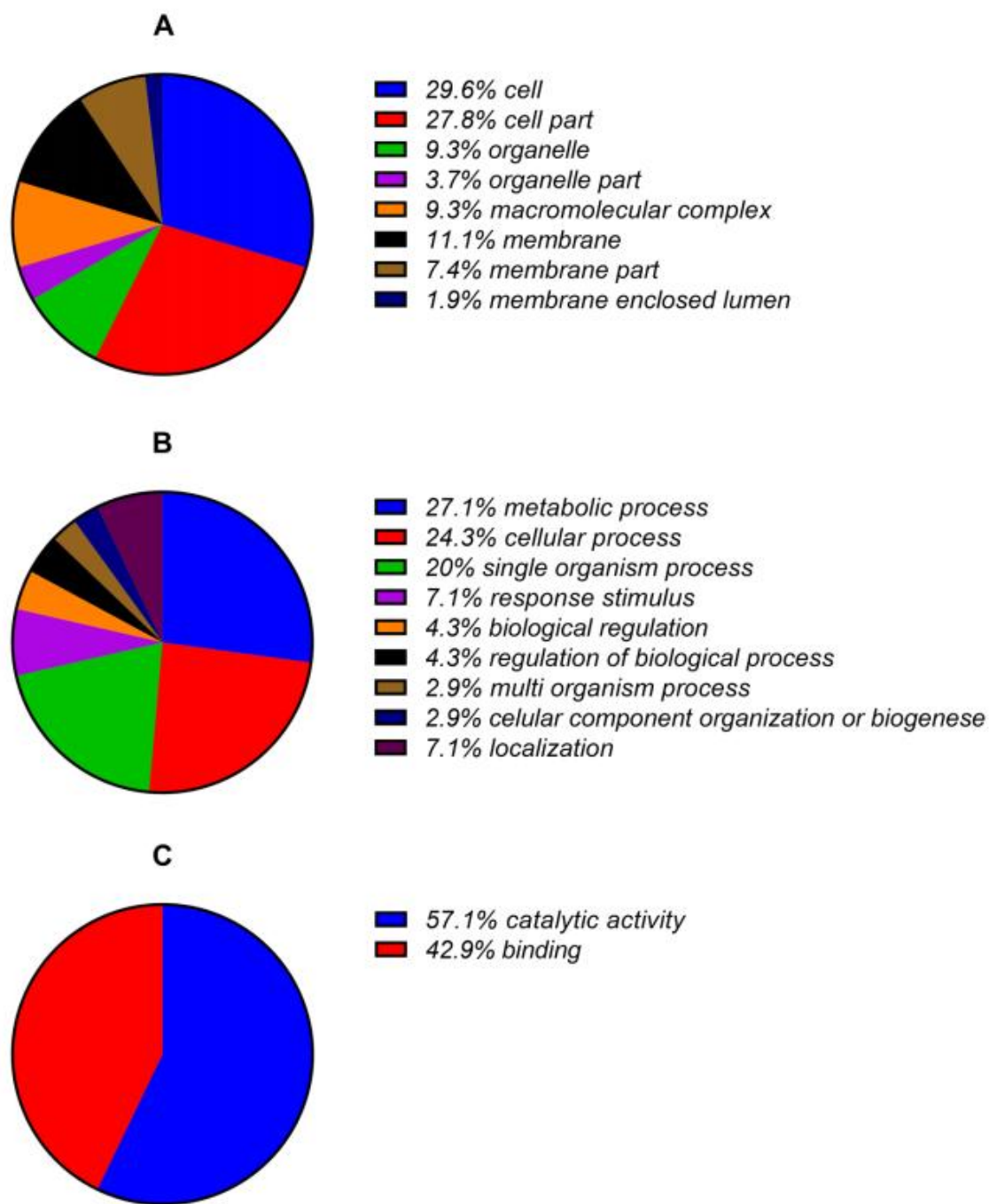
proteínas específicas de 10 dpa; e proteínas em comum. Para a classificação, as seguintes categorias foram utilizadas: componente celular, processo biológico e função molecular. As ontologias resultantes destas análises podem ser observadas nas figuras 8, 9, 10, 11 e 12.



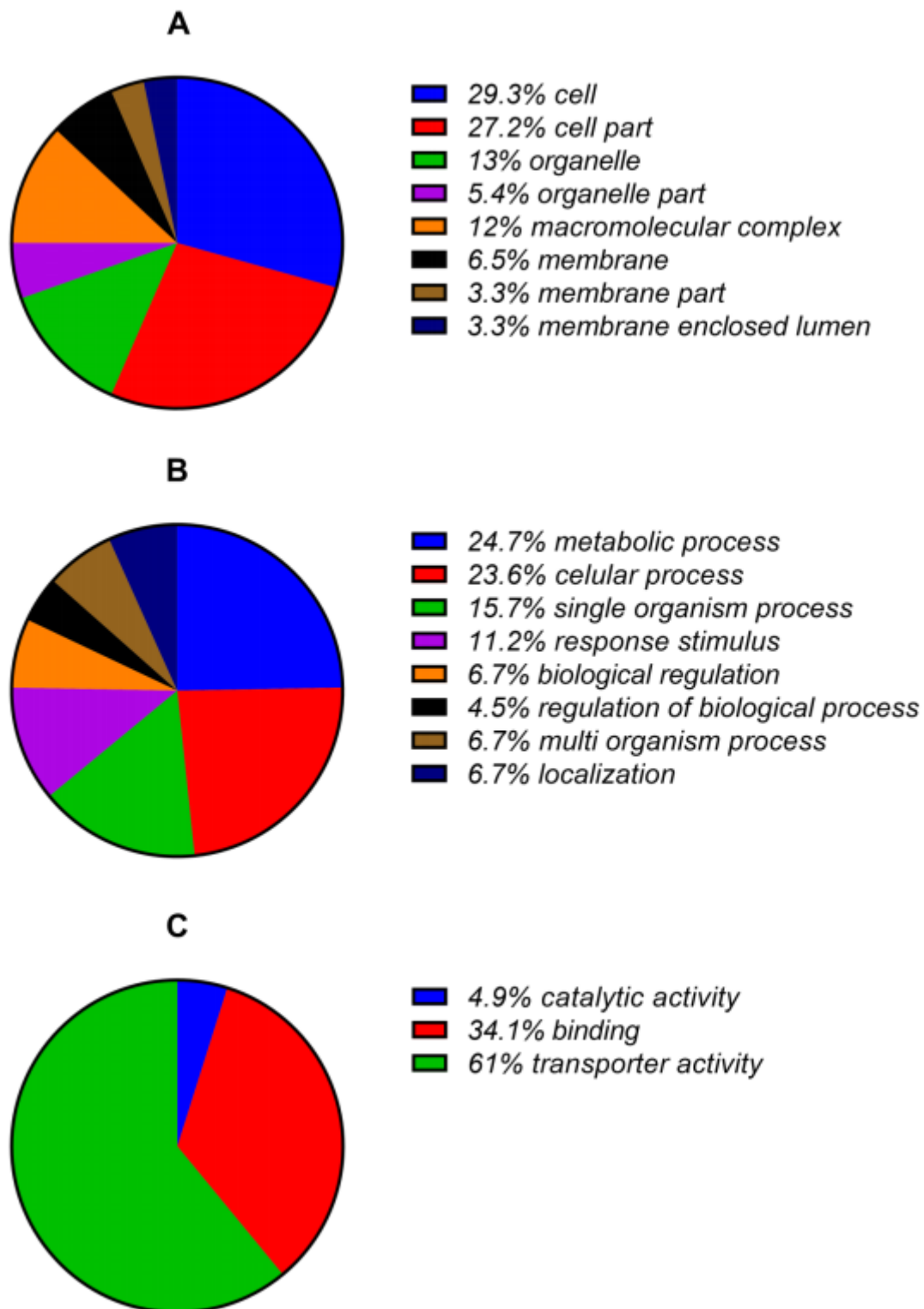
**Figura 8.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* coletadas 5 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO.



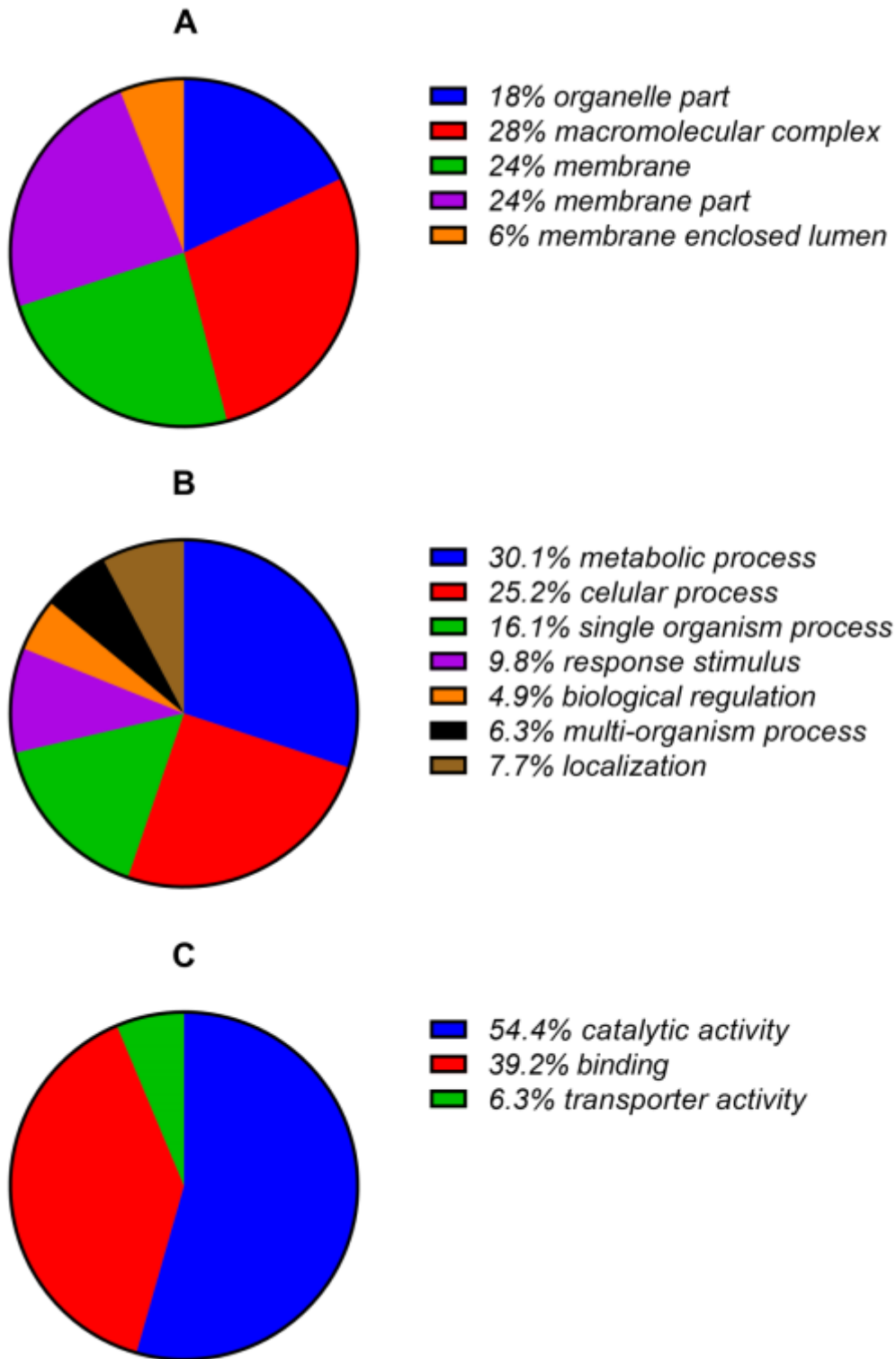
**Figura 9.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* coletadas 10 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO.



**Figura 10.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* encontradas apenas nas amostras coletadas 5 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO.



**Figura 11.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* encontradas apenas nas amostras coletadas 10 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do Gene Ontology. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO.



**Figura 12.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* comuns nas amostras coletadas 5 e 10 dias após a alimentação sanguínea, distribuídas segundo as categorias do Gene Ontology. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO.



A fim de investigar quais proteínas são realmente secretadas os conjuntos das sequências das proteínas identificadas em 5 e 10 dpa foram submetidos a dois *programas*, primeiramente ao SignalP (ref) e em seguida, ao SecretomeP (ref). O SignalP prediz se as proteínas são secretadas pela via clássica (presença de peptídeo sinal no N-terminal) e o SecretomeP se são secretadas por vias não clássicas.

### **5 dias após alimentação**

Os resultados apontaram que, dentre as 283 proteínas salivares identificadas 5 dpa, 45 (15,9%) apresentaram peptídeo sinal e são secretadas pela via clássica. Outras 64 (22,6%) são secretadas pela via não clássica e o restante, 174 (61,5%) não são secretadas (Figura13, A).

O *programa* TMHMM revelou que, das 174 proteínas não secretadas, três proteínas (1,1%), A0A0V0G2F9 [*NADPH--cytochrome P450 reductase* (EC 1.6.2.4), A0A0V0G5R3 (*putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit a*) e A0A0V0G415 (*putative 26s proteasome regulatory complex subunit rpn2/psmd1*), contêm uma hélice transmembrânica (Figura13 B).

A análise realizada pelo *programa* TargetP nas 171 proteínas restantes, levou ao encontro de 18 (6,4%) proteínas mitocondriais, 151 (53,4%) extramitocondriais, e ainda 2 (0,7%) proteínas, A0A0V0G479 (*Putative phosphoinositide 3-kinase*) e A0A0V0G4S4 (*Malate dehydrogenase*), secretadas (Figura 13, B).

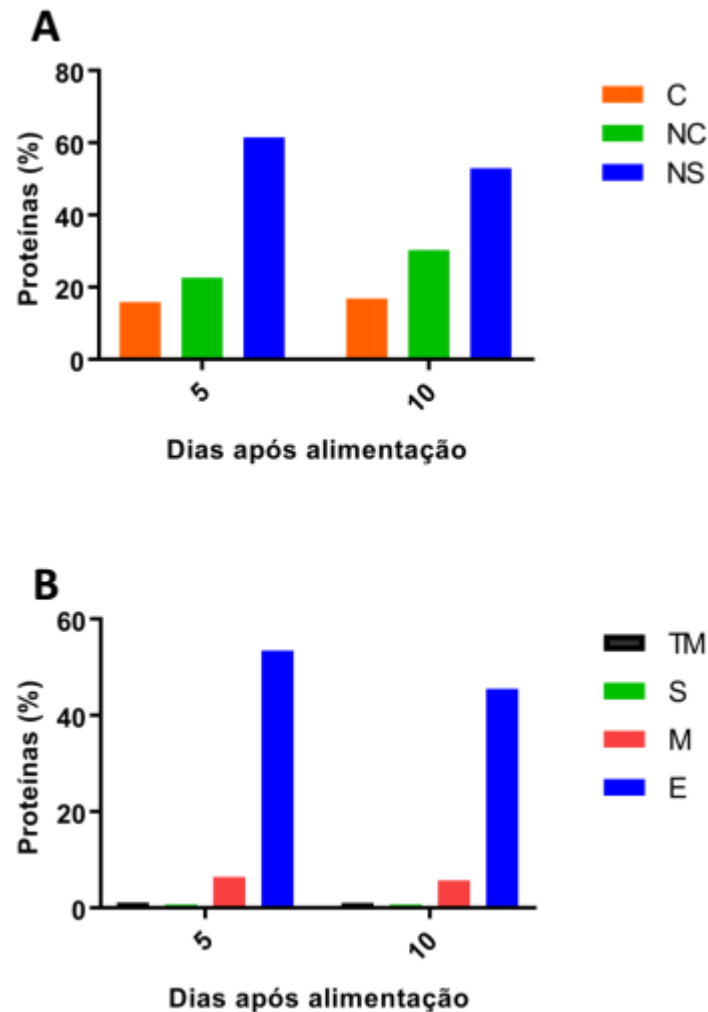
### **10 dias após alimentação**

Entre as 297 proteínas salivares identificadas dez dias após a alimentação (10 dpa), 50 (16,8%) apresentaram peptídeo sinal e são secretadas pela via clássica. Outras 90 (30,3%) são secretadas pela via não clássica e o restante, 157 (52,9%) não são secretadas (Figura 13, A).

Aquelas três proteínas que contêm uma hélice transmembrânica pelo *programa* TMHMM na amostra de 5 dpa foram precisamente as mesmas



identificadas na amostra de 10 dpa. Finalmente, a análise realizada pelo programa TargetP revelou que 17 (5,7%) proteínas são mitocondriais, 135 (45,5%) são extramitocondriais, e ainda, 2 (0,7%) são secretadas (Figura 13, B). E, essas duas proteínas preditas como secretadas pelo TargetP são as mesmas identificadas na amostra de 5 dpa (Figura. 13, B).



**Figura 13.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* 5 e 10 dias após a alimentação. (A) Predição das proteínas secretadas pela via clássica (C) ou via não clássica (NC), e não secretadas (NS). (B) Predição da localização celular das proteínas salivares não secretadas. TM – transmembrânica, realizada pelo programa TMHMM; S – secretada, M – mitocondrial, E – extramitocondrial, realizadas pelo programa TargetP.

A soma das proteínas secretadas pela via clássica em 5 e 10 dpa totalizou 56 proteínas. Destas, 6 proteínas (10,7%) são específicas da amostra de saliva de 5 dpa, 11 (19,6%) são específicas da amostra de saliva de 10 dpa e 39 (69,6%) são comuns em ambas as amostras. As proteínas específicas da amostra de 5 dpa, são as seguintes: A0A0V0GCM8 (*Putative kazal-type inhibitor*), D1MXA9 (*Similar to heme-binding protein*), A0A0V0G803 (*Putative selenoprotein - Fragment*), A0A0V0G301 (*Putative esterase and lipase*), e duas proteínas não caracterizadas identificadas como D1MWE5 e D1MWD9. Já as proteínas secretadas específicas da amostra de saliva de 10 dpa são: D1MX91 (*Similar to biogenic amine-binding protein*), três proteínas identificadas como putativamente secretadas (A0A0V0GFI2, A0A0V0G611, A0A0V0G452) e sete proteínas não caracterizadas identificadas como D1MWD8, D1MWE4, D1MWE2, D1MWB9, A0A0V0G2H3, D1MWD6 e D1MWB8.

Além disso, nas duas amostras foram identificadas proteínas comumente descritas na saliva de diferentes espécies de triatomíneos, como por exemplo, apirase (A0A0V0G2S8), lipocalinas (A0A0V0G2H8, A0A0V0G5Q2, A0A0V0G4M9, A0A0V0G2H6, A0A0V0G4L1, A0A0V0GAJ0), inibidores de proteases da família das serpinas (A0A0V0G2G2) ou do tipo Kazal (A0A0V0G4J9), proteína similar à tripsina (D1MXA8), além de uma proteína putativamente secretada (A0A0V0G2M6) e 19 proteínas não caracterizadas. A tabela 1 apresenta todas as proteínas salivares de *T. dimidiata* secretadas pela via clássica de acordo com o SignalP. Essas sequências foram novamente submetidas ao *Gene Ontology Consortium* e a Figura 14 apresenta as ontologias resultantes desta análise.

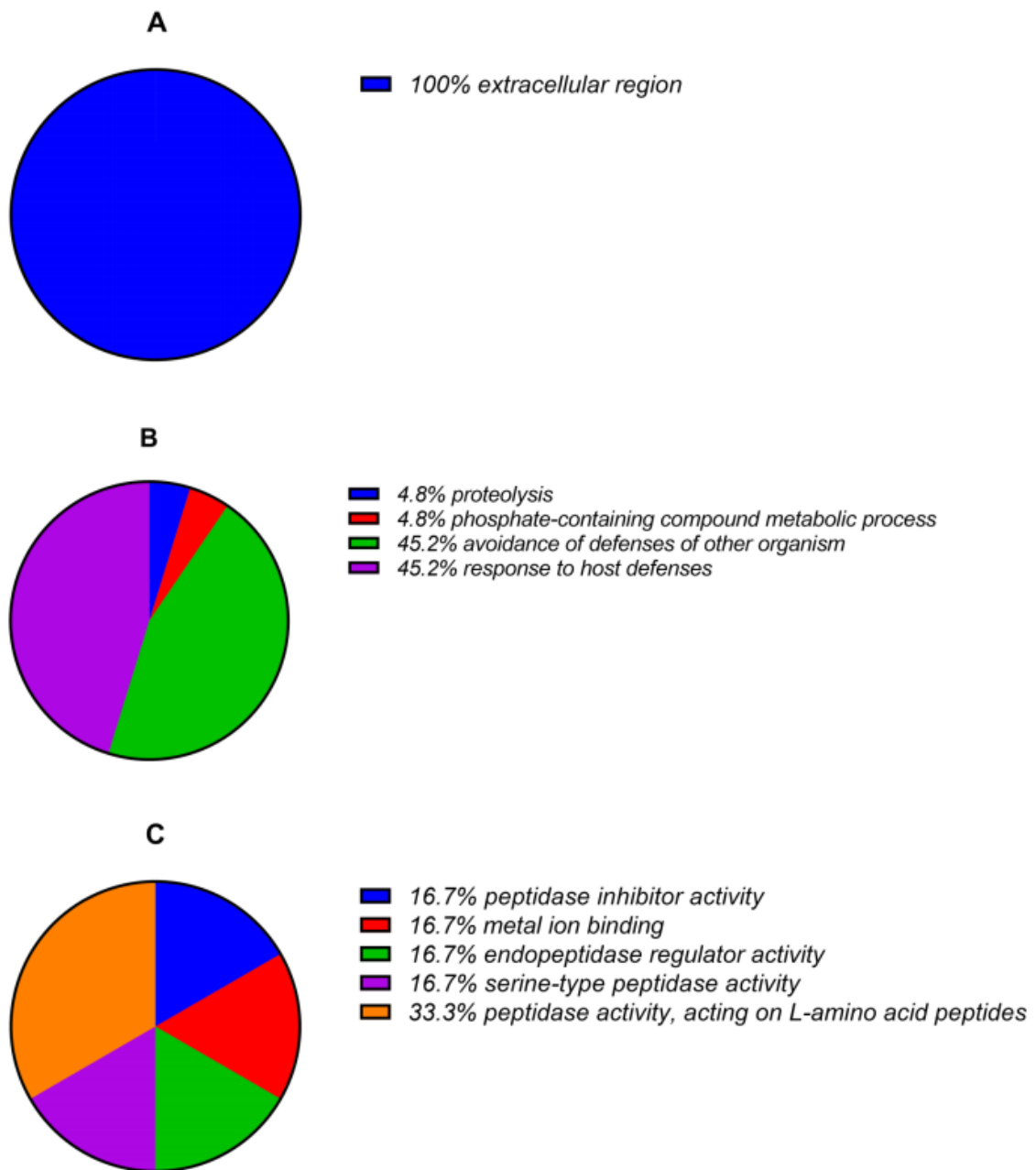
**Tabela 1.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* secretadas pela via clássica

Identificação*	Descrição	Cp (aa)**
<b>5 dpa</b>		
A0A0V0GCM8	<i>Putative kazal-type inhibitor (Fragment)</i>	179
D1MXA9	<i>Similar to heme-binding protein, clone: L2G6</i>	135
A0A0V0G803	<i>Putative selenoprotein (Fragment)</i>	160
A0A0V0G301	<i>Putative esterase and lipase (Fragment)</i>	543
D1MWE5	<i>Uncharacterized protein</i>	194
D1MWD9	<i>Uncharacterized protein</i>	202
<b>10 dpa</b>		
D1MX91	<i>Similar to biogenic amine-binding protein</i>	206
A0A0V0GF12	<i>Putative secreted protein</i>	144
A0A0V0G611	<i>Putative secreted protein (Fragment)</i>	136
A0A0V0G452	<i>Putative secreted protein (Fragment)</i>	175
D1MWD6	<i>Uncharacterized protein</i>	203
D1MWB9	<i>Uncharacterized protein</i>	167
D1MWE2	<i>Uncharacterized protein</i>	180
D1MWD8	<i>Uncharacterized protein</i>	203
D1MWE4	<i>Uncharacterized protein</i>	195
D1MWB8	<i>Uncharacterized protein</i>	178
A0A0V0G2H3	<i>Uncharacterized protein</i>	194
<b>5 / 10 dpa</b>		
A0A0V0G2S8	<i>Putative cd73 ecto-5'-nucleotidase (Fragment)</i>	425
A0A0V0G2H8	<i>Putative salivary lipocalin 4 (Fragment)</i>	165
A0A0V0G5Q2	<i>Putative salivary lipocalin (Fragment)</i>	192
A0A0V0G4M9	<i>Putative triabin</i>	148
A0A0V0G2H6	<i>Putative triabin-like lipocalin (Fragment)</i>	169
A0A0V0G4L1	<i>Putative triabin (Fragment)</i>	145
A0A0V0GAJ0	<i>Putative nitrophorin</i>	207
A0A0V0G2G2	<i>Putative serpin (Fragment)</i>	393
A0A0V0G4J9	<i>Putative salivary secreted kazal type proteinase inhibitor</i>	83
D1MXA8	<i>Similar to trypsin, clone: L2E3</i>	134
A0A0V0G2N7	<i>Putative angiotensin i-converting enzyme (Fragment)</i>	430
A0A0V0GDS7	<i>Putative hexamerin (Fragment)</i>	624
A0A0V0GD89	<i>Putative lysozyme (Fragment)</i>	122
A0A0V0G4R4	<i>Putative microtubule-associated protein futsch (Fragment)</i>	574
A0A0V0G3J5	<i>Putative inositol polyphosphate 5-phosphatase (Fragment)</i>	315
A0A0V0G6L7	<i>Putative palmitoyl protein thioesterase (Fragment)</i>	300
A0A0V0G5G2	<i>Putative glutaminyl cyclase</i>	342
A0A0V0G4P9	<i>Putative prosaposin (Fragment)</i>	817
A0A0V0G306	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8) (Fragm.)</i>	204

<b>Identificação*</b>	<b>Descrição</b>	<b>Cp (aa)**</b>
A0A0V0G2M6	<i>Putative salivary secreted protein (Fragment)</i>	169
D1MWC4	<i>Uncharacterized protein</i>	214
D1MWB4	<i>Uncharacterized protein</i>	177
D1MWC1	<i>Uncharacterized protein</i>	239
A0A0V0G2G8	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	190
D1MWC7	<i>Uncharacterized protein</i>	199
D1MWF2	<i>Uncharacterized protein</i>	181
D1MWC3	<i>Uncharacterized protein</i>	197
A0A0V0G1Z1	<i>Uncharacterized protein</i>	228
D1MWC6	<i>Uncharacterized protein</i>	196
A0A0V0G2V8	<i>Uncharacterized protein</i>	198
D1MWC5	<i>Uncharacterized protein</i>	221
A0A0V0G2E8	<i>Uncharacterized protein</i>	175
A0A0V0G3K6	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	198
A0A0V0G2K3	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	157
D1MWB2	<i>Uncharacterized protein</i>	177
D1MWB1	<i>Uncharacterized protein</i>	177
D1MWB7	<i>Uncharacterized protein</i>	197
D1MWB5	<i>Uncharacterized protein</i>	198
D1MWF1	<i>Uncharacterized protein</i>	177

\*Número identificador atribuído pelo banco UniProtKB

\*\*Comprimento (total de aminoácidos)



**Figura 14.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* secretadas pela via clássica, distribuídas segundo as categorias do *Gene Ontology*. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO.

As proteínas secretadas por vias não clássicas totalizaram 102 moléculas. Desse total, 12 proteínas (11,8%) são específicas da amostra de saliva de 5 dpa, 38 (37,3%) são específicas da amostra de saliva de 10 dpa e 52 (51%) são comuns das duas amostras. Os resultados revelaram que, deste total, seis proteínas não caracterizadas foram observadas, uma (A0A0V0G5F1) em 5 dpa, quatro (A0A0V0G5C8, A0A0V0G2P4, A0A0V0G2Y0, A0A0V0G5K2) em 10 dpa e apenas uma (A0A0V0G5L3) em ambos os períodos. As proteínas secretadas por vias não clássicas comuns nas amostras de 5 e 10 dpa que podem estar envolvidas no sucesso da hematofagia são: cinco lipocalinas (A0A0V0G1Y6, A0A0V0G2K7, A0A0V0G2N6, A0A0V0G2G7, A0A0V0G1Y5), um inibidor de serino protease da família da dipetalogastina (A0A0V0GC63), uma serino protease do tipo tripsina (A0A0V0G2A1). A tabela 2 apresenta todas as proteínas salivares de *T. dimidiata* secretadas por vias não clássicas de acordo com o programa SecretomeP. Essas sequências foram novamente submetidas ao *Gene Ontology Consortium* e a Figura 15 apresenta as ontologias resultantes desta análise.

**Tabela 2.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* secretadas por vias não clássicas

Identificação*	Descrição	Cp (aa)**
<b>5 dpa</b>		
A0A0V0G5F1	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	500
A0A0V0G2T0	<i>Putative electron transfer flavoprotein alpha subunit</i>	330
A0A0V0G3R0	<i>Putative phosphatidylethanolamine-binding protein</i>	177
A0A0V0G493	<i>Putative rab subfamily protein of small gtpase</i>	202
A0A0V0G8D7	<i>Adenylyl cyclase-associated protein (Fragment)</i>	490
A0A0V0G8W6	<i>Putative echinoderm microtubule-associated protein-like 1</i>	871
A0A0V0G3N8	<i>Putative cytoskeletal protein adducin (Fragment)</i>	359
A0A0V0G4B1	<i>Anion exchange protein (Fragment)</i>	1122
A0A0V0G4D7	<i>Putative programmed cell death protein</i>	843
A0A0V0G4U3	<i>Putative mitochondrial matrix protein p33</i>	290
A0A0V0G5K4	<i>Putative pyridoxamine 5'-phosphate oxidase (Fragment)</i>	188
A0A0V0GB59	<i>Putative f-actin capping protein beta subunit</i>	275
<b>10 dpa</b>		
A0A0V0G5C8	<i>Uncharacterized protein</i>	1710
A0A0V0G2P4	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	153
A0A0V0G2Y0	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	118
A0A0V0G5K2	<i>Uncharacterized protein</i>	238
A0A0V0GC21	<i>Putative tumor necrosis factor (Fragment)</i>	321
A0A0V0G7P2	<i>Putative carboxypeptidase inhibitor smci (Fragment)</i>	1219
A0A0V0G337	<i>Putative ubiquitin regulatory protein ubxd2</i>	545
A0A0V0G3F9	<i>Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2</i>	153
A0A0V0G3Y4	<i>Small ubiquitin-related modifier (SUMO)</i>	94
A0A0V0G440	<i>Putative hydroxyacylglutathione hydrolase mitochondrial</i>	296
A0A0V0G4R1	<i>Putative myosin regulatory light chain 2-like protein</i>	204

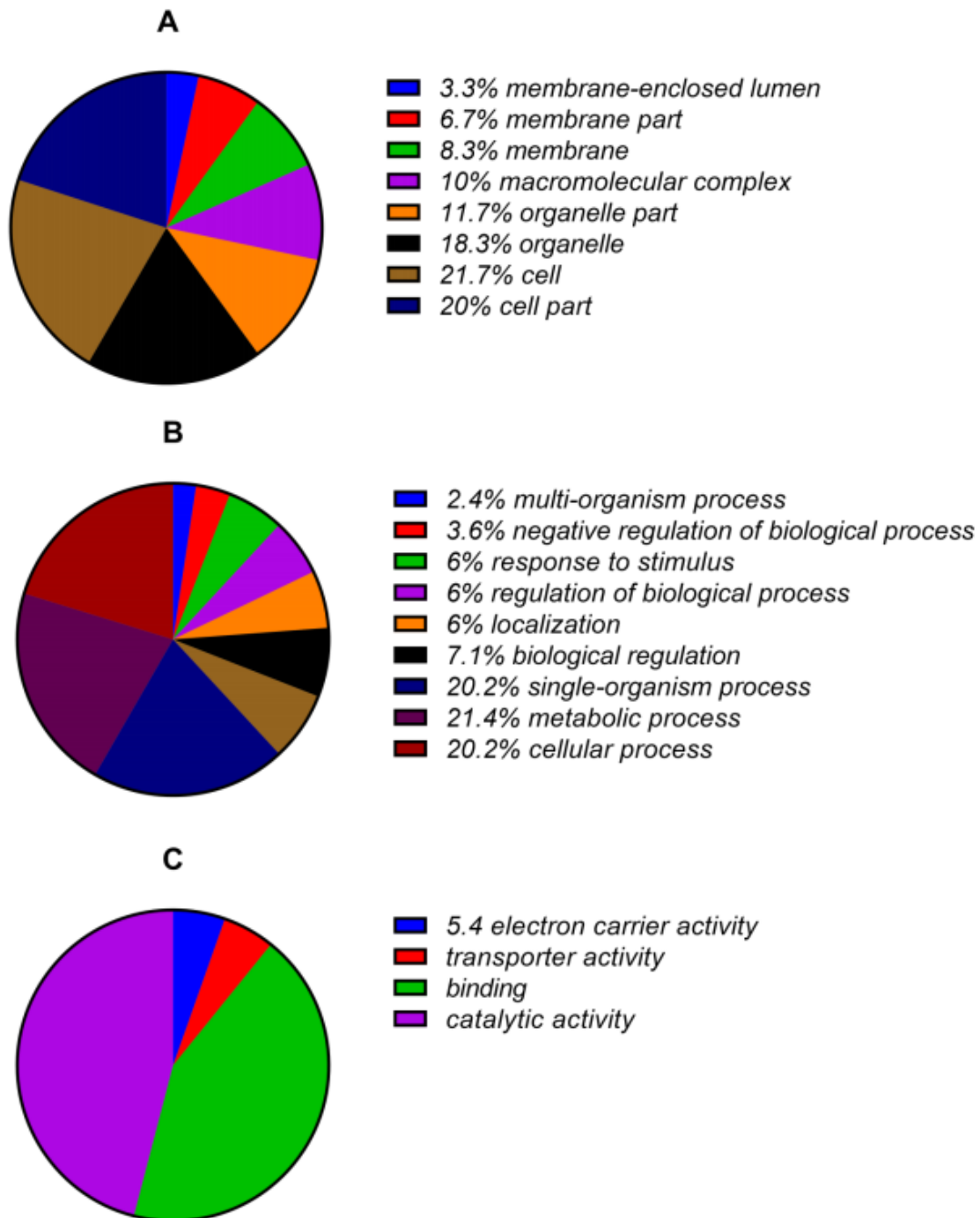
<b>Identificação*</b>	<b>Descrição</b>	<b>Cp (aa)**</b>
A0A0V0G4R6	<i>Putative vesicle coat complex copii subunit sec31 (Fragment)</i>	1027
A0A0V0G5E8	<i>Putative hsp90 co-chaperone p23</i>	174
A0A0V0G671	<i>Putative molecular co-chaperone sti1 (Fragment)</i>	542
A0A0V0G6J0	<i>Putative rab subfamily protein of small gtpase</i>	213
A0A0V0G9R6	<i>Putative adaptor protein enigma</i>	467
A0A0V0GAC3	<i>Putative failed axon connections fax protein/glutathione s-transferase-like protein</i>	377
A0A0V0GAF6	<i>Putative oxysterol-binding protein</i>	749
A0A0V0G383	<i>Putative death-associated protein 1 dap-1</i>	105
A0A0V0G3R2	<i>Putative acyl-coa binding protein</i>	89
A0A0V0G431	<i>Putative serine/threonine-protein kinase kinx</i>	406
A0A0V0G4E6	<i>Putative thioredoxin-like protein</i>	287
A0A0V0G4P2	<i>Putative nucleotide excision repair factor nef2 rad23 component</i>	334
A0A0V0G578	<i>Putative muscle lim protein mlp84b</i>	453
A0A0V0G5V0	<i>Putative inorganic pyrophosphatase/nucleosome remodeling factor subunit nurf38 (Fragment)</i>	288
A0A0V0G666	<i>Putative titin (Fragment)</i>	1430
A0A0V0G702	<i>Putative carbonic anhydrase</i>	271
A0A0V0G780	<i>Putative niemann-pick type c2 (Fragment)</i>	147
A0A0V0G808	<i>Putative parvulin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	124
A0A0V0G916	<i>Putative glycosyl transferase family 8 (Fragment)</i>	607
A0A0V0G3W5	<i>Putative k-similarity type rna binding protein (Fragment)</i>	537
A0A0V0G474	<i>Putative s10e ribosomal protein</i>	158
A0A0V0G5W9	<i>Citrate synthase</i>	470
A0A0V0G658	<i>Putative rho gdp-dissociation inhibitor</i>	207
A0A0V0G6L2	<i>Putative 26s proteasome regulatory complex subunit</i>	382
A0A0V0G766	<i>Putative casein kinase substrate phosphoprotein pp28</i>	184
A0A0V0GBH9	<i>Putative thioredoxin peroxidase 1 (Fragment)</i>	219
A0A0V0GD03	<i>Putative acyl-coa-binding protein 5</i>	87



<b>Identificação*</b>	<b>Descrição</b>	<b>Cp (aa)**</b>
<b>5 / 10 dpa</b>		
A0A0V0G5L3	<i>Uncharacterized protein</i>	208
A0A0V0G1Y6	<i>Putative triabin lipocalin (Fragment)</i>	155
A0A0V0G2K7	<i>Putative triabin lipocalin (Fragment)</i>	152
A0A0V0G2N6	<i>Putative triabin lipocalin (Fragment)</i>	164
A0A0V0G2G7	<i>Putative triabin lipocalin (Fragment)</i>	169
A0A0V0G1Y5	<i>Putative salivary lipocalin (Fragment)</i>	155
A0A0V0GC63	<i>Putative serine protease inhibitor dipetalogastin (Fragment)</i>	333
A0A0V0G2A1	<i>Putative trypsin-like protease (Fragment)</i>	277
A0A0V0G4P0	<i>Putative prolyl endopeptidase (Fragment)</i>	706
A0A0V0G6K0	<i>Putative transglutaminase/protease-like protein (Fragment)</i>	691
A0A0V0G8V3	<i>Putative lysophospholipase (Fragment)</i>	202
A0A0V0GBZ5	<i>Putative dipeptidase amino acid transport and metabolism (Fragment)</i>	386
A0A0V0G2Z6	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPlase) (EC 5.2.1.8) (Fragment)</i>	141
A0A0V0G5S8	<i>Putative farnesoic acid o-methyltransferase</i>	305
A0A0V0G954	<i>Putative formyltetrahydrofolate dehydrogenase (Fragment)</i>	494
A0A0V0G2N3	<i>Putative 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (Fragment)</i>	185
A0A0V0G3E5	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)</i>	333
A0A0V0G3N9	<i>Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)</i>	341
A0A0V0G3Z1	<i>Putative 3-oxoacyl coa thiolase</i>	411
A0A0V0G4C4	<i>Putative delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase mitochondrial</i>	569
A0A0V0G4K8	<i>Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)</i>	274
A0A0V0G4M0	<i>Putative carbonic anhydrase-like protein (Fragment)</i>	260
A0A0V0G4W2	<i>Putative elongation factor 1-gamma</i>	425
A0A0V0G4X4	<i>S-formylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.12)</i>	286
A0A0V0G525	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	109
A0A0V0G575	<i>Glutathione peroxidase (Fragment)</i>	168

<b>Identificação*</b>	<b>Descrição</b>	<b>Cp (aa)**</b>
A0A0V0G5X6	<i>Putative vacuolar protein (Fragment)</i>	296
A0A0V0G5Y3	<i>Putative dihydropteridine reductase dhpr/qdpr</i>	235
A0A0V0G6D0	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (eIF3i)</i>	324
A0A0V0G6V7	<i>Putative fumarylacetoacetase (Fragment)</i>	411
A0A0V0G6W9	<i>Putative wd40 repeat stress protein/actin</i>	602
A0A0V0G8A2	<i>Putative gdp dissociation inhibitor</i>	442
A0A0V0GCQ3	<i>Putative vacuolar h<sup>+</sup>-atpase v1 sector subunit c</i>	389
A0A0V0G2Q7	<i>Putative multifunctional chaperone 14-3-3 family</i>	247
A0A0V0G2R7	<i>Putative mucin-2 (Fragment)</i>	3651
A0A0V0G2X6	<i>Putative cytochrome c</i>	108
A0A0V0G3L4	<i>Putative basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (Fragment)</i>	2292
A0A0V0G481	<i>S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (EC 1.1.1.284) (Fragment)</i>	346
A0A0V0G4A8	<i>Putative actin-depolymerizing factor 1</i>	148
A0A0V0G4C2	<i>Putative peroxiredoxin posttranslational modification (Fragment)</i>	234
A0A0V0G4H2	<i>Putative prokaryotic long-chain fatty acid coa synthetase (Fragment)</i>	569
A0A0V0G4J2	<i>Putative f-actin capping protein alpha subunit</i>	287
A0A0V0G4T6	<i>Ubiquitin-fold modifier 1</i>	88
A0A0V0G4X9	<i>Putative aldo-keto reductase (Fragment)</i>	245
A0A0V0G500	<i>Putative rna polymerase ii transcriptional coactivator</i>	113
A0A0V0G532	<i>Putative leucine-rich acidic nuclear protein</i>	255
A0A0V0G2U3	<i>Putative peroxiredoxin posttranslational modification (Fragment)</i>	151
A0A0V0G2W3	<i>Catalase (EC 1.11.1.6)</i>	504
A0A0V0G2Y1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D (eIF3d) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7)</i>	543
A0A0V0G426	<i>Putative heat shock 70 kDa protein cognate 2</i>	628
A0A0V0G4Q6	<i>Putative puromycin-sensitive aminopeptidase (Fragment)</i>	880
A0A0V0G5V3	<i>Putative small heat shock protein hsp20 family</i>	191

\*Número identificador atribuído pelo banco UniProtKB. \*\*Comprimento (total de aminoácidos)



**Figura 15.** Proteínas salivares de *T. dimidiata* secretadas por vias não clássicas, distribuídas segundo as categorias do Gene Ontology. (A) Componente celular. (B) Processo biológico. (C) Função molecular, de acordo com o programa Blast2GO.

