



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular  
Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

**Expressão de antígenos salivares e avaliação da atividade apirásica  
salivar do triatomíneo *Rhodnius neglectus*, vetor da doença de Chagas**

DÉBORAH BIANCA SANTOS MARTINS

Brasília - DF

2018

DÉBORAH BIANCA SANTOS MARTINS

**Expressão de antígenos salivares e avaliação da atividade apirásica  
salivar do triatomíneo *Rhodnius neglectus*, vetor da doença de Chagas**

Orientador: Dr. Jaime Martins de Santana  
Co-Orientadora: Dra. Carla Nunes de Araújo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília - Faculdade de Medicina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília - DF  
2018

Pesquisa realizada no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) -  
Departamento de Biologia Celular - Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAP-DF.

**Dedico ao meu pai e aos meus avós maternos,  
pelo amor e apoio incondicional durante toda  
minha jornada, mesmo que parte dela tenha  
sido longe de seus braços.**

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, professor Dr. Jaime Santana, pela oportunidade, orientação e confiança durante todo o tempo de realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Carla Nunes, uma pessoa brilhante, carinhosa e amiga. Obrigada pelo incentivo, paciência e ensinamentos. Serei eternamente grata por ter me recebido e me conduzido na vida acadêmica e científica.

Às professoras Dr<sup>a</sup> Izabela Bastos e Dr<sup>a</sup> Flávia Motta, pelo apoio diário, incentivo e valiosas sugestões.

A todos os colegas do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro por serem acolhedores e prestativos, obrigada pelos momentos de aprendizado, reflexão e diversão. E em especial à Marta Rosa, Sofia Silva e Kaio Bentes pelo apoio durante as atividades desenvolvidas neste trabalho.

Aos meus familiares, minha mãe Dircilene Santos, meu irmão Wesley Santos e minha cunhada Rita de Cássia, pelo exemplo constante de luta e humildade. Obrigada pela compreensão e carinho, e mesmo distantes sempre me apoiaram e incentivaram.

Às minhas amigas Beatriz Pereira, Nathália Soares e Nayara Trigueiro, pessoas que acompanharam de perto esse desafio e facilitaram a caminhada com palavras e gestos acalmadores.

Ao Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, pela colaboração na identificação das proteínas, principalmente ao Prof. Sébastien Charneau e ao pós-doutorando Samuel Mandacaru.

À Adriana Xavier, ao Weverton Carlos e Juliana Batista pelo auxílio na manutenção das colônias de barbeiros no Biotério do IB.

Aos membros da banca examinadora por participarem da defesa da dissertação.

Ao CNPq, CAPES e FAPDF pelo financiamento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina - UnB pela oportunidade de realização do mestrado.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIações.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	2
LISTA DE TABELAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
1.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS.....	9
1.2 A DOENÇA DE CHAGAS.....	10
<b>1.2.1 A descoberta da doença e suas formas de transmissão.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.2 O agente causador, seu ciclo de vida e as fases da doença.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.3 O tratamento.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.4 Epidemiologia.....</b>	<b>16</b>
1.3 OS TRIATOMÍNEOS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS.....	18
<b>1.3.1 Gênero <i>Rhodnius</i>.....</b>	<b>20</b>
1.4 A DINÂMICA DA INTERAÇÃO TRIATOMÍNEO-HOSPEDEIRO.....	22
<b>1.4.1 O impacto da saliva na hemostasia do hospedeiro.....</b>	<b>23</b>
1.4.1.1 Vasodilatadores e inibidores da vasoconstrição.....	25
1.4.1.2 Inibidores da agregação plaquetária.....	26
1.4.1.3 Inibidores da cascata de coagulação sanguínea.....	27
1.5 PROTEÍNAS SALIVARES DE ANIMAIS HEMATÓFAGOS E SEU USO NA PRÁTICA CLÍNICA.....	28
1.6 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES SALIVARES DE TRIATOMÍNEOS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS.....	29
1.7 PROTEÍNAS DE INTERESSE.....	31
<b>1.7.1 Triabinas.....</b>	<b>31</b>
<b>1.7.2 Antígeno 5.....</b>	<b>32</b>
<b>1.7.3 Apirases.....</b>	<b>33</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	36
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>

4.1 PRODUZIR TRIABINA E ANTÍGENO 5 RECOMBINANTES DA SALIVA DE <i>R. NEGLECTUS</i> .....	37
4.1.1 Seleção e análise <i>in silico</i> das sequências de <i>R. neglectus</i> .....	38
4.1.2 Sequências das proteínas salivares de interesse clonadas .....	38
4.1.3 Linhagens de bactérias utilizadas.....	39
4.1.4 Transformação de <i>E. coli</i> com pET100/D-TOPO_triabina e pET100/D-TOPO_antígeno 5 .....	40
4.1.5 Indução e expressão das proteínas recombinantes.....	40
4.1.6 Análise da solubilidade por SDS-PAGE.....	41
4.1.7 <i>Western blotting</i> .....	41
4.1.8 Purificação .....	42
4.1.9 Imunização de camundongos com rAG5 ou rTRI .....	44
4.1.10 Criação de triatomíneos .....	44
4.1.11 Obtenção da saliva .....	45
4.1.12 Análise da reatividade cruzada com anticorpos anti-rAG5 e anti-rTRI de <i>R. neglectus</i> .....	45
4.2 VERIFICAR A PRESENÇA DE ATIVIDADE APIRÁSICA NA SALIVA DE <i>RHODNIUS NEGLECTUS</i> .....	46
4.2.1 Análise da atividade apirásica em solução .....	47
4.2.2 Análise da atividade apirásica por zimografia em gel .....	47
4.2.3 Preparo de amostras para espectrometria de massas.....	48
4.2.4 LC-MS/MS e análise dos dados .....	48
4.2.5 Análise da reatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de <i>R. prolixus</i> .....	50
4.2.6 Inibição da agregação plaquetária .....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1 ANTÍGENO 5 E TRIABINA .....	51
5.1.1 Análise <i>in silico</i> das sequências do antígeno 5 e da triabina da saliva de <i>R. neglectus</i> .....	51
5.1.2 Expressão das proteínas recombinantes rAG5 e rTRI .....	54
5.1.3 Purificação de rAG5, rTRI e produção de anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes .....	56
5.1.4 Antígeno 5 e triabina de <i>R. prolixus</i> e <i>T. infestans</i> detectados por anticorpos anti-rAG5 e anti-rTRI de <i>R. neglectus</i> .....	59
5.1.5 Produção e purificação de rTRI da fração solúvel de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	60

5.1.6 Estimulação da salivação com pilocarpina .....	61
5.2 ATIVIDADE APIRÁSICA DA SALIVA DE <i>R. NEGLECTUS</i> .....	62
5.2.1 Análise da atividade apirásica da saliva de <i>R. neglectus in vitro</i> .....	62
5.2.2 Análise da atividade apirásica da saliva de <i>R. neglectus</i> por zimografia em gel e identificação das proteínas por espectrometria de massas.....	63
5.2.3 Apirase de <i>R. neglectus</i> detectada por anticorpos policlonais anti-apirase de <i>R. prolixus</i> .....	65
5.2.4 Inibição da agregação plaquetária .....	66
6. DISCUSSÃO .....	67
6.1 EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS SALIVARES DE <i>R. NEGLECTUS</i> EM SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTERIANO.....	67
6.2 ATIVIDADE APIRÁSICA SALIVAR DE <i>R. NEGLECTUS</i> .....	70
7. CONCLUSÕES.....	72
8. PERSPECTIVAS.....	73
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS .....	87

## LISTA DE ABREVIACOES

**ADP** – Adenosina difosfato

**AG5** – Antígeno 5

**AMP** – Adenosina monofosfato

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BENEFIT** – *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*

**CaCl<sub>2</sub>** – Cloreto de cálcio

**DNA** – cido desoxirribonucleico

**DTNs** – Doenças tropicais negligenciadas

**EDTA** – Etileno bis (oxi-etilenonitrilo) do ácido tetraacético

**HCl** – cido clorídrico

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

**KCl** – Cloreto de potássio

**kDa** – Kilodalton

**LB** – Luria Bertani

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

**NaCl** – Cloreto de sódio

**OMS** – Organizao Mundial da Saúde

**OPAS** – Organizao Pan-Americana da Saúde

**OPS** – ORGANIZACO PANAMERICANA DE LA SALUD

**PBS** – *Phosphate-buffered saline*

**PPP** – Plasma pobre em plaquetas

**PRP** – Plasma rico em plaquetas

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

**TBS** – *Tris-buffered saline*

**TRI** – Triabina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*. (1) No momento do repasto sanguíneo, o triatomíneo ingere tripomastigotas presentes na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado. (2) No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e multiplicam-se. (3-4) Já no intestino posterior, ocorre a transformação em tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes que são eliminadas junto com as fezes, e estes entram pelo local da picada ou mucosas do hospedeiro. (5) Os tripomastigotas metacíclicos penetram em vários tipos celulares. (6) Eles se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária nas células infectadas (7-8) Os amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneos, rompem a membrana celular, caem na corrente sanguínea e podem invadir novas células. Quando ingeridos pelos barbeiros, iniciam um novo ciclo. Fonte: BERN, 2011 (modificado). ..... 13

Figura 2: Distribuição de casos de infecção por *T. cruzi*, estimativa oficial da OMS entre 2006-2010. Fonte: *Second WHO report on neglected tropical disease / WHO*, 2013 (modificado)..... 17

Figura 3: Estágios de desenvolvimento do triatomíneo da espécie *Rhodnius neglectus*. Ovos embrionados e não embrionados, (1-5) ninfas de 1° a 5° estágios e o inseto adulto. FONTE: Martins, 2017..... 19

Figura 4: Par de glândulas salivares principais de *R. neglectus*. Coloração avermelhada pela presença de heme proteínas. FONTE: Martins, 2016..... 21

Figura 5: Representação esquemática da metodologia empregada para produzir triabina e antígeno 5 recombinantes da saliva de *R. neglectus*. ..... 37

Figura 6: Vetor de expressão pET100/D-TOPO. Fonte: ThermoFisher Scientific. .... 39

Figura 7: Representação esquemática da metodologia empregada para verificar a presença de atividade apirásica na saliva de *R. neglectus*..... 46

Figura 8: Reação baseada no método colorimétrico correspondente à liberação de fosfato inorgânico (Pi) a partir dos substratos ATP, ADP e AMP. .... 47

Figura 9: (A) Sequência nucleotídica do cDNA de antígeno 5 de *R. neglectus*, contendo 825 pares de bases. (B) Sequência aminoácídica do produto do cDNA de antígeno 5 de *R. neglectus*, contendo 274 resíduos de aminoácidos. (C) Sequência nucleotídica do cDNA de triabina de *R. neglectus*, contendo 543 pares de bases. (D) Sequência aminoácídica do produto do cDNA de triabina

de *R. neglectus*, contendo 180 resíduos de aminoácidos. Em rosa está demarcado o peptídeo sinal e em negrito o domínio que de fato às caracterizam como proteínas antígeno 5 e triabina, respectivamente. .... 52

Figura 10: Análise da expressão das proteínas recombinantes rAG5 e rTRI na fração insolúvel de Rosetta2(DE3)pLysS induzidas a 37°C por 3 h com 1 mM IPTG. Amostra de 10 µL foi aplicada em cada poço. A- Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. B- *Western blotting*. (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. C- Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie Blue. (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. D- *Western blotting* (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. .... 55

Figura 11: Análise da expressão das proteínas recombinantes rAG5 e rTRI na fração insolúvel de BL21(DE3) induzidas a 37°C por 3 h com 1 mM IPTG. Amostra de 10 µL foi aplicada em cada poço. A- Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Prestained Protein Ladder – Invitrogen, (AI) antes da indução, (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. B- *Western blotting* (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. C- Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. D- *Western blotting*. (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. .... 55

Figura 12: Análise da expressão da proteína recombinante rTRI na fração solúvel de BL21(DE3) induzida a 15°C por 20 h com 0,4 mM IPTG. Amostra de 10 µL foi aplicada em cada poço. A- Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. B- *Western blotting*. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. .... 56

Figura 13: Purificação da fração insolúvel de rAG5 por cromatografia de afinidade em níquel, utilizando His-tag. Em cada poço do gel foi aplicado 10 µL de cada amostra. Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS) fração solúvel, (AI) antes da indução, (CI) corpos de inclusão (NL) fração não ligada, (5-300 mM imidazol). .... 57

Figura 14: Purificação da fração insolúvel de rTRI por cromatografia de afinidade em níquel, utilizando His-tag. Em cada poço do gel foi aplicado 10 µL de cada amostra. Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS)

fração solúvel, (AI) antes da indução, (CI) corpos de inclusão, (NL) fração não ligada, (5-300 mM imidazol). ..... 57

Figura 15: *Western blotting* de rAG5 e rTRI purificadas e concentradas em filtro Amicon® 10K (Millipore). Foi aplicado 10 µL de cada amostra. (AP) antes da purificação, (P) purificada e concentrada. .... 58

Figura 16: *Western blotting* dos soros pré-imune e imune anti-rAG5 e anti-rTRI produzidos pelos camundongos 3, diluídos 1:100. Foram utilizados 5 µg de rAG5 e rTRI e 30 µg de saliva total de *R. neglectus*. .... 59

Figura 17: *Western blotting* dos soros pré-imune e imune dos anticorpos policlonais anti-AG5 e anti-TRI produzidos pelos camundongos 3, diluídos 1:100. Foram utilizados 10 µg de extrato salivar em cada poço respectivo às espécies. .... 60

Figura 18: Purificação da fração solúvel de rTRI do lisado de *E. coli* BL21(DE3) por cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando His-tag. Em cada poço do gel foram aplicados 10 µl de cada fração. Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (ET) extrato total, (NL) fração não ligada, (5-300 mM de imidazol). ..... 61

Figura 19: Análise em SDS-PAGE e *western blotting* da rTRI purificada da fração solúvel do lisado de *E. coli* BL21(DE3) e dessalinizado em saco de diálise. Foram aplicados 5 µg da rTRI. A- Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (1) rTRI. B- *Western blotting* utilizando anticorpo primário anti-His. .... 61

Figura 20: Análise do perfil protéico da saliva de *R. neglectus* após estimulação da salivação com pilocarpina. SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. (M) marcador de peso molecular (kDa; BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen), (1) 5 µg de proteínas após dissecação de um par de glândulas salivares, (2) 5 µg de proteínas da saliva ejetada após injeção de pilocarpina. 62

Figura 21: Curva de fosfato inorgânico (Pi)..... 62

Figura 22: Zimografia em gel. Gel poliacrilamida 10% incubado por 16 h em solução de atividade contendo ADP e ATP. Ambos com 30 µg de extrato salivar de *R. neglectus*. Os (\*) representam as bandas numeradas em 4, 5 e 6 excisadas para identificação por espectrometria..... 64

Figura 23: Análise da reatividade cruzada do soro anti-apirase de *R. prolixus* com a apirase de *R. neglectus*. *Western blotting*. Foram aplicados 10 µg de saliva total em cada poço e o soro imune diluído 1:100. .... 65

Figura 24: Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP. Diferentes concentrações de proteínas de *R. neglectus* (2, 4, 6, 8 e 10 µg/µL) foram incubadas com plasma rico em plaquetas (PRP) a 37 °C por 5 min antes da adição de 5 µM ADP. A absorbância foi medida durante 5 min. O controle consistiu de incubação de PRP na ausência de saliva. Ensaio feito em triplicata.  $p < 0.0001$  com ANOVA, seguido de um teste de média a um nível de significância de 5%. (A letra “e” significa que não houve diferença significativa entre as médias)..... 66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise <i>in silico</i> das sequencias aminoacídica de antígeno 5 e triabina. ....	54
Tabela 2: Atividade apirásica <i>in vitro</i> da saliva de <i>R. neglectus</i> . ....	63
Tabela 3: Apirases das bandas 4, 5 e 6 do zimograma identificadas por LC-MS/MS. ....	65

## RESUMO

*Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae) é um vetor potencial do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Ele apresenta em suas glândulas salivares moléculas importantes que neutralizam os mecanismos hemostáticos do hospedeiro, auxiliam na alimentação sanguínea e, de forma indireta, na transmissão do *T. cruzi*. Assim, a saliva desse inseto hematófago se torna um relevante alvo de pesquisas devido à presença de moléculas com elevado potencial farmacológico. Este estudo teve por objetivos, a expressão heteróloga de membros das famílias de proteínas salivares triabina e antígeno 5 e a avaliação da atividade apirásica salivar de *R. neglectus*. As sequências nucleotídicas das proteínas foram obtidas a partir do transcriptoma de *R. neglectus*, clonadas no vetor pET100/D-TOPO e expressas em bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3). Ambas as proteínas recombinantes, triabina e antígeno 5, foram observadas na fração insolúvel após a lise das bactérias. Essas foram purificadas por cromatografia de afinidade e usadas para a produção de anticorpos policlonais em camundongos, os quais reagiram cruzadamente com antígenos das salivas das espécies *R. prolixus* e *T. infestans*. Após a otimização do protocolo de expressão, somente a triabina foi expressa na fração solúvel do lisado bacteriano. A atividade apirásica também foi avaliada na saliva de *R. neglectus* em solução e por zimografia em gel. As proteínas salivares com atividade apirásica foram identificadas por espectrometria de massas das bandas excisadas do zimograma contendo ADP como substrato. Os anticorpos anti-apirase de *R. prolixus* reagiram cruzadamente com antígenos da saliva de *R. neglectus*. Os resultados mostram que há espécies nas tribos Rhodniini e Triatomini que compartilham epítomos semelhantes de triabina, antígeno 5 e apirase. Como perspectiva, a triabina recombinante solúvel poderá ser avaliada como potencial marcador de exposição aos triatomíneos, bem como ter determinadas as suas potenciais atividades farmacológicas e contribuir na compreensão das interações dinâmicas hospedeiro-vetor.

**Palavras-chaves:** Triatomíneo, proteínas salivares, triabina, antígeno 5, apirase.

## ABSTRACT

*Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae) is a potential vector for *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. It presents in its salivary glands important molecules that neutralize the hemostatic mechanisms of the host, assist in the blood supply and in *T. cruzi* transmission. The saliva of this hematophagous insect is, therefore, a research target due to the presence of molecules with pharmacological potential. In this study, the heterologous expression of members from triabin and antigen 5 families and the evaluation of *R. neglectus* salivary apyrase activity are reported. Protein nucleotide sequences were selected from *R. neglectus* transcriptome, cloned into pET100/D-TOPO vector and expressed in *Escherichia coli* strain BL21(DE3). Both recombinant proteins, triabin and antigen 5, were observed in the insoluble fraction after bacterial lysis. They were purified by affinity chromatography and used to raise polyclonal antibodies in mice, which cross-reacted with antigens from saliva of *R. prolixus* and *Triatoma infestans*. After optimization of the expression protocol, only triabin was expressed in the bacterial soluble fraction. Apyrase activity was also evaluated in *R. neglectus* saliva, both in solution and by in gel zymography. Salivary proteins with apyrase activity were identified by mass spectrometry of bands excised from the zymogram containing ADP as substrate. *R. prolixus* anti-apyrase antibodies cross-reacted with *R. neglectus* salivary antigens. Results show that species from both Rhodniini and Triatomiini tribes share similar antigen 5, triabin, and apyrase epitopes. As a perspective, soluble recombinant triabin can be evaluated as biomarker candidate to triatomine exposure, for potential pharmacological activities and may contribute in the understanding of host-vector dynamic interactions.

**Keywords:** Triatomine, salivary proteins, triabin, antigen 5, apyrase.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) representam um conjunto de 17 doenças infecciosas que historicamente não têm recebido atenção adequada nos níveis local, nacional e internacional, o que resulta em falta de investimento no desenvolvimento de drogas, vacinas e programas para seu tratamento e prevenção. Elas impactam principalmente as populações da faixa tropical do planeta, concentradas em regiões de menor progresso socioeconômico (WHO, 2013), e são uma barreira para o desenvolvimento de esforços que visam aliviar a pobreza e melhorar a saúde humana nessa região (MACKEY et al., 2014). Além disso, moradias inadequadas, desnutrição, falta de água tratada, de saneamento básico e de serviços de saúde são fatores que aceleram a disseminação dessas doenças (LINDOSO & LINDOSO, 2009).

Aproximadamente 1 bilhão de pessoas são afetadas por uma ou mais DTNs (dengue, raiva, tracoma, úlcera buruli, treponematose endêmica, lepra, doença de Chagas, tripanossomíase africana humana, leishmaniose, esquistossomose, teníase/cisticercose, filariose linfática, entre outras). Essas DTNs são causadas por vírus, bactérias, protozoários ou helmintos e matam cerca de 500 mil pessoas a cada ano no mundo, além de enfraquecer e incapacitar outras tantas, resultando em efeitos negativos na qualidade de vida e na produtividade do trabalhador, com impacto social e econômico significativo nos países (WHO, 2006).

Muitas dessas DTNs são zoonoses e/ou doenças transmitidas por vetores. O controle da exposição humana aos vetores e aos animais reservatórios pode quebrar o ciclo das doenças e proteger as populações susceptíveis, sendo uma estratégia crítica de prevenção na ausência de vacinas e tratamento efetivos (WHO, 2010). Porém, as habitações precárias nos países endêmicos para as DTNs podem servir de habitat para os vetores, sendo um determinante de risco importante para a transmissão de algumas dessas doenças, além de dificultar as tentativas de controle vetorial, levando ao aumento da exposição (HOTEZ et al., 2008). O controle vetorial deve ser

iniciado pela vigilância da população de vetores, que inclui também o estudo de sua biologia.

Nesse cenário, o presente trabalho traz conhecimentos acerca de proteínas salivares de *Rhodnius neglectus*, um dos triatomíneos vetores da doença de Chagas. Esta doença é uma das principais DTNs encontradas no Brasil, uma doença infecciosa emergente e reemergente devido aos desafios associados com sua prevenção, sua expansão geográfica e ao seu impacto negativo para o progresso econômico e social (MACKKEY & LIANG, 2012).

## 1.2 A DOENÇA DE CHAGAS

### 1.2.1 A descoberta da doença e suas formas de transmissão

Em 1907, o médico Carlos Chagas, a pedido do sanitarista Oswaldo Cruz, viajou para o norte de Minas Gerais para controlar um surto de malária. Após um ano de sua presença, já com o surto controlado, Carlos Chagas percebeu a presença de um inseto hematófago com hábitos noturnos, chamado de “barbeiro”, no interior das habitações humanas e decidiu investigá-los. No intestino desses insetos, encontrou formas flageladas identificadas como *Schizotrypanum cruzi* na Fundação Oswaldo Cruz. Entre 1909 e 1912, Carlos Chagas levou ao conhecimento mundial uma nova enfermidade: seu vetor e seu agente etiológico. A doença então passou a ser denominada doença de Chagas (CHAGAS, 1909).

A descoberta dessa doença foi considerada um dos mais relevantes acontecimentos médicos nas Américas (SCHMUNIS, 1997) e da história da medicina tropical (COURA & BORGES-PEREIRA, 2010). A doença de Chagas, também chamada tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). É uma zoonose endêmica em 21 países do continente americano, onde 8 milhões de pessoas podem estar infectadas por esse parasito, e causa a morte de aproximadamente 10 mil indivíduos anualmente (WHO, 2018), destacando que a disseminação da doença tem sido observada também em regiões não endêmicas (NUNES et al, 2013).

O protozoário causador dessa doença infecta animais silvestres e domésticos, sendo transmitido principalmente pelas fezes contaminadas de insetos hemípteros da subfamília Triatominae, encontrados naturalmente nas

Américas e que se alimentam do sangue de animais vertebrados. Existem três ciclos de transmissão vetorial na natureza: o selvagem, o peridoméstico e o doméstico. O ciclo selvagem é enzoótico, ou seja, endêmico em uma determinada área, mantido por triatomíneos e animais silvestres contaminados pelo *T. cruzi*. O peridoméstico é originado a partir do ciclo selvagem, mantendo a infecção entre os animais domésticos em áreas próximas às habitações humanas. E o doméstico é mantido por triatomíneos adaptados ao ambiente humano, transmitindo a infecção aos animais domésticos e eventualmente ao homem (COURA & DIAS, 2009).

A doença pode ser transmitida também por consumo de alimentos contaminados, transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão vertical ou congênita, via sexual e acidentes laboratoriais (WHO, 2017; RASSI J.; RASSI; REZENDE, 2012; RIBEIRO, 2016). Cerca de 10% dos indivíduos infectados desenvolvem infecção crônica que pode resultar em danos orgânicos severos e levar à má-nutrição, morte súbita, cardiomiopatia e síndromes digestivas com desenvolvimento de megas (RASSI J.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Os barbeiros se adaptaram com sucesso aos ambientes domiciliares humanos, reproduzindo-se neles e alimentando-se do sangue de seus moradores, ocasionando transmissão do agente etiológico da doença de Chagas pela via tradicional de propagação da infecção. Além disso, a expansão humana e urbanização na mata, contribuíram para o deslocamento e colonização de insetos silvestres em áreas peridomésticas (BELLO CORASSA et al., 2016), com isso a doença foi progressivamente se alastrando em populações rurais, causando morbidade e se tornando um fator preocupante de saúde pública e social.

### **1.2.2 O agente causador, seu ciclo de vida e as fases da doença**

O protozoário *T. cruzi* é um organismo eucarioto, do filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida e família Trypanosomatidae (SMITH-CAVALIER, 2016). Possui um flagelo e sua mitocôndria possui o cinetoplasto, uma estrutura contendo DNA extra-nuclear, localizado perto do corpo basal. Este protozoário é heteroxênico, uma vez que necessita passar por dois hospedeiros diferentes para completar seu ciclo de vida. Sendo eles,

um hospedeiro invertebrado, o triatomíneo, e outro vertebrado (NEVES, 2005). Portanto, apresenta grande diversidade adaptativa durante todo seu ciclo de vida que está representado na Figura 1.

O ciclo se inicia quando o barbeiro, ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, suga formas tripomastigotas infectivas presentes na circulação (1). Muitas dessas formas morrem durante o processo digestivo, mas ainda assim, alguns parasitos sobreviventes se diferenciam em formas proliferativas no vetor, mas não infectivas, denominadas epimastigotas (2). Ao atingirem o intestino posterior do barbeiro, sofrem metaciclogênese, em que mudam de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos, formas infectivas e não replicativas presente nas fezes do inseto (3-4) (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Durante o repasto sanguíneo, o barbeiro possui um comportamento de deposição de fezes próximas à região onde inseriu a probóscide. O hospedeiro ao se coçar, promove a entrada dos tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes pelo local da picada, os quais se difundem pela corrente sanguínea do hospedeiro.

Ainda na Figura 1, as formas tripomastigotas metacíclicos invadem diferentes tipos celulares (5), onde se transformam em amastigotas proliferativas (6), que preenchem o citoplasma das células hospedeiras e, após 90 a 120 horas, são novamente liberados na corrente sanguínea na forma tripomastigotas infectivas (7-8). A partir de novos eventos de repasto sanguíneo, os triatomíneos podem se contaminar e disseminar a infecção (BERN, 2011; RASSI J.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

No local da picada, pode ocorrer o desenvolvimento de um processo inflamatório denominado chagoma de inoculação, descrito pela primeira vez por Mazza e Freire (1940), e caracterizado como uma lesão cutânea redonda avermelhada, endurecida, indolor ou pouco dolorosa e que pode ou não ulcerar.

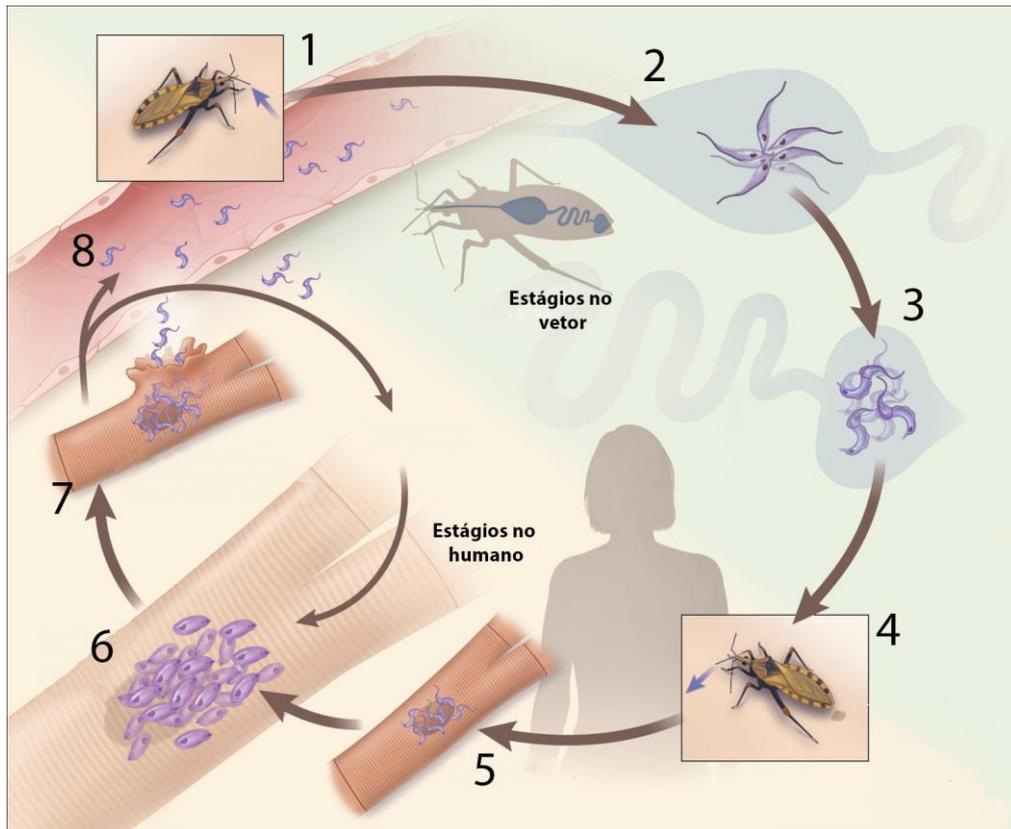


Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*. (1) No momento do repasto sanguíneo, o triatomíneo ingere tripomastigotas presentes na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado. (2) No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e multiplicam-se. (3-4) Já no intestino posterior, ocorre a transformação em tripomastigotas metacíclicas, formas infectantes que são eliminadas junto com as fezes, e estes entram pelo local da picada ou mucosas do hospedeiro. (5) Os tripomastigotas metacíclicos penetram em vários tipos celulares. (6) Eles se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária nas células infectadas (7-8) Os amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneos, rompem a membrana celular, caem na corrente sanguínea e podem invadir novas células. Quando ingeridos pelos barbeiros, iniciam um novo ciclo. Fonte: BERN, 2011 (modificado).

Se a picada do inseto for próximo aos olhos, os tripomastigotas podem penetrar através da mucosa visual e o indivíduo pode vir a desenvolver um edema bipalpebral unilateral, denominado sinal de Romaña (RASSI J.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). O chagoma de inoculação e o sinal de Romaña são sinais que ocorrem na fase aguda da infecção. Essa fase se inicia de seis a dez dias após infecção, podendo durar aproximadamente oito semanas (STEVERDING, 2014).

Na fase aguda, os indivíduos infectados podem apresentar sintomas inespecíficos ou leves como mal-estar, febre, dor no corpo, dor de cabeça, aumento dos linfonodos, dificuldade em respirar, e outros (BERN, 2011). Entre os sintomas clínicos, pode ocorrer disfunção ventricular com perda da ejeção

sanguínea em 50% (insuficiência cardíaca sistólica), desenvolvimento de arritmia, adenomegalia, conjuntivite e diarreia (ANTUNES et al., 2016; WHO, 2017; STEVERDING, 2014). Essa fase é caracterizada pela alta taxa de parasitos presentes na circulação (BRENER, 1997). Segundo Rassi J.; Rassi; Marin-Neto (2012), existem diferenças no tempo do início do aparecimento dos sintomas, se a infecção for por meio do vetor, os sintomas geralmente começam a aparecer em cerca de uma a duas semanas, e se a infecção tiver origem pela doação de sangue infectado, os sintomas aparecerão alguns meses mais tarde.

Os pacientes que evoluíram para a fase crônica, mas com ausência de sintomas clínicos, radiológicos, eletrocardiográficos, acometimentos digestivos e cardíacos, são considerados pacientes na fase indeterminada, possuem baixa parasitemia que pode durar a vida inteira. Porém, nessa fase, após 10-30 anos de infecção, 30% a 40% dos pacientes podem desenvolver formas determinadas com anormalidades cardiovasculares, alterações no trato digestivo, no sistema nervoso ou mistas (PRATA, 2001).

Na fase crônica, a forma de apresentação clínica cardíaca da doença representa a mais importante, dada sua prevalência e gravidade no paciente (NUNES et al., 2013). Os achados mais comuns de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica são: hipertrofia do miocárdio, dilatação das cavidades cardíacas, formação de trombos, entre outros (COURA, 2007). Com isso, o coração aumenta seu tamanho, surgindo arritmias e bloqueios atrioventriculares, além do tromboembolismo que antecipa a insuficiência cardíaca, considerada a forma mais grave de manifestação da doença (COURA & BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI J.; RASSI; REZENDE, 2012).

### **1.2.3 O tratamento**

Quando a doença de Chagas foi descoberta, devido à falta de medicamentos eficazes contra a doença e de inseticidas para o controle dos vetores, a prevenção era baseada na melhoria das habitações (DIAS, 2009). O tratamento preconizado e atualmente validado consiste no uso de tripanocidas, como o Nifurtimox produzido pelo laboratório Bayer em 1967, ou Benzonidazol desenvolvido pelo laboratório Roche em 1972 (BERN, 2011).

No Brasil, o Benzonidazol é a única droga disponível para comercialização. Desde 1980, o Nifurtimox saiu do mercado brasileiro e depois em outros países da América do Sul, possivelmente em razão do efeito tripanocida menor em algumas regiões endêmicas (COURA & CASTRO, 2002).

O uso desses medicamentos pode resultar na cura da doença, caso ela seja tratada logo no início da infecção. No entanto, a eficácia das duas drogas diminui durante a fase crônica e 40% dos pacientes, se tratados por mais de dois meses, podem desencadear reações adversas como: neuropatia periférica, fraqueza muscular, cefaleia, bem como distúrbios visuais e neurais (WHO, 2017). Além disso, o abandono do tratamento pode levar ao desenvolvimento de resistência pelo parasito aos medicamentos (APT & ZULANTAY, 2011).

O paciente pode ser diagnosticado pela presença de parasitos circulantes em exames parasitológicos de sangue periférico, por sorologia quantitativa, hemaglutinação, imunofluorescência, ensaio imunoenzimático (ELISA), reação em cadeia da polimerase (PCR) ou xenocultura (CANÇADO, 2002).

Devido à eficácia limitada das drogas disponíveis durante a fase crônica da doença, aos efeitos colaterais e ao acesso limitado dos pacientes aos medicamentos, o tratamento da doença de Chagas é um desafio (DUMONTEIL & HERRERA, 2017). O estudo BENEFIT, foi realizado por um comitê que reuniu cinco países para avaliar a interrupção da tripanossomíase durante a fase crônica da doença de Chagas com o uso do benzonidazol. Os resultados obtidos demonstraram que a quimioterapia com o medicamento não traz benefícios para a contenção da progressão da doença em pacientes que já desenvolveram a cardiomiopatia (RASSI; MARIN-NETO; RASSI, 2017).

