

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS LABORATÓRIO DE INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

ANÁLISE PROTEÔMICA DA SALIVA DE Triatoma costalimai, UM VETOR POTENCIAL DO Trypanosoma cruzi NO CERRADO

Nathália Araujo Varela da Costa

Brasília – DF 2025

NATHÁLIA ARAUJO VARELA DA COSTA

Análise proteômica da saliva de *Triatoma costalimai,* um Vetor Potencial do *Trypanosoma cruzi* NO CERRADO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Carla Nunes de Araújo

Coorientadora: Dr^a. Paula Beatriz de Medeiros Santigo

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

Apoio financeiro:

FAP-DF 00193-00002600/2022-70

Curso de Mestrado realizado com bolsa da CAPES

"Se manter de pé Contra o que vier Vencer os medos Mostrar a que veio Ter o foco ali E sempre seguir Rumo a vitória!" - Rodrigo Lima

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria, ao meu irmão, Marcos, à minha irmã, Shellen, e à minha sobrinha, Nina.

AGRADECIMENTOS

A conclusão do Mestrado marca a realização de um sonho pessoal. Desde o início, o mestrado representou um desafio na minha vida acadêmica e profissional, uma jornada de autodescoberta e crescimento. Concluir esse projeto simboliza a conquista de um objetivo e o alcance de um marco importante na minha vida.

Agradeço a Deus por abençoar minha vida, a minha saúde e me dar forças diariamente para chegar até aqui. Agradeço a Ele por ter colocado pessoas tão maravilhosas no meu caminho.

À minha orientadora, professora Dra. **Carla Nunes de Araújo**, pela oportunidade, apoio, orientação e conselhos. Obrigada por ter sido amiga e compartilhar toda sua experiência comigo com muita paciência e sempre acreditar e confiar em mim.

À minha coorientadora, Dra. **Paula Beatriz Santiago**, por toda ajuda com as amostras e com as análises. Pelos conselhos e tempo disponibilizado para me ensinar, me corrigir e me motivar. Você foi essencial durante esse processo.

À professora Dra. **Izabela Bastos**, pelo acolhimento no LIPH, incentivo e conselhos valiosos sobre meu projeto e sobre meu crescimento. Aos professores **Dr. Jaime Santana**, **Dra. Flávia Nader**, Dr. **Sèbastien Charneau** pela disponibilidade e ensinamentos durante esse projeto.

Aos professores Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves, Dr. Marcos Obara e Dr. Vinícius Lima pela captura dos triatomíneos. O estabelecimento da colônia só foi possível devido ao esforço de vocês em capturar os barbeiros.

Ao **Dr. Lucas Oliveira**, do Laboratório de Química e Bioquímica de Proteínas da UnB. Obrigada por a sua ajuda na preparação das amostras e a parceria com as análises dos dados.

A pesquisadora Dra. Lyris Martins Franco de Godoy e a Fundação Oswaldo Cruz Paraná (FIOCRUZ-PR) pela colaboração na espectrometria de massas e análise proteômica das amostras.

Ao **Jheimes Kevin** e a **Juliana Dourado** pela manutenção das colônias dos barbeiros. Obrigada pelo cuidado, tempo disponibilizado e dedicação com a colônia.

Ao amigo e colega de profissão **Pedro Paulo de Queiroz de Souza**, pelo trabalho com as fotos dos barbeiros, por ter se disponibilizado e ter feito um trabalho incrível.

À minha família, minha base e minha força. À minha mãe, **Maria**, obrigada por todo cuidado. Obrigada pelo colo, compreensão e pelo amor e carinho. À minha irmã, **Shellen**, e minha sobrinha **Nina**. Obrigada por todo o incentivo, ajuda, cuidado e os momentos de risada. Amo vocês.

Ao meu irmão, **Marcos Vinicius**. Obrigada por me motivar diariamente e acreditar em mim. Obrigada pelos conselhos, e pelas conversas. Você é meu melhor amigo e a minha inspiração. Eu te amo!

Ao meu querido gato, **Vlad**, que tem sido meu companheiro fiel e meu porto seguro. Nos momentos mais ansiosa, foi você quem trouxe conforto e alegria à minha vida. Sua presença alegra meus momentos de estudo, e me lembra da importância de cuidar e ser cuidada.

Aos meus demais familiares, os momentos de alegria compartilhado com vocês foram fundamentais para meu equilíbrio durante essa jornada. Ao meu pai, **Marcos**. Obrigada pelos conselhos e palavras.

À Dra. **Yanna Reis**, minha amiga, conselheira, terapeuta e minha inspiração. Obrigada pela parceria e tempo disponibilizado, pela ajuda com as planilhas, pelas dicas e o suporte. Aprendi muito com você durante esses anos. Admiro você, sou feliz por ter sido "sua cria" e ter você como amiga! Você é fundamental nessa trajetória, vou te levar para a vida. Te amo!

Ao **Kaio Bentes**, meu amigo, companheiro de bancada e de experimento. Obrigada pelos ensinamentos, explicações, experiência, dedicação e tempo. Obrigada por me ouvir e ser um ombro amigo quando as coisas estavam difíceis. Obrigada pela paciência nos momentos de desespero. Te amo amigo.

Aos meus amigos do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, Alexandra Carvalho, Gilberto Morais e Daniela Franco Rosa, meu muito *obrigueida.* Vocês são incríveis, obrigada pelos conselhos e amizade. Amo vocês.

Aos meus demais amigos do LIPH, **Renan Pereira**, **Juliana Marques**, **Andrey Boava**, **Júlia Lisboa**, **Verônica Lucas**, **Maurício Aoyama**, **Felipe Mendonça**, **Gabriel Silva**, **Karen Mangabeira**, **Amanda Coutinho**, **Guilherme Crispim**, **Beatriz Argôlo**, **Gabriela Dantas**, **Lara Santos** e **Laura Lopes**, obrigada por serem colegas de trabalhos e amigos tão especiais, por cada risada e brincadeiras no corredor, pelos lanches na copa, festinhas e rolês por Brasília. O mestrado foi significativo para mim por ter conhecido vocês, vocês tornaram esse processo mais leve.

À minha querida amiga Jana Carneiro. Obrigada pela amizade e pela companhia principalmente nessa reta final do mestrado. À minha querida amiga Mariza, obrigada por todo incentivo, conselhos, paciência. As minhas amigas de infância sempre presentes, Stephanie Moura e Priscilla Pereira. À Giovanna Vilasboa, você é incrível, obrigada pela amizade. Amo vocês meninas!

Aos meus demais amigos que a vida me trouxe, Tiago Paiva, Fellipe Eduardo, George Emanuel, Victor Lucas pela companhia nos momentos de distração e muitas risadas.

Ao Igor Biagioni por todo apoio, cuidado e carinho comigo nessa reta final, amo você.

Aos meus **barbeiros**, meus bichos! A todas as horas no biotério para sucesso do trabalho. A experiência de estabelecer uma colônia foi única. Sou feliz por ter tido essa oportunidade e por ter mostrado o tanto que o estudo de insetos vetores é importante.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPDF pelo investimento na pesquisa e concessão da bolsa.

A todos que me acompanharam, me ajudaram e fizeram parte desse processo, muito obrigada! Vocês fazem parte da conquista desse título!

RESUMO

Triatomíneos são insetos hematófagos que transmitem o protozoário Trypanosoma cruzi, causador da doença de Chagas. Para se alimentar, eles produzem uma saliva rica em moléculas que inibem a coagulação, a resposta imune e a inflamação do hospedeiro. A análise proteômica é uma ferramenta essencial para estudar a composição salivar desses insetos. Entre as espécies, Triatoma costalimai é um vetor negligenciado, capaz de transmitir T. cruzi em ambientes domésticos e peridomésticos, mas pouco estudado. Este trabalho investigou a expressão proteica nas glândulas salivares de T. costalimai, partindo de indivíduos silvestres mantidos em colônia. O extrato salivar foi obtido por dissecação das glândulas e analisado por espectrometria de massas, com processamento de dados no software PEAKS. Foram identificadas 841 proteínas, das quais 475 foram detectadas em múltiplas réplicas biológicas. Dentre elas, 25,2% foram classificadas como secretadas e 74,8% como constitutivas. A categoria de proteínas secretadas foi subdividida por função e incluiu calicinas (a superfamília mais abundante), proteases (do tipo serina e metaloproteases), inositol fosfato fosfatases e apirases salivares. Outras enzimas secretadas foram carboxilesterases, nucleases, ferritina e transferrina. Identificamos várias proteínas de interesse, incluindo inibidores de protease (Kazal, serpina, pacifistina e uma provável Kunitz), além de proteínas como trialisina, MYS/hemolisina, peptídeos antimicrobianos, antígeno-5, proteínas de ligação ao odorante e outras proteínas secretadas, como vitelogenina/apolipoforina, proteína de choque térmico e calreticulina. Este é o primeiro estudo do proteoma das glândulas salivares de T. costalimai, oferecendo uma base para compreender a biologia desse vetor. Esse conhecimento pode ser aplicado no desenvolvimento de estratégias de controle vetorial e na prevenção da doença de Chagas, demonstrando o potencial biotecnológico desses compostos salivares.