## Análise *in silico* do RNAV

A sequência nucleotídica RnSigm-SigP-2128 do transcrito do triatomíneo *R. neglectus* (Santiago *et al.*, 2016), que codifica para o antígeno 5 putativo de *R. neglectus* (RNAV) foi utilizada nesse estudo. Resumidamente: 1) realizou-se a análise *in silico* para verificar a possível localização celular, presença de peptídeo sinal, hélices transmembrânicas, sítios de glicosilação, fosforilação e de possíveis epítomos lineares para células B; e 2) adquiriu-se um vetor contendo a sequência clonada do RNAV da empresa Genecust (Luxemburgo) para a expressão do RNAV em sistema procaríoto de expressão.

A sequência nucleotídica do RNAV possui 665 pares de bases e a sequência aminoácídica possui 220 resíduos de aminoácidos (Figura 16). O peso molecular teórico do RNAV é 24.687,84 Da ([http://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool](http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool)).

### A

```
ATGCATCCCTTCATACAGATATTGCTAATCGCACTTGCAATTAAGTGGCTCTATCCTGTCAGGGCGGCCAAGTCATTAA
TCGAGAAGTTAGCCCTGAAGAGCAGCAACTAATTTTAGATGTGCACAACAGATATAGGCAAGCTATTGCGCTAGGAAAAA
TTCGAGGCCAGCCAACCGGTTTGAACATGATAGAAATGTCTTGGGATGACGAATTAGCGAACATGGCGCAGCAATGGGCC
GACAATTGTGTCTTTAAGCATGATACCAATATTAGGAGAACGTCAAGAAGATTTCCAGTTGGCCAAAATTTAGCTATATC
GTGGAGTTCACCCACTCCAATAAATATGGTGAGGCTGCAGAATGGGCTGCACAAATTCGAAATTTGGTTTAAATGAAGTTT
ACACAAGTGGCAATGACATTAAGAAATCAGGACATTATACGCAGGTGGTATGGGGAGATTCGTATCTGGTAGGTTGTGGT
TACACATACTACAAAGATCCAAGGAAGAATGGTTACGTTAAACTATATGTCTGCAATTATGGCCCTGCTGGGAACGTCAT
TGGTGAGCCACCATATATTGAAGGAACCTCTGGCTGTGATCGAAGTGATTTAAAACCTTCAAGCAGTTACTTAGGCCTTT
GTGACTTCGTTGACTATTGAGGATC
```

### B

```
1 MHPFIQILLI ALAIKCALSC QGGQVINREV SPEEQQLILD VHNRYRQAIA 50
51 LGKIRGQPTG SNMIEMSWDD ELANMAQQWA DNCVFKHDTN IRRTSRRFPV 100
101 GQNLAISSWSS PTPNKYGEAA EWAAQIRNWF NEVYTSGNDI KKS GHYTQVV 150
151 WGDSYLVGCG YTYKDPKRN GYVKLYVCNY GPAGNVIGEP PYIEGTPGCD 200
201 RSDLKPFSSSY LGLCDFVDY*
```

**Figura 16.** (A) Sequência nucleotídica do cDNA do antígeno 5 [RnSigm-SigP-2128-*peptidase inhibitor 16-like isoform X2 (venom allergen)*] de *R. neglectus*, contendo 665 pares de bases. (B) Sequência aminoácídica do produto do cDNA do antígeno 5 de *R. neglectus*, contendo 220 resíduos de aminoácidos.

O resultado da busca realizada no programa Blastp mostra que a RNAV tem relação de similaridade com a sequência de uma proteína secretada de *Ancylostoma* putativa de *Cimex lectularius* (XP\_014255242.1) e com as sequências de proteínas do tipo alérgeno 5 do veneno de formigas ou vespas, por exemplo *Camponotus floridanus* (XP\_011255025.1), *Wasmannia auropunctata* (XP\_011704086.1), *Dinoponera quadriceps* (XP\_014484388.1), *Harpegnathos saltator* (XP\_011148558.1), *Copidosoma floridanum* (XP\_014212871.1), *Linepithema humile* (XP\_012230072.1), *Polistes canadensis* (XP\_014601952.1), *Diachasma alloeum* (XP\_015126083.1) e *Polistes dominula* (XP\_015188005.1), entre outras. O alinhamento da sequência do RNAV com as dez sequências mencionadas foi realizado (Figura 17). A figura 18 mostra a árvore filogenética entre as mesmas sequências.

Essa busca direcionou, ainda, para o banco de dados de domínios conservados CDD (Anexo 1), que mostra a presença dos domínios SCP\_euk (cd05380), SCP (smart00198), CAP (pfam00188), que estão conservados na família das proteínas secretadas ricas em cisteína (*Cysteine-rich secretory protein family*), a qual inclui os antígenos 5.

```

Rodneg -----MHPFIQILLIAL-----AIKCALSCQGGQVINRE-VSPEEQ
Cimlec -----MVKQLVSYLIVFSLMG-----LSCACSGAKLLKSGGLSCEEK
Copflo MKLKGSACEQRKKESRKTRTPVIVLVAVVL--IAAMAPCCLACRGKMLMRTG-VSCQDR
Diaall -----MISIISKWIICLCLIG-----APLPISSSCAGKTVLRTGSLSCQDK
Polcan -----MPSISRKNLNQFILLGILVPVILSFNMVRANCTGKKMLRSGRISCEEK
Poldom -----MPSILRKNLNQFTRLLGILVPVILSFNMVRANCTGKKMLRSGRISCEEK
Camflo -----MMFTEKNVSLFLITAKCLL-----MIHCETSCVGSLLRSGGISCEEK
Camflo -----MMFTEKNVSLFLITAKCLL-----MIHCETSCVGSLLRSGGISCEEK
Linhum -----MVSTERNAGLLMVAACL-----VNHGEATCIGKTMRLRSGGISCEEK
Dinqua -----MMSVERDVSVLMAVAACL-----VEHCAPSCLGKSVLRSGGISCEEK
Harsal -----MLSVERNVGLILMAVTCLL-----TEHCAASCLGKTMRLRSGGISCEEK

```

```

* * :. :* :.

```

```

Rodneg QLILDVHNRYRQAIALGKIRGQPTGSNMIEMSWDDELANMAQQWADNCVFKHDTNIRRTS
Cimlec RLIVDAHNRRLRQVALGKVPQSPAENMLEMSWDEELARGAQKWADQCIFQHSQNDRRV
Copflo RTILDEHNRLRQLVALGQIRGQPSAKMMEMVWDELAARAQQWASICAEDHDS--RNV
Diaall QTILDEHNRLRQLVALGQIHGQPSAANMEMVWDELATMAQRWADSCAENHDAT--RNV
Polcan QIILDEHNRLRQLVALGQIHGQPGAANMEMLWDELAADVAQKWADSCAEVHDNY--RNV
Poldom QIILDEHNRLRQLVALGQIHGQPGAANMEMLWDELAADVAQKWADSCAEVHDNY--RNV
Camflo QIILDEHNRLRQLVALGQIRGQPGAANMEMIWDDELAIAQRWADRCAESHDSL--RNV
Camflo QIILDEHNRLRQLVALGQIRGQPGAANMEMIWDDELAIAQRWADRCAESHDSL--RNV
Linhum QIILDEHNRLRQLVALGQIHGQPSAANMEMIWDDELAIAQRWADRCAESHDSL--RNV
Dinqua QIILNEHNRLRQLVALGQIHGQPSAANMEMIWDDELAIAQRWADRCAESHDSL--RNV
Harsal QIILDEHNRLRQLVALGQIHGQPSAANMEMIWDDELAIAQRWADRCAEHDSL--RNV

```

```

. *: : ** * :*: : * . * :* * * * * * * * * * * * *

```

```

Rodneg RRFVGVQNLAISWSSPTP-NKYGEAAEWAQIRNWFNEV-YTSGNDIKKSGHYTQ----
Cimlec SRFLVGVQNLAMTWSSPH-NSLGDKPDFETQINNWFNEVRYRGGYSTQVGHYTQPNGLY
Copflo RRFVGVQNLARTWTTRTPANYDTEPEWRVKIQDFNEVQYYRAGFSPIAHTYTQ----
Diaall RRFVGVQNIARTWTTRPP-GPYDAEPNWRQISGFNEVQHYQTGYSRATGHYTQ----
Polcan RRFVGVQNIARTWTTRPP-GPYDSEPNWRQISGFNEVQHYHTGYSKTTGHYTQ----
Poldom RRFVGVQNIARTWTTRPP-GPYDSEPNWRQISGFNEVQHYHTGYSKTTGHYTQ----
Camflo RRFVGVQNIARSWTFRPP-GRYGDEPDWRQISGFNEVQFYHSGYSTTTGHYTQ----
Camflo RRFVGVQNIARSWTFRPP-GRYGDEPDWRQISGFNEVQFYHSGYSTTTGHYTQ----
Linhum RRFVGVQNMARSWTTRPP-GPYDSEPNWRQISGFNEVQYYHSGYSRTTGHYTQ----
Dinqua RRFVGVQNIARTWTTRPP-GLYDSEPNWRQISSWFNEVQYYHTGYSKATGHYTQ----
Harsal RRFVGVQNIARTWTTRPP-GPYDSEPNWRQISGFNEVQYYHTGYSKATGHYTQ----

```

```

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Rodneg -----VWGD SYLVGCGYTYKDPKNGYKLVYCNYPAGNVIGPEPPYIEGTPGC
Cimlec EGVVMKLEELIWDGTYLVGCGSYFYLKGNQ--YTKYVCNYPAGNVRGFPYKSGSPAC
Copflo -----VWGD TFLVGCYGYDPRN-GYTKNYVCNYPAGNVLGNPEYFSGWPEC
Diaall -----VWGD TFAVGCYGYFYDPAK-GYTKNYVCNYPAGNVLGYQPYQFGQPS
Polcan -----LVWSDSFLIGCGYSFYDPAK-GYTKNYVCNYPAGNVIIGYQPYQSGQPAC
Poldom -----LVWSDTFLIGCGYSFYDPAK-GYTKNYVCNYPAGNVIIGYQPYQSGQPAC
Camflo -----LVWSDTFLIGCGYSFYDPAK-GYTKNYVCNYPAGNVIIGYQPYQSGQPAC
Camflo -----LVWSDTFLIGCGYSFYDPAK-GYTKNYVCNYPAGNVIIGYQPYQSGQPAC
Linhum -----LVWSDTFLIGCGYSFYDPAK-GYTKNYVCNYPAGNVLGFQPYKSGQPAC
Dinqua -----LVWSDTFLIGCGYSFYDPAK-GYTKNYVCNYPAGNVLGFQPYKSGQPAC
Harsal -----LVWSDTFLIGCGYSFYDPAK-GYTKNYVCNYPAGNVLGFQPYKSGQPAC

```

```

: * : : : : * * * * * : : . . * * * * * * * * * * * * *

```

```

Rodneg DRSDLKPSSSYLGLC-----
Cimlec AQHGTTPSRTYPLCHALCNAQIGTKRFKHIPGKGNLTCTDKRKIVNVHNKLRKVAAGK
Copflo NQYGVSYSNKYSGLC-----ESRNS-----
Diaall NSYGMTYSNRYAGLC-----SRGG-----
Polcan NNYGMIYSNRYAGLC-----SRGN-----
Poldom SNYGMIYSNRYAGLC-----SRGN-----
Camflo DNYGMSYSNRYAGLC-----SRGS-----
Camflo DNYGMSYSNRYAGLC-----SRGS-----
Linhum GNYGMSYSNRYAGLC-----SRGS-----
Dinqua GSYGMSYSNRYAGLC-----SRGS-----
Harsal GSYGMSYSNRYAGLC-----SRGS-----

```

```

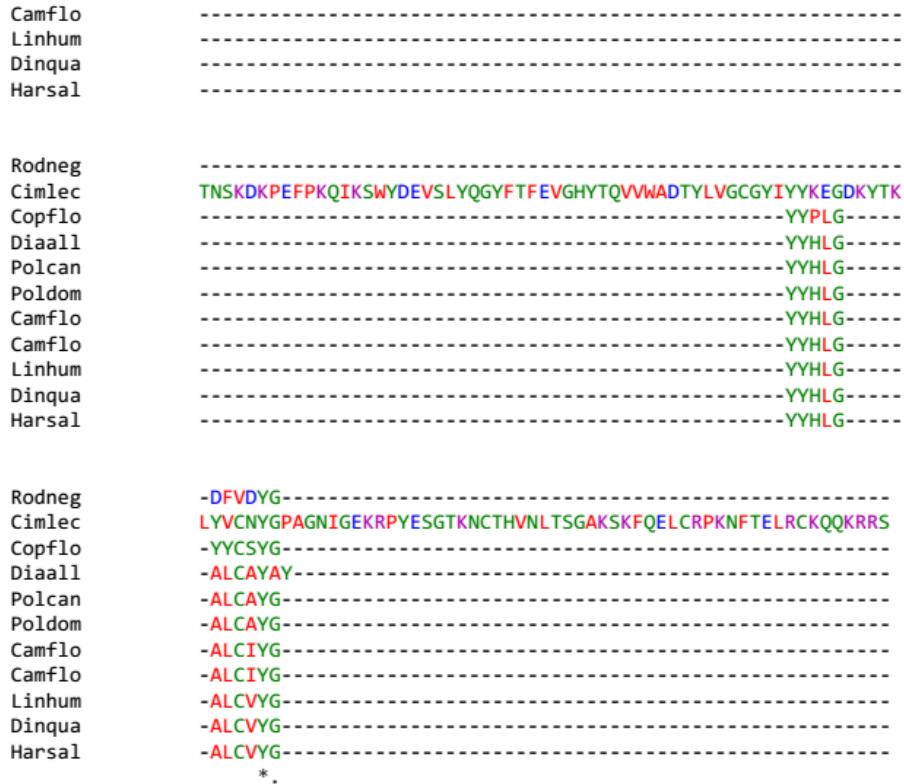
* * * * *

```

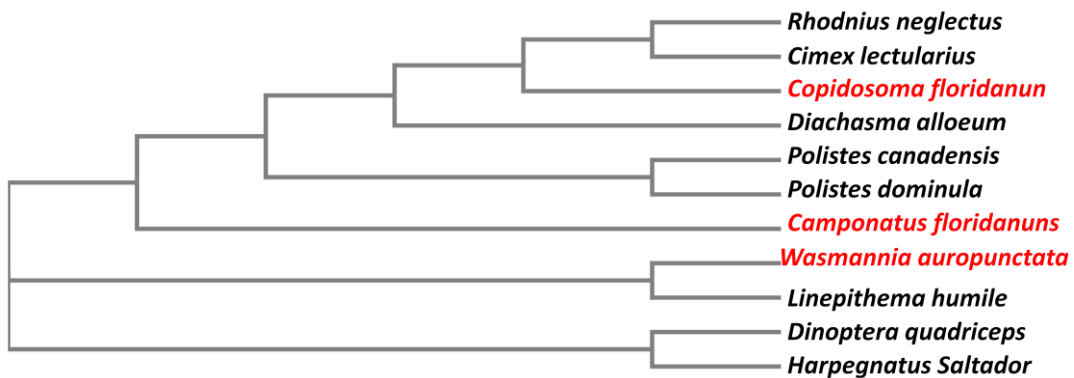
```

Rodneg -----
Cimlec QSGQPSAIYMLEMSWDEELENGAQKWAENCTFDHNTYEQRKVERFNVGQNMASWSSPNE
Copflo -----
Diaall -----
Polcan -----
Poldom -----
Camflo -----

```

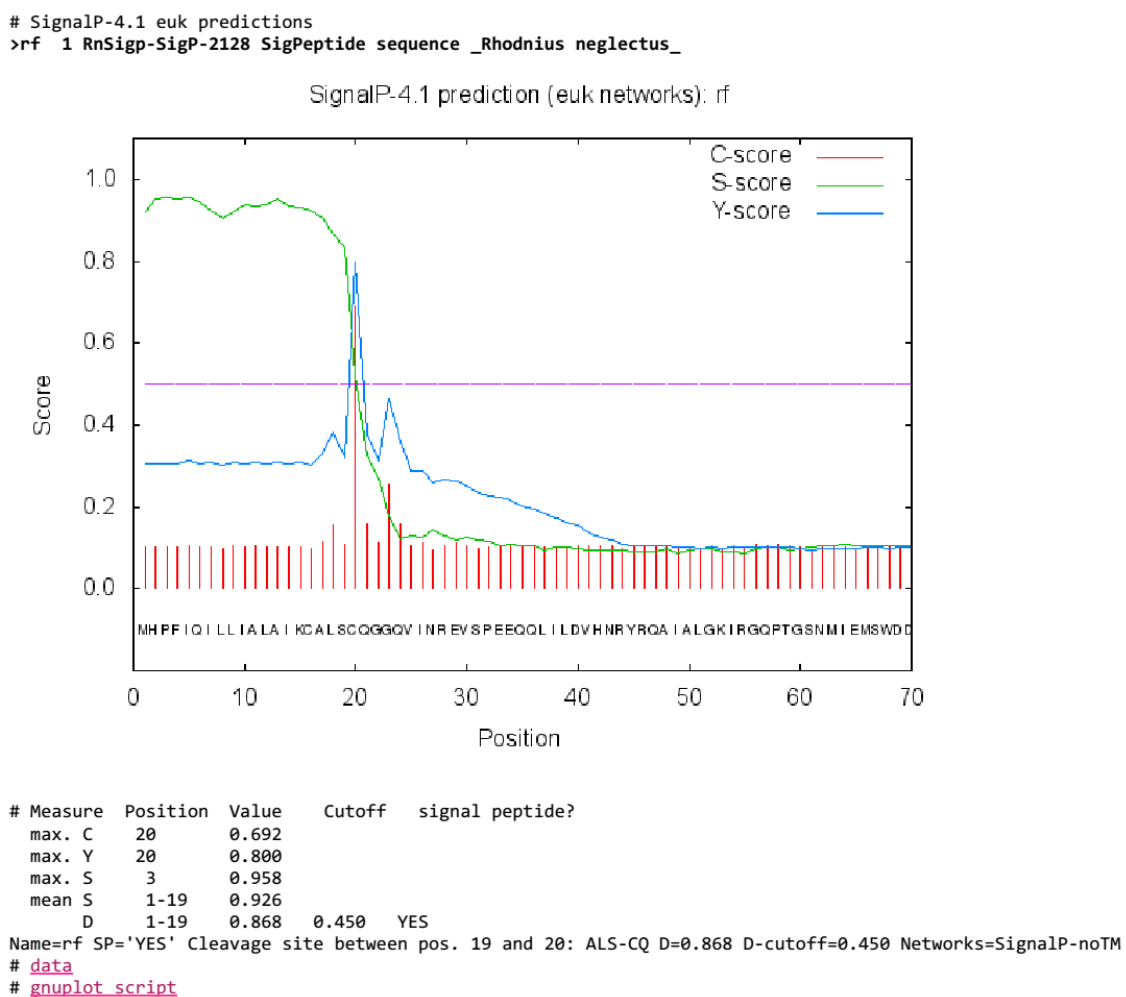


**Figura 17.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos do RNAV com a seqüência putativa de proteína secretada por *Ancylostoma* (de *C. lectularius*) e com nove seqüências putativas de alérgeno 5 do veneno de diferentes espécies de formigas e vespas. (\*) resíduos idênticos; (:) resíduos altamente conservados; (.) resíduos semiconservados; (-) marca *gap* na seqüência.



**Figura 18.** Árvore filogenética construída utilizando o programa MUSCLE versão 3.8.31 a partir da seqüência do RNAV e de uma seqüência putativa de proteína secretada por *Ancylostoma* (de *C. lectularius*) e de nove seqüências putativas de alérgeno 5 de veneno de formigas e vespas.

Utilizando-se o programa TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007), preditor de localização celular, observou-se que o RNAV é putativamente secretado (Anexo 2). A possível via de secreção utilizada pelo RNAV é a clássica, via dependente do retículo endoplasmático e/ou Golgi para secreção, já que a molécula possui peptídeo sinal, conforme observado na análise realizada com o programa SignalP (Emanuelsson *et al.*, 2007) e apresentada na Figura 19.



**Figura 19.** Predição de peptídeo sinal na sequência de RNAV utilizando o programa SignalP. *C-score (raw cleavage site score)*: elevado na posição imediatamente após o sítio de clivagem – o primeiro resíduo do RNAV maduro. *S-score (signal peptide score)*. *Y-score (combined cleavage site score)*: predição do sítio de clivagem, já que distingue entre picos *C-score* pela escolha daquele onde o *S-score* declina.

A sequência do RNAV não possui nenhuma hélice transmembrânica, segundo predição realizada pelo programa TMHMM. O resíduo de treonina na



posição 196 é um sítio potencial de glicosilação ligada ao oxigênio (O), conforme analisado utilizando-se o programa GlycoEP (Figura 20). Não foram preditos sítios potenciais de glicosilação ligados ao nitrogênio (N), nem C-glicosilações.

```
>RnSigp Length = 220
```

**Potential O-Linked Glycosylated Sites:**

MHPFIQILLIALAIKCALSCQGGQVINREVSPEEQQLILDVHNRYRQAIALGKIRGQPIGSNMIEMSWDELANMAQQWADNCVFKHDINIRRISRRFPV  
 GQNLAISWSSPI PNKYGEAAEWAAQIRNWFNEVYISGNDIKKSGHYIQVVWGDSYLVGCGYIYKDPKNGYVKLYVCNYGPAGNVIGEPPYIEGIPGC  
 DRSDLKPSSSYLGCLDFVDYG

---

Position	Residue	Score	Prediction
19	<u>S</u>	-0.42345411	Non-glycosylated
31	<u>S</u>	-0.54888102	Non-glycosylated
59	<u>I</u>	-0.13414441	Non-glycosylated
61	<u>S</u>	-0.39931998	Non-glycosylated
67	<u>S</u>	-0.45894218	Non-glycosylated
89	<u>I</u>	-0.063221502	Non-glycosylated
94	<u>I</u>	-0.1055797	Non-glycosylated
95	<u>S</u>	-0.32843672	Non-glycosylated
107	<u>S</u>	-0.13558709	Non-glycosylated
109	<u>S</u>	-0.030940418	Non-glycosylated
110	<u>S</u>	-0.001097065	Non-glycosylated
112	<u>I</u>	-0.036652816	Non-glycosylated
135	<u>I</u>	-0.14995788	Non-glycosylated
136	<u>S</u>	-0.37694094	Non-glycosylated
143	<u>S</u>	-0.03782812	Non-glycosylated
147	<u>I</u>	-0.32780748	Non-glycosylated
154	<u>S</u>	-0.2965361	Non-glycosylated
162	<u>I</u>	-0.1202564	Non-glycosylated
196	<u>I</u>	<b>0.023848141</b>	<b>Potential Glycosylated</b>
202	<u>S</u>	-0.22836254	Non-glycosylated

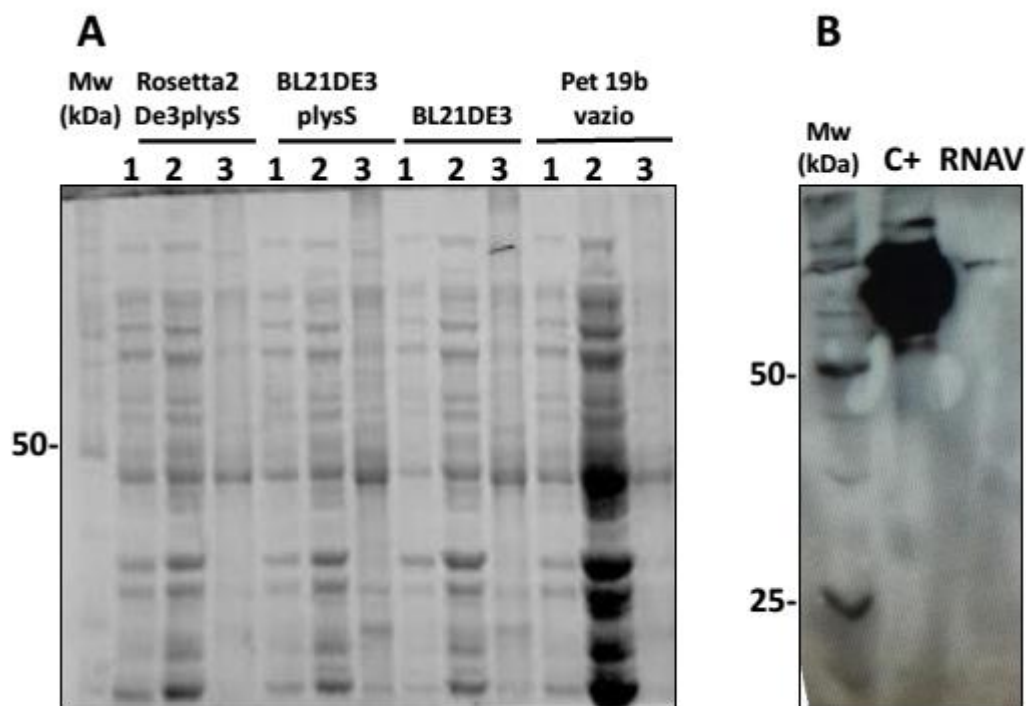
**Figura 20.** Predição de sítios de O-glicosilações na sequência de RNAV utilizando o programa GlycoEP. Em vermelho, resíduos de serina e treonina.

Para prever a presença de epítomos lineares para células B, utilizou-se o programa Bepipred 1.0 (Larsen *et al.*, 2006) 25 resíduos de aminoácidos na sequência do RNAV podem fazer parte de possíveis epítomos lineares para as células B (Anexo 3).

A análise de potenciais sítios de fosforilação pelo programa NetPhos 2.0 resultou na predição de 17 sítios de fosforilação: em sete resíduos de serina, dois resíduos de treonina e oito resíduos de tirosina da sequência do RNAV (Anexo 4).

### **Expressão do RNAV recombinante**

Abaixo é apresentado apenas um dos ensaios para a expressão do RNAV recombinante, induzida pela adição de 0,4 mM de IPTG aos clones de bactérias transformadas com o plasmídeo pET15b\_RNAV conforme descrito na metodologia. Neste ensaio, a indução foi realizada por 6 h a temperatura ambiente. Os perfis proteicos apresentados pelos clones das diferentes linhagens de *E. coli* testadas são semelhantes ao apresentado nos três últimos poços do gel, que contêm as amostras dos clones transformados com o plasmídeo pET19b que não continha a sequência do RNAV. Essa observação sugere que não houve expressão diferenciada de proteínas entre as bactérias transformadas com o vetor que continha a sequência do RNAV e o vetor vazio. Não há sinal de expressão do RNAV recombinante nem na fração solúvel, nem na fração insolúvel dos clones avaliados, assim como no *western blot* realizado com a fração solúvel do clone de Rosetta2(DE3)pLysS, utilizando anticorpo anti-cauda de histidina. O peso molecular esperado para a banda do RNAV era em torno de 25 kDa. Nenhuma banda de proteína se sobressaiu nessa faixa do gel de poliacrilamida em nenhum dos ensaios realizados.



**Figura 21.** Perfil de expressão dos clones de diferentes linhagens de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET15b\_RNAV ou com o pET19b vazio como controle. (A) SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie. 1 – lisado bacteriano anterior à indução da expressão com IPTG 0,4 mM; 2 - fração solúvel do lisado bacteriano; 3 - fração insolúvel do lisado bacteriano. (B) *Western blot*. C+ - controle positivo para o anticorpo anti-cauda de histidina (oligopeptidase B de *T. cruzi*). RNAV - fração solúvel de um clone de Rosetta2(DE3)pLysS transformada com o plasmídeo pET15b\_RNAV. Mw – marcadores de peso molecular. Esperava-se visualizar a banda do RNAV na altura de 25 kDa.

## DISCUSSÃO

### Proteoma da saliva de *T. dimidiata*

Os triatomíneos hematófagos desenvolveram estratégias ao longo de sua evolução para garantir a sua alimentação sanguínea. Eles utilizam a saliva, que é composta por moléculas que contrapõem o sistema hemostático/imune do hospedeiro e favorecem a transmissão de patógenos (Otalora-Luna et al, 2015). Por esse motivo, esse fluido tem sido objeto de estudos realizados com diferentes espécies de artrópodes hematófagos vetores de doenças.

A análise proteômica da saliva de *T. dimidiata* coletada 5 dpa e 10 dpa realizada nesse trabalho levou à identificação de 362 proteínas. Não foi possível realizar a análise bioinformática da saliva coletada 20 dpa, pois os espectros das três replicatas técnicas dessa amostra biológica estavam corrompidos. O conjunto de proteínas identificado foi representado por proteínas salivares putativamente secretadas e proteínas constitutivas das glândulas salivares, que possivelmente foram liberadas no momento da perfuração das glândulas para liberação da saliva. Independente da liberação de moléculas intracelulares decorrentes dos danos causados às glândulas salivares, algumas proteínas constitutivas presentes na saliva podem realizar funções importantes para a hematofagia e para a transmissão de patógenos para o hospedeiro vertebrado. Um exemplo é a proteína peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase - A0A0V0G306) identificada entre as proteínas secretadas pela via clássica de ambas as amostras de 5 dpa e 10 dpa. Essa proteína ajuda no enovelamento de proteínas e, em vertebrados é ubíqua e abundante no citosol, liberada no espaço extracelular durante respostas inflamatórias, capaz de induzir a quimiotaxia de monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células T para a periferia (Xu *et al.*, 1992; Yurchenko *et al.*, 2002). No caso dos triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*, a liberação dessa molécula juntamente com a saliva poderia recrutar células hospedeiras para infecção pelo protozoário, e seria um elo importante na interação vetor-patógeno-hospedeiro. Essa proteína é um exemplo de molécula que não foi observada no proteoma realizado por Santiago (2016).

Dentre as proteínas de maior relevância para a hematofagia já descritas, algumas foram encontradas apenas na amostra coletada 5 dpa, apenas na amostra coletada 10 dpa e a maioria era comum às duas amostras. Assim como no proteoma da saliva de *T. dimidiata* realizado por Santiago (2016), foram identificados membros das famílias das lipocalinas, triabina, apirase, antígeno 5, proteínas de ligação a aminas, proteína sensível de odor, proteases do tipo tripsina e inibidores de proteases do tipo serpina. Santiago identificou ainda as lipocalinas triatina e palidipina, a proteína formadora de poros trialisina e uma hemolisina, que foram identificadas nas amostras estudadas nesta análise proteômica como não caracterizadas com os seguintes códigos de identificação D1MWC6 (triatina), A0A0V0G1Z1 (palidipina), A0A0V0G3R1 e A0A0V0G2Y3 (trialisinas), e D1MWC5 (hemolisina).

No entanto, esta análise foi mais abrangente, pois permitiu a identificação de proteínas putativamente secretadas pela via clássica que não foram identificadas no proteoma realizado por Santiago (2016), entre elas o inibidor de protease do tipo kazal, nitroforina, lisozima, proteína de ligação ao heme, selenoproteína, proteína da família das esterases / lipases, enzima conversora de angiotensina, inositol polifosfato 5-fosfatase, hexamerina, prosaposina, palmitoil tioesterase, glutaminil ciclase, proteína futsch associada ao microtúbulo, peptidil-prolil cis-trans isomerase (já discutida acima), entre outras identificadas como não caracterizadas, mas que também podem estar envolvidas diretamente no processo de hematofagia, como já mencionado. Na próxima seção serão discutidas algumas das proteínas identificadas mais comumente relacionadas com a hematofagia.