Como não existe uma vacina para a doença de Chagas, o controle do vetor, a triagem sorológica e a higiene alimentar ainda são as principais ações preventivas (WHO, 2017; DIAS, 2009). Todavia, a grande variedade de reservatórios naturais do *T. cruzi* e a diversidade de triatomíneos transmissores, cujo ambiente natural é continuamente alterado pelo estabelecimento de atividades humanas, contribuem para a disseminação. Assim, deve-se ressaltar a importância do desenvolvimento de ações de vigilância em saúde (OPAS, 2009; COURA & BORGES-PEREIRA, 2012).

#### 1.2.4 Epidemiologia

Acredita-se que os ciclos enzoóticos de *T. cruzi* ocorrem há milhões de anos. Auderheide e colaboradores (2004) relatam vestígios de DNA de *T. cruzi* em múmias de 9 mil anos na região norte do Chile e sul do Peru.

Dados epidemiológicos de pessoas infectadas por *T. cruzi* são conflitantes, apesar de não ocupar lugar de destaque nas agendas de saúde pública de muitos países endêmicos, houve uma drástica diminuição na incidência de doença de Chagas desde a década de 1980. Isto se deve a iniciativas governamentais de controle e prevenção adotadas por países endêmicos em 1990. O risco de transmissão se encontra reduzido devido aos programas de controle vetorial e à obrigação da triagem sorológica nos bancos de sangue (WHO, 2013; CORASSA 2017).

No Brasil, o programa de combate à doença de Chagas evitou 277 mil novas infecções e 85 mil mortes entre 1985 e 1995 (OPS, 2000). A estimativa mais atual brasileira indica cerca de 4,6 milhões de pessoas infectadas (MARTINS-MELO et al., 2014). Entretanto, a taxa de mortalidade devido a doença de Chagas permanece elevada, com cerca de 6 mil mortes anuais registradas (MARTINS-MELO et al. 2012).

A Figura 2 mostra a distribuição mundial dos casos de infecção por *T. cruzi* no mundo. Estima-se que aproximadamente 300 mil pessoas estejam infectadas nos Estados Unidos, devido à intensa migração de indivíduos de países latino-americanos para países desenvolvidos, onde diversos países considerados não endêmicos vêm registrando um número cada vez maior de casos de doença de Chagas (BERN, YABSLEY; MONTGOMERY, 2011; ROBERTS et al., 2014).

Na Europa, a doença está presente na Bélgica, França, Alemanha, Itália, Holanda, Portugal, Espanha, Suíça, e Reino Unido. Cerca de 4.290 pessoas foram diagnosticadas nesses países, na maioria dos casos congênita de bebês cujas mães eram imigrantes da América Latina. Embora tenham sido diagnosticados 4.290, estima-se que haja entre 68 mil a 120 mil casos não documentados de imigrantes infectados (BASILE et al. 2011).

No Japão existem cerca de 4,5 mil pessoas infectadas, todos imigrantes advindos das regiões endêmicas principalmente do México (SCHMUNIS, 2007).

A Austrália e a Nova Zelândia também têm recebido grande número de imigrantes da América Latina. Como não há programas de prevenção congênita, não se tem a estimativa exata de infectados. Nesses países, supõem-se, que existem 2,1 mil pessoas infectadas (JACKSON; PINTO; PETT, 2014).

Entre 1950 e 1951, foi realizada a primeira Campanha de Profilaxia da Doença de Chagas no Brasil, e em 2006, a Comissão Internacional da Organização Pan-Americana de Saúde certificou formalmente que o país cessou a transmissão da doença pelo *Triatoma infestans*. Ainda foram encontrados *T. infestans* nativos, mas a transmissão foi considerada baixa pela diminuição das populações existentes. Apesar disso, é ainda indispensável a vigilância entomológica contínua (SILVEIRA & DIAS, 2011).

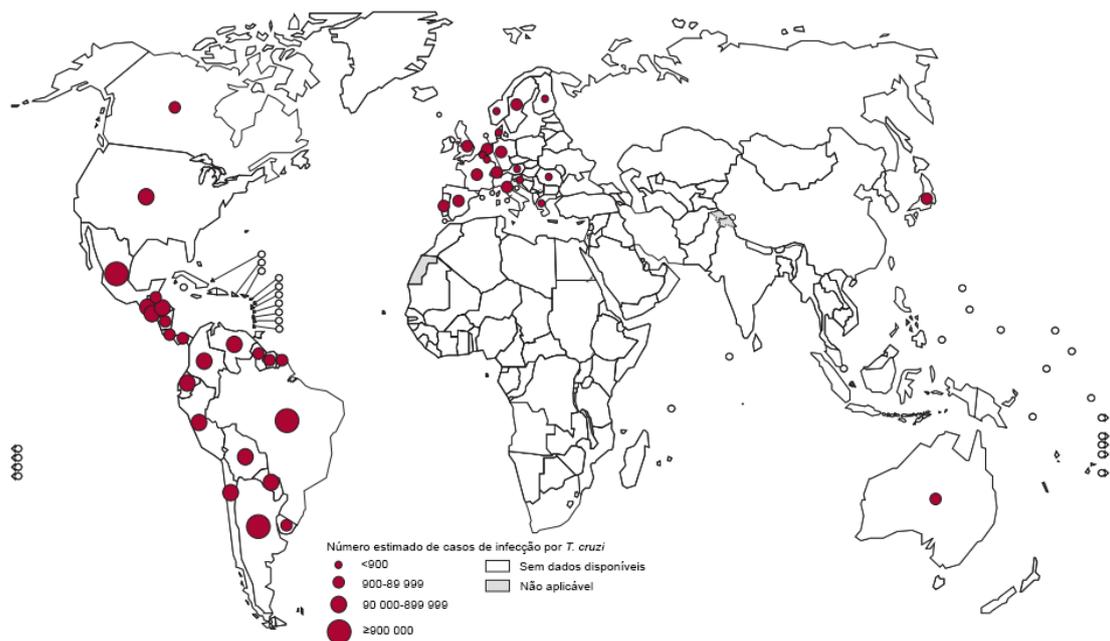


Figura 2: Distribuição de casos de infecção por *T. cruzi*, estimativa oficial da OMS entre 2006-2010. Fonte: *Second WHO report on neglected tropical disease / WHO, 2013* (modificado).

As características epidemiológicas da doença de Chagas nas Américas podem ser agrupadas em quatro grupos de acordo com os ciclos selvagem, peridoméstico e doméstico, a manifestação clínica, e a doença (COURA & DIAS 2009).

Grupo I - Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Equador, Paraguai, Peru e Venezuela. São caracterizados pelos três tipos de ciclos, predominam manifestações clínicas cardíacas e raras, ou nenhuma, digestiva. Nestes países houveram programas para eliminação do *T. infestans* e o controle das transfusões sanguíneas (GORLA et al., 2013).

Grupo II – Colômbia, Costa Rica e México; possui ciclos peridomésticos e domésticos. Há falta de programa para eliminação do vetor e as manifestações clínicas são caracterizadas pela cardiomiopatia comum na fase crônica da doença de Chagas (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014).

Grupo III – El Salvador, Guatemala, Nicarágua, Honduras e Panamá. Há poucas informações clínicas sobre os casos humanos e as ações de controles na Nicarágua e Guatemala, no entanto, tem a presença dos três tipos de ciclos (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014).

Grupo IV – Antilhas, Bahamas, Belize, Cuba, Estados Unidos, Guiana, Guiana Francesa, Haiti, Jamaica e Suriname, onde o ciclo predominante é o selvagem. Há casos raros, poucas informações clínicas, infecções de imigrantes que vivem nos Estados Unidos (SCHMUNIS, 2007) e casos de transmissão via transfusão de sangue (ZELEDÓN et al., 2012).

### 1.3 OS TRIATOMÍNEOS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS

Os triatomíneos são insetos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae, ordem Hemiptera, subordem Heteroptera. Encontram-se 152 espécies distribuídas em 18 gêneros como *Panstrongylus* (15 espécies), *Triatoma* (73 espécies) e *Rhodnius* (21 espécies), que são consideradas epidemiologicamente importantes por transmitirem o *T. cruzi*, embora outros 15 gêneros (43 espécies) também sejam capazes de transmitir o agente etiológico da doença de Chagas (POINAR, 2013; GALVÃO, 2014; MENDONÇA et al., 2016; SOUZA et al., 2016; ROSA et al., 2017).

Todos os membros desta subfamília, independente do estágio e sexo, são hematófagos e, portanto, o repasto sanguíneo é fundamental para regular a muda, o crescimento e a reprodução. Eles apresentam ampla distribuição em diferentes ecótopos naturais nas regiões tropicais e subtropicais do continente americano (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Esses insetos são hemimetábolos, ou seja, passam por cinco estágios de ninfa, desde a eclosão do ovo até a fase adulta (Figura 3). O período de desenvolvimento varia de poucos meses a mais de um ano dependendo da espécie, densidade populacional e parâmetros externos como a temperatura no ambiente doméstico (GORLA & SCHOFIELD, 1985, 1989) e silvestre (JIMENEZ & PALACIOS, 2002). Eles possuem diversos nomes populares e, no Brasil, são conhecidos como barbeiro devido ao hábito de picar a face do homem durante a noite (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009).

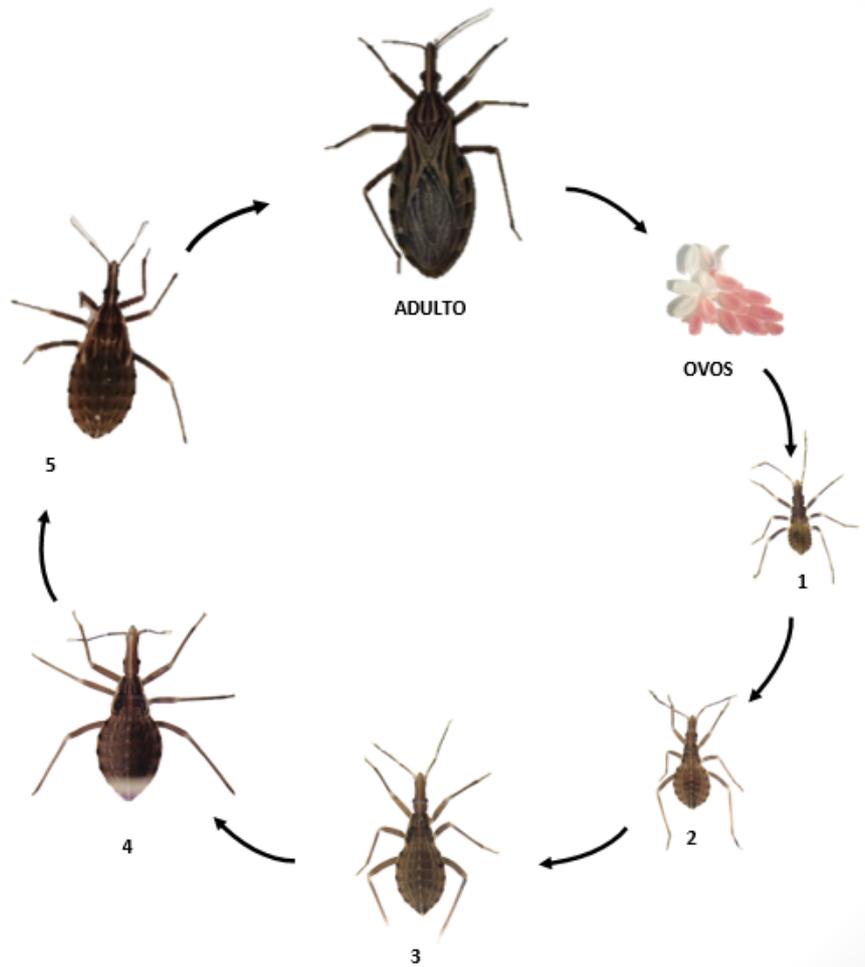


Figura 3: Estágios de desenvolvimento do triatomíneo da espécie *Rhodnius neglectus*. Ovos embrionados e não embrionados, (1-5) ninfas de 1° a 5° estágios e o inseto adulto. FONTE: Martins, 2017.

As principais diferenças entre as ninfas e os adultos são a ausência de asas posteriores e de ocelos, caráter rudimentar dos hemélitros (pteroteca), olhos menores que os dos adultos e ausência de diferenciação sexual nas

ninfas, dificultando o reconhecimento dos sexos antes do quinto estágio (CARCAVALHO et al., 1998).

É comum encontrar membros dessa subfamília em tocas, ninhos, palmeiras, arbustos e pedras, onde vivem associados a diferentes animais silvestres, como por exemplo, gambás, tatus, aves, morcegos, entre outros (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GURGEL-GONÇALVES R. et al., 2008; RODRIGUES et al., 2014; WHO, 2017).

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 (CARCAVALHO et al., 1998). Podem ser classificados como ectoparasitas temporários, uma vez que mantêm contato com o hospedeiro unicamente durante o repasto sanguíneo (GUARNERI et al., 2000).

A distribuição de 65 espécies de triatomíneos conhecidas em todo território brasileiro foi analisada, e verificou-se que existe uma associação entre os biomas com a presença de determinadas espécies. A maioria habita principalmente os biomas: Cerrado, Amazônia e Caatinga. As espécies mais frequentes nesse estudo pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (GALVAO, 2014).

No Distrito Federal, as espécies encontradas são *Psammolestes tertius*, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus diasi*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Rhodnius neglectus*, (MAEDA et al., 2012; GURGEL-GONÇALVES R. et al., 2014), essa última é a espécie estudada nesse trabalho.

### **1.3.1 Gênero *Rhodnius***

O gênero *Rhodnius* pertence à tribo Rhodniini e compreende 21 espécies descritas atualmente, 14 são brasileiras e, desses, 7 apresentam maior importância epidemiológica, embora todas sejam consideradas potenciais transmissores deste protozoário (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO, 2014; ROSA et al., 2017).

As espécies de *Rhodnius* são morfologicamente similares entre si e de outros triatomíneos (GURGEL-GONÇALVES et al., 2008). Além disso, eles têm

como característica a coloração vermelha em suas glândulas salivares (Figura 4), o que não ocorre nas glândulas de outros gêneros de triatomíneos.

A coloração avermelhada se dá pela presença de hemeproteínas, grupo o qual destacam as nitroforinas, que são hemeproteínas responsáveis por muitas atividades anti-hemostáticas da saliva de *Rhodnius*, como ação anticoagulante, anti-histamínica (SOARES et al., 2000) e vasodilatadora pela liberação de óxido nítrico, este essencial para o desempenho alimentar dos barbeiros (PAIM et al., 2017).



Figura 4: Par de glândulas salivares principais de *R. neglectus*. Coloração avermelhada pela presença de hemeproteínas. FONTE: Martins, 2016.

A identificação das espécies do gênero *Rhodnius* necessita de análises morfométricas (SOUZA et al., 2016), assim como métodos de caracterização molecular e de identificação das proteínas salivares, na qual vêm sendo desenvolvidas para refinar a descrição das espécies e diferenciá-las (SOARES et al., 2000; HERNÁNDEZ-VARGAS, 2017).

As espécies *R. pallescens* e *R. prolixus* têm se destacado, sendo a primeira no Panamá e a segunda principalmente na Venezuela, Colômbia e América Central. (ARÉVALO, 2007). No Brasil, *R. robustus* e *R. pictipes* habitam mais a região amazônica, *R. nasutus* a Caatinga e *R. neglectus* prevalece no Cerrado (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012).

A presença de *R. neglectus* foi relatada no Distrito Federal, Goiás, Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná,

Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012). Esta espécie é predominantemente silvestre e tem sido encontrada na copa de palmeiras, como babaçu (*Orbignya maritima*), macaubeira (*Acrocomia macrocarpa*), buriti (*Mauritia vinifera*), aricuri (*Scheelea phalerata*) e palmeira australiana (*Livistona australis*), mas também presente em ninhos de pássaros da família Furnariidae (*Phacellodomus*), e de mamíferos como do gênero *Didelphis* (LENT & WYGODZINSKY, 1979; GURGEL-GONÇALVES et al., 2003; CARVALHO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014). Apesar de ser considerado um vetor secundário potencial da doença de Chagas, já foi relatada em ambiente intra e peridomiciliares nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Tocantins (OLIVEIRA & SILVA, 2007; ALMEIDA et al., 2008; GURGEL-GONÇALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2014). Estudos revelam que essa espécie tem um importante papel na manutenção da circulação enzoótica do *T. cruzi* e do *Trypanosoma rangeli* no Cerrado brasileiro (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012).

#### 1.4 A DINÂMICA DA INTERAÇÃO TRIATOMÍNEO-HOSPEDEIRO

O calor emitido pelos vertebrados é o principal estímulo para os triatomíneos localizarem seus hospedeiros (BERNAD et al., 1970). A captação da fonte térmica se dá por receptores concentrados nas antenas e distribuídos pela superfície corpórea do inseto (FLORES & LAZZARI, 1995). Estes, contam também com a umidade, fluxo de ar, odores e dióxido de carbono, gerados pelos hospedeiros, além de detectarem baixas radiações infravermelhas (GUERENSTEIN & LAZZARI, 2009).

O repasto sanguíneo, dura em média 20 minutos para as ninfas de quinto estágio e adultos. Quando localizam o hospedeiro, os triatomíneos utilizam sua probóscide longa e flexível para alcançar um vaso sanguíneo, no interior do qual, por movimentos coordenados, a saliva é injetada. A lesão vascular desencadeia uma rápida resposta fisiológica do hospedeiro com formação de um tampão hemostático, vasoconstrição, inflamação, cicatrização e ativação da resposta imune do hospedeiro. Esses mecanismos são complexos, redundantes e interligados, representando um obstáculo à

alimentação completa dos hematófagos. Por esse motivo, para facilitar o fluxo sanguíneo e permitir o repasto, os triatomíneos desenvolveram moléculas salivares com atividades farmacológicas que inibem a dor, coceira, hemostasia, modulam as respostas imunes, a angiogênese e a cicatrização em seus hospedeiros (RIBEIRO, 1995; CHAMPAGNE, 2004).

Dessa forma, quando o triatomíneo ingere quantidade de sangue suficiente, a distensão da parede do estômago produz um estímulo nervoso para iniciar a muda para o próximo estágio. Se o sangue ingerido estiver contaminado pelo *T. cruzi*, o triatomíneo estará apto a transmiti-lo para outro hospedeiro vertebrado, quando estes entrarem em contato com as fezes contaminadas (NOIREAU & DUJARDIN, 2010).

#### **1.4.1 O impacto da saliva na hemostasia do hospedeiro**

A hemostasia é um conjunto de processos fisiológicos, incluindo a vasoconstrição, agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise, que juntos minimizam a perda sanguínea após a lesão do endotélio vascular e promovem a restauração de sua arquitetura para permitir o retorno ao fluxo sanguíneo normal. Esses processos são desencadeados segundos após o dano vascular (HOFFMAN et al., 2009).

Em condições fisiológicas normais, o tônus vascular é mantido pelo equilíbrio endógeno entre mediadores vasodilatadores e vasoconstritores que regulam a pressão arterial e a perda de calor a partir da pele. Em caso de lesão física, ocorre a vasoconstrição, um estreitamento do vaso sanguíneo devido a uma resposta contrátil da musculatura lisa, reduzindo o fluxo sanguíneo (KINI et al., 2010).

As plaquetas regulam a hemostasia principalmente por alterarem a fisiologia da parede vascular (BASANOVA et al., 2002). Após a lesão do vaso, as plaquetas reconhecem o vWF (Fator von Willebrand) e o colágeno por meio de receptores de superfície, como *GP1b* (glicoproteína), *GPVI* e a integrina *A2β1* (VARGA-SZABO, PLEINES & NIESWANDT, 2008), aderem ao tecido subendotelial exposto e são ativadas. A interação entre o receptor plaquetário *GP1b* e o fator vWF promove a liberação de mediadores solúveis, como adenosina difosfato (ADP) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), recrutando plaquetas adjacentes para o sítio lesionado. A ligação a esses receptores também

promove a alteração conformacional da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  que é responsável pela ligação ao fibrinogênio e ao fator vWF (FURIE & FURIE B. C., 2005; WATSON et al., 2005). A ligação das integrinas à superfície de plaquetas adicionais e a outros ligantes no tecido subendotelial promove maior ativação e agregação plaquetárias, levando à formação do tampão plaquetário para conter o fluxo sanguíneo (RIVERA et al., 2009; VERSTEEG et al., 2013).

Os mediadores solúveis liberados pelas plaquetas ativas, por exemplo, ADP, serotonina, tromboxano A<sub>2</sub>, geram múltiplas respostas mesmo em pequenas doses. Além da ativação plaquetária mencionada acima, induzem a secreção de moléculas pró-inflamatórias e contribuem para o processo de inflamação local (COUGHLIN, 2005; JENNINGS, 2009).

A coagulação sanguínea ocorre concomitantemente aos processos de vasoconstrição e agregação plaquetária. O sistema de coagulação é complexo e regulado por um conjunto de proteínas plasmáticas que ativam umas às outras sequencialmente, amplificando a cascata de coagulação até a ativação da trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina para a formação do coágulo sanguíneo. A trombina também regula a atividade de outros fatores do sistema de coagulação (VERSTEEG et al., 2013).

A coagulação tem início com a exposição da glicoproteína de membrana denominada Fator Tecidual (FT), expresso por células endoteliais em decorrência de injúria vascular ou por monócitos estimulados por infecções e citocinas. O FT funciona como um receptor para o fator VII da coagulação, que quando ativado forma o fator VIIa que ativa os fatores IX e X, os quais devem ser convertidos à fatores IXa e Xa (BAUER et al., 1990; BROZE, 1995). O fator Xa se liga ao fosfolípido plaquetário e converte protombina (fator II) em trombina, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e do fator V ativado (FVa) (MONROE & HOFFMAN, 2006). A trombina é o principal agonista plaquetário, ativa os fatores V, VIII e XIII da cascata de coagulação e também é a enzima responsável por converter o fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina, que então formam polímeros, para estabilizar o tampão plaquetário. As ligações entre as fibrinas são estabilizadas pelo fator XIII ativado formando uma rede em volta do tampão plaquetário denominada coágulo (MONROE & HOFFMAN, 2006). As falhas no sistema de coagulação podem levar a hemorragia ou ao

desenvolvimento de trombos que podem impedir o suprimento sanguíneo para os tecidos (KUMAR et al., 2010).

Os triatomíneos produzem em suas glândulas salivares vários componentes anti-hemostáticos que interferem em diferentes pontos da hemostasia. Entre as moléculas salivares com atividades farmacológicas ativas foram descritos vasodilatadores, anti-agregadores de plaquetas, anticoagulantes, anti-histamínicos, bloqueadores de canal de sódio, anestésicos, imunomoduladores, entre outras (RIBEIRO, 1995; RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003; ANDERSEN et al., 2005; CHAMPAGNE, 2005; DE ARAÚJO et al., 2012). Muitas dessas moléculas são membros das seguintes famílias de proteínas: lipocalinas, triabinas, apirases, hemolisinas, antígenos 5, inibidores de proteases, proteases, entre outras (DE ARAÚJO et al., 2012; SANTIAGO, 2016). Algumas dessas moléculas salivares podem agir de forma redundante, ou seja, apresentarem um mesmo efeito sobre uma mesma molécula alvo envolvida na hemostasia (RIBEIRO, 1987; RIBEIRO, 1989). Essas moléculas salivares variam em abundância e diversidade de uma espécie de triatomíneo para outra (SANTOS et al., 2007; ASSUMPÇÃO et al., 2008).

#### 1.4.1.1 Vasodilatadores e inibidores da vasoconstrição

Algumas moléculas salivares dos triatomíneos hematófagos podem induzir a vasodilatação local ou sequestrar vasoconstritores endógenos, expandindo o calibre do vaso para aumentar o fluxo sanguíneo ou neutralizando a vasoconstrição no local da picada. Dessa maneira, as moléculas salivares podem acelerar a aquisição de sangue e diminuir o tempo de contato do triatomíneo com o hospedeiro no decorrer do repasto.

Um exemplo de molécula salivar com ação vasodilatadora são as nitroforinas de *R. prolixus*, caracterizada por serem hemeproteínas carreadoras de óxido nítrico (NO). O NO é um gás que se difunde diretamente através da membrana celular e interage com a adenilato ciclase solúvel nas células do músculo liso que circundam os vasos sanguíneos, causando vasodilatação (ANDERSEN & MONTFORT, 2000; DE ARAUJO et al. 2012). As nitroforinas ainda apresentam atividade de tiol-oxidase que pode levar à inativação da

noradrenalina, interrompendo umas das vias de vasoconstrição, o que resulta na potencialização do NO (RIBEIRO, 1996).

O sequestro de vasoconstritores endógenos é outra estratégia utilizada por *R. prolixus*. A proteína salivar ligadora de aminas (ABP, *amine binding protein*) liga-se eficientemente às aminas biogênicas, mais especificamente, à serotonina, inibindo a vasoconstrição local, à norepinefrina e à histamina. Ainda, as aminas biogênicas atuam como moléculas pró-inflamatórias, dessa forma a ABP, além de facilitar o repasto ao inibir a vasoconstrição, também contém a inflamação (ANDERSEN et al., 2003; XU, et al., 2013). Outro exemplo de molécula inibidora da vasoconstrição é uma lipocalina encontrada na saliva do *Dipetalogaster maxima*, denominada dipetalodipina. Ela impede a vasoconstrição pela alta especificidade de ligação à prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ). A dipetalodipina apresenta ação pleiotrópica e é capaz de inibir a agregação plaquetária e a angiogênese (ASSUMPÇÃO et al., 2011).

#### 1.4.1.2 Inibidores da agregação plaquetária

Os inibidores salivares da agregação plaquetária interferem na ativação das plaquetas via ADP, colágeno, trombina, tromboxano A2, epinefrina e fator de agregação plaquetária (PAF). Um dos mecanismos utilizados envolve o uso de enzimas como as apirases, que hidrolisam ATP (adenosina trifosfato) e ADP (adenosina difosfato) em AMP (adenosina monofosfato) e Pi (fosfato inorgânico). O ADP é um agonista importante da agregação plaquetária, sendo também liberado por plaquetas já ativadas, fazendo assim um “*feedback*” positivo (RIBEIRO et al., 1984; FRANCISCHETTI, 2010). As apirases já foram descritas na saliva de *R. prolixus* (SARKIS, GUIMARÃES & RIBEIRO, 1986), *T. infestans* (FAUDRY et al., 2004; CHARNEAU et al., 2007), *T. brasiliensis* (SANTOS, et al, 2007), *D. maxima* (ASSUMPÇÃO et al., 2011), *P. megistus* (RIBEIRO; SCHWARZ; FRANCISCHETTI, 2015), *R. neglectus* (SANTIAGO et al., 2016; SANTIAGO, 2016) e *T. dimidiata* (SANTIAGO, 2016; SANTIAGO et al., 2017).

*R. prolixus* exhibe outras estratégias para inibir a agregação plaquetária. A proteína denominada RPAI (*Rhodnius platelet aggregation inhibitor*) (FRANCISCHETTI et al., 2000) é uma lipocalina que exerce seu efeito

antiplaquetário devido ao sequestro de baixas concentrações de ADP *in vitro* e *in vivo* (FRANCISCHETTI; ANDERSEN; RIBEIRO, 2002). Adicionalmente, a proteína ABP, descrita anteriormente por possuir atividade vasodilatadora, também inibe a agregação plaquetária induzida por uma combinação de baixas concentrações de ADP ou colágeno e serotonina ou epinefrina (ANDERSEN et al., 2003; XU, et al., 2013).

A palidipina é uma proteína presente na saliva do *Triatoma pallidipennis* capaz de interferir na agregação plaquetária inibindo a liberação de ATP (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1994). A triplatina e a infestina foram caracterizadas em *T. infestans*, e possuem alta similaridade à palidipina. Morita e colaboradores (2006) sugeriram em seu estudo que a triplatina se liga ao receptor GPVI e assim inibe a transdução de sinal necessária para a ativação plaquetária por colágeno. E a infestina não só inibe a trombina, mas também interfere no fator XIIa, Xa e plasmina (CAMPOS et al, 2012).

#### 1.4.1.3 Inibidores da cascata de coagulação sanguínea

Os anticoagulantes foram descritos nas glândulas salivares de artrópodes hematófagos pela primeira vez há mais de 70 anos. Desde então, a diversidade molecular e o modo de ação dessas moléculas têm sido cada vez mais estudados. Como já foi mencionado, a formação de coágulos no momento do repasto sanguíneo compromete a hematofagia. Para que o hematófago consiga se alimentar, é necessário realizar o bloqueio da cascata de coagulação sanguínea. Hellmann & Hawkins (1965) identificaram dois anticoagulantes em *R. prolixus* denominados prolixina-S (salivar) e prolixina-G (intestinal). A prolixina-S, também chamada de nitroforina-2 (NP-2), impede a ativação do fator X da cascata de coagulação (ZHANG et al. 1998), enquanto a prolixina-G inibe a atividade da trombina (RIBEIRO; SCHNEIDER & GUIMARAES, 1995).

A trombina é uma serino-protease multifuncional, além de ser um estímulo para a agregação plaquetária, é uma protease chave no sistema de coagulação sanguínea. Também promove diversos efeitos celulares como quimiotaxia, proliferação, renovação da matriz extracelular e liberação de citocinas. Essas ações celulares podem promover a patogênese de diferentes

doenças, como, por exemplo, trombose arterial e venosa ou arteriosclerose (GOLDSACK et al., 1998).

## 1.5 PROTEÍNAS SALIVARES DE ANIMAIS HEMATÓFAGOS E SEU USO NA PRÁTICA CLÍNICA

O conhecimento sobre a composição salivar dos animais hematófagos tem crescido com o avanço da ciência. Alguns compostos salivares isolados desses animais ou seus análogos têm mostrado potencial para o desenvolvimento de drogas para uso nas práticas clínicas (CIPRANDI; HORN; TERMIGNONI, 2003).

Um exemplo é a proteína hirudina, que foi isolada da sanguessuga *Hirudo medicinalis* (MARKWARDT, 1970). A especificidade da trombina frente a diferentes substratos se dá pela presença de dois sítios de interação (exosítios) além do sítio ativo da mesma. O exosítio I é o sítio de ligação iônica ou de ligação ao fibrinogênio, importante na interação da trombina com fibrinogênio (FENTON et al., 1988), receptores plaquetários (VU et al., 1991) e trombomodulina (HOFSTEENGE; BRAUN & STONE, 1988). O exosítio II é o sítio de ligação à heparina (BODE & HUBER, 2000). Assim, a hirudina se liga à trombina e a inibe especificamente através da ligação ao exosítio I (de fibrinogênio) bloqueando indiretamente o sítio ativo da enzima (GRUTTER et al., 1990). Em 1990, Maraganore e colaboradores patentearam o fármaco Hirulog, um peptídeo sintético semelhante à hirudina, composto por 20 aminoácidos, usado para tratamento de pacientes com síndromes coronarianas agudas que serão submetidos à intervenção coronariana percutânea.

Outro exemplo é o maxadilan, uma proteína vasodilatadora potente descoberta por Lerner (1991). O maxadilan contém 61 resíduos de aminoácidos e foi isolado das glândulas salivares do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, transmissor de leishmanioses. Essa proteína é a provável responsável pelo eritema provocado após a picada desse vetor. Um estudo recente mostrou que o maxadilan possui alta afinidade de ligação ao receptor PAC1 (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor*), expresso por insulinomas (tumores derivados das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas). Nesse contexto, o maxadilan foi

conjugado em sua porção C- ou N-terminal à substância DTPA (*diethylene triamine pentaacetic acid*; denominado maxadilan-DPTA ou DTPA-maxadilan, respectivamente), radiomarcado e se demonstrou eficaz na detecção de células cancerígenas por imagem (JOOSTEN et al, 2017). O inseto simúlideo *Simulium vitattum* também apresenta uma proteína salivar similar ao maxadilan (CUPP et al., 1998).

## 1.6 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES SALIVARES DE TRIATOMÍNEOS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS

A tecnologia do DNA recombinante visando a expressão de proteínas recombinantes é uma abordagem que revolucionou os estudos sobre purificação, função, estrutura, e identificação de novas proteínas com interesse biológico, por exemplo, para o tratamento de doenças humanas e/ou a produção de vacinas. Isso se deve ao fato de que, dependendo da proteína de interesse, é possível obter a proteína em abundância. O sistema mais comum utilizado para expressão de proteínas heterólogas é o que utiliza a bactéria *Escherichia coli* como célula hospedeira, cuja genética já está bem caracterizada. Esse sistema é bastante utilizado devido ao baixo custo, cultivo rápido e facilidade de reprodução (SORENSEN & MORTENSEN, 2005).

A expressão de proteínas salivares recombinantes de triatomíneos tem sido descrita na literatura. A sequência de uma proteína salivar de *Triatoma dimidiata*, denominada dimiconina, foi clonada no vetor pET32b e expressa em células de *E. coli* da linhagem BL21(DE3). A dimiconina inibe a ativação do fator XII em XIIIa de maneira dose dependente, conseqüentemente a via intrínseca da coagulação sanguínea (ISHIMARU et al., 2012).

Friedrich et al. (1993) caracterizou um inibidor específico de trombina na saliva de *R. prolixus*, denominado rodniina. Eles verificaram a capacidade do inibidor em formar um complexo 1:1 com a trombina, após ter sido purificado por cromatografia de afinidade. A sequência da rodniina foi clonada no vetor pR2C e a proteína recombinante expressa em células de *E. coli* Xph62.

De maneira semelhante, a região codificadora de dipetalogastina de *D. maxima* foi clonada no vetor pGEX-5X-1 e expressa em *E. coli* JM105. Mende et al. (1999) provou que a dipetalogastina, além de ser um inibidor específico

da trombina, em contraste com hirudina e rodniina, possui a capacidade de inibir a atividade de tripsina e plasmina em altas concentrações, tendo, portanto, atividade anticoagulante.

Utilizando sistema de expressão eucariótico, a sequência que codifica para a palidipina salivar do *Triatoma pallidipennis* foi clonada no vetor pMPSV/CMV, expressa em células de mamíferos BHK (*baby hamster kidney cells*) e caracterizada como potente inibidor da agregação plaquetária, por interferir na liberação de ATP (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1994).

A triabina do *Triatoma pallidipennis* foi clonada no vetor pKK233-2, expressa em *E. coli* e caracterizada como um inibidor específico da trombina com a qual forma um complexo não covalente. A interação com a enzima dá-se somente pelo exosítio I, inibindo a clivagem do fibrinogênio e a ativação da proteína C por trombina-trombomodulina. No entanto, não inibe a atividade amidolítica sobre os substratos sintéticos pequenos que ocorre no sítio ativo da enzima (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1995).