Palavras-chave: *Triatoma costalimai*. Cerrado.Saliva. Hematofagia. Proteoma. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Triatomines are hematophagous insects that transmit the protozoan *Trypanosoma cruzi,* the causative agent of Chagas disease. To feed, they produce saliva rich in molecules that inhibit coagulation, the immune response, and inflammation in the host. Proteomic analysis is an essential tool for studying the salivary composition of these insects. Among the species, Triatoma costalimai is a neglected vector capable of transmitting T. cruzi in domestic and peridomestic environments, yet it is poorly studied. This study investigated protein expression in the salivary glands of *T. costalimai*, using wild-caught individuals maintained in a colony. The salivary extract was obtained by dissection of the glands and analyzed by mass spectrometry, with data processing performed using PEAKS software. A total of 841 proteins were identified, of which 475 were detected in multiple biological replicates. Of these, 25.2% were classified as secreted, and 74.8% as constitutive. The secreted protein category was further subdivided by function and included calicins (the most abundant superfamily), proteases (serine and metalloproteases), inositol phosphate phosphatases, and salivary apyrases. Other secreted enzymes included carboxylesterases, nucleases, ferritin, and transferrin. Several proteins of interest were identified, including protease inhibitors (Kazal, serpins, pacifistins, and a probable Kunitz), as well as proteins such as trialisin, MYS/hemolysin, antimicrobial peptides, and antigen-5, odorant-binding proteins, other secreted proteins like vitellogenin/apolipophorin, heat shock proteins, and calreticulin. This is the first study of the *T. costalimai* salivary gland proteome, providing a foundation for understanding the biology of this vector. This knowledge can be applied to the development of vector control strategies and the prevention of Chagas disease, demonstrating the biotechnological potential of these salivary compounds.

Keywords: *Triatoma costalimai.* Cerrado triatomine fauna. Saliva. Hematophagy. Proteome. Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global da doença de Chagas. As áreas em laranja escuro representam regiões endêmicas, onde a transmissão vetorial é ativa e a doença é comum. As áreas em laranja claro indicam regiões não endêmicas, mas onde casos de Chagas foram registrados. Imagem adaptada de DNDi (2020). ("Symptoms, transmission, and current treatments for Figura 2 - Ciclo intracelular do Trypanosoma cruzi. Tripomastigotas metacíclicos, liberados nas fezes dos triatomíneos durante a refeição sanguínea, entram no hospedeiro através de feridas na pele ou mucosas, invadindo células próximas. Após a invasão, os parasitas transformam-se em amastigotas e se multiplicam no citosol. Após a multiplicação, os amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas, que, após a lise celular, são liberados para infectar outras células, migrar para diferentes tecidos ou serem ingeridos por Figura 3 – Distribuição de pacientes ativos no sistema eletrônico do SUS para notificação de doença de Chagas crônica por município, entre janeiro de 2023 e janeiro de 2024. Fonte: Figura 4 - Exemplo de distribuição geográfica de espécies de triatomíneos de maior relevância epidemiológica na América, dividido em biorregiões. ChAn= Chaco-Andino; CCPa= Caatinga-Cerrado-Pampa; AmAn= Amazônico-Andino; Pa= Panamenho; Ca= Caribe; CeMe= México Central; NoM-EUA= Norte do México-Estados Unidos da América. Fonte: (GOMEZ et al., Figura 5 – Ciclo de vida de Triatoma costalimai. As etapas de desenvolvimento incluem: (1) ovo, (2) ninfa de 1º estágio, (3) ninfa de 2º estágio, (4) ninfa de 3º estágio, (5) ninfa de 4º estágio, (6) ninfa de 5º estágio, (7) adulto fêmea, e (8) adulto macho. Fonte: Acervo pessoal. Figura 6 - Adultos de Triatoma costalimai evidenciando a visão externa da genitália. Fonte: Figura 7 - Fêmea de T. costalimai. Na foto é possível observar indivíduo de coloração marrom escura, com marcas laranja-avermelhadas ao longo do conexivo e na região posterior do Figura 8 - Vista lateral de ninfa de 4º estágio, evidenciando a probóscida reta com três Figura 9 - Modelo de coagulação compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação. Fator tecidual (FT), ativado (a). Adaptado de Ferreira, C.N., 2010, O novo modelo

Figura 10 - Resumo esquemático da metodologia para análise proteômica da saliva de T. costalimai......44 Figura 12 – Workflow OmicsBox. Etapas empregadas no módulo "Análise Funcional". Adaptado de (OMICSBOX, 2019)51 Figura 13 – Perfil eletroforético unidimensional das proteínas do extrato salivar do Triatoma costalimai demonstra que as amostras apresentavam padrões consistentes entre as réplicas biológicas, SDS-PAGE 12%. 10µg de proteínas foram aplicados por poço. Ptn ladder: marcador de peso molecular Bench Mark Pre-Stained Protein Ladder. R1, R2, R3 e R4: Figura 14 - Progresso da análise das sequências submetidas ao OmicBox, com as Figura 15 - Distribuição do Comprimento das Sequências. Gráfico de área mostrando o número de sequências para cada comprimento (em aminoácidos). Comprimento médio (Avg). Figura 16 - Representação da distribuição do proteoma do extrato salivar de Triatoma costalimai após análise no programa Outcyte. Transmembrana: proteínas transmembranares; UPS: secreção não convencional; Intracelular: proteínas preditas intracelulares. Os números

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tribos e gêneros dos triatomíneos	.23
Tabela 2 - Softwares utilizados para a análise de bioinformática	.52
Tabela 3 - Total de identificações de proteínas na saliva de Triatoma costalimai	.55
Tabela 4 - Quantidade de proteínas identificadas, exclusivas em apenas uma	das
réplicas biológicas e categorização dessas últimas em secretadas ou constitutivas	60
Tabela 5 - Famílias de proteínas salivares de Triatoma costalimai identificadas	no
sialoproteoma	.61

SUMÁRIO

1.	INTE	RODUÇÃO	16
1	I.1.	Doenças Transmitidas por Vetores	16
-	1.2.	Aspectos gerais da doença de Chagas	17
-	1.3.	Formas de transmissão	19
-	1.4.	Triatomíneos	22
1	l.5.	Gêneros de triatomíneos com importância epidemiológica	27
	1.6.	Triatoma costalimai	29
1	١.7.	Repasto sanguíneo	31
1	l.8.	Saliva	33
	1.9.	Hemostasia	34
	I.10.	Proteoma: visão geral	37
	I.11.	Proteomas salivares de triatomíneos	40
2.	JUS	TIFICATIVA	42
3.	OBJ	ETIVO GERAL	43
4.	MET	ODOLOGIA	44
2	4.1.	Desenho experimental	44
2	4.2.	Estabelecimento e manutenção da colônia de T. costalimai	44
2	4.3.	Extração das glândulas salivares e obtenção de saliva	45
2	1.4.	Preparação das amostras de saliva para análise proteômica	45
2	4.5.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	46
2	4.6.	Espectrometria de massas tipo LC-MS/MS	47
2	4.7.	Busca de proteínas	48
2	4.8.	Análises proteômica	48
2	4.9.	Análise Funcional	51
5.	RES	SULTADOS	54
5	5.1.	Perfil eletroforético das proteínas do extrato salivar de <i>Triatoma costalim</i> 54	ai
Ę	5.2.	Análise proteômica do extrato salivar de Triatoma costalimai	54
Ę	5.3.	Análises in silico das proteínas identificadas	55
	5.3.2	1. Predição de peptídeo sinal nas sequências identificadas	57
	5.3.2	2. Predição de secreção por via não clássica	57
	5.3.3	3. Predição de localização subcelular e sinais de classificação	58
	5.3.4	4. Predição de domínios transmembrânicos	59

5.	.4. Vis	ão geral do sialoproteoma de <i>Triatoma costalimai</i>	59
5.	.5. An	álise funcional das proteínas com' base no <i>Gene Ontology</i>	63
	5.5.1.	Caracterização proteínas secretadas	66
6.	DISCUS	SSÃO	69
6.	.1. Pro	oteínas secretadas	70
	6.1.1.	Lipocalinas	70
	6.1.2.	Enzimas	74
	6.1.2.1.	Proteases	74
	6.1.2.1.	1. Serino protease	75
	6.1.2.1.	2. Metaloproteases	78
	6.1.2.2.	Apirases	81
	6.1.2.3.	Inositol 5-fosfatase	83
	6.1.2.4.	Outras enzimas	84
	6.1.3.	Inibidores de proteases	87
	6.1.3.1.	Kazal	87
	6.1.3.2.	Serpina	89
	6.1.3.3.	Pacifistina	90
	6.1.3.4.	Kunitz	91
	6.1.4.	Hemolisina/MYS e Trialisina	92
	6.1.5.	Antígeno 5	93
	6.1.6.	Proteínas de Ligação a Odorantes (OBP)	95
	6.1.7.	Relacionado à imunidade	98
6.	.2. Ou	tras proteínas secretadas	101
	6.2.1.	Vitelogenina/Apolipoforina	101
	6.2.2.	Proteínas de choque térmico (Heat Shock protein)	102
	6.2.3.	Calreticulina	102
6.	.3. Pro	oteínas constitutivas	103
6.	4. Dis	stribuição das proteínas nas réplicas analisadas	104
7. CONCLUSÃO106			
8. PERSPECTIVAS			
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS,			
10. ANEXO 1133			
11.	ANE	XO 2	134

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Transmitidas por Vetores

As Doenças Transmitidas por Vetores (DTVs) são aquelas cujos agentes etiológicos são transmitidos de um hospedeiro para outro através de vetores, geralmente artrópodes (WHO, 2020). Esses vetores, que incluem muitos insetos hematófagos, são responsáveis pela veiculação biológica de patógenos infecciosos entre humanos ou de animais para humanos. Exemplos de artrópodes vetores incluem mosquitos, triatomíneos, moscas negras (Simuliidae), moscas tsé-tsé (Glossinidae), flebotomíneos e carrapatos (WILSON *et al.*, 2020). Durante uma refeição de sangue, esses artrópodes ingerem microrganismos causadores de doenças de um hospedeiro infectado e, após a replicação do patógeno, podem transmiti-lo a um novo hospedeiro. Uma vez que um vetor se torna infeccioso, ele pode continuar a transmitir o patógeno a cada nova refeição de sangue. Essas doenças podem ser causadas por parasitas, vírus ou bactérias (ROCKLÖV; DUBROW, 2020).