## **Lipocalinas**

As lipocalinas são proteínas altamente expressas na saliva de artrópodes hematófagos, e os dados apresentados corroboram essa informação, já que boa parte das proteínas encontradas pertence a essa família. Elas já foram descritas nas seguintes espécies de *Triatoma*: *T. pallidipennis* (Fuentes-Prior *et al.*, 1997) *T. infestans* (Charneau *et al.*, 2007;

Assumpção et al., 2008), *T. rubida* (Ribeiro et al., 2012), *T. matogrossensis* (Assumpção et al., 2012), e em *D. maxima* (Assumpção et al., 2011) e *P. megistus* (Ribeiro et al., 2015), ambas pertencentes à mesma tribo do *Triatoma*. Foram descritas também em espécies do gênero *Rhodnius* (Champagne et al., 1995; Montfort et al., 2000; Ribeiro et al., 2004; Andersen, Gudderra, Francischetti e Ribeiro, 2005; Costa et al., 2011; Santiago et al., 2016).

As proteínas dessa família são caracterizadas por possuírem uma estrutura tridimensional bem conservada, com oito cadeias  $\beta$ -antiparalelas, formando uma cavidade hidrofóbica de interação com os ligantes (Hernández-Vargas et al., 2016). Os *loops* que conectam as folhas- $\beta$  são flexíveis, sendo responsáveis por garantirem a interação com ligantes com diferentes características químicas e/ou conformacionais, sem alterar o dobramento da proteína. Entretanto, apesar da estrutura bem conservada, as sequências polipeptídicas podem variar bastante (Flower, 1996; Andersen, Gudderra, Francischetti e Ribeiro, 2005).

Um exemplo de lipocalina são as nitroforinas. Essas proteínas têm sido descritas principalmente na saliva das espécies de *Rhodnius*. Membros dessa família sequestram a histamina liberada pelos mastócitos e estão envolvidas na modulação da resposta inflamatória e imune do hospedeiro (Zhang et al., 1998; Weichsel et al., 2000; Moreira et al., 2003; Ribeiro et al., 2004). Podem agir também como vasodilatadoras, pois têm a capacidade de estocar e liberar óxido nítrico (Walker, 2005), inibir a coagulação sanguínea, agindo diretamente no FX, impedindo sua conversão em FXa (Montfort et al., 2000). Recentemente, Buarque e colaboradores mostraram que uma proteína semelhante à nitroforina é super-regulada no intestino de *T. infestans* infectados pelo *T. cruzi* (Buarque et al., 2013). Uma nitroforina putativa também foi identificada (A0A0V0GAJ0) nesse estudo, tanto 5 dpa quanto 10 dpa.

Outros exemplos de lipocalinas que atuam na hematofagia são a RPAI (*Rhodnius prolixus* aggregation inhibitor – 1) e a ABP (*Amino binding protein*). A primeira inibe a agregação plaquetária por meio de doses baixas de ADP (Francischetti et al., 2002), enquanto a segunda se liga a aminas

biogênicas como a norepinefrina e a serotonina, portanto pode atuar como vasodilatador ou anti-agregador plaquetário (Xu et al., 2013). As aminas biogênicas são liberadas por plaquetas e mastócitos durante a resposta inflamatória (Xanthos *et al.*, 2008). Nesse estudo a proteína identificada como D1MX91 é uma *biogenic amine-binding protein*, encontrada especificamente na amostra de saliva de 10 dpa predita como secretada pela via clássica. Elas são liberadas rapidamente no sangue para contrapor também as respostas inflamatórias, garantindo a alimentação ininterrupta. Calvo e colaboradores reportaram que essas moléculas também estão presentes na saliva de mosquitos para retardar a resposta imune do hospedeiro (Calvo *et al.*, 2009).

As triabinas agem como inibidores de trombina. Entre outras funções, a trombina converte o fibrinogênio em fibrina, estimulando a agregação plaquetária, conforme já demonstrado para *T. pallidipennis* (Noeske-Jungblut *et al.*, 1994; Hernández-Vargas *et al.*, 2016). Embora classificadas inicialmente como membros da família das lipocalinas, agora pertencem à superfamília das calicinas, uma família fortemente relacionada às lipocalinas (Flower *et al.*, 2000; Hernández-Vargas *et al.*, 2016)

Os dados obtidos neste estudo estão de acordo com os dados da literatura que mostram que as lipocalinas são proteínas expressas na saliva dos triatomíneos hematófagos durante o repasto, pois desempenham papéis importantes para o sucesso desse processo.

## **Apirases**

As apirases são difosfohidrolases capazes de inibir a agregação plaquetária por meio da hidrólise da ligação fosfato no ATP e ADP, liberando Pi (Francischetti *et al.*, 2010). Essas enzimas têm sido descritas em triatomíneos (Faudry, Lozzi, *et al.*, 2004; Faudry, Rocha, *et al.*, 2004; Faudry *et al.*, 2006; Charneau *et al.*, 2007; Assumpcao *et al.*, 2011), mosquitos, por exemplo, em *Aedes aegypti* (Champagne, 2005), flebotomíneos, e carrapatos (Ribeiro *et al.*, 1984; Ribeiro, 1995; Ribeiro e Francischetti, 2003a; Champagne, 2005). Essas proteínas podem ser classificadas em três famílias: 5'-nucleotidases, família

CD39 e família Cimex. Um membro da família 5'-nucleotidase foi identificado (A0A0V0G2S8 - *cd73 ecto-5'-nucleotidase*) entre as proteínas secretadas pela via clássica comum aos 5 dpa e 10 dpa. A principal característica dessa família é a dependência de íons cálcio e ou magnésio. A família Cimex foi identificada em *C. lectularius* e tem como principal característica ser dependente exclusivamente de cálcio (Francischetti, 2011). E por último, a família CD39 foi descrita na pulga *Xenopsylla cheopis* (Andersen, Gudderra, Francischetti e Ribeiro, 2005). Novamente, a presença das apirases nas duas amostras de saliva de *T. dimidiata* e em outros animais hematófagos, demonstra a importância dessas moléculas e sugere uma evolução convergente entre os animais que possuem esse hábito alimentar.

A análise do perfil eletroforético em gel 2-DE revelou spots entre 68 kDa e 97 kDa que podem corresponder aos spots das apirases salivares encontrados no gel 2-DE de *T. infestans* (Charneau et al., 2007). Assim como para esta espécie, estes spots concentrados na região alcalina do gel formaram uma linha horizontal. Para confirmar se os spots correspondem às apirases, a excisão das bandas do gel para identificação por LC-MS/MS e a realização de *western blot* utilizando os anticorpos anti-apirases de *T. infestans* poderão ser realizados. A saliva do *T. infestans* parece diferir da saliva de outras espécies de insetos e carrapatos em relação à abundância e diversidade de apirases.

### **Inibidores de serino proteases**

As serino proteases estão envolvidas em muitos processos fisiológicos importantes. Em mamíferos, atuam na cascata da coagulação sanguínea. Em artrópodes hematófagos, uma das estratégias para garantir a aquisição do sangue é a presença de inibidores naturais de serino proteases, que nesse contexto, atuam inibindo a trombina ou o fator de coagulação Xa, garantindo assim a fluidez do sangue e o sucesso de sua alimentação. Esses inibidores estão presentes em quase todos os organismos vivos (Agarwala et al., 1996; Simonet et al., 2003). Além disso, em artrópodes, também estão envolvidos no



processo de metamorfose, na coagulação da hemolinfa e na cascata da pro-fenoloxidase, que resulta em um dos principais mecanismos de defesa dos artrópodes, a melanização de patógenos (Jiang e Kanost, 2000; Simonet *et al.*, 2002).

Uma serpina putativa (A0A0V0G2G2) foi encontrada em ambos os períodos após a alimentação. Essa proteína é membro da família de inibidores naturais de serino proteases, e possui entre 45 e 50 kDa. Sua principal característica é a presença de seis resíduos de cisteína, que são espaçados por três pontes dissulfeto. O sítio ativo se encontra exposto na superfície da molécula.

Outro inibidor identificado nesse estudo, 5 dpa e 10 dpa, foi o inibidor de serino protease do tipo Kazal. Membros dessa família apresentam estrutura primária conservada e conformação com uma  $\alpha$ -hélice central e três folhas  $\beta$ -antiparalelas. Cada domínio possui entre 50-60 aminoácidos com seis cisteínas conservadas e presença de três pontes dissulfeto. A especificidade do inibidor do tipo Kazal depende do resíduo P1 no sítio ativo da protease (Zheng *et al.*, 2007). Inibidores com resíduos de Arg ou Lys que entrarão em contato com o resíduo de aminoácido da posição P1 tendem a inibir a tripsina (Zheng *et al.*, 2007). Em *D. maxima* (Mende *et al.*, 1999) e *R. prolixus* (Friedrich *et al.*, 1993), o inibidor kazal é responsável pela inibição da trombina.

### **Superfamília hemocianina - Hexamerina**

A superfamília hemocianina inclui cinco classes de proteínas que possuem estrutura similar e relação evolutiva. As classes são: hemocianinas (Hc), fenoloxidasas (OP), pseudo-hemocianina / criptocianinas (Phc/Cc), hexamerinas (Hx) e receptores de hexamerinas (Hxr) (Burmester *et al.*, 1997). Em artrópodes, parece ter havido uma evolução de forma independente dos membros dessa família, sendo foco de muitos estudos de filogenia (Burmester e Hankeln, 2007).

A hexamerina está presente em alguns moluscos e artrópodes. Em insetos com desenvolvimento hemimetábolo, como o caso dos triatomíneos,

mas também holometábols, pode estar associada à metamorfose (Zouh, 2007,(Cristino *et al.*, 2010). Essas proteínas têm entre 75 e 90 kDa e desempenham um papel importante como proteínas de armazenamento, fornecendo aminoácidos para a metamorfose dos insetos (Cristino *et al.*, 2010). Elas estão envolvidas no processo de transporte de hormônio esteróide (Enderle et al, 1983). Portanto sua função está relacionada à estocagem de nutrientes e à sinalização nutricional (Burmester e Scheller,1999).

Cristino forneceu evidências de que as hexamerinas estão envolvidas na produção dos ovos da vespa *Nasonia vitripennis* (Cristino *et al.*, 2010). A maioria dos estudos sobre hexamerina foi realizada em Diptera e Lepidoptera (Cristino *et al.*, 2010) Até o momento, o papel das hexamerinas não está bem elucidado em triatomíneos. Um membro dessa família (A0A0V0GDS7) foi identificado na saliva do *T. dimidiata*, sendo comum nas duas amostras. Para o melhor entendimento da ação das hexamerinas no contexto da saliva do *T. dimidiata* são necessários novos estudos.

### **Lisozima**

As lisozimas são proteínas que atuam na imunidade de diferentes organismos, plantas e animais, com função antibacteriana (Hultmark, 1996). Elas são divididas em três grupos: tipo C, tipo G e tipo I. As de inseto são do tipo C. Elas hidrolisam a ligação glicosídica  $\beta$ -(1,4) da camada de peptidoglicano, causando a ruptura da célula (Russel and Dunn, 1991; Danfre et al, 1994). Além desse efeito direto na parede das bactérias gram positivas, as lisozimas contribuem para a degradação das células bacterianas (Boman *et al*, 1991). Portanto, estão envolvidas tanto na imunidade, como no processo de digestão das bactérias ingeridas durante a alimentação (Moreira-Ferro *et al.*, 1998).

Essa função já foi descrita em *Musca domestica*, *Anastrepha fraterculus* e *Drosophila melanogaster* (Lemos e Terra, 1991; Regel et al, 1998). Em diferentes gêneros de mosquito, a lisozima parece atuar na atividade imune durante a alimentação, sendo expressa nas glândulas salivares de ambos os

sexos (Rossignol e Luerdes, 1986; Pimentel e Rossignol, 1990; Moreira-Ferro *et al.*, 1999).

Em triatomíneos, as lisozimas já foram descritas na hemolinfa associada também à imunidade (Azambuja e Garcia, 1987; Hultmark, 1996). Entretanto, a função digestiva dessas enzimas foi sugerida em *R. prolixus* pela primeira vez em 1984 (Ribeiro e Pereira, 1984). Em *T. infestans* e *T. brasiliensis* os genes que codificam para essa molécula já foram identificados e seus produtos se concentram no estômago e intestino (Araújo *et al.*, 2006; Ursic-Bedoya *et al.*, 2008). Sua atividade proteolítica acontece em meio ácido (Cançado *et al.*, 2007).

Neste trabalho, uma lisozima (A0A0V0GD89) foi identificada entre as proteínas secretadas pela via clássica nas amostras de 5 dpa e 10 dpa, sugerindo que elas talvez desempenhem função de defesa logo no início da alimentação como ocorre em mosquitos, se estendendo ao processo de defesa e digestão no estômago e intestino.

## **Selenoproteína**

Selenoproteína é uma família de proteínas amplamente diversa, que possui como característica a presença de resíduos de selenocisteína (Sec) no lugar de cisteína. Essa alteração pode resultar, por exemplo, em maior atividade enzimática, uma vantagem competitiva para os organismos que o utilizam. Em seu trabalho, Chapple e Guidó (2009) demonstraram que alguns insetos estão perdendo a capacidade de sintetizar essa molécula, que se acreditava ser essencial para essa classe (Chapple e Guigó, 2009).

As selenoproteínas são bem conservadas na saliva de artrópodes hematófagos e contrapõem o stress oxidativo presente durante a alimentação sanguínea, por exemplo, agindo na transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas em carrapatos (Francischetti *et al.*, 2009). Uma selenoproteína (A0A0V0G803) foi identificada especificamente na amostra de 5 dpa.

## **Proteína de ligação ao heme**

Transcritos para a proteína de ligação ao heme foram identificados na hemolinfa e nos oócitos de *R. prolixus* (Paiva-Silva *et al.*, 2002), nas glândulas salivares de *T. brasiliensis* (Santos *et al.*, 2007) e de *T. dimidiata* (Kato *et al.*, 2010). Entretanto, seu papel na saliva de animais que se alimentam de sangue ainda não foi elucidado. Santos e colaboradores sugeriram uma atuação na percepção gustativa, pois essas proteínas possuem domínios conservados de ligação à feromônios e a odor, como descrito para *D. melanogaster* (Galindo e Smith, 2001).

Nesse estudo, uma metaloproteína de ligação ao heme (D1MXA9) foi identificada especificamente na amostra de 5 dpa, validando o encontro dos transcritos para essa proteína na análise transcritômica realizada por Kato e colaboradores (Kato *et al.*, 2010) e por Santiago (2016). Essa proteína pode ter surgido como uma estratégia para a detoxificação do heme, que livre é tóxico para as células do inseto, pois pode causar peroxidação lipídica e lise celular. Entretanto, o seu papel, continua apenas como especulação.

## **Esterase e lipase**

As esterases e lipases são enzimas multifuncionais com ampla especificidade para substratos e sítios de ligação. Em alguns artópodes, como o *R. prolixus*, atuam na digestão de triacilgliceróis liberando ácido graxos livres e glicerol (Grillo *et al.*, 2007). Em *Bombix mori*, uma lipase foi purificada e mostrou atividade antiviral (Ponnuvel *et al.*, 2003). Uma função importante descrita em insetos é a indução de resistência à inseticidas, pois são capazes de hidrolisar ligações éster presentes na maioria dos inseticidas (Montella, 2012). Uma esterase e lipase putativa (A0A0V0G301) foi identificada especificamente na amostra de 5 dpa, que poderia atuar em mecanismos de defesa do triatomíneo e/ou conferir resistência a inseticidas.

## **Enzima conversora de angiotensina (ECA)**

A enzima conversora de angiotensina é uma peptidil-dipeptidase A que converte a angiotensina I em angiotensina II, peptídeo que atua no controle da pressão arterial (Studdy *et al.*, 1983). Sua função ainda não está bem esclarecida. Foi proposto que em insetos ela atua na biossíntese de hormônios e transmissores (Isaac *et al.*, 1998). Uma família de genes codificadores para essa enzima foi descrita em *Anopheles gambiae*, vetor da malária (Burnham *et al.*, 2005). Em nossa análise proteômica, foi identificada uma enzima conversora de angiotensina putativa (A0A0V0G2N7) especificamente na amostra de 5 dpa da saliva de *T. dimidiata*.

## **Antígeno 5 de *R. neglectus***

As proteínas da família do antígeno 5 estão entre as proteínas mais abundantes e imunogênicas presentes nas glândulas salivares de insetos picadores (King e Spangfort, 2000). Elas pertencem à superfamília CAP (*cysteine rich secretory proteins, antigen 5 e pathogenesis-related 1 proteins*) de proteínas. Esta superfamília é caracterizada por vários domínios, dois deles estão definidos no banco de dados PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>): CAP1, [GDER][HR][FYWH][TVS][QA][LIVM][LIVMA]Wxx[STN], e CAP2, [LIVMFYH][LIVMFY]xC[NQRHS]Yx[P ARH]x [GL]N[LIVMFYWDN]. Outros dois motivos adicionais são CAP3 (HNxxR) e CAP4 (G[EQ]N[ILV]) (Gibbs *et al.*, 2008).

Essas moléculas foram identificadas inicialmente no veneno de formigas e vespas (King e Spangfort, 2000). São as proteínas mais abundantes do veneno das vespas e estão frequentemente associadas com o desencadeamento de uma forte resposta alérgica em humanos (King *et al.*, 1978; King *et al.*, 1983). No entanto, sua função não está esclarecida. Posteriormente, antígenos-5 foram descritos no intestino de *Drosophila melanogaster* (Kovalick *et al.*, 1998) e na saliva de carrapatos (Mans *et al.*, 2008), flebótomos (Charlab *et al.*, 1999), moscas (Ameri *et al.*, 2008), mosquitos (Valenzuela *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2007) e no sialoma de algumas espécies de triatomíneos hematófagos (De Araújo *et al.*, 2012).

Membros dessa família encontrados na saliva dos triatomíneos *D. maxima* (DMAV) e *T. infestans* (TIAV) foram expressos e apresentaram atividade antioxidante, inibiram a agregação plaquetária induzida por colágeno e o estresse oxidativo em neutrófilos. Os resultados revelaram, portanto, uma nova família de enzimas antioxidantes, importante para atenuar os eventos pró-inflamatórios associados com produção desregulada de espécies reativas de oxigênio (ROS) na microcirculação e, conseqüentemente, que poderia beneficiar os insetos hematófagos a se alimentarem satisfatoriamente do sangue de suas presas (Assumpção *et al.*, 2013).

Em vista do potencial biotecnológico dessa molécula, realizou-se a análise *in silico* de uma das sequências de RNAV identificadas no sialoma de *R. neglectus* (Santiago *et al.*, 2016) e se propôs a expressão recombinante do RNAV em sistema de expressão procariótico. A sequência do RNAV possui peptídeo sinal e foi predita secretada pela via clássica. Essa localização foi confirmada pelo programa TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007). A proteína predita apresenta um sítio de O-glicosilação, vários sítios de fosforilação e 25 resíduos de aminoácidos que podem estar presentes em possíveis epítomos lineares para células B. Essa análise é interessante, visto que em outras espécies de artrópodes as proteínas da família do antígeno 5 são alérgenos (King *et al.*, 1983; Fang *et al.*, 1988; Hoffman, 1993; Barral *et al.*, 2000). Essa proteína recombinante poderia, nesse contexto, ser utilizada como marcador de exposição para a picada de triatomíneos.

Mesmo utilizando uma linhagem de bactérias que expressa tRNAs (RNAs transportadores) para aminoácidos raros em bactérias, a Rosetta2(DE3)pLysS, não foi possível obter o RNAV recombinante. Além das linhagens bacterianas, outras variáveis foram alteradas na tentativa de expressar o RNAV recombinante, por exemplo, diferentes concentrações de agente indutor, tempos e temperatura de indução. Todas essas tentativas foram frustradas.

## CONCLUSÕES

A presente análise proteômica da saliva de *T. dimidiata* coletada 5 e 10 dias após a alimentação sanguínea possibilitou a identificação de proteínas que podem estar relacionadas com processos bioquímicos da hematofagia. Uma maior quantidade de identificações foi observada nessa análise em comparação com a análise proteômica realizada previamente para a saliva dessa espécie de triatomíneo. As amostras analisadas pareciam estar íntegras e o perfil eletroforético das proteínas salivares de *T. dimidiata* no gel bidimensional é semelhante ao de *T. infestans*.

De interesse, poucas proteínas foram diferencialmente expressas nos dois períodos avaliados. Na amostra de 5 dpa, as proteínas identificadas foram: um inibidor de protease do tipo kazal, que pode ter efeito sobre a hemostasia do hospedeiro, inibindo a coagulação sanguínea e favorecendo o repasto do triatomíneo; uma metaloproteína de ligação ao heme, que pode ter surgido como uma estratégia para a detoxificação do heme, que livre é tóxico para as células do inseto pois pode causar peroxidação lipídica e lise celular; uma selenoproteína, proteína que possui selenocisteína (21<sup>o</sup> resíduo de aminoácido de ocorrência natural) no lugar da cisteína; uma esterase / lipase que pode estar envolvida na resistência a inseticidas, sendo ainda importante no metabolismo de compostos endógenos, como por exemplo hormônios. Nenhuma dessas quatro proteínas havia sido observada no proteoma anterior da saliva de *T. dimidiata*. Além destas, duas proteínas não caracterizadas também foram observadas.

Na amostra de 10 dpa, foi encontrada uma proteína de ligação a aminas biogênicas, que pode apresentar efeito anti-inflamatório, por exemplo, antagonismo da histamina para impedir a rejeição do triatomíneo no momento do repasto. Além desta, três proteínas putativamente secretadas e sete proteínas não caracterizadas foram observadas 10 dpa. Em ambas as amostras, as proteínas não caracterizadas apresentam similaridade com as proteínas da família das lipocalinas.

Por fim, a sequência do antígeno 5 de *R. neglectus* foi caracterizada *in silico*, mas não foi produzida no sistema heterólogo procarioto proposto. Nova tentativa de produção do RNAVr será realizada em sistema heterólogo eucarioto.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PAHO - Organização Panamericana de saúde. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra>. Acessado em: 05.04.2016 às 16:00.

AGARWALA, K. L. et al. Limulus intracellular Coagulation inhibitor type 3. **Biological Chemistry**, v. 271(29), p. 23768-23774, 1996.

ALMEIDA; D., P. S.; AL, E. Levantamento da fauna de Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) em ambiente domiciliar e infecção natural por Trypanosomatidae no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41(4), p. 374-380 2008. Disponível em: <[http://dspace.fsp.usp.br/xmlui/bitstream/handle/bdfsp/79/art\\_ALMEIDA\\_Levantamento\\_da\\_fauna\\_de\\_Triatominae\\_-\\_Hemiptera\\_Reduviidae\\_-\\_2008.pdf?sequence=1](http://dspace.fsp.usp.br/xmlui/bitstream/handle/bdfsp/79/art_ALMEIDA_Levantamento_da_fauna_de_Triatominae_-_Hemiptera_Reduviidae_-_2008.pdf?sequence=1)>.

ALTELAAR, A. F.; MUNOZ, J.; HECK, A. J. Next generation proteomics: towards and integrative view of proteome dynamics. **Nat. Vet. Gent**, v. 14(1), p. 35-48, 2013. ISSN 1471-0056.

ANDERSEN, J. F. et al. **The role of salivary lipocalins in blood feeding by Rhodnius prolixus.**: Archives of insect biochemistry and physiology. 58: 97–105 p. 2005.

\_\_\_\_\_. The role of salivary lipocalins in blood feeding by Rhodnius prolixus. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 58, n. 2, p. 97-105, Feb 2005. ISSN 0739-4462 (Print)

0739-4462 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15660358](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15660358)>.

ARAUJO, R. N. et al. Electromyogram of the Cibarial Pump and the Feeding Process in Hematophagous Hemiptera.

ARAÚJO, C. A. C. et al. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of reduviid bug *Triatom brasiliensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 547-560, 2006.

ARIËNS, R. A. et al. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 743-54, Aug 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12130481>>.

ASSUMPÇÃO, T. C. et al. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. **J Proteome Res**, v. 10, n. 2, p. 669-79, Feb 4 2011. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21058630](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21058630)>.

ASSUMPÇÃO, T. C. et al. Salivary antigen-5/CAP family members are Cu<sup>2+</sup>-dependent antioxidant enzymes that scavenge O<sub>2</sub><sup>-</sup> and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst. **J Biol Chem**, v. 288, n. 20, p. 14341-61, May 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564450> >.

ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* a vector of Chagas' disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 213-232, 2008.

BALASHOV YUS. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. **Annu Rev Entomol**, v. 29, p. 137-56, 1984. ISSN 0066-4170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6362549> >.

BARGUES, M. D. et al. Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 5, p. e233, 2008. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461141> >.

BARRAL, A. et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **Am J Trop Med Hyg**, v. 62, n. 6, p. 740-5, Jun 2000. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304066> >.

BENDTSEN, J. D., L.; FAUSBOLL, A.; BRUNAK, S. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC Microbiology**, v. 5(58), 2005.

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

BUARQUE, D. S. et al. Differential expression profiles in the midgut of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e61203, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23658688> >.

BURMESTER, T. et al. The evolution of Hexamerins and the Phylogeny of Insects. **Jornal of Molecular evolution**, v. 47, p. 93-108, 1997.

BURNHAM, S. et al. The angiotensin-converting enzyme (ACE) gene family of *Anopheles gambiae*. **BMC Genomics**, v. 6, p. 172, 2005. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16329762> >.

BUSSACOS, A. C. et al. Diversity of anti-haemostatic proteins in the salivary glands of *Rhodnius* species transmitters of Chagas disease in the greater Amazon. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1664-72, Aug 24 2011. ISSN 1876-7737 (Electronic). Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21742069](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21742069) >.

BUSSACOS, A. C. M. et al. Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. **Journal of proteomics**, v. 74, p. 1693-1700, 2011.

CALVO, E. et al. An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 2, p. 164-75, Feb 2007. ISSN 0965-1748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244545> >.

\_\_\_\_\_. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein **PNAS**, v. 106(10), p. 3728-3733, 2009. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/106/10/3728.full.pdf> >.

CARVALHO, D. B. et al. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasions in Monte Alto City, São Paulo, Brazil. **Acta Trop**, v. 130, p. 35-8, Feb 2014. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145156> >.

CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nat Protoc**, v. 11, n. 1, p. 102-17, Jan 2016. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26658470> >.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v. 34, n. 4-5, p. 221-7, 2005. ISSN 1424-8832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707932> >.

CHAMPAGNE, D. E.; NUSSENZVEIG, R. H.; RIBEIRO, J. M. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, v. 270, n. 15, p. 8691-5, Apr 14 1995. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7721773](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7721773) >.

CHAPPLE, C. E.; GUIGÓ, R. Relaxation of Selective Constraints Causes Independent Selenoprotein Extinction in Insect Genomes. **PlosOne**, v. 3(8), 2009. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002968> >.

CHARLAB, R. et al. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 26, p. 15155-60, Dec 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611354> >.

CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA, M.; COSTA, C. M. **The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors.** . International Journal of Mass Spectrometry. v. 268 p. 265–276 p. 2007.

COSTA, C. 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**, v. 74, n. 9, p. 1652-63, Aug 2011. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362504> >.

COUTINHO, M.; FREIRE, O.; DIAS, J. C. The noble enigma: Chagas' nominations for the Nobel prize. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 123-9, 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677698> >.

CRISTINO, A. S. et al. Organization, evolution and transcriptional profile of hexamerins genes of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Insec Molecular Biology**, v. 19, p. 137-146, 2010.

DE ARAÚJO, C. N. et al. Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **J Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3829-41, Jul 2012. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579750> >.

DORN, P. L.; MONROY, C.; CURTIS, A. *Triatoma dimidiata* (Lateille, 1811): a review of its diversity across its geographic ranges and the relationship among populations. **Infect. Genet. Evol.**, v. 7, p. 343-352, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097928> >.

DREWES, C. C. et al. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 333-40, Sep 2012. ISSN 1879-3150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575283> >.

DUMONTEIL, E. et al. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. **Expert Rev Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1043-55, Sep 2012. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151163> >.

EMANUELSSON, O. et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nat Protoc**, v. 2, n. 4, p. 953-71, 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446895> >.

FANG, K. S. et al. cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 3, p. 895-9, Feb 1988. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3422469> >.

FAUDRY, E. et al. Triatoma infestans apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. **J Biol Chem**, v. 279, n. 19, p. 19607-13, May 7 2004. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14985353](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14985353)>.

\_\_\_\_\_. Kinetics of expression of the salivary apyrases in Triatoma infestans. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, n. 10, p. 1051-8, Oct 2004. ISSN 0965-1748 (Print)

0965-1748 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15475299](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15475299)>.

\_\_\_\_\_. Salivary apyrases of Triatoma infestans are assembled into homo-oligomers. **Biochem J**, v. 396, n. 3, p. 509-15, Jun 15 2006. ISSN 1470-8728 (Electronic)

0264-6021 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16542158](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16542158)>.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large molecules. **Science**, v. 246(4926), p. 64-71, 1989.

FLOWER, D. R. The lipocalin family: structure and Function. **Biochem J.**, v. 318, p. 1-14, 1996.

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

FRANCISCHETTI, I. M.; ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. Biochemical and functional characterization of recombinant *Rhodnius prolixus* platelet agregation inhibitor 1 as novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides. **Biochemistry**, v. 41(11), p. 3810-8, 2002.

FRANCISCHETTI, I. M. et al. Insight into the Sialome of Bed Bug, *Cimex lectularius*. **J. Proteome Res.**, v. 6;9(8), p. 3820-31, 2010.

\_\_\_\_\_. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 14, p. 2051-88, 2009. ISSN 1093-4715. Disponible em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273185>>.

FRIEDRICH, T. et al. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, v. 268, n. 22, p. 16216-22, Aug 5 1993. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponible em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8344906](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8344906)>.

FUENTES-PRIOR, P. 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**, v. 94, n. 22, p. 11845-50, Oct 28 1997. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9342325](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9342325)>.

GALINDO, K.; SMITH, D. P. A large family of divergent *Drosophila* odorantbinding proteins expresses in gustatory and olfactory sensilla. **Genetics**, v. 159, p. 1059-1072, 2001. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729153>>.

GIBBS, G. M.; ROELANTS, K.; O'BRYAN, M. K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. **Endocr Rev**, v. 29, n. 7, p. 865-97, Dec 2008. ISSN 0163-769X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824526>>.

GRILLO, L. A.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolismo in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae): role of midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochem Mol. Biol.**, v. 37, p. 579-588., 2007. Disponível em: <  
<http://europepmc.org/abstract/med/17517335>>.

GUARNERI, A. A. et al. Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human hosts. **Acta Trop**, v. 87, n. 3, p. 361-70, Aug 2003. ISSN 0001-706X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875930>>.

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.

GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? **Acta Trop**, v. 107, n. 2, p. 90-8, Aug 2008. ISSN 0001-706X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550022>>.

\_\_\_\_\_. Infestation of *Mauritia flexuosa* palms by triatomines (Hemiptera: Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian savanna. **Acta Trop**, v. 121, n. 2, p. 105-11, Feb 2012. ISSN 1873-6254. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037200>>.

\_\_\_\_\_. **Guia de Triatomíneos da Bahia**. Feira de Santana - BA: 2012. 113 ISBN 978-85-99799-47-5.

\_\_\_\_\_. Sampling *Rhodnius neglectus* in *Mauritia flexuosa* palm trees: a field study in the Brazilian savanna. **Med Vet Entomol**, v. 17, n. 3, p. 347-50, Sep 2003. ISSN 0269-283X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941022> >.

\_\_\_\_\_. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 46, n. 6, p. 323-30, 2004 Nov-Dec 2004. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15654478> >.

HERNANDÉZ-VARGAS, M. J.; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E.; CORZO, G. An insight into the Triabin Protein family of American Hematophagous Reduvids: Funtional, Structural and Phylogenetic analysis. **Toxins**, v. 8(44), p. 1-19, 2016.

HOFFMAN, D. R. Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 92, n. 5, p. 707-16, Nov 1993. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8227862> >.

HOTEZ, P. J. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820747> >.

ISAAC, R. et al. A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme): the hydrolysis of lysyl-arginine and arginyl-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide. **Biochem J**, v. 330 ( Pt 1), p. 61-5, Feb 1998. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461491> >.

ITO, N. et al. Novel cysteine-rich secretory protein in the buccal gland secretion of the parasitic lamprey, *Lethenteron japonicum*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 358, n. 1, p. 35-40, Jun 2007. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467660> >.

J. S., V. et al. **A Kunitz- Type FXa inhibitor affects tumor progression, Hypercoagulable sate and tiggers apoptosis::** Biomed Pharmacother. 67: 192- 6 p. 2013.

JESTY, J. The inhibition of activated bovine coagulation factors X and VII by antithrombin III. **Arch Biochem Biophys**, v. 185, n. 1, p. 165-73, Jan 1978. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/564164> >.

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

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.

KATO, H. et al. A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 2, p. 184-91, Mar 2010. ISSN 1567-7257 (Electronic)

1567-1348 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19900580](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19900580)>.

KING, T. P. et al. Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins. **Mol Immunol**, v. 20, n. 3, p. 297-308, Mar 1983. ISSN 0161-5890. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6865952>>.

\_\_\_\_\_. Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet, and yellow jacket venoms. **Biochemistry**, v. 17, n. 24, p. 5165-74, Nov 1978. ISSN 0006-2960. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/83154>>.

KING, T. P.; SPANGFORT, M. D. Structure and biology of stinging insect venom allergens. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 123, n. 2, p. 99-106, Oct 2000. ISSN 1018-2438. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060481>>.

KOVALICK, G. E. et al. Structure and expression of the antigen 5-related gene of *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 28, n. 7, p. 491-500, Jul 1998. ISSN 0965-1748. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9718681>>.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>>.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B- cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2(2), 2006.

LAVOPIERRE, M. M.; DICKERSON, G.; GORDON, R. M. 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. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 53, p. 235-50, Jun 1959. ISSN 0003-4983 (Print)



0003-4983 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14414675](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14414675)>.

LEE, B. Y. et al. Modeling the economic value of a Chagas' disease therapeutic vaccine. **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 9, p. 1293-301, Sep 2012. ISSN 2164-554X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894964>>.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 163, p. 125-520, 1979. Disponível em: <  
<http://digitallibrary.amnh.org/handle/2246/1282>>.

LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-53, 2009 Sep-Oct 2009. ISSN 1678-9946. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893976>>.

MAEDA, M. H.; KNOX, M. B.; GURGEL-GONÇALVES, R. Occurrence of synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 1, p. 71-6, Feb 2012. ISSN 1678-9849. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22370832>>.

MANS, B. J. et al. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 38, n. 1, p. 42-58, Jan 2008. ISSN 0965-1748. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070664>>.

MENDE, K. et al. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. *Dipetalogaster maximus* cDNA cloning, expression and characterization. **Eur J Biochem**, v. 266, n. 2, p. 583-90, Dec 1999. ISSN 0014-2956. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561601>>.

MESQUITA, R. D. et al. Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infect Immun**, v. 76, n. 12, p. 5543-52, Dec 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794282>>.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 1, p. 41-8, Jan 2006. ISSN 1524-4636. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254201>>.

MONTELLA, J., R.VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance: a review. **Mem. Ist. Oswaldo Cruz**, v. 107(4), p. 427-49, 2012. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666852>>.

MONTFORT, W. R.; WEICHSEL, A.; ANDERSEN, J. F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. **Biochim Biophys Acta**, v. 1482, n. 1-2, p. 110-8, Oct 18 2000. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11058753](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11058753)>.

MOREIRA, M. F. et al. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 33, n. 1, p. 23-8, Jan 2003. ISSN 0965-1748 (Print)

0965-1748 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12459197](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12459197)>.

MOREIRA-FERRO, C. K. et al. A lysozyme in the salivary glands of the malaria vector *Anopheles darlingi*. **Insect Mol. Bio.**, v. 7(3), p. 257-64, 1998. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662475>>.

MOREIRA-FERRO, C. K.; MARINOTTI, O.; BIJOSKY, A. T. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector *Anopheles darlingi*. **Tissue & Cell**, v. 31(3), p. 264-73, 1999. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10481298>>.

NOESKE-JUNGBLUT, C. et al. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. **J Biol Chem**, v. 269, n. 7, p. 5050-3, Feb 18 1994. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8106481](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8106481)>.

OLIVEIRA, A. W. S. D.; SILVA, I. G. D. Geographical distribution and indicators entomologic of sinantropic triatomines captured in the State of Goiás. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40(2), p. 204-208, 2007.

OLIVEIROS, J. C. Venny. **An interactive for comparing lists with Venn's diagrams**. 2007-2015.

OTALORA-LUNA, F. et al. Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera:Reduviidae). **Revista Chilena de História Natural**, v. 88:4, 2015. Disponível em: <  
<http://link.springer.com/article/10.1186/s40693-014-0032-0#enumeration>>.

PAIVA-SILVA, G. O. et al. On the biosynthesis of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p. 1533-1541, 2002. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12530221>>.

PAHO - Organização Panamericana de saúde. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra>. Acessado em: 05.04.2016 às 16:00.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genome. **Nature**, v. 485(6788), p. 837-46, 2000. ISSN 0028-0836.

PASSOS, L. A. C. et al. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*\*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21.2, p. 223-232, 2012.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat Methods**, v. 8, n. 10, p. 785-6, 2011. ISSN 1548-7105. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21959131>>.