As proteínas recombinantes triafestina 1 e 2 presentes a saliva do *T. infestans*, foram expressas por meio do sistema baculovírus. Elas interferem em diferentes fatores da via intrínseca da cascata de coagulação através da inibição do sistema calicreína-cinina, da intervenção na ativação do fator XII e pré-calicreína (PK) de maneira  $Zn^{2+}$  dependente, e consequentemente na liberação de bradicinina (ISAWA et al., 2007).

Nas últimas duas décadas, os estudos dos sialomas (transcriptoma e proteoma salivares) de algumas espécies de triatomíneos pertencentes aos gêneros *Rhodnius* (RIBEIRO et al., 2014; SANTIAGO et al., 2016), *Triatoma* (SANTOS, et al, 2007; CHARNEAU et al., 2007; SANTIAGO et al, 2018), *Dipetalogaster* (ASSUMPÇÃO et al., 2011) e *Panstrongylus* (RIBEIRO; SCHWARZ; FRANCISCHETTI, 2015) têm revelado as famílias de genes salivares presentes nas diferentes espécies. Esses estudos mostram que os triatomíneos compartilham um grupo de genes que são expressos na saliva para permitirem a realização do repasto sanguíneo (SANTIAGO et al, 2017). Os sialomas têm dado origem a informações que podem ser utilizadas em diferentes projetos de pesquisa sobre as proteínas salivares, permitindo selecionar sequências gênicas de interesse para estudos de expressão em sistemas heterólogos.

Esse trabalho teve origem a partir dos dados obtidos no sialoma do *R. neglectus* publicado por Santiago e colaboradores (2016). A partir dos dados do transcriptoma salivar de *R. neglectus* (SANTIAGO et al., 2016), foram selecionados dois transcritos de interesse: o primeiro codifica uma triabina putativa de aproximadamente 20 kDa (número de acesso UniProt A0A0P4VLV1) e o segundo, um membro da família de antígenos 5 de aproximadamente 31 kDa (número de acesso UniProt A0A0P4VT29). Adicionalmente, a atividade apirásica no extrato salivar total de *R. neglectus* foi avaliada.

## 1.7 PROTEÍNAS DE INTERESSE

### 1.7.1 Triabinas

As triabinas são proteínas salivares que foram inicialmente classificadas na família das lipocalinas devido à estrutura tridimensional semelhante entre os membros das duas famílias (FUENTES-PRIOR et al., 1997). Posteriormente, foram classificadas como uma família distinta fortemente relacionada à das lipocalinas, mas pertencentes à superfamília das calicinas. As triabinas diferem das lipocalinas na direção das folhas-beta na conformação geral do barril-beta (FLOWER, NORTH & SANSOM, 2000; HERNÁNDEZ-VARGAS, SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ & CORZO, 2016).

A família das triabinas é constituída por proteínas que contrapõem a hemostasia de vertebrados. Fuentes et al (1997) mostraram a estrutura tridimensional do complexo triabina-trombina. A triabina do *Triatoma pallidipennis* ligou-se ao sítio de interação da trombina com o fibrinogênio, envolvendo cerca de 19 resíduos da triabina e 13 da trombina (FUENTES-PRIOR et al., 1997). Três interações principais foram visualizadas nesse complexo: (a) ligações de hidrogênio entre Asp135 e Glu128 de triabina e Arg77 da trombina; (b) interação hidrofóbica entre os resíduos Ile99, Leu108, Val126 e Phe109 de triabina com Leu65 e Met84 da trombina, e (c) interação polar de Glu9 da triabina com a Lys36 e Lys109 da trombina (FUENTES-PRIOR et al., 1997).

Entre as triabinas, há proteínas carreadoras de pequenas moléculas, inibidores de proteases, ligantes de receptores celulares específicos e

proteínas que formam complexos com macromoléculas. Oito subfamílias foram propostas baseando-se em análises filogenéticas e na sua caracterização funcional: 1) nitroforina e proteínas ligadoras de aminas, 2) inibidor da agregação de *R. prolixus*, 3) triafestina, 4) triatina, 5) dipetalodipina e palidipina, 6) triplatina e infestilina, 7) dimiconina e triabina, e 8) procalina. É possível ainda a existência de triabinas com atividades biológicas desconhecidas (HERNÁNDEZ-VARGAS, SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ & CORZO, 2016).

### 1.7.2 Antígeno 5

O antígeno 5 é um alérgeno, membro da superfamília CAP, que é composta por proteínas ricas em resíduos de cisteína (**CRISP** - *cysteine rich secretory proteins*), **Antígeno-5** e proteínas relacionadas à patogenicidade em plantas (**Pathogenesis-related – PR 1**) (GIBBS, et. al., 2008). Esse antígeno está entre os mais abundantes e imunogênicos presentes nas glândulas salivares de insetos picadores (KING & SPANGFORT, 2000) e estão associados com o desencadeamento de uma forte resposta alérgica em humanos (KING et al., 1978; KING et al., 1983).

Ele foi descrito inicialmente nos venenos de diferentes espécies de vespas e formigas (KING & SPANGFORT, 2000). Posteriormente, foi descrito no intestino de *Drosophila melanogaster* (KOVALICK et al., 1998) e na saliva de carrapatos (MANS et al., 2008), flebotomíneos (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; SANTIAGO et al., 2016). Em carrapatos, moscas e mosquitos hematófagos, essas proteínas podem estar envolvidas na supressão do sistema imunológico do hospedeiro ou na prevenção da coagulação para prolongar a hematofagia (RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003).

Nos estudos de Cascone et al. (1995) e Pirpignani et al. (2002), o antígeno 5 do veneno da vespa *Polybia scutellaris rioplatensis* foi isolado e caracterizado estruturalmente. Nesse caso, ele apresenta 207 resíduos de aminoácidos, dos quais 8 são resíduos de cisteína formando 4 pontes de dissulfeto, massa molecular em torno de 23 kDa, ponto isoelétrico em torno de 9 e função biológica desconhecida. A estrutura tridimensional do antígeno 5 do veneno da vespa *Vespula vulgaris* foi determinada por cristalografia de raio X,

revelando que a mesma apresenta estrutura secundária composta por 5 hélices- $\alpha$  e 4 folhas- $\beta$  (HENRIKSEN et al., 2001).

Sabe-se que o sistema imunológico tem a capacidade de reagir e distinguir entre um número enorme de diferentes proteínas, as quais formam a mais abundante e diversificada classe de antígenos. A interação entre um anticorpo e seu antígeno ocorre de forma específica e com alta afinidade (RUBINSTEIN et al., 2008). Sendo assim, a investigação dessa interação com alérgenos salivares é um passo fundamental para o conhecimento das bases moleculares e fisiopatologia da alergia à picada de insetos hematófagos.

### 1.7.3 Apirases

As apirases também são chamadas de adenosina difosfatases, ADPases, ATP-difosfatases e ATP-difosfohidrolases. Em triatomíneos, foram inicialmente identificadas na saliva de *T. infestans* (RIBEIRO et al., 1998). As apirases salivares de *T. infestans* se organizam em oligômeros, são dependentes de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou de  $\text{Mg}^{2+}$  e pertencem à família das 5'-nucleotidases (FAUDRY et al., 2004). Outras duas famílias de apirases já foram descritas: a família Cimex, identificada em *Cimex lectularius*, dependente exclusivamente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (VALENZUELA, et al. 1998; FRANCISCHETTI, 2011), e a família da CD39/GTPase de levedura (SMITH, et al. 1999).

Essas enzimas são ubíquas na saliva de animais hematófagos, o que ilustra sua importância e sugere uma evolução convergente entre os animais de hábito hematofágico. Além dos triatomíneos, as apirases foram descritas também em mosquitos *Ae. aegypti* (CHAMPAGNE, et al. 1995), *Anopheles gambiae* (ARCÁ, et al. 1999), no percevejo de cama *C. lectularius* (VALENZUELA, et al. 1998), em carrapatos do gênero *Ornithodoros* e pulgas (STUTZER et al, 2009).

A apirase salivar de artrópodes hematófagos interfere na sinalização nucleotídica entre as plaquetas, o que lhe confere o caráter de anti-agregador plaquetário (ARAUJO et al., 2012). Seu papel em outros organismos e tecidos tem sido atribuído ao processamento de proteínas no retículo endoplasmático e regulação das vias de sinalização celular (ZIMMERMAN et al. 2012). Charneau e colaboradores (2007) realizaram a primeira investigação proteômica de saliva de um barbeiro, *T. infestans*, e mostraram que a maioria das proteínas

identificadas pertenciam às famílias das lipocalinas ou das apirases. Ao menos quinze isoformas apirásicas foram observadas, possivelmente produtos de modificações pós-traducionais (CHARNEAU, et al. 2007). A presença dessas isoformas pode representar um processo adaptativo/evolutivo para garantir o sucesso do repasto sanguíneo.

## 2. JUSTIFICATIVA

Na literatura, o relato de produção de proteínas salivares recombinantes de triatomíneos ainda é escasso, o que torna essa área de estudo relevante. Assim a expressão de proteínas por sistemas de expressão heterólogos poderá gerar conhecimento e compreensão mais profunda sobre as moléculas salivares de *R. neglectus*, as interações moleculares entre o inseto e seu hospedeiro, e o inseto e o agente etiológico da doença de Chagas, o *T. cruzi*. Ao mesmo tempo poderá contribuir para a descoberta de compostos farmacologicamente ativos capazes de afetar a hemostasia e a imunidade do hospedeiro, dificultando o repasto satisfatório e a transmissão vetorial do *T. cruzi*, bem como servirem como marcadores de exposição à picada do inseto. Além disso, as moléculas salivares podem vir a ser utilizadas para o estudo da fisiologia vascular e hemostática, e no desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças, como as cardíacas e cânceres, bem como para o rastreamento desses últimos.

### 3. OBJETIVOS

Esse estudo teve como dois objetivos principais: 1) produzir as proteínas recombinantes triabina e antígeno 5 da saliva do triatomíneo *R. neglectus*, vetor da doença de Chagas, em sistema bacteriano; e 2) verificar a presença de atividade apirásica na saliva desse triatomíneo.

#### 3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para alcançar o primeiro objetivo, foram propostas as seguintes atividades:

- Expressão das proteínas recombinantes triabina e antígeno 5 da saliva de *R. neglectus* em sistema heterólogo bacteriano;
- Purificação das proteínas recombinantes pela técnica de cromatografia de afinidade a íons metálicos;
- Produção de anticorpos policlonais específicos em camundongos; e
- Análise por *western blotting* da reatividade cruzada dos anticorpos policlonais produzidos com proteínas dos extratos salivares de outras espécies de triatomíneos.

Para alcançar o segundo objetivo, foram propostas as seguintes atividades:

- Coleta da saliva de *R. neglectus*;
- Avaliação da estimulação, usando pilocarpina, da salivação de *R. neglectus*;
- Análise da atividade apirásica em solução e por zimografia em gel;
- Identificação das proteínas nas bandas do zimograma por espectrometria de massas;
- Análise por *western blotting* da reatividade cruzada dos anticorpos policlonais produzidos anti-apirase de *R. prolixus* com proteínas da saliva de *R. neglectus*;
- Testes de inibição da agregação plaquetária.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 PRODUZIR TRIABINA E ANTÍGENO 5 RECOMBINANTES DA SALIVA DE *R. NEGLECTUS*

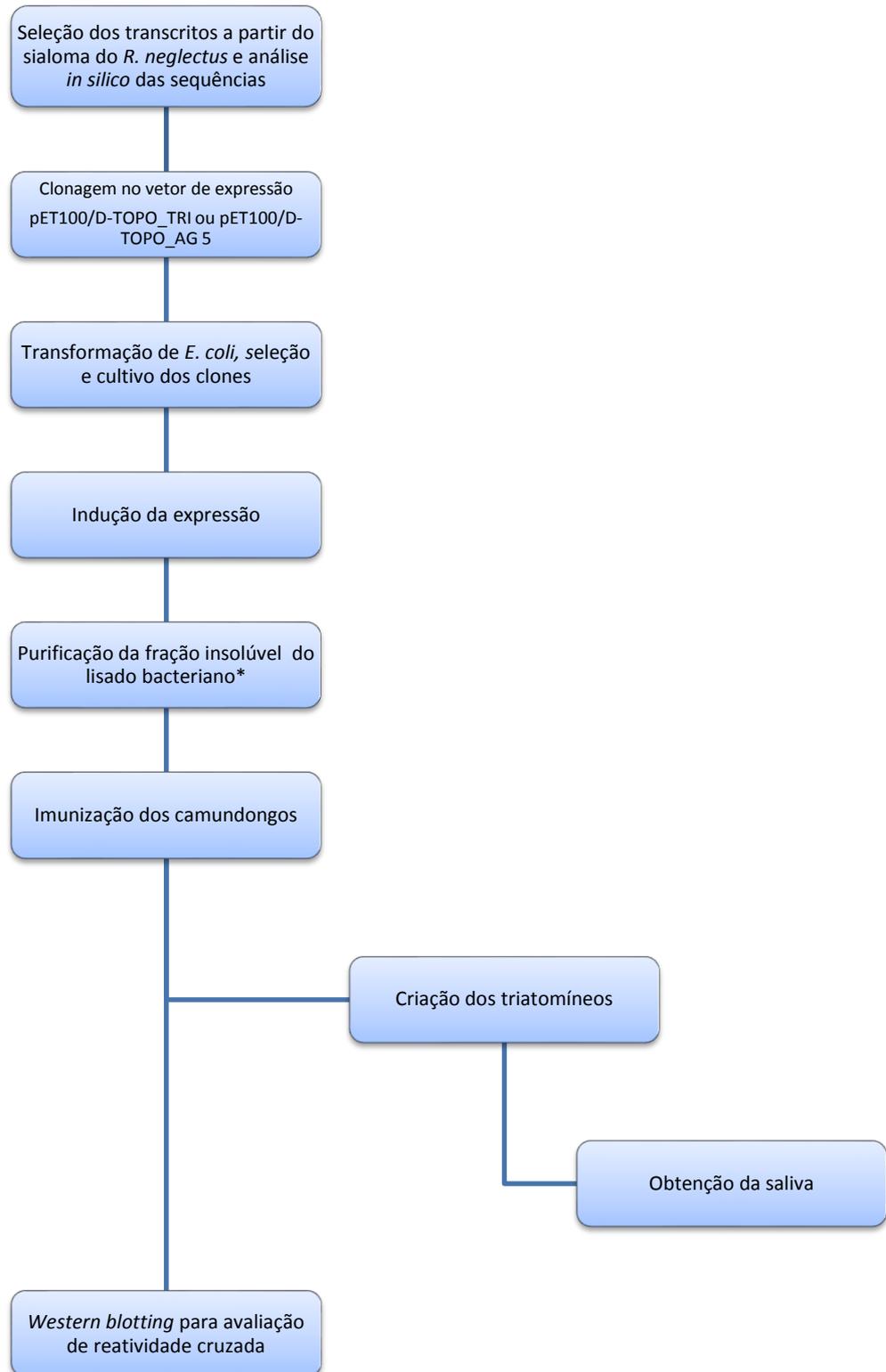


Figura 5: Representação esquemática da metodologia empregada para produzir triabina e antígeno 5 recombinantes da saliva de *R. neglectus*.

#### 4.1.1 Seleção e análise *in silico* das sequências de *R. neglectus*

Em vista do potencial biotecnológico das proteínas salivares de artrópodes hematófagos e a partir dos dados do transcriptoma salivar de *R. neglectus* (SANTIAGO et al., 2016), foram selecionados dois transcritos de interesse: o primeiro codifica uma triabina putativa de aproximadamente 20 kDa (número de acesso UniProt A0A0P4VLV1) e o segundo, um membro da família de antígenos 5 de aproximadamente 31 kDa (número de acesso UniProt A0A0P4VT29).

Com o objetivo de realizar uma caracterização inicial das proteínas e definir suas propriedades para iniciar seus estudos, foi realizada uma análise *in silico* da sequência aminoacídica de antígeno 5 (AG5) e triabina (TRI) salivar com auxílio de programas específicos. *GlycoEP* (CHAUHAN; RAO; RAGHAVA, 2013) prediz se proteínas de células eucarióticas recebem modificações pós-traducionais como *N*-glicosilação, *O*-glicosilação ou *C*-glicosilação e, em caso positivo, indica as posições de glicosilação na sequência proteica. *NetPhos 3.1* (BLOM et al., 2004) prediz se proteínas, de células eucarióticas, recebem modificações pós-traducionais como fosforilação. *TargetP 1.1* (EMANUELSSON et al., 2007) prediz a localização de proteínas no interior de células eucarióticas, com base na presença de alguma das sequências N-terminal: peptídeo sinal para via secretora (SP), cloroplasto (cTP) ou mitocôndria (mTP). *SignalP 4.1* (EMANUELSSON et al., 2007; PETERSEN et al., 2011) prediz se a proteína é secretada ou não por vias clássicas e *SecretomeP 2.0* (BENDTSEN, 2005) confirma se a proteína é secretada pela via não clássica. *BepiPred 1.0b* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred-1.0/output.php>) para a predição de possíveis epítomos lineares para os linfócitos B.

#### 4.1.2 Sequências das proteínas salivares de interesse clonadas

Essas sequências foram enviadas à empresa ThermoFisher para síntese e clonagem no vetor pET100/D-TOPO para expressão em *E. coli* regulada pelo promotor T7. O vetor utilizado, funde a proteína de interesse a uma cauda de 6xHis na porção N-terminal, que é a responsável pela diferença entre os pesos moleculares observados e esperados de rAG5 (32 kDa) e rTRI (21 kDa).

Esse vetor possui um sítio RBS responsável pelo recrutamento ribossomal durante o início da tradução de proteínas; duas sequências que codificam para caudas de fusão na porção N-terminal (uma com 6 resíduos de histidina – 6xHis, e a outra o epítipo Xpress™), visando a purificação e detecção das proteínas recombinantes; um sítio de enteroquinase (EK), visando a remoção das caudas após a purificação da proteína recombinante; e um marcador de resistência ao antibiótico ampicilina (Figura 6). As sequências foram clonadas direcionalmente no vetor. As sequências da triabina e do antígeno 5 possuem 523 pb (pares de bases) e 825 pb, respectivamente.

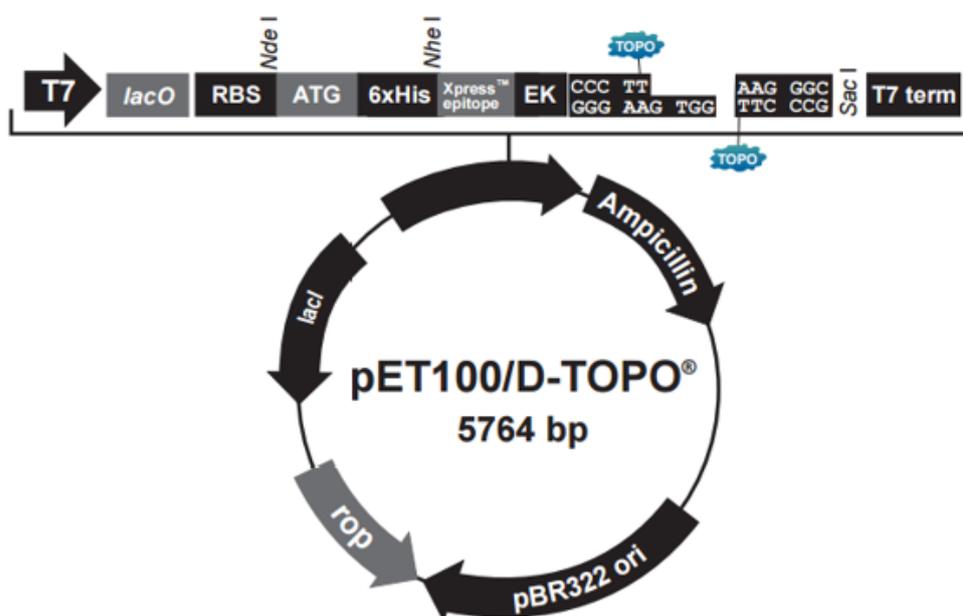


Figura 6: Vetor de expressão pET100/D-TOPO. Fonte: ThermoFisher Scientific.

#### 4.1.3 Linhagens de bactérias utilizadas

Quatro linhagens de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) competentes foram utilizadas: BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3)pLysS e SHuffle. Todas podem expressar proteínas recombinantes utilizando o promotor T7, que está presente no vetor pET100/D-TOPO. 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 (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) ao meio de cultura. Esse plasmídeo induz resistência ao cloranfenicol (Promega).

A linhagem Rosetta2(DE3)pLysS difere das outras por expressar melhor as proteínas que contêm códons raros (KANE, 1995). A linhagem SHuffle é mais apropriada para a expressão de proteínas com múltiplas pontes dissulfeto (BESSETTE et al., 1999).

#### **4.1.4 Transformação de *E. coli* com pET100/D-TOPO\_triabina e pET100/D-TOPO\_antígeno 5**

As bactérias competentes foram incubadas com 20 ng/μL do vetor pET100/D-TOPO\_triabina ou pET100/D-TOPO\_antígeno 5 por 30 min no gelo. Após esse período, foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 1,5 min, seguidas de incubação no gelo por 2 min. Em seguida, as bactérias cresceram em 250 μL de meio SOC a 37°C por 1 h sob agitação de 250 rpm e foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 100 μg/mL de ampicilina (e 34 μg/mL de cloranfenicol, quando a linhagem de *E. coli* apresentava o pLysS). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 h para crescimento das colônias.

#### **4.1.5 Indução e expressão das proteínas recombinantes**

Algumas colônias resultantes da transformação foram inoculadas separadamente em 5 mL de meio LB contendo os antibióticos específicos e incubadas a 37°C sob agitação constante de 250 rpm por 16 h. Após esse período, 4 mL de cada cultura foram transferidos para 100 mL ou 1000 mL de meio LB contendo os antibióticos específicos. As culturas foram incubadas a 37°C, sob agitação constante de 250 rpm, até atingir OD<sub>600</sub> de 0,4 – 0,6 (Leitora de microplacas Spectra-Max M5, Molecular Devices). A expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de diferentes concentrações (0,1 mM a 1 mM) de IPTG. Após a adição do agente indutor, as culturas foram incubadas variando o tempo (3 a 20 h) e a temperatura (15 a 37°C), sob agitação de 250 rpm. As culturas foram centrifugadas em centrífuga CF16RXII (Hitachi) a 2.000 x g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e as bactérias sedimentadas foram lisadas em reagente BugBuster® (Novagen) acrescido de coquetel de inibidores de protease 1X (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) e DNase, seguindo as instruções do fabricante. O lisado foi centrifugado a 16.000 x g por 20 min a 4°C e as frações solúvel e

insolúvel foram obtidas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

#### **4.1.6 Análise da solubilidade por SDS-PAGE**

A fim de analisar o perfil eletroforético unidimensional das frações solúvel e insolúvel, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (para análise da expressão do antígeno 5 recombinante - rAG5) ou 15% (para análise da expressão da triabina recombinante – rTRI), contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), sob condições desnaturantes e redutoras, conforme método descrito originalmente por Laemmli (1970).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 5x [Tris HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%,  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) 15 mM] e fervidas por 5 min antes de serem aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad), à temperatura ambiente, com voltagem constante de 90 V durante passagem pelo gel concentrador e 120 V pelo gel separador, com tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM Tris HCl, pH 8,8, 250 mM glicina e SDS 0,1%). Como padrão de massa molecular, foram utilizados os marcadores *Bench Mark™ Protein Ladder* (Invitrogen) e *Bench Mark™ Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). Para visualização das proteínas, o gel foi submerso em solução de coloração azul de Comassie (metanol 45%, ácido acético 10%, *Comassie Brilliant Blue R-250*) por 2 h sob agitação constante, e posteriormente transferido à solução descorante (ácido acético 10% e metanol 10%) sob agitação lenta à temperatura ambiente até a visualização das bandas proteicas.

A eletroforese em SDS-PAGE também foi utilizada para analisar as frações eluídas da cromatografia de afinidade, realizada para purificação das proteínas recombinantes.

#### **4.1.7 Western blotting**

Para confirmar a expressão das proteínas recombinantes, foi realizada análise por *western blotting* após separação das amostras por SDS-PAGE e transferência para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Supported 0.45 NC, GE Healthcare). A membrana foi submersa em tampão

Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v) e metanol 20% (v/v), por 10 min antes do início da transferência. Utilizou-se o sistema resfriado de *wet blotting* (Bio-Rad) e uma corrente constante de 350 mA por 1 h. Após a transferência, as bandas foram visualizadas com solução Ponceau (Ponceau S 0,2% p/v; ácidoacético 1%). A membrana foi bloqueada em solução *Tris-buffered saline* (TBS, Tris 50 mM, pH 7.5 e NaCl 150 mM) contendo 5% (m/v) de leite desnatado por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído 1:2000 em TBS contendo 0,1% (v/v) de Tween 20 e 1% (m/v) de leite desnatado por 16 h a 4°C. Após essa etapa de incubação, a membrana foi lavada quatro vezes por 5 min a temperatura ambiente, sob agitação, com TBS contendo 0,1% de Tween 20 e incubada com o anticorpo secundário (*goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated*) diluído 1:30.000 em TBS, Tween 20 0,1% e leite desnatado 1% (m/v) por 1,5 h. Por fim, a membrana foi lavada sete vezes com TBS, Tween 20 0,1%. Após as lavagens, as bandas de proteínas imunorreativas foram visualizadas utilizando o substrato quimioluminescente de peroxidase (*ECL™ Prime Western blotting detection reagent*, GE Healthcare) no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

A diluição do anticorpo variou conforme necessário: 1:2000 anticorpo anti-His (Sigma Aldrich), 1:100 anticorpo policlonal anti-rAG5, 1:100 anticorpo policlonal anti-rTRI e 1:100 anticorpo policlonal anti-apirase (avaliado no tópico 4.2). O soro pré-imune dos camundongos foi utilizado como controle negativo na diluição 1:100.

#### **4.1.8 Purificação**

Após a confirmação da expressão das proteínas recombinantes pela técnica de *western blotting*, as frações do lisado bacteriano que continham as proteínas recombinantes foram usadas para purificação por cromatografia de afinidade em resina His-Bind (GE Healthcare) carregada com níquel.

Para purificar as proteínas recombinantes (rTRI e rAG5) a partir das frações insolúveis, foram obtidos os corpos de inclusão utilizando o reagente BugBuster®. Resumidamente, à fração insolúvel de cada amostra foi adicionado o mesmo volume de BugBuster® usado para ressuspender o primeiro sedimento. As amostras foram homogeneizadas por pipetagem e em

agitador vortex por 1 min para obtenção de uma suspensão uniforme. Adicionou-se lisozima para uma concentração final de 200 µg/mL (20 µL de um estoque de lisozima 10 mg/mL preparado em água), homogeneizou-se novamente em vortex, com posterior incubação a temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram separadas cada uma em dois microtubos de 1,5 mL e, foi adicionado 1 mL de BugBuster® diluído em água Milli-Q (1:10) em cada amostra, seguida de homogeneização em vortex por 1 min. As amostras foram centrifugadas à 16.000 x g por 15 min a 4°C, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. Essa etapa foi repetida por mais duas vezes. Por fim, o sedimento foi ressuspensão em tampão de ligação 1X (Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 0,5 M) contendo imidazol 5 mM e uréia 6 M.

As amostras contendo rTRI ou rAG5 foram adicionadas à coluna contendo a resina His-Bind (GE Healthcare, EUA) carregada com níquel, previamente equilibrada a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min. A coluna foi lavada com o tampão de ligação 1X contendo concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 20mM, 60 mM e 80 mM) e uréia 6 M. As proteínas recombinantes foram eluídas com 100 mM, 200 mM e 300 mM de imidazol. As frações obtidas da purificação foram analisadas por SDS-PAGE 12% para rAG5 e 15% para rTRI sob condições desnaturantes e redutoras, e *western blotting* usando anticorpo anti-His. As frações contendo as proteínas recombinantes foram concentradas em filtro Amicon® 10K (Millipore) a uma velocidade de 5000 x g por 10 min a 4°C, quantificadas no aparelho Qubit 2,0 (Invitrogen, EUA) e estocadas a -20 °C.

A fração solúvel do lisado bacteriano de BL21(DE3) induzida a 15°C por 20 h contendo 0,4 mM IPTG foi submetida ao mesmo processo de purificação, no entanto, na ausência de uréia 6 M. As frações eluídas em 80 mM e 100 mM de imidazol da purificação foram unidas e o *pool* dessalinizado em saco de diálise, quantificado no aparelho Qubit 2.0 (Invitrogen, EUA) e analisado em SDS-PAGE e *western blotting* com anticorpo anti-His. A rTRI foi diluída em glicerol (1:1) e estocada à -20 °C para realização de ensaios futuros.

#### 4.1.9 Imunização de camundongos com rAG5 ou rTRI

As proteínas recombinantes rAG5 e rTRI purificadas dos corpos de inclusão foram administradas por via intraperitoneal em camundongos machos Swiss com idade de 8 semanas, mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Os anticorpos policlonais foram obtidos ao final de um ciclo de 4 imunizações intercaladas por 15 dias. Quatro camundongos foram imunizados com rAG5 e outros quatro com a rTRI. Uma semana antes da primeira imunização, amostras de sangue foram coletadas por punção via retro-orbital com o animal previamente anestesiado com Cetamina e Xilasina (1:1) por injeção intramuscular. O soro pré-imune foi separado, diluído em uma proporção 1:1 em glicerol e armazenado a -20 °C. Na primeira imunização, foram administrados 5 µg de rAG5 ou rTRI emulsionada em 100 µL de adjuvante completo de Freund (1:1). Nas duas imunizações seguintes, foram administrados 5 µg de rAG5 ou rTRI emulsionada em 100 µL adjuvante incompleto de Freund (1:1). Na última imunização, 5 µg da rAG5 ou rTRI diluída em 100 µL PBS. Após sete dias da última imunização, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca com o animal previamente anestesiado, o soro imune foi separado, diluído em uma proporção 1:1 em glicerol e estocado a -20 °C para utilização no *western blotting*, com posterior sacrifício do animal por deslocamento cervical.

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, tendo respaldo no projeto 27323/2016 (Anexo 1).

#### 4.1.10 Criação de triatomíneos

Os triatomíneos da espécie *R. neglectus* foram coletados em 1982 em Itambaracá/Paraná. Juntamente com as espécies *R. prolixus* e *T. infestans*, as colônias são mantidas no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, onde são conservados a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com umidade relativa de  $70 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12 h. Ovos, ninfas de 1° ao 5° estágios e em média 25 adultos mantidos separadamente em frascos de polietileno para desenvolvimento e acasalamento, e alimentados quinzenalmente em aves (*Gallus gallus domesticus*) por 30 minutos estimados. Insetos adultos de ambos os sexos foram usados nos experimentos.

#### **4.1.11 Obtenção da saliva**

As glândulas salivares foram extraídas dos insetos adultos de ambos os sexos escolhidos aleatoriamente. Com o auxílio de um estereomicroscópio, cada triatomíneo foi posicionado ventralmente sobre uma lâmina de vidro, a cabeça foi deslocada cuidadosamente com uma pinça cirúrgica expondo o par de glândulas. Essas foram recolhidas utilizando uma seringa de 0,3 mm, armazenadas em um microtubo de 1,5 mL e mantidas em gelo até o término da coleta, que ocorreu em aproximadamente 25 min. Em seguida, as glândulas foram perfuradas e o extrato salivar foi centrifugado à 16000 x g por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, a fração solúvel foi recolhida e quantificada no fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante e utilizada imediatamente. Quando armazenada a -80 °C foi adicionado um coquetel de inibidores de protease (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche).

Visto que *R. neglectus* não possui o hábito comum de salivação espontânea, a estimulação da salivação foi realizada por injeção de 2 µL de solução de Pilocarpina® (Allergan, 10 ng/µL diluída em água Milli-Q) na região ventral do tórax do triatomíneo, utilizando uma seringa 0,3 mm, técnica adaptada de BECHARA, et al. (1988). O inseto foi imobilizado na bancada com o auxílio de uma fita adesiva branca e a saliva foi coletada por 2 h em temperatura ambiente diretamente da probóscide fixada a uma ponteira de plástico. Cada inseto ejetava aproximadamente 1 µL de saliva, este era armazenado em um microtubo de 1,5 mL mantido em gelo para utilização imediata, ou quando estocada a -80°C foi acrescentado um coquetel de inibidores de proteases (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche).

#### **4.1.12 Análise da reatividade cruzada com anticorpos anti-rAG5 e anti-rTRI de *R. neglectus***

As glândulas salivares de *R. neglectus*, *R. prolixus* e *T. infestans* foram extraídas da forma descrita acima e a reatividade cruzada das proteínas salivares com os anticorpos policlonais produzidos em camundongos anti-rAG5 e anti-rTRI de *R. neglectus* foi avaliada por *western blotting* conforme descrito anteriormente no tópico 4.1.7. Os soros imunes anti-rAG5, anti-rTRI e pré-imune foram utilizados na diluição 1:100.

## 4.2 VERIFICAR A PRESENÇA DE ATIVIDADE APIRÁSICA NA SALIVA DE *RHODNIUS NEGLECTUS*

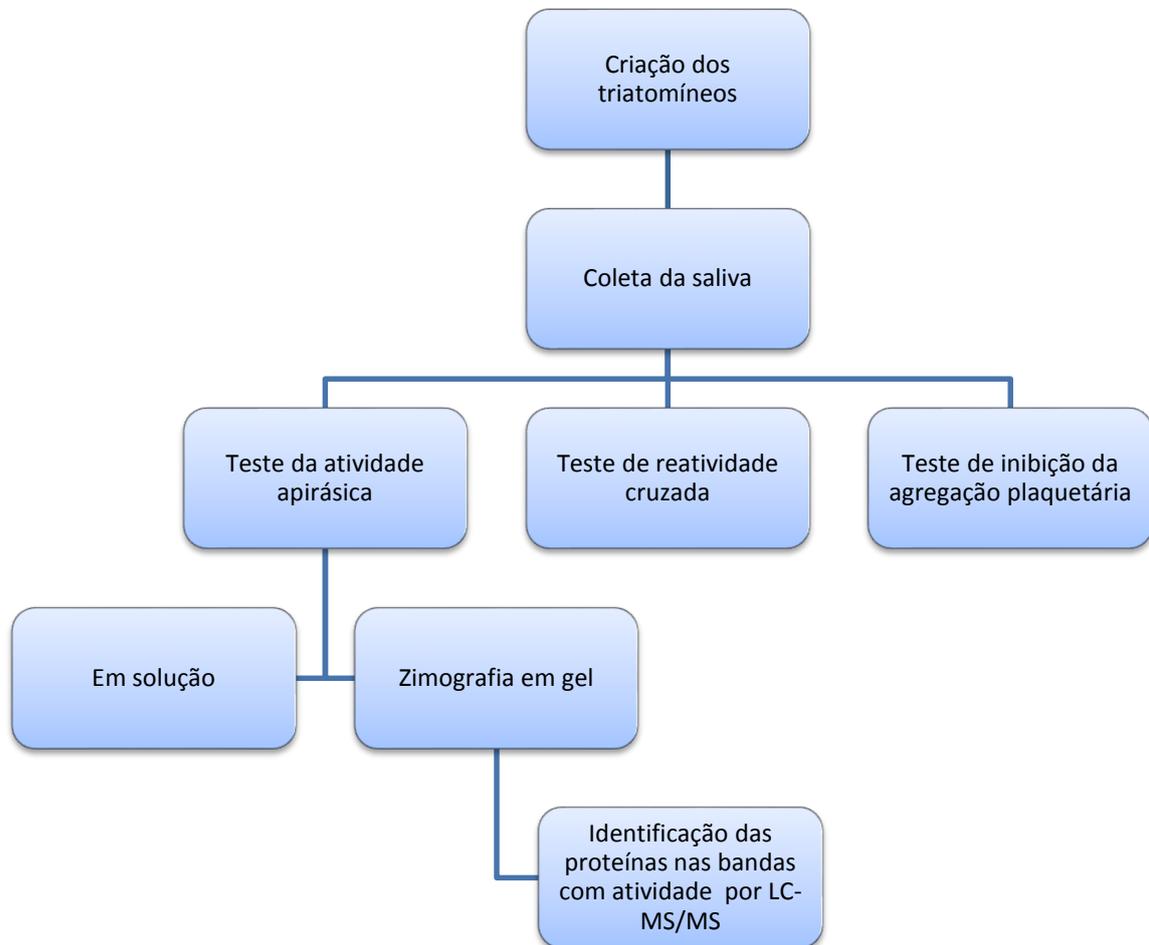


Figura 7: Representação esquemática da metodologia empregada para verificar a presença de atividade apirásica na saliva de *R. neglectus*.