Doenças transmitidas por vetores são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em regiões tropicais e subtropicais (SEGOVIA *et al.*, 2023). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 17% de todas as doenças infecciosas são transmitidas por vetores, resultando em 700.000 mortes por ano. A OMS identifica a malária, dengue, Chikungunya, febre amarela, Zika, filariose linfática, esquistossomose, oncocercose, doenças transmitidas por vetores. Essas doenças ameaçam mais de 80% da população mundial, com maior impacto em populações pobres que residem em áreas tropicais e subtropicais (GOLDING *et al.*, 2015; WHO, 2020).

Muitas das doenças transmitidas por vetores também são classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), havendo uma considerável sobreposição entre esses conceitos. Embora nem todas as DTNssejam transmitidas por vetores muitas delas são propagadas por artrópodes hematófagos (HOTEZ, 2021). De acordo com a OMS as doenças negligenciadas exercem um impacto significativo na saúde, afetando a qualidade de vida e o desenvolvimento socioeconômico das comunidades afetadas (WHO, 2023a).

16

As mudanças ambientais contínuas, os surtos de doenças e a expansão da distribuição dos vetores apresentam desafios para a compreensão dos cenários de transmissão das doenças transmitidas por vetores (CARVALHO *et al.*, 2020; ROCKLÖV; DUBROW, 2020). Diversas características epidemiológicas das DTNs são importantes, como a transmissão de patógenos por diferentes *taxa*, as espécies de vertebrados envolvidas na transmissão e até as condições socioeconômicas que aumentam o risco de transmissão (OCAÑA-MAYORGA *et al.*, 2021).

A epidemiologia dessas doenças é complexa e tendem a afetar predominantemente populações rurais e remotas, comunidades pobres e marginalizadas que vivem em estreita proximidade com animais e vetores de doenças. Essas comunidades enfrentam significativas barreiras de acesso aos serviços de saúde pública, além da escassez de investimentos em pesquisa, desenvolvimento de novos medicamentos e controle efetivo das doenças (MAGALHÃES *et al.*, 2023). As DTNs têm maior prevalência na África, Ásia e América Latina, afetando aproximadamente um bilhão de pessoas globalmente. Dentre as doenças negligenciadas transmitidas por vetores tem-se a doença de Chagas (DC), uma zoonose de alta relevância segundo a OMS (WHO, 2023a).

1.2. Aspectos gerais da doença de Chagas

Também conhecida como tripanossomíase americana, a doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2023b). A DC foi descoberta em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. Durante a investigação de uma epidemia de malária em Lassance, Minas Gerais, Chagas identificou o protozoário *T. cruzi*, o vetor "barbeiro" e o paciente com a doença (CHAGAS, 1909). O pesquisador conseguiu determinar o agente etiológico, explorar a biologia do parasita em hospedeiros vertebrados (como animais silvestres e humanos) e invertebrados (insetos), além de identificar os reservatórios do parasita e descrever diversos aspectos da patologia da doença (DE SOUSA *et al.*, 2024; STEVERDING, 2014).

Trata-se de uma doença endêmica em 21 países da América Latina (GÓMEZ-OCHOA *et al.*, 2022). Nos últimos anos, a migração de indivíduos infectados, principalmente do México, América Central e América do Sul, levou à disseminação da doença para regiões não endêmicas, tornando-a um problema de saúde global (Figura 1) (ECHAVARRÍA *et al.*, 2021). Aproximadamente 30% das pessoas infectadas desenvolvem formas clínicas da doença de Chagas, enquanto o restante permanece na forma indeterminada. Entre os indivíduos sintomáticos, a manifestação clínica mais comum é a forma cardíaca da doença de Chagas, embora as manifestações digestivas também sejam importantes (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).



Figura 1 – Distribuição global da doença de Chagas. As áreas em laranja escuro representam regiões endêmicas, onde a transmissão vetorial é ativa e a doença é comum. As áreas em laranja claro indicam regiões não endêmicas, mas onde casos de Chagas foram registrados. Imagem adaptada de DNDi (2020). ("Symptoms, transmission, and current treatments for Chagas disease | DNDi", 2020)

Segundo avaliação do Banco Mundial na década de 1990, entre as doenças transmissíveis nas Américas, apenas as doenças diarreicas, infecções respiratórias e AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) causaram perdas econômicas maiores do que a DC (GUARNERI; LORENZO, 2021). Uma revisão sistemática recente sobre o impacto econômico da doença utilizou como métrica os custos de hospitalização, revelando que o custo médio anual de internação por paciente varia de US\$25,47 a \$18.823,74 de paridade de poder de compra (PPP-USD), com um valor mediano de US\$324,44 PPP-USD. O custo hospitalar ao longo da vida por paciente pode variar de \$209,44 PPP-USD para cuidados gerais até \$14.351,68 PPP-USD para pacientes com insuficiência cardíaca (ANDRADE *et al.*, 2023).

1.3. Formas de transmissão

A forma "clássica" de transmissão do *T. cruzi* para humanos é através de insetos vetores, os triatomíneos (ALEVI *et al.*, 2021; STEVERDING, 2014). O *T. cruzi* infecta o inseto vetor quando este ingere a forma tripomastigota sanguínea do parasita. No trato digestivo do inseto, o parasito passa por diferentes transformações morfológicas (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Ao alcançar a porção final do intestino, o *T. cruzi* se diferencia na forma infectante tripomastigota metacíclica, e é liberado nas fezes do vetor. A transmissão para um novo hospedeiro vertebrado ocorre durante a alimentação do triatomíneo infectado, quando ele pode defecar próximo à ferida da picada ou em mucosas do indivíduo, permitindo que os parasitas entrem na corrente sanguínea do hospedeiro e causem a infecção (Figura 2) (DE SOUSA *et al.*, 2024).



Trends in Parasitology

Figura 2 - Ciclo intracelular do *Trypanosoma cruzi*. Tripomastigotas metacíclicos, liberados nas fezes dos triatomíneos durante a refeição sanguínea, entram no hospedeiro através de feridas na pele ou mucosas, invadindo células próximas. Após a invasão, os parasitas transformam-se em amastigotas e se multiplicam no citosol. Após a multiplicação, os amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas, que, após a lise celular, são liberados para infectar outras células, migrar para diferentes tecidos ou serem ingeridos por novos vetores. Adaptado de (MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2020).

Além da transmissão vetorial, a transmissão também pode ocorrer por outros meios, uma vez que os parasitas circulam no sangue, como transfusão sanguínea (COURA, 2015), transmissão congênita de mãe para filho, amamentação (CEVALLOS; HERNÁNDEZ, 2014; CHANCEY; EDWARDS; MONTGOMERY, 2023), transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais (HOFFLIN et al., 1987), manipulação de animais infectados e ingestão de alimentos contaminados (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A infecção oral tem se destacado como uma via significativa de transmissão, resultante do consumo acidental de insetos infectados ou de alimentos contaminados com fezes do vetor contendo o parasito. Nos últimos anos, o número de casos e surtos da doença de Chagas aumentou, ou pelo menos se tornou mais evidente na América Latina devido à transmissão oral (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2015).

As regiões com incidência da doença de Chagas coincide com áreas onde os triatomíneos estão presentes (Figura 3) (CARLOS SILVEIRA; RAMOS FEITOSA; BORGES, 1984). No Brasil, estas áreas correspondem principalmente a biorregião Caatinga-Cerrado-Pampa, que possui uma diversidade maior de espécies de triatomíneos (Figura 4) (GOMEZ *et al.*, 2024), a qual inclui biomas importantes do ponto de vista epidemiológico, como o Caatinga, o Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e Pampa (FORATTINI, 2006; GOMEZ *et al.*, 2024; GUARNERI; LORENZO, 2021).

Embora a via oral seja atualmente a principal forma de infecção, a transmissão para humanos está diretamente relacionada à frequência de contato com triatomíneos, ou seja, à presença dos insetos vetores (SAN JUAN *et al.*, 2023). Dessa forma, o controle da doença depende fortemente da redução das populações desses insetos. A meta proposta pela OMS é interromper a transmissão vetorial até 2030 (HAMER *et al.*, 2024).



Fonte: CGZV/DEDT/SVSA/MS. Periodo: 6 de janeiro de 2023 a 6 de janeiro de 2024.

Figura 3 – Distribuição de pacientes ativos no sistema eletrônico do SUS para notificação de doença de Chagas crônica por município, entre janeiro de 2023 e janeiro de 2024. Fonte: ("Boletim Epidemiológico - Volume 55 - nº 08 — Ministério da Saúde", [s.d.])



Figura 4 - Exemplo de distribuição geográfica de espécies de triatomíneos de maior relevância epidemiológica na América, dividido em biorregiões. ChAn= Chaco-Andino; CCPa= Caatinga-Cerrado-Pampa; AmAn= Amazônico-Andino; Pa= Panamenho; Ca= Caribe; CeMe= México Central; NoM-EUA= Norte do México-Estados Unidos da América. Fonte: (GOMEZ et al., 2024).

1.4. Triatomíneos

Os triatomíneos estão amplamente distribuídos pelas Américas, incluindo o Brasil e diversos outros países do continente americano (GALVÃO; GURGEL-GONÇALVES, 2014; VIEIRA *et al.*, 2018). Além disso, algumas espécies podem ser encontradas em continentes como Ásia e Oceania (MONTEIRO *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2024; VIEIRA *et al.*, 2018). Há uma grande diversidade de triatomíneos, cada uma adaptada a diferentes habitats, como palmeiras, troncos de árvore, bromélias, rochas, ninho de aves e tocas de pequenos mamíferos. Esses insetos possuem uma variedade de fontes alimentares, incluindo vertebrados de sangue quente e frio (GUARNERI; LORENZO, 2021).