PIMENTEL, G. E.; ROSSIGNOL, P. A. Age dependence of salivary bacteriolytic activity in adult mosquitoes. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 96, p. 549-51, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2390862>>.

PONNUVEL, K. M. et al. A lipase isolated from the Silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology** v. 77(190), p. 10725– 10729. , 2003. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/77/19/10725.full>>.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001. ISSN 1473-3099. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11871482>>.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect Agents Dis**, v. 4, n. 3, p. 143-52, Sep 1995. ISSN 1056-2044. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548192>>.

RIBEIRO, J. M. et al. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, n. 1, p. 61-79, Jan 2004. ISSN 0965-1748 (Print)

0965-1748 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14976983](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14976983)>.

\_\_\_\_\_. An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma rubida* (Hemiptera: Heteroptera). **J Med Entomol**, v. 49, n. 3, p. 563-72, May 2012. ISSN 0022-2585. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679863>>.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol**, v. 48, p. 73-88, 2003a. ISSN 0066-4170. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194906>>.

\_\_\_\_\_. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol**, v. 48, p. 73-88, 2003b. ISSN 0066-4170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194906> >.

RIBEIRO, J. M. et al. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 79B, p. 81-86, 1984.

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**, v. 52, n. 3, p. 351-8, May 2015. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26334808> >.

RODRIGUES, V. L. et al. Colonization of palm trees by *Rhodnius neglectus* and household and invasion in an urban area, Araçatuba, São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 56, n. 3, p. 213-8, 2014 May-Jun 2014. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24878999> >.

ROSSIGNOL, P. A.; LUERDES, A. M. Bacteriolitic factor in the salivary glands *Aedes aegypti*. **Comp. Biochem. Physio**, v. 83B, p. 819-22, 1986. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3519067> >.

SANTIAGO, P. B. et al. A Deep Insight into the Sialome of *Rhodnius neglectus*, a Vector of Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004581, Apr 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27129103> >.

SANTOS, A. et al. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 7, p. 702-12, Jul 2007. ISSN 0965-1748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550826> >.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution and species of groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, p. 88-100, 2009.

SCHOFIELD, C. J.; DIOTAITUI, L.; DUJARDIN, J. P. The process of Domestication in Triatominae

font-family:"Calibri", "sans-serif";mso-ascii-theme-font:minor-latin;mso-fareast-font-family:

Calibri;mso-fareast-theme-font:minor-latin;mso-hansi-theme-font:minor-latin;

mso-bidi-font-family:"Times New Roman";mso-bidi-theme-font:minor-bidi;

mso-ansi-language:PT-BR;mso-fareast-language:EN-US;mso-bidi-language:AR-SA">. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 94(1), p. 375-378, 1999.

SILVA, A. R. et al. Chagas' disease: Triatomines notification of the São Paulo State during the 1990s. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2006.

SIMONET, G.; CLAEYS, I.; BROECK, J. V. Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132, p. 247-255, 2002.

SIMONET, G. et al. Genomics, evolution and biological functions of the pacifastin peptide family: a conserved serine proteases inhibitor family in arthropods. **Peptides**, v. 24, p. 1633-1644, 2003.

STUART, K. et al. **Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases:** J Clin Invest. 118: 1301-10 p. 2008.

STUDDY, P. R.; LAPWORTH, R.; BIRD, R. Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance--a review. **J Clin Pathol**, v. 36, n. 8, p. 938-47, Aug 1983. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6308066> >.

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

URSIC-BEDOYA, R. J. et al. Identification and characterization of two novel lysosymes from *Rhodnius prolixus*, vector of Chagas disease. **J. Insect Physiol.**, v. 54(3), p. 593-603, 2008.

VALENZUELA, J. G. et al. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 32, n. 9, p. 1101-22, Sep 2002. ISSN 0965-1748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213246> >.

VENTURA, J. S. et al. **A Kunitz- Type FXa inhibitor affects tumor progression, Hypercoagulable state and tiggers apoptosis:** Biomed Pharmacother. 67: 192- 6 p. 2013.

VERSTEEG, H. H. et al. New fundamentals in hemostasis. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 327-58, Jan 2013. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303912> >.

WALKER, F. A. Nitric oxide interaction with insect nitrophorins and thoughts on the electron configuration of the {FeNO}6 complex. **J Inorg Biochem**, v. 99, n. 1, p. 216-36, Jan 2005. ISSN 0162-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15598503> >.

WEICHSEL, A. et al. Nitric oxide binding to nitrophorin 4 induces complete distal pocket burial. **Nat Struct Biol**, v. 7, n. 7, p. 551-4, Jul 2000. ISSN 1072-8368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10876239> >.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **Fact sheet N 340**, 2016a. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >. Acesso em: June 14, 2016.

\_\_\_\_\_. **Vector-borne diseases. Fact sheet n. 387.:**  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/#> 2016b.

XANTHOS, D. N.; BENETT, G. J.; CODERRE, T. J. Norepinephrine-induced nociception and vasoconstrictor hypersensitivity in rats with chronic post- ischemia pain. **Pain**, v. 137(3), p. 640- 651, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4494839/> >.

XU, Q. et al. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. **J Biol Chem**, v. 267, n. 17, p. 11968-71, Jun 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1601866> >.

YURCHENKO, V. et al. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. **J Biol Chem**, v. 277, n. 25, p. 22959-65, Jun 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943775> >.

ZHANG, Y. et al. Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-X activating complex. **Biochemistry**, v. 37, n. 30, p. 10681-90, Jul 1998. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692958> >.

ZHENG, Q.-L. et al. Expression, purification and characterization of three-domain Kazal-Type inhibitor from silkworm pupae (*Bombyx mori*). **Comp. Biochem. and Physiol**, v. 146B, p. 234-240, 2007.

## APÊNDICE A. Tabelas suplementares

**Tabela suplementar 1.** Proteínas salivares putativas de *T. dimidiata* identificadas na amostra coletada 5 dias após a alimentação

Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Uniq Peptides	Sequ ence Coun t	Spect rum Coun t
A0A0V0G2V8	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	198	22635,8	0,6768	17	40	308
A0A0V0G4M9	Putative triabin OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	148	16617,2	0,3581	13	17	219
A0A0V0G3R1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	220	23688,4	0,6	16	16	210
A0A0V0G3J5	Putative inositol polyphosphate 5-phosphatase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	315	36118,8	0,654	36	36	191
D1MWB7	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	197	22112,7	0,4162	13	33	189
D1MWB5	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	198	22506,7	0,4848	7	18	150
A0A0V0G2K3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	157	17537,4	0,586	7	10	118
A0A0V0G1Y5	Putative salivary lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	155	17617,9	0,5161	16	16	83
A0A0V0G2A1	Putative trypsin-like protease (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	277	30777,9	0,7906	29	29	76
A0A0V0G2Y3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	204	22263,7	0,5147	9	9	75
A0A0V0G2H8	Putative salivary lipocalin 4 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	165	18212,8	0,6424	13	13	74
D1MWB2	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	177	19914,8	0,2994	10	13	74
D1MWC1	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	239	26799,2	0,113	5	5	73
D1MXA8	Similar to trypsin, clone: L2E3 OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	134	14356	0,4104	5	5	70
A0A0V0G1Y6	Putative triabin lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	155	17712	0,471	9	9	53
D1MWB1	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	177	20010,9	0,2429	3	6	48
A0A0V0G2K7	Putative triabin lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	152	17213,4	0,6184	9	10	47
D1MWC3	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	197	22193,8	0,2132	2	5	41
A0A0V0G2N6	Putative triabin lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	164	18350	0,3537	5	5	32
A0A0V0G3K6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	198	22470,1	0,4394	9	9	30
A0A0V0G2R7	Putative mucin-2 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	3651	406749,4	0,115	24	24	29
A0A0V0GDS7	Putative hexamerin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	624	72775,9	0,3029	15	15	28

Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
D1MWB4	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	177	19795,8	0,2712	5	5	26
D1MWC4	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	214	24199,1	0,0561	1	1	24
A0A0V0G2N7	Putative angiotensin i-converting enzyme (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	430	49852	0,3372	13	13	23
A0A0V0G3L4	Putative basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	2292	253391,1	0,1017	13	13	22
A0A0V0G2G8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	190	22077,1	0,2211	5	5	22
A0A0V0G2I5	Putative tubulin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	447	50180,2	0,4183	15	15	21
A0A0V0G386	Putative actin-2 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	376	41740,8	0,3271	12	12	21
A0A0V0G573	Putative creatine kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	356	40080,2	0,427	11	11	20
A0A0V0G3S4	Putative gnl-cdd-187611 cd05353 hydroxyacyl-coa-like dh sdr c-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	717	77909	0,3208	13	13	18
A0A0V0G546	Putative metalloexopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	478	53441,4	0,3389	11	11	17
D1MWF1	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	177	19772,6	0,3446	7	11	17
A0A0V0G6Y0	Putative tubulin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	450	50055,6	0,3911	13	13	16
A0A0V0G3Q3	Putative inactive protein kinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	238	26007,4	0,3866	7	7	16
A0A0V0G561	Putative ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	1049	116919,9	0,163	11	11	15
A0A0V0GAP3	Aminomethyltransferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	386	42483,8	0,5181	10	10	15
A0A0V0G435	Putative ca2+-binding actin-bundling protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	2414	278257,5	0,0862	12	12	14
A0A0V0G1Z1	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	228	25954,3	0,2456	6	6	14
A0A0V0G5R3	Putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit a OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	613	67674,5	0,2153	10	10	13
A0A0V0GB32	Putative prophenoloxidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	687	79507,9	0,2285	10	11	13
A0A0V0G2W3	Catalase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	504	56757,4	0,2798	8	8	12
A0A0V0G3W3	Putative nadp-dependent isocitrate dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	397	44951,9	0,2544	8	8	12
A0A0V0G2P6	Putative xaa-pro dipeptidase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	502	55197,9	0,2729	8	8	12
A0A0V0G373	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	228	25412,7	0,4737	6	6	12
A0A0V0G2W9	Putative hydrolase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	226	25178,3	0,4292	7	7	11
A0A0V0G2N3	Putative 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	185	20482,6	0,427	6	6	11



Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Uniq ue Pepti des	Sequ ence Coun t	Spect rum Coun t
A0A0V0G2R0	Putative transitional endoplasmic reticulum atpase ter94 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	803	89228,4	0,1905	8	8	10
A0A0V0G426	Putative heat shock 70 kDa protein cognate 2 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	628	68645,1	0,1656	8	8	10
A0A0V0G3P4	Putative 60 kDa heat shock protein mitochondrial OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	571	60737	0,2627	8	8	10
A0A0V0G4W2	Putative elongation factor 1-gamma OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	425	48442,3	0,2235	8	8	10
A0A0V0G3E5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	333	35775,2	0,3333	6	6	10
A0A0V0G3V6	Putative fructose-16-bisphosphatase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	344	37657,2	0,3372	6	6	10
D1MWC6	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	196	22209,2	0,1582	5	5	10
A0A0V0G5S4	Phosphoglycerate kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	428	46377,1	0,2944	9	9	9
A0A0V0G2U7	Aspartate aminotransferase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	413	46337,5	0,2542	8	8	9
A0A0V0G3G9	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	555	62796,3	0,2198	8	8	9
A0A0V0G3N9	Malate dehydrogenase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	341	35941,2	0,4487	8	8	9
A0A0V0G4C1	Putative transketolase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	612	66296	0,2108	7	7	9
A0A0V0G4D6	Putative methylmalonate semialdehyde dehydrogenase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	523	56373,9	0,1912	7	7	9
A0A0V0G481	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	346	36748,3	0,3555	6	6	8
A0A0V0G314	Putative 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase mitochondrial OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	292	31265,9	0,2363	6	6	8
A0A0V0G4A8	Putative actin-depolymerizing factor 1 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	148	16940,4	0,4595	6	6	8
A0A0V0G8U2	Putative salivary secreted protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	531	61822,4	0,2109	6	6	8
A0A0V0G3V3	Putative chaperonin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	540	58780,5	0,1667	5	5	8
A0A0V0G3L0	Putative transcriptional regulator dj-1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	219	23492,3	0,3333	5	5	8
A0A0V0G4L1	Putative triabin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	145	16417	0,3448	4	5	8
A0A0V0G3V2	Pyruvate kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	536	58344,4	0,1772	7	7	7
A0A0V0G4R2	Putative gtp-binding adp-ribosylation factor-like protein arl1 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	182	20674,6	0,5165	6	6	7
A0A0V0G3D5	Putative spectrin beta chain-like protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	2439	281049,6	0,0447	6	6	7
A0A0V0G5N1	Aconitate hydratase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	892	97720,4	0,1143	6	6	7
A0A0V0G3F6	Putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit b (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	495	54925,1	0,1434	6	6	7

Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Uniq ue Pepti des	Sequ ence Coun t	Spect rum Coun t
A0A0V0G345	Putative enolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	432	47164,2	0,1366	5	5	7
A0A0V0G4N8	Putative aminopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	465	50380,2	0,228	5	5	7
A0A0V0G4X9	Putative aldo-keto reductase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	245	27531,3	0,4204	5	5	7
A0A0V0G6E2	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	206	22999,6	0,2913	4	4	7
A0A0V0G9B9	Putative bisphosphate 3'-nucleotidase bpnt1/inositol polyphosphate 1-phosphatase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	305	32561,9	0,1639	4	4	7
A0A0V0G7I4	Putative multifunctional chaperone 14-3-3 family OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	254	28942,4	0,3031	4	6	7
A0A0V0G4A7	Profilin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	126	13762,1	0,4206	3	3	7
D1MWC5	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	221	22966,1	0,1991	3	3	7
A0A0V0G2Q7	Putative multifunctional chaperone 14-3-3 family OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	247	28134	0,2065	3	5	7
A0A0V0G4P0	Putative prolyl endopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	706	79699,6	0,1827	6	6	6
A0A0V0G5X5	Putative translation elongation factor 2 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	844	94620,4	0,0865	5	5	6
A0A0V0G4Q6	Putative puromycin-sensitive aminopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	880	100660,2	0,0864	5	5	6
A0A0V0GA46	Putative heat shock protein 83 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	728	83586,2	0,0755	5	5	6
A0A0V0G5Y7	Putative chaperonin subunit 6a zeta OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	534	58389,5	0,1592	5	5	6
A0A0V0G2M9	Putative fatty acid-binding protein fabp OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	134	15211,9	0,2537	4	4	6
A0A0V0G2Z6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	141	15258,6	0,3759	4	4	6
A0A0V0G2E8	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	175	20138,6	0,3829	4	4	6
A0A0V0G537	Putative sulfotransferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	315	37043,1	0,1968	4	4	6
A0A0V0G2W8	Glutamine synthetase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	362	40655,1	0,2017	4	4	6
A0A0V0G4C4	Putative delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase mitochondrial OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	569	63318,9	0,1002	3	3	6
A0A0V0G4Q3	Putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit h OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	479	55148,7	0,0793	3	3	6
A0A0V0G2X2	Putative salivary lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	175	20030,1	0,2057	2	2	6
A0A0V0G5Y3	Putative dihydropteridine reductase dhpr/qdpr OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	235	25361,2	0,3702	5	5	5
A0A0V0G8Z9	Putative ecdysteroid kinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	411	47488,7	0,1606	5	5	5
A0A0V0GDV4	Putative glutathione s-transferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	206	24063,6	0,2573	5	5	5

Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G5K7	Putative ca2+-binding actin-bundling protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	890	102994,1	0,0674	4	4	5
A0A0V0G3B6	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit rpn1/psmd2 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	891	98321	0,0673	4	4	5
D1MWC7	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	199	23002,4	0,1759	4	4	5
A0A0V0G4M0	Putative carbonic anhydrase-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	260	29686,8	0,1038	4	4	5
A0A0V0G2G7	Putative triabin lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	169	19179,3	0,3254	3	3	5
A0A0V0G5A7	Putative alpha-ketoacid-coa transferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	462	49473,7	0,1861	3	3	5
A0A0V0G4J5	Putative uridylyate kinase/adenylyate kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	204	22402,5	0,2255	3	3	5
A0A0V0G3Z2	Putative enoyl-coa isomerase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	279	30768,7	0,1219	3	3	5
A0A0V0GC63	Putative serine protease inhibitor dipetalogastin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	333	36692,9	0,1892	3	3	5
A0A0V0G7Q5	Putative prophenoloxidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	716	81907	0,0601	3	4	5
D1MXA9	Similar to heme-binding protein, clone: L2G6 OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	135	15022,6	0,1407	2	2	5
A0A0V0G552	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	258	28694,4	0,1318	2	2	5
A0A0V0G6K0	Putative transglutaminase/protease-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	691	78212	0,0796	4	4	4
A0A0V0G536	Putative mitochondrial succinate-semialdehyde dehydrogen (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	503	54841	0,1511	4	4	4
A0A0V0G4F2	Putative acetyl-coa hydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	482	52356,6	0,1452	4	4	4
A0A0V0G652	Glutathione synthetase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	432	50411,9	0,1782	4	4	4
A0A0V0G404	Annexin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	321	35290,6	0,2399	4	4	4
A0A0V0G350	Putative heat shock 70 kDa protein cognate 5 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	637	69851,3	0,0706	4	4	4
A0A0V0G5Q2	Putative salivary lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	192	22013,9	0,0729	4	4	4
A0A0V0G3P6	Thioredoxin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	105	11697	0,4	4	4	4
A0A0V0G2S8	Putative cd73 ecto-5'-nucleotidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	425	47349,3	0,0353	3	3	4
A0A0V0G8A2	Putative gdp dissociation inhibitor OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	442	49838,2	0,1606	3	3	4
A0A0V0GBZ5	Putative dipeptidase amino acid transport and metabolism (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	386	42572,8	0,1192	3	3	4
A0A0V0G6W9	Putative wd40 repeat stress protein/actin OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	602	66228,2	0,1146	3	3	4
A0A0V0G7A9	Putative transglutaminase/protease-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	685	77610	0,0861	3	3	4

Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Uniq ue Pepti des	Sequ ence Coun t	Spect rum Coun t
A0A0V0G4K4	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	230	25891,2	0,2739	3	3	4
A0A0V0G479	Putative phosphoinositide 3-kinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	772	86575,3	0,0648	3	3	4
A0A0V0G4W9	Putative fumarylacetoacetate hydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	335	37225	0,0567	3	3	4
A0A0V0G4S9	Putative salivary lipocalin lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	164	18729	0,1768	3	3	4
A0A0V0G4Z9	Histone H2A (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	147	15704,6	0,1837	3	3	4
A0A0V0G5L7	Putative hydroxyacyl-coa dehydrogenase/enoyl-coa hydratase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	277	30662,1	0,1444	2	2	4
A0A0V0G3D9	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	464	53146,6	0,0819	2	2	4
A0A0V0G4J9	Putative salivary secreted kazaltype proteinase inhibitor OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	83	9357,3	0,3012	2	2	4
A0A0V0G8U1	Thymidine phosphorylase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	437	46664,1	0,103	2	2	4
A0A0V0G5V8	Putative delta-aminolevulinic acid dehydratase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	332	36567,5	0,0693	2	2	4
A0A0V0GD89	Putative lysozyme (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	122	13951	0,2869	2	2	4
A0A0V0G3R8	T-complex protein 1 subunit gamma (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	542	60157,7	0,0664	2	2	4
A0A0V0G525	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	109	11776,9	0,3486	2	2	4
A0A0V0G2Y1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	543	62392,1	0,081	2	2	4
D1MWE5	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	194	22033,2	0,0464	1	1	4
A0A0V0G2G2	Putative serpin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	393	44105,1	0,1196	3	3	3
A0A0V0G2W0	Putative fumarase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	465	50216,1	0,1075	3	3	3
A0A0V0G5G2	Putative glutaminyl cyclase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	342	38924,1	0,1667	3	3	3
A0A0V0G3B8	Putative aminopeptidase npepl1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	509	54718,8	0,0904	3	3	3
A0A0V0G8W6	Putative echinoderm microtubule-associated protein-like 1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	871	95267,3	0,0861	3	3	3
A0A0V0G2X6	Putative cytochrome c OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	108	11813,2	0,3426	3	3	3
A0A0V0G4L9	Putative cytochrome p450 cyp3/cyp5/cyp6/cyp9 subfamily protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	329	37475,1	0,1398	3	3	3
A0A0V0G3X1	Proteasome subunit alpha type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	234	25836,1	0,2607	3	3	3
A0A0V0G7G9	Putative methylthioadenosine phosphorylase mtap OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	276	30264,8	0,1775	3	3	3
A0A0V0G356	Putative oxoprolinase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	1263	138636	0,0396	3	3	3

Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Uniq ue Pepti des	Sequ ence Coun t	Spect rum Coun t
A0A0V0G5W2	Putative phosphoglucomutase/phosphomannomutase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	553	60931	0,0687	3	3	3
A0A0V0G2M6	Putative salivary secreted protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	169	18883,6	0,4142	3	3	3
A0A0V0G4P9	Putative prosaposin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	817	91753,9	0,0171	3	3	3
A0A0V0G4L8	Putative chaperonin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	542	59281	0,0959	3	3	3
A0A0V0G2S7	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	520	55671,2	0,0846	3	3	3
A0A0V0G4U1	Putative vesicle coat complex copi gamma subunit (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	883	97581,1	0,0895	3	3	3
A0A0V0G4F6	Transaldolase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	322	35732	0,1025	3	3	3
A0A0V0G555	Putative aicar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	591	64767,5	0,0575	3	3	3
A0A0V0G575	Glutathione peroxidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	168	19119,6	0,3571	3	3	3
A0A0V0G515	Adenylate kinase OS=Triatoma dimidiata GN=Adk2 PE=3 SV=1	246	27759,2	0,2358	3	3	3
A0A0V0G5V3	Putative small heat shock protein hsp20 family OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	191	21344,8	0,2461	3	3	3
A0A0V0G5E2	Putative 20s proteasome regulatory subunit beta type psmb2/pre1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	197	22602,1	0,2335	2	2	3
A0A0V0G415	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit rpn2/psmd1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	891	98695,7	0,037	2	2	3
A0A0V0G3A8	Putative ubiquitin-conjugating enzyme OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	147	16649,4	0,2993	2	2	3
A0A0V0G4G1	Putative calmodulin OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	149	16781,8	0,2215	2	2	3
A0A0V0G436	V-type proton ATPase subunit F OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	123	13758	0,2195	2	2	3
A0A0V0G3Z1	Putative 3-oxoacyl coa thiolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	411	43056,3	0,0608	2	2	3
A0A0V0G4E8	Protein kinase c inhibitor (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	127	13867,3	0,3543	2	2	3
A0A0V0G4U3	Putative mitochondrial matrix protein p33 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	290	32247	0,1379	2	2	3
A0A0V0G4C2	Putative peroxiredoxin posttranslational modification (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	234	26307,7	0,1538	2	2	3
A0A0V0G548	Putative tata-binding protein-interacting protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	1244	138873,4	0,0241	2	2	3
A0A0V0G4F0	Putative ecdysteroid kinase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	402	46842	0,0473	2	2	3
A0A0V0G4R4	Putative microtubule-associated protein futsch (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	574	64015,1	0,0348	2	2	3
A0A0V0G5P5	Putative phosphoglycerate mutase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	255	28960,5	0,098	2	2	3
A0A0V0G398	Putative pfkb family carbohydrate kinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	343	38082,6	0,102	2	2	3

Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Uniq ue Pepti des	Sequ ence Coun t	Spect rum Coun t
A0A0V0GCE2	Putative histone tail methylase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	568	65079,8	0,044	2	2	3
A0A0V0GAD6	Putative attractin and platelet-activating factor acetylhydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	225	25575,1	0,1289	2	2	2
A0A0V0G2U3	Putative peroxiredoxin posttranslational modification (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	151	16133,3	0,0993	2	2	2
A0A0V0G428	Transgelin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	165	18164,3	0,0909	2	2	2
A0A0V0G301	Putative esterase and lipase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	543	61868,8	0,0387	2	2	2
A0A0V0G4T6	Ubiquitin-fold modifier 1 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	88	9360	0,3977	2	2	2
A0A0V0G571	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	277	30332,4	0,0433	2	2	2
A0A0V0G4R0	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	1177	136754,7	0,0272	2	2	2
A0A0V0GE53	Putative polyprenyl synthetase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	351	40159,4	0,094	2	2	2
A0A0V0G5K4	Putative pyridoxamine 5'-phosphate oxidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	188	21307,5	0,0638	2	2	2
A0A0V0G3N8	Putative cytoskeletal protein adducin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	359	40121,2	0,1393	2	2	2
A0A0V0G7G8	Putative aspartyl/asparaginyl-trna synthetase translation OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	553	63421,9	0,0579	2	2	2
A0A0V0G8V3	Putative lysophospholipase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	202	21648	0,1287	2	2	2
A0A0V0G4Z8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	311	35725,3	0,1093	2	2	2
A0A0V0G6V7	Putative fumarylacetoacetase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	411	45426,7	0,0608	2	2	2
A0A0V0G662	Putative pyridoxal/pyridoxine/pyridoxamine kinase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	299	32692,2	0,0769	2	2	2
A0A0V0G4Y6	Putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit d OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	240	27016,8	0,125	2	2	2
A0A0V0G587	Putative puromycin-sensitive aminopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	894	103770,4	0,0324	2	2	2
A0A0V0G4Z6	Superoxide dismutase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	216	24464,2	0,1898	2	2	2
A0A0V0G2J4	ATP synthase subunit alpha OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	551	59537,4	0,0363	2	2	2
A0A0V0G4X5	Putative vesicle coat complex copii subunit sec13 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	287	32019,5	0,1324	2	2	2
A0A0V0G4N2	Putative thioredoxin and glutathione reductase selenoprotein OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	594	65153,9	0,0741	2	2	2
A0A0V0G5R2	Putative ras-related small gtpase rho type OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	193	21730,3	0,1192	2	2	2
A0A0V0G532	Putative leucine-rich acidic nuclear protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	255	29111,9	0,1216	2	2	2
A0A0V0G6I8	Putative succinyl-coa synthetase alpha subunit (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	325	34136,2	0,1015	2	2	2

Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G3H0	Putative serine--trna ligase cytoplasmic (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	476	54389,5	0,1008	2	2	2
A0A0V0G528	Putative methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	931	98890,3	0,0311	2	2	2
A0A0V0G7E1	Putative puromycin-sensitive aminopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	859	97298,8	0,014	2	2	2
A0A0V0G5S8	Putative farnesoic acid o-methyltransferase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	305	33269,4	0,0656	2	2	2
A0A0V0G4S4	Malate dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	330	35948,6	0,0788	2	2	2
A0A0V0G5I9	Putative gdp-mannose pyrophosphorylase/mannose-1-phosphate guanylyltransferase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	423	46572,9	0,1324	2	2	2
A0A0V0G2T0	Putative electron transfer flavoprotein alpha subunit OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	330	34420,3	0,0818	2	2	2
A0A0V0G0CQ3	Putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit c OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	389	44713,9	0,1542	2	2	2
A0A0V0G2Z1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	154	15939,9	0,0844	2	2	2
A0A0V0G549	Putative cytosolic juvenile hormone binding protein 36 kDa subunit (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	289	33129,5	0,1003	2	2	2
A0A0V0GAJ0	Putative nitrophorin OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	207	23612	0,1304	2	2	2
A0A0V0G4X4	S-formylglutathione hydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	286	31623,4	0,1294	2	2	2
A0A0V0GEG6	Calponin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	167	18844,6	0,1796	2	2	2
A0A0V0G752	Uroporphyrinogen decarboxylase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	355	39904,8	0,0592	1	1	2
A0A0V0G954	Putative formyltetrahydrofolate dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	494	53721,1	0,0628	1	1	2
A0A0V0G6M8	Putative rna-binding protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	182	20465,7	0,1044	1	1	2
A0A0V0G413	Tyrosine--trna ligase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	524	58487,5	0,0458	1	1	2
A0A0V0G5P2	Putative mevalonate pyrophosphate decarboxylase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	333	36958,7	0,0721	1	1	2
A0A0V0G5L3	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	208	21576,1	0,0962	1	1	2
A0A0V0G4T1	Proteasome subunit alpha type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	246	27368,7	0,0813	1	1	2
D1MWD9	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	202	23332,7	0,0594	1	1	2
A0A0V0G4H2	Putative prokaryotic long-chain fatty acid coa synthetase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	569	62403,6	0,0404	1	1	2
A0A0V0G4Q1	Putative transglutaminase/protease-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	694	78530,6	0,0216	1	1	2
A0A0V0G493	Putative rab subfamily protein of small gtpase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	202	22656,5	0,0842	1	1	2
A0A0V0G462	Putative 26s protease regulatory subunit 6b-like protein OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	415	47007,2	0,0795	1	1	2

Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Uniq ue Pepti des	Sequ ence Coun t	Spect rum Coun t
A0A0V0G5F1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	500	53840,3	0,034	1	1	2
A0A0V0G437	Putative dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	235	25465,1	0,0936	1	1	2
A0A0V0GBE7	Putative ras-related gtpase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	184	20839,7	0,0652	1	1	1
A0A0V0G2F9	NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	682	77158,7	0,022	1	1	1
A0A0V0G3R0	Putative phosphatidylethanolamine-binding protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	177	19962,1	0,0791	1	1	1
A0A0V0G6L7	Putative palmitoyl protein thioesterase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	300	34612,4	0,0733	1	1	1
A0A0V0G500	Putative rna polymerase ii transcriptional coactivator OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	113	12974,6	0,0885	1	1	1
A0A0V0G579	Putative cytidine deaminase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	139	15347,5	0,223	1	1	1
A0A0V0G9F0	Putative pyridoxine OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	227	25563,6	0,163	1	1	1
A0A0V0G7A3	Putative fed tick salivary protein 8 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	226	26127,6	0,1283	1	1	1
A0A0V0G5Z5	ATP-citrate synthase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	1084	119650,3	0,0194	1	1	1
A0A0V0G438	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	384	43474,8	0,0312	1	1	1
A0A0V0G7B3	Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2-17 kDa (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	156	17701,2	0,1282	1	1	1
A0A0V0G2X8	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	525	55949,7	0,0267	1	1	1
A0A0V0G4D7	Putative programmed cell death protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	843	93737,7	0,0439	1	1	1
A0A0V0GA53	Putative diamine acetyltransferase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	167	19521,9	0,0778	1	1	1
A0A0V0G3X9	Putative hydroxyacyl-coa dehydrogenase/enoyl-coa hydratase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	763	82058,5	0,0236	1	1	1
A0A0V0GB59	Putative f-actin capping protein beta subunit OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	275	30823,3	0,0909	1	1	1
A0A0V0G4P6	Annexin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	323	35728,4	0,0743	1	1	1
A0A0V0G4B4	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit rpn11 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	311	34570,6	0,1125	1	1	1
A0A0V0G981	Putative aldo/keto reductase family OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	318	36160,6	0,0786	1	1	1
A0A0V0G580	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	326	37245,6	0,0583	1	1	1
A0A0V0GEU9	Putative ubiquitin-protein ligase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	145	16712,8	0,1517	1	1	1
A0A0V0G4B1	Anion exchange protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	1122	125549	0,0232	1	1	1
A0A0V0G589	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	884	102501,6	0,0181	1	1	1



Identificação	Descrição	Lenght	Mol/Wt	Cobertura	#Uniq Peptides	Sequ ence Coun t	Spect rum Coun t
A0A0V0G4M4	Putative thioredoxin and glutathione reductase selenoprotein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	509	55244,2	0,0413	1	1	1
A0A0V0G803	Putative selenoprotein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	160	18351,2	0,0688	1	1	1
A0A0V0G642	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit rpn7/psmd6 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	375	42870,8	0,0693	1	1	1
A0A0V0G6D0	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	324	36197,4	0,0494	1	1	1
A0A0V0G5X6	Putative vacuolar protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	296	32188,9	0,0811	1	1	1
A0A0V0G7H5	Putative 5'-phosphoribosylglycinamide formyltransferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	999	107417,7	0,027	1	1	1
A0A0V0GBK7	Putative dual-specificity protein kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	413	45174,8	0,0363	1	1	1
A0A0V0G5H8	Putative phosphoenolpyruvate carboxykinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	600	66903,7	0,0267	1	1	1
A0A0V0G8D7	Adenylyl cyclase-associated protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	490	53066	0,0224	1	1	1
A0A0V0G4I9	Putative pterin carbinolamine dehydratase pcbd/dimerization cofactor of hnf1 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	135	15422,2	0,1333	1	1	1
A0A0V0G3D1	Putative glycine--trna ligase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	700	78556,1	0,0286	1	1	1
A0A0V0G368	T-complex protein 1 subunit delta OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	532	57201,4	0,032	1	1	1
A0A0V0G778	Putative sulfotransferase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	336	39878,3	0,0476	1	1	1
A0A0V0G376	Proteasome subunit alpha type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	250	27966,6	0,088	1	1	1
A0A0V0GCM8	Putative kazal-type inhibitor (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	179	19648,5	0,1732	1	1	1
A0A0V0G306	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	204	22415,4	0,0588	1	1	1
A0A0V0G801	Putative diadenosine and diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	138	16233,2	0,087	1	1	1
A0A0V0G3L7	Putative vesicle coat complex copi beta subunit (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	970	107706,6	0,0113	1	1	1
A0A0V0G3A1	Putative chloride intracellular channel exc-4 isoform x2 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	258	29674	0,0891	1	1	1
A0A0V0G522	Putative galactokinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	442	48645,6	0,0362	1	1	1
A0A0V0G3U5	Putative chaperonin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	549	59821,7	0,0528	1	1	1
D1MWF2	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	181	21206	0,0718	1	1	1
A0A0V0G4Q9	Putative purine nucleoside phosphorylase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	299	33141,7	0,097	1	1	1
A0A0V0G300	Putative eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 x-linked OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	470	50755,1	0,0426	1	1	1
A0A0V0G2H6	Putative triabin-like lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	169	19481,2	0,0888	1	1	1

<b>Identificação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Lenght</b>	<b>Mol/Wt</b>	<b>Cobertura</b>	<b>#Uniq ue Pepti des</b>	<b>Sequ ence Coun t</b>	<b>Spect rum Coun t</b>
A0A0V0G4L0	Putative aromatic-l-amino-acid/l-histidine decarboxylase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	476	53777,2	0,0294	1	1	1
A0A0V0G4J2	Putative f-actin capping protein alpha subunit OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	287	33039,5	0,0767	1	1	1
A0A0V0GA07	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	320	35449,9	0,0781	1	1	1
A0A0V0G9H1	Malic enzyme (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	555	61742,5	0,0468	1	1	1
A0A0V0G783	Putative vesicle coat complex copii subunit sec23 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	765	86109,7	0,034	1	1	1
A0A0V0G7N2	Methylthioribose-1-phosphate isomerase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	360	39369,5	0,0639	1	1	1
A0A0V0GB10	Putative camp-dependent protein kinase types i and ii regulatory subunit (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	373	42632,5	0,0456	1	1	1
A0A0V0G4K8	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	274	30799,1	0,0511	1	1	1
A0A0V0G3U7	Putative peroxisomal 3-ketoacyl-coa-thiolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	542	59182,8	0,0387	1	1	1
A0A0V0G3H2	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	228	24477	0,0965	1	1	1
A0A0V0G7Z5	Putative phosphatidylinositol transfer protein sec14 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	288	33841,6	0,0486	1	1	1

**Tabela suplementar 2.** Proteínas salivares putativas de *T. dimidiata* identificadas na amostra coletada 10 dias após a alimentação

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequência Count	Spectrum Count
A0A0V0GDS7	Putative hexamerin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	624	72775,9	0,1699	11	11	33
A0A0V0G2G2	Putative serpin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	393	44105,1	0,1069	5	5	13
A0A0V0G481	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	346	36748,3	0,3064	7	7	10
A0A0V0G2F9	NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	682	77158,7	0,0367	2	2	3
A0A0V0G5E2	Putative 20s proteasome regulatory subunit beta type psmb2/pre1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	197	22602,1	0,2335	2	2	2
A0A0V0G440	Putative hydroxyacylglutathione hydrolase mitochondrial OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	296	32496,4	0,0743	1	1	3
A0A0V0G2Q8	Putative arylalkylamine n-acetyltransferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	223	24911,4	0,2018	3	3	15
A0A0V0G5V0	Putative inorganic pyrophosphatase/nucleosome remodeling factor subunit nurf38 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	288	32934,4	0,0972	1	1	6
A0A0V0G3L4	Putative basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	2292	253391,1	0,1178	17	17	61
A0A0V0G5R3	Putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit a OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	613	67674,5	0,2594	11	11	34
A0A0V0G546	Putative metalloexopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	478	53441,4	0,4623	14	14	42
A0A0V0G7D5	Glucosamine-6-phosphate isomerase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	268	30438,6	0,1567	2	2	4
A0A0V0G2G7	Putative triabin lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	169	19179,3	0,3373	7	7	23
A0A0V0G2W0	Putative fumarase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	465	50216,1	0,0452	2	2	7
A0A0V0G6L7	Putative palmitoyl protein thioesterase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	300	34612,4	0,0733	1	1	2
A0A0V0G2U3	Putative peroxiredoxin posttranslational modification (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	151	16133,3	0,3775	5	5	9
A0A0V0G2S8	Putative cd73 ecto-5'-nucleotidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	425	47349,3	0,1529	5	5	14
A0A0V0G808	Putative parvulin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	124	13655,1	0,0968	1	1	2
A0A0V0GBR6	Putative small heat shock protein OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	186	21420,1	0,2527	3	3	5
A0A0V0GFI2	Putative secreted protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	144	15617,8	0,0903	1	1	2
D1MWD8	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	203	23343,9	0,064	3	3	10