#### 4.2.1 Análise da atividade apirásica em solução

Os ensaios para determinação da atividade apirásica foram feitos em microplaca de 96 poços, com base em método colorimétrico que corresponde à liberação de fosfato inorgânico Pi a partir dos substratos ATP, ADP e AMP (FISKE & SUBBAROW, 1925; RIBEIRO et al., 1989). O ensaio foi realizado em triplicata e em cada poço foi aplicada amostra de saliva (1µg -10 uL/poço), 128 µL de tampão de atividade (Tris HCl 100 mM, KCl 10 mM, sacarose 450 mM, glicose 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 0,1 mM) e 10 µL de ATP, ADP ou AMP para uma concentração final de 5 mM. O controle negativo foi obtido pela incubação do tampão de atividade e ATP, ADP ou AMP na ausência da amostra de saliva, nas mesmas condições. Após 20 minutos de incubação a 37°C, a reação enzimática foi interrompida com adição de 10 µL de ácido tricloroacético (TCA) 75%, a uma concentração de 5% do volume final. A coloração foi obtida com a adição de 30 µL de molibdato de amônio 2,5% (m/v) diluído em HCl 2N e 12 µL de ácido aminonaftolsulfônico (Fiske e Subbarow, Sigma) para um volume final de 200 µL. Após 5 minutos de incubação, a absorbância foi medida a 630 nm no leitor de microplacas (Leitora de multiplacas Spectra-Max M5, Molecular Devices). O método pode ser descrito da seguinte forma:



Figura 8: Reação baseada no método colorimétrico correspondente à liberação de fosfato inorgânico (Pi) a partir dos substratos ATP, ADP e AMP.

#### 4.2.2 Análise da atividade apirásica por zimografia em gel

As proteínas da glândula salivar de *R. neglectus* (30 µg) foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE conforme descrito anteriormente, contudo à temperatura de 4°C. A amostra foi diluída em tampão de amostra sem agente redutor e não submetida a fervura (condição não redutora e não desnaturante). Após a eletroforese, o gel foi submetido a duas lavagens de 20

min cada com Triton X-100 2,5%, seguidas de outras duas de 20 min com água ultra pura, sob agitação lenta à temperatura ambiente. Após as lavagens, o gel foi incubado em solução de atividade (Tris HCl 50 mM, pH 8,3, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM e ATP ou ADP 5 mM) por 16 h para visualização das bandas de atividade. A reação foi parada com a mesma solução de atividade, porém, na ausência do nucleotídeo.

A atividade apirásica foi determinada pela observação de um precipitado de fosfato de cálcio (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) em algumas bandas do gel. As bandas ativas foram visualizadas mais facilmente posicionando o gel contra um fundo escuro. O fosfato de cálcio foi formado a partir da ligação do fosfato, liberado do ATP ou ADP na reação enzimática, com o cálcio presente na solução de atividade, formando um precipitado de cor branca, insolúvel e visível no gel.

As bandas visualizadas foram enumeradas de um a oito, excisadas do gel e incubadas em microtubos contendo 200 µL de água ultra pura por oito dias, com uma troca no quarto dia, a 4°C, para retirada do precipitado de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. As proteínas das bandas contendo atividade apirásica foram identificadas por LC-MS/MS no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

#### **4.2.3 Preparo de amostras para espectrometria de massas**

As proteínas nas bandas com atividade foram reduzidas com 20 mM de DTT a 56°C por 45 min, alquiladas com 40 mM de iodoacetamida em temperatura ambiente e no escuro por 60 min, e, em seguida, digeridas por 18 h a 37°C com 1 µg de tripsina (Promega, Madison, USA). Após a digestão, as amostras foram acidificadas com TFA para uma concentração final de 0,1% e dessalinizadas com microcolunas em ponteiras de 200 µL contendo resina C18 (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA) (GOBOM, 1999).

#### **4.2.4 LC-MS/MS e análise dos dados**

As amostras dessalinizadas foram ressuspensas em 1% de ácido fórmico e 2 µg (quantificadas em sistema Qubit) de cada foram submetidos a LC-MS/MS em um sistema DIONEX 3000 nanoUPLC (Thermo Scientific,

Waltham, USA) acoplado *on line* a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Waltham, USA).

A cromatografia foi feita em um sistema de duas colunas capilares: (i) *trap column* (150  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e dois cm de comprimento) e (ii) coluna analítica (75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, 15 cm de comprimento), empacotadas (*home made*) com resina de fase reversa ReproSil-Pur C18-AQ, 5  $\mu\text{m}$  (Dr. Maisch GmbH, Germany) e lavadas por 5 min com 98% de tampão A (0.1% ácido fórmico) e 2% de tampão B (0.1 % de ácido fórmico, 95% de acetonitrila). A eluição foi realizada utilizando um gradiente de 2% de tampão B para 30% de tampão B por 90 min, 30% para 98% de tampão B por 5 min, 98% de tampão B por 10 min, voltando para 2% de tampão B por 1 min e reequilibrando por 15 min em 2% de tampão B (um total de 121 min e 300 nl/min). Os espectros de massas foram gerados no modo de aquisição positivo e *data-dependent MS scan*. Cada *MS scan* no orbitrap (intervalo de *m/z* de 400-1300 e resolução de 120.000) foi seguido de MS/MS dos 15 íons mais intensos. A fragmentação foi realizada por colisão de alta energia (HCD) com exclusão dinâmica por 15 s dos peptídeos já selecionados uma vez para fragmentação por MS/MS. Dados brutos foram visualizados utilizando Xcalibur v.2.1 (Thermo Scientific, Waltham, USA). O processamento dos dados foi realizado usando Proteome Discoverer v.1.3 (Thermo Scientific, Waltham, USA). Os arquivos raw brutos gerados pelo espectrômetro foram submetidos a identificação no Proteome Discoverer com algoritmo SequestHT contra o banco de dados de proteínas do genoma de *R. prolixus* depositado e disponível no Uniprot. As proteínas contaminantes (vários tipos de queratinas humanas, BSA e tripsina porcina) também foram adicionadas à base de dados, o que permitiu a remoção manual de todas as proteínas contaminantes da lista de resultados. As pesquisas foram realizadas com os seguintes parâmetros: 10 ppms de erro no MS e 0,06 Da de erro no MS/MS, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e deamidação de asparaginas e oxidação de metioninas como modificações variáveis.

#### **4.2.5 Análise da reatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de *R. prolixus***

ROSA (2013) produziu anticorpos policlonais anti-apirase de *R. prolixus* em camundongos. Esses foram testados, na diluição 1:100 pela técnica de *western blotting* conforme descrito no ítem 4.1.7, para verificação de reatividade cruzada entre as apirases das duas espécies de triatomíneos, *R. prolixus* e *R. neglectus*.

#### **4.2.6 Inibição da agregação plaquetária**

Sangue de três doadores voluntários sadios do sexo masculino foi coletado após jejum de pelo menos 6 h. Os doadores relataram não haver feito uso de nenhum medicamento que pudesse interferir na agregação plaquetária por pelo menos 10 dias. O sangue foi coletado em tubos contendo citrato de sódio 3,8% e os testes realizados em no máximo 4 h após a coleta. O método é baseado na formação de agregados plaquetários após a exposição a um agente agregante (ADP 5  $\mu$ M). O plasma rico em plaquetas (PRP) e o pobre em plaquetas (PPP) foram obtidos pela centrifugação do sangue a 100 x g por 10 min e 1500 x g por 15 min, respectivamente, a 4°C (WANG et al, 1996) . O PRP foi deixado em repouso por 30 min a temperatura ambiente antes do início dos testes.

Em uma placa de 96 poços, 100  $\mu$ L de PRP e PPP foram incubados, separadamente, por 10 min a 37°C e as curvas de agregação máxima e mínima determinadas a 600 nm. PRP foi incubado com diferentes concentrações da saliva total de *R. neglectus* por 5 min a 37°C. Terminado esse período, 10  $\mu$ L da substância indutora (ADP 5  $\mu$ M) foram adicionados aos poços e a curva de agregação plaquetária foi traçada durante 5 min. O controle foi obtido ao incubar PRP com ADP na ausência de saliva. As reações foram realizadas em leitura de microplacas (SpectraMax M5 - Molecular Devices). Esse teste foi realizado em triplicata e o procedimento realizado para coleta de sangue humano foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Humana (CEP) da Universidade de Brasília, tendo respaldo no projeto 54822616.7.0000.5558.

O gráfico foi gerado a partir do programa Prism (GraphPad) versão 6.0, com desvio padrão da média, e analisados estatisticamente através da análise

de variância (ANOVA) seguido de um teste de média Scott-Knott (1974) a um nível de significância de 5%. O programa empregado foi (SISVAR) versão 5.6.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 ANTÍGENO 5 E TRIABINA**

#### **5.1.1 Análise *in silico* das sequências do antígeno 5 e da triabina da saliva de *R. neglectus***

A sequência nucleotídica da triabina (número de acesso UniProt A0A0P4VLV1) possui 543 pares de bases e a sequência aminoacídica apresenta 180 resíduos de aminoácidos, constituindo uma proteína com aproximadamente 20 kDa. A segunda sequência nucleotídica selecionada codifica para um membro da família de antígenos 5 (número de acesso UniProt A0A0P4VT29), possui 825 pares de base, 274 resíduos de aminoácidos dando origem a uma proteína com aproximadamente 31 kDa (Figura 09).

## Antígeno 5

(A)

```
ATGGTTCAATACTGCTCGTTGGAGGTTGGTCTGCTGGCCAGCATAGTATTTCTGTCTTCAATGGTGTGCTGGTTTCGTCCC  
GGTCCAAGGCCCAAGACTGGTTTCGGATTCCCTGAGAGAAGTCAGGAGTTCCTGCAAGAATCCTTCAAAAACAATTTATA  
GGTTTAAAAAATATTAATGAAAAAGATAAACAGCTTCTGCTAAACAAGCACAAAGTACAGGGAAAAGGTTGCAGCT  
GGCAAGGAGCCCCCTCAGCCTAAAGCGGAGAACATGATTCTGCTGACCTGGGACAGTGATGCAGCGTTACAAGCCAAA  
GCTTGGGCAAGTGGGTGTGATTATGGGCACAACAATCCTGAAATTA AAAAGACAAAAGAAAACCAATGGGACAGAATATT  
TATATGAAAAGTTCAACCGAAAATGGAGGTTTAGAGAAAAATTCAAAAAGTACATACCGGAAAATGGTGAAGGGGTGG  
TATGACGAGGTGAAGTTGTACACGTTTCGGAGATGCCTTCTCCGTAAAAACAGGTCACTTCACACAGATTGTGTGGAAG  
AACACTACTAAGGTTGGTTGCGGTTATGTATACTTCAAGGAACGTACTGATTACCAATGGTTCAGAGGTTATTTGGTC  
TGCAACTACAGCCAGCAGGGAATATGGAAGGGGAGGAACCCTATAAAGAAGGTAGAGGAACCTGTACTGGCAATTTA  
GTTGCATCAACTAAATATCCACATCTTTGCCAAAAAAAAAAAAAGAAATAATCATAAAAAAACTTGGACTTTTCAAGCAA  
ATATTTTCTTATCAGATATATTTTATTTAACTAAAATTTATTAG
```

(B)

```
MVQYCSLEVLLASIVFLSSMVLVREGPRPKTGSDSLREVRSSCKNPSKQFIGLKNINEKDKQLLLLNKHNKYREKVAA  
GKEPPQPKAENMILLTWDSDAALQAKAWASGCDYHNNPEIKKTKKPMGQNIYMKSSSTENGGLEKTFKKYIPEMVKGW  
YDEVKLYTFGDAFVSKTGHFTQIVWKNTTKVGCYVYFKERTDYQWFRGYLVCNYSYPAGNMEGEEPYKEGRGTCTGNL  
VASTKYPHLCQKKKEIIKKLGLFKQIFSYQILFYLTKIY
```

## Triabina

(C)

```
ATGATAATCATTGCAGTGACATTTTTAGGACTTTTGGGCCATACATTTGCAGCTGCCGTTACCCTGCACCTCCCTCT  
ATGCCTACTGAATGCCTTGAATTAAGGGTGACATTATGTCAAACCTTTAAAGCTAATCAATTTTTTACAGGAGATTGG  
TATCTGACTCATGCGAGGAACCCAAAACATCCAACTCTGCCAGAAGTACCAAGCTAAACCCAACTTACATCTTACT  
TTCAATGGAAATGATGGTAAGGATGTCACATGCCAAGGTGCCAAAGTGAGTGGAAAGGAAGGGTTCTATTCTTTTGAA  
TGCACCACAACGTCAGGTCAATCTTCACTTCATTATGGTAGTTGTTGAAACAGACTATGATAATTATGCTTTGCTC  
TATAGATGTGGACTTTATGGAACATCAACTACTCCAGAAGATAACTTTTTGTATTTAACCGAAAATCCAGTGGTGAA  
ATTCCTACTGAACTAAAAGCCAAGTTGAGCCAAGTACTGAAACATCCCTCACTAAGCTTGGTTGTACTTGA
```

(D)

```
MIIIAVTFGLGLLGHTEFAAAVTTAPPSMPTECLELKGDIMSNFKANQFFTGDWYLTHARNPKHPTLCQKYQAKPNLHLT  
FNGNDGKDVTCQGAKEGFGYSEFCTTTSGQSFTSEFMVVVETDYDNYALLYRCGLYGTSTTPEDNFLLENRKSSE  
IPTELKAKLSQLDLNLSLTKLGCT
```

Figura 9: (A) Sequência nucleotídica do cDNA de antígeno 5 de *R. neglectus*, contendo 825 pares de bases. (B) Sequência aminoácídica do produto do cDNA de antígeno 5 de *R. neglectus*, contendo 274 resíduos de aminoácidos. (C) Sequência nucleotídica do cDNA de triabina de *R. neglectus*, contendo 543 pares de bases. (D) Sequência aminoácídica do produto do cDNA de triabina de *R. neglectus*, contendo 180 resíduos de aminoácidos. Em rosa está demarcado o peptídeo sinal e em negrito o domínio que de fato às caracterizam como proteínas antígeno 5 e triabina, respectivamente.

A análise das sequências utilizando os programas *SignalP*, *TargetP* e *SecretomeP* revelou que ambas possuem um peptídeo sinal na porção *N*-terminal e que são putativamente secretadas pela via clássica de secreção. O antígeno 5 apresenta 16 sítios preditos serem fosforilados pelo programa *NetPhos*, que são seis resíduos de serina, cinco de treonina e cinco de tirosina. Segundo o mesmo programa, a triabina apresenta 11 sítios preditos de fosforilação, sendo sete resíduos de serina, dois de treonina e dois de tirosina (Tabela 1).

Quanto à possível ocorrência de modificações pós-traducionais, o uso do programa *Glyco EP* permitiu verificar a existência de potenciais sítios de glicosilação. Na sequência do antígeno 5, os resíduos de treonina nas posições 136, 177, 229 e 238 são sítios potenciais de O-glicosilação, e os resíduos de prolina na posição 46, treonina na posição 183 e tirosina na posição 210 são sítios potenciais de N-glicosilação. Na sequência da triabina, os resíduos de treonina nas posições 7, 15, 21, 22, 29, 106, 107, 108, 114, 172, 175 e 180 são sítios potenciais de O-glicosilação, enquanto o resíduo de treonina na posição 171 é um sítio potencial de N-glicosilação. Em ambas as proteínas não foram preditos sítios potenciais de C-glicosilação (Tabela 1).

Em seguida, a presença de epítomos lineares para células B foi avaliada utilizando o programa *Bepipred 1.0b*. Sessenta e dois resíduos de aminoácidos na sequência do antígeno 5, e sessenta e seis na sequência da triabina podem fazer parte de possíveis epítomos lineares para as células B (Tabela 1, Anexos 2 e 3).

Tabela 1: Análise *in silico* das sequências aminoacídica de antígeno 5 e triabina.

	<b>Antígeno 5</b>	<b>Triabina</b>
<b>SignalP</b>	1-26 aa	1-17 aa
<b>TargetP</b>	Via clássica	Via clássica
<b>SecretomeP</b>	Não classificado	Não classificado
<b>NetPhos</b>	6 serina 5 treonina 5 tirosina	7 serina 2 treonina 2 tirosina
<b>O-glicosilação</b>	Treonina nas posições 136, 177, 229 e 238	Treonina nas posições 7, 15, 21, 22, 29, 106, 107, 108, 114, 172, 175 e 180
<b>N-glicosilação</b>	Prolina na posição 46, treonina (183) e tirosina (210)	Treonina (171)
<b>C-glicosilação</b>	Não foram preditos sítios potenciais	Não foram preditos sítios potenciais
<b>Bepipred 1.0b</b>	62 resíduos de aa	66 resíduos de aa

### 5.1.2 Expressão das proteínas recombinantes rAG5 e rTRI

Não foi possível obter produção de nenhuma das duas proteínas recombinantes com BL21(DE3)pLysS e SHuffle. No entanto, rAG5 e rTRI foram expressas na fração insolúvel de Rosetta2(DE3)pLysS (Figura 10), e em maior quantidade em BL21(DE3) (Figura 11), após a indução com 1 mM de IPTG por 3 h a 37°C. Nestas condições, ambas as proteínas recombinantes foram expressas somente em corpos de inclusão (Figuras 10-11). As diferenças nos géis SDS-PAGE podem ser claramente visualizadas antes e após a indução das células. rAG5 (32 kDa) e rTRI (21 kDa) foram os principais produtos expressos após a indução com IPTG. *Western blotting* usando um anticorpo anti-histidina revelou sinais positivos, indicando a presença de rAG5 e rTRI fusionadas com a cauda de histidina. Esses resultados mostram a expressão

das proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis usando o sistema de expressão bacteriano *E. coli*.

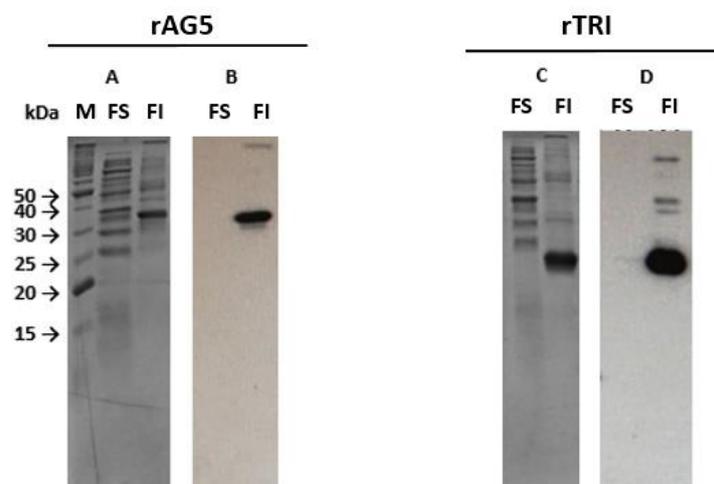


Figura 10: Análise da expressão das proteínas recombinantes rAG5 e rTRI na fração insolúvel de Rosetta2(DE3)pLysS induzidas a 37°C por 3 h com 1 mM IPTG. Amostra de 10  $\mu$ L foi aplicada em cada poço. A- Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. B- *Western blotting*. (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. C- Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie Blue. (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. D- *Western blotting* (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel.

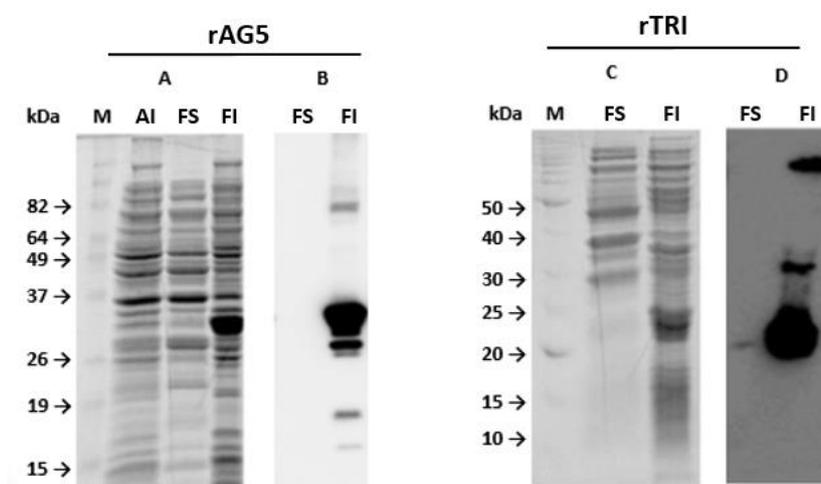


Figura 11: Análise da expressão das proteínas recombinantes rAG5 e rTRI na fração insolúvel de BL21(DE3) induzidas a 37°C por 3 h com 1 mM IPTG. Amostra de 10  $\mu$ L foi aplicada em cada poço. A- Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Prestained Protein Ladder – Invitrogen, (AI) antes da indução, (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. B- *Western blotting* (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. C- Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. D- *Western blotting*. (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel.

Apenas a rTRI foi expressa em ambas as frações, solúvel e insolúvel, de BL21(DE3), após indução com 0,4 mM de IPTG por 20 h a 15°C (Figura 12). Embora não tenha sido visualizada diferença de expressão na altura de 21 kDa em ambas as frações, a expressão foi confirmada por *western blotting* (Figura 12B).

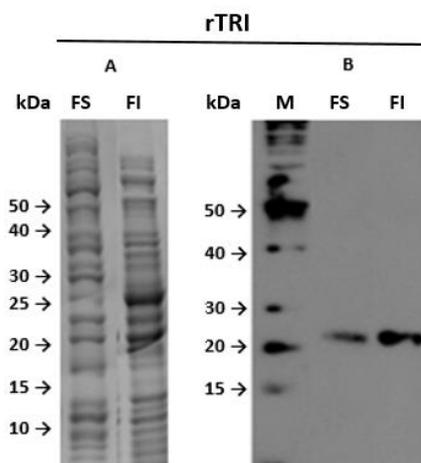


Figura 12: Análise da expressão da proteína recombinante rTRI na fração solúvel de BL21(DE3) induzida a 15°C por 20 h com 0,4 mM IPTG. Amostra de 10  $\mu$ L foi aplicada em cada poço. A- Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel. B- *Western blotting*. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS) fração solúvel, (FI) fração insolúvel.

### 5.1.3 Purificação de rAG5, rTRI e produção de anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes

Nas Figuras 13 e 14, as proteínas recombinantes foram eluídas a partir das concentrações 100, 200 e 300 mM de imidazol, podem ser visualizadas na presença de poucas proteínas, indicando pureza quase total. As frações contendo as proteínas recombinantes foram reunidas, identificadas por *western blotting* (Figura 15) e concentradas. O rendimento da produção das proteínas recombinantes a partir de 100 mL de cada cultura, após a purificação e concentração, foi 165  $\mu$ g de rAG5 e 201  $\mu$ g de rTRI.

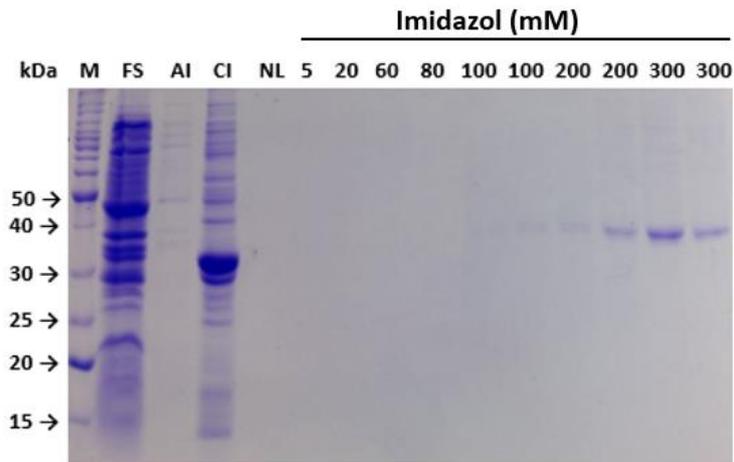


Figura 13: Purificação da fração insolúvel de rAG5 por cromatografia de afinidade em níquel, utilizando His-tag. Em cada poço do gel foi aplicado 10  $\mu$ L de cada amostra. Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS) fração solúvel, (AI) antes da indução, (CI) corpos de inclusão (NL) fração não ligada, (5-300 mM imidazol).

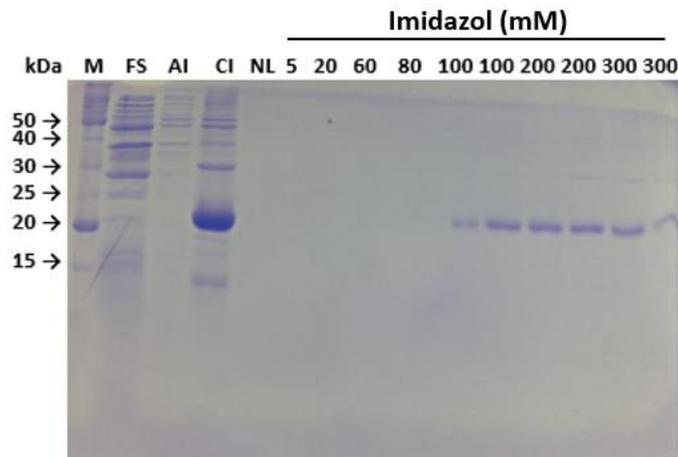


Figura 14: Purificação da fração insolúvel de rTRI por cromatografia de afinidade em níquel, utilizando His-tag. Em cada poço do gel foi aplicado 10  $\mu$ L de cada amostra. Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FS) fração solúvel, (AI) antes da indução, (CI) corpos de inclusão, (NL) fração não ligada, (5-300 mM imidazol).

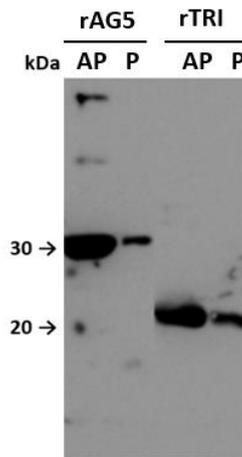


Figura 15: *Western blotting* de rAG5 e rTRI purificadas e concentradas em filtro Amicon® 10K (Millipore). Foi aplicado 10  $\mu$ L de cada amostra. (AP) antes da purificação, (P) purificada e concentrada.

As proteínas recombinantes concentradas foram utilizadas para a produção de anticorpos policlonais em camundongos. Todos os camundongos produziram anticorpos específicos para a proteína recombinante com a qual foram imunizados. Não se observou nenhuma marcação quando os soros pré-*imunes* foram utilizados. A Figura 16 mostra os resultados referente aos camundongos 3. Nos poços 3 e 7 uma forte marcação da rAG5 na altura esperada de 32 kDa e de rTRI na altura de 21 kDa, respectivamente.

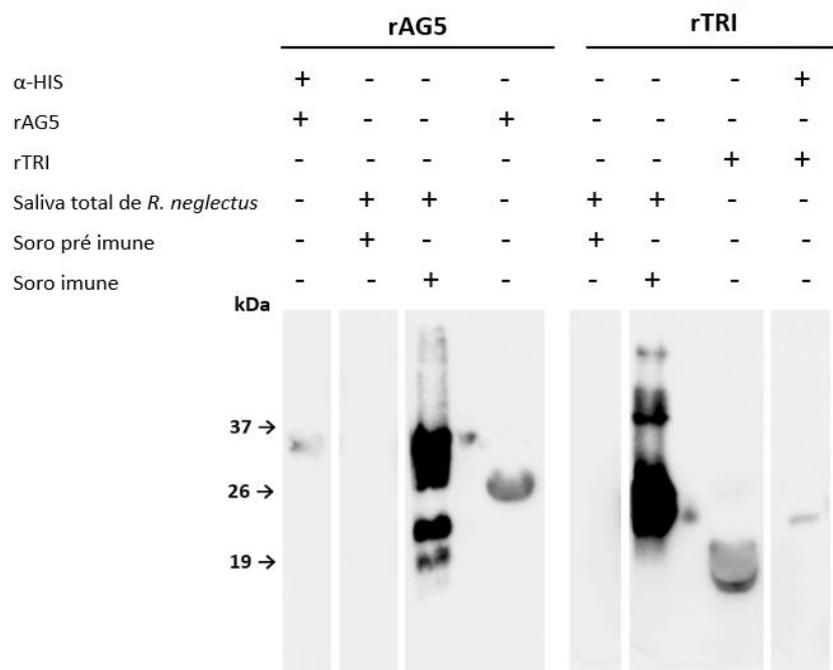


Figura 16: *Western blotting* dos soros pré-imune e imune anti-rAG5 e anti-rTRI produzidos pelos camundongos 3, diluídos 1:100. Foram utilizados 5  $\mu$ g de rAG5 e rTRI e 30  $\mu$ g de saliva total de *R. neglectus*.

#### 5.1.4 Antígeno 5 e triabina de *R. prolixus* e *T. infestans* detectados por anticorpos anti-rAG5 e anti-rTRI de *R. neglectus*

Não foi observada nenhuma marcação de bandas nas tiras de nitrocelulose incubadas com os soros pré-ímenes dos camundongos (Figura 17). Quando incubadas com os soros ímenes, houve reatividade com antígeno(s) com peso molecular de aproximadamente 32 kDa, conforme esperado e observado para o AG 5 salivar de *R. neglectus*, e com antígenos de aproximadamente 21 kDa, conforme esperado e observado para a triabina salivar de *R. neglectus*. Em ambos os casos, pode se observar uma variação quantitativa nos antígenos nas amostras de saliva das espécies do gênero *Rhodnius* em relação ao *T. infestans*, visualizada como uma marcação mais fraca nessa última espécie.

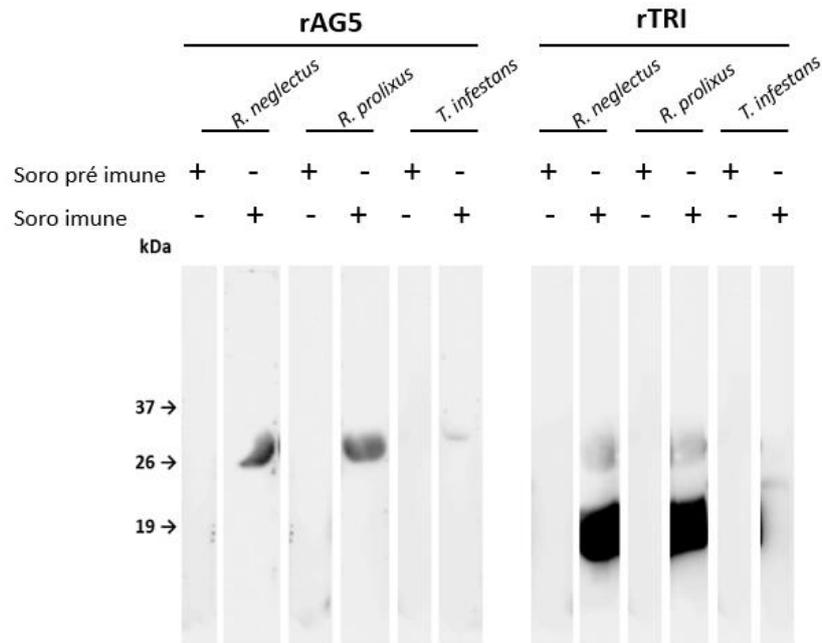


Figura 17: *Western blotting* dos soros pré-imune e imune dos anticorpos policlonais anti-AG5 e anti-TRI produzidos pelos camundongos 3, diluídos 1:100. Foram utilizados 10 µg de extrato salivar em cada poço respectivo às espécies.

### 5.1.5 Produção e purificação de rTRI da fração solúvel de *E. coli* BL21(DE3)

A Figura 18 mostra os resultados da purificação da fração solúvel do lisado bacteriano, após otimização da expressão (0,4 mM IPTG por 20 h a 15°C). Como pode-se observar, a rTRI foi eluída nas frações contendo 80 mM e 100 mM de imidazol. Na Figura 19 é possível visualizar o resultado do *western blotting* das frações eluídas que foram reunidas e dessalinizadas em saco de diálise. O rendimento da produção da rTRI a partir de 1000 mL de cultura, após a purificação e dessalinização, foi 0,5 mg/mL de rTRI. Essas triabinas recombinantes foram estocadas para utilização futura.

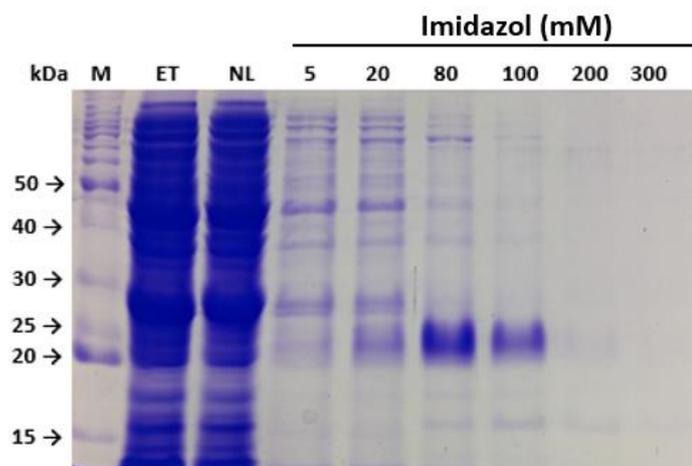


Figura 18: Purificação da fração solúvel de rTRI do lisado de *E. coli* BL21(DE3) por cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando His-tag. Em cada poço do gel foram aplicados 10  $\mu$ l de cada fração. Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (ET) extrato total, (NL) fração não ligada, (5-300 mM de imidazol).