Os triatomíneos, conhecidos como barbeiros no Brasil, são insetos da ordem Hemiptera e família Reduviidae (JUSTI *et al.*, 2014). Os triatomíneos pertencem a subfamília Triatominae, única subfamília dentro da família Reduviidae caracterizada por indivíduos hematófagos em todas as fases do ciclo de vida, o que ressalta sua importância epidemiológica na transmissão do *T. cruzi* (GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2012; TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2006).

Os triatomíneos, que evoluíram de percevejos predadores reduvídeos, formam um grupo polifilético com diferentes características ecológicas e bioquímicas (MONTEIRO *et al.*, 2018). Até o momento, foram identificadas 158 espécies (CAMPOS et al., 2024; MONTEIRO et al., 2018; ZHAO et al., 2023), incluindo 3 espécies fósseis, agrupados em 18 gêneros e 5 tribos - Alberproseniini, Bolboderini, Cavercolini, Rhodniini, Triatomioni (Tabela 1), sendo todas potenciais vetores do *T. cruzi* (ALEVI *et al.*, 2021).

Tribo	Gênero	Nº espécies
Alberproseniini	Alberprosenia	2
Bolboderini	Belminus	9
	Bolbodera	1
	Microtriatoma	2
	Parabelminus	2
Cavernicolini	Cavernicola	2
Rhodniini	Psammolestes	3
	Rhodnius	22
Triatomini	Dipetalogaster	1
	Eratyrus	2
	Hermanlentia	1
	Linshcosteus	6
	Mepraia	3
	Nesotriatoma	3
	Panstrongylus	15
	Paratriatoma	2

Tabela 1- Tribos e gêneros dos triatomíneos.

	Triatoma	81
	Paleotriatoma	1
Total		158

Os triatomíneos são hemimetábolos, passam por um ciclo de metamorfose incompleta, que inclui as fases de ovo, ninfa e adultos (Figura 5) (MWANGI et al., 2023). Diferentemente das ninfas, os adultos possuem asas e genitália desenvolvida, e chegam a medir cerca de 1 a 4 cm de comprimento (Figura 6) (GUARNERI; LORENZO, 2021). Normalmente, um único repasto sanguíneo é suficiente para que o triatomíneo se desenvolva para o próximo estágio de ninfa, o que ocorre em um período de 6 a 30 dias. Este processo se repete até o inseto atingir a fase adulta, e a duração do período entre as mudas pode variar dependendo da espécie e das condições ambientais, como temperatura e disponibilidade de alimento (KOLLIEN; SCHAUB, 2000; SCHAUB; LÖSCH, 1989).



Figura 5 – Ciclo de vida de *Triatoma costalimai*. As etapas de desenvolvimento incluem: (1) ovo, (2) ninfa de 1º estágio, (3) ninfa de 2º estágio, (4) ninfa de 3º estágio, (5) ninfa de 4º estágio, (6) ninfa de 5º estágio, (7) adulto fêmea, e (8) adulto macho. Fonte: Acervo pessoal.



Figura 6 - Adultos de Triatoma costalimai evidenciando a visão externa da genitália. Fonte: Acervo pessoal

A adaptação dos triatomíneos aos diferentes ambientes levou à formação de populações distintas e ao surgimento de novas espécies (GUARNERI; LORENZO, 2021). Esses insetos sofrem alterações fisiológicas, anatômicas, genéticas e comportamentais, o que ajuda a entender sua ampla distribuição e evidencia os diversos processos adaptativos pelos quais passaram (MONTEIRO et al., 2018). A proximidade física com os hospedeiros vertebrados é essencial devido ao seu comportamento hematófago. Em ecótopos com condições ambientais instáveis e variáveis, a presença dos hospedeiros pode ser esporádica, resultando em colônias de triatomíneos compostas por poucos indivíduos. Em contraste, em locais com condições ambientais estáveis e uma abundância regular de hospedeiros vertebrados, as colônias de triatomíneos tendem a apresentar uma maior densidade de indivíduos (DIOTAIUTI *et al.*, 2000; GUARNERI; LORENZO, 2021; PEREIRA *et al.*, 2006)

A influência do ambiente é evidenciada pela associação entre espécies de triatomíneos e seus respectivos habitats. Por exemplo, o gênero *Triatoma* é frequentemente associado a áreas rochosas, enquanto o gênero *Rhodnius* é mais comumente encontrado em palmeiras (GAUNT; MILES, 2000). Originalmente, a transmissão do *T. cruzi* ocorria principalmente através do ciclo silvestre, envolvendo triatomíneos e mamíferos sem a interação humana (GUHL, 2017; OCAÑA-MAYORGA *et al.*, 2021). Este ciclo de transmissão natural é mantido pela ingestão oral, seja ao

consumir um triatomíneo infectado ou outro mamífero portador da infecção (GUARNERI; LORENZO, 2021; JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018).

Embora muitos mamíferos possam contrair a infecção pelo *T. cruzi*, nem todos podem ser considerados reservatórios eficazes, pois isso requer a presença da infecção e um nível significativo de competência como hospedeiro (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2017). Aves, anfíbios e repteis são resistentes ao *T. cruzi*, no entanto, as aves desempenham uma fonte de alimentação para os triatomíneos, o que pode, por sua vez, aumentar a densidade das populações de vetores, influenciando diretamente a transmissão da doença (JANSEN; ROQUE; XAVIER, 2017; OCAÑA-MAYORGA et al., 2021).

A expansão das atividades humanas, como o desmatamento e outras práticas extrativistas, tem forçado os triatomíneos a migrarem de seus habitats naturais para áreas próximas às habitações humanas (TELLERIA; TIBAYRENC, 2017; TROVO *et al.*, 2024). Este processo gradual de ocupação humana em zonas de transmissão zoonótica abriu novos nichos para os triatomíneos (GUHL, 2017). Com a destruição dos ecótopos naturais, esses insetos passaram a se alimentar de animais domésticos e humanos, estabelecendo-se em áreas tanto internas quanto externas aos domicílio (WALSH; MOLYNEUX; BIRLEY, 1993). Nessas condições, os vetores sobrevivem temporariamente em ambientes domiciliares, e podem colonizá-los a longo prazo sem precisar retornar à natureza para alimentação e reprodução (SEGOVIA *et al.*, 2023).

A atividade humana promove alterações climáticas, como o aumento das temperaturas globais e dos níveis de CO₂, o que, juntamente com a invasão contínua de áreas anteriormente selvagens, ajuda a expandir a transmissão enzoótica do *T. cruzi* (CARVALHO *et al.*, 2020; JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2015). As mudanças climáticas e ambientais proporcionam condições favoráveis para que os triatomíneos se adaptem e prosperem em ambientes artificiais, aumentando o risco de transmissão da doença de Chagas (BEZERRA *et al.*, 2014). A literatura destaca a relevância da temperatura na distribuição dos triatomíneos, sugerindo que temperaturas mais altas favorecem uma maior dispersão desses vetores (LOSHOUARN; GUARNERI, 2024; RAVAZI *et al.*, 2023). A alta prevalência de infecção por *T. cruzi* em animais domésticos e selvagens reforça a estreita relação entre o ciclo enzoótico e as populações humanas (BEZERRA *et al.*, 2014; DURÃES-OLIVEIRA *et al.*, 2024).

26

A habilidade de colonizar ambientes modificados pelos humanos e de se alimentar de sangue de animais domésticos e humanos confere aos triatomíneos uma relevância epidemiológica (GUARNERI; LORENZO, 2021; PEREIRA *et al.*, 2006). Essa capacidade é determinada principalmente por duas características: a habilidade de se alimentar das fontes de sangue disponíveis nas residências e a resistência aos fatores microclimáticos (temperatura e umidade) dos abrigos domiciliares (BEZERRA *et al.*, 2014; LENT; WYGODZINSKY, 1979; LORENZO *et al.*, 2000). Embora existam mais de 150 espécies de triatomíneos, a maioria desempenha um papel no ciclo silvático da doença, enquanto apenas algumas infestam residências e se tornam vetores significativos no ciclo doméstico da doença de Chagas (ALEVI *et al.*, 2021; KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Quase metade dessas espécies está presente no Brasil, incluindo pelo menos 25 espécies nativas do Cerrado (VENDRAMI *et al.*, 2020).

Os triatomíneos podem ser divididos em categorias com base no comportamento de cada espécie em relação à invasão e colonização de diferentes ambientes como, por exemplo, silvestres, intrusivas, domiciliar e domésticas (NOIREAU; DUJARDIN, 2010). Espécies silvestres vivem em ambientes naturais, associadas a animais selvagens. Espécies intrusivas são principalmente silvestres, mas muitos adultos são atraídos para dentro das habitações humanas pela luz ou transporte passivo, sem evidência de colonização. As espécies domiciliadas são frequentemente encontradas nas residências ou peridomicílios, com ciclo completo ocorrendo em ambiente doméstico. Espécies domésticas possuem as características das domiciliadas, mas com uma extensão geográfica mais ampla, explicável pela intervenção humana e transporte passivo (WALECKX; GOURBIÈRE; DUMONTEIL, 2015).

1.5. Gêneros de triatomíneos com importância epidemiológica

A relevância epidemiológica dos triatomíneos é determinada por três fatores específicos de cada espécie: a extensão da distribuição geográfica, o nível de sinantropismo, que é a capacidade de invadir e/ou colonizar ambientes humanos, e a bionomia, que abrange as características da espécie que influenciam a probabilidade de transmissão do patógeno a um hospedeiro humano (DE MIRANDA *et al.*, 2022).