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G3R9	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	380	42540,6	0,0711	2	2	3
A0A0V0G5G2	Putative glutaminyl cyclase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	342	38924,1	0,1345	3	3	12
A0A0V0G5W9	Citrate synthase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	470	51881,8	0,0511	2	2	3
A0A0V0G500	Putative rna polymerase ii transcriptional coactivator OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	113	12974,6	0,2035	2	2	5
A0A0V0GAF6	Putative oxysterol-binding protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	749	85679,9	0,0721	3	3	6
A0A0V0G752	Uroporphyrinogen decarboxylase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	355	39904,8	0,0592	2	2	2
A0A0V0G5A7	Putative alpha-ketoacid-coa transferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	462	49473,7	0,2359	6	6	13
A0A0V0G415	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit rpn2/psmd1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	891	98695,7	0,0404	2	2	7
A0A0V0G5P9	Putative 26s proteasome regulatory complex atpase rpt6 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	400	45097,7	0,035	1	1	2
A0A0V0G428	Transgelin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	165	18164,3	0,1758	3	3	10
A0A0V0G3S9	Putative tomosyn OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	1054	114539,1	0,0275	1	1	2
A0A0V0G337	Putative ubiquitin regulatory protein ubxd2 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	545	61126	0,0239	2	2	4
A0A0V0G5E8	Putative hsp90 co-chaperone p23 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	174	19598,4	0,0575	1	1	3
A0A0V0GBH9	Putative thioredoxin peroxidase 1 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	219	24674,3	0,1142	1	1	3
A0A0V0G5Z5	ATP-citrate synthase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	1084	119650,3	0,0194	1	1	2
A0A0V0G2I5	Putative tubulin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	447	50180,2	0,5996	16	16	54
A0A0V0G2W3	Catalase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	504	56757,4	0,2917	12	12	31
A0A0V0G916	Putative glycosyl transferase family 8 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	607	62457	0,1334	5	5	15
A0A0V0G3V2	Pyruvate kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	536	58344,4	0,1381	7	7	11
A0A0V0G438	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	384	43474,8	0,0781	2	2	3
A0A0V0G561	Putative ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	1049	116919,9	0,1268	9	9	12
A0A0V0G4P0	Putative prolyl endopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	706	79699,6	0,068	3	3	9
A0A0V0G2R0	Putative transitional endoplasmic reticulum atpase ter94 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	803	89228,4	0,1009	6	6	10

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G386	Putative actin-2 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	376	41740,8	0,2527	7	7	25
A0A0V0G7B3	Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2-17 kDa (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	156	17701,2	0,25	2	2	5
A0A0V0G4T6	Ubiquitin-fold modifier 1 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	88	9360	0,3977	2	2	3
A0A0V0G6J0	Putative rab subfamily protein of small gtpase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	213	23268,8	0,1174	2	2	5
A0A0V0G3A8	Putative ubiquitin-conjugating enzyme OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	147	16649,4	0,1973	3	3	7
A0A0V0G6L2	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	382	41280,4	0,0471	2	2	2
D1MWC6	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	196	22209,2	0,1173	8	8	25
A0A0V0G3R1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	220	23688,4	0,6	23	23	239
A0A0V0G9R6	Putative adaptor protein enigma OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	467	51734,2	0,0771	2	2	13
A0A0V0G435	Putative ca2+-binding actin-bundling protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	2414	278257,5	0,0389	5	5	7
A0A0V0G3B8	Putative aminopeptidase npepl1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	509	54718,8	0,053	2	2	3
A0A0V0G6M2	Putative proteasome assembly chaperone 1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	260	29834,8	0,0692	1	1	3
A0A0V0G7P2	Putative carboxypeptidase inhibitor smci (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	1219	136988,8	0,0812	4	4	15
A0A0V0G702	Putative carbonic anhydrase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	271	30253,8	0,203	3	3	9
A0A0V0G6K0	Putative transglutaminase/protease-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	691	78212	0,0941	4	4	7
A0A0V0G571	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	277	30332,4	0,0542	1	1	1
A0A0V0G4J5	Putative uridylate kinase/adenylate kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	204	22402,5	0,201	3	3	6
A0A0V0G5N1	Aconitate hydratase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	892	97720,4	0,0291	3	3	3
A0A0V0G3D5	Putative spectrin beta chain-like protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	2439	281049,6	0,0074	3	3	7
A0A0V0G5S0	Putative metallopeptidase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	386	43020,2	0,044	1	1	2
A0A0V0GBK2	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	233	25234,7	0,103	1	1	1
A0A0V0G1Y5	Putative salivary lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	155	17617,9	0,8129	29	29	417
A0A0V0G780	Putative niemann-pick type c2 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	147	16655,2	0,2313	3	3	10

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G2A1	Putative trypsin-like protease (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	277	30777,9	0,5704	32	32	133
A0A0V0G3E5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	333	35775,2	0,3814	8	8	24
A0A0V0G4R0	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	1177	136754,7	0,0212	2	2	4
A0A0V0G4G1	Putative calmodulin OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	149	16781,8	0,2953	3	3	13
A0A0V0G2M9	Putative fatty acid-binding protein fabp OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	134	15211,9	0,5149	12	12	33
A0A0V0G2X6	Putative cytochrome c OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	108	11813,2	0,2685	3	3	10
A0A0V0G954	Putative formyltetrahydrofolate dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	494	53721,1	0,0628	1	1	3
A0A0V0G2X8	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	525	55949,7	0,0267	1	1	2
A0A0V0G2N7	Putative angiotensin i-converting enzyme (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	430	49852	0,3302	12	12	39
A0A0V0G5S6	Putative chaperonin 10 kd subunit (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	103	11166,1	0,2621	2	2	5
A0A0V0G5Y3	Putative dihydropteridine reductase dhpr/qdpr OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	235	25361,2	0,3277	4	4	7
A0A0V0G3R2	Putative acyl-coa binding protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	89	10043	0,2022	1	1	1
D1MXA8	Similar to trypsin, clone: L2E3 OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	134	14356	0,4179	5	5	141
A0A0V0G4Q6	Putative puromycin-sensitive aminopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	880	100660,2	0,0648	5	5	12
A0A0V0G9W4	Putative peroxiredoxin posttranslational modification (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	217	24289,4	0,1382	2	2	5
A0A0V0G981	Putative aldo/keto reductase family OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	318	36160,6	0,1164	2	2	8
A0A0V0G917	Putative phosphatidylinositol transfer protein sec14 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	311	36404,1	0,0547	1	1	1
A0A0V0G5C8	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	1710	187841,4	0,0123	1	1	1
A0A0V0G531	Putative proteasome beta type-1 subunit OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	215	23640,8	0,0651	1	1	3
A0A0V0G2Z6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	141	15258,6	0,2979	3	3	6
A0A0V0G8A2	Putative gdp dissociation inhibitor OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	442	49838,2	0,2602	7	7	18
A0A0V0G6Y0	Putative tubulin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	450	50055,6	0,3622	14	14	35

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G3F6	Putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit b (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	495	54925,1	0,1333	4	4	10
A0A0V0G426	Putative heat shock 70 kDa protein cognate 2 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	628	68645,1	0,1465	9	9	29
A0A0V0GD03	Putative acyl-coa-binding protein 5 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	87	9907,2	0,3793	2	2	8
A0A0V0G4R6	Putative vesicle coat complex copii subunit sec31 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	1027	112404,1	0,0419	3	3	6
A0A0V0G8V3	Putative lysophospholipase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	202	21648	0,1584	2	2	6
A0A0V0G4C4	Putative delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase mitochondrial OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	569	63318,9	0,0351	1	1	2
A0A0V0GEU9	Putative ubiquitin-protein ligase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	145	16712,8	0,1517	1	1	1
A0A0V0G2Y0	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	118	12529,1	0,1864	1	1	3
A0A0V0G4C1	Putative transketolase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	612	66296	0,2092	8	8	20
A0A0V0GAP3	Aminomethyltransferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	386	42483,8	0,2591	6	6	22
A0A0V0G3X1	Proteasome subunit alpha type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	234	25836,1	0,2265	3	3	8
A0A0V0G6V7	Putative fumarylacetoacetase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	411	45426,7	0,1606	5	5	8
A0A0V0G436	V-type proton ATPase subunit F OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	123	13758	0,3252	2	2	3
A0A0V0G8Y8	Putative sugar phosphatase had superfamily protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	276	31061	0,0688	1	1	1
A0A0V0G3D9	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	464	53146,6	0,1552	5	5	9
A0A0V0G2E8	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	175	20138,6	0,2114	4	4	23
A0A0V0G4A7	Profilin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	126	13762,1	0,4048	3	3	12
A0A0V0G4F2	Putative acetyl-coa hydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	482	52356,6	0,1037	5	5	7
A0A0V0G537	Putative sulfotransferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	315	37043,1	0,2159	5	5	14
A0A0V0G642	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit rpn7/psmd6 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	375	42870,8	0,0427	1	1	4
A0A0V0G3Z1	Putative 3-oxoacyl coa thiolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	411	43056,3	0,0925	2	2	5
A0A0V0GB32	Putative prophenoloxidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	687	79507,9	0,2271	10	10	24
A0A0V0G474	Putative s10e ribosomal protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	158	18168,4	0,0823	1	1	2

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G5K7	Putative ca <sup>2+</sup> -binding actin-bundling protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	890	102994,1	0,0382	2	2	2
A0A0V0G766	Putative casein kinase substrate phosphoprotein pp28 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	184	20875,6	0,0815	1	1	3
A0A0V0G6D0	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	324	36197,4	0,0864	2	2	6
A0A0V0G5X6	Putative vacuolar protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	296	32188,9	0,0811	1	1	2
A0A0V0G652	Glutathione synthetase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	432	50411,9	0,0787	2	2	3
A0A0V0G3P4	Putative 60 kDa heat shock protein mitochondrial OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	571	60737	0,1401	6	6	16
A0A0V0GAP9	Vacuolar protein sorting-associated protein 29 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	182	20476,5	0,0714	1	1	3
A0A0V0G823	Putative dihydroorotase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	466	50566,5	0,0494	1	1	4
A0A0V0G6U9	Putative cysteine--trna ligase cytoplasmic OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	720	82605	0,0222	1	1	1
A0A0V0G3F9	Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	153	17483,8	0,1699	2	2	6
A0A0V0G314	Putative 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase mitochondrial OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	292	31265,9	0,2329	4	4	9
A0A0V0G2G8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	190	22077,1	0,1053	6	6	21
A0A0V0G2Y3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	204	22263,7	0,5784	13	13	99
A0A0V0G4I9	Putative pterin carbinolamine dehydratase pcbd/dimerization cofactor of hnf1 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	135	15422,2	0,2296	3	3	6
A0A0V0GDV4	Putative glutathione s-transferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	206	24063,6	0,1311	2	2	6
A0A0V0G3B6	Putative 26s proteasome regulatory complex subunit rpn1/psmd2 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	891	98321	0,0842	4	4	5
A0A0V0GBZ5	Putative dipeptidase amino acid transport and metabolism (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	386	42572,8	0,1166	3	3	4
A0A0V0G4E8	Protein kinase c inhibitor (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	127	13867,3	0,3543	2	2	4
A0A0V0G7G9	Putative methylthioadenosine phosphorylase mtap OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	276	30264,8	0,1775	4	4	8
A0A0V0G404	Annexin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	321	35290,6	0,19	4	4	5
A0A0V0GBK7	Putative dual-specificity protein kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	413	45174,8	0,0387	1	1	1
A0A0V0G662	Putative pyridoxal/pyridoxine/pyridoxamine kinase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	299	32692,2	0,1371	2	2	3
A0A0V0G5K	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	238	26231,4	0,0798	1	1	2



Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
2							
A0A0V0G4J9	Putative salivary secreted kazaltype proteinase inhibitor OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	83	9357,3	0,2169	11	11	57
A0A0V0G2U7	Aspartate aminotransferase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	413	46337,5	0,2034	7	7	14
A0A0V0G3G9	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	555	62796,3	0,2577	9	9	24
A0A0V0G5S4	Phosphoglycerate kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	428	46377,1	0,2921	11	11	20
A0A0V0G3S4	Putative gnl-cdd-187611 cd05353 hydroxyacyl-coa-like dh sdr c-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	717	77909	0,3515	17	17	40
A0A0V0GA46	Putative heat shock protein 83 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	728	83586,2	0,1016	7	7	18
D1MWE4	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	195	22598	0,1795	4	4	14
A0A0V0G7A9	Putative transglutaminase/protease-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	685	77610	0,035	2	2	5
A0A0V0G6C1	Putative pyridoxal 5-phosphate OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	251	28302,3	0,0797	2	2	6
A0A0V0G6W9	Putative wd40 repeat stress protein/actin OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	602	66228,2	0,0781	2	2	7
A0A0V0G8U1	Thymidine phosphorylase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	437	46664,1	0,0503	1	1	3
A0A0V0G552	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	258	28694,4	0,3101	4	4	13
A0A0V0G3Z2	Putative enoyl-coa isomerase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	279	30768,7	0,1505	3	3	3
A0A0V0GC21	Putative tumor necrosis factor (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	321	36796,1	0,0779	2	2	5
A0A0V0G3V3	Putative chaperonin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	540	58780,5	0,1667	5	5	13
A0A0V0G778	Putative sulfotransferase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	336	39878,3	0,0506	1	1	1
A0A0V0G4Y6	Putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit d OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	240	27016,8	0,0792	3	3	3
A0A0V0G2W9	Putative hydrolase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	226	25178,3	0,4912	9	9	27
A0A0V0G1Z1	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	228	25954,3	0,307	8	8	29
A0A0V0G368	T-complex protein 1 subunit delta OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	532	57201,4	0,0771	5	5	9
A0A0V0G4C2	Putative peroxiredoxin posttranslational modification (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	234	26307,7	0,0897	1	1	6
A0A0V0G4A8	Putative actin-depolymerizing factor 1 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	148	16940,4	0,4932	8	8	20

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G3W3	Putative nadp-dependent isocitrate dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	397	44951,9	0,3199	11	11	30
A0A0V0G5W2	Putative phosphoglucomutase/phosphomannomutase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	553	60931	0,0868	3	3	5
A0A0V0G373	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	228	25412,7	0,6009	8	8	20
A0A0V0G4K4	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	230	25891,2	0,187	2	2	10
A0A0V0G4Q3	Putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit h OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	479	55148,7	0,0564	2	2	3
A0A0V0G376	Proteasome subunit alpha type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	250	27966,6	0,06	2	2	6
D1MX91	Similar to biogenic amine-binding protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	206	23344,9	0,0534	1	1	3
D1MWC5	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	221	22966,1	0,2172	4	4	19
A0A0V0G4Z6	Superoxide dismutase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	216	24464,2	0,0602	1	1	3
A0A0V0G413	Tyrosine--tRNA ligase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	524	58487,5	0,1031	3	3	3
A0A0V0G3J5	Putative inositol polyphosphate 5-phosphatase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	315	36118,8	0,7048	44	44	344
A0A0V0G3L0	Putative transcriptional regulator dj-1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	219	23492,3	0,4612	9	9	19
A0A0V0G5L3	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	208	21576,1	0,2933	4	4	15
A0A0V0G5P2	Putative mevalonate pyrophosphate decarboxylase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	333	36958,7	0,0991	2	2	4
A0A0V0G4X5	Putative vesicle coat complex copii subunit sec13 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	287	32019,5	0,0801	1	1	1
A0A0V0G350	Putative heat shock 70 kDa protein cognate 5 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	637	69851,3	0,044	2	2	4
A0A0V0G801	Putative diadenosine and diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	138	16233,2	0,1957	2	2	5
A0A0V0GBC6	Putative gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase gilt (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	186	20902,5	0,1183	1	1	1
A0A0V0G671	Putative molecular co-chaperone sti1 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	542	61046,3	0,0369	1	1	3
A0A0V0G1Y6	Putative triabin lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	155	17712	0,5226	13	13	131
A0A0V0G306	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	204	22415,4	0,1569	4	4	7
A0A0V0G2R7	Putative mucin-2 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	3651	406749,4	0,1569	36	36	111
A0A0V0G4D6	Putative methylmalonate semialdehyde dehydrogenase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	523	56373,9	0,153	5	5	7

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G3Q3	Putative inactive protein kinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	238	26007,4	0,3487	7	7	22
A0A0V0G2M6	Putative salivary secreted protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	169	18883,6	0,1183	2	2	3
A0A0V0G4T1	Proteasome subunit alpha type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	246	27368,7	0,2561	4	4	12
A0A0V0G4W9	Putative fumarylacetoacetate hydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	335	37225	0,0925	2	2	5
A0A0V0G3A1	Putative chloride intracellular channel exc-4 isoform x2 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	258	29674	0,0465	2	2	3
A0A0V0G5Q2	Putative salivary lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	192	22013,9	0,2448	5	5	11
A0A0V0G5V8	Putative delta-aminolevulinic acid dehydratase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	332	36567,5	0,1416	4	4	9
A0A0V0G479	Putative phosphoinositide 3-kinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	772	86575,3	0,0181	1	1	2
A0A0V0G2N6	Putative triabin lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	164	18350	0,4268	8	8	85
A0A0V0G0D8	Putative lysozyme (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	122	13951	0,4098	3	3	7
A0A0V0G3R8	T-complex protein 1 subunit gamma (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	542	60157,7	0,1218	4	4	14
A0A0V0G345	Putative enolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	432	47164,2	0,2523	9	9	24
D1MWE2	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	180	20280,2	0,0944	2	2	9
A0A0V0G4L8	Putative chaperonin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	542	59281	0,1458	5	5	12
A0A0V0G611	Putative secreted protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	136	14945	0,2426	2	2	5
A0A0V0G6H8	Putative nuclear envelope protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	566	65148,2	0,0371	1	1	4
A0A0V0G4U1	Putative vesicle coat complex copI gamma subunit (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	883	97581,1	0,0283	1	1	1
A0A0V0G4E6	Putative thioredoxin-like protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	287	32200,2	0,0592	1	1	1
A0A0V0G578	Putative muscle lim protein mlp84b OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	453	48530,4	0,1876	7	7	23
A0A0V0G522	Putative galactokinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	442	48645,6	0,0362	1	1	4
A0A0V0G4P9	Putative prosaposin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	817	91753,9	0,0171	3	3	7
A0A0V0G8U2	Putative salivary secreted protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	531	61822,4	0,1073	6	6	13
A0A0V0G6I8	Putative succinyl-coa synthetase alpha subunit (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	325	34136,2	0,0492	1	1	5

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G7Q5	Putative prophenoloxidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	716	81907	0,1369	5	5	11
A0A0V0G3Y4	Small ubiquitin-related modifier OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	94	10559,2	0,1277	1	1	3
A0A0V0G3U5	Putative chaperonin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	549	59821,7	0,0455	3	3	7
A0A0V0G3S8	Proteasome subunit alpha type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	246	27338,9	0,0528	1	1	2
A0A0V0G3N9	Malate dehydrogenase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	341	35941,2	0,4985	9	9	18
A0A0V0G4H2	Putative prokaryotic long-chain fatty acid coa synthetase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	569	62403,6	0,0281	2	2	4
D1MWC4	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	214	24199,1	0,0561	3	3	42
A0A0V0G5A6	Putative medium subunit of clathrin adaptor complex OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	512	57181,6	0,0938	3	3	7
D1MWF2	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	181	21206	0,1381	2	2	6
A0A0V0GAH2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	355	39158,6	0,0338	1	1	3
A0A0V0G555	Putative aicar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	591	64767,5	0,0525	3	3	5
A0A0V0G532	Putative leucine-rich acidic nuclear protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	255	29111,9	0,1255	2	2	8
A0A0V0G3K6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	198	22470,1	0,5253	19	19	89
A0A0V0G4N8	Putative aminopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	465	50380,2	0,2237	7	7	16
A0A0V0G2H6	Putative triabin-like lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	169	19481,2	0,1598	3	3	6
A0A0V0G3H0	Putative serine--trna ligase cytoplasmic (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	476	54389,5	0,1197	3	3	6
A0A0V0G2H8	Putative salivary lipocalin 4 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	165	18212,8	0,5939	18	18	95
A0A0V0G7E1	Putative puromycin-sensitive aminopeptidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	859	97298,8	0,0279	1	1	1
A0A0V0G575	Glutathione peroxidase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	168	19119,6	0,1012	1	1	5
A0A0V0G4J2	Putative f-actin capping protein alpha subunit OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	287	33039,5	0,1359	2	2	4
A0A0V0G2P4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	153	16415,9	0,3791	4	4	12
A0A0V0G4L0	Putative aromatic-l-amino-acid/l-histidine decarboxylase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	476	53777,2	0,063	1	1	3
A0A0V0G666	Putative titin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	1430	168821,	0,0133	1	1	1

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
			1				
A0A0V0G3W5	Putative k-similarity type rna binding protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	537	56703,4	0,0317	1	1	1
A0A0V0G5P5	Putative phosphoglycerate mutase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	255	28960,5	0,1216	3	3	8
A0A0V0G9H1	Malic enzyme (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	555	61742,5	0,1171	4	4	8
A0A0V0G4R4	Putative microtubule-associated protein futsch (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	574	64015,1	0,0819	7	7	18
A0A0V0G2X2	Putative salivary lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	175	20030,1	0,2629	4	4	18
D1MWC7	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	199	23002,4	0,0603	3	3	11
A0A0V0G4M0	Putative carbonic anhydrase-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	260	29686,8	0,1654	6	6	17
A0A0V0G4H8	Phosphotransferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	441	49139,1	0,034	1	1	5
A0A0V0G5S8	Putative farnesoic acid o-methyltransferase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	305	33269,4	0,0656	1	1	2
A0A0V0G4Q1	Putative transglutaminase/protease-like protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	694	78530,6	0,0432	3	3	4
A0A0V0G4S4	Malate dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	330	35948,6	0,1303	3	3	6
A0A0V0G658	Putative rho gdp-dissociation inhibitor OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	207	23521	0,0821	2	2	6
A0A0V0G3V6	Putative fructose-16-bisphosphatase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	344	37657,2	0,2965	6	6	8
A0A0V0GDQ1	Putative trypsin-like serine protease (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	195	21394,8	0,0923	1	1	3
A0A0V0G4R1	Putative myosin regulatory light chain 2-like protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	204	22308,2	0,1422	2	2	7
A0A0V0G7R6	Serine/threonine-protein phosphatase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	309	35477,3	0,068	1	1	2
A0A0V0G5Y7	Putative chaperonin subunit 6a zeta OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	534	58389,5	0,1798	5	5	12
D1MWB9	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	167	18630,1	0,1078	5	5	15
A0A0V0GC63	Putative serine protease inhibitor dipetalogastin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	333	36692,9	0,1622	4	4	13
A0A0V0G2N3	Putative 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	185	20482,6	0,5081	8	8	21
A0A0V0G5D1	Putative short-chain dehydrogenase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	251	26769	0,0518	1	1	2

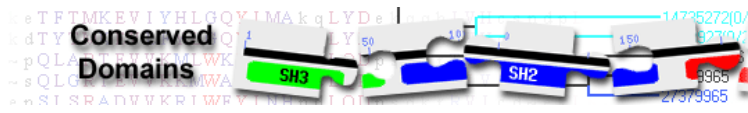
Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0G525	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	109	11776,9	0,2752	2	2	6
A0A0V0G431	Putative serine/threonine-protein kinase kinx OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	406	43533,5	0,0936	4	4	10
A0A0V0G383	Putative death-associated protein 1 dap-1 OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	105	11394,7	0,1143	1	1	3
A0A0V0G452	Putative secreted protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	175	20126,6	0,08	1	1	2
A0A0V0G3P6	Thioredoxin OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	105	11697	0,3143	2	2	6
A0A0V0G7Q8	Putative myotrophin OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	116	12584,5	0,2069	1	1	3
A0A0V0G4K8	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	274	30799,1	0,0511	1	1	4
A0A0V0G5I9	Putative gdp-mannose pyrophosphorylase/mannose-1-phosphate guanylyltransferase OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	423	46572,9	0,0307	2	2	3
A0A0V0G398	Putative pfkb family carbohydrate kinase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	343	38082,6	0,0671	1	1	3
A0A0V0G4W2	Putative elongation factor 1-gamma OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	425	48442,3	0,24	8	8	26
A0A0V0G2H3	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	194	22107,9	0,3093	8	8	26
A0A0V0G6E2	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	206	22999,6	0,1117	2	2	6
A0A0V0G5V3	Putative small heat shock protein hsp20 family OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	191	21344,8	0,3665	5	5	10
A0A0V0G4X9	Putative aldo-keto reductase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	245	27531,3	0,298	4	4	8
A0A0V0G3U7	Putative peroxisomal 3-ketoacyl-coa-thiolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	542	59182,8	0,048	2	2	6
A0A0V0G357	Putative sulfotransferase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	332	38762,5	0,0331	1	1	3
A0A0V0G2W8	Glutamine synthetase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	362	40655,1	0,1243	6	6	19
A0A0V0G2Y1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	543	62392,1	0,0442	1	1	2
A0A0V0G573	Putative creatine kinase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	356	40080,2	0,4382	14	14	50
A0A0V0GAC3	Putative failed axon connections fax protein/glutathione s-transferase-like protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	377	43703,9	0,122	2	2	8
A0A0V0G4P2	Putative nucleotide excision repair factor nef2 rad23 component OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	334	36156	0,0479	1	1	3
D1MWD6	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	203	23648,5	0,064	2	2	5
A0A0V0G3H2	Proteasome subunit beta type OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	228	24477	0,0965	1	1	2

Identificação	Descrição	Length	Mol/Wt	Cobertura	#Unique Peptides	Sequence Count	Spectrum Count
A0A0V0GCQ3	Putative vacuolar h <sup>+</sup> -atpase v1 sector subunit c OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	389	44713,9	0,0694	1	1	3
A0A0V0G549	Putative cytosolic juvenile hormone binding protein 36 kDa subunit (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	289	33129,5	0,1972	5	5	14
D1MWC1	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	239	26799,2	0,1213	4	4	116
A0A0V0G9B9	Putative bisphosphate 3'-nucleotidase bpnt1/inositol polyphosphate 1-phosphatase (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	305	32561,9	0,2689	7	7	14
A0A0V0G7Z5	Putative phosphatidylinositol transfer protein sec14 (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	288	33841,6	0,1458	3	3	5
A0A0V0G2Z1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	154	15939,9	0,7403	8	8	41
A0A0V0GAJ0	Putative nitrophorin OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	207	23612	0,1981	2	2	3
A0A0V0G2P6	Putative xaa-pro dipeptidase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	502	55197,9	0,0558	1	1	4
A0A0V0G4X4	S-formylglutathione hydrolase OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	286	31623,4	0,2273	4	4	10
A0A0V0GEG6	Calponin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	167	18844,6	0,1796	2	2	5
D1MWC3	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	197	22193,8	0,2538	4	9	143
A0A0V0G2K3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	157	17537,4	0,5924	9	14	202
A0A0V0G4R2	Putative gtp-binding adp-ribosylation factor-like protein arl1 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	182	20674,6	0,3077	3	4	10
A0A0V0G5K3	Putative gtp-binding adp-ribosylation factor-like protein arl1 OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	180	20540,7	0,1444	1	2	4
A0A0V0G7I4	Putative multifunctional chaperone 14-3-3 family OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	254	28942,4	0,2047	4	5	10
A0A0V0G2Q7	Putative multifunctional chaperone 14-3-3 family OS=Triatoma dimidiata PE=3 SV=1	247	28134	0,2591	6	7	18
A0A0V0G4M9	Putative triabin OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	148	16617,2	0,5743	21	23	362
D1MWB8	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	178	19843,8	0,2191	2	10	88
D1MWF1	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	177	19772,6	0,2938	9	18	165
A0A0V0G2K7	Putative triabin lipocalin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	152	17213,4	0,4342	18	19	101
A0A0V0G4L1	Putative triabin (Fragment) OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	145	16417	0,4	11	12	90
D1MWB5	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	198	22506,7	0,5202	7	15	286
D1MWB7	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	197	22112,7	0,5228	25	34	346

<b>Identificação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Length</b>	<b>Mol/Wt</b>	<b>Cobertura</b>	<b>#Unique Peptides</b>	<b>Sequence Count</b>	<b>Spectrum Count</b>
A0A0V0G2V8	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=4 SV=1	198	22635,8	0,6818	20	33	447
D1MWB4	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	177	19795,8	0,1582	6	7	47
D1MWB2	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	177	19914,8	0,1808	5	6	43
D1MWB1	Uncharacterized protein OS=Triatoma dimidiata PE=2 SV=1	177	20010,9	0,1299	5	6	26



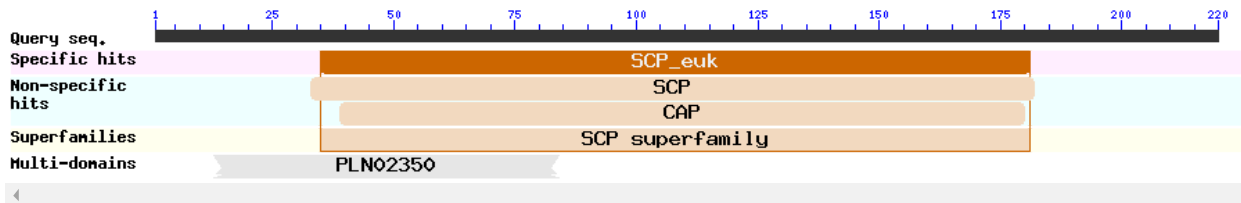
## **ANEXO 1**


[HOME](#) [SEARCH](#) [GUIDE](#)
[NewSearch](#)
[Structure Home](#)
[3D Macromolecular Structures](#)
[Conserved Domains](#)
[Pubchem](#)
[BioSystems](#)

## Conserved domains on [Ic|Query\_86212]

View [Standard Results](#) ?

RnSigg

**Graphical summary**  Zoom to residue level [show extra options](#) ?

 ?
 ?

### List of domain hits

Name	Accession	Description	Interval	E-value
SCP_euk	cd05380	SCP_euk: SCP-like extracellular protein domain, as found mainly in eukaryotes. This family ...	35-181	3.27e-48
SCP	smart00198	SCP / Tpx-1 / Ag5 / PR-1 / Sc7 family of extracellular domains; Human glioma ...	33-182	1.45e-44
CAP	pfam00188	Cysteine-rich secretory protein family; This is a large family of cysteine-rich secretory ...	39-180	8.20e-22
PLN02350	PLN02350	phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	13-84	4.81e-03

### Blast search parameters

**Data Source:** Live blast search RID = PRJW84XE01R

**User Options:** Database: CDSEARCH/cdd v3.14 Low complexity filter: no Composition Based Adjustment: yes E-value threshold: 0.01 Maximum number of hits: 500

### References:

- [Marchler-Bauer A et al. \(2015\), "CDD: NCBI's conserved domain database.", \*Nucleic Acids Res.\*43\(D\)222-6.](#)
- [Marchler-Bauer A et al. \(2011\), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", \*Nucleic Acids Res.\*39\(D\)225-9.](#)
- [Marchler-Bauer A et al. \(2009\), "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database.", \*Nucleic Acids Res.\*37\(D\)205-10.](#)
- [Marchler-Bauer A, Bryant SH \(2004\), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", \*Nucleic Acids Res.\*32\(W\)327-331.](#)

[Help](#) | [Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)  
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

## **ANEXO 2**



# TargetP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

---

```
### targetp v1.1 prediction results #####  
Number of query sequences: 1  
Cleavage site predictions included.  
Using NON-PLANT networks.
```

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
rf	220	0.023	0.923	0.065	S	1	19
-----							
cutoff		0.000	0.000	0.000			

**Explain the output. Go back.**

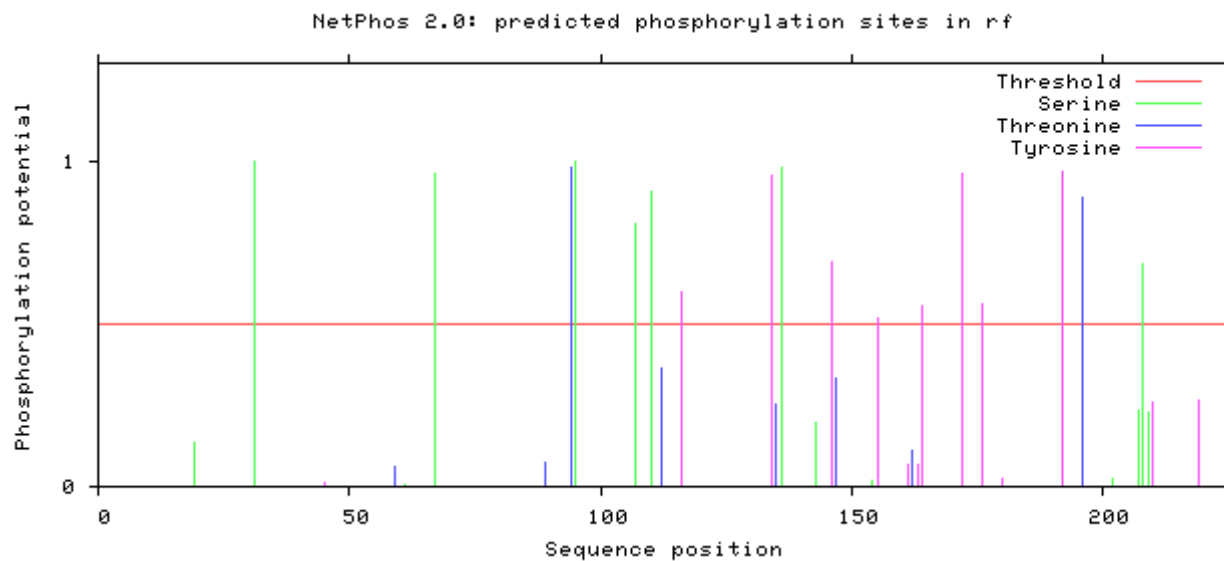
---

## **ANEXO 3**



rf	172	RKNGYVKLY	0.963	*Y*
rf	176	YVKLYVCNY	0.559	*Y*
rf	180	YVCNYGPAG	0.027	.
rf	192	GEPPYIEGT	0.966	*Y*
rf	210	PSSSYLGLC	0.259	.
rf	219	DFVDYG---	0.263	.