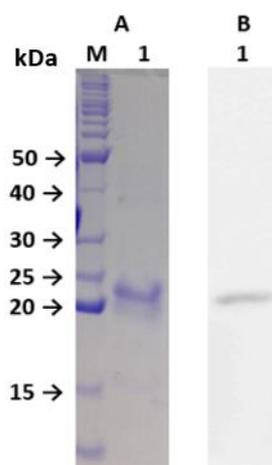


Figura 19: Análise em SDS-PAGE e *western blotting* da rTRI purificada da fração solúvel do lisado de *E. coli* BL21(DE3) e dessalinizado em saco de diálise. Foram aplicados 5  $\mu$ g da rTRI. A- Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie Blue. (M) marcador (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (1) rTRI. B- *Western blotting* utilizando anticorpo primário anti-His.

### 5.1.6 Estimulação da salivação com pilocarpina

O perfil protéico da saliva ejetada após a estimulação foi comparado com o perfil protéico da saliva extraída por dissecação das glândulas salivares (Figura 20). O uso da pilocarpina não resultou em um aumento substancial da saliva coletada, no entanto é possível observar possíveis diferenças no perfil eletroforético das proteínas salivares coletadas pelos dois métodos distintos, principalmente na faixa de peso molecular entre 15 kDa e 20 kDa.

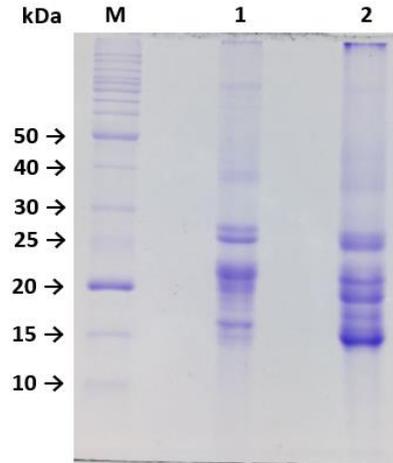


Figura 20: Análise do perfil protéico da saliva de *R. neglectus* após estimulação da salivacão com pilocarpina. SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. (M) marcador de peso molecular (kDa; BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen), (1) 5 µg de proteínas após dissecação de um par de glândulas salivares, (2) 5 µg de proteínas da saliva ejetada após injeção de pilocarpina.

## 5.2 ATIVIDADE APIRÁSICA DA SALIVA DE *R. NEGLECTUS*

### 5.2.1 Análise da atividade apirásica da saliva de *R. neglectus in vitro*

A quantidade de Pi liberada nas reações foi quantificada a partir da comparação de absorbância na curva de calibração feita com Pi. Uma unidade de atividade apirásica corresponde a 1,0 µmol de Pi liberado/min a 37°C.

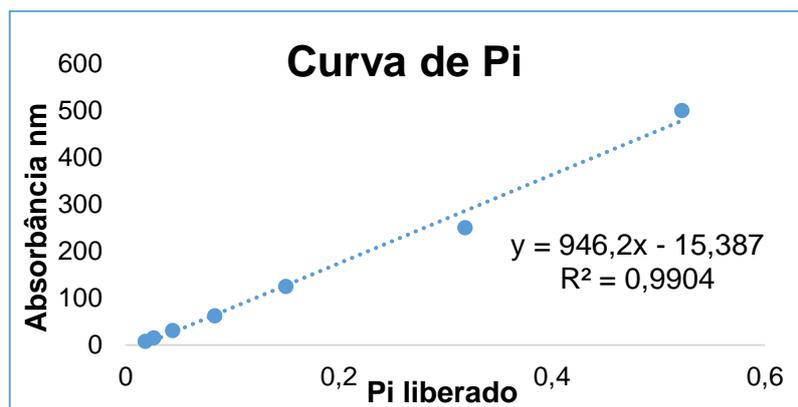


Figura 21: Curva de fosfato inorgânico (Pi).

A saliva de *R. neglectus* apresentou atividade apirásica *in vitro*, na presença dos substratos ATP e ADP, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Atividade apirásica *in vitro* da saliva de *R. neglectus*.

<b>Atividade de Hidrólise de ATP/ADP na presença de Ca<sup>++</sup></b>			
	<b>ATP</b>	<b>ADP</b>	<b>AMP</b>
	<b>Atividade Específica</b> <b>(uM de Pi liberado/ug proteína/min)</b>		
<i>R. neglectus</i>	432,7	363,4	N.D.

N.D.: não detectado. Desvio padrão menor que 8%.

Ensaio realizado em triplicata.

### 5.2.2 Análise da atividade apirásica da saliva de *R. neglectus* por zimografia em gel e identificação das proteínas por espectrometria de massas

A atividade apirásica da saliva de *R. neglectus* foi determinada por zimografia em gel. Oito bandas entre 35 kDa e 170 kDa com atividade foram visualizadas no zimograma, indicando a presença de apirases/fosfatases na saliva desse triatomíneo. Essas bandas foram numeradas, excisadas e estocadas a 4 °C para identificação por espectrometria de massas (Figura 22).

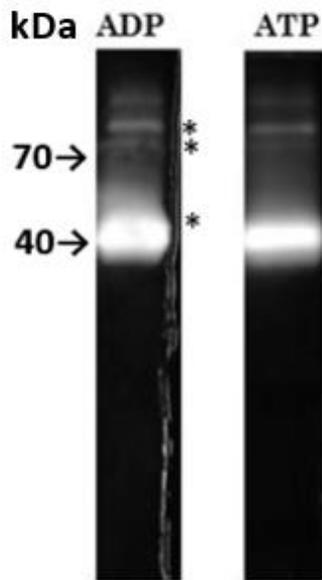


Figura 22: Zimografia em gel. Gel poliacrilamida 10% incubado por 16 h em solução de atividade contendo ADP e ATP. Ambos com 30  $\mu\text{g}$  de extrato salivar de *R. neglectus*. Os (\*) representam as bandas numeradas em 4, 5 e 6 excisadas para identificação por espectrometria.

Até o momento foram identificadas as proteínas das bandas 4, 5 e 6 do gel incubado em solução de atividade contendo ADP. No total foram identificados 143, 133 e 295 peptídeos nas bandas 4, 5 e 6, respectivamente (Anexo 4). Além dos domínios das apirases identificados, listados na Tabela 3, também foram identificados peptídeos de outras famílias de proteínas salivares, por exemplo de nitroforina, triabina, lipocalina, antígeno 5, entre outras (Anexo 4).

Tabela 3: Apirases das bandas 4, 5 e 6 do zimograma identificadas por LC-MS/MS.

Amostra	Identificação	Função molecular	Domínio	Massa kDa
Rn4*	T1HHF3	Atividade nucleosídeo-difosfato dependente de cálcio	Apirase	20.52
Rn5	T1HHF3	Atividade nucleosídeo-difosfato dependente de cálcio	Apirase	20.52
	T1HHF3	Atividade nucleosídeo-difosfato dependente de cálcio	Apirase	20.52
Rn6	T1H8D6	Atividade nucleosídeo-difosfato dependente de cálcio	Apirase	39.7
	T1H852	Atividade nucleosídeo-difosfato dependente de cálcio	Apirase	46.89

\*Rn4 = *R. neglectus* banda 4.

### 5.2.3 Apirase de *R. neglectus* detectada por anticorpos policlonais anti-apirase de *R. prolixus*

Os anticorpos policlonais anti-apirase de *R. prolixus* reagiram cruzadamente com as proteínas salivares de *R. neglectus* com pesos moleculares semelhantes aos das proteínas reconhecidas na saliva da primeira espécie. Uma banda forte foi marcada na altura de 60 kDa, referente à apirase submetida a eletroforese em condições redutoras e desnaturantes nas duas espécies do gênero *Rhodnius*.

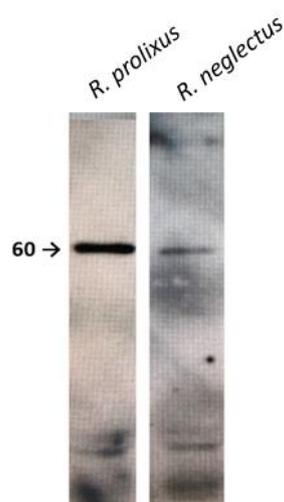


Figura 23: Análise da reatividade cruzada do soro anti-apirase de *R. prolixus* com a apirase de *R. neglectus*. *Western blotting*. Foram aplicados 10 µg de saliva total em cada poço e o soro imune diluído 1:100.

#### 5.2.4 Inibição da agregação plaquetária

Aproximadamente 50% de inibição da agregação plaquetária induzida por ADP foi atingida na presença de 08  $\mu\text{g}$  de proteínas salivares de *R. neglectus* (Figura 24). Esse resultado mostra a existência de moléculas inibidoras da agregação plaquetária na saliva dessa espécie.

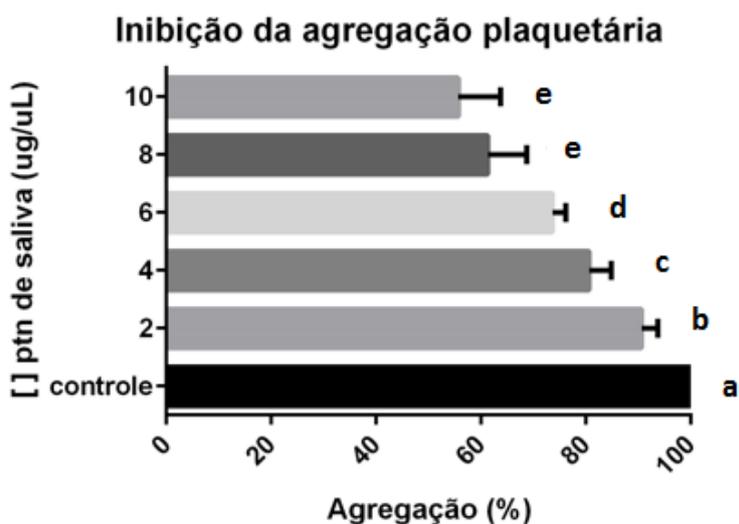


Figura 24: Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP. Diferentes concentrações de proteínas de *R. neglectus* (2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foram incubadas com plasma rico em plaquetas (PRP) a 37 °C por 5 min antes da adição de 5  $\mu\text{M}$  ADP. A absorbância foi medida durante 5 min. O controle consistiu de incubação de PRP na ausência de saliva. Ensaio feito em triplicata.  $p < 0.0001$  com ANOVA, seguido de um teste de média a um nível de significância de 5%. (A letra "e" significa que não houve diferença significativa entre as médias).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS SALIVARES DE *R. NEGLECTUS* EM SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTERIANO

Na saliva, são encontradas moléculas que têm propriedades bioquímicas com potencial para diversas aplicações biotecnológicas. Por exemplo, reduvídeos predadores usam toxinas salivares para paralisar suas presas. Concomitantemente, injetam agentes difusores e enzimas digestivas para facilitar a ingestão e a absorção de alimentos (EDWARDS, 1961). Além disso, moléculas bactericidas também foram encontradas em saliva de diferentes espécies (SAHAYARAJ et al., 2006). Logo, o potencial destas moléculas pode ser grande e de interesse tanto para a compreensão da biologia do animal quanto para o uso em pesquisa e desenvolvimento de novas drogas.

Nas últimas décadas, foram descritas diversas proteínas salivares de triatomíneos que tem ajudado a compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo biológico da hematofagia, pois se associa a microrganismos que produzem doenças de interesse médico e veterinário. O difícil combate às doenças transmitidas por insetos hematófagos depende da aquisição de conhecimentos sobre os mecanismos que sustentam o ciclo de vida desses animais (MARCONDES, 2001).

Muitas triabinas e membros da família de antígenos 5 têm sido descritos nas salivas de artrópodes hematófagos (NOESKE-JUNGLUT et al., 1994; MORITA et al, 2006; FUENTES-PRIOR et al., 1997). Membros da família de antígenos 5 foram encontrados na saliva dos triatomíneos *D. maxima* (DMAV) e *T. infestans* (TIAV). Esses antígenos foram expressos e apresentaram atividade antioxidante, inibiram a agregação plaquetária induzida por colágeno e o estresse oxidativo em neutrófilos. Os resultados revelaram uma nova família de enzimas antioxidantes, importante para atenuar os eventos pró-inflamatórios associados com a produção desregulada de espécies reativas de oxigênio (ROS) na microcirculação, e capazes de beneficiar os insetos hematófagos a se alimentarem satisfatoriamente do sangue do hospedeiro (ASSUMPÇÃO et al., 2013).

Em vista do potencial biotecnológico dessas moléculas, se propôs a expressão de uma triabina e um antígeno 5 da saliva de *R. neglectus*, recombinantes em sistema de expressão procariótico. Foi realizada a análise *in silico* das sequências dessas proteínas selecionadas do transcriptoma de *R. neglectus* (Santiago et al., 2016), que sugerem que: 1) ambas as proteínas possuem peptídeo sinal e são possivelmente secretadas pela via clássica de secreção, 2) que podem ocorrer modificações pós-traducionais como O- e N-glicosilação, e fosforilações, e 3) a predição de resíduos de aminoácidos, que podem estar presentes em possíveis epítomos lineares para células B. Essa última análise é importante, visto que as proteínas da família do antígeno 5 são alérgenos já caracterizados em outras espécies de artrópodes (KING et al., 1983; FANG et al., 1988; HOFFMAN, 1993; BARRAL et al., 2000). Nesse contexto, o antígeno 5 recombinante, bem como a triabina recombinante de *R. neglectus* poderiam vir a serem utilizados como possíveis marcadores de exposição à picada de triatomíneos.

As bactérias que carregam um determinado gene clonado em um plasmídeo são capazes de multiplicar essa sequência de DNA em várias cópias, bem como traduzir em proteína. A nível industrial, foram descritas expressões em bactérias de insulina (JOHSON, 1983), hormônio de crescimento (TRITOS & MANTZOROS, 1998), antígeno da vacina contra a hepatite B (LANCASTER; ELAM; KAISER, 1989), entre outras proteínas. A produção de proteínas recombinantes em sistema bacteriano é geralmente simples, eficiente, e de baixo custo financeiro, podendo suprir de imediato as necessidades da pesquisa básica. Espera-se que a proteína de interesse seja estável, não seja tóxica para a bactéria, solúvel, produzida em grande quantidade e possa ser facilmente purificada. Mas, esse processo nem sempre é atingido. Há relatos de proteínas recombinantes que não são expressas, ou, quando expressas, não são solúveis; às vezes são expressas em baixas concentrações e que podem formar agregados insolúveis, mesmo na presença de agentes redutores (BANEYX, 1999).

Numa tentativa de circunvir essas limitações, as sequências da triabina e do antígeno 5 de *R. neglectus* foram otimizadas para clonagem no vetor de expressão pET100/D-TOPO para permitir altas taxas de expressão e estabilidade das proteínas recombinantes em *E. coli*, adaptando os códons ao

hospedeiro bacteriano. Mesmo após várias tentativas de otimização do protocolo de expressão, variando as linhagens de *E. coli*, temperatura e tempo de cultivo, e concentração do indutor de expressão, foi possível obter apenas triabina recombinante solúvel no lisado bacteriano. Essa triabina recombinante solúvel será utilizada para caracterização funcional futura. Os possíveis múltiplos sítios de glicosilação e fosforilação em ambas as sequências podem ter contribuído para a dificuldade de otimização do protocolo de expressão. Uma alternativa que pode ser considerada é a utilização de sistemas de expressão em células de eucariotos como leveduras do tipo *Pichia pastoris* (CREGG et al, 2000) ou *Saccharomyces cerevisiae* (EVANS et al, 2010), insetos, usando o sistema de baculovirus, plantas ou outros organismos complexos (TROWITZSCH et al, 2010). A habilidade para expressar e purificar a triabina e o antígeno 5 da saliva de *R. neglectus* poderá auxiliar a aprofundar o conhecimento sobre a função dessas proteínas durante o repasto sanguíneo e a transmissão de *T. cruzi* para o hospedeiro vertebrado.

Ambas as proteínas recombinantes purificadas das frações insolúveis bacterianas foram usadas para imunizar camundongos e produzir anticorpos policlonais, que reagiram cruzadamente com o antígeno 5 e a triabina na saliva de *R. prolixus* e *T. infestans*. As imunodeteccões observadas nesse trabalho indicam a existência de epítomos similares entre os antígenos 5 e as triabinas salivares das espécies *R. neglectus*, *R. prolixus* e *T. infestans*. Schwarz e colaboradores (2009) mostraram que o soro de aves expostas a quatro espécies de triatomíneos, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, *R. prolixus*, e *P. megistus*, reconheceram uma proteína recombinante de 14,6 kDa da saliva de *T. infestans* (rTiSP14.6), indicando reatividade cruzada entre as espécies (SCHWARZ et al, 2009).

Numa tentativa de estimular a salivação de *R. neglectus*, foi utilizada a pilocarpina - um alcalóide parassimpáticomimético extraído das folhas do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), conforme descrito por BECHARA et al., (1988). Embora a quantidade de saliva coletada de *R. neglectus* após a indução não tenha sido muito elevada, o método permitiu notar possíveis diferenças no perfil eletroforético das proteínas salivares obtidas por salivação quando comparado com o das proteínas obtidas por dissecação das glândulas salivares. Isso pode ser devido ao 1) processamento de proteínas salivares

precursoras no momento da salivação, e 2) contaminação das proteínas salivares com proteínas citosólicas / de organelas / membranares das células glandulares, durante a dissecação e perfuração das glândulas salivares.

## 6.2 ATIVIDADE APIRÁSICA SALIVAR DE *R. NEGLECTUS*

A apirase salivar de insetos é sabidamente um inibidor de agregação plaquetária, função importante para o sucesso da alimentação dos hematófagos. Por isso, há interesse crescente em estudar essa atividade nas glândulas salivares de *R. neglectus*, já que essas enzimas têm sido descritas em diversos triatomíneos, por exemplo na saliva de *T. infestans* (FAUDRY et al, 2004; FAUDRY et al, 2006).

As apirases convertem adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofosfato (AMP) e fosfato inorgânico (Pi) pela hidrólise das ligações fosfato (JOHNSTON-COX & RAVID, 2011). ADP e ATP são agonistas da ativação e agregação de plaquetas (BORN, 1985). Eles compõem a sinalização purinérgica de processos inflamatórios e hemostáticos com efeitos em células endoteliais, leucócitos e plaquetas (LUTHJE, 1989).

Nesse estudo, a atividade apirásica da saliva total de *R. neglectus* foi avaliada em solução, por zimografia em gel e através de ensaios de inibição da agregação plaquetária induzida por ADP ou ATP. As proteínas nas bandas do zimograma que apresentaram atividade foram identificadas por espectrometria de massas e revelaram a presença de três domínios de apirases. Houve também a identificação de peptídeos de outras famílias de proteínas salivares. Esse encontro pode ser devido ao fato de que as bandas foram excisadas de gel SDS-PAGE unidimensional e que numa mesma banda é possível observar proteínas com o mesmo peso molecular, além de oligômeros. As apirases são, em geral, proteínas glicosiladas e algumas se organizam em oligômeros (FAUDRY et al, 2006).

A observação neste estudo de várias bandas com atividade apirásica no zimograma levou à sugestão de que também em *R. neglectus* a apirase salivar forma complexos e que essa oligomerização é importante para sua atividade. A formação de complexos proteicos pode dificultar a análise por espectrometria

de massa, já que alguns peptídeos resultantes da fragmentação destes complexos podem conter sequências de mais de uma proteína e não serem compatíveis com nenhuma sequência presente no banco de dados.

Demonstrou-se ainda a reatividade cruzada entre anticorpos produzidos contra as apirases de *R. prolixus* (ROSA, 2013) com possíveis apirases salivares de *R. neglectus*.

O teste da agregação plaquetária induzida por ADP, agonista que estimula a adesão e aderência entre as plaquetas, pode ser realizado em um agregômetro (WANG et al., 1996). Nesse estudo, a técnica foi adaptada para utilização na leitora de microplacas (Spectramax-Molecular Devices) seguindo os mesmos princípios do agregômetro. Esse teste afirmou a presença de proteínas na saliva de *R. neglectus* que atuam na inibição da agregação plaquetária induzida por uma concentração final de 5  $\mu$ M de ADP, revelando a complexidade molecular da saliva e a importância de proteínas que atuam durante o repasto sanguíneo impedindo a coagulação do sangue e facilitando a alimentação sanguínea por tempo prolongado. O estudo das apirases salivares de triatomíneos é importante também devido ao fato de que poderia vir a ser utilizado na prática clínica.

Por fim, o conhecimento das proteínas salivares de *R. neglectus* pode contribuir para informações sobre as interações inseto-hospedeiro e inseto-patógeno e auxiliar na compreensão de processos biológicos fundamentais como a sobrevivência e a adaptação de vetores e na transmissão de agentes infecciosos.

## 7. CONCLUSÕES

Neste estudo foram produzidos as proteínas recombinantes triabina (rTRI) e antígeno 5 (rAG5) da saliva de *R. neglectus* em sistema de expressão procariótico utilizando *E. coli* BL21(DE3), purificadas de corpos de inclusão e produzidos anticorpos policlonais contra os mesmos em camundongos. A reatividade cruzada desses anticorpos com as proteínas salivares de outras duas espécies de triatomíneos foi demonstrada. Além disso, foi realizada a expressão da rTRI solúvel.

Ainda, foi observado possíveis diferenças no perfil proteico da saliva ejetada após o tratamento dos insetos com pilocarpina, comparado ao da saliva obtida após a dissecação das glândulas salivares. Essas diferenças indicam o possível processamento de proteínas precursoras no momento da salivação. Ainda, a ruptura das células glandulares pode resultar na liberação de proteínas contaminantes, ou seja, que não são necessariamente salivares/secretadas.

Por fim, os resultados obtidos nesse estudo, também verificaram a presença de apirases salivares em *R. neglectus*, cuja atividade foi demonstrada em solução, em gel e funcionalmente pela inibição da agregação plaquetária induzida pelo agonista ADP. Três domínios de apirases foram identificados por espectrometria de massas nas bandas que apresentaram atividade apirásica excisadas do zimograma.

## 8. PERSPECTIVAS

- Avaliação da rTRI solúvel como potencial marcador de exposição à picada dos triatomíneos;
- Caracterização funcional da rTRI solúvel;
- Otimizar a técnica para estimular a salivação usando pilocarpina em triatomíneos;
- Comparar os perfis, por meio de géis bidimensionais, das salivas obtidas por estimulação por pilocarpina e por dissecação das glândulas salivares;
- Expressar, purificar e testar a apirase salivar de *R. neglectus*.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALMEIDA, P. S. D. et al. 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, n. 4, p. 374-380, 2008.
- 2- ANDERSEN, J. F. et al. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic aminebinding protein from the saliva of a blood-feeding insect. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 7, p. 4611-7, 2003.
- 3- ANDERSEN, J. F. et al. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. **Arc. Ins. Biochem. Physiol.**, v. 58, p. 97–105, 2005.
- 4- ANDERSEN, J. F.; MONTFORT, W. R. The crystal structure of nitrophorin 2. A trifunctional antihemostatic protein from the saliva of *Rhodnius prolixus*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 39, p. 30496-503, Sep., 2000.
- 5- ANTUNES, A. F. et al. Chronic heart disease after treatment of oral acute Chagas disease. **Arquiv. Bras. Cardiol.**, p. 184–186, 2016.
- 6- APT, W & ZULANTAY, I. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. **Rev. Med. Chile**, v. 139, p. 247-257, 2011.
- 7- AREVALO, A.; CARRANZA, J. C. Patrones electroforéticos de hemoproteínas salivares (nitroforinas) de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Biom.**, v. 27 (supl. 1), p. 137-42, 2007.
- 8- ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* a vector of Chagas' disease. **Ins. Biochem. Molec. Biol.**, v. 38, p. 213-232, 2008.
- 9- ASSUMPÇÃO, Teresa C. F. et al. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. **J. Proteom. Res.**, v. 10, p. 669-679, 2011.
- 10- ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. Salivary antigen-5/CAP family members are Cu<sup>2+</sup> dependent antioxidant enzymes that scavenge O<sub>2</sub> and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst\*. **The J. of biol. chem.**, vol. 288, n. 20, p. 14341–14361, 2013.
- 11- AUFDERHEIDE, A. C., et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 101(7), p. 2034-9, 2004.
- 12- BASANOVA, A. V., BASKOVA, I. P. & ZAVALOVA, L. L. Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals. **Biochem.**, v. 67, p. 167-176, 2002.
- 13- BASILE L., et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveill.**, v.16 pii, p. 19968, 2011.

- 14- BAUER, K. A. et al. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. **Blood**, v. 76, n. 4, p. 731-6, Aug., 1990.
- 15- BECHARA G. H., et al. A technique for collecting saliva from the cattle-tick *Boophilus Microplus* (Canestrini, 1887) using chemical stimulation. environmental and temporal influences on secretion yield. **Brasilian J. Med. Res.**, v. 21, p. 479-484, 1988.
- 16- BELLO CORASSA, R. et al. Evolution of Chagas' disease in Brazil. epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. **Perspectives in public health**, v. 20, n. 10, p. 1-7, 2016.
- 17- BENDTSEN, J. D. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC Micro.**, v. 5:58, 2005.
- 18- BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY; M. MONTGOMERY, S. *Trypanosoma cruzi* and chagas' disease in the united states. **Clin. Micro. Rev.**, v. 24, n.4, p. 655-681, 2011.
- 19- BERN, C. BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **The new Engl. J. Med.**, v. 364(26), p. 2527-34, 2011.
- 20- BERNARD, J., PINET, J. M. & BOISTEL, J. Électrophysiologie des récepteurs des stylets maxillaires de *Triatoma infestans* action de la tempeérature et de la teneur e, Eau de L'air. **J. Ins. Physiol.** v. 16, p. 2157-2180, 1970.
- 21- BESSETTE, P.H., et al. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 96, p. 13703-13708, 1999.
- 22- BLOM, N. et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. **Proteom.**, v. 4(6), p. 1633-49, 2004.
- 23- BODE, W., HUBER, R., Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1477, p. 241-52, 2000.
- 24- BORN, G. V. Adenosine diphosphate as a mediator of platelet aggregation in vivo. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 192, p. 399-409, 1985.
- 25- BRENER, Z. *Typanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. **Scielo Books**, p. 24-31, 1997.
- 26- BROZE, G. J. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. **Annu. Rev. Med.**, v. 46, p. 103-12, 1995.
- 27- 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, 2007.

- 28- CAMPOS, I. T. N. Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. **Ins. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p. 991–997, 2002.
- 29- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002.
- 30- 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, Sao Paulo, Brazil. **Act. Trop.**, v. 130, p. 35-38, 2014.
- 31- CARCAVALHO, R. U., et al. **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1998.
- 32- CASCONI, O., et al. Purification and characterization of two forms of antigen-5 from the *Polybia scutellaris* venom. **Tox. Elm.**, v.38, p. 1367-1379, 1995.
- 33- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago., 1909.
- 34- CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. **Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders**, v. 4, n. 4, p. 375-396, 2004.
- 35- 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. USA**, v. 96, n. 26, p. 15155-60, 1999.
- 36- CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA, M.; COSTA, C. M. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. **Internat. J. Mass Spect.** v. 268 p. 265–276, 2007.
- 37- CHAUHAN, J. S., RAO, A, RAGHAVA, G. P. In silico platform for prediction of N, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. **PLoS One.**, v. 28;8(6), e67008, 2013.
- 38- CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 4, p. 250–262, 2003.
- 39- CORASSA, R., et al. Evolution of Chagas disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. **Persp. Public Health**, v.137:5, 2017.

- 40- COSTA, C. et al. 2 DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*. **J. Proteom.**, v. 74, p. 1652–1663, 2011.
- 41- COUGHLIN, S. R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 8, p. 1800-14, 2005.
- 42- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropic.**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.
- 43- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 3, p. 286- 96, 2012.
- 44- COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, 2009.
- 45- COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856–862, 2014.
- 46- COURA, J.R, CASTRO, S.L. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.
- 47- CUPP, M.S, et al., Analyses of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, *Simulium vittatum*. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1553-1561, 1998.
- 48- DE ARAÚJO, C. N. et al. Interactome: smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **J. Proteom.**, v. 75, n. 13, p. 3829-41, 2012.
- 49- DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int. J. Cell. Biol.**, v. 2010, 2010.
- 50- DIAS, J. C. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, suppl 1, p. 41-5, 2009.
- 51- DUMONTEIL, E. & HERRERA, C. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. **PLoS Neglec. Trop. Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005422, 2017.
- 52- 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.
- 53- FAUDRY, E. et al. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 19, p. 19607-13, 2004.

- 54- FAUDRY, E. et al. Salivary apyrases of *Triatoma infestans* are assembled into homo-oligomers. **Biochem. J.**, v. 396, p. 509-515, 2006.
- 55- FENTON, J. W. et al. Thrombin: structure and function. **Biochem.**, v. 27, p. 7106-7112, 1988.
- 56- FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v. 66, p. 375-400, 1925.
- 57- FLORES, G. & LAZZARI, C. R. The role of antennae in *Triatoma infestans*: orientation towards thermal sources. **J. Insect Physiol.**, v. 42, p. 433-440, 1995.
- 58- FLOWER, D.R.; NORTH, A.C.; SANSOM, C.E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1482, p. 9-24, 2000.
- 59- FRANCISCHETTI, I. M. et al. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 17, p. 12639-50, 2000.
- 60- FRANCISCHETTI, I. M. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. **Toxicon.**, v. 56, n. 7, p. 1130-44, 2010.
- 61- FRANCISCHETTI, I. M. B; ANDERSEN, J. F; RIBEIRO, J. M. C. Biochemical and functional characterization of recombinant *Rhodnius prolixus* platelet aggregation inhibitor 1 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides., v. 19;41(11), p. 3810-8, 2002.
- 62- FRIEDRICH, T. et al. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 16216-16122, 1993.
- 63- 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. USA.** v. 94, p. 11845-11850, 1997.
- 64- FURIE, B.; FURIE, B. C. Thrombus formation in vivo. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 12, p. 3355-62, 2005.
- 65- GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Sociedade Brasileira de Zoologia, Curitiba, p. 289, 2014.
- 66- GASTEIGER, E. et al. ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 3784-3788, 2003.
- 67- 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, 2008.

68- GOBOM, J., et al., Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v, 34(2), p. 105-116, 1999.

69- GOLDSACK, N. R. et al. Thrombin. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v. 30, p. 641-646, 1998.

70- GORLA D.E., et al. New structures for goat corrals to control peridomestic populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Gran Chaco of Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 352-358, 2013.

71- GRUTTER, M.G. et al. Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. **EMBO J.** v. 9, p. 2361-2365, 1990.

72- GUARNERI, A. A. et al. Potencial Biológico do *Triatoma brasiliensis*. **Caderno de Saúde Pública**, v. 16 (2), p. 101-104, 2000.

73- GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo**, v. 46, n. 6, p. 323-330, 2004.

74- GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Infestation of *Mauritia flexuosa* palms by triatomines (Hemiptera: Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian savanna. **Acta tropica**, v. 121, n. 2, p. 105-111, 2012.

75- GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 90-98, 2008.

76- GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Sampling *Rhodnius neglectus* in *Mauritia flexuosa* palm trees: a field study in the Brazilian savanna. **Med. Vet. Entomol.**, v. 17, n. 3, p. 347-350, 2003.

77- HELLMANN, K. & HAWKINS, R. Prolixin-S and Prolixin-G; Two Anticoagulant from *Rhodnius prolixus* STAL. **Nature**, v. 207 p. 1008-1009, 1965.

78- HENRIKSEN, A.; KING, T. P.; MIRZA, O. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: Structural characterization of a Pathogenesis-related protein superfamily. **Proteins: Structure and Genetics**, v. 45, p. 438-448, 2001.

79- HERNÁNDEZ-VARGAS, M. J., et al. Proteomic and transcriptomic analysis of saliva components from the hematophagous reduviid *Triatoma pallidipennis*., v.162, p. 30-39, 2017.

- 80- HERNÁNDEZ-VARGAS, M.; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E. & CORZO, G. An insight into the triabin protein family of american hematophagous reduviids: functional, structural and phylogenetic analysis. **Toxins**, v. 8, p. 44, 2016.
- 81- HOTEZ, P. 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., v. 2(9) e300, 2008.
- 82- HOFFMAN, R., et al. **Hematology: Basic Principles and Practice**. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; Elsevier, 2009.
- 83- HOFSTEENGE, J., BRAUN, P. J., and STONE, S. R. Thrombin: structure and function. **Biochem.** v. 27, p. 2144–2151, 1988.
- 84- ISAWA, H. et al. Identification and characterization of plasma kallikrein–kinin system inhibitors from salivary glands of the blood-sucking insect *Triatoma infestans*. **FEBS J.**, v. 274, p. 4271–4286, 2007.
- 85- ISHIMARU, Y. et al. Dimiconin, a novel coagulation inhibitor from the kissing bug, triatoma dimidiata, a vector of chagas disease. **J. Exp. Biol.** v. 215, p. 3597–3602, 2012.
- 86- JENNINGS, L. K. Role of platelets in atherothrombosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 103, n. 3, Suppl, p. 4A-10A, 2009.
- 87- JOHNSTON-COX, H. A & RAVID, K. Adenosine and blood platelets. **Purinergic Signal**, v. 7:3, p. 57–65, 2011.
- 88- JOOSTEN, L., et al. Preclinical evaluation of PAC1 targeting with radiolabeled Maxadilan. **Scientific reports**, v. 7, p. 1751, 2017.
- 89- KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 6(5), p. 494-500, 1995
- 90- KING, T. P. et al. Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins. **Mol. Immunol.**, v. 20, n. 3, p. 297-308, 1983.
- 91- KING, T. P. et al. Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet, and yellow jacket venoms. **Biochem.**, v. 17, n. 24, p. 5165-74, 1978.
- 92- 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, 2000.
- 93- KINI, R.M.; CLEMETSON, K.J.; MARKLAND, F.S.; MCLANE, M.A.; MORITA, T. Toxins and Hemostasis. From Bench to Bedside. **Springer**, 2010.
- 94- 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, 1998.

- 95- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças.** 10<sup>a</sup>, 2010.
- 96- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.
- 97- LANCASTER, D., et al. Immunogenicity of the intradermal route of hepatitis B vaccination with the use of recombinant hepatitis B vaccine. **Am. J. Infect Control.**, v. 17 (3), p. 126-129, 1989.
- 98- LAW et al. Biochemical insights derived From insect diversity. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 61. p. 87-111, 1992.
- 99- LENT, H & WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123–520, 1979.
- 100- LERNER, E.A., et al. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.**, v 15;266(17), p. 11234–6, 1991.
- 101- LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 51, n. 5, p. 247-53, 2009.
- 102- MACKEY, T. et al. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment., v. 27(4) p. 949–979, 2014.
- 103- 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, 2012.
- 104- 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, 2008.
- 105- MARAGANORE, J. M., et al. Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. **Biochem.**, v. 29 (30), p. 7095–7101, 1990.
- 106- MARIN-NETO, J. A., et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 1, p. 319-24, 2009.
- 107- MARKEY, T. & LIANG, B. Threats from emerging and re-emerging neglected tropical diseases (NTDs)., v. 2, p. 75-88, 2012.
- 108- MARKWARDT, F. Biochemical basis for the control of anticoagulant and thrombolytic therapy. **Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.** v.94, p. 116-128, 1970.