A capacidade vetorial é influenciada por uma combinação de fatores biológicos, comportamentais, ecológicos e fisiológicos do inseto. Dentro do corpo do triatomíneo, o parasita enfrenta uma série de barreiras fisiológicas e seletivas, como a ação dos componentes da saliva, enzimas digestivas e moléculas do sistema imunológico, além de variações de temperatura, osmolaridade e pH *(SANT'ANNA et al.,* 2017). Para que o parasita consiga se adaptar a esse microambiente e se replicar, é essencial que ele supere essas barreiras e mantenha uma carga parasitária adequada (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Esses fatores determinam a suscetibilidade do triatomíneo à infecção pelo parasita e seu sucesso na transmissão da doença de Chagas (LAZZARI, 2021).

Entre os aspectos comportamentais dos triatomíneos que podem influenciar a capacidade vetorial é possível citar a busca ativa por um hospedeiro, a localização de vasos sanguíneos, o tempo de alimentação e o momento da defecação (LAZZARI, 2021). O tempo entre a alimentação e a defecação do triatomíneo é um dos principais determinantes da eficácia da transmissão. Espécies com um intervalo curto entre esses eventos são tradicionalmente consideradas de alta capacidade vetorial (SCHAUB, 2024). Contudo, com o aumento da importância da transmissão oral, causada pela ingestão de alimentos contaminados com formas metacíclicas, essa medida clássica de capacidade vetorial pode não refletir completamente a eficácia de uma espécie em transmitir a doença (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2015; PEREIRA *et al.*, 2009)

Analisando a competência vetorial e a capacidade de colonizar ambientes domiciliares, alguns gêneros de triatomíneos se destacam pela sua importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas. Os gêneros *Triatoma, Rhodnius* e *Panstrongylus* são especialmente relevantes na América Latina devido à sua adaptação para viver em ambientes peridomésticos e domésticos, onde estabelecem contato direto com animais domésticos e humanos (CAVASSIN et al., 2014; VIEIRA et al., 2018). Exemplos de espécies com importância na transmissão doméstica do parasito incluem *Triatoma infestans, Rhodnius prolixus, T. dimidiata* e, no Brasil, especificamente, *Panstrongylus megistus, T. brasiliensis, T. sordida* e *T. pseudomaculata.*

Embora outros vetores também estejam envolvidos no ciclo de transmissão da DC, eles são menos estudados. Essas espécies podem ter importância significativa

em determinadas regiões, e falta de estudos detalhados sobre vetores secundários limita a compreensão completa da doença. Entre os gêneros de importância, destacase o *Triatoma costalimai*, uma espécie endêmica do Cerrado e com relevância médica (NOGUEIRA BRITO *et al.*, 2017a). Considerado um vetor negligenciado (DE MIRANDA *et al.*, 2022), é especialmente significativo por sua capacidade de atuar como vetor, uma vez que foi encontrado em ambientes domiciliares e peridomiciliares, onde estava naturalmente infectado com *T. cruzi* (TEVES *et al.*, 2019).

1.6. Triatoma costalimai

A espécie *Triatoma costalimai* foi descrita pela primeira vez por Verano e Galvão em 1958, a partir de indivíduos coletados em ambientes silvestres em Tocantins (VERANO; GALVÃO, 1958). Os adultos dessa espécie são de tamanho médio, variando entre 2,55 e 2,65 cm de comprimento, e apresentam coloração preta ou marrom-escura, com marcas laranja-avermelhadas ao longo das bordas dorsais externas do conexivo, nas asas anteriores e, em alguns espécimes, no pescoço e na região posterior do pronoto, enquanto as ninfas são de coloração preta (Figura 7) (DE MIRANDA *et al.*, 2022).



Figura 7 - Fêmea de *T. costalimai*. Na foto é possível observar indivíduo de coloração marrom escura, com marcas laranja-avermelhadas ao longo do conexivo e na região posterior do pronoto. Fonte: Acervo Pessoal.

T. costalimai é uma espécie com uma distribuição relativamente limitada, ocorrendo principalmente nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais e Tocantins. É provável que seja endêmica das fitofisionomias de solo rochoso do Cerrado, incluindo áreas de Cerrado rupestre e mata seca decídua calcária. Sua presença é concentrada na Bacia do Alto Rio Tocantins, assim como nas cadeias e planaltos adjacentes, como a Serra Geral de Goiás e o Planalto Central (DE MIRANDA *et al.*, 2022; NOGUEIRA BRITO *et al.*, 2017a). Entretanto foi encontrada recentemente no Mato Grosso do Sul (DE ALMEIDA et al., 2023).

No ambiente silvestre, a espécie está associada em afloramentos de arenito e calcário, sendo uma espécie rupícola. A espécie é encontrada principalmente em rochas e os hábitos alimentares são variados, podendo incluir roedores, lagartos e marsupiais (NOGUEIRA BRITO *et al.*, 2017). No entanto, a espécie também apresenta comportamento sinantrópico, invadindo e colonizando casas e estruturas peridomésticas (NOGUEIRA BRITO *et al.*, 2017b).

Em relação à relevância médica de *T. costalimai*, dois aspectos importantes são a infecção pelo *T. cruzi* e o ciclo de vida e potencial reprodutivo do inseto (DE MIRANDA et al., 2022). Quanto ao ciclo de vida, *T. costalimai* se desenvolve lentamente, e a fonte de sangue e a frequência de alimentação têm um impacto significativo no tempo de desenvolvimento dos indivíduos (SCHOFIELD; MARSDEN; DAS VIRGENS, 1980).

Estudos, como os de Schofield *et al.* (1980), mostraram que *T. costalimai* é suscetível à infecção por *T. cruzi* (SCHOFIELD; MARSDEN; DAS VIRGENS, 1980). Mello & Borges (1981) relataram infecção natural nestes percevejos selvagens (MELLO; BORGES, 1981), e desde então, diversos estudos confirmaram que a infecção é relativamente comum em espécimes capturadas em campo. Uma alta prevalência de *T. cruzi* foi observada em adultos e ninfas capturados em Aurora do Tocantins, sugerindo que a espécie mantém o ciclo silvestre do parasita em ambientes peridomésticos e representa um risco de transmissão na região (TEVES *et al.*, 2019). Nesse cenário, embora não seja um vetor primário da doença de Chagas, *T. costalimai* é de interesse para a saúde pública (TEVES *et al.*, 2019). Um aspecto crítico para a transmissão eficiente do *T. cruzi* é o comportamento de defecar enquanto se alimenta, uma característica observada em 30% das ninfas testadas por Dias-Lima e Sherlock (1997).

30

As rochas nos peridomicílios oferecem ambientes favoráveis para o desenvolvimento de colônias de *T. costalimai* (MACHINER *et al.*, 2012). Em peridomicílios estudados, a espécie foi detectada em rochas próximas a chiqueiros e galinheiros, sugerindo que pode se alimentar de animais domésticos, como aves e porcos (OLIVEIRA; SILVA, 2007; DE MIRANDA *et al.*, 2022; MACHINER *et al.*, 2012; TEVES *et al.*, 2019). Nesse cenário as alterações no ambiente devido à intervenção humana e a presença de criação de animais podem proporcionar maiores oportunidades de alimentação e desenvolvimento para a espécie (MACHINER *et al.*, 2012).

Diante destes aspectos, é perceptível que em condições favoráveis, as características do *T. costalimai* como vetor é comparável as de outras espécies de triatomíneos com grande relevância epidemiológica, como o *T. infestans*, *T. brasiliensis* e *T. sordida* (DE MIRANDA *et al.*, 2022; GUARNERI; PEREIRA; DIOTAIUTI, 2000)

1.7. Repasto sanguíneo

A hematofagia surgiu em pelo menos 20 ocasiões distintas ao longo da evolução dos artrópodes, levando a uma série de adaptações fisiológicas para superar os desafios relacionados ao comportamento hematófago. Essas adaptações incluem um aparelho alimentar altamente especializado e diversas biomoléculas salivares que facilitam a alimentação a partir da pele de hospedeiros vertebrados (ARCÀ; RIBEIRO, 2018; SOARES *et al.*, 2021). Dentre as adaptações morfológicas, diferente dos hemípteros predadores que possuem uma probóscide curvilínea, a probóscide dos triatomíneos é praticamente reta e composta por três segmentos, não ultrapassando o primeiro par de pernas (Figura 8). O aparelho bucal desses insetos inclui lábio ou probóscide, um par de mandíbulas serrilhadas e um par de maxilas longas e flexíveis. Essas estruturas formam dois canais: o canal salivar, que conduz a saliva ao local da alimentação, e o canal alimentar, por onde o sangue é sugado durante o repasto (LAVOIPIERRE; DICKERSON; GORDON, 1959).



Figura 8 - Vista lateral de ninfa de 4º estágio, evidenciando a probóscida reta com três seguimentos. Fonte: Acervo pessoal

São insetos solenofágicos, removendo sangue diretamente das vênulas ou arteríolas de vertebrados (GUARNERI; LORENZO, 2021), podendo consumir de 6 a 12 vezes o seu próprio peso em sangue (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). No início do processo alimentar, o triatomíneo perfura a pele com suas mandíbulas, introduz as maxilas e realiza movimentos oscilatórios para sondar um vaso sanguíneo. Após localizar o vaso, inicia-se a fase de ingurgitamento, onde o sangue é bombeado para o intestino médio do inseto através de contrações dos músculos da bomba cibarial na cabeça (BENNET-CLARK, 1963; SOARES *et al.*, 2021). Esse processo é repetitivo e ocorre em intervalos regulares.