^



**Explain** the output. Go **back**.

## **ANEXO 4**





# BepiPred 1.0b Server - prediction results

Technical University of Denmark

```
##gff-version 2
##source-version bepiped-1.0b
##date 2016-06-22
##Type Protein rf
##Protein rf cat seq.1.fsa
##MHPFIQILLIALAIKCALSCQGGQVINREVSPEEQQLILDVHNRYPQAIALGKIRGQPTGSNMIEMSWDDELANMAQQWA
##DNCVFKHDTNIRRTSRRFPVGNLAISWSSPTPNKYGEAAEWAAQIRNWFNEVYTSNDIKKSGHYTQVWVGDSYLVGCG
##YTYKDKPRKNGYVKLYVCNYGPAGNVIGEPYIEGTPGCDRSDLKPSSSYLGCLDFVDYG
##end-Protein
# seqname          source          feature          start    end    score  N/A    ?
# -----
rf                  bepiped-1.0b  epitope          1        1    -0.951  . .    M|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope          2        2    -0.925  . .    H|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope          3        3    -1.289  . .    P|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope          4        4    -1.600  . .    F|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope          5        5    -1.847  . .    I|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope          6        6    -2.178  . .    Q|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope          7        7    -2.327  . .    I|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope          8        8    -2.633  . .    L|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope          9        9    -2.505  . .    L|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         10       10    -2.640  . .    I|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         11       11    -2.549  . .    A|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         12       12    -2.320  . .    L|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         13       13    -1.988  . .    A|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         14       14    -1.949  . .    I|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         15       15    -1.520  . .    K|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         16       16    -1.429  . .    C|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         17       17    -0.931  . .    A|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         18       18    -0.710  . .    L|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         19       19    -0.185  . .    S|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         20       20    -0.066  . .    C|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         21       21    -0.013  . .    Q|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         22       22    -0.172  . .    G|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         23       23     0.286  . .    G|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         24       24     0.269  . .    Q|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         25       25     0.472  . .    V|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         26       26     0.332  . .    I|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         27       27     0.437  . .    N|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         28       28     0.423  . .    R|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         29       29     0.633  . .    E|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         30       30     1.068  . .    V|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         31       31     1.440  . .    S|E
rf                  bepiped-1.0b  epitope         32       32     1.420  . .    P|E
rf                  bepiped-1.0b  epitope         33       33     1.059  . .    E|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         34       34     0.606  . .    E|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         35       35     0.215  . .    Q|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         36       36     0.023  . .    Q|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         37       37    -0.300  . .    L|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         38       38    -0.621  . .    I|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         39       39    -0.890  . .    L|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         40       40    -0.988  . .    D|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         41       41    -1.106  . .    V|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         42       42    -0.703  . .    H|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         43       43    -0.349  . .    N|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         44       44     0.020  . .    R|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         45       45    -0.288  . .    Y|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         46       46    -0.181  . .    R|.
rf                  bepiped-1.0b  epitope         47       47    -0.459  . .    Q|.
```

rf	bepipred-1.0b	epitope	48	48	-0.473	. .	A .
rf	bepipred-1.0b	epitope	49	49	-0.475	. .	I .
rf	bepipred-1.0b	epitope	50	50	-0.566	. .	A .
rf	bepipred-1.0b	epitope	51	51	-0.552	. .	L .
rf	bepipred-1.0b	epitope	52	52	-0.406	. .	G .
rf	bepipred-1.0b	epitope	53	53	-0.116	. .	K .
rf	bepipred-1.0b	epitope	54	54	0.382	. .	I .
rf	bepipred-1.0b	epitope	55	55	0.720	. .	R .
rf	bepipred-1.0b	epitope	56	56	1.291	. .	G .
rf	bepipred-1.0b	epitope	57	57	1.403	. .	Q E
rf	bepipred-1.0b	epitope	58	58	1.481	. .	P E
rf	bepipred-1.0b	epitope	59	59	1.490	. .	T E
rf	bepipred-1.0b	epitope	60	60	1.127	. .	G .
rf	bepipred-1.0b	epitope	61	61	0.958	. .	S .
rf	bepipred-1.0b	epitope	62	62	0.527	. .	N .
rf	bepipred-1.0b	epitope	63	63	0.424	. .	M .
rf	bepipred-1.0b	epitope	64	64	-0.038	. .	I .
rf	bepipred-1.0b	epitope	65	65	-0.046	. .	E .
rf	bepipred-1.0b	epitope	66	66	0.012	. .	M .
rf	bepipred-1.0b	epitope	67	67	0.091	. .	S .
rf	bepipred-1.0b	epitope	68	68	0.049	. .	W .
rf	bepipred-1.0b	epitope	69	69	0.290	. .	D .
rf	bepipred-1.0b	epitope	70	70	0.314	. .	D .
rf	bepipred-1.0b	epitope	71	71	0.368	. .	E .
rf	bepipred-1.0b	epitope	72	72	0.235	. .	L .
rf	bepipred-1.0b	epitope	73	73	0.511	. .	A .
rf	bepipred-1.0b	epitope	74	74	0.377	. .	N .
rf	bepipred-1.0b	epitope	75	75	0.029	. .	M .
rf	bepipred-1.0b	epitope	76	76	-0.072	. .	A .
rf	bepipred-1.0b	epitope	77	77	0.296	. .	Q .
rf	bepipred-1.0b	epitope	78	78	0.425	. .	Q .
rf	bepipred-1.0b	epitope	79	79	0.267	. .	W .
rf	bepipred-1.0b	epitope	80	80	0.140	. .	A .
rf	bepipred-1.0b	epitope	81	81	-0.241	. .	D .
rf	bepipred-1.0b	epitope	82	82	-0.304	. .	N .
rf	bepipred-1.0b	epitope	83	83	-0.447	. .	C .
rf	bepipred-1.0b	epitope	84	84	-0.079	. .	V .
rf	bepipred-1.0b	epitope	85	85	-0.073	. .	F .
rf	bepipred-1.0b	epitope	86	86	-0.122	. .	K .
rf	bepipred-1.0b	epitope	87	87	-0.421	. .	H .
rf	bepipred-1.0b	epitope	88	88	-0.287	. .	D .
rf	bepipred-1.0b	epitope	89	89	-0.026	. .	T .
rf	bepipred-1.0b	epitope	90	90	0.442	. .	N .
rf	bepipred-1.0b	epitope	91	91	0.525	. .	I .
rf	bepipred-1.0b	epitope	92	92	0.536	. .	R .
rf	bepipred-1.0b	epitope	93	93	0.413	. .	R .
rf	bepipred-1.0b	epitope	94	94	0.109	. .	T .
rf	bepipred-1.0b	epitope	95	95	0.045	. .	S .
rf	bepipred-1.0b	epitope	96	96	0.252	. .	R .
rf	bepipred-1.0b	epitope	97	97	0.470	. .	R .
rf	bepipred-1.0b	epitope	98	98	0.526	. .	F .
rf	bepipred-1.0b	epitope	99	99	0.590	. .	P .
rf	bepipred-1.0b	epitope	100	100	0.187	. .	V .
rf	bepipred-1.0b	epitope	101	101	0.091	. .	G .
rf	bepipred-1.0b	epitope	102	102	-0.279	. .	Q .
rf	bepipred-1.0b	epitope	103	103	0.053	. .	N .
rf	bepipred-1.0b	epitope	104	104	-0.216	. .	L .
rf	bepipred-1.0b	epitope	105	105	0.075	. .	A .
rf	bepipred-1.0b	epitope	106	106	0.098	. .	I .
rf	bepipred-1.0b	epitope	107	107	0.295	. .	S .
rf	bepipred-1.0b	epitope	108	108	0.483	. .	W .
rf	bepipred-1.0b	epitope	109	109	1.047	. .	S .
rf	bepipred-1.0b	epitope	110	110	1.366	. .	S E
rf	bepipred-1.0b	epitope	111	111	1.867	. .	P E
rf	bepipred-1.0b	epitope	112	112	1.763	. .	T E
rf	bepipred-1.0b	epitope	113	113	2.128	. .	P E
rf	bepipred-1.0b	epitope	114	114	2.072	. .	N E
rf	bepipred-1.0b	epitope	115	115	1.924	. .	K E
rf	bepipred-1.0b	epitope	116	116	1.720	. .	Y E

rf	bepipred-1.0b	epitope	117	117	1.576	. .	G E
rf	bepipred-1.0b	epitope	118	118	1.138	. .	E . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	119	119	0.946	. .	A . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	120	120	0.691	. .	A . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	121	121	0.762	. .	E . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	122	122	0.401	. .	W . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	123	123	0.231	. .	A . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	124	124	0.141	. .	A . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	125	125	-0.184	. .	Q . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	126	126	-0.588	. .	I . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	127	127	-0.355	. .	R . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	128	128	-0.337	. .	N . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	129	129	-0.420	. .	W . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	130	130	-0.554	. .	F . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	131	131	-0.251	. .	N . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	132	132	-0.109	. .	E . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	133	133	0.089	. .	V . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	134	134	0.519	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	135	135	0.959	. .	T . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	136	136	0.709	. .	S . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	137	137	0.740	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	138	138	0.945	. .	N . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	139	139	1.167	. .	D . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	140	140	1.201	. .	I . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	141	141	1.085	. .	K . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	142	142	0.837	. .	K . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	143	143	0.695	. .	S . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	144	144	0.502	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	145	145	0.541	. .	H . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	146	146	0.315	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	147	147	-0.006	. .	T . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	148	148	-0.017	. .	Q . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	149	149	0.114	. .	V . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	150	150	0.177	. .	V . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	151	151	0.074	. .	W . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	152	152	-0.254	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	153	153	-0.541	. .	D . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	154	154	-0.400	. .	S . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	155	155	-0.315	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	156	156	0.012	. .	L . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	157	157	-0.249	. .	V . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	158	158	-0.420	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	159	159	-0.641	. .	C . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	160	160	-0.558	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	161	161	-0.076	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	162	162	0.462	. .	T . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	163	163	0.618	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	164	164	0.866	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	165	165	1.002	. .	K . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	166	166	1.266	. .	D . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	167	167	1.276	. .	P . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	168	168	1.314	. .	R E
rf	bepipred-1.0b	epitope	169	169	1.193	. .	K . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	170	170	0.967	. .	N . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	171	171	0.313	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	172	172	-0.093	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	173	173	-0.580	. .	V . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	174	174	-0.950	. .	K . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	175	175	-1.057	. .	L . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	176	176	-1.154	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	177	177	-0.861	. .	V . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	178	178	-0.500	. .	C . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	179	179	-0.252	. .	N . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	180	180	0.350	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	181	181	0.696	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	182	182	0.878	. .	P . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	183	183	0.804	. .	A . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	184	184	0.932	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	185	185	1.285	. .	N . .

rf	bepipred-1.0b	epitope	186	186	1.324	. .	V E
rf	bepipred-1.0b	epitope	187	187	1.312	. .	I E
rf	bepipred-1.0b	epitope	188	188	1.205	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	189	189	0.877	. .	E . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	190	190	0.926	. .	P . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	191	191	1.245	. .	P . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	192	192	1.744	. .	Y E
rf	bepipred-1.0b	epitope	193	193	1.720	. .	I E
rf	bepipred-1.0b	epitope	194	194	1.584	. .	E E
rf	bepipred-1.0b	epitope	195	195	1.415	. .	G E
rf	bepipred-1.0b	epitope	196	196	1.433	. .	T E
rf	bepipred-1.0b	epitope	197	197	1.391	. .	P E
rf	bepipred-1.0b	epitope	198	198	1.608	. .	G E
rf	bepipred-1.0b	epitope	199	199	1.631	. .	C E
rf	bepipred-1.0b	epitope	200	200	1.284	. .	D . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	201	201	1.170	. .	R . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	202	202	1.125	. .	S . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	203	203	1.184	. .	D . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	204	204	1.338	. .	L E
rf	bepipred-1.0b	epitope	205	205	1.226	. .	K . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	206	206	1.090	. .	P . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	207	207	0.659	. .	S . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	208	208	0.412	. .	S . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	209	209	0.201	. .	S . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	210	210	-0.085	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	211	211	-0.198	. .	L . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	212	212	-0.785	. .	G . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	213	213	-1.184	. .	L . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	214	214	-1.124	. .	C . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	215	215	-1.102	. .	D . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	216	216	-0.655	. .	F . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	217	217	-0.659	. .	V . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	218	218	-0.335	. .	D . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	219	219	-0.254	. .	Y . .
rf	bepipred-1.0b	epitope	220	220	-0.308	. .	G . .

# -----

**Explain** the output. Go **back**.

---

## **ANEXO 5**

## Parasites & Vectors

### Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood feeding, yolk formation and immunity - a review

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>													
<b>Full Title:</b>	Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood feeding, yolk formation and immunity - a review												
<b>Article Type:</b>	Review												
<b>Section/Category:</b>	Vector-Borne Zoonoses and One Health												
<b>Funding Information:</b>	<table border="1"> <tr> <td>Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (BR) (193.001.076/2015)</td> <td>Izabela M. Dourado Bastos</td> </tr> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR) (407730/2013-3)</td> <td>Jaime Martins Santana</td> </tr> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR) (407855/2013-0)</td> <td>Izabela M. Dourado Bastos</td> </tr> <tr> <td>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BR) (23038.005298/2011-83)</td> <td>Sébastien Charneau</td> </tr> <tr> <td>Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (BR) (193.001.053/2015)</td> <td>Dr Carla Nunes de Araújo</td> </tr> <tr> <td>Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (BR) (193.000.822/2015)</td> <td>Jaime Martins Santana</td> </tr> </table>	Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (BR) (193.001.076/2015)	Izabela M. Dourado Bastos	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR) (407730/2013-3)	Jaime Martins Santana	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR) (407855/2013-0)	Izabela M. Dourado Bastos	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BR) (23038.005298/2011-83)	Sébastien Charneau	Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (BR) (193.001.053/2015)	Dr Carla Nunes de Araújo	Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (BR) (193.000.822/2015)	Jaime Martins Santana
Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (BR) (193.001.076/2015)	Izabela M. Dourado Bastos												
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR) (407730/2013-3)	Jaime Martins Santana												
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR) (407855/2013-0)	Izabela M. Dourado Bastos												
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BR) (23038.005298/2011-83)	Sébastien Charneau												
Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (BR) (193.001.053/2015)	Dr Carla Nunes de Araújo												
Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (BR) (193.000.822/2015)	Jaime Martins Santana												
<b>Abstract:</b>	Ticks, mosquitoes, sandflies and triatomines comprise a large number of haematophagous arthropods considered vectors of infectious diseases of worldwide importance. These insects are able to transmit pathogens while consuming blood to obtain the nutrients necessary to carry on life functions. Among the molecules related to the blood feeding habit, proteases play an essential role. In this review, we describe proteases from arthropods with regard to their activity on haematophagy, on different mechanisms of digestion reported for insects and ticks, on egg development and immunity. As they act in central biological processes, haematophagous proteases may influence vector competence to transmit pathogens to their prey, and thus could be valuable targets for vectorial control.												
<b>Corresponding Author:</b>	Jaime M Santana, PhD Universidade de Brasília BRAZIL												
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>													
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade de Brasília												
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>													
<b>First Author:</b>	Paula Beatriz Santiago, Ph.D.												
<b>First Author Secondary Information:</b>													
<b>Order of Authors:</b>	<table border="1"> <tr> <td>Paula Beatriz Santiago, Ph.D.</td> </tr> <tr> <td>Carla Nunes de Araújo, Ph.D.</td> </tr> <tr> <td>Flavia Nader Motta, Ph.D.</td> </tr> <tr> <td>Yanna Reis Praça</td> </tr> <tr> <td>Sébastien Charneau, Ph.D.</td> </tr> </table>	Paula Beatriz Santiago, Ph.D.	Carla Nunes de Araújo, Ph.D.	Flavia Nader Motta, Ph.D.	Yanna Reis Praça	Sébastien Charneau, Ph.D.							
Paula Beatriz Santiago, Ph.D.													
Carla Nunes de Araújo, Ph.D.													
Flavia Nader Motta, Ph.D.													
Yanna Reis Praça													
Sébastien Charneau, Ph.D.													

	Izabela M. Dourado Bastos, Ph.D.
	Jaime Martins Santana, Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	

[Click here to view linked References](#)

1 **Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood feeding,**  
2 **yolk formation and immunity - a review**

3 Paula Beatriz Santiago<sup>1</sup>, Carla Nunes de Araújo<sup>1,2</sup>, Flávia Nader Motta<sup>1,2</sup>, Yanna Reis  
4 Praça<sup>1,3</sup>, Sébastien Charneau<sup>4</sup>, Izabela M. Dourado Bastos<sup>1</sup> and Jaime M. Santana<sup>1\*</sup>

5  
6 <sup>1</sup>Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, Departamento de Biologia Celular,  
7 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy  
8 Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

9 <sup>2</sup>Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Centro Metropolitano, Conjunto A,  
10 Lote 01, 72220-275 Brasília, DF, Brazil

11 <sup>3</sup>Programa Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade  
12 de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília, DF,  
13 Brazil

14 <sup>4</sup>Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Departamento de Biologia Celular,  
15 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy  
16 Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

17  
18 \* Corresponding author:

19 Jaime M. Santana

20 Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, Departamento de Biologia Celular,  
21 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy  
22 Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

23 E-mail: [jsantana@unb.br](mailto:jsantana@unb.br)



- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31
- 24
- 25 Paula Beatriz Santiago (paulabeatriz@hotmail.com)
- 26 Carla Nunes de Araújo (cnunes@unb.br)
- 27 Flávia Nader Motta (fnmotta@unb.br)
- 28 Yanna Reis Praça (rp.yanna@gmail.com)
- 29 Sébastien Charneau (charneau@unb.br)
- 30 Izabela Marques Dourado Bastos (dourado@unb.br)
- 31

32 **Abstract**

33 Ticks, mosquitoes, sandflies and triatomines comprise a large number of  
34 haematophagous arthropods considered vectors of infectious diseases of worldwide  
35 importance. These insects are able to transmit pathogens while consuming blood to  
36 obtain the nutrients necessary to carry on life functions. Among the molecules related to  
37 the blood feeding habit, proteases play an essential role. In this review, we describe  
38 proteases from arthropods with regard to their activity on haematophagy, on different  
39 mechanisms of digestion reported for insects and ticks, on egg development and  
40 immunity. As they act in central biological processes, haematophagous proteases may  
41 influence vector competence to transmit pathogens to their prey, and thus could be  
42 valuable targets for vectorial control.

43

44 **Keywords:** proteases, haematophagy, digestion, yolk formation, insect immunity,  
45 insects, sandflies, triatomines, ticks.

46

## 47 **Background**

48 Haematophagous arthropods are spread worldwide and present medical and  
49 veterinary importance since their blood feeding habit provides a scenario to the  
50 transmission of a variety of pathogens during their meals, including virus, bacteria,  
51 protozoans, and helminthes [1]. Although there are clinical differences among the  
52 diseases caused by these microorganisms, they share common features, including  
53 association with poor in low and middle-income countries, where they tend to coexist.  
54 Additionally, for the majority of the diseases transmitted by vectors there are neither  
55 vaccines nor preventive treatments, generating social and economic losses.  
56 Chikungunya, Zika, and Mayaro virus infections, dengue fever, rift valley fever, yellow  
57 fever, malaria, japanese encephalitis, lymphatic filariasis, West Nile fever,  
58 leishmaniasis, Crimean-Congo haemorrhagic fever, lyme disease, tick-borne  
59 encephalitis, tularaemia, Chagas disease, sleeping sickness, plague, rickettsiosis, and  
60 onchocerciasis are examples of vector-borne diseases with global impact on morbidity  
61 and mortality, since they affect more than one billion individuals and cause over one  
62 million deaths every year [2].

63 Ecological factors are associated with vector dispersion to urban areas [3]. Ticks,  
64 fleas, triatomine bugs, mosquitoes, sandflies, tsetse flies and black flies are examples of  
65 haematophagous arthropod vectors [2], which present different feeding habits. In ticks,  
66 triatomines and fleas, the blood feeding habit occurs in both sexual forms and in all  
67 stages of development. Changing from one stage to the next requires at least one blood  
68 meal. On the other hand, only females of mosquitoes and sandflies require a blood meal  
69 to fulfil their need to complete oogenesis process [4].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

70           Vascular damage caused by the haematophagous bite during the repast triggers  
71 physiological defence responses in the host that are mainly determined by three  
72 important events: haemostasis, immunity and inflammation. To accomplish a continued  
73 blood flow into the arthropod mouthparts, a saliva array of pharmacologically active  
74 biomolecules, as antihemostatic, anti-inflammatory and immunomodulatory  
75 compounds, is injected into the bite site [5-7]. Within this context, different pathogens  
76 can be transmitted by vector saliva [7, 8]. Depending on each feeding habit, after  
77 achieving the necessary fluidity the haematophagous can consume a large amount of  
78 blood in a single meal, and proceed to digestion [9]. The digestive process includes  
79 various proteases that act to obtain the necessary energy for biological processes,  
80 guaranteeing their survival, biological development and reproduction [10].

81           Proteases are enzymes that hydrolyse (a) peptide bond(s) in amino acid residue  
82 sequences; if such catalysis occurs in internal peptide bonds of a protein, they are called  
83 endopeptidases. However, when cleavage of a peptide bond takes place at the N- or C-  
84 terminal of a polypeptide chain, those enzymes are named exopeptidases. Protease  
85 classification involves the clustering of related sequences into families. Currently, there  
86 are seven main different families of proteases: aspartic, cysteine, glutamic, metallo,  
87 serine, threonine peptidase and asparagine lyase, all grouped accordingly to the  
88 molecular composition of their active sites [11]. The clans represent one or more  
89 families that have evolutionary relationships evidenced by their tertiary structures or,  
90 when no tertiary structures are available, by the order of acid amino residues in the  
91 catalytic site and/or by common sequences around it [11]. Each clan is identified by two  
92 letters where the first represents the catalytic type of the families included in the clan.  
93 There are three additional letters to assign a clan: P, for peptidases of mixed catalytic  
94 type; U, for peptidases of unknown catalytic type; and I, for inhibitors that are proteins.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

95 A clan identifier example is PA, which contains both serine PA(S) and cysteine  
96 peptidases PA(C). Regarding the family identification, it contains a letter representing  
97 the peptidase catalytic type together with a unique number [11]. For instance, S1 is the  
98 family of trypsin and chymotrypsin that also belongs to PA(S) clan. Another clan  
99 example is CA, which contains several families of cysteine peptidases with structures  
100 similar to that of papain [11]. In this clan, C1 is the family of cathepsin B and L,  
101 peptidases that may act in the digestive vacuoles of protozoa and/or in the lysosomal  
102 system of eukaryotic cells [12].

103 Proteolytic enzymes may be synthesized as zymogens (inactive precursors) or as  
104 inactive forms binding to natural inhibitors to prevent unwanted protein degradation,  
105 and to facilitate spatial and temporal organization of proteolytic activity [13]. Zymogen  
106 conversion to the active enzyme occurs by removal of an inhibitory segment from its  
107 tertiary structure within an appropriate subcellular compartment or at the extracellular  
108 environment. The inhibitory segment proteolysis may be performed by another  
109 peptidase or by autocatalysis, requiring, for instance, a drop in pH to take place [13]. An  
110 example of peptidase family containing zymogens is the already mentioned S1, possibly  
111 the most well-known of all serine peptidases [14]. The active forms of S1 zymogens  
112 participate in complex and tightly controlled tasks such as the proteolytic cleavage  
113 cascade required during the formation of a blood clot in mammals; during protein  
114 digestion and catabolism; the yolk maturation and the defence mechanisms in  
115 arthropods. In this review, we highlight the functions of the haematophagous arthropod  
116 proteases in blood-dependent biological processes, with an emphasis to their roles in  
117 vector biology.

118

119 **The role of arthropod proteases in blood dependent processes**

120 **Haematophagy**

121 Although arthropod saliva presents many protein families to secure the fluidity  
122 of prey blood and the success of meal uptake, few salivary proteases have been  
123 characterized [15-18]. Instead, there is a variety of salivary natural protease inhibitors,  
124 pointing to the diverse cocktail arthropods produce against host proteases. Advances in  
125 transcriptomic approaches have made possible the analysis of the biochemical  
126 complexity of the saliva from many haematophagous arthropods, unravelling coding  
127 sequences for salivary gland proteases [17, 19-23]. However, these sequences are not a  
128 guarantee of salivary protein expression. From our experience, saliva of triatomine bugs  
129 displays low proteolytic activities, tested by in-gel zymography or direct incubation of  
130 saliva with fluorogenic substrates (unsubmitted).

131

132 **Digestion**

133 Proteins represent about 95% of the blood, from which haemoglobin (Hb) is the  
134 most representative. That is probably the reason proteases are the main enzymes in the  
135 arthropod midgut [9]. In insects, proteases are secreted in the gut lumen where  
136 extracellular digestion occurs, generating peptides, which are then degraded in the  
137 epithelial cells [9]. On the other hand, tick gut cells digest proteins by heterophagy.  
138 Some blood proteins are internalized by unspecific endocytosis and addressed to small  
139 acidic vesicles, while Hb is specifically recognized by surface receptors and directed to  
140 large endosomal vesicles. The digestion occurs in those respective acidic intracellular  
141 compartments orchestrated by multiple enzymes [24] (Fig. 1). The Hb degradation  
142 process initially results in 8–11 kDa fragments, which are hydrolysed into smaller  
143 peptides around 3–7 kDa, and finally to dipeptides and free amino acids [25, 26].

144

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 145 **Yolk formation**

146           Blood meal provides the necessary resources to haematophagous female  
147 arthropods produce their eggs [9]. The yolk precursor protein vitellogenin (Vg) is, in  
148 arthropods, synthesized in the fat body and then secreted into haemolymph. After being  
149 uptaken by oocyte coated vesicles, the Vg suffers dissociation and a crystallization  
150 process occurs in the endosome compartment, forming the yolk body. Following Vg  
151 proteolysis, the vitellin (Vt) protein is generated in lysosome-like organelles, called yolk  
152 granules. The final step is a mature yolk body containing the crystalline Vt form, which  
153 provides the energy to support the embryo development, together with lipids and sugars  
154 [27].

155           In female arthropods, the accumulation of yolk proteins is regulated by the  
156 developmental hormones, juvenile hormone (JH) and the 20-hydroxyecdysone (20-HE),  
157 both found in low levels in young females. Once adult undergoes eclosion, the level of  
158 JH rises and the fat body becomes responsive to signals that induce vitellogenesis [28].  
159 The role of JH also includes the growth of terminal follicles and development of oocyte  
160 competence for protein internalization [27].

161           Upon a blood meal, the JH level drops in haemolymph, while that of the egg  
162 development neurosecretory hormone (EDNH) increases to stimulate the release of  
163 ecdysone by ovaries. The later is a steroidal prohormone that is converted in 20-HE, the  
164 main regulator of vitellogenesis in the fat body. This hormone stimulates the expression  
165 of Vg, which is secreted in the haemolymph and endocytosed by oocytes [28]. Besides  
166 the 20-HE, the nutrients consumed during the blood meal could also be a signal to the  
167 vitellogenesis regulation by the fat body [29]. The hormonal regulated yolk formation  
168 steps are summarized in the Fig. 2.

169

1  
2  
3 **170 Immunity**  
4

5 171 Proteases have been implicated in vector immunity responses leading to early  
6  
7  
8 172 parasite mortality. Thus, once acquired by the vectors, parasites must survive to the  
9  
10 173 proteolytic attack in the midgut before undergoing a complex cycle of development, in  
11  
12  
13 174 order to infect a new host in a subsequent meal, perpetuating the disease cycle [30].  
14

15  
16 175 Orthologous genes, involved in *Drosophila* immune signalling, have been  
17  
18 176 described in arthropods in response to a variety of pathogens limiting infection [31],  
19  
20  
21 177 although transmission rates of infectious disease can be maintained. Three major  
22  
23  
24 178 arthropod immune pathways have been described: the Toll, the immunodeficiency  
25  
26 179 (IMD), and the JAK-STAT. After cleavage of Relish (REL) in the first pathway, and  
27  
28 180 IMD in the second, by a caspase-8 like (DREDD), humoral innate immune response is  
29  
30  
31 181 triggered, inducing antimicrobial peptide gene expression [32]. The JAK-STAT  
32  
33  
34 182 pathway also exerts its activity against pathogens, for instance viruses [33], bacteria  
35  
36 183 [34-36], and *Plasmodium* [35, 37]. The activation of these pathways leads to the  
37  
38 184 generation of anti-microbial, cytotoxic, opsonic, or encapsulation-promoting factors  
39  
40  
41 185 [38].  
42  
43

44 186 Melanization of pathogens and damaged tissues is one of the major innate  
45  
46  
47 187 defence systems in invertebrates. This process is controlled by phenoloxidase (PO) that  
48  
49 188 is regulated in an intricate manner by specific protease inhibitors aiming to avoid  
50  
51  
52 189 superfluous activation and production of toxic and reactive compounds. Tiny amounts  
53  
54 190 of microbial compounds, such as beta-1,3-glucans, lipopolysaccharides, and  
55  
56 191 peptidoglycans ensure the activation of zymogenic proPO into active PO by a cascade  
57  
58  
59 192 of serine proteases and other factors in the presence of potential pathogens [38].  
60  
61  
62  
63  
64  
65



193

194 **Proteases from haematophagous arthropods**

195 Figure 3 and additional table file (Additional file 1) show a summary of the  
196 proteases from haematophagous arthropods.

197

198 **Cysteine proteases**

199 Cysteine protease is a large family of peptidases that contains endo- and  
200 exopeptidases. Members from C1 and C13 families of cysteine proteases act mainly in  
201 the lysosomal system. In haematophagous arthropods, C1 family comprises cathepsin-  
202 L, cathepsin-B, and dipeptidyl-peptidases, and present a catalytic dyad formed by Cys  
203 and His amino acid residues in this order in their primary sequence. C13 family  
204 comprises legumain-like cysteine proteases, and the active site shows the residues His  
205 and Cys in this order in its sequence. Furthermore, a third residue, Asn, could be present  
206 forming a catalytic triad [12].

207

208 **Cathepsin-L**

209 There are a few reports on insect cathepsin-L. In triatomine bugs, two cathepsin  
210 L-like proteases present in the midgut of *Triatoma brasiliensis*, TBCATL-1 and  
211 TBCATL-2, have been characterized Their proteolytic activities have been detected in  
212 the acidic pH of the posterior midgut by zymogram assay. Specific antibodies aided to  
213 confirm the enzymes belong to cathepsin-L family [39]. In both, *T. infestans* and *R.*  
214 *prolixus*, digestive cathepsin L cDNAs have also been reported [40-42], but there is no  
215 information about the corresponding enzymes.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

216 Two cathepsin L-like cysteine proteases have been reported in the guts of  
217 *Haemaphysalis longicornis* [43] and *Ixodes ricinus* [44] ticks. In the first, HLCPL-A is  
218 up-regulated during the repast and cleaves bovine Hb in a dose-dependent manner at pH  
219 5.5 [43]. In the second, IrCL1 is localized inside the digestive gut cells and shows low  
220 stability at pH above 5, a feature that could prevent enzyme activity outside the gut cell  
221 environment [44]. Another two cathepsin L-like genes, HLCG-A and HLCG-B, have  
222 been reported in *H. longicornis* [45] and they may also have important functions in the  
223 digestion of host Hb.

224 Cathepsin L-like cysteine activities are present in *Rhipicephalus (Boophilus)*  
225 *microplus* tick crude midgut extracts [46-48], larvae [49, 50], and eggs [51]. The  
226 enzymes mediating these activities are named *Boophilus microplus* cathepsin L-like  
227 (BmCL1), *R. microplus* larval cysteine endopeptidase (RmLCE), and vitellin degrading  
228 cysteine endopeptidase (VTDCE), respectively. RmLCE is possibly the native form of  
229 the recombinant BmCL1 [49]. VTDCE is present in fat body, gut, salivary glands, ovary  
230 extracts, and haemolymph from partially or fully engorged females, suggesting it could  
231 have an extra ovarian origin, to be later internalized by oocytes [51]. It was proposed a  
232 coexistence between VTDCE and Vg/Vt with no polypeptide cleavage during  
233 vitellogenesis [52]. Although VTDCE has been classified as a cathepsin L-like cysteine  
234 [51], a very low similarity was found between its deduced amino acid sequence  
235 (AFK78425.1) and any other cysteine endopeptidase. On the other hand, phylogenetic  
236 sequence analyses revealed that VTDCE is similar to some tick antimicrobial peptides  
237 [53]. Moreover, the presence of VTDCE significantly inhibits *Staphylococcus*  
238 *epidermidis* growth after a period of 24 h. This was the first arthropod protease to be  
239 reported as an antimicrobial that is not correlated to its peptidase activity [53]. Finally,

240 VTDCCE, BmCL1 and RmLCE hydrolyse Hb and vitellin at acidic pH [48, 49, 51], and  
 241 may have a fundamental role during tick development.

242 Taking into consideration the works mentioned above had been published before  
 243 the *R. (B) microplus* genome sequencing [54], we decided to carry out a deeper  
 244 investigation to differentiate the sequence annotations and features of those three  
 245 proteases. After a search into *R. (B) microplus* genome database (GenBank:  
 246 HM748961), ten different protein-coding genes for cathepsin L were identified,  
 247 including BmCL1 (AAF61565.1); nevertheless none of them codes for VTDCCE. A  
 248 comparative pairwise amino acid sequence alignment demonstrated a homology of, at  
 249 least, 97% among the sequences (Table 1), that together with the fully identity of the  
 250 active site residues (Additional file 2) may indicate *R. (B.) microplus* presents ten active  
 251 cathepsin L isoforms. It is not possible to conclude if BmCL1 and RmLCE are exactly  
 252 the same isoform. However, a stage specific expression pattern may exist to guarantee  
 253 the success of cathepsin L blood dependent process in this tick.

254 **Table 1** Percentage of sequence identity between predicted Cathepsin L from *R. (B.)*  
 255 *microplus* after pairwise alignment performed by EMBOSS Needle

Accession number	AFQ 98389.1	AFQ9 8385.1	AFQ 98392.1	AFQ 98386.1	AGK 88363.1	AFQ 98393.1	AFQ 98390.1	AFQ 98387.1	AAF61565.1 (BmCL1)	AFQ 98388.1
AFQ98389.1	100	99.4	98.5	98.2	98.2	98.2	98.2	98.5	98.2	98.2
AFQ98385.1		100	99.1	98.8	98.8	98.8	98.8	99.1	98.8	98.2
AFQ98392.1			100	98.5	98.5	99.7	99.7	98.8	99.1	97.3
AFQ98386.1				100	98.8	98.2	98.8	98.5	98.8	97.6
AGK88363.1					100	98.2	98.8	98.5	98.8	97.6
AFQ98393.1						100	99.4	98.5	98.8	97.0
AFQ98390.1							100	99.1	99.4	97.6
AFQ98387.1								100	99.1	97.9
AAF61565.1 (BmCL1)									100	97.6
AFQ98388.1										100

256

257 Cathepsin-B

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
258 The cathepsin B-like activity from the midgut of *R. prolixus* increases following  
259 a blood meal [55]. Indeed, trace amounts of cathepsin B are detected in the lysosome of  
260 *R. prolixus* midgut cells before feeding, but after blood sucking, cathepsin B localizes in  
261 a granular precipitate associated with this organelle, and maybe is released in the gut  
262 lumen [56]. A strong acidic peptidase activity found in the gut extract of *T infestans* is  
263 possibly mediated by a cathepsin B. Although the molecular features and functional  
264 properties of the protein are unknown, the enzymatic activity is efficiently inhibited by  
265 CA-074, a specific cathepsin-B inhibitor [42]. In *Aedes aegypti* mosquito, vitellogenic  
266 cathepsin B (VCB) is specifically expressed by fat body during vitellogenesis in  
267 response to repast, internalized by developing oocytes, and deposited in the yolk bodies  
268 to the onset of embryogenesis. VCB hydrolyses Vg at acidic pH, and may be involved  
269 in the embryonic degradation of yolk proteins, although it is produced as a precursor by  
270 extraovarian tissue [57].

32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
271 Tsuji *et al.* have reported the molecular characterization of a cathepsin B-like  
272 named longipain from the midgut epithelium of *Haemaphysalis longicornis* tick [58].  
273 The enzyme is specifically localized in the lysosomes and secreted into the intestinal  
274 lumen, following blood feeding. Enzymatic assays with natural substrates revealed that  
275 longipain cleaves spectrin, an important component of erythrocytes membranes, but not  
276 Hb. Endogenous longipain RNAi knockdown has revealed that treated ticks diminish  
277 feeding capacity, and show an increased number of *Babesia equi* protozoan parasites in  
278 their midguts, suggesting longipain exerts a killing effect against parasites [58]. It is  
279 worth pointing out that this toxic effect may be direct and/or by means of the  
280 degradation of ingested proteins and peptides.

282 Legumain-like cysteine protease (asparaginyl endopeptidase)

283 Two legumains, *H. longicornis* legumain 1 (HILgm1) and *H. longicornis*  
284 legumain 2 (HILgm2), from the gut of *H. longicornis* have been characterized by their  
285 ability to cleave Z-Ala-Ala-Asn-AMC, a legumain specific substrate, over a neutral to  
286 basic pH [59, 60]. HILgm1 and HILgm2 localize in midgut epithelium and are  
287 upregulated during blood feeding process. Moreover, the cleavage of bovine Hb by  
288 these legumains corroborates their role in the digestion of blood proteins. [61].  
289 Silencing of both genes by RNAi has revealed an extended feeding period, survival  
290 decrease, weight loss, delayed oviposition and reduced number of normal eggs. In  
291 addition, the epithelium of the gut shows, upon this condition, damage and disruption of  
292 normal cellular remodelling during the feeding, resulting in luminal narrowing in  
293 silenced individuals [61]. IrAE, a legumain from the gut of *Ixodes ricinus* is effectively  
294 inhibited by the specific legumain inhibitor Aza-Asn-11a using the same HILgm1 and  
295 HILgm2 substrate [62]. The knowledge of their molecular and enzymatic properties will  
296 largely improve our understanding about the environment and extent of the involvement  
297 of these peptidases in haematophagy.

298

### 299 **Serine proteases**

300 Serine proteases (SPs) are known to be crucial for blood protein hydrolysis in  
301 haematophagous arthropods. Additionally, they are known to participate in other critical  
302 processes, such as yolk protein digestion, immune protection, fertilization, embryonic  
303 development, molting and metamorphosis of insects [17, 63]. Among SP families, S1 is  
304 the most representative and diverse family, and encompasses trypsin and chymotrypsin-  
305 like SPs. This family encloses the His-Asp-Ser catalytic triad [12].

306

307 In triatomines

1  
2 308 Triapsin is a trypsin-like SP purified from the D2 pair of *T. infestans* salivary  
3  
4 309 glands, expressed as an inactive precursor and activated during salivation stimulated by  
5  
6  
7 310 biting. Triapsin shows high specificity towards arginine at the P1 site. This protease  
8  
9 311 may be involved in hydrolysis of the superfamily of Proteinase Activated G protein-  
10  
11 312 coupled Receptors (PAR), which regulates growth, development, inflammation, and  
12  
13 313 responses to injury. Triapsin is unlikely to be involved in digestion since this  
14  
15 314 phenomenon in Hemiptera seems to depend exclusively on the action of cysteine and  
16  
17 315 aspartic proteases [15]. However, it is imperative to perform experiments to test the  
18  
19 316 involvement of this peptidase on the physiology of triatomines and other insect vectors  
20  
21  
22 317 of illnesses.