- 109- MARTINS-MELO, et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Trop.**, v. 130, p. 167-74, 2014.
- 110- MARTINS-MELO, F. R., et al. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. **J. Infect Dev. Ctries.**, v. 6(11) p. 817-24, 2012.
- 111- MENDE, K. et al. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. *Dipetalogaster maxima* cDNA cloning, expression and characterization. **Eur. J. Biochem.** v. 266, p. 583-590, 1999.
- 112- MENDONÇA, V.J, et al. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. **Zootaxa**, v. 4107, p. 239–254, 2016.
- 113- 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, 2006.
- 114- MORITA, A. et al. Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. **FEBS J.**, v. 273, n. 13, p. 2955-62, 2006.
- 115- NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11<sup>a</sup>. **São Paulo: Atheneu**, 2005.
- 116- 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, 1994.
- 117- NOESKE-JUNGBLUT, C. et al. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 48, p. 28629-34, 1995.
- 118- NOIREAU, F. & DUJARDIN, J. P. **American Trypanosomiasis**. Cap. 7 - Biology of Triatominae, p. 149–168, 2010.
- 119- NUNES, C. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 62(9) p. 767-76, 2013.
- 120- OLIVEIRA, A. W. S. D.; SILVA, I. G. D. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. Suppl 2, p. 204-208, 2007.
- 121- OPAS. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas agudatransmitida por alimentos. **Organização Panamericana de Saúde**. Rio de Janeiro, 2009.
- 122- OPS-ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Análise de custoefetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil**. Brasília: OPS; 2000.

- 123- PAIM, R. Functional aspects of salivary nitric oxide synthase of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) and nitric oxide trafficking at the vector-host interface., v. 7, p. 16036, 2017.
- 124- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat. Methods**, v. 8, n. 10, p. 785-6, 2011.
- 125- PIRPIGNANI, M.; RIVERA, E.; HELMAN, U.; BISCOGLIO, M.; BONINO, J. Structural and immunological aspects of *Polybia scutellaris* antigen 5. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **New York**, v.407, p.224-230, 2002.
- 126- POINAR, G. Jr. *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. **Palaeodiversity**, v. 6, p. 1–8, 2013.
- 127- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.
- 128- RASSI, A.J; MARIN-NETO, J.A.; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of a etiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n.3, p. 224-235, 2017.
- 129- RASSI, A J; RASSI, A; MARIN-NETO, JA. Chagas disease. **Lancet.**, v. 17;375, p. 1388-1402, 2010.
- 130- RASSI, A. J.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.
- 131- RIBEIRO, J. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious agents and disease**, v. 4, n. 3, p. 143-152, 1995.
- 132- RIBEIRO, J. M. & NUSSENZVEIG, R. H. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. **FEBS Lett.**, v. 330(2), p 165-8, 1993.
- 133- RIBEIRO, J. M. C., SCHNEIDER, M. & GUIMARAES, J. A. purification and characterization of prolixin s (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochem. J.**, v. 308, p. 243-249, 1995.
- 134- RIBEIRO, SCHWARZ, FRANCISCHETTI, I. M. B. A deep insight into the sialotranscriptome of the Chagas disease vector, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Heteroptera)., v. 52(3), p. 351–358, 2015.
- 135- RIBEIRO, J. M. et al. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 79, n. 1, p. 81-6, 1984.

- 136- 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, 2003.
- 137- RIBEIRO, J. M.C., et al. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8(1):e2594, 2014.
- 138- RIBEIRO, J.M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 32, p 463-478, 1987.
- 139- RIBEIRO, J.M. Vector saliva and its role in parasite transmission. **Exp. Parasitol.** V. 69, p. 104-106, 1989.
- 140- RIBEIRO, M., et al. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Exp. Parasitol.**, v. 162, p. 1-6, 2016.
- 141- RIVERA, J. et al. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. **Haematologica**, v. 94, n. 5, p. 700-11, 2009.
- 142- ROBERTS, A. J; TORRIE, L. S; WYLLIE, S; FAIRLAMB, A. H. Biochemical and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* N-myristoyltransferase. **Biochem. J.** [s.l.: s.n.], 459, p. 323-332, 2014.
- 143- RODRIGUES, V. L. C. C. et al. Colonization of palm trees by *Rhodnius neglectus* and household invasion in an urban area, Araçatuba, São Paulo state, Brazil. **Ver. Inst. Med. Trop.**, v. 56, n. 3, p. 213-218, 2014.
- 144- ROSA, J. A., et al A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, v, 675, p. 1–25, 2017.
- 145- ROSA, M. C. D. Purificação parcial e caracterização da apirase salivar de *Rhodnius prolixus*. **Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília**, 2013.
- 146- SANTIAGO, P. B, et al. Exploring the molecular complexity of *Triatoma dimidiata* sialome. **J. Proteomics**, p. 47-60, 2017.
- 147- SANTIAGO, P. B. Descrição extensiva dos sialomas de *Rhodnius neglectus* e *Triatoma dimidiata*, vetores da doença de Chagas. **Tese de Doutorado.** Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2016.
- 148- 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, 2016.
- 149- 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, 2007.
- 150- SARKIS, J.; GUIMARÃES, J.; RIBEIRO, J. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus* kinetics and purification. **Biochem. J.** v. 233, p. 885-891, 1986.

- 151- SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102 (Suppl. I), p. 75-85, 2007.
- 152- SCHMUNIS, Gabriel. Tripanossomíase Americana: Seu impacto nas américas e perspectivas de eliminação. DIAS, João Carlos & COURA, José Rodrigues (orgs.) **Clínica Terapêutica da Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997.
- 153- SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution and species of groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, p. 88-100, 2009.
- 154- SILVA, et al. Saliva of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. **Parasites & Vectors**, v. 9:445, 2016.
- 155- SILVEIRA, A.C. & DIAS, J.C., The control of vectorial transmission. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44 (Suppl. 2), p. 52–63, 2011.
- 156- SMITH-CAVALIER, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **European J. Protistol.**, v. 56, p. 250-276, 2016.
- 157- SOARES, R. *et al.* Identification of morphologically similar *Rhodnius species* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. **American J. Trop. Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 1, p. 157-161, 2000.
- 158- SOUZA, E. D. *et al.* Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. **Zookeys**, n. 621, p. 45-62, 2016.
- 159- STEVERDING, D. The History of Chagas Disease. **Parasites & Vectors.**, v. 317(7), p. 1-8, 2014.
- 160- TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. D.; CERON, C. Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Brazilian J. Biol.**, v. 66, n. 2B, p. 703-708, 2006.
- 161- TEIXEIRA, A. Doença de Chagas e evolução. In: (Ed.). **Doença de Chagas e evolução: Editora da UNB/Finatec**, 2007.
- 162- 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, 2002.
- 163- VARGA-SZABO, D.; PLEINES, I.; NIESWANDT, B. Cell adhesion mechanisms in platelets. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, n. 3, p. 403-12, 2008.
- 164- VERSTEEG, H. H. *et al.* New fundamentals in hemostasis. **Physiol. Rev.**, v. 93, n. 1, p. 327-58, 2013.

- 165- VU, T.-K. H. et al. Characterization of a functional thrombin receptor **Nature**. v. 353, p. 674–677, 1991.
- 166- WANG, X., et al. Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibit or from the hard tick *Dermacentor variabilis*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 17785–17790, 1996.
- 167- WATSON, S. P. et al. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 8, p. 1752-62, 2005.
- 168- WHO 2011. Informal Consultation on Chagas Disease in the Western Pacific. Manila, Philippines.
- 169- WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organ. Fact Sheet**. 2017. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 30 out. 2017.
- 170- WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **World Health Organization**, 2010. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/)>.
- 171- WHO. Hidden successes, Emerging opportunities. **World Health Organization**, 2006. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/44214>>.
- 172- WHO. Second WHO report on neglected tropical diseases: sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **World Health Organization**, 2013. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564540/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/)>.
- 173- XU, X., et al. Structure and ligand-binding properties of the biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect vector of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Cryst.** D69, p. 105–113, 2013.
- 174- ZELEDÓN R., et al. An appraisal of the status of Chagas disease in the United States, **Elsevier, Amsterdam/Oxford**, p.102, 2012.
- 175- ZHANG, Y. et al. Nitroforin-2 a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-x activating complex. **Biochem.**, v. 37, p. 10681-10690, 1998.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Aprovação do comitê de ética para utilização de camundongos



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 10 de março de 2016.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "ADAMTS E ANTÍGENO 5 SALIVARES DE RHODNIUS NEGLECTUS, VETOR DE **TRYPANOSOMA CRUZI**: IDENTIFICAÇÃO DO PAPEL DESSAS MOLÉCULAS NA INTERAÇÃO VETOR-HOSPEDEIRO", UnBDoC n.º 27323/2016, sob responsabilidade da Professora Carla Nunes de Araújo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*: 10. A presente aprovação é válida pelo período de 2/04/2016 a 2/04/2018.

  
Prof. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB


\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## ANEXO 2: Análise *in silico* da sequência aminoacídica de antígeno 5

15/02/2018

SignalP 4.1 Server - prediction results

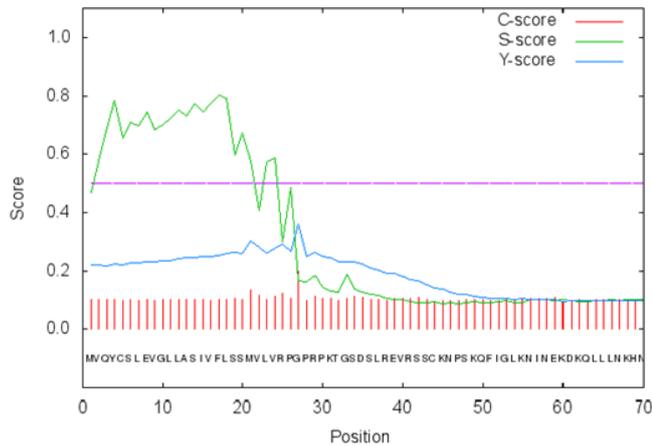


### SignalP 4.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

# SignalP-4.1 euk predictions  
>Sequence

SignalP-4.1 prediction (euk networks): Sequence



# Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	27	0.199		
max. Y	27	0.362		
max. S	17	0.802		
mean S	1-26	0.653		
D	1-26	0.519	0.450	YES

Name=Sequence SP='YES' Cleavage site between pos. 26 and 27: VRP-GP D=0.519 D-cutoff=0.450 Networks=SignalP-noTM

# data  
# gnuplot script

Signal peptides: 1  
# processed fasta entries  
# gff file of processed entries

Please cite:  
SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions  
Petersen TN., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H.  
Nature Methods, 8:785-786, 2011

[Explain](#) the output. Go [back](#).

<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=5A85A3A0000089B34CF9A5F0&wait=20>

1/1



## TargetP 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

---

```
### targetp v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions not included.
Using NON-PLANT networks.
```

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	274	0.069	0.888	0.058	S	1
cutoff		0.000	0.000	0.000		

[Explain](#) the output. Go [back](#).

---



## SecretomeP 2.0a Server - prediction results

Technical University of Denmark

---

Non-classically secreted proteins should obtain an NN-score / SecP score exceeding the threshold, but not at the same time be predicted to contain a signal peptide.

The recommended thresholds are **0.5** for bacterial sequences and **0.6** for mammalian sequences.

Network 1	Network 2	Network 3	SecP score	Sequence name
0.940811	0.910438	0.886753	0.912667	Sequence

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

---



## NetPhos 2.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

274 Sequence  
 MVQYCSLEVGLLASIVFLSSMVLVVRPGRPKTGSDSLREVRSSCKNPSKQF IGLKNINEKDKQLLLNKHKNKYREKVAAGK 80  
 EPPQPKAENMILLTWDSDAALQAKAWASGCDYGHNNPEIKKTKKPMGQNIYMKSSSTENGGLEKTFKKYIPENVKGYDEV 160  
 KLYTFGDAFSVKTGHFTQIVWKNNTTKVCGYVYFKERTDYQWFRGYLVCNYSYPAGNMEGEEPYKEGRGTCTGNLVASTKY 240  
 PHLCCQKKKEIIKKLGLFKQIFSYQILFYLTKIY 320  
 ...Y.....T...S.....S..... 80  
 .....S...Y.....T.....S.....T.....Y... 160  
 .....S.....T.....Y.....T.....S... 240  
 ..... 320

Phosphorylation sites predicted: Ser: 6 Thr: 5 Tyr: 5

### Serine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
v				
Sequence	6	VQYCSLEVG	0.166	.
Sequence	14	GLLASIVFL	0.004	.
Sequence	19	IVFLSSMVL	0.017	.
Sequence	20	VFLSSMVLV	0.022	.
Sequence	34	PKTGSDSL	0.234	.
Sequence	36	TGSDSLREV	0.996	*S*
Sequence	42	REVRSSCKN	0.332	.
Sequence	43	EVRSSCKNP	0.998	*S*
Sequence	48	CKNPSKQFI	0.060	.
Sequence	97	LTWDSDAAL	0.004	.
Sequence	108	KAWASGCDY	0.872	*S*
Sequence	134	IYMKSSSTEN	0.091	.
Sequence	135	YMKSSSTENG	0.990	*S*
Sequence	170	GDAFSVKTG	0.940	*S*
Sequence	212	VCNYSYPAGN	0.027	.
Sequence	237	NLVASTKYP	0.891	*S*
Sequence	263	KQIFSYQIL	0.009	.
^				

### Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
v				
Sequence	32	PRPKTGSDS	0.907	*T*
Sequence	94	MILLTWDS	0.056	.
Sequence	122	EIKKTKKPM	0.593	*T*
Sequence	136	MKSSTENGG	0.030	.
Sequence	144	GLEKTFKKY	0.569	*T*
Sequence	164	VKLYTFGDA	0.051	.
Sequence	173	FSVKTGHFT	0.084	.
Sequence	177	TGHFTQIVW	0.045	.
Sequence	184	VWKNNTKVG	0.898	*T*
Sequence	185	WKNNTKVG	0.353	.
Sequence	198	FKERTDYQW	0.071	.
Sequence	229	EGRGTCTGN	0.602	*T*
Sequence	231	RGTCTGNLV	0.112	.
Sequence	238	LVASTKYPH	0.229	.

15/02/2018

NetPhos 2.0 Server - prediction results

Sequence	271	LFYLT <sup>^</sup> KIY-	0.012	.
----- Tyrosine predictions -----				
Name	Pos	Context	Score	Pred
----- v -----				
Sequence	4	-MVQYCSLE	0.529	*Y*
Sequence	72	KHNKYREKV	0.141	.
Sequence	112	SGCDYGHNN	0.809	*Y*
Sequence	131	GQNIYMKSS	0.165	.
Sequence	148	TFKKYIPEM	0.027	.
Sequence	157	VKGWYDEVK	0.571	*Y*
Sequence	163	EVKLYTFGD	0.113	.
Sequence	191	VGCGYVYFK	0.268	.
Sequence	193	CGYVYFKER	0.019	.
Sequence	200	ERTDYQWFR	0.843	*Y*
Sequence	206	WFRGYLVCN	0.027	.
Sequence	211	LVCNYSFAG	0.011	.
Sequence	223	GEEPYKEGR	0.958	*Y*
Sequence	240	ASTKYPHLC	0.451	.
Sequence	264	QIFS <sup>v</sup> YQILF	0.015	.
Sequence	269	QILFYLT <sup>v</sup> KI	0.007	.
Sequence	274	LTKIY <sup>^</sup> ----	0.019	.
-----				



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

---

## GlycoEP: Prediction of Glycosylation site Result

<a href="#">Home</a>	<a href="#">Submit</a>	<a href="#">Contact</a>	<a href="#">Team</a>	<a href="#">Help</a>	<a href="#">Rachava</a>
----------------------	------------------------	-------------------------	----------------------	----------------------	-------------------------

No of sequences=1

Threshold Selected: 0.0

>seq Length = 274

### Potential O-Linked Glycosylated Sites:

MVQYCSLEVGLLA~~S~~I~~V~~FL~~SS~~MVLVLRPGPRPK~~T~~~~G~~~~S~~~~D~~~~S~~LREVR~~SS~~CKNFSKQFIGLKNINEKDKQLLNKHNKYREKVAAGKEPPQPKAENMILL~~T~~W~~S~~DAA  
LQAKAWASGCDYGHNNPEIKK~~T~~KKPMGQNIYMK~~SS~~TENGGLEK~~T~~FKKYIPEMVKGWYDEVKLY~~T~~FGDAF~~S~~V~~K~~~~T~~G~~H~~F~~T~~QIVWKN~~T~~~~T~~KVGGCVVYFKER~~T~~  
YQWFRGYLVCNYSFAGNMEGEEPEYKEGRG~~T~~~~C~~~~T~~GNLVA~~S~~~~T~~KYPHLCQKKKEIIKKLGLFKQIF~~S~~YQILFYL~~T~~KIY

Position	Residue	Score	Prediction
6	<del>S</del>	-0.35121235	Non-glycosylated
14	<del>S</del>	-0.42597413	Non-glycosylated
19	<del>S</del>	-0.36217842	Non-glycosylated
20	<del>S</del>	-0.38147348	Non-glycosylated
32	<del>T</del>	-0.16774317	Non-glycosylated
34	<del>S</del>	-0.16082826	Non-glycosylated
36	<del>S</del>	-0.47893778	Non-glycosylated
42	<del>S</del>	-0.41723907	Non-glycosylated
43	<del>S</del>	-0.15033922	Non-glycosylated
48	<del>S</del>	-0.54113561	Non-glycosylated
94	<del>T</del>	-0.2924931	Non-glycosylated
97	<del>S</del>	-0.36144694	Non-glycosylated
108	<del>S</del>	-0.19629973	Non-glycosylated
122	<del>T</del>	-0.035284295	Non-glycosylated
134	<del>S</del>	-0.34379481	Non-glycosylated
135	<del>S</del>	-0.40488931	Non-glycosylated
136	<del>T</del>	0.0092627823	Potential Glycosylated
144	<del>T</del>	-0.2732979	Non-glycosylated
164	<del>T</del>	-0.24639116	Non-glycosylated
170	<del>S</del>	-0.34840339	Non-glycosylated
173	<del>T</del>	-0.071098995	Non-glycosylated
177	<del>T</del>	0.071413557	Potential Glycosylated

<http://crdd.osdd.net/cgi-bin/glycoep/glyechk?ob=9430&tim=30>

1/2

15/02/2018 Prediction result for job No.9430

184	T	-0.18517504	Non-glycosylated
185	T	-0.049371419	Non-glycosylated
198	T	-0.17514647	Non-glycosylated
212	S	-0.37011514	Non-glycosylated
229	T	0.086100368	Potential Glycosylated
231	T	-0.084151906	Non-glycosylated
237	S	-0.26323322	Non-glycosylated
238	T	0.069356901	Potential Glycosylated
263	S	-0.51006681	Non-glycosylated
271	T	-0.0024960576	Non-glycosylated

\*\*\*\*\*

## GlycoEP: Prediction of Glycosylation site Result

<a href="#">Home</a>	<a href="#">Submit</a>	<a href="#">Contact</a>	<a href="#">Team</a>	<a href="#">Help</a>	<a href="#">Bachava</a>
----------------------	------------------------	-------------------------	----------------------	----------------------	-------------------------

No of sequences=1

Threshold Selected: 0.0

>seq Length = 274

### Potential N-Linked Glycosylated Sites:

MVQYCSLEVGLLASIVFLSSMVLVRPGPRPKTGSDSLREVRSSCKNPSKQFIGLKNI~~NE~~KDKQLLNKH~~N~~KYREKVAAGKEPPQPKAE~~N~~MILLTWSDAA  
 LQAKAWASGCDYGH~~NN~~PEIKKTKKPMGQNIYMKSTENGGLEKTFKKYIPEMVKGWYDEVKLYTFGDASFVKTGHFTQIVWKN~~N~~TTKVGCGYVYFKERTD  
 YQWFRGYLVC~~N~~YSPAG~~N~~MEGEEPYKEGRGTCTGNLVA~~N~~STKYPHLCQKKKEIIKKLGLFRQIFSYQILFYLT~~N~~KIY

Position	Residue	Score	Prediction
46	<del>N</del> PS	0.15730083	Potential Glycosylated
56	<del>N</del> IN	-1.2037684	Non-glycosylated
58	<del>N</del> EK	-1.0031091	Non-glycosylated
67	<del>N</del> KH	-1.2246447	Non-glycosylated
70	<del>N</del> KY	-1.114739	Non-glycosylated
89	<del>N</del> MI	-0.98897018	Non-glycosylated
115	<del>NN</del> P	-1.3148763	Non-glycosylated
116	<del>N</del> PE	-1.0569399	Non-glycosylated
129	<del>N</del> IY	-0.97918599	Non-glycosylated
138	<del>N</del> GG	-1.1314634	Non-glycosylated
183	<del>N</del> TT	0.95672177	Potential Glycosylated
210	<del>N</del> YS	0.84934248	Potential Glycosylated
216	<del>N</del> ME	-1.1617924	Non-glycosylated
233	<del>N</del> LV	-1.0939288	Non-glycosylated

\*\*\*\*\*

## GlycoEP: Prediction of Glycosylation site Result

<a href="#">Home</a>	<a href="#">Submit</a>	<a href="#">Contact</a>	<a href="#">Team</a>	<a href="#">Help</a>	<a href="#">Bachava</a>
----------------------	------------------------	-------------------------	----------------------	----------------------	-------------------------

No of sequences=1

Threshold Selected: 0.0

>seq Length = 274

### Potential C-Linked Glycosylated Sites:

MVQYCSLEVGLLASIVFLSSMVLVRFPGPRPKTGSDSLREVRSSCKNPSKQFIGLKNINEKDKQLLNKHNKYREKVAAGKEPPQPKAENMILLT**Y**DSDAALQAKA**W**ASGCDYGHNNPEIKTKKPMGQNIYMKSTENGGLEKTFKKYIPEMVK**G**YDEVKLYTFGDASFVKTGHFTQIV**W**KNTTKVGGGYVYFKERTDY**Q**WFRGYLVLCNYSFAGNMEGEEPYKEGRGTCTGNLVASTKYPHLCQKKKEIIKKLGLFRQIFSYQILFYLTKIY

Position	Residue	Score	Prediction
95	<b>Y</b>	-0.65470521	Non-glycosylated
106	<b>Y</b>	-0.67995485	Non-glycosylated
156	<b>Y</b>	-0.82539719	Non-glycosylated
181	<b>Y</b>	-0.65605374	Non-glycosylated
202	<b>Y</b>	-0.68391209	Non-glycosylated

\*\*\*\*\*



## BepiPred 1.0b Server - prediction results

Technical University of Denmark

```
##gff-version 2
##source-version bepipred-1.0b
##date 2018-02-15
##Type Protein Sequence
##Protein Sequence cat seq.1.fsa
##MVVQYCSLEVGLLASIVFLSSMVLVVRPGPRPKTGSDSLREVRSSCKNPSKQF IGLKNINEKDKQLLLNKHKNKYREKVAAGK
##EPPQPKAENMILLTWDSDAALQAKAWASGCDYGHMNP EIKKTKKPMGQNIYMKSS TENGLEKTFKKYIPEMVKGWYDEV
##KLYTFGD&FSVRTGHFTQIVWKNNTTKVGCQYVYFKERTDYQWFRGYLVCNYS P&GNMEGEEP YKEGRGTC TGNLVASTKY
##PHLCQKKKEII IKKLG LFKQIFSYQILFYLTKIY
##end-Protein
# seqname          source          feature          start    end    score    N/A    ?
# -----
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          1        1    -1.216    . .    M|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          2        2    -0.995    . .    V|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          3        3    -1.287    . .    Q|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          4        4    -0.990    . .    Y|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          5        5    -1.068    . .    C|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          6        6    -0.877    . .    S|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          7        7    -1.007    . .    L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          8        8    -1.207    . .    E|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          9        9    -1.198    . .    V|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         10       10    -1.093    . .    G|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         11       11    -1.397    . .    L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         12       12    -1.336    . .    L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         13       13    -1.841    . .    A|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         14       14    -1.975    . .    S|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         15       15    -1.988    . .    I|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         16       16    -1.670    . .    V|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         17       17    -1.630    . .    F|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         18       18    -1.758    . .    L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         19       19    -2.168    . .    S|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         20       20    -2.011    . .    S|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         21       21    -1.638    . .    M|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         22       22    -1.028    . .    V|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         23       23    -0.381    . .    L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         24       24    -0.001    . .    V|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         25       25     0.311    . .    R|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         26       26     0.782    . .    P|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         27       27     1.297    . .    G|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         28       28     1.991    . .    P|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         29       29     2.346    . .    R|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         30       30     2.497    . .    P|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         31       31     2.517    . .    K|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         32       32     2.304    . .    T|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         33       33     1.722    . .    G|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         34       34     1.409    . .    S|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         35       35     1.201    . .    D|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         36       36     0.843    . .    S|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         37       37     0.647    . .    L|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         38       38     0.463    . .    R|E
```

15/02/2018

BepiPred 1.0b Server - prediction results

Sequence	bepipred-1.0b	epitope	39	39	0.295	..	E .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	40	40	0.047	..	V .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	41	41	0.106	..	R .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	42	42	0.507	..	S E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	43	43	0.683	..	S E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	44	44	0.913	..	C E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	45	45	1.220	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	46	46	1.177	..	N E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	47	47	0.889	..	P E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	48	48	0.521	..	S E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	49	49	0.513	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	50	50	0.084	..	Q .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	51	51	-0.056	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	52	52	-0.182	..	I .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	53	53	-0.629	..	G .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	54	54	-0.688	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	55	55	-0.554	..	K .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	56	56	-0.118	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	57	57	0.442	..	I E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	58	58	0.548	..	N E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	59	59	0.845	..	E E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	60	60	0.420	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	61	61	0.006	..	D .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	62	62	-0.193	..	K .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	63	63	-0.316	..	Q .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	64	64	-0.431	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	65	65	-0.561	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	66	66	-0.712	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	67	67	-0.737	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	68	68	-0.815	..	K .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	69	69	-0.371	..	H .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	70	70	0.098	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	71	71	0.556	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	72	72	0.461	..	Y E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	73	73	0.432	..	R E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	74	74	0.416	..	E E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	75	75	0.493	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	76	76	0.706	..	V E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	77	77	1.166	..	A E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	78	78	1.365	..	A E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	79	79	1.635	..	G E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	80	80	1.990	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	81	81	2.346	..	E E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	82	82	2.578	..	P E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	83	83	2.712	..	P E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	84	84	2.666	..	Q E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	85	85	2.451	..	P E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	86	86	1.802	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	87	87	1.137	..	A E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	88	88	0.340	..	E .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	89	89	-0.469	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	90	90	-0.722	..	M .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	91	91	-1.184	..	I .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	92	92	-1.068	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	93	93	-1.007	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	94	94	-0.783	..	T .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	95	95	-0.538	..	W .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	96	96	-0.132	..	D .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	97	97	0.063	..	S .
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	98	98	0.519	..	D E
Sequence	bepipred-1.0b	epitope	99	99	0.489	..	A E

<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=5A85A8FA000022ABF8C2B63D&wait=20>

2/3

15/02/2018

BepiPred 1.0b Server - prediction results

Sequence	bepipred-1.0b epitope	100	100	0.836	. .	A E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	101	101	0.590	. .	L E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	102	102	0.215	. .	Q . .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	103	103	-0.002	. .	A . .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	104	104	0.094	. .	K . .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	105	105	0.216	. .	A . .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	106	106	0.459	. .	W E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	107	107	0.582	. .	A E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	108	108	0.497	. .	S E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	109	109	0.501	. .	G E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	110	110	0.525	. .	C E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	111	111	0.977	. .	D E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	112	112	1.164	. .	Y E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	113	113	1.185	. .	G E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	114	114	1.293	. .	H E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	115	115	1.189	. .	N E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	116	116	1.076	. .	N E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	117	117	1.248	. .	P E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	118	118	1.229	. .	E E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	119	119	1.398	. .	I E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	120	120	1.282	. .	K E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	121	121	1.139	. .	K E
Sequence	bepipred-1.0b ep					

## ANEXO 3: Análise *in silico* da sequência aminoacídica de triabina

15/02/2018

SignalP 4.1 Server - prediction results

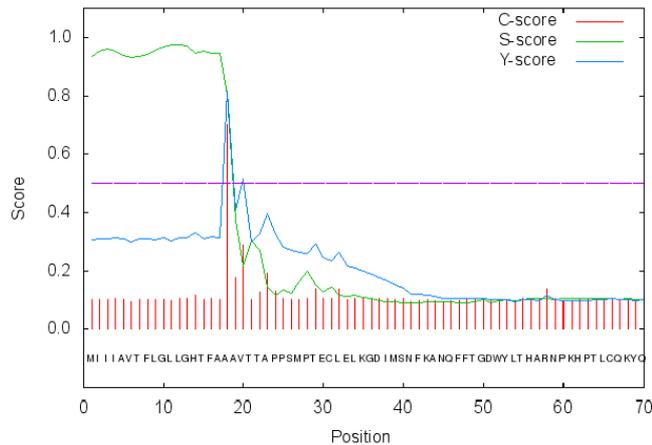


### SignalP 4.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

```
# SignalP-4.1 euk predictions
>Sequence
```

SignalP-4.1 prediction (euk networks): Sequence



```
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 18 0.703
max. Y 18 0.817
max. S 11 0.976
mean S 1-17 0.952
D 1-17 0.890 0.450 YES
```

```
Name=Sequence SP='YES' Cleavage site between pos. 17 and 18: TFA-AA D=0.890 D-cutoff=0.450 Networks=SignalP-noTM
# data
# gnuplot script
```

```
Signal peptides: 1
# processed fasta entries
# gff file of processed entries
```

Please cite:  
SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions  
Petersen TN., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H.  
Nature Methods, 8:785-786, 2011

[Explain](#) the output. Go [back](#).

<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=5A85A46800022ACF7E3A80D&wat=20>

1/1



## TargetP 1.1 Server - prediction results

### Technical University of Denmark

---

```
### targetp v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions not included.
Using NON-PLANT networks.
```

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	180	0.028	0.964	0.049	S	1
cutoff		0.000	0.000	0.000		

[Explain](#) the output. Go [back](#).

---



## SecretomeP 2.0a Server - prediction results

Technical University of Denmark

---

Non-classically secreted proteins should obtain an NN-score / SecP score exceeding the threshold, but not at the same time be predicted to contain a signal peptide.

The recommended thresholds are **0.5** for bacterial sequences and **0.6** for mammalian sequences.

Network 1	Network 2	Network 3	SecP score	Sequence name
0.924072	0.996951	0.873139	0.931387	Sequence

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

---



## NetPhos 2.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

180 Sequence  
 MIIIAVTFLLGHTFAAAVTTAPPSMPTECLELKGDI MSNFKANQFFTDGWDYLTHARNPKHPTLCQKYQAKPNLHLTFN 80  
 GNDGKDVTCQGAQVSGKEGFYSFECTTTSGQSFTSFVVVETDYDNYALLYRCGLYGTSTTPEDNFFLNRRKSSGEIPTE 160  
 LKAKLSQLDLNTSLTKLGCT  
 .....S.....Y..... 80  
 .....S.....S.....S.....Y.....TT.....SS..... 160  
 .....S..... 240

Phosphorylation sites predicted: Ser: 7 Thr: 2 Tyr: 2

### Serine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
v				
Sequence	26	TAPPSMPTE	0.757	*S*
Sequence	40	GDIMSNFKA	0.005	.
Sequence	95	GAKVSGKEG	0.993	*S*
Sequence	102	EGFYSECT	0.877	*S*
Sequence	109	CTTSGQSF	0.019	.
Sequence	112	TSGQSFTSF	0.573	*S*
Sequence	115	QSFTSFVW	0.024	.
Sequence	139	LYGTSTTPE	0.102	.
Sequence	153	FNRKSSGEI	0.986	*S*
Sequence	154	NRKSSGEIP	0.995	*S*
Sequence	166	KAKLSQLDL	0.659	*S*
Sequence	173	DLNTSLTKL	0.023	.

### Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
v				
Sequence	7	IIAVTFLLGL	0.018	.
Sequence	15	LLGHTFAAA	0.007	.
Sequence	21	AAAVTTAPP	0.163	.
Sequence	22	AAVTTAPPS	0.304	.
Sequence	29	PSMPTECLE	0.469	.
Sequence	49	NQFFTDGWY	0.057	.
Sequence	55	DWYLTHARN	0.255	.
Sequence	64	PKHPTLCQK	0.444	.
Sequence	78	NLHLTFNGN	0.024	.
Sequence	88	GKDVTCQGA	0.029	.
Sequence	106	SFECTTSG	0.128	.
Sequence	107	FECTTSGQ	0.115	.
Sequence	108	ECTTSGQS	0.455	.
Sequence	114	QSFTSFVW	0.068	.
Sequence	122	VVVETDYDN	0.272	.
Sequence	138	GLYGTSTTP	0.048	.
Sequence	140	YGTSTTPED	0.891	*T*
Sequence	141	GTSTTPEDN	0.899	*T*
Sequence	159	GEIPTELKA	0.161	.
Sequence	172	LDLNTSLTK	0.011	.
Sequence	175	NTSLTKLGC	0.060	.