Durante a fase de sondagem e ingurgitamento, ocorre a salivação. Em *Rhodnius prolixus*, por exemplo, a salivação começa na picada e continua até o final da refeição (FRIEND; SMITH, 1971), sendo abundante durante a sondagem e mais lenta durante o ingurgitamento (SOARES *et al.*, 2006). Parte da saliva é ingerida junto com o sangue, permitindo que suas biomoléculas atuem no intestino médio do inseto (SANT'ANNA *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2021)

A atividade das peças bucais dos triatomíneos ao perfurar a pele e buscar sangue causa danos nas estruturas da pele, como células e vasos sanguíneos, resultando na liberação ou exposição de várias moléculas do hospedeiro no local de alimentação. Estas moléculas são mediadoras das respostas fisiológicas do hospedeiro que previnem a perda de sangue (hemostasia) e promovem a reparação tecidual (inflamação) (ARCÀ; RIBEIRO, 2018). Durante a hematofagia, os triatomíneos enfrentam essas reações, que dificultam a aquisição de sangue devido à diminuição da disponibilidade de sangue no local da picada ou desencadeiam comportamentos defensivos do hospedeiro, como coceira e dor. Em contraste, a saliva dos triatomíneos é rica em moléculas bioativas capazes de interferir na hemostasia, inflamação e imunidade do hospedeiro, auxiliando na aquisição de uma refeição de sangue (RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). Portanto, essas moléculas ativas são essenciais para que os triatomíneos obtenham sucesso ao realizar o repasto, contornando os obstáculos impostos pelas respostas fisiológicas rápidas do hospedeiro (SOARES *et al.*, 2021).

1.8. Saliva

Durante o repasto sanguíneo, os insetos hematófagos injetam saliva nos tecidos dos hospedeiros. As moléculas salivares auxiliam na busca por um local adequado para a hematofagia e ajudam a superar as respostas fisiológicas do hospedeiro (ARCÀ; RIBEIRO, 2018).

A composição salivar varia significativamente entre os diferentes grupos de insetos hematófagos. Por exemplo, estima-se que pulgas e nematóceros hematófagos, como mosquitos, flebotomíneos e simulídeos, possuam entre 100 e 200 tipos de proteínas em sua saliva. Insetos da subordem Brachycera, como moscas tsétsé e tabanídeos, têm cerca de 250 a 300 proteínas, enquanto triatomíneos possuem mais de 300 proteínas bioativas, e carrapatos apresentam mais de 500 (ARCÀ; RIBEIRO, 2018; FRANCISCHETTI et al., 2009).

Dentro da subfamília Triatominae, existem diferenças significativas nas moléculas expressas e na morfologia das glândulas salivares, especialmente entre as tribos Rhodniini e Triatomini (LACOMBE, 1999; RIBEIRO et al., 1998). As nitroforinas, hemo proteínas transportadoras de óxido nítrico (NO), são as lipocalinas salivares predominantes no gênero *Rhodnius,* mas não estão presentes nas espécies da tribo Triatomini, que, em contrapartida, possuem sequências de proteases secretadas (RIBEIRO; ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI, 2012; SOARES *et al.*, 2021). Além das diferenças na composição salivar, morfologicamente as glândulas salivares das

espécies de Triatomini possuem três lobos (D1, D2 e D3), enquanto o lobo D3 está ausente nas espécies de Rhodniini (LACOMBE, 1999).

A saliva dos triatomíneos contém várias substâncias que facilitam a alimentação sanguínea e diminui o tempo necessário para sondagem e alimentação, como anticoagulantes, vasodilatadores, anti-histamínicos, bloqueadores de canais de sódio e inibidores da agregação plaquetária induzida por ADP, trombina, serotonina, ácido araquidônico, fator ativador de plaquetas (PAF), epinefrina e norepinefrina. Além dessas, a saliva também possui compostos com atividade imunossupressora, enzima sialidase, e proteína formadora de poros (DE ARAÚJO *et al.*, 2012; RIBEIRO; ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI, 2012; SANT'ANNA *et al.*, 2017; SANTIAGO *et al.*, 2020a; SOARES *et al.*, 2021)

Além de suas propriedades anti-hemostáticas, a saliva contém compostos que podem influenciar a resposta imunológica do hospedeiro (RIBEIRO *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2021). Por exemplo, em triatomíneos, foi visto que a saliva de *R. prolixus* contribui para a transmissão do *T. cruzi* através da indução da quimiotaxia de células inflamatórias, consequentemente aumentando a parasitemia (MESQUITA *et al.*, 2008).

1.9. Hemostasia

Ao ocorrer uma lesão vascular, o corpo reage para mediar o evento e reestabelecer o equilíbrio natural. Esse processo, conhecido como hemostasia, evita a perda excessiva de sangue e envolve diferentes interações entre os componentes do sistema circulatório para conter a lesão vascular (VERSTEEG *et al.*, 2013). Em áreas de lesão, o endotélio muda de um estado anticoagulante para um estado pró-coagulante e pró-trombótico para minimizar a hemorragia. A hemostasia envolve uma série de eventos fisiológicos organizados em três etapas principais: vasoconstrição, formação do tampão plaquetário e formação do coágulo sanguíneo (BROOS *et al.*, 2011; NEUBAUER; ZIEGER, 2022).

A vasoconstrição é a resposta inicial quando um vaso sanguíneo é danificado. O processo é desencadeado pela exposição das células musculares lisas a agentes vasoativos gerados localmente, como bradicinina, histamina, vasopressina e trombina, enquanto a ação vasodilatadora das células endoteliais é suprimida. A contração das células musculares lisas reduz o diâmetro do vaso e diminui o fluxo sanguíneo (DURAND; GUTTERMAN, 2013; NEUBAUER; ZIEGER, 2022). A próxima etapa na hemostasia envolve a coagulação, que começa quase instantaneamente. Este processo é essencial para cessar a perda de sangue e iniciar o reparo tecidual, e depende da interação entre as plaquetas e o sistema de coagulação (RUGGERI, 2002).

Quando ocorre a lesão em um vaso sanguíneo, as plaquetas são rapidamente recrutadas para o local da lesão, aderindo às fibras de colágeno e outras proteínas da matriz subendotelial expostas (BROOS et al., 2011). Este processo inicia a formação de um aglomerado de plaquetas que ajuda a conter o fluxo sanguíneo. A agregação plaquetária ocorre em três etapas principais: iniciação, extensão e estabilização (VERSTEEG et al., 2013). Na fase de iniciação, as plaquetas aderem ao sítio da lesão e formam uma camada inicial sobre a superfície danificada. A adesão inicial é mediada pelo fator von Willebrand (VWF) e pela interação com o colágeno subendotelial, facilitada pelo complexo GPIb-V-IX e o receptor GPVI (NEUBAUER; ZIEGER, 2022; SAKARIASSEN; BOLHUIS; SIXMA, 1979). Durante a extensão, as plaquetas adicionais são recrutadas e ativadas, formando um tampão plaquetário. Esta ativação é acompanhada pela mudança na forma das plaguetas, que passam de discoides para esféricas, e pela liberação de grânulos contendo ADP e tromboxano A2, que promovem a agregação de novas plaquetas (BROOS et al., 2011; EHRMAN; TOTH; FROJMOVIC, 1978). Finalmente, na fase de estabilização, a fibrina é depositada sobre o tampão plaquetário, formando um coágulo sanguíneo que sela a lesão vascular. As plaquetas também liberam fatores de crescimento e outras moléculas hemostáticas que amplificam a resposta e estabilizam o coágulo (NEUBAUER; ZIEGER, 2022; RUGGERI, 2002; VERSTEEG et al., 2013)

A resposta hemostática à lesão vascular envolve uma série de eventos proteolíticos em cascata, onde vários zimogênios inativos da família da tripsina são convertidos em proteases ativas (GREEN, 2006; STOJANOVSKI; MOHAMMED; DI CERA, 2024). A iniciação da coagulação sanguínea depende de vários componentes que precisam ser ativados, incluindo plaquetas, células endoteliais e leucócitos. Esses elementos criam uma superfície apropriada para que as proteínas de coagulação se fixem e interajam. A proximidade dessas proteínas é importante para que a cascata de coagulação ocorra de forma eficiente. O resultado desse processo é a produção

de trombina, que promove a agregação das plaquetas, a formação e estabilização da fibrina, e a inibição da fibrinólise. Esse processo ocorre através das etapas de iniciação, amplificação e propagação (FERREIRA et al., 2010; VINE, 2009).

A iniciação da coagulação sanguínea é desencadeada pela lesão na parede do vaso, que expõe células subendoteliais, como fibroblastos e células musculares lisas. Essas células liberam o fator tecidual (FT) na corrente sanguínea, dando início à primeira fase da coagulação (GREEN, 2006). O FT é uma glicoproteína que se liga ao fator VII, formando um complexo que ativa o fator VII para a forma FVIIa. Este complexo FT/FVIIa ativa, por sua vez, os fatores IX e X, convertendo-os em FIXa e FXa. O fator Xa ativa, em combinação com o fator Va, forma o complexo protrombinase. Este complexo é responsável pela conversão da protrombina (Fator II) em trombina (Fator IIa) (FERREIRA et al., 2010; VINE, 2009). Durante essa fase inicial, são formadas apenas pequenas quantidades de trombina (STOJANOVSKI; MOHAMMED; DI CERA, 2024). A trombina gerada é essencial para a fase de amplificação da coagulação, que produzirá quantidades maiores desse fator.