23  
24  
25  
26  
27 318 Our group has used next-generation sequencing and mass spectrometry-based  
28  
29 319 protein identification to study the transcriptome and proteome of *R. neglectus* salivary  
30  
31 320 glands (sialome) [17]. The results have revealed abundant transcripts of putative  
32  
33 321 secreted trypsin-like peptidases, although only one serine protease was detected in the  
34  
35 322 proteome, suggesting physiological conditions may influence secretion [17]. Sequence  
36  
37 323 alignments disclosed the presence of domains currently present in proteins that act in  
38  
39 324 haemostasis and immunity such as the CUB (complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1)  
40  
41 325 domain [64] and the cysteine-stabilized structures for molecular recognition (CLIP,  
42  
43 326 LDLa and SUSHI domains). Five SP sequences of *R. neglectus* sialotranscriptome [17]  
44  
45 327 match to SPs sequences from *T. infestans* [20, 65], *T. braziliensis* [21], *P. megistus* [22],  
46  
47 328 and *R. prolixus* [41]. Although physiological roles of SPs are unknown, their presence  
48  
49 329 in the sialotranscriptome of different triatomine species is an indicative of the  
50  
51 330 importance of these proteases in haematophagy.

52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60 331

332 In mosquitoes

333 Trypsin-like SPs from both *Aedes* [66] and *Anopheles* share an acidic isoelectric  
334 point but differ in size [67]. Two different groups of *Ae. aegypti* female gut trypsins  
335 regulated at the midgut cellular level are proposed that show different levels of  
336 expression after blood meal. The first one is the early trypsin group, which transcription  
337 occurs in the midgut of newly emerged adult before feeding and under the control of JH  
338 [68], being translated at detectable levels after blood feeding [69, 70]. Early trypsins,  
339 secreted either through stretching of the midgut or osmotic effect, would be required for  
340 the transcription of the second group, the late trypsins. It is possible that released amino  
341 acids are also involved in this process [71, 72]. Expression of late trypsins requires  
342 complete synthesis of new mRNAs after feeding, produced in large amounts 8-10 h  
343 after blood meal, suggesting it may have the major role in the digestive process [69].  
344 These two phases would allow the mosquitoes to assess the quality of the meal before  
345 committing to the synthesis of late trypsins, since large amount of these proteases in the  
346 absence of blood might be harmful for the mosquito [71].

347 Three trypsins of *Ae. aegypti* [Aedes Early Trypsin (AaET), AaSPVI and  
348 AaSPVII] had their enzymatic activities compared among them and with bovine trypsin  
349 (BvT). The specific activities of AaET and BvT are comparable, and 5-10 times higher  
350 than those of AaSPVI and AaSPVII late trypsins. In addition, AaSPVI is 3-4 times more  
351 active on Hb than AaET and AaSPVII [73]. AaSPVI RNAi knockdown, but not that of  
352 AaSPVII, have triggered a significant decrease in late phase trypsin-like activity. In  
353 contrast, injection of AaSPVI, and AaSPVII dsRNAs decreases both degradation of  
354 endogenous serum albumin *in vivo* and egg production. Taken together, these data  
355 indicate that AaSPVI, and AaSPVII contribute to blood digestion and oocyte maturation  
356 [74]. *Ae. aegypti* late trypsin (AaLT), that lacks trypsin-like activity, and AaSPI are

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

357 classified as collagenase-like SP and might be related to mosquito defence against  
358 complement cascade ingested with the blood meal [75]. Two different trypsin-like SPs  
359 and one chymotrypsin have been identified by means of two-dimensional  
360 electrophoresis of midgut proteins from *Ae. albopictus* female [76].

361 A gene cluster of gut trypsin-like SPs, Antryp 1-7, has been identified in  
362 *Anopheles gambiae* [77-79]. Antryp 1 and 2 show selective proteolytic activity against  
363 blood components; Antrypl mediates degradation of both Hb and serum albumin  
364 whereas Antryp2 seems to be mainly active against Hb [77-79]. While transcription of  
365 Antryp 1 and 2 are induced after blood meal [77-79], Antryp 3-7 are constitutively  
366 transcribed in females and their levels are down regulated after blood feeding [77-79].  
367 These observations suggest that Antryp 3-7 are involved in initiating the events leading  
368 to the expression of other SPs directly associated with digestion [77-79]. Trypsin-like  
369 SPs activities have been also observed in *An. Aquasalis* females [80].

370 Regarding SPs of *Culex quinquefasciatus*, a proteomic approach associated with  
371 zymographic analysis had identified eight trypsin-like peptidases in the midgut of  
372 females fed on sugar [81]. These enzymes are specific to *C. quinquefasciatus* when  
373 compared to the culicids genomes sequenced so far. Moreover, these proteases exhibit  
374 singularities at the protein sequence level such as the presence of different amino acids  
375 at the autocatalytic motif and substrate binding regions [81].

376 A female specific *Ae. aegypti* chymotrypsin-like SP gene (JHA15 or AaJA15) is  
377 required in the yolk for embryo development and is regulated in a dose-dependent  
378 manner by JH [82]. Other five *Ae. aegypti* chymotrypsin-like SP genes (AaChymo,  
379 AaSP II-V) have been cloned and sequenced [75]. Northern and Western blots analyses  
380 have shown that AaChymo mRNA is abundant in adult female midgut and its



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

381 expression is induced after a blood meal [83]. On the other hand, midgut AaSP II–V are  
382 equally expressed before and after blood meal [75]. An explanation for this observation  
383 awaits further investigations.

384 A study of two midgut *An. gambiae* chymotrypsins (Anchym1 and Anchym2)  
385 have revealed the presence of N-terminus preceded by an arginine, indicating zymogen  
386 activation by tryptic cleavage. It has been suggested that these chymotrypsins are  
387 members of a digestive cascade initiated upon tryptic activation [84]. A midgut *An.*  
388 *gambiae* chymotrypsin (AgChyL) is restricted to adult female stage and contains a Thr  
389 residue at the position 182, feature that could determine its narrow specificity range  
390 [85]. In other two species of *Anopheles*, *An. aquasalis* (Anachy1 and Anachy2) and *An.*  
391 *darlingi* (Andchy1 and Andchy2), two closely related chymotrypsins has been also  
392 reported. Anachy1 and Anachy2 mRNAs seem to be detectable only in adult females,  
393 approximately 24 h after the blood meal [86].

394 An intriguing possibility is that SPs levels in the haematophagous vectors may  
395 be associated with susceptibility to infections. Eight immune related SPs have been  
396 described in *An. gambiae*: ISPL5, ISP13 [87, 88], AgSp14D1 [89], Sp14A, Sp14D2,  
397 Sp18D, Sp2A [90], and Sp22D [90, 91]. These SPs, except Sp18D and Sp2A, probably  
398 participate in the anti-bacterial and *-Plasmodium* defence mechanisms [87-89].  
399 Furthermore, AgSp14D1 catalytic domain has similar sequence identities to kallikreins  
400 and coagulation factors, members that are involved in immune and wound responses  
401 [89]. Sp14A, Sp14D1, and Sp14D2 present an amino-terminal clip domain,  
402 characteristic of secreted proteases that activate prophenoloxidas and regulate  
403 melanotic parasite encapsulation or antimicrobial peptide synthesis [89]. Regarding  
404 Sp22D mRNA, it is expressed constitutively in the three immune related cell types:  
405 adult hemocytes, fat body, and midgut epithelial cells. The authors suggest that Sp22D

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

406 is secreted into the hemolymph where it may interact with pathogen surfaces and initiate  
407 an immune response, as rapidly as pathogen detection [91]. Sp2A and Sp18D functions  
408 remain to be characterized, however Sp18D present the clip domain and Sp2A is similar  
409 to vertebrate and invertebrate blood coagulation factors [89]. In the main vector of  
410 malaria in Southeast Asia, *An. dirus*, the SP cDNAs for ClipSP1, SerF2, and SerF3 have  
411 been analysed upon *P. falciparum* infection. Only SerF3 seems to be up regulated in  
412 infected *An. dirus*, and might also play a role in the mosquito immunity [92].

413

414 In sandflies

415 Four trypsin-like (Pptryp1–Pptryp4) and two chymotrypsin-like (Ppchym1 and  
416 Ppchym2) cDNAs from *Phlebotomus papatasi* midgut have been studied. Ppchym1 and  
417 Ppchym2 expression profiles are similar to *Ae. aegypti* early and late trypsins,  
418 suggesting that a two-phase digestive mechanism also occurs in sandflies [93]. In  
419 *Lutzomyia longipalpis* two trypsin-like SP cDNAs, Lltryp1 and Lltryp2, have been  
420 described [94]. While Lltryp1 is expressed in females after blood meal, Lltryp2 is  
421 detected in both sexes independently of feeding. *L. longipalpis* infection by *Leishmania*  
422 *major* promastigotes has not modified the expression levels of Lltryp1 and Lltryp2. It is  
423 plausible that different results may be obtained when infections are performed with  
424 *Leishmania chagasi* amastigotes [95]. In contrast, a correlation has been reported  
425 between *Leishmania* infections and reduced trypsin-like SP activity in *P. papatasi*. The  
426 presence of specific inhibitors of trypsin in the blood meal prevents the early killing of  
427 *L. major* and *Leishmania donovani* in the midgut of this insect species, implying that  
428 the proteolytic activity in the sandfly midgut modulates the vector susceptibility to  
429 infections [96-98].

430

431 In ticks

432 Some SPs have been also described in ticks. HLSG-1 and HLSG-2 SPs of the  
433 hard tick *H. longicornis*, which carries and transmits various pathogens [99], are blood  
434 meal-induced and expressed in the midgut, salivary glands as well as other organs  
435 [100]. Another *H. longicornis* SP named HISP is expressed during the development and  
436 is localized in adult tick midgut. This protease contains both domains, CUB and LDL,  
437 important at mediating protein–protein interactions in various extracellular proteins  
438 [101-103]. The presence of low levels of HISP upon RNAi correlates well with  
439 diminished capacity of ticks to degrade host erythrocytes, suggesting this enzyme is  
440 involved in hemolysis. Moreover, the recombinant protein rHISP also shows hemolytic  
441 activity *in vitro* in a dose-dependent manner [102]. Two other SPs studied, HISP2 and  
442 HISP3, are also localized in the midgut epithelial cells and lumen of adult ticks [104].  
443 Silencing of these three SP genes together by RNAi have resulted in a major impact on  
444 body weight reduction, indicating they may form a proteolytic network for host Hb  
445 digestion in the midgut of ticks [104]. Finally, a carboxypeptidase-like SP from *H.*  
446 *longicornis*, HISCP1, is found in the vacuoles of midgut endothelial cells of this tick,  
447 and its up regulation is observed after blood meal. Of interest, this protease is able to  
448 cleave Hb [105].

449

#### 450 **Aspartic proteases**

451 Aspartic proteases contain two aspartate residues at their catalytic site and play a  
452 role in numerous physiological functions in parasitic organisms, such as in tissue  
453 invasion, migration, digestion, moulting, and reproduction [106]. In the case of  
454 haematophagous arthropods, these proteases seems to be associated mainly with  
455 digestion [107]. Pepsinogen, renin, cathepsin E, and cathepsin D are examples of the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

456 largest aspartic protease group, the A1 family. Among soluble lysosomal aspartic  
457 endopeptidases, cathepsin D is a glycoprotein synthesized as a preprocathepsin D,  
458 targeted to intracellular vesicular structures such as lysosomes, endosomes, and  
459 phagosomes after removing of the signal peptide [108, 109].

460 A cathepsin D aspartic-like protease activity is detectable in the blood-sucking  
461 triatomine *R. prolixus* [110]. *Trypanosoma cruzi* colonization of *R. prolixus* may  
462 modulate the expression of cathepsin D in the invertebrate since its activity is much  
463 higher on days 1-3 after infection [110]. A similar result has been found in *T. infestans*  
464 [111], another vector of *T. cruzi*. Yet, *T. infestans* midgut TiCatD is strongly induced  
465 after feeding whereas TiCatD2 is upregulated only 10 to 20 days after meal, suggesting  
466 that the former might play a role in processes related to early digestion [112]. More  
467 recently, triatomine cathepsin D had been also proposed to be involved in  
468 vitellogenesis. A *Dipetalogaster maxima* cathepsin D (DmCatD) is expressed in the fat  
469 body and ovarian tissues during the reproductive cycle. As for other peptidases,  
470 DmCatD also degrades Vt. Early activation of DmCatD had shown to be a relevant  
471 physiological mechanism in yolk protein degradation during follicular atresia to either,  
472 increase female lifetime or sustain younger oocytes until improvement of nutritional  
473 conditions [113].

474 In ticks, aspartic proteases play a key role in Hb proteolysis, and may be also  
475 involved in yolk degradation [10]. Eggs of *R. (B.) microplus* express two aspartic  
476 proteinases able to degrade Vt: boophilus yolk cathepsin (BYC) and tick heme-binding  
477 protease (THAP). In addition, the activity of THAP seems to be regulated by heme  
478 molecule, and BYC also cleaves Hb [114-116]. Interestingly, a cathepsin D from this  
479 tick midgut (BmAP) may be responsible for the generation of antimicrobial peptides,  
480 suggesting that proteases play roles in immune response against parasite invasion [117].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

481 At last, a *H. longicornis* cathepsin D is highly expressed in the salivary gland and  
482 midgut after blood meal and also hydrolyses Hb [118].

483

#### 484 **Metalloproteases**

485 Metalloproteases are enzymes that require a metal ion at the active site to  
486 hydrolyse the peptide bond [119]. This family possesses a characteristic motif HEXXH,  
487 being the glutamate residue important for catalysis [12]. These proteases are involved in  
488 regulating a wide range of biological processes [120].

489 Two *R. prolixus* metalloproteases were characterized from the haemolymph of  
490 insects infected with *Enterobacter cloacae* [121] or *Trypanosoma rangeli* [122]. The  
491 source of these proteases is the fat body, and they are released into the haemolymph  
492 upon infection, what suggests these enzymes may be involved in *R. prolixus* defence  
493 mechanisms. In *T. matogrossensis* saliva [123] and *R. prolixus* oddities [41], sequences  
494 related to the astacin family of metalloproteases have been reported. In the sialome of *R.*  
495 *neglectus*, one CDS related to the zinc-dependent metalloproteases from the astacin-like  
496 metalloproteases, and other two related to the adamalysin/reprolysin family, which  
497 includes ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin  
498 motifs) have been also reported. Both are members of the metzincins metalloproteases  
499 superfamily [17]. Astacin family members have the ability to hydrolyse fibrinogen and  
500 fibronectin [124-126], leading to local haemorrhage [127], whereas disintegrins bind to  
501 platelets acting as potent inhibitors of platelet aggregation [128-130]. These proteases  
502 may have key functions in the maintenance of blood flow at the bite site.

503 Late metalloprotease trypsin, leucineaminopeptidase (LpNa), carboxypeptidase  
504 A (HPA) and carboxypeptidase B (HA) of the midgut of *Ae. aegypti* females present

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

505 enzymatic activities stimulated 20–24 h after a blood or protein, but not amino acid  
506 meal. There is a positive correlation between metalloprotease activity and protein  
507 concentration in the meal [131].

508         AgMMP1, a matrix metalloprotease (MMP) from *An. gambiae*, is expressed as a  
509 trans-membrane/membrane protein (MT-MMP1) in epithelial tissues and as a secreted  
510 (S-MMP1) isoform in hemocytes. MT-MMP1 transcript levels shows a remarkable  
511 response to blood meal digestion and to midgut infection and invasion by *Plasmodium*  
512 ookinetes [132]. Since tissue invaded by pathogens has often been associated with  
513 increased MMP activity, this study suggests MMPs may have an impact in vector  
514 competence determination [133, 134].

515         *I. scapularis* degradome (the full repertoire of proteases encoded by the genome)  
516 is mainly represented by metalloproteases (~40%), in contrast to those of blood feeding  
517 insects, that show serine proteases as the predominant component. *I. scapularis*  
518 putatively active metalloproteases are organized in 23 families, but functions in tick  
519 physiology are unknown for many of them. M12 family contains 14 enzymes that are  
520 believed to be involved in blood meal feeding regulation [135]. Recombinant M12  
521 AAP22067 has gelatinase and fibrinogenolytic activities [18], essential to maintain host  
522 blood in a fluid state during tick feeding. Protein sequences of the repropylsin family of  
523 metalloproteases from *Ixodes persulcatus* (Ip-MPs), *Rhipicephalus sanguineus* (Rs-  
524 MPs) and *R. microplus* (BrRm-MPs) have been found in the salivary glands of partially  
525 and fully fed female ticks. Those data lead to the hypothesis that these proteases are  
526 required during tick feeding to manipulate host defences and support tick haematophagy  
527 [136].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

528 RNAi silencing of metalloproteases affect feeding efficiency and fertility of *R.*  
529 *microplus* [117] and *I. ricinus* [118]. The presence of specific antibodies against a  
530 recombinant tick metalloprotease induces lower feeding efficiency of *H. longicornis* on  
531 rabbits [137]. In the sialotranscriptome of *Haemaphysalis flava*, metalloprotease genes  
532 involved in modulating host haemostasis are over expressed in semi-engorged ticks,  
533 probably in order to maintain blood flow [138]. Finally, three metalloprotease  
534 sequences from *Amblyoma americanum* show identity to annotated tick  
535 metalloproteases, and another shows identity to *I. scapularis* endothelin-converting  
536 enzyme (ECE) [139]. Endothelins are a family of potent vasoconstrictive peptides  
537 [140]. Thus the role of ECE in haematophagous arthropod saliva might be the  
538 hydrolysis of endothelins in order to impair vasoconstriction.

539

## 540 **Conclusions**

541 In this review, we discussed the role of proteases involved in processes related to  
542 blood feeding behaviour of arthropods: blood sucking, digestion, yolk formation and  
543 immunity, and even if indirectly, in the transmission and survival of pathogens.  
544 Inevitably, the success of haematophagy is dependent on the ability of the invertebrates  
545 to impair prey haemostasis and inflammation in the feeding foci. However, few  
546 proteases are present in the saliva probably to avoid triggering platelet aggregation in  
547 the prey and furthermore saliva presents several protease inhibitors maybe to prevent  
548 thrombin-induced platelet aggregation and preserve prey blood flow during feeding.

549 Since the common meal is blood, we reported that haematophagous arthropod  
550 proteases share structural and functional features resulting in the generation of the  
551 essential nutrients and detoxification of the adverse molecules to their development,

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

552 reproduction, and survival. Ticks and insects have evolved different mechanisms of  
553 digestion. In ticks, protein digestion occurs intracellularly using aspartic and cysteine  
554 proteases, while in insects the digestion occurs in the gut lumen mainly realized by  
555 trypsin-like serine proteases.

556         After we have prospected many related papers, we noticed authors have given  
557 different names for proteases belonging to the same clan or isoforms even in a single  
558 organism. This issue claims for a unified nomenclature to avoid misunderstanding and  
559 ambiguities. Thus, we suggest that a careful sequence analysis be done when describing  
560 a new gene in order to name it according to the clan (or clan prototype) name and in the  
561 case of already studied proteases, rename them. MEROPS database  
562 (merops.sanger.ac.uk) is very useful to define accurate systematic nomenclature, since it  
563 allows search for organism peptidase, family, clans, substrates, inhibitors and other  
564 resources.

565         Considering the central functions of haematophagous arthropod proteases have,  
566 they could be employed as potential targets for the development of alternative strategies  
567 for arthropod vector control. For instance, arthropod protease inhibitor investigation is  
568 emerging [141].

#### 569 570 **Acknowledgements**

571 DPP/UnB.

572

#### 573 **Funding**

574 This work was supported by MCTI/CNPq/FNDCT/PRO-CENTRO-OESTE  
575 [407730/2013-3 and 407855/2013-0], CAPES/Incentivo a Pesquisa em Parasitologia



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

576 Básica [23038.005298/2011-83], FAPDF [193.001.076/2015, 193.001.053/2015 and  
577 193.000.822/2015], CNPq, Finep and UnB.

578

579 **Authors' contributions**

580 PBS, CNA, FNM, YRP, SOC, IMDB: conceived the study, and wrote the manuscript.  
581 JMS: participated in design, coordination and wrote the manuscript. All authors read  
582 and approved the final manuscript.

583

584 **Competing interests**

585 The authors declare that they have no competing interests.

586

587

588 **References**

- 1  
2 589 1. Mehlhorn H: Arthropods as Vectors of Emerging Diseases, vol. 3. Germany:  
3 590 Springer International Publishing AG; 2012.
- 4 591 2. WHO: Vector-borne diseases. Fact sheet n. 387., vol. 2016: WHO; 2016.
- 5 592 3. Ribeiro G, Gurgel-Gonçalves R, Reis RB, Santos CG, Amorim A, Andrade SG,  
6 593 Reis MG: Frequent house invasion of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in  
7 594 a suburban area of Brazil. PLoS Negl Trop Dis 2015, 9(4):e0003678.
- 8 595 4. Bai H, Gelman DB, Palli SR: Mode of action of methoprene in affecting female  
9 596 reproduction in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Pest Manag  
10 597 Sci 2010, 66(9):936-943.
- 11 598 5. Ribeiro JM: Role of saliva in blood-feeding by arthropods. Annu Rev Entomol  
12 599 1987, 32:463-478.
- 13 600 6. de Araújo CN, Bussacos AC, Sousa AO, Hecht MM, Teixeira AR: Interactome:  
14 601 Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human  
15 602 hemostasis during meal acquisition. J Proteomics 2012, 75(13):3829-3841.
- 16 603 7. Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, Rogier C, Almeras  
17 604 L: Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector  
18 605 interactions. Parasit Vectors 2011, 4:187.
- 19 606 8. Ribeiro JM: Vector salivation and parasite transmission. Mem Inst Oswaldo  
20 607 Cruz 1987, 82 Suppl 3:1-3.
- 21 608 9. Lehane MJ: The Biology of Blood-Sucking in Insects, vol. 2: Cambridge  
22 609 University Press; 2005.
- 23 610 10. Sojka D, Franta Z, Horn M, Caffrey CR, Mareš M, Kopáček P: New insights  
24 611 into the machinery of blood digestion by ticks. Trends Parasitol 2013,  
25 612 29(6):276-285.
- 26 613 11. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R: Twenty years of the MEROPS database of  
27 614 proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res 2016,  
28 615 44(D1):D343-350.
- 29 616 12. Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the database of  
30 617 proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res 2014,  
31 618 42(Database issue):D503-509.
- 32 619 13. Khan AR, James MN: Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to  
33 620 active proteolytic enzymes. Protein Sci 1998, 7(4):815-836.
- 34 621 14. Rawlings ND, Salvesen G: Handbook of Proteolytic Enzymes, vol. 3: Academic  
35 622 Press; 2013.
- 36 623 15. Amino R, Tanaka AS, Schenkman S: Triapsin, an unusual activatable serine  
37 624 protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease  
38 625 *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Insect Biochem Mol Biol 2001,  
39 626 31(4-5):465-472.
- 40 627 16. Assumpcao TC, Ribeiro JM, Francischetti IM: Disintegrins from  
41 628 hematophagous sources. Toxins (Basel) 2012, 4(5):296-322.
- 42 629 17. Santiago PB, Assumpção TC, Araújo CN, Bastos IM, Neves D, Silva IG,  
43 630 Charneau S, Queiroz RM, Raiol T, Oliveira JV et al: A Deep Insight into the  
44 631 Sialome of *Rhodnius neglectus*, a Vector of Chagas Disease. PLoS Negl Trop  
45 632 Dis 2016, 10(4):e0004581.
- 46 633 18. Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM: Cloning of a salivary gland  
47 634 metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities  
48 635 in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. Biochem  
49 636 Biophys Res Commun 2003, 305(4):869-875.

- 637 19. Assumpcao TC, Charneau S, Santiago PB, Francischetti IM, Meng Z, Araujo  
638 CN, Pham VM, Queiroz RM, de Castro CN, Ricart CA et al: Insight into the  
639 salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. J Proteome Res  
640 2011, 10(2):669-679.
- 641 20. Assumpcao TC, Francischetti IM, Andersen JF, Schwarz A, Santana JM,  
642 Ribeiro JM: An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma*  
643 *infestans*, a vector of Chagas' disease. Insect Biochem Mol Biol 2008,  
644 38(2):213-232.
- 645 21. Santos A, Ribeiro JM, Lehane MJ, Gontijo NF, Veloso AB, Sant'Anna MR,  
646 Nascimento Araujo R, Grisard EC, Pereira MH: The sialotranscriptome of the  
647 blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). Insect  
648 Biochem Mol Biol 2007, 37(7):702-712.
- 649 22. Ribeiro JM, Schwarz A, Francischetti IM: A Deep Insight Into the  
650 Sialotranscriptome of the Chagas Disease Vector, *Panstrongylus megistus*  
651 (Hemiptera: Heteroptera). J Med Entomol 2015, 52(3):351-358.
- 652 23. Karim S, Singh P, Ribeiro JM: A deep insight into the sialotranscriptome of the  
653 gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. PLoS One 2011, 6(12):e28525.
- 654 24. Zhou G, Flowers M, Friedrich K, Horton J, Pennington J, Wells MA: Metabolic  
655 fate of [14C]-labeled meal protein amino acids in *Aedes aegypti* mosquitoes. J  
656 Insect Physiol 2004, 50(4):337-349.
- 657 25. Horn M, Nussbaumerová M, Sanda M, Kovárová Z, Srba J, Franta Z, Sojka D,  
658 Bogyo M, Caffrey CR, Kopáček P et al: Hemoglobin digestion in blood-feeding  
659 ticks: mapping a multipeptidase pathway by functional proteomics. Chem Biol  
660 2009, 16(10):1053-1063.
- 661 26. Sojka D, Francischetti IM, Calvo E, Kotsyfakis M: Cysteine proteases from  
662 bloodfeeding arthropod ectoparasites. Adv Exp Med Biol 2011, 712:177-191.
- 663 27. Raikhel AS, Dhadialla TS: Accumulation of yolk proteins in insect oocytes.  
664 Annu Rev Entomol 1992, 37:217-251.
- 665 28. Attardo GM, Hansen IA, Raikhel AS: Nutritional regulation of vitellogenesis in  
666 mosquitoes: implications for anautogeny. Insect Biochem Mol Biol 2005,  
667 35(7):661-675.
- 668 29. Uchida K, Ohmori D, Yamakura F, Suzuki K: Changes in free amino acid  
669 concentration in the hemolymph of the female *Culex pipiens pallens* (Diptera:  
670 Culicidae), after a blood meal. J Med Entomol 1990, 27(3):302-308.
- 671 30. Gorman MJ, Paskewitz SM: Serine proteases as mediators of mosquito immune  
672 responses. Insect Biochem Mol Biol 2001, 31(3):257-262.
- 673 31. Severo MS, Sakhon OS, Choy A, Stephens KD, Pedra JH: The 'ubiquitous'  
674 reality of vector immunology. Cell Microbiol 2013, 15(7):1070-1078.
- 675 32. Kim CH, Paik D, Rus F, Silverman N: The caspase-8 homolog Dredd cleaves  
676 Imd and Relish but is not inhibited by p35. J Biol Chem 2014, 289(29):20092-  
677 20101.
- 678 33. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G: An evolutionary conserved function of  
679 the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. Proc Natl Acad Sci U S A  
680 2009, 106(42):17841-17846.
- 681 34. Barillas-Mury C, Han YS, Seeley D, Kafatos FC: *Anopheles gambiae* Ag-  
682 STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to  
683 bacterial infection. EMBO J 1999, 18(4):959-967.
- 684 35. Gupta L, Molina-Cruz A, Kumar S, Rodrigues J, Dixit R, Zamora RE, Barillas-  
685 Mury C: The STAT pathway mediates late-phase immunity against Plasmodium  
686 in the mosquito *Anopheles gambiae*. Cell Host Microbe 2009, 5(5):498-507.

- 687 36. Liu L, Dai J, Zhao YO, Narasimhan S, Yang Y, Zhang L, Fikrig E: *Ixodes*  
688 *scapularis* JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby  
689 controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. *J Infect Dis* 2012,  
690 206(8):1233-1241.
- 691 37. Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Araújo HR, Guedes BA, Orfanó AS,  
692 Tadei WP, Ríos-Velásquez CM, Han YS, Secundino NF et al: The JAK-STAT  
693 pathway controls *Plasmodium vivax* load in early stages of *Anopheles aquasalis*  
694 infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, 5(11):e1317.
- 695 38. Cerenius L, Söderhäll K: The prophenoloxidase-activating system in  
696 invertebrates. *Immunol Rev* 2004, 198:116-126.
- 697 39. Waniek PJ, Pacheco Costa JE, Jansen AM, Costa J, Araújo CA: Cathepsin L of  
698 *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): sequence characterization,  
699 expression pattern and zymography. *J Insect Physiol* 2012, 58(1):178-187.
- 700 40. Lopez-Ordoñez T, Rodríguez MH, Hernández-Hernández FD: Characterization  
701 of a cDNA encoding a cathepsin L-like protein of *Rhodnius prolixus*. *Insect Mol*  
702 *Biol* 2001, 10(5):505-511.
- 703 41. Ribeiro JM, Genta FA, Sorgine MH, Logullo R, Mesquita RD, Paiva-Silva GO,  
704 Majerowicz D, Medeiros M, Koerich L, Terra WR et al: An insight into the  
705 transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*.  
706 *PLoS Negl Trop Dis* 2014, 8(1):e2594.
- 707 42. Kollien AH, Waniek PJ, Nisbet AJ, Billingsley PF, Schaub GA: Activity and  
708 sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the  
709 reduviid bug *Triatoma infestans*. *Insect Mol Biol* 2004, 13(6):569-579.
- 710 43. Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, Anisuzzaman,  
711 Takenaka A, Fujisaki K: Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the  
712 ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol Int* 2009, 58(3):232-237.
- 713 44. Franta Z, Sojka D, Frantova H, Dvorak J, Horn M, Srba J, Talacko P, Mares M,  
714 Schneider E, Craik CS et al: IrCL1 - the haemoglobinolytic cathepsin L of the  
715 hard tick, *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* 2011, 41(12):1253-1262.
- 716 45. Mulenga A, Sugimoto C, Ingram G, Ohashi K, Onuma M: Molecular cloning of  
717 two *Haemaphysalis longicornis* cathepsin L-like cysteine proteinase genes. *J*  
718 *Vet Med Sci* 1999, 61(5):497-502.
- 719 46. Mendiola J, Alonso M, Marquetti MC, Finlay C: *Boophilus microplus*: multiple  
720 proteolytic activities in the midgut. *Exp Parasitol* 1996, 82(1):27-33.
- 721 47. Renard G, Garcia JF, Cardoso FC, Richter MF, Sakanari JA, Ozaki LS,  
722 Termignoni C, Masuda A: Cloning and functional expression of a *Boophilus*  
723 *microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochem Mol Biol* 2000,  
724 30(11):1017-1026.
- 725 48. Renard G, Lara FA, de Cardoso FC, Miguens FC, Dansa-Petretski M,  
726 Termignoni C, Masuda A: Expression and immunolocalization of a *Boophilus*  
727 *microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Mol Biol* 2002, 11(4):325-328.
- 728 49. Estrela AB, Seixas A, Teixeira VeO, Pinto AF, Termignoni C: Vitellin- and  
729 hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae  
730 and females. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2010, 157(4):326-  
731 335.
- 732 50. Estrela A, Seixas A, Termignoni C: A cysteine endopeptidase from tick  
733 (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitellin digestion activity.  
734 *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007, 148(4):410-416.

- 1 735 51. Seixas A, Dos Santos PC, Velloso FF, Da Silva Vaz I, Masuda A, Horn F,  
2 736 Termignoni C: A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine  
3 737 endopeptidase. Parasitology 2003, 126(Pt 2):155-163.  
4 738 52. Seixas A, Estrela AB, Ceolato JC, Pontes EG, Lara F, Gondim KC, Termignoni  
5 739 C: Localization and function of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* vitellin-  
6 740 degrading cysteine endopeptidase. Parasitology 2010, 137(12):1819-1831.  
7 741 53. Oldiges DP, Parizi LF, Zimmer KR, Lorenzini DM, Seixas A, Masuda A, da  
8 742 Silva Vaz I, Termignoni C: A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin  
9 743 with dual peptidase and antimicrobial activity. Int J Parasitol 2012, 42(7):635-  
10 744 645.  
11 745 54. Moolhuijzen PM, Lew-Tabor AE, Morgan JA, Valle MR, Peterson DG, Dowd  
12 746 SE, Guerrero FD, Bellgard MI, Appels R: The complexity of *Rhipicephalus*  
13 747 (*Boophilus) microplus* genome characterised through detailed analysis of two  
14 748 BAC clones. BMC Res Notes 2011, 4:254.  
15 749 55. Houseman JG, Downe A: Activity cycles and the control of four digestive  
16 750 proteinases in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera:  
17 751 Reduviidae). In: J Insect Physiol, vol. 29. Great Britain: Pergamon Press Ltd;  
18 752 1983: 141-148.  
19 753 56. Billingsley PF, Downe AE: The effects of artificial diets on the anterior  
20 754 intestinal cell ultrastructure of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae). Int J  
21 755 Parasitol 1989, 19(3):291-299.  
22 756 57. Cho WL, Tsao SM, Hays AR, Walter R, Chen JS, Snigirevskaya ES, Raikhel  
23 757 AS: Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of  
24 758 vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. J Biol Chem 1999,  
25 759 274(19):13311-13321.  
26 760 58. Tsuji N, Miyoshi T, Battsetseg B, Matsuo T, Xuan X, Fujisaki K: A cysteine  
27 761 protease is critical for *Babesia* spp. transmission in *Haemaphysalis* ticks. PLoS  
28 762 Pathog 2008, 4(5):e1000062.  
29 763 59. Abdul Alim M, Tsuji N, Miyoshi T, Khyrul Islam M, Huang X, Motobu M,  
30 764 Fujisaki K: Characterization of asparaginyl endopeptidase, legumain induced by  
31 765 blood feeding in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. Insect Biochem  
32 766 Mol Biol 2007, 37(9):911-922.  
33 767 60. Alim MA, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Huang X, Hatta T, Fujisaki K:  
34 768 HILgm2, a member of asparaginyl endopeptidases/legumains in the midgut of  
35 769 the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, is involved in blood-meal digestion.  
36 770 J Insect Physiol 2008, 54(3):573-585.  
37 771 61. Alim MA, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Fujisaki K: Legumains from  
38 772 the hard tick *Haemaphysalis longicornis* play modulatory roles in blood feeding  
39 773 and gut cellular remodelling and impact on embryogenesis. Int J Parasitol 2009,  
40 774 39(1):97-107.  
41 775 62. Sojka D, Hajdusek O, Dvorák J, Sajid M, Franta Z, Schneider EL, Craik CS,  
42 776 Vancová M, Buresová V, Bogyo M et al: IrAE: an asparaginyl endopeptidase  
43 777 (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. Int J Parasitol 2007,  
44 778 37(7):713-724.  
45 779 63. Jiang H, Kanost MR: The clip-domain family of serine proteinases in  
46 780 arthropods. Insect Biochem Mol Biol 2000, 30(2):95-105.  
47 781 64. Gaboriaud C, Gregory-Pauron L, Teillet F, Thielens NM, Bally I, Arlaud GJ:  
48 782 Structure and properties of the Ca(2+)-binding CUB domain, a widespread  
49 783 ligand-recognition unit involved in major biological functions. Biochem J 2011,  
50 784 439(2):185-193.