## GlycoEP: Prediction of Glycosylation site Result

<a href="#">Home</a>	<a href="#">Submit</a>	<a href="#">Contact</a>	<a href="#">Team</a>	<a href="#">Help</a>	<a href="#">Rachava</a>
----------------------	------------------------	-------------------------	----------------------	----------------------	-------------------------

No of sequences=1

Threshold Selected: 0.0

>seq Length = 180

### Potential O-Linked Glycosylated Sites:

MIIIAVTFLGLLGHFAAAVTTAPPSPTECLELKGDIMSNFKANQFFTDWYLTTHARNPKHPTLCQKYQAKPNLHLTFNGNDGKDVTCQGAQVSGKEGF  
YSFECTTTSGOQSFISFMVVVEITDYNALLYRCGLYGTSTTPEDNFFLENRKSSEGEIPTLAKAKLSQLDLNLSLTKLGC

Position	Residue	Score	Prediction
7	T	0.10429186	Potential Glycosylated
15	T	0.16685669	Potential Glycosylated
21	T	0.62485171	Potential Glycosylated
22	T	0.50407931	Potential Glycosylated
26	S	-0.13978346	Non-glycosylated
29	T	0.16489886	Potential Glycosylated
40	S	-0.41414825	Non-glycosylated
49	T	-0.15517529	Non-glycosylated
55	T	-0.060148286	Non-glycosylated
64	T	-0.24748013	Non-glycosylated
78	T	-0.14632278	Non-glycosylated
88	T	-0.21255386	Non-glycosylated
95	S	-0.27153884	Non-glycosylated
102	S	-0.022758143	Non-glycosylated
106	T	0.2011085	Potential Glycosylated
107	T	0.055546572	Potential Glycosylated
108	T	0.28926134	Potential Glycosylated
109	S	-0.15084547	Non-glycosylated
112	S	-0.13898417	Non-glycosylated
114	T	0.30645938	Potential Glycosylated
115	S	-0.1087074	Non-glycosylated
122	T	-0.27567479	Non-glycosylated
138	T	-0.19377289	Non-glycosylated

15/02/2018 Prediction result for job No.2890

139	<u>S</u>	-0.1594064	Non-glycosylated
140	<u>T</u>	-0.23449281	Non-glycosylated
141	<u>T</u>	-0.16326666	Non-glycosylated
153	<u>S</u>	-0.35155779	Non-glycosylated
154	<u>S</u>	-0.19423994	Non-glycosylated
159	<u>T</u>	-0.18369574	Non-glycosylated
166	<u>S</u>	-0.19510783	Non-glycosylated
172	<u>T</u>	0.0014217644	Potential Glycosylated
173	<u>S</u>	-0.23446846	Non-glycosylated
175	<u>T</u>	0.18477158	Potential Glycosylated
180	<u>T</u>	0.25607146	Potential Glycosylated

\*\*\*\*\*

## GlycoEP: Prediction of Glycosylation site Result

<a href="#">Home</a>	<a href="#">Submit</a>	<a href="#">Contact</a>	<a href="#">Team</a>	<a href="#">Help</a>	<a href="#">Bachava</a>
----------------------	------------------------	-------------------------	----------------------	----------------------	-------------------------

No of sequences=1

Threshold Selected: 0.0

>seq Length = 180

### Potential N-Linked Glycosylated Sites:

MIIIAVTFILGLLGHFAAAVTTAPPSMPTCELELKGDIMSNFKANQFFFTGDWYLTHARNPKHPTLCQKYQAKFNLHLTFNCGNDGKDVTCQGAUVSGKEGF  
YSFECTTTSQGQSFTSMVVVETDYNLYALLYRCGLYGTSTTPEDNFLFNKRKSSGEIPELAKAKLSQLDLNTSLTKLGCT

Position	Residue	Score	Prediction
41	NFK	-1.1873368	Non-glycosylated
45	NQF	-1.0498752	Non-glycosylated
59	NPK	-1.2200828	Non-glycosylated
74	NLH	-1.1410209	Non-glycosylated
80	NGN	-0.75910194	Non-glycosylated
82	NDG	-1.1185516	Non-glycosylated
126	NYA	-1.0534919	Non-glycosylated
145	NFL	-1.1525011	Non-glycosylated
150	NRK	-0.86311821	Non-glycosylated
171	NTS	0.95366549	Potential Glycosylated

\*\*\*\*\*

## GlycoEP: Prediction of Glycosylation site Result

<a href="#">Home</a>	<a href="#">Submit</a>	<a href="#">Contact</a>	<a href="#">Team</a>	<a href="#">Help</a>	<a href="#">Bachava</a>
----------------------	------------------------	-------------------------	----------------------	----------------------	-------------------------

No of sequences=1

Threshold Selected: 0.0

>seq Length = 180

**Potential C-Linked Glycosylated Sites:**

MIIIAVTFLLGLGHTFAAAVTTAPPSMPTCELELKGDIMSNFKANQFFTGLWYLTHARNPKHPTLCQKYQAKPNLHMTFNGNDGKDVTCQGAKVSGKEGF  
YSFECTTTSQSFTSFMVVVETDYNALYRCGLYGTSTTTPEDNFFLENRKSSGEIPELAKKLSQLDLNLSLTKLGCT

Position	Residue	Score	Prediction
52	W	-0.70965514	Non-glycosylated

\*\*\*\*\*



## BepiPred 1.0b Server - prediction results

Technical University of Denmark

```
##gff-version 2
##source-version bepipred-1.0b
##date 2018-02-15
##Type Protein Sequence
##Protein Sequence cat seq.1.fsa
##MIIIAVTFLGLLGHFTFAAAVTTAPPSMPTCELELKGDI MSNFKANQFFTGDWYLTHARNPKHPTLCQKYQAKPNLHLTFN
##GNDGKDVTCQGAQVSGKEGFYSFECTTTSGQSFTSFMVVVETDYDNYALLYRCGLYGTSTTPEDNPLLFRKSSGEIPTE
##LKAKLSQLDLNTSLTRLGCT
##end-Protein
# seqname          source          feature          start    end    score  N/A  ?
# -----
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          1        1    -2.699  . .  M|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          2        2    -2.555  . .  I|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          3        3    -2.229  . .  I|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          4        4    -2.289  . .  I|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          5        5    -2.366  . .  A|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          6        6    -2.190  . .  V|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          7        7    -2.113  . .  T|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          8        8    -2.000  . .  F|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope          9        9    -1.613  . .  L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         10       10    -1.545  . .  G|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         11       11    -1.249  . .  L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         12       12    -1.452  . .  L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         13       13    -1.150  . .  G|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         14       14    -0.865  . .  H|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         15       15    -0.763  . .  T|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         16       16    -0.524  . .  F|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         17       17    -0.151  . .  A|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         18       18     0.026  . .  A|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         19       19     0.315  . .  A|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         20       20     0.498  . .  V|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         21       21     0.947  . .  T|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         22       22     1.345  . .  T|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         23       23     1.483  . .  A|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         24       24     1.603  . .  P|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         25       25     1.792  . .  P|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         26       26     1.847  . .  S|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         27       27     1.585  . .  M|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         28       28     0.982  . .  P|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         29       29     0.690  . .  T|E
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         30       30     0.208  . .  E|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         31       31    -0.050  . .  C|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         32       32    -0.070  . .  L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         33       33    -0.040  . .  E|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         34       34    -0.342  . .  L|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         35       35    -0.644  . .  K|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         36       36    -0.587  . .  G|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         37       37    -0.168  . .  D|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         38       38    -0.358  . .  I|.
Sequence          bepipred-1.0b  epitope         39       39     0.003  . .  M|.
```

15/02/2018

BepiPred 1.0b Server - prediction results

Sequence	bepipred-1.0b epitope	40	40	-0.133	..	S .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	41	41	-0.078	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	42	42	-0.199	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	43	43	-0.270	..	K .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	44	44	-0.373	..	A .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	45	45	-0.289	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	46	46	-0.201	..	Q .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	47	47	0.269	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	48	48	-0.037	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	49	49	-0.130	..	T .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	50	50	-0.553	..	G .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	51	51	-0.574	..	D .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	52	52	-0.346	..	W .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	53	53	-0.088	..	Y .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	54	54	0.001	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	55	55	0.098	..	T .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	56	56	-0.038	..	H .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	57	57	0.485	..	A E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	58	58	0.815	..	R E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	59	59	1.183	..	N E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	60	60	1.222	..	P E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	61	61	1.050	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	62	62	0.949	..	H E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	63	63	0.764	..	P E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	64	64	0.562	..	T E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	65	65	0.409	..	L E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	66	66	0.222	..	C .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	67	67	0.105	..	Q .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	68	68	0.280	..	K .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	69	69	0.319	..	Y .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	70	70	0.702	..	Q E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	71	71	0.563	..	A E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	72	72	0.498	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	73	73	0.064	..	P .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	74	74	0.083	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	75	75	-0.289	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	76	76	-0.253	..	H .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	77	77	-0.338	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	78	78	-0.170	..	T .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	79	79	-0.021	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	80	80	0.434	..	N E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	81	81	0.688	..	G E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	82	82	1.326	..	N E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	83	83	1.183	..	D E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	84	84	1.476	..	G E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	85	85	1.286	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	86	86	1.241	..	D E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	87	87	1.078	..	V E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	88	88	0.796	..	T E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	89	89	0.706	..	C E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	90	90	0.469	..	Q E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	91	91	0.369	..	G E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	92	92	0.679	..	A E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	93	93	0.859	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	94	94	1.096	..	V E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	95	95	1.082	..	S E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	96	96	0.786	..	G E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	97	97	0.630	..	K E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	98	98	0.526	..	E E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	99	99	0.284	..	G .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	100	100	0.212	..	F .

<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=5A85A8D000039AF718D2DE7&wait=20>

2/4

15/02/2018

BepiPred 1.0b Server - prediction results

Sequence	bepipred-1.0b epitope	101	101	-0.001	..	Y .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	102	102	-0.132	..	S .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	103	103	-0.251	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	104	104	-0.161	..	E .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	105	105	0.248	..	C .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	106	106	0.570	..	T E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	107	107	0.686	..	T E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	108	108	1.153	..	T E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	109	109	0.887	..	S E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	110	110	0.984	..	G E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	111	111	0.891	..	Q E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	112	112	0.488	..	S E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	113	113	0.028	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	114	114	-0.501	..	T .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	115	115	-0.946	..	S .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	116	116	-1.258	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	117	117	-1.274	..	M .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	118	118	-0.973	..	V .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	119	119	-0.736	..	V .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	120	120	-0.716	..	V .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	121	121	-0.169	..	E .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	122	122	0.246	..	T .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	123	123	0.478	..	D E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	124	124	0.598	..	Y E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	125	125	0.401	..	D E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	126	126	-0.100	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	127	127	-0.491	..	Y .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	128	128	-0.832	..	A .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	129	129	-0.967	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	130	130	-1.212	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	131	131	-1.645	..	Y .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	132	132	-1.601	..	R .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	133	133	-1.393	..	C .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	134	134	-0.868	..	G .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	135	135	-0.283	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	136	136	0.252	..	Y .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	137	137	0.581	..	G E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	138	138	0.918	..	T E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	139	139	1.269	..	S E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	140	140	1.874	..	T E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	141	141	1.992	..	T E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	142	142	1.566	..	P E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	143	143	0.976	..	E E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	144	144	0.327	..	D .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	145	145	-0.304	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	146	146	-0.542	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	147	147	-0.714	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	148	148	-0.906	..	L .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	149	149	-1.042	..	F .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	150	150	-0.903	..	N .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	151	151	-0.418	..	R .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	152	152	0.281	..	K .
Sequence	bepipred-1.0b epitope	153	153	0.652	..	S E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	154	154	1.168	..	S E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	155	155	1.266	..	G E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	156	156	1.456	..	E E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	157	157	1.093	..	I E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	158	158	0.994	..	P E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	159	159	0.679	..	T E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	160	160	0.606	..	E E
Sequence	bepipred-1.0b epitope	161	161	0.103	..	L .

<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=5A85A8D000039AF718D2DE7&wait=20>

3/4

15/02/2018

BepiPred 1.0b Server - prediction results

Sequence	bepipred-1.0b epitope	162	162	0.186	. .	KI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	163	163	0.101	. .	AI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	164	164	-0.290	. .	KI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	165	165	-0.400	. .	LI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	166	166	-0.449	. .	SI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	167	167	-0.385	. .	QI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	168	168	-0.272	. .	LI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	169	169	-0.228	. .	DI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	170	170	-0.221	. .	LI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	171	171	-0.245	. .	NI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	172	172	-0.267	. .	TI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	173	173	-0.291	. .	SI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	174	174	-0.391	. .	LI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	175	175	-0.189	. .	TI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	176	176	-0.258	. .	KI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	177	177	-0.316	. .	LI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	178	178	-0.521	. .	GI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	179	179	-0.284	. .	CI.
Sequence	bepipred-1.0b epitope	180	180	-0.362	. .	TI.

# -----

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

---

## ANEXO 4: Proteínas identificadas por espectrometria de massa referente às bandas 4, 5 e 6 da zimografia

Rn4

Protein	Protein	Accession	-	Coverag	#Pept	#Un	P	Ma	Description
2	1	R4G408 R4G408_RHOPR	24	44	37	3	Y	8	Aconitate hydratase_mitochondrial OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
3	2	R4FMH8 R4FMH8_RHOPR	24	39	40	3	Y	8	Putative hsp90 protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
1	4	T1HU08 T1HU08_RHOPR	24	43	45	4	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
4	6	R4G483 R4G483_RHOPR	21	35	31	3	Y	6	Putative radixin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
6	5	T1HDK5 T1HDK5_RHOPR	20	22	25	2	Y	9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
5	3	T11111 T11111_RHOPR	20	31	21	2	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
9	32	Q26239 NP1_RHOPR	20	48	15	6	Y	2	Nitrophenol-1 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
13	8	T1HX75 T1HX75_RHOPR	19	26	20	2	Y	9	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
23	9	T11044 T11044_RHOPR	18	22	15	1	Y	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
14	10	T1HB40 T1HB40_RHOPR	18	19	20	1	Y	9	Aconitate hydratase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
15	13	T1HSA9 T1HSA9_RHOPR	18	26	16	1	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
12	16	T1HFP9 T1HFP9_RHOPR	18	27	22	2	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
16	11	R4FQ90 R4FQ90_RHOPR	18	42	14	1	Y	4	Putative actin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
7	45	T1H7P5 T1H7P5_RHOPR	18	52	13	3	Y	2	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
7	46	Q94734 NP4_RHOPR	18	51	13	3	Y	2	Nitrophenol-4 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
20	15	T1HB89 T1HB89_RHOPR	17	26	15	1	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
22	14	B8LJ43 B8LJ43_RHOPR	17	26	16	1	Y	7	Transferrin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
22	12	R4G9V6 R4G9V6_RHOPR	17	27	16	1	Y	7	Putative transferrin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
26	63	Q7YT15 Q7YT15_RHOPR	17	40	11	5	Y	2	Nitrophenol 4A OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
8	33	R4FPG4 R4FPG4_RHOPR	17	58	16	1	Y	1	Putative salivary platelet aggregation inhibitor 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
8	34	Q94731 Q94731_RHOPR	17	58	16	1	Y	1	Salivary platelet aggregation inhibitor 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
24	18	T1HKY3 T1HKY3_RHOPR	17	18	14	1	Y	10	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
28	25	T1HRT1 T1HRT1_RHOPR	17	20	11	1	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
40	70	T1HZP3 T1HZP3_RHOPR	16	29	9	9	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
40	71	Q95041 Q95041_RHOPR	16	29	9	9	Y	3	Salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=2
25	17	T1HE95 T1HE95_RHOPR	16	20	14	1	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
27	20	T1HZU5 T1HZU5_RHOPR	16	11	12	1	Y	13	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
34	30	T1HF57 T1HF57_RHOPR	15	17	11	1	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
39	29	A0A004WUY9 A0A004WUY9_RH	15	14	10	1	Y	8	Relish OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
37	28	T1IB60 T1IB60_RHOPR	15	30	10	1	Y	4	Flavin-containing monooxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
21	31	T1HR52 T1HR52_RHOPR	15	18	15	1	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
29	37	T1IB40 T1IB40_RHOPR	15	6	10	1	Y	20	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
29	38	R4G3Y1 R4G3Y1_RHOPR	15	6	10	1	Y	20	Putative vitellogenin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
43	47	T1HW22 T1HW22_RHOPR	14	12	9	5	N	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
32	35	T1BW5 T1BW5_RHOPR	14	17	11	1	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
47	61	T1I625 T1I625_RHOPR	14	10	7	7	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
46	56	T1HW62 T1HW62_RHOPR	14	11	8	4	N	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
46	57	A0A1B2G381 A0A1B2G381_RHO	14	11	8	4	N	8	Phenol oxidase 2 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
33	48	T1IFN4 T1IFN4_RHOPR	14	16	10	7	N	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
57	67	R4G4X2 R4G4X2_RHOPR	13	11	6	6	Y	6	Putative aicar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase OS=Rhodnius prolixus PE=2
41	49	T1IBT2 T1IBT2_RHOPR	13	14	10	7	Y	7	Glycogen [starch] synthase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
52	58	T1HI54 T1HI54_RHOPR	13	12	7	7	Y	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
17	68	T1I9F9 T1I9F9_RHOPR	13	13	13	1	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
60	75	T1I9S1 T1I9S1_RHOPR	13	29	5	5	Y	2	Flavin-containing monooxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
30	59	T1H7Y9 T1H7Y9_RHOPR	13	15	10	1	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
50	69	T1HB68 T1HB68_RHOPR	13	10	6	6	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
45	73	Q26241 NP2_RHOPR	13	39	7	4	Y	2	Nitrophenol-2 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
68	84	T1HAC7 T1HAC7_RHOPR	13	9	5	5	Y	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
70	81	T1HBM4 T1HBM4_RHOPR	12	12	5	5	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
36	51	T1I7V8 T1I7V8_RHOPR	12	12	9	6	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
36	52	A0A1B2G385 A0A1B2G385_RHO	12	12	9	6	Y	8	Phenol oxidase 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
59	72	T1HA59 T1HA59_RHOPR	12	29	6	6	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
49	85	T1I1C5 T1I1C5_RHOPR	12	20	7	7	N	2	Metalloendopeptidase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
44	64	R4G8S8 R4G8S8_RHOPR	12	14	7	6	Y	5	Elongation factor 1-alpha OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
73	1	Q86P79 Q86P79_RHOPR	12	17	5	3	N	2	Biogenic amine-binding protein OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
73	1	R4FLH5 R4FLH5_RHOPR	12	17	5	3	N	2	Putative biogenic amine-binding protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
48	60	T1I3Q3 T1I3Q3_RHOPR	12	12	7	7	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
64	80	T1I4U6 T1I4U6_RHOPR	12	30	5	5	Y	1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
54	62	R4FNU0 R4FNU0_RHOPR	12	13	7	7	N	6	Putative xaa-pro aminopeptidase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
58	82	R4G5M1 R4G5M1_RHOPR	11	10	6	3	Y	7	Putative hsp70 family member (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
58	83	T1HJT8 T1HJT8_RHOPR	11	10	6	3	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
66	1	R4FPW7 R4FPW7_RHOPR	11	18	6	4	Y	2	Putative nitrophenol 1a OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
66	1	Q7YT11 Q7YT11_RHOPR	11	18	6	4	Y	2	Nitrophenol 1A OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
51	74	T1HFJ2 T1HFJ2_RHOPR	11	12	5	5	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
61	65	R4F55 R4F55_RHOPR	11	26	6	6	Y	2	Putative antigen-5-like protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
71	90	R4G393 R4G393_RHOPR	11	12	5	5	Y	5	Carboxylic ester hydrolase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1

71	91	T1H8Y3 T1H8Y3_RHOPR	11	9	5	5	Y	6	Carboxylic ester hydrolase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
62	78	T1HIL3 T1HIL3_RHOPR	11	6	6	6	Y	11	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
62	79	Q26240 NOS_RHOPR	11	5	6	6	Y	13	Nitric oxide synthase_salivary gland OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
38	1	Q7YSZ8 Q7YSZ8_RHOPR	11	39	5	5	Y	1	GE-rich protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
53	87	R4G7Q1 R4G7Q1_RHOPR	11	16	5	5	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
92	1	T1IE11 T1IE11_RHOPR	10	5	6	6	N	11	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
75	95	T1HHF3 T1HHF3_RHOPR	10	34	5	3	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
82	1	R4GSZ8 R4GSZ8_RHOPR	10	21	4	4	N	1	Putative biogenic amine-binding protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
82	1	T1HTC8 T1HTC8_RHOPR	10	18	4	4	N	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
79	1	R4G4C9 R4G4C9_RHOPR	10	10	4	4	Y	5	Homogentisate 1,2-dioxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
91	99	T1HEA8 T1HEA8_RHOPR	10	8	4	4	N	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
85	1	T18C2 T18C2_RHOPR	10	8	4	4	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
72	93	T1HQV9 T1HQV9_RHOPR	10	9	5	5	Y	7	Protein-serine/threonine kinase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
78	97	T1HV8 T1HV8_RHOPR	10	10	5	5	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
63	77	T1HG38 T1HG38_RHOPR	10	7	6	6	N	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
92	1	T1HHZ9 T1HHZ9_RHOPR	9	8	4	4	N	4	Tubulin alpha chain (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
92	1	T1HWF2 T1HWF2_RHOPR	9	8	4	4	N	4	Tubulin alpha chain (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
92	1	R4G8S7 R4G8S7_RHOPR	9	8	4	4	N	4	Tubulin alpha chain OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
92	1	R4FNL0 R4FNL0_RHOPR	9	8	4	4	N	4	Tubulin alpha chain OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
65	89	R4FN70 R4FN70_RHOPR	9	30	5	2	Y	1	Putative lipocalin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
80	1	T1HYN4 T1HYN4_RHOPR	9	10	4	4	Y	5	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
80	1	R4FK9 R4FK9_RHOPR	9	10	4	4	Y	5	Putative aminopeptidase of the m17 family OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
74	88	R4G561 R4G561_RHOPR	9	7	5	4	N	7	Beta-galactosidase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
81	1	Q7YSZ2 Q7YSZ2_RHOPR	9	32	4	4	Y	1	Putative salivary protein myosin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
113	1	T1836 T1836_RHOPR	9	14	3	3	Y	2	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
69	96	T1HC49 T1HC49_RHOPR	9	10	4	4	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
83	1	R4FG8 R4FG8_RHOPR	9	8	5	2	Y	7	Putative hsp70 protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
115	1	R4G8M9 R4G8M9_RHOPR	9	15	3	2	Y	2	Putative nitrophenol 1-like OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
116	1	T1H812 T1H812_RHOPR	8	25	3	3	Y	1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
116	1	R4FPQ1 R4FPQ1_RHOPR	8	20	3	3	Y	2	Putative triabin-like lipocalin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
112	1	T1HFV2 T1HFV2_RHOPR	8	11	3	2	N	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
86	1	T1HWY2 T1HWY2_RHOPR	8	7	4	4	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
101	1	T1IEG7 T1IEG7_RHOPR	8	4	3	3	Y	9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
119	1	T1HVH9 T1HVH9_RHOPR	8	6	3	3	N	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
120	1	R4G4D5 R4G4D5_RHOPR	8	6	3	3	Y	6	Putative thioredoxin reductase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
88	1	R4G3G8 R4G3G8_RHOPR	8	8	4	4	N	6	Putative v-apsase subunit alpha OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
114	1	R4G4V3 R4G4V3_RHOPR	8	8	3	3	Y	5	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
122	1	T14G8 T14G8_RHOPR	8	5	3	3	N	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
87	98	T113X8 T113X8_RHOPR	8	5	4	4	Y	11	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
109	1	G1K0S0 G1K0S0_RHOPR	8	43	3	3	N	9	Ubiquitin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
109	1	R4G4B9 R4G4B9_RHOPR	8	27	3	3	N	1	Putative ribosomal protein l40 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
109	1	T117H5 T117H5_RHOPR	8	12	3	3	N	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
109	1	R4G516 R4G516_RHOPR	8	6	3	3	N	6	Putative polyubiquitin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
102	1	T118D5 T118D5_RHOPR	8	12	3	3	Y	3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
89	1	R7WR04 R7WR04_9NOCA	8	7	3	3	Y	5	Dehydrogenase OS=Rhodococcus rhodnii LMG 5362 GN=Rhod_0877 PE=3 SV=1
137	1	T1H8F8 T1H8F8_RHOPR	7	12	2	2	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
130	1	T11875 T11875_RHOPR	7	17	2	2	N	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
90	1	T118U8 T118U8_RHOPR	7	6	3	3	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
110	1	T1HM48 T1HM48_RHOPR	7	10	3	3	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
131	1	T1HPM7 T1HPM7_RHOPR	7	3	2	2	N	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
123	1	T1HGP5 T1HGP5_RHOPR	7	12	3	3	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
95	1	T11GL9 T11GL9_RHOPR	7	4	4	3	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
117	1	T11356 T11356_RHOPR	7	8	3	3	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
106	1	T1HPW0 T1HPW0_RHOPR	7	4	2	2	N	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
118	1	R4FL8 R4FL8_RHOPR	6	21	3	3	Y	1	Putative lipocalin ai-7 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
107	1	T1H9Q6 T1H9Q6_RHOPR	6	7	3	3	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
148	2	T1H876 T1H876_RHOPR	6	30	2	2	N	1	Histone H2A (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
148	2	R4FMP4 R4FMP4_RHOPR	6	30	2	2	N	1	Histone H2A OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
139	1	R4G3N4 R4G3N4_RHOPR	6	9	2	2	N	3	Putative porphobilinogen synthase pbgs OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
140	1	R4FP56 R4FP56_RHOPR	6	21	2	2	Y	1	Putative lipocalin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
142	1	R4G417 R4G417_RHOPR	6	13	2	2	N	2	Putative glutathione s-transferase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
104	1	T1HM81 T1HM81_RHOPR	6	4	2	2	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
103	1	T1HR3 T1HR3_RHOPR	6	5	3	3	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
129	1	A0A1B2G383 A0A1B2G383_RHO	6	6	2	2	N	4	Fumarylacetoacetate OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
129	1	R4G8A7 R4G8A7_RHOPR	6	6	2	2	N	4	Putative fumarylacetoacetate hydrolase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
147	2	R4FOG1 R4FOG1_RHOPR	6	3	2	2	N	5	ATP synthase subunit alpha OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
132	1	T1HGL0 T1HGL0_RHOPR	6	3	2	2	N	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
108	1	R4G595 R4G595_RHOPR	5	15	3	3	Y	2	Putative nitrophenol OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
108	1	Q6PK2 NP7_RHOPR	5	15	3	3	Y	2	Nitrophenol-7 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
143	1	R4FL04 R4FL04_RHOPR	5	6	2	2	N	5	Putative metalloproteinase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
145	2	T113T6 T113T6_RHOPR	5	1	2	2	N	12	Alpha-1,4 glucan phosphorylase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
144	2	T1HX8 T1HX8_RHOPR	4	4	2	2	N	6	Malic enzyme (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
128	1	R4G2M9 R4G2M9_RHOPR	4	5	2	2	N	5	Protein phosphatase 2a regulatory subunit a (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
128	1	T1H983 T1H983_RHOPR	4	3	2	2	N	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=2
150	2	T11DX3 T11DX3_RHOPR	4	7	2	2	Y	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
127	1	T1H19 T1H19_RHOPR	4	3	2	2	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
134	2	T1HWC3 T1HWC3_RHOPR	3	1	2	2	N	26	Spectrin beta chain OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1

# Rn5

Protein	Protein	Accession	-	Coverag	#Pept	#Un	P	Mas	Description
1	1	T1HU08 T1HU08_RHOPR	32	72	1	1	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
3	6	BBLJ43 BBLJ43_RHOPR	27	61	56	1	Y	7	Transferrin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
3	5	R4G8W6 R4G8W6_RHOPR	27	63	56	5	Y	7	Putative transferrin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
2	12	T1HRT1 T1HRT1_RHOPR	26	61	56	5	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
5	8	T1HJT8 T1HJT8_RHOPR	26	44	35	2	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
5	7	R4G5M1 R4G5M1_RHOPR	26	45	35	2	Y	7	Putative hsp70 family member (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
6	2	A0A1B2G385 A0A1B2G385_RH	26	52	39	3	Y	8	Phenol oxidase 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
4	4	R4G8G8 R4G8G8_RHOPR	25	55	36	3	Y	6	Putative v-atpase subunit a OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
9	11	T1HW62 T1HW62_RHOPR	24	43	35	1	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
9	9	A0A1B2G381 A0A1B2G381_RH	24	42	35	1	Y	8	Phenol oxidase 2 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
11	10	T1HE95 T1HE95_RHOPR	24	46	31	3	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
8	14	T1HW22 T1HW22_RHOPR	23	39	34	2	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
10	16	T1HFR5 T1HFR5_RHOPR	22	47	36	3	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
13	15	T1HFR9 T1HFR9_RHOPR	22	42	31	5	Y	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
15	13	T1HDK5 T1HDK5_RHOPR	21	28	22	2	Y	9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
21	17	T1HW51 T1HW51_RHOPR	20	32	20	2	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
25	30	R4F0G8 R4F0G8_RHOPR	20	23	15	8	Y	7	Putative hsp70 protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
7	50	T1HZP3 T1HZP3_RHOPR	20	41	29	2	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
7	51	Q95041 Q95041_RHOPR	20	41	29	2	Y	3	Salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=2
19	18	R4FNJ0 R4FNJ0_RHOPR	20	32	21	2	Y	6	Putative xaa-pro aminopeptidase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
16	22	T1HS98 T1HS98_RHOPR	20	29	20	2	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
22	58	Q26239 NP1_RHOPR	20	49	16	5	Y	2	Nitrophenol-1 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
26	57	Q94734 NP4_RHOPR	19	52	14	2	Y	2	Nitrophenol-4 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
26	56	T1H7P5 T1H7P5_RHOPR	19	52	14	2	Y	2	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
23	25	T1HV8 T1HV8_RHOPR	19	27	15	1	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
12	49	T1HW12 T1HW12_RHOPR	18	41	17	1	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
32	31	T1HFJ2 T1HFJ2_RHOPR	18	27	15	1	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
28	26	R4G4X2 R4G4X2_RHOPR	18	29	15	1	Y	6	Putative aicar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
43	36	T1HFS7 T1HFS7_RHOPR	18	22	14	1	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
49	27	T1HV64 T1HV64_RHOPR	18	22	13	1	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
27	46	R4FFG4 R4FFG4_RHOPR	18	54	13	1	Y	1	Putative salivary platelet aggregation inhibitor 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
27	47	Q94731 Q94731_RHOPR	18	54	13	1	Y	1	Salivary platelet aggregation inhibitor 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
40	24	T1H816 T1H816_RHOPR	17	29	14	1	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
20	28	T1HC49 T1HC49_RHOPR	17	41	19	1	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
48	66	Q7YT15 Q7YT15_RHOPR	17	46	11	3	Y	2	Nitrophenol 4A OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
30	40	T1HM48 T1HM48_RHOPR	17	33	11	1	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
42	29	T1I111 T1I111_RHOPR	16	21	13	1	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
36	45	Q94733 NP3_RHOPR	16	49	10	7	Y	2	Nitrophenol-3 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
33	61	T1HM42 T1HM42_RHOPR	16	46	10	9	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
41	33	R4G5V5 R4G5V5_RHOPR	16	24	12	1	Y	6	Putative phosphoenolpyruvate carboxykinase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
35	52	T1HFV2 T1HFV2_RHOPR	16	37	11	3	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
31	32	T18C2 T18C2_RHOPR	16	24	13	1	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
38	35	T1HSH7 T1HSH7_RHOPR	16	20	13	1	Y	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
47	39	T1IBT2 T1IBT2_RHOPR	16	21	12	1	Y	7	Glycogen [starch] synthase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
29	34	T1I107 T1I107_RHOPR	15	23	13	1	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
34	38	T1HKP0 T1HKP0_RHOPR	15	19	13	1	Y	7	Trehalase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
52	42	T1HQA1 T1HQA1_RHOPR	15	13	10	6	N	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
54	41	T1HMW9 T1HMW9_RHOPR	15	32	10	1	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
56	63	R4FNL0 R4FNL0_RHOPR	15	23	8	8	Y	4	Tubulin alpha chain OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
56	62	T1H4Z9 T1H4Z9_RHOPR	15	23	8	8	Y	4	Tubulin alpha chain (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
37	87	T1HU07 T1HU07_RHOPR	15	44	9	9	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
50	53	T1HAD6 T1HAD6_RHOPR	15	36	10	1	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
63	71	R4FP55 R4FP55_RHOPR	15	29	8	8	Y	2	Putative antigen-5-like protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
62	48	T1HSA9 T1HSA9_RHOPR	14	16	9	9	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
45	54	R4F090 R4F090_RHOPR	14	26	9	4	Y	4	Putative actin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
72	88	T1IAR5 T1IAR5_RHOPR	14	13	7	6	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
44	43	T1HEI4 T1HEI4_RHOPR	14	19	13	1	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
55	44	T1IBU1 T1IBU1_RHOPR	14	20	10	1	Y	6	Serine/threonine-protein phosphatase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
93	1	T1IB95 T1IB95_RHOPR	13	26	4	4	Y	2	Flavin-containing monooxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
60	92	R4G4E6 R4G4E6_RHOPR	13	34	7	2	Y	1	Putative lipocalin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
80	1	T1HFF5 T1HFF5_RHOPR	13	34	5	5	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
39	86	T1I9F9 T1I9F9_RHOPR	12	12	9	9	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
24	98	T1HZP0 T1HZP0_RHOPR	12	17	12	5	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
24	99	R4FNJ8 R4FNJ8_RHOPR	12	17	12	5	Y	3	Putative salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
85	1	T1I836 T1I836_RHOPR	12	30	5	5	Y	2	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
46	55	R4FNS7 R4FNS7_RHOPR	12	20	8	2	Y	4	Tubulin beta chain OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
59	80	T1H4U6 T1H4U6_RHOPR	12	34	6	6	Y	1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
66	70	R4G8S8 R4G8S8_RHOPR	12	15	7	7	Y	5	Elongation factor 1-alpha OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
74	68	T1HXC8 T1HXC8_RHOPR	12	16	7	7	Y	6	Malic enzyme (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
67	77	T1HVE5 T1HVE5_RHOPR	12	20	7	2	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1