Durante a amplificação, a trombina gerada na fase inicial ativa as plaquetas no local da lesão (NEUBAUER; ZIEGER, 2022). A trombina também converte o fator V em FVa, que aumenta a atividade do complexo protrombinase, potencializando a conversão de protrombina em trombina. Além disso, a trombina ativa o fator XI, que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IXa, junto com o fator VIIIa, forma o complexo "tenase" na superfície das plaquetas, promovendo a produção maciça de FXa. A trombina gerada nesta fase ativa ainda mais plaquetas e fatores de coagulação, amplificando o processo. Na fase de propagação, acontece a produção de uma grande quantidade de trombina, resultando na formação de um tampão estável no sítio da lesão e interrupção da perda sanguínea. O FIXa ativado anteriormente se liga ao FVIIIa na superfície das plaquetas, formando o complexo tenase. Além disso, mais FIXa é gerado pelo FXIa ligado às plaquetas. Como o FXa não pode se mover efetivamente das células que expressam FT para as plaquetas ativadas, é necessário produzir mais FXa diretamente na superfície das plaquetas através do complexo FIXa/FVIIIa. O FXa, então, se associa rapidamente ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase. Este complexo converte uma grande quantidade de protrombina em trombina, que cliva o
fibrinogênio em monômeros de fibrina, consolidando o tampão plaquetário inicial (Figura 9) (FERREIRA *et al.*, 2010; VINE, 2009).



Figura 9 - Modelo de coagulação compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação. Fator tecidual (FT), ativado (a). Adaptado de Ferreira, C.N., 2010, O novo modelo de cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações

1.10. Proteoma: visão geral

As "ômicas" referem-se a uma análise ampla e global de conjuntos de moléculas em um sistema biológico. No caso da proteômica, essa abordagem foca no estudo do proteoma, que é o conjunto de proteínas expressas em uma célula, tecido ou fluido biológico em um momento específico (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). A proteômica é usada para quantificar a abundância, modificação e interação de peptídeos, sendo uma ferramenta cada vez mais utilizada para entender os

mecanismos moleculares e bioquímicos, especialmente na transmissão de doenças por vetores (SHUKEN, 2023).

A pesquisa proteômica complementa significativamente as informações genéticas obtidas por estudos genômicos. A integração de dados proteômicos e genômicos pode desempenhar um papel importante em pesquisas biomédicas futuras, contribuindo para o avanço de novas estratégias de diagnóstico e tratamento. (ZHANG et al., 2014). Com o uso de espectrometria de massa (MS), a proteômica permite caracterizar e quantificar o perfil proteico de amostras biológicas, além de revelar as interações complexas das proteínas (SHUKEN, 2023).

A espectrometria de massa é uma técnica que permite a análise de diversas substâncias simultaneamente, identificando e quantificando proteínas em uma amostra por meio da medição da relação massa/carga (m/z) de peptídeos ionizados. Esta tecnologia tornou-se fundamental para a identificação e caracterização de proteínas, assim como para a detecção de suas modificações pós-traducionais (PTMs) (BENSIMON; HECK; AEBERSOLD, 2012).

Existem diferentes abordagens proteômicas, sendo uma das principais a chamada *shotgun proteomics*, que pode ser realizada de duas formas: *Top-down* e *Bottom-up*. Na abordagem *Top-down*, as proteínas são analisadas intactas, sem passar por digestão prévia. Já na abordagem *Bottom-up*, as proteínas são primeiro digeridas quimicamente ou enzimaticamente em peptídeos menores antes da análise. A MS é então utilizada para gerar espectros que identificam as sequências desses peptídeos, combinando-os com sequências de proteínas conhecidas através de métodos de inferência. Ambas as abordagens permitem a realização de análises quantitativas (DUPREE *et al.*, 2020; GILLET; LEITNER; AEBERSOLD, 2016; SHUKEN, 2023; ZHANG *et al.*, 2014).

As abordagens mais recentes *Bottom-up* utilizam cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), facilitando a análise proteômica *shotgun* (SHUKEN, 2023). Um fluxo de trabalho típico de proteômica *Bottom-up* inclui várias etapas principais: (i) isolamento da mistura de proteínas da amostra biológica, seguido por (ii) quantificação das proteínas isoladas, (iii) fracionamento das proteínas por eletroforese em gel ou cromatografia líquida, (iv) clivagem proteolítica das proteínas, geralmente por tripsina, (v) medição dos

38

peptídeos resultantes por espectrometria de massa, e finalmente, (vi) busca em bancos de dados para identificação das proteínas (DUPREE et al., 2020).

Na análise proteômica por MS, peptídeos ou proteínas, que são polares e termicamente instáveis, precisam ser transferidos para a fase gasosa sem sofrer degradação significativa. Para isso, utilizam-se dois métodos principais de ionização: a ionização por eletrospray (ESI) e a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). A técnica MALDI é comumente usada com métodos baseados em gel, enquanto a ESI é frequentemente acoplada à cromatografia líquida para análise com espectrômetros de massa. Durante o processo, proteínas e peptídeos são ionizados na fase gasosa antes de serem acelerados em um campo magnético ou elétrico (BENSIMON; HECK; AEBERSOLD, 2012; GILLET; LEITNER; AEBERSOLD, 2016)

A detecção dos peptídeos e proteínas é realizada por meio de análises de massa, que podem incluir técnicas como análise de tempo de voo (TOF) ou armadilhas de íons. No analisador TOF, a separação dos íons é baseada no tempo que eles levam para percorrer um tubo de voo. Em métodos de aprisionamento de íons, a separação é feita em um campo magnético ou eletrodinâmico que retém os íons. Para uma análise mais detalhada, a espectrometria de massa em tandem (MS/MS) é utilizada, permitindo a fragmentação dos peptídeos em íons menores. Este processo pode envolver a realização de duas etapas de MS em sequência, utilizando o mesmo princípio de separação duas vezes ou combinando dois tipos diferentes de separação (GILLET; LEITNER; AEBERSOLD, 2016; HUGO; BIRRELL, 2018; SHUKEN, 2023).

O Orbitrap é outro tipo de analisador de massas, e se destaca por sua alta resolução e precisão na análise de íons. No Orbitrap, os íons são capturados e mantidos em um campo eletrostático entre dois eletrodos: um eletrodo interno em forma de espiral e um eletrodo externo em forma de cilindro. Quando os íons são introduzidos no Orbitrap, eles oscilam ao redor do eixo do eletrodo interno com uma frequência que é inversamente proporcional à sua massa. O detector do Orbitrap mede essas frequências de oscilação, permitindo a determinação precisa da massa dos íons (ELIUK; MAKAROV, 2015; SCIGELOVA; MAKAROV, 2006; ZUBAREV; MAKAROV, 2013).

A biologia computacional utiliza algoritmos para interpretar os espectros de massa complexos obtidos de análises de LC-MS e LC-MS/MS. A identificação de proteínas é realizada através da comparação dos dados experimentais com bancos de dados teóricos, utilizando métodos estatísticos para confirmar a autenticidade das correspondências. A identificação é geralmente validada com base em múltiplas massas de peptídeos correspondentes e íons de fragmentos. Algoritmos frequentemente integram probabilidade e estatística para a inferência de identificação, ajustando taxas de descoberta falsa (FDR) para níveis adequados. O sequenciamento de peptídeos *de novo*, que envolve a elucidação de sequências a partir de espectros de íons, é particularmente útil para amostras de espécies não sequenciadas. Instrumentos modernos de alta resolução podem analisar milhares de espectros MS/MS rapidamente (COLINGE; BENNETT, 2007; SHUKEN, 2023).

1.11. Proteomas salivares de triatomíneos

No contexto dos estudos envolvendo triatomíneos, as análises proteômicas fornecem uma visão das interações entre os triatomíneos e o agente causador da doença de Chagas (VIEIRA *et al.*, 2018). Ao longo dos anos, os estudos focados na descrição e caracterização de moléculas tem evoluído, com investigações centrada na saliva (SANTIAGO et al., 2020b), trato digestivo (GUMIEL *et al.*, 2020; OUALI et al., 2020), apêndices sensoriais (OLIVEIRA *et al.*, 2017), hemolinfa (BARBOSA *et al.*, 2023; OUALI *et al.*, 2022), cérebro (ONS *et al.*, 2009; S *et a*., 2011), cutícula (SOUZA-FERREIRA *et al.*, 2014), entre outros tecidos e órgãos que expressam moléculas importantes, tanto para a sobrevivência do vetor, quanto para a persistência do parasito no interior do vetor (DOS SANTOS SOUZA *et al.*, 2020; LAROCHE *et al.*, 2018).

Um grande aliado na descoberta e caracterização de diferentes micromoléculas presente na saliva de artrópodes hematófagos é através da descrição dos sialomas, em que os estudos realizados por análises transcriptômicas e protômicas das glândulas salivares (GS) desses animais tem sido implementadas (RIBEIRO; ASSUMPÇÃO; FRANCISCHETTI, 2012; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). A proteômica é empregada para validar a expressão dos transcritos da GS em larga escala (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). Estudos anteriores sobre o sialoma em

espécies de triatomíneos incluem *Triatoma infestans* (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2008), *T. dimidiata* (SANTIAGO *et al.*, 2018), *T. pallidipennis* (HERNÁNDEZ-VARGAS *et al.*, 2017), *Rhodnius neglectus* (SANTIAGO *et al.*, 2016), *Rhodnius prolixus (RIBEIRO et al.*, 2004), *Panstrongylus megistus* (RIBEIRO; SCHWARZ; FRANCISCHETTI, 2015), *Triatoma matogrossensis* (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2012), *Dipetalogaster maxima* (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011), e mais recentemente, *Triatoma sordida* (PRAÇA *et al.*, 2022).