- 1 785 65. Schwarz A, Medrano-Mercado N, Schaub GA, Struchiner CJ, Bargues MD,  
2 786 Levy MZ, Ribeiro JM: An updated insight into the Sialotranscriptome of  
3 787 *Triatoma infestans*: developmental stage and geographic variations. PLoS Negl  
4 788 Trop Dis 2014, 8(12):e3372.
- 5 789 66. Graf R, Raikhel AS, Brown MR, Lea AO, Briegel H: Mosquito trypsin:  
6 790 immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.).  
7 791 Cell Tissue Res 1986, 245(1):19-27.
- 8 792 67. Graf R, Boehlen P, Briegel H: Structural diversity of trypsin from different  
9 793 mosquito species feeding on vertebrate blood. Experientia 1991, 47(6):603-609.
- 10 794 68. Edgar KA, Noriega FG, Bonning BC, Wells MA: Recombinant juvenile  
11 795 hormone esterase, an effective tool for modifying juvenile hormone-dependent  
12 796 expression of the early trypsin gene in mosquitoes. Insect Mol Biol 2000,  
13 797 9(1):27-31.
- 14 798 69. Noriega FG, Pennington JE, Barillas-Mury C, Wang XY, Wells MA: *Aedes*  
15 799 *aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding.  
16 800 Insect Mol Biol 1996, 5(1):25-29.
- 17 801 70. Noriega FG, Wang XY, Pennington JE, Barillas-Mury CV, Wells MA: Early  
18 802 trypsin, a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation,  
19 803 aminoterminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene.  
20 804 Insect Biochem Mol Biol 1996, 26(2):119-126.
- 21 805 71. Barillas-Mury CV, Noriega FG, Wells MA: Early trypsin activity is part of the  
22 806 signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in  
23 807 the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol 1995,  
24 808 25(2):241-246.
- 25 809 72. Brandon MC, Pennington JE, Isoe J, Zamora J, Schillinger AS, Miesfeld RL:  
26 810 TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein  
27 811 synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol  
28 812 2008, 38(10):916-922.
- 29 813 73. Rascón AA, Gearin J, Isoe J, Miesfeld RL: In vitro activation and enzyme  
30 814 kinetic analysis of recombinant midgut serine proteases from the Dengue vector  
31 815 mosquito *Aedes aegypti*. BMC Biochem 2011, 12:43.
- 32 816 74. Isoe J, Rascón AA, Kunz S, Miesfeld RL: Molecular genetic analysis of midgut  
33 817 serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol 2009,  
34 818 39(12):903-912.
- 35 819 75. Brackney DE, Isoe J, W C B, Zamora J, Foy BD, Miesfeld RL, Olson KE:  
36 820 Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases  
37 821 from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. J Insect Physiol 2010,  
38 822 56(7):736-744.
- 39 823 76. Saboia-Vahia L, Cuervo P, Borges-Veloso A, de Souza NP, Britto C, Dias-  
40 824 Lopes G, De Jesus JB: The midgut of *Aedes albopictus* females expresses active  
41 825 trypsin-like serine peptidases. Parasit Vectors 2014, 7:253.
- 42 826 77. Müller HM, Crampton JM, della Torre A, Sinden R, Crisanti A: Members of a  
43 827 trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal.  
44 828 EMBO J 1993, 12(7):2891-2900.
- 45 829 78. Nirmala X, Marinotti O, James AA: The accumulation of specific mRNAs  
46 830 following multiple blood meals in *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol 2005,  
47 831 14(1):95-103.
- 48 832 79. Müller HM, Catteruccia F, Vizioli J, della Torre A, Crisanti A: Constitutive and  
49 833 blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*. Exp Parasitol 1995,  
50 834 81(3):371-385.

- 1 836 80. Dias-Lopes G, Borges-Veloso A, Saboia-Vahia L, Domont GB, Britto C,  
2 837 Cuervo P, De Jesus JB: Expression of active trypsin-like serine peptidases in the  
3 838 midgut of sugar-feeding female *Anopheles aquasalis*. Parasit Vectors 2015,  
4 839 8:296.  
5 840 81. Borges-Veloso A, Saboia-Vahia L, Dias-Lopes G, Domont GB, Britto C,  
6 841 Cuervo P, De Jesus JB: In-depth characterization of trypsin-like serine  
7 842 peptidases in the midgut of the sugar fed *Culex quinquefasciatus*. Parasit  
8 843 Vectors 2015, 8:373.  
9 844 82. Bian G, Raikhel AS, Zhu J: Characterization of a juvenile hormone-regulated  
10 845 chymotrypsin-like serine protease gene in *Aedes aegypti* mosquito. Insect  
11 846 Biochem Mol Biol 2008, 38(2):190-200.  
12 847 83. Jiang Q, Hall M, Noriega FG, Wells M: cDNA cloning and pattern of expression  
13 848 of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. Insect  
14 849 Biochem Mol Biol 1997, 27(4):283-289.  
15 850 84. Vizioli J, Catteruccia F, della Torre A, Reckmann I, Müller HM: Blood  
16 851 digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and  
17 852 biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. Eur J Biochem  
18 853 2001, 268(14):4027-4035.  
19 854 85. Shen Z, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M: A gut-specific serine protease from the  
20 855 malaria vector *Anopheles gambiae* is downregulated after blood ingestion. Insect  
21 856 Mol Biol 2000, 9(3):223-229.  
22 857 86. de Almeida RW, Tovar FJ, Ferreira II, Leoncini O: Chymotrypsin genes in the  
23 858 malaria mosquitoes *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. Insect  
24 859 Biochem Mol Biol 2003, 33(3):307-315.  
25 860 87. Dimopoulos G, Richman A, Müller HM, Kafatos FC: Molecular immune  
26 861 responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites.  
27 862 Proc Natl Acad Sci U S A 1997, 94(21):11508-11513.  
28 863 88. Dimopoulos G, Richman A, della Torre A, Kafatos FC, Louis C: Identification  
29 864 and characterization of differentially expressed cDNAs of the vector mosquito,  
30 865 *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A 1996, 93(23):13066-13071.  
31 866 89. Paskewitz SM, Reese-Stardy S, Gorman MJ: An easter-like serine protease from  
32 867 *Anopheles gambiae* exhibits changes in transcript abundance following immune  
33 868 challenge. Insect Mol Biol 1999, 8(3):329-337.  
34 869 90. Gorman MJ, Andreeva OV, Paskewitz SM: Molecular characterization of five  
35 870 serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. Insect  
36 871 Biochem Mol Biol 2000, 30(1):35-46.  
37 872 91. Gorman MJ, Andreeva OV, Paskewitz SM: Sp22D: a multidomain serine  
38 873 protease with a putative role in insect immunity. Gene 2000, 251(1):9-17.  
39 874 92. Sriwichai P, Rongsriyam Y, Jariyapan N, Apiwathnasorn C, Sattabongkot J,  
40 875 Paskewitz S: Expression of three serine protease genes from the South East  
41 876 Asian malaria vector, *Anopheles dirus*, in relation to blood feeding and parasite  
42 877 infection. Dev Comp Immunol 2008, 32(9):1011-1014.  
43 878 93. Ramalho-Ortigão JM, Kamhawi S, Rowton ED, Ribeiro JM, Valenzuela JG:  
44 879 Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from  
45 880 the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. Insect Biochem Mol  
46 881 Biol 2003, 33(2):163-171.  
47 882 94. Telleria EL, Pitaluga AN, Ortigão-Farias JR, de Araújo AP, Ramalho-Ortigão  
48 883 JM, Traub-Cseko YM: Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in  
49 *Lutzomyia longipalpis*. Arch Insect Biochem Physiol 2007, 66(2):53-63.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1 884 95. Telleria EL, de Araújo AP, Secundino NF, d'Avila-Levy CM, Traub-Csekö YM:  
2 885 Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*--expression, activity and  
3 886 possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. PLoS One 2010,  
4 887 5(5):e10697.
- 5 888 96. Borovsky D, Schlein Y: Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly  
6 889 *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector  
7 890 competence. Med Vet Entomol 1987, 1(3):235-242.
- 8 891 97. Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL: A novel role for  
9 892 the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of  
10 893 the sand fly midgut. Parasitology 1997, 115 ( Pt 4):359-369.
- 11 894 98. Schlein Y, Jacobson RL: Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with  
12 895 *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal.  
13 896 Parasitology 1998, 117 ( Pt 5):467-473.
- 14 897 99. Liu LM, Liu JN, Liu Z, Yu ZJ, Xu SQ, Yang XH, Li T, Li SS, Guo LD, Liu JZ:  
15 898 Microbial communities and symbionts in the hard tick *Haemaphysalis*  
16 899 *longicornis* (Acari: Ixodidae) from north China. Parasit Vectors 2013, 6(1):310.
- 17 900 100. Mulenga A, Sugimoto C, Ingram G, Ohashi K, Misao O: Characterization of  
18 901 two cDNAs encoding serine proteinases from the hard tick *Haemaphysalis*  
19 902 *longicornis*. Insect Biochem Mol Biol 2001, 31(8):817-825.
- 20 903 101. Miyoshi T, Tsuji N, Islam MK, Kamio T, Fujisaki K: Cloning and molecular  
21 904 characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick  
22 905 *Haemaphysalis longicornis*. Insect Biochem Mol Biol 2004, 34(8):799-808.
- 23 906 102. Miyoshi T, Tsuji N, Islam MK, Huang X, Motobu M, Alim MA, Fujisaki K:  
24 907 Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced  
25 908 hemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. J Insect  
26 909 Physiol 2007, 53(2):195-203.
- 27 910 103. Bork P, Beckmann G: The CUB domain. A widespread module in  
28 911 developmentally regulated proteins. J Mol Biol 1993, 231(2):539-545.
- 29 912 104. Miyoshi T, Tsuji N, Islam MK, Alim MA, Hatta T, Huang X, Fujisaki K: A set  
30 913 of serine proteinase paralogs are required for blood-digestion in the ixodid tick  
31 914 *Haemaphysalis longicornis*. Parasitol Int 2008, 57(4):499-505.
- 32 915 105. Motobu M, Tsuji N, Miyoshi T, Huang X, Islam MK, Alim MA, Fujisaki K:  
33 916 Molecular characterization of a blood-induced serine carboxypeptidase from the  
34 917 ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. FEBS J 2007, 274(13):3299-3312.
- 35 918 106. Sojka D, Franta Z, Horn M, Hajdusek O, Caffrey CR, Mares M, Kopáček P:  
36 919 Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an  
37 920 evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. Parasit  
38 921 Vectors 2008, 1(1):7.
- 39 922 107. Nisbet AJ, Billingsley PF: A comparative survey of the hydrolytic enzymes of  
40 923 ectoparasitic and free-living mites. Int J Parasitol 2000, 30(1):19-27.
- 41 924 108. Hasilik A, Neufeld EF: Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts.  
42 925 Synthesis as precursors of higher molecular weight. J Biol Chem 1980,  
43 926 255(10):4937-4945.
- 44 927 109. Kornfeld S: Lysosomal enzyme targeting. Biochem Soc Trans 1990, 18(3):367-  
45 928 374.
- 46 929 110. Borges EC, Machado EM, Garcia ES, Azambuja P: *Trypanosoma cruzi*: effects  
47 930 of infection on cathepsin D activity in the midgut of *Rhodnius prolixus*. Exp  
48 931 Parasitol 2006, 112(2):130-133.
- 49 932 111. Buarque DS, Braz GR, Martins RM, Tanaka-Azevedo AM, Gomes CM,  
50 933 Oliveira FA, Schenkman S, Tanaka AS: Differential expression profiles in the



- 934 midgut of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. PLoS One 2013,  
 1 935 8(5):e61203.
- 2 936 112. Balczun C, Siemanowski J, Pausch JK, Helling S, Marcus K, Stephan C, Meyer  
 3 937 HE, Schneider T, Cizmowski C, Oldenburg M et al: Intestinal aspartate  
 4 938 proteases TiCatD and TiCatD2 of the haematophagous bug *Triatoma infestans*  
 5 939 (Reduviidae): sequence characterisation, expression pattern and characterisation  
 6 940 of proteolytic activity. Insect Biochem Mol Biol 2012, 42(4):240-250.
- 7 941 113. Leyria J, Fruttero LL, Nazar M, Canavoso LE: The Role of DmCatD, a  
 8 942 Cathepsin D-Like Peptidase, and Acid Phosphatase in the Process of Follicular  
 9 943 Atresia in *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), a Vector of Chagas'  
 10 944 Disease. PLoS One 2015, 10(6):e0130144.
- 11 945 114. Logullo C, Vaz IaS, Sorgine MH, Paiva-Silva GO, Faria FS, Zingali RB, De  
 12 946 Lima MF, Abreu L, Oliveira EF, Alves EW et al: Isolation of an aspartic  
 13 947 proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*.  
 14 948 Parasitology 1998, 116 ( Pt 6):525-532.
- 15 949 115. Abreu LA, Valle D, Manso PP, Façanha AR, Pelajo-Machado M, Masuda H,  
 16 950 Masuda A, Vaz I, Lenzi H, Oliveira PL et al: Proteolytic activity of *Boophilus*  
 17 951 *microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification  
 18 952 during embryogenesis. Insect Biochem Mol Biol 2004, 34(5):443-449.
- 19 953 116. Sorgine MH, Logullo C, Zingali RB, Paiva-Silva GO, Juliano L, Oliveira PL: A  
 20 954 heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus*  
 21 955 *microplus*. J Biol Chem 2000, 275(37):28659-28665.
- 22 956 117. Cruz CE, Fogaça AC, Nakayasu ES, Angeli CB, Belmonte R, Almeida IC,  
 23 957 Miranda A, Miranda MT, Tanaka AS, Braz GR et al: Characterization of  
 24 958 proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in  
 25 959 the generation of antimicrobial peptides. Parasit Vectors 2010, 3:63.
- 26 960 118. Boldbaatar D, Sikalizyo Sikasunge C, Battsetseg B, Xuan X, Fujisaki K:  
 27 961 Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from  
 28 962 the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. Insect Biochem Mol Biol 2006,  
 29 963 36(1):25-36.
- 30 964 119. Ugalde AP, Ordóñez GR, Quirós PM, Puente XS, López-Otín C:  
 31 965 Metalloproteases and the degradome. Methods Mol Biol 2010, 622:3-29.
- 32 966 120. Hatfield KJ, Reikvam H, Bruserud Ø: The crosstalk between the matrix  
 33 967 metalloprotease system and the chemokine network in acute myeloid leukemia.  
 34 968 Curr Med Chem 2010, 17(36):4448-4461.
- 35 969 121. Feder D, Salles JM, Garcia ES, Azambuja P: Haemolymph and fat body  
 36 970 metallo-protease associated with *Enterobacter cloacae* infection in the  
 37 971 bloodsucking insect, *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998,  
 38 972 93(6):823-826.
- 39 973 122. Feder D, Gomes S, Garcia E, Azambuja P: Metalloproteases in *Trypanosoma*  
 40 974 *rangeli*-infected *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999, 94(6):771-  
 41 975 777.
- 42 976 123. Assumpção TC, Eaton DP, Pham VM, Francischetti IM, Aoki V, Hans-Filho G,  
 43 977 Rivitti EA, Valenzuela JG, Diaz LA, Ribeiro JM: An insight into the  
 44 978 sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with  
 45 979 fogo selvagem in South America. Am J Trop Med Hyg 2012, 86(6):1005-1014.
- 46 980 124. da Silveira RB, dos Santos Filho JF, Mangili OC, Veiga SS, Gremski W, Nader  
 47 981 HB, von Dietrich CP: Identification of proteases in the extract of venom glands  
 48 982 from brown spiders. Toxicon 2002, 40(6):815-822.

- 1 983 125. Feitosa L, Gremski W, Veiga SS, Elias MC, Graner E, Mangili OC, Brentani  
2 984 RR: Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic,  
3 985 fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles*  
4 986 *intermedia*) venom. *Toxicon* 1998, 36(7):1039-1051.
- 5 987 126. da Silveira RB, Wille AC, Chaim OM, Appel MH, Silva DT, Franco CR, Toma  
6 988 L, Mangili OC, Gremski W, Dietrich CP et al: Identification, cloning,  
7 989 expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease  
8 990 toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem J* 2007,  
9 991 406(2):355-363.
- 10 992 127. Trevisan-Silva D, Gremski LH, Chaim OM, da Silveira RB, Meissner GO,  
11 993 Mangili OC, Barbaro KC, Gremski W, Veiga SS, Senff-Ribeiro A: Astacin-like  
12 994 metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different  
13 995 species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie* 2010, 92(1):21-32.
- 14 996 128. Hsu CC, Wu WB, Chang YH, Kuo HL, Huang TF: Antithrombotic effect of a  
15 997 protein-type I class snake venom metalloproteinase, kistomin, is mediated by  
16 998 affecting glycoprotein Ib-von Willebrand factor interaction. *Mol Pharmacol*  
17 999 2007, 72(4):984-992.
- 20 1000 129. Huang TF, Chang MC, Teng CM: Antiplatelet protease, kistomin, selectively  
21 1001 cleaves human platelet glycoprotein Ib. *Biochim Biophys Acta* 1993,  
22 1002 1158(3):293-299.
- 24 1003 130. Hsu CC, Wu WB, Huang TF: A snake venom metalloproteinase, kistomin,  
25 1004 cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions. *J Thromb*  
26 1005 *Haemost* 2008, 6(9):1578-1585.
- 28 1006 131. Noriega FG, Edgar KA, Bechet R, Wells MA: Midgut exopeptidase activities in  
29 1007 *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. *J Insect Physiol* 2002, 48(2):205-  
30 1008 212.
- 31 1009 132. Goulielmaki E, Sidén-Kiamos I, Loukeris TG: Functional characterization of  
32 1010 Anopheles matrix metalloprotease 1 reveals its agonistic role during sporogonic  
33 1011 development of malaria parasites. *Infect Immun* 2014, 82(11):4865-4877.
- 35 1012 133. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H:  
36 1013 Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-  
37 1014 glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem* 2001,  
38 1015 276(31):29596-29602.
- 40 1016 134. Okamoto T, Akuta T, Tamura F, van Der Vliet A, Akaike T: Molecular  
41 1017 mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during  
42 1018 bacterial infections and respiratory inflammation. *Biol Chem* 2004,  
43 1019 385(11):997-1006.
- 45 1020 135. Mulenga A, Erikson K: A snapshot of the *Ixodes scapularis* degradome. *Gene*  
46 1021 2011, 482(1-2):78-93.
- 47 1022 136. Ali A, Tirloni L, Isezaki M, Seixas A, Konnai S, Ohashi K, da Silva Vaz Junior  
48 1023 I, Termignoni C: Reprolysin metalloproteases from *Ixodes persulcatus*,  
49 1024 *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol*  
50 1025 2014, 63(4):559-578.
- 52 1026 137. Imamura S, da Silva Vaz I, Konnai S, Yamada S, Nakajima C, Onuma M,  
53 1027 Ohashi K: Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from  
54 1028 *Haemaphysalis longicornis*. *Exp Appl Acarol* 2009, 48(4):345-358.
- 56 1029 138. Xu XL, Cheng TY, Yang H, Yan F, Yang Y: De novo sequencing, assembly and  
57 1030 analysis of salivary gland transcriptome of *Haemaphysalis flava* and  
58 1031 identification of sialoprotein genes. *Infect Genet Evol* 2015, 32:135-142.

1032 139. Radulović Ž, Kim TK, Porter LM, Sze SH, Lewis L, Mulenga A: A 24-48 h fed  
1033 *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. BMC Genomics 2014,  
1034 15:518.  
1035 140. Masaki T: Historical review: Endothelin. Trends Pharmacol Sci 2004,  
1036 25(4):219-224.  
1037 141. da Silva DS, de Oliveira CF, Parra JR, Marangoni S, Macedo ML: Short and  
1038 long-term antinutritional effect of the trypsin inhibitor ApTI for biological  
1039 control of sugarcane borer. J Insect Physiol 2014, 61:1-7.  
1040 142. Chraïbi A, Vallet V, Firsov D, Hess SK, Horisberger JD: Protease modulation of  
1041 the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus oocytes*. J  
1042 Gen Physiol 1998, 111(1):127-138.

1043

1044

1045 **Figure Legends**

1  
2 1046 **Fig. 1** Haemoglobin digestion in mosquitoes and ticks. (A) Host erythrocytes undergo  
3  
4 1047 lysis and release haemoglobin (Hb) and other proteins in the lumen of the midgut (1). In  
5  
6 1048 mosquitoes, proteases are secreted in the gut lumen for initial Hb extracellular digestion  
7  
8  
9 1049 (2), generating peptides that will be further internalized and hydrolyzed in the epithelial  
10  
11 1050 cells (3). Upon degradation of Hb, free heme must be detoxified (4). (B) In ticks, Hb is  
12  
13  
14 1051 internalized by receptor-mediated endocytosis (2), and directed to large endosomal  
15  
16 1052 vesicles that fuse with lysosomes containing cysteine and aspartic proteases where it is  
17  
18 1053 degraded (3). Upon degradation of Hb, free heme must be detoxified (4).

20  
21 1054

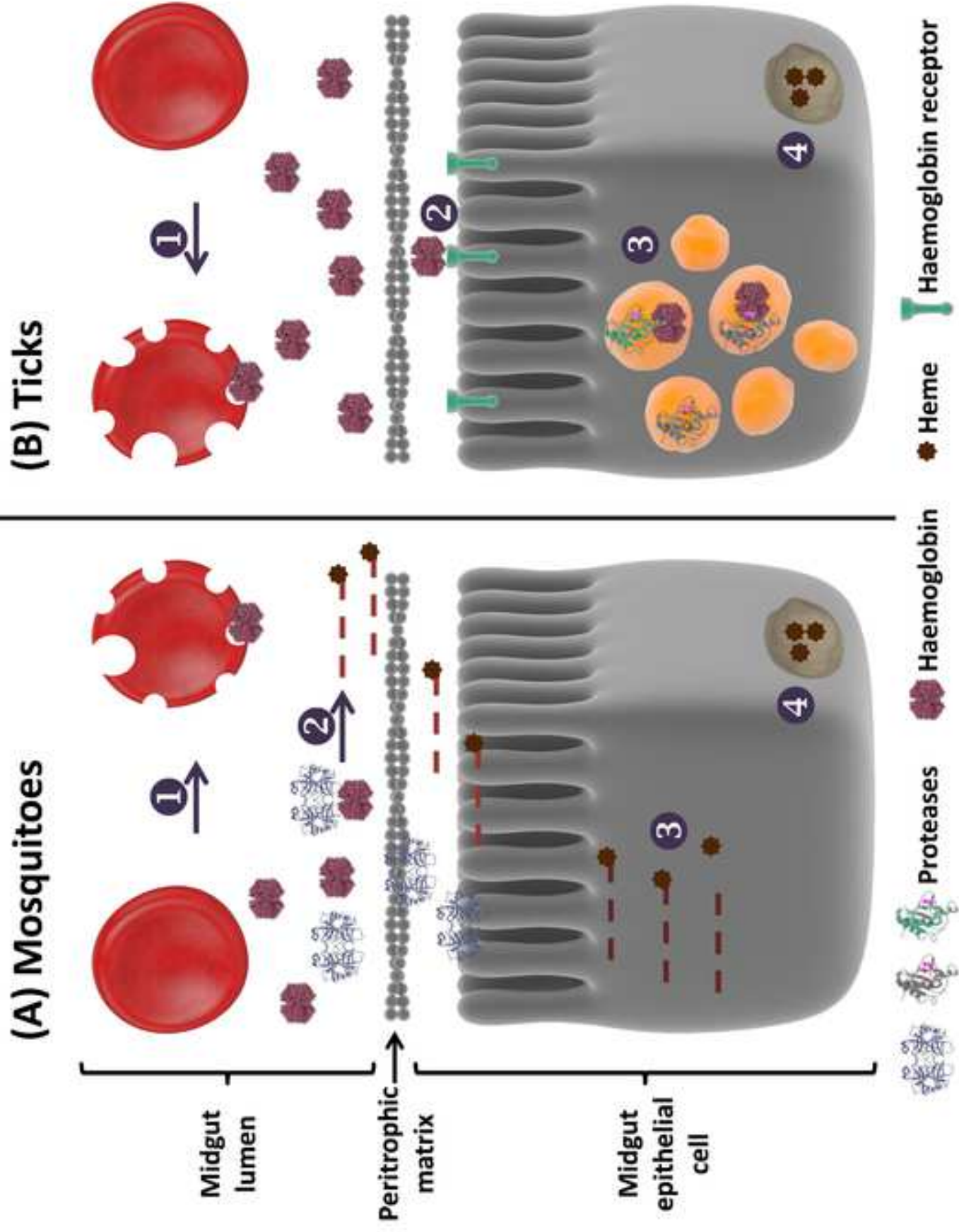
22  
23 1055 **Fig. 2** Hormonal control of yolk formation. There are three invertebrate hormones that  
24  
25  
26 1056 play major roles in yolk formation. Young females have a high level of juvenile  
27  
28 1057 hormone (JH), which is produced by corpora allata located in the arthropod brain and  
29  
30  
31 1058 acts on fat body and ovaries (1). Upon a blood meal, the JH level drops in haemolymph,  
32  
33 1059 and egg development neurosecretory hormone (EDNH) (2) level increases to stimulate  
34  
35 1060 the release of ecdysone (Ec) (3) by ovaries that is converted in 20-hydroxyecdysone  
36  
37 1061 (20-HE) in the fat body. Together with 20-HE, the nutrients consumed during the blood  
38  
39 1062 meal stimulate the expression and secretion, by fat body cells, of yolk precursor proteins  
40  
41 1063 (YPP) (4) that are essentials in vitellogenesis.

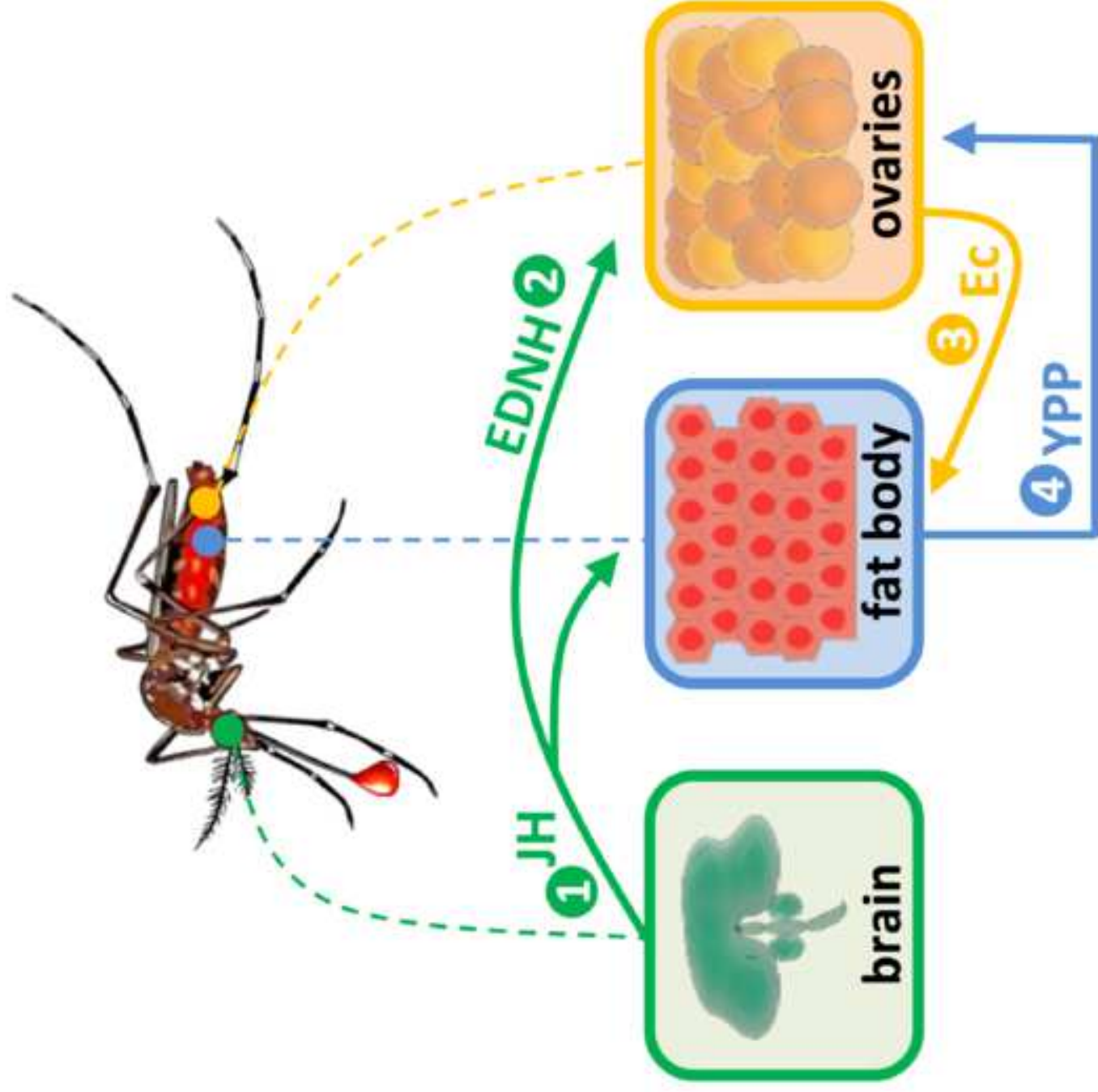
42  
43 1064

44  
45  
46 1065 **Fig. 3** Overview of proteases from haematophagous arthropods. The columns show  
47  
48 1066 proteases reported in: (A) ticks, arthropods from Arachnida class; and also in (B)  
49  
50 1067 Diptera (Culicidae) and (C) Hemiptera (Reduviidae:Triatomine), orders from Insecta  
51  
52 1068 class. The colors used group the proteases according to their biological function as  
53  
54 1069 follows: orange, digestion; blue, haematophagy; green, immunity; and red, yolk  
55  
56 1070 formation. The symbols above the words add the following information: black triangle,  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

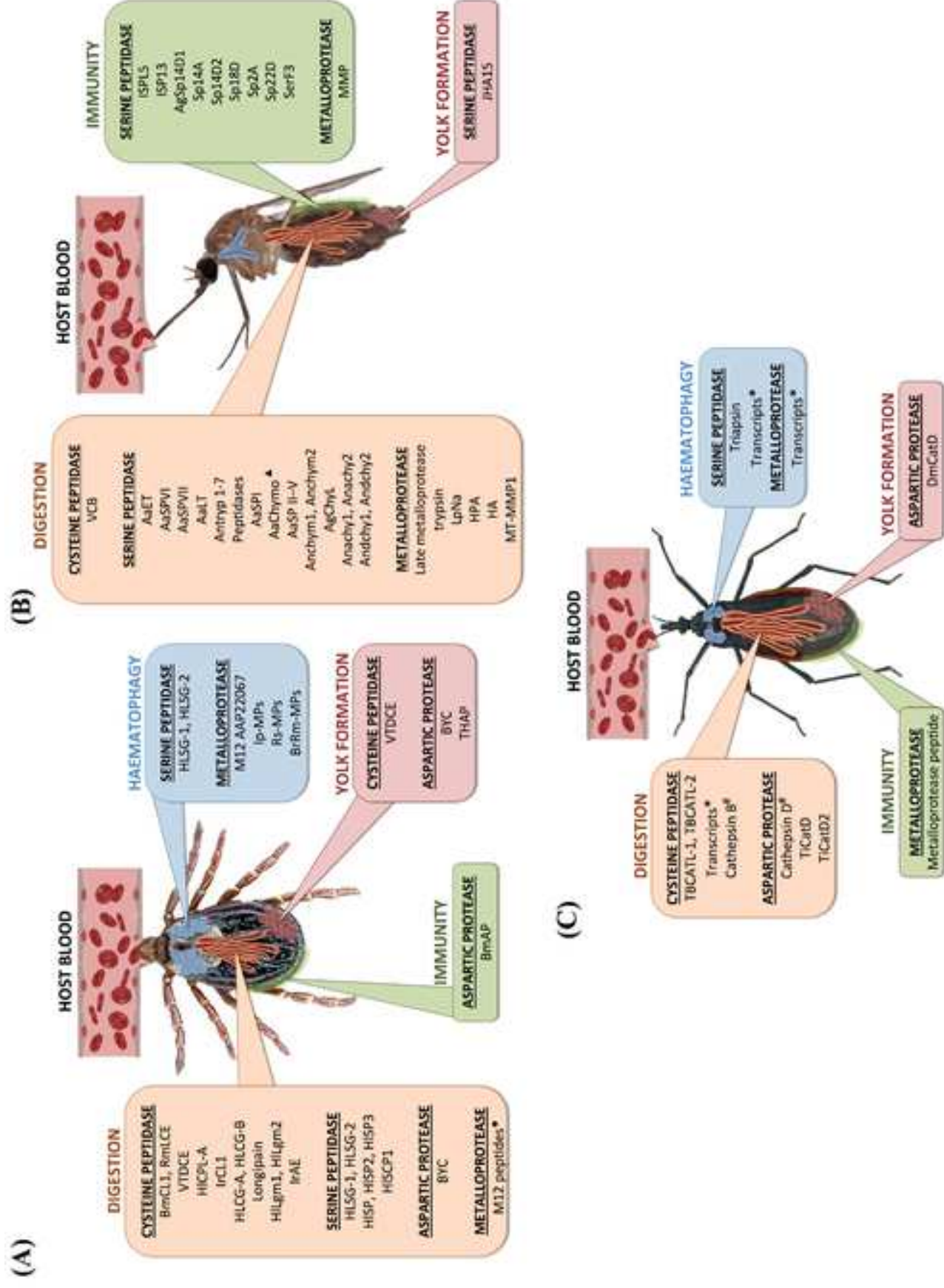
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1071 proteins identified using proteomic approach; black circle, proteases described through  
1072 in silico analysis; asterisk, sequences obtained using transcriptomic approach; hashtag,  
1073 protease activity derived from tissue extracts (midgut or salivary gland).  
1074  
**1075 Additional files**  
**1076 Additional table file 1** Characteristics of proteases from hematophagous arthropods  
1077  
**1078 Additional file 2** Overview of multiple sequence alignment of ten predicted Cathepsin  
1079 L from *R. (B.) microplus*. The alignments were performed by Multiple Sequence  
1080 Comparison - Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), and manually  
1081 edited using Aline (<http://bondxray.org/software/aline.html>). Black – fully conserved  
1082 residues. Gray – not conserved residues. Blue – catalytic residues.  
1083









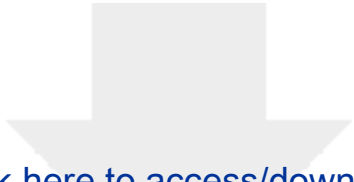




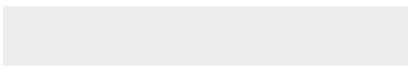



Click here to access/download  
**Supplementary Material**  
Additional file 1.pdf






Click here to access/download  
**Supplementary Material**  
Additional file 2.bmp



Dear Editors,

All authors of this manuscript declare that we have seen and approved the submitted version of this manuscript.


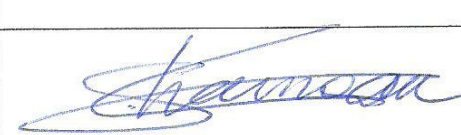
Yours faithfully,

Name	Date	Signature
Jaime M. Santana	10/06/2016	

Dear Editors,

All authors of this manuscript declare that we have seen and approved the submitted version of this manuscript.

Yours faithfully,

Name	Date	Signature
Paula Beatriz Santiago	10/06/2016	
Carla Nunes de Araújo	10/06/2016	
Flávia Nader Motta	10/06/2016	
Yanna Reis Praça	10/06/2016	
Sébastien Charneau	10/06/2016	
Izabela M. Dourado Bastos	10/06/2016	



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB  
Instituto de Ciências Biológicas  
Laboratório de Interação Patógeno- Hospedeiro  
Phone: +556131073053

---

Brasília, June 14<sup>th</sup>, 2016

Dr. Filipe Dantas-Torres,  
Editor of *Vector-borne zoonoses and One Health* section  
Parasites & Vectors

Dear Dr. Dantas-Torres,

Please, find the enclosed review manuscript for your appreciation, entitled **“Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood feeding, yolk formation and immunity - a review”**.

This manuscript brings a review on proteases of haematophagous arthropods vectors of diseases. These enzymes have central roles in many physiological processes and we emphasize their involvement in haematophagy, digestion, yolk formation, and immunity.

Transmission of parasites by arthropods is crucially dependent on successful blood feeding, a process mediated by saliva injected at the site of feeding to counteract host haemostasis, inflammation, and immune responses. Knowledge about proteases repertoire could lead to improved strategies for disrupting parasite transmission, allowing the prevention of new cases of vector-borne diseases. Likewise, comparison of insects and ticks physiology may reveal common and/or different patterns among them helping to highlight the potential targets.

I declare that all authors have contributed significantly to the manuscript and that they are in agreement with its content. This manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by another journal.

I suggest the following as potential peer reviewers, as they are experts in their respective fields:

- **Claudia Masini d’Avila Levy.** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Laboratório de Estudos Integrados em Prtozoologia, Av. Brasil 4365. Manguinhos. 21045-900, Rio de Janeiro, Brasil. [davila.levy@ioc.fiocruz.br](mailto:davila.levy@ioc.fiocruz.br)
- **Jose Marcos Chaves Ribeiro.** Vector Biology Section. Laboratory of Malaria

and Vector Research. National Institute of Allergy and Infectious Diseases.  
TW3 BG RM 2E32. 12735 Twinbrook PKWY. Rockville MD 20852.  
[jose.ribeiro@nih.gov](mailto:jose.ribeiro@nih.gov)

- **Theresa HT Coetzer.** Rabie Saunders Building, no: 31. University of KwaZulu-Natal, Durban. [Coetzer@ukzn.ac.za](mailto:Coetzer@ukzn.ac.za)

Sincerely yours,

A handwritten signature in blue ink, reading "Jaime Martins de Santana". The signature is written in a cursive style with a large initial "J" and a long horizontal stroke extending to the right.

Jaime Martins de Santana, Ph.D  
Department of Cell Biology  
University of Brasilia, Brazil  
E-mail: [jsantana@unb.br](mailto:jsantana@unb.br)