73	83	T1H983 T1H983_RHOPR	12	11	6	6	N	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=2
57	97	Q7YT04 Q7YT04_RHOPR	12	32	7	3	Y	1	Triabin-like lipocalin 3 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
68	1	T1H812 T1H812_RHOPR	11	26	5	3	Y	1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
88	1	Q26241 NP2_RHOPR	11	24	5	2	Y	2	Nitrophenol-2 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
81	84	R4G4D5 R4G4D5_RHOPR	11	11	6	6	Y	6	Putative thioredoxin reductase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
75	72	T1HEA8 T1HEA8_RHOPR	11	14	7	7	Y	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
92	1	R4G4C9 R4G4C9_RHOPR	11	13	5	5	Y	5	Homogenisate 1_2-dioxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
85	1	R4FM92 R4FM92_RHOPR	11	11	4	4	N	5	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
103	1	Q86PT9 Q86PT9_RHOPR	11	12	4	2	N	2	Biogenic amine-binding protein OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
103	1	R4FLH5 R4FLH5_RHOPR	11	12	4	2	N	2	Putative biogenic amine-binding protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
104	1	R4FPW7 R4FPW7_RHOPR	11	11	4	2	Y	2	Putative nitrophenol 1a OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
104	1	Q7YT11 Q7YT11_RHOPR	11	11	4	2	Y	2	Nitrophenol 1A OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
63	85	R4FLF8 R4FLF8_RHOPR	11	36	6	4	Y	1	Putative lipocalin ai-7 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
87	1	R4FPS6 R4FPS6_RHOPR	11	49	4	4	Y	1	Putative lipocalin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
76	82	T1HR80 T1HR80_RHOPR	11	14	6	6	Y	5	Pyruvate kinase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
70	1	T1IFN4 T1IFN4_RHOPR	11	11	6	6	N	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
92	1	Q7YT10 Q7YT10_RHOPR	10	17	4	2	Y	1	Lipocalin AI-3 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
79	1	T1IB60 T1IB60_RHOPR	10	15	5	5	Y	4	Flavin-containing monooxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
91	1	T1HB40 T1HB40_RHOPR	10	5	4	4	Y	9	Aconitate hydratase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
78	81	T1H972 T1H972_RHOPR	10	10	6	6	Y	7	Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
69	74	T1HUM9 T1HUM9_RHOPR	10	52	7	7	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
119	1	R4GSZ8 R4GSZ8_RHOPR	9	13	3	3	N	1	Putative biogenic amine-binding protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
119	1	T1HTC8 T1HTC8_RHOPR	9	11	3	3	N	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
115	1	T1IE29 T1IE29_RHOPR	9	14	3	3	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
115	1	R4GBD5 R4GBD5_RHOPR	9	14	3	3	Y	2	Putative dehydrogenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
71	2	Q7YSZ8 Q7YSZ8_RHOPR	9	17	3	3	Y	1	GE-rich protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
108	1	T1HAS9 T1HAS9_RHOPR	9	17	3	3	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
90	1	R4G4H9 R4G4H9_RHOPR	9	28	4	4	Y	2	Putative triabin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
86	1	T1HB91 T1HB91_RHOPR	9	8	5	4	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
124	1	R4FKF9 R4FKF9_RHOPR	9	5	2	2	N	5	Putative aminopeptidase of the m17 family OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
124	1	T1HYN4 T1HYN4_RHOPR	9	5	2	2	N	5	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
99	1	T1HIL3 T1HIL3_RHOPR	9	5	4	4	Y	11	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
99	1	Q26240 NOS_RHOPR	9	5	4	4	Y	13	Nitric oxide synthase, salivary gland OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
111	1	R4G393 R4G393_RHOPR	8	7	3	3	Y	5	Carboxylic ester hydrolase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
111	1	T1H8Y3 T1H8Y3_RHOPR	8	6	3	3	Y	6	Carboxylic ester hydrolase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
109	1	T1HN35 T1HN35_RHOPR	8	21	3	3	N	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
102	1	T1HGK7 T1HGK7_RHOPR	8	38	3	3	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
116	1	R4G3G0 R4G3G0_RHOPR	8	16	3	3	N	2	Putative triabin-like protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
121	1	R4G408 R4G408_RHOPR	8	4	2	2	Y	8	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
132	1	R4G417 R4G417_RHOPR	8	13	2	2	N	2	Putative glutathione s-transferase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
95	1	T1I0W4 T1I0W4_RHOPR	8	6	2	2	N	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
128	1	T1HGQ7 T1HGQ7_RHOPR	8	5	4	4	N	9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
112	1	R4G5I9 R4G5I9_RHOPR	8	11	3	3	Y	3	Putative arginine kinase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
134	1	T1I1X9 T1I1X9_RHOPR	8	3	2	2	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
127	1	T1HVM4 T1HVM4_RHOPR	7	13	2	2	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
89	1	T1HH29 T1HH29_RHOPR	7	11	4	4	Y	4	Peptidylprolyl isomerase OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
113	1	T1I356 T1I356_RHOPR	7	8	3	3	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
106	1	R7WR04 R7WR04_9NOCA	7	5	2	2	N	5	Dehydrogenase OS=Rhodococcus rhodnii LMG 5362 GN=Rhod_0877 PE=3 SV=1
133	1	R4G614 R4G614_RHOPR	7	6	2	2	N	6	Putative asparaginyl-lyase synthetase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
117	1	A0A1B2G383 A0A1B2G383_RH	7	8	3	3	Y	4	Fumarylacetoacetate OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
117	1	R4G8A7 R4G8A7_RHOPR	7	8	3	3	Y	4	Putative fumarylacetoacetate hydrolase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
114	1	T1I1C5 T1I1C5_RHOPR	7	14	3	3	Y	2	Metalloendopeptidase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
118	1	R4G8G7 R4G8G7_RHOPR	7	6	3	2	N	6	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
136	1	T1HHF3 T1HHF3_RHOPR	6	10	2	2	N	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
101	1	T1HR11 T1HR11_RHOPR	6	3	3	3	N	12	ATP-citrate synthase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
110	1	G1K0F8 G1K0F8_RHOPR	5	26	3	3	N	1	Ubiquitin/40S ribosomal protein S27a fusion (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
110	1	R4G4B9 R4G4B9_RHOPR	5	22	3	3	N	1	Putative ribosomal protein L40 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
110	1	R4G538 R4G538_RHOPR	5	18	3	3	N	1	Putative ubiquitin/ribosomal protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
110	1	T1I7H5 T1I7H5_RHOPR	5	10	3	3	N	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
110	1	R4G516 R4G516_RHOPR	5	5	3	3	N	6	Putative polyubiquitin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
107	1	R4FMH8 R4FMH8_RHOPR	4	5	3	2	N	8	Putative hsp90 protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
137	1	T1HK11 T1HK11_RHOPR	4	3	2	2	N	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
120	2	R7WM68 R7WM68_9NOCA	3	0	2	2	N	119	Non-ribosomal peptide synthetase OS=Rhodococcus rhodnii LMG 5362 GN=Rhod_2286 PE=4 SV=1

# Rn6

Protein	Protein	Accession	Coverage	#Pept	#U	P	Ma	Description	
2	2	T1H2P3 T1H2P3_RHOPR	39	67	84	7	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
2	3	Q95041 Q95041_RHOPR	39	67	84	7	Y	3	Salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=2
1	1	T1HU08 T1HU08_RHOPR	37	81	1	1	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
3	4	T1HRT1 T1HRT1_RHOPR	33	66	69	6	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
4	12	T1HDK5 T1HDK5_RHOPR	31	54	67	6	Y	9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
7	8	B8L43 B8L43_RHOPR	30	63	58	5	Y	7	Transferrin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
7	7	R4G8W6 R4G8W6_RHOPR	30	66	58	5	Y	7	Putative transferin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
11	16	R4G5I9 R4G5I9_RHOPR	29	59	35	3	Y	3	Putative arginine kinase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
10	10	R4G5M1 R4G5M1_RHOPR	28	45	37	2	Y	7	Putative hsp70 family member (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
10	11	T1HU18 T1HU18_RHOPR	28	44	37	2	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
15	5	AOA1B2G385 AOA1B2G385_RHOP	28	52	39	3	Y	8	Phenol oxidase 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
14	9	R4G8G8 R4G8G8_RHOPR	28	55	36	3	Y	6	Putative v-actin subunit 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
9	23	R4FQ90 R4FQ90_RHOPR	27	68	27	5	Y	4	Putative actin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
22	15	T1HW62 T1HW62_RHOPR	27	46	37	2	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
22	14	AOA1B2G381 AOA1B2G381_RHOP	27	46	37	2	Y	8	Phenol oxidase 2 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
31	22	R4FMH8 R4FMH8_RHOPR	26	39	40	3	Y	8	Putative hsp90 protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
27	20	R4G408 R4G408_RHOPR	26	43	36	3	Y	8	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
20	13	T1HE95 T1HE95_RHOPR	26	48	32	3	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
30	25	R4G3Y1 R4G3Y1_RHOPR	26	20	33	3	Y	20	Putative vitellogenin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
30	24	T1B40 T1B40_RHOPR	26	20	33	3	Y	20	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
13	84	Q26239 NP1_RHOPR	26	57	20	7	Y	2	Nitrophenol 1 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
17	21	T1HW22 T1HW22_RHOPR	26	42	36	2	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
21	18	T1HFR5 T1HFR5_RHOPR	25	51	37	4	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
26	17	T1HFR9 T1HFR9_RHOPR	25	44	32	6	Y	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
12	94	Q94734 NP4_RHOPR	25	56	16	2	Y	2	Nitrophenol-4 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
12	93	T1H7P5 T1H7P5_RHOPR	25	56	16	2	Y	2	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
6	1	T1HMF3 T1HMF3_RHOPR	24	65	27	2	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
58	27	R4G8S4 R4G8S4_RHOPR	24	50	21	2	Y	4	Putative chitinase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
16	34	T1HVE5 T1HVE5_RHOPR	24	61	24	5	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
38	19	T1BW5 T1BW5_RHOPR	24	35	23	2	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
5	99	T1I9F9 T1I9F9_RHOPR	23	23	24	2	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
18	59	T1HZ52 T1HZ52_RHOPR	23	48	20	1	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
37	38	R4FCG8 R4FCG8_RHOPR	23	28	18	1	Y	7	Putative hsp70 protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
33	41	T1HFV3 T1HFV3_RHOPR	23	35	25	1	Y	5	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
40	40	R4G483 R4G483_RHOPR	23	36	32	3	Y	6	Putative radixin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
36	30	T1I111 T1I111_RHOPR	22	33	23	2	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
8	63	Q94731 Q94731_RHOPR	22	66	19	1	Y	1	Salivary platelet aggregation inhibitor 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
8	64	R4FPG4 R4FPG4_RHOPR	22	66	19	1	Y	1	Putative salivary platelet aggregation inhibitor 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
67	36	T1HS98 T1HS98_RHOPR	22	29	20	2	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
50	55	T1I0J6 T1I0J6_RHOPR	22	48	18	1	Y	3	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
113	1	R4G3N4 R4G3N4_RHOPR	22	29	10	1	Y	3	Putative porphobilinogen synthase pbgs OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
19	1	Q94733 NP3_RHOPR	22	55	14	1	Y	2	Nitrophenol-3 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
51	33	R4FNJ0 R4FNJ0_RHOPR	22	32	21	2	Y	6	Putative xaa-pro aminopeptidase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
105	1	R4FJV0 R4FJV0_RHOPR	22	27	12	1	Y	3	Putative phosphatidylinositol transfer protein sec14 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
54	39	T1HV8 T1HV8_RHOPR	21	30	17	1	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
145	1	R4G4R4 R4G4R4_RHOPR	21	24	8	8	N	3	Putative aldo-keto reductase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
32	1	Q7Y115 Q7Y115_RHOPR	21	49	14	5	Y	2	Nitrophenol 4A OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
23	29	R4G588 R4G588_RHOPR	21	48	18	1	Y	4	Tubulin beta chain (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
24	26	R4G4U5 R4G4U5_RHOPR	21	48	18	1	Y	5	Tubulin beta chain OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
75	43	T1HX75 T1HX75_RHOPR	21	27	21	2	Y	9	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
42	52	T1HFS7 T1HFS7_RHOPR	21	28	17	6	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
25	1	Q9TY55 Q9TY55_RHOPR	21	55	14	1	Y	2	Nitrophenol-3 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
84	46	R4FQCO R4FQCO_RHOPR	21	35	17	1	Y	4	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
43	1	Q7YT11 Q7YT11_RHOPR	21	40	12	9	Y	2	Nitrophenol 1A OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
43	1	R4FPW7 R4FPW7_RHOPR	21	40	12	9	Y	2	Putative nitrophenol 1a OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
76	50	R4G5K7 R4G5K7_RHOPR	20	32	18	1	Y	5	Citrate synthase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
29	97	T1H8D6 T1H8D6_RHOPR	20	39	21	1	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
28	89	T1HW12 T1HW12_RHOPR	20	48	19	1	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
82	53	T1HFJ2 T1HFJ2_RHOPR	20	16	1	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1	
114	74	T1I4E2 T1I4E2_RHOPR	20	30	14	1	Y	4	Phosphoglycerate kinase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
47	1	R4FJ72 R4FJ72_RHOPR	20	49	14	3	Y	1	Putative triabin-like lipocalin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
118	49	T1HV64 T1HV64_RHOPR	20	22	12	1	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
119	1	R4FNRS R4FNRS_RHOPR	20	32	14	1	Y	4	Putative elongation factor 1-gamma OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
69	44	R4G4X2 R4G4X2_RHOPR	20	30	16	1	Y	6	Putative acar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
115	47	R4FP78 R4FP78_RHOPR	20	35	14	1	Y	5	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
79	92	R4G8M9 R4G8M9_RHOPR	20	53	10	5	Y	2	Putative nitrophenol 1-like OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
64	51	T1HB40 T1HB40_RHOPR	20	20	20	1	Y	9	Aconitate hydratase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
46	48	T1HSA9 T1HSA9_RHOPR	20	24	15	1	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
85	37	T1H816 T1H816_RHOPR	20	33	16	1	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
34	91	R4FP55 R4FP55_RHOPR	19	37	11	9	Y	2	Putative antigen-5-like protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
97	45	T1I044 T1I044_RHOPR	19	22	15	1	Y	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
60	58	T1HFP9 T1HFP9_RHOPR	19	25	22	2	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
65	79	T1HM48 T1HM48_RHOPR	19	33	11	1	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
81	57	T1HB91 T1HB91_RHOPR	19	26	15	1	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
56	1	Q26241 NP2_RHOPR	19	42	9	6	Y	2	Nitrophenol 2 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1

63	1	T1HFV2 T1HFV2_RHOPR	19	37	12	4	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
45	54	T1HC49 T1HC49_RHOPR	19	42	19	1	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
77	67	T1IBT2 T1IBT2_RHOPR	18	27	16	1	Y	7	Glycogen [starch] synthase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
62	1	Q86P9 Q86P9_RHOPR	18	38	10	6	Y	2	Biogenic amine-binding protein OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
62	1	R4FLH5 R4FLH5_RHOPR	18	38	10	6	Y	2	Putative biogenic amine-binding protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
112	61	T1HKY3 T1HKY3_RHOPR	18	16	13	1	Y	10	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
35	1	QY7T04 QY7T04_RHOPR	18	44	15	5	Y	1	Triabin-like lipocalin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
39	1	R4FPQ1 R4FPQ1_RHOPR	18	39	13	8	Y	2	Putative triabin-like lipocalin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
55	82	R4FNL0 R4FNL0_RHOPR	18	32	13	4	Y	4	Tubulin alpha chain OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
55	81	T1HHZ9 T1HHZ9_RHOPR	18	32	13	4	Y	4	Tubulin alpha chain (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
98	76	R4GSK4 R4GSK4_RHOPR	18	25	12	1	Y	4	Adenosylhomocysteinase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
86	56	T18C2 T18C2_RHOPR	18	24	13	1	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
93	60	R4G5V5 R4G5V5_RHOPR	18	26	13	1	Y	6	Putative phosphoenolpyruvate carboxykinase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
90	1	T1HA76 T1HA76_RHOPR	18	14	10	1	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
121	1	R4G8F0 R4G8F0_RHOPR	18	32	11	1	Y	3	Putative adenosine kinase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
161	85	R4G5K6 R4G5K6_RHOPR	18	28	10	1	Y	4	Rab GDP dissociation inhibitor OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
143	1	T1HB69 T1HB69_RHOPR	17	24	7	7	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
59	1	Q7YT08 Q7YT08_RHOPR	17	43	8	1	Y	2	Lipocalin Al-5 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
102	1	T1HM42 T1HM42_RHOPR	17	46	10	8	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
41	1	T1I4U6 T1I4U6_RHOPR	17	61	13	1	Y	1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
101	95	R4FJD2 R4FJD2_RHOPR	17	28	12	1	N	4	Putative serpin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
101	96	T1IF83 T1IF83_RHOPR	17	26	12	1	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
191	1	R4G866 R4G866_RHOPR	17	24	7	7	Y	3	Malate dehydrogenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
179	1	ADA1B2G378 ADA1B2G378_RHOP	17	22	7	7	Y	4	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
136	70	T1HZU5 T1HZU5_RHOPR	17	10	11	1	Y	13	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
142	1	T1I6S8 T1I6S8_RHOPR	17	29	10	9	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
71	1	R4G4U6 R4G4U6_RHOPR	17	27	10	1	Y	5	Tubulin alpha chain OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
71	1	T1I1W3 T1I1W3_RHOPR	17	27	10	1	Y	4	Tubulin alpha chain (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
88	62	T1HSH7 T1HSH7_RHOPR	17	20	13	1	Y	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
87	68	T1I107 T1I107_RHOPR	17	23	13	1	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
117	1	T1I897 T1I897_RHOPR	17	47	8	1	Y	1	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
57	3	Q7YSZ0 Q7YSZ0_RHOPR	17	39	6	6	Y	1	GE-rich protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
70	72	T1E11 T1E11_RHOPR	17	14	14	1	N	11	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
73	1	T1HU07 T1HU07_RHOPR	17	44	9	8	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
44	87	R4G8S8 R4G8S8_RHOPR	17	29	13	1	Y	5	Elongation factor 1-alpha OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
172	1	R4FNK5 R4FNK5_RHOPR	17	25	9	8	Y	3	Transaldolase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
132	75	T1HMW9 T1HMW9_RHOPR	17	33	11	1	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
104	73	T1HKP0 T1HKP0_RHOPR	16	18	12	1	Y	7	Trehalase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
155	1	T1HW55 T1HW55_RHOPR	16	23	9	8	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
92	1	R4G339 R4G339_RHOPR	16	49	8	6	Y	1	Putative triabin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
107	77	T1I860 T1I860_RHOPR	16	33	11	1	Y	4	Flavin-containing monooxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
129	88	T1HOA1 T1HOA1_RHOPR	16	12	9	6	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
146	78	AOA0D4WUY9 AOA0D4WUY9_RH	16	15	11	1	Y	8	Relish OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
89	1	R4G3G0 R4G3G0_RHOPR	16	34	8	7	Y	2	Putative triabin-like protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
158	1	R4FNG8 R4FNG8_RHOPR	16	22	9	8	Y	4	Putative phosphoribosylaminoimidazole carboxylase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
96	86	T1HEI4 T1HEI4_RHOPR	16	19	13	1	Y	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
72	1	R4FN02 R4FN02_RHOPR	16	42	7	1	Y	2	Putative triabin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
109	1	R4G8A7 R4G8A7_RHOPR	16	24	10	1	Y	4	Putative fumarylacetoacetate hydrolase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
131	1	T1HAD6 T1HAD6_RHOPR	16	32	9	9	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
139	1	T1IAR5 T1IAR5_RHOPR	16	16	8	7	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
163	1	T1HHM4 T1HHM4_RHOPR	16	22	9	8	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
52	2	T1HZP0 T1HZP0_RHOPR	16	21	15	6	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
52	2	R4FNJ8 R4FNJ8_RHOPR	16	21	15	6	Y	3	Putative salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
66	1	T1I836 T1I836_RHOPR	16	34	7	7	Y	2	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
91	1	R4G8R0 R4G8R0_RHOPR	16	28	9	9	Y	3	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
144	1	T1I895 T1I895_RHOPR	16	29	5	5	Y	2	Flavin-containing monooxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
68	90	T1IFN4 T1IFN4_RHOPR	16	19	12	9	N	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
176	1	T1I625 T1I625_RHOPR	15	10	7	7	Y	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
175	1	T1HMK7 T1HMK7_RHOPR	15	28	8	8	Y	3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
128	83	T1I8U1 T1I8U1_RHOPR	15	22	11	1	Y	6	Serine/threonine-protein phosphatase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
125	1	R4G4B4 R4G4B4_RHOPR	15	22	8	5	Y	3	Putative sulfotransferase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
48	1	T1I1C5 T1I1C5_RHOPR	15	32	9	9	Y	2	Metalloendopeptidase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
186	1	T1HR77 T1HR77_RHOPR	15	19	6	6	N	3	Phosphoserine aminotransferase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
186	1	R4G458 R4G458_RHOPR	15	18	6	6	N	3	Phosphoserine aminotransferase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
164	1	T1HFH9 T1HFH9_RHOPR	15	26	7	7	Y	3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
99	80	T1HRS2 T1HRS2_RHOPR	15	17	14	1	Y	2	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
116	1	T1HEA8 T1HEA8_RHOPR	15	23	10	1	Y	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
83	1	T1H852 T1H852_RHOPR	15	16	10	3	Y	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
94	2	R7WR04 R7WR04_9NOCA	15	12	6	6	Y	5	Dehydrogenase OS=Rhodococcus rhodnii LMG 5362 GN=Rhod_0877 PE=3 SV=1
53	2	R4G4E6 R4G4E6_RHOPR	14	34	7	2	Y	1	Putative lipocalin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
224	1	R4G7U4 R4G7U4_RHOPR	14	16	6	6	Y	4	Thymidine phosphorylase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
157	1	T1HI54 T1HI54_RHOPR	14	13	8	8	Y	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
61	1	R4FNS7 R4FNS7_RHOPR	14	22	9	2	Y	4	Tubulin beta chain OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
134	1	T1H4S9 T1H4S9_RHOPR	14	35	7	7	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
137	2	R4FGQ1 R4FGQ1_RHOPR	14	8	5	4	Y	5	ATP synthase subunit alpha OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
197	1	T1HB68 T1HB68_RHOPR	14	10	6	6	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
209	1	T1HBM4 T1HBM4_RHOPR	14	14	6	5	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
149	1	R4FKF9 R4FKF9_RHOPR	14	12	5	5	Y	5	Putative aminopeptidase of the m17 family OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
149	1	T1HYN4 T1HYN4_RHOPR	14	12	5	5	Y	5	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
183	2	T1HFH5 T1HFH5_RHOPR	14	34	5	5	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1

156	1	R4G4C9 R4G4C9_RHOPR	14	16	6	6	Y	5	Homogentisate 1,2-dioxygenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
100	1	T1DK1 T1DK1_RHOPR	14	17	7	7	Y	3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
100	1	R4G5W1 R4G5W1_RHOPR	13	18	7	7	Y	3	Putative differentiation-related protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
110	2	R4FPS6 R4FPS6_RHOPR	14	49	6	6	Y	1	Putative lipocalin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
148	1	R4FND1 R4FND1_RHOPR	13	25	8	8	N	3	Ribokinase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
159	1	T1HY79 T1HY79_RHOPR	13	13	9	9	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
173	3	T1H876 T1H876_RHOPR	13	30	2	1	N	1	Histone H2A (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
173	3	R4FMP4 R4FMP4_RHOPR	13	30	2	1	N	1	Histone H2A OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
171	1	T1HX8J T1HX8C_RHOPR	13	18	8	6	Y	6	Malic enzyme (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
74	2	R4FN70 R4FN70_RHOPR	13	37	10	4	Y	1	Putative lipocalin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
103	1	R4G393 R4G393_RHOPR	13	12	5	5	Y	5	Carboxylic ester hydrolase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
103	1	T1H8Y3 T1H8Y3_RHOPR	13	9	5	5	Y	6	Carboxylic ester hydrolase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
152	1	T1DX3 T1DX3_RHOPR	13	14	5	5	Y	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
246	2	T1HAC7 T1HAC7_RHOPR	13	9	5	5	Y	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
150	1	T1HL3 T1HL3_RHOPR	13	7	6	6	Y	11	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
150	1	Q26240 INOS_RHOPR	13	6	6	6	Y	13	Nitric oxide synthase, salivary gland OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
80	2	Q7YT10 Q7YT10_RHOPR	13	36	6	4	Y	1	Lipocalin Al-3 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
174	1	R4G4D6 R4G4D5_RHOPR	13	13	7	7	Y	6	Putative thioredoxin reductase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
237	2	T1I7R1 T1I7R1_RHOPR	13	11	5	5	N	5	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
140	2	R4G5G1 R4G5G1_RHOPR	13	7	5	2	Y	9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
185	1	R4G4U8 R4G4U8_RHOPR	13	16	6	6	Y	4	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
169	1	T1H983 T1H983_RHOPR	13	11	6	5	N	6	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=2
120	2	Q6PK2N P7_RHOPR	13	27	6	6	Y	2	Nitrophenol-7 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
182	1	R4G4U2 R4G4U2_RHOPR	13	14	6	6	Y	4	Putative enolase length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
123	2	R4G499 R4G499_RHOPR	12	51	4	1	Y	1	Putative procalin-like lipocalin 1 (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
193	1	T1HS20 T1HS20_RHOPR	12	14	6	6	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
247	2	T1HQ16 T1HQ16_RHOPR	12	61	4	1	N	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
166	1	T1HAU5 T1HAU5_RHOPR	12	18	8	8	Y	4	V-type proton ATPase subunit C OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
95	1	R4FLF8 R4FLF8_RHOPR	12	41	7	4	Y	1	Putative lipocalin al-7 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
160	2	T1I875 T1I875_RHOPR	12	32	4	4	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
225	2	T1HS55 T1HS55_RHOPR	12	25	5	5	N	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
265	2	R4FM92 R4FM92_RHOPR	12	11	4	4	N	5	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
244	2	T1I7Y8 T1I7Y8_RHOPR	12	19	4	4	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
167	2	R4G5C2 R4G5C2_RHOPR	12	40	6	2	Y	1	Putative lipocalin al-5 (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
124	2	Q7YS22 Q7YS22_RHOPR	12	45	5	5	Y	1	Putative salivary protein mys1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
180	1	T1I3Q3 T1I3Q3_RHOPR	11	12	7	7	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
181	2	R4G3Z5 R4G3Z5_RHOPR	11	11	5	5	Y	3	Putative sulfotransferase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
170	1	T1HR80 T1HR80_RHOPR	11	14	6	6	Y	5	Pyruvate kinase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
203	1	T1H972 T1H972_RHOPR	11	10	6	6	Y	7	Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
130	1	T1I3X8 T1I3X8_RHOPR	11	9	7	7	Y	11	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
262	2	R4G840 R4G840_RHOPR	11	11	4	4	N	4	Protein disulfide isomerase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
243	2	T1I7C6 T1I7C6_RHOPR	11	12	5	5	N	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
216	1	T1HT15 T1HT15_RHOPR	11	14	6	5	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
216	2	R4G4S9 R4G4S9_RHOPR	11	14	6	5	Y	4	Putative 26s proteasome non-atpase regulatory subunit OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
153	2	R4G5Z8 R4G5Z8_RHOPR	11	21	4	4	N	1	Putative biogenic amine-binding protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
153	2	T1HTC8 T1HTC8_RHOPR	11	18	4	4	N	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
270	2	R4G3E0 R4G3E0_RHOPR	11	11	4	4	Y	3	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
360	3	R4G4B0 R4G4B0_RHOPR	11	9	2	2	Y	3	Putative thymidylate synthase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
360	3	T1HS01 T1HS01_RHOPR	9	24	2	2	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
177	2	T1HR11 T1HR11_RHOPR	11	4	5	4	N	12	ATP-citrate synthase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
141	2	R4G4H9 R4G4H9_RHOPR	11	28	5	5	Y	2	Putative triabin length OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
302	2	T1IE29 T1IE29_RHOPR	11	14	3	3	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
302	2	R4G8D5 R4G8D5_RHOPR	10	14	3	3	Y	2	Putative dehydrogenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
194	2	T1HJA6 T1HJA6_RHOPR	11	17	6	6	Y	3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
252	2	R4G8E6 R4G8E6_RHOPR	11	14	4	4	Y	3	Putative thioredoxin-like 2 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
108	5	T1H134 T1H134_RHOPR	11	11	8	4	N	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
212	2	R4G7Q1 R4G7Q1_RHOPR	11	16	5	5	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
165	2	T1I366 T1I366_RHOPR	11	14	5	5	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
260	2	R4G4U0 R4G4U0_RHOPR	11	11	4	4	N	4	Aspartate aminotransferase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
138	2	T1HAR7 T1HAR7_RHOPR	11	15	4	2	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
214	3	R4FM54 R4FM54_RHOPR	10	30	2	1	Y	1	Histone H3 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
133	2	G1K0S0 G1K0S0_RHOPR	10	65	5	5	N	9	Ubiquitin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
133	2	R4G4B9 R4G4B9_RHOPR	10	41	5	5	N	1	Putative ribosomal protein l40 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
133	2	T1I7H5 T1I7H5_RHOPR	10	18	5	5	N	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
133	2	R4G516 R4G516_RHOPR	10	9	5	5	N	6	Putative polyubiquitin (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
236	2	T1HQV9 T1HQV9_RHOPR	10	9	5	5	Y	7	Protein-serine/threonine kinase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
189	1	R4G5A5 R4G5A5_RHOPR	10	21	7	7	Y	4	Glutamine synthetase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
151	1	T1HUM9 T1HUM9_RHOPR	10	47	6	6	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
211	2	T1HG38 T1HG38_RHOPR	10	7	6	6	N	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
239	2	R4G4V6 R4G4V6_RHOPR	10	11	5	3	N	4	Putative 26s protease regulatory subunit 8 isoform 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
122	2	Q7YT09 Q7YT09_RHOPR	10	36	5	5	Y	1	Lipocalin Al-4 OS=Rhodnius prolixus PE=1 SV=1
306	3	R4G4V2 R4G4V2_RHOPR	10	7	3	2	N	4	Putative aspartyl protease OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
187	2	R4G821 R4G821_RHOPR	10	24	4	2	Y	1	Putative lipocalin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
195	2	T1HKR8 T1HKR8_RHOPR	10	18	5	5	N	2	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
317	3	T1IA19 T1IA19_RHOPR	9	9	2	2	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
126	3	T1HGK7 T1HGK7_RHOPR	9	38	3	3	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
206	3	R4G4L0 R4G4L0_RHOPR	9	11	2	2	N	2	Putative nitrophenol 4b OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
206	3	Q7YT12 Q7YT12_RHOPR	9	11	2	2	N	2	Nitrophenol 4b OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
162	2	T1HBF0 T1HBF0_RHOPR	9	41	4	4	Y	1	Histone H4 OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
162	2	R4G555 R4G555_RHOPR	9	40	4	4	Y	1	Histone H4 (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1

248	2	R4G4T2 R4G4T2_RHOPR	9	8	4	4	Y	4	Mannose-6-phosphate isomerase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
259	2	T1IEG7 T1IEG7_RHOPR	9	4	3	3	Y	9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
232	2	T1HH29 T1HH29_RHOPR	9	14	5	5	Y	4	Peptidylprolyl isomerase OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
238	2	R4G561 R4G561_RHOPR	9	7	5	5	N	7	Beta-galactosidase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
213	2	T1I358 T1I358_RHOPR	9	12	3	3	Y	3	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
241	3	R4G417 R4G417_RHOPR	9	13	2	2	N	2	Putative glutathione S-transferase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
304	2	T1HN35 T1HN35_RHOPR	9	21	3	3	N	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
261	2	T1HWY2 T1HWY2_RHOPR	9	7	4	4	Y	7	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
249	2	R4G8N0 R4G8N0_RHOPR	9	17	3	1	N	2	Putative nitrophorin OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
303	2	R4G4V3 R4G4V3_RHOPR	9	8	3	3	Y	5	Dihydropyridyl dehydrogenase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
316	2	T1HVH9 T1HVH9_RHOPR	8	6	3	3	N	5	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
301	3	T1I0W4 T1I0W4_RHOPR	8	6	2	2	N	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
220	4	T1H8N3 T1H8N3_RHOPR	8	13	3	3	Y	2	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
363	3	T1I1X9 T1I1X9_RHOPR	8	3	2	2	Y	7	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
233	3	T1I4G6 T1I4G6_RHOPR	8	3	2	2	N	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
319	3	R4G7S8 R4G7S8_RHOPR	8	5	2	2	N	3	Putative cytochrome p450 family member OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
266	2	T1HGQ7 T1HGQ7_RHOPR	8	5	4	4	N	9	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
437	3	T1H8F8 T1H8F8_RHOPR	8	12	2	2	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
297	2	T1I721 T1I721_RHOPR	8	8	3	3	Y	4	Diphosphomevalonate decarboxylase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
267	3	T1I8U8 T1I8U8_RHOPR	8	6	3	3	Y	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
219	2	T1I8D5 T1I8D5_RHOPR	8	12	3	3	Y	3	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
382	3	R4G614 R4G614_RHOPR	8	6	2	2	N	6	Putative asparaginyl-tRNA synthetase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
383	3	T1HYM4 T1HYM4_RHOPR	8	13	2	2	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
240	3	R4G8B3 R4G8B3_RHOPR	8	5	3	2	N	6	Lysine-tRNA ligase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
240	3	T1ICE5 T1ICE5_RHOPR	8	5	3	2	N	6	Lysine-tRNA ligase OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
362	3	T1HPM7 T1HPM7_RHOPR	8	3	2	2	N	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
217	3	Q8T5U0 Q8T5U0_RHOPR	8	18	2	2	Y	1	Heme-binding protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
217	3	R4FPG0 R4FPG0_RHOPR	8	18	2	2	Y	1	Putative heme-binding protein OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
440	3	T1I6S6 T1I6S6_RHOPR	8	9	2	2	N	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
307	3	T1HLU1 T1HLU1_RHOPR	7	6	3	2	N	4	Aspartate aminotransferase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
271	2	T1HS06 T1HS06_RHOPR	7	21	3	3	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
245	2	T1H9Q6 T1H9Q6_RHOPR	7	10	4	4	Y	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
308	3	T1HPW0 T1HPW0_RHOPR	7	4	2	2	N	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
379	3	T1HGP5 T1HGP5_RHOPR	7	9	2	2	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
328	3	T1HR95 T1HR95_RHOPR	7	8	3	3	N	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
188	3	R4G8G7 R4G8G7_RHOPR	7	6	3	2	N	6	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
233	3	T1HDI9 T1HDI9_RHOPR	7	1	3	1	N	20	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
276	2	T1IGL9 T1IGL9_RHOPR	7	3	3	2	N	8	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
305	3	T1I9R1 T1I9R1_RHOPR	7	14	3	3	Y	2	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
449	5	T1IDJ6 T1IDJ6_RHOPR	7	8	2	2	N	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
405	3	T1HYA1 T1HYA1_RHOPR	7	6	2	2	N	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
207	3	T1HYB6 T1HYB6_RHOPR	7	23	2	1	N	1	Histone H2A OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
207	3	R4G8I6 R4G8I6_RHOPR	7	23	2	1	N	1	Histone H2A OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
318	3	T1I7C5 T1I7C5_RHOPR	7	3	2	2	Y	7	Sulfhydryl oxidase (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
361	3	T1I357 T1I357_RHOPR	7	5	2	2	N	4	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
210	2	R4FNV6 R4FNV6_RHOPR	7	5	3	2	N	5	Putative aldehyde dehydrogenase 7 family OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
298	2	T1IDM0 T1IDM0_RHOPR	7	19	3	3	Y	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
438	3	R4G5K3 R4G5K3_RHOPR	6	5	2	1	N	4	Putative 26S protease regulatory subunit 6a OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
196	3	R7WUY6 R7WUY6_SNOCA	6	6	4	4	Y	5	60 kDa chaperonin OS=Rhodococcus rhodii LMG 5362 GN-agrol. PE=3 SV=1
227	3	Q7Y702 Q7Y702_RHOPR	6	10	2	1	N	2	Pallidipin-like lipocalin 1 OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
340	3	T1I6N7 T1I6N7_RHOPR	6	2	1	1	N	6	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
412	4	T1HX88 T1HX88_RHOPR	6	9	1	1	N	1	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
403	3	R4G8S3 R4G8S3_RHOPR	6	5	2	2	N	4	Putative mannose-1-phosphate guanylyltransferase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
409	3	R4FLC5 R4FLC5_RHOPR	6	2	1	1	N	5	Carboxypeptidase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
380	3	T1HML8 T1HML8_RHOPR	6	4	2	2	N	4	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
443	3	T1ICQ9 T1ICQ9_RHOPR	6	25	2	2	N	9	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=4 SV=1
292	2	R4FC79 R4FC79_RHOPR	6	10	3	3	Y	3	Putative nad dependent epimerase/dehydratase OS=Rhodnius prolixus PE=2 SV=1
439	3	R4G4S7 R4G4S7_RHOPR	6	5	2	2	N	4	Putative gdp-mannose pyrophosphorylase/mannose-1-phosphate guanylyltransferase OS=Rhodnius prolixus PE=2
364	3	T1HGL0 T1HGL0_RHOPR	6	3	2	2	N	8	Uncharacterized protein OS=Rhodnius prolixus PE=3 SV=1
300	3	T1HE43 T1HE43_RHOPR	6	2	3	1	N	9	Uncharacterized protein (Fragment)