A análise proteômica foi realizada especificamente para *Triatoma infestans* (CHARNEAU et al., 2007), *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius robustus* (COSTA *et al.*, 2011), *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lectularia*, e *Panstrongylus herreri* (MONTANDON *et al.*, 2016). Esses estudos identificaram diversas famílias de proteínas na saliva, incluindo lipocalinas, triabinas, palidipinas, proteases, nitroforinas, inibidores de proteases e proteínas de ligação ao odorante. No entanto, a função de muitas dessas moléculas ainda não é totalmente compreendida (SANTIAGO *et al.*, 2020b). Essas aplicações demonstram a importância da proteômica para entender diferentes aspectos da fisiologia dos triatomíneos (DE ARAÚJO *et al.*, 2012; HUGO; BIRRELL, 2018). Até o momento, não há estudos de análise proteômica das glândulas salivares para *T. costalimai*.

2. JUSTIFICATIVA

A saliva dos triatomíneos contém moléculas bioativas que facilitam a alimentação ao inibir a coagulação sanguínea, a agregação plaquetária e as respostas imunológicas do hospedeiro, podendo também influenciar a transmissão do *T. cruzi*. A análise proteômica permite identificar e classificar proteínas expressas em células ou tecidos específicos, e, no estudo de triatomíneos, as proteínas salivares podem ser fundamentais para a descoberta de novos alvos terapêuticos. Essas proteínas têm potencial para o desenvolvimento de vacinas ou inibidores que interrompam a alimentação dos triatomíneos e a transmissão do *T. cruzi*.

A bioprospecção de biomoléculas salivares de vetores hematófagos contribui para a descoberta de fármacos para distúrbios circulatórios, antimicrobianos e tratamentos hematológicos, considerando que moléculas salivares de outros organismos resultaram em anticoagulantes, vasodilatadores e imunomoduladores. Dada a diversidade de triatomíneos transmissores do *T. cruzi*, investigar espécies menos pesquisadas, como *Triatoma costalimai*, amplia nossa compreensão da dinâmica da doença de Chagas. Estudos proteômicos sobre essa espécie ainda não foram realizados, e investigar as proteínas salivares desses vetores pode esclarecer a dinâmica entre o parasita, o vetor e o hospedeiro, além de aprofundar o entendimento sobre a evolução dos organismos hematófagos.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a análise proteômica do extrato salivar de *Triatoma costalimai*, um vetor potencial do *Trypanosoma cruzi* no Cerrado As seguintes etapas foram realizadas para alcançar o objetivo geral:

- 1. Estabelecer a colônia de *Triatoma costalimai* no insetário a partir de indivíduos silvestres;
- Coletar o extrato salivar de *T. costalimai* através da dissecação das glândulas salivares;
- Realizar a análise proteômica do extrato salivar de *T. costalimai* por meio da espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS;
- 4. Identificar as proteínas da saliva do *T. costalimai* a partir de análises de bioinformática e realizar anotação funcional utilizando a ferramenta OmicsBox;
- Realizar uma interpretação biológica das proteínas salivares do triatomíneo, suas possíveis interações conhecidas utilizando dados previamente descritos na literatura para outras espécies de triatomíneos e insetos hematófagos.

4. METODOLOGIA

4.1. Desenho experimental

O fluxo de trabalho empregado para a análise proteômica do extrato salivar do *T. costalimai* está representado abaixo (Figura 10).



Figura 10 - Resumo esquemático da metodologia para análise proteômica da saliva de T. costalimai.

4.2. Estabelecimento e manutenção da colônia de *T. costalimai*

Os triatomíneos da espécie *Triatoma costalimai* foram coletados no município de Mambaí, localizado no nordeste de Goiás, a cerca de 320 km de Brasília, Distrito Federal, Brasil, em outubro de 2022, pelos professores Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves, Dr. Marcos Takashi Obara e Dr. Vinícius Lima de Miranda - Faculdade de Medicina, UnB, autorizada pelo SISBIO através da Licença permanente para coleta de material zoológico número 22404-2. Trezentos e quarenta e cinco triatomíneos silvestres (ninfas de 1º ao 5º estágio) foram coletados no peridomicílio, em formações rochosas/pedreiras próximos às habitações humanas. A coleta foi realizada através do método de busca ativa e os insetos foram acondicionados em potes coletores de polietileno perfurados para aeração. Posteriormente, os insetos foram encaminhados e mantidos em colônias no Insetário do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB (IB/UnB).

No Insetário, as ninfas de 1° ao 5° estágios foram acondicionadas em frascos de polietileno cobertos com tecido de malha fina (organza) envolto por elástico na parte superior, e mantidas em câmaras climatizadas sob temperatura de 26 \pm 1 °C e umidade relativa de 60 – 70%, com ciclo de claro e escuro de 12/12h para desenvolvimento e acasalamento. As ninfas de 1° ao 3° estágios foram alimentadas quinzenalmente em aves (*Gallus gallus domesticus*) em média por 30 min (CANAVOSO; RUBIOLO, 1995), para reprodução e obtenção de ovos, resultando na geração de novos indivíduos com o propósito de estabelecer a colônia de triatomíneos no insetário.

As ninfas de 4º e 5º estágio foram utilizadas para a extração do intestino e das glândulas salivares para a realização de análise de transcriptômica em paralelo por outros componentes da equipe de pesquisa.

4.3. Extração das glândulas salivares e obtenção de saliva

Os triatomíneos adultos foram divididos em quatro grupos de 10 insetos, resultando em um total de 40 glândulas em cada réplica biológica. As glândulas salivares foram dissecadas imobilizando previamente os insetos no gelo e, em seguida, utilizando pinças e lupa para deslocar a cabeça e expor o par de glândulas salivares. Em seguida, as glândulas foram coletadas em microtubos de 1,5 mL, delicadamente perfuradas e mantidas em gelo até o término da coleta. A saliva foi diluída em 4 μ L de PBS, e as amostras foram submetidas a centrifugação a 16.000*xg* por 15 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi recolhido e transferido para novos tubos. O volume da fração solúvel foi mensurado e em seguida, o volume de cada amostra foi ajustado para 10 μ L com a adição de PBS e de coquetel de inibidores de proteases (Roche, USA). Por fim, 2 μ L de cada réplica foi separado em novos microtubos para a realização da quantificação de proteínas, e os 8 μ L restantes foram estocados a -80 °C até o momento da análise proteômica.

4.4. Preparação das amostras de saliva para análise proteômica

As amostras de saliva foram inicialmente quantificadas utilizando o fluorímetro Qubit 2,0 (Invitrogen, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. As frações solúveis contendo aproximadamente 300 µg de proteína foram precipitadas com acetona/NaCl (CROWELL; WALL; DOUCETTE, 2013), incubadas 16h a - 20 °C e centrifugadas a 16.000 *x g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi seca à vácuo por 20 min. As proteínas foram ressuspendidas adicionando-se 20 µL de ureia 8M e submetida ao vórtex até completa homogeneização do sedimento. A fim de determinar a porcentagem de recuperação das proteínas precipitadas, 1 µL da amostra foi retirado e diluído no tampão TEAB para uma nova quantificação no Qubit.

As amostras foram reduzidas na presença de DTT a 0,5 M, incubadas por 25 min a 55 °C, e em seguida alquiladas com iodo acetamida no escuro por 40 min, em uma concentração final de 0.014 M. Para inativar a alquilação, foi adicionado DTT 0,5 M. Em seguida, as proteínas foram digeridas com Tripsina e Lys-C (Promega, EUA) por aproximadamente 17h a 37 °C, considerando uma proporção de 1:50 – para cada 50 µg de proteína foi usado 1 µg de Tripsina e Lys-c. A amostra resultante da digestão foi acidificada adicionando 6 µL de ácido trifluoracético 0,5% (concentração final) (KOLLIPARA; ZAHEDI, 2013; VILLÉN; GYGI, 2008) e estocada a - 20 ° C até a dessalinização.

A dessalinização foi realizada com StageTip C₁₈, utilizando microcolunas *home made* em ponteiras de 200 µl contendo a membrana Empore C₁₈ (CDS Analytical, EUA) e resina Oligo R3 *Reversed Phase Resin (Applied Biosystems*, CA, EUA) (RAPPSILBER; MANN; ISHIHAMA, 2007). Após a aplicação das amostras nas colunas, a amostra foi lavada com ácido acético 0.5% (v/v), e em seguida, as proteínas foram eluídas sequencialmente com diferentes concentrações de acetronitrila (25%, 50%, 80%, 98%). Após completa eluição, as amostras foram secas à vácuo por aproximadamente 20 min e armazenadas a - 20 °C até o uso.

Os peptídeos foram ressuspensos em solução contendo ácido fórmico a 0,1% e novamente dosados no sistema Qubit, para quantificação após a dessalinização. Finalmente, amostras contendo 6 µg de proteínas foram aliquotadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C até serem utilizadas para a espectrometria de massas.

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para análise do perfil eletroforético unidimensional das amostras da saliva de *T. costalimai,* as proteínas do estoque diluídas em ureia 8M foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo docecil sulfado de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). A amostra foi diluída em tampão (Tris-HCI 50 mM, pH 6,8; glicerol 10%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; β-Mercaptoetanol (βME) 15 mM), e submetida à fervura a 95 °C por 5 min no banho seco (*Dry block Nova Instruments*). A eletroforese foi realizada em sistema vertical MiniProtean®3 Cell (BioRad), a temperatura ambiente, com voltagem constante de 90 V, na passagem pelo gel concentrador e 120 V, durante a passagem pela região separadora, com tampão de corrida tris-glicina (Tris HCI 25 mM, pH 8,8; glicina 250 mM e SDS 0,1%). Como padrão de massa molecular foi utilizado o marcador *BenchMarck*[™] *Pre-stained Protein Ladder* (ThermoFisher).

Para observação do perfil proteico o gel foi corado com azul de Coomassie, após a eletroforese. O gel resultante foi submerso em solução corante (metanol 45%; ácido acético 10%, *Coomasie Brillant Blue R-250*) *overnight* sob agitação constante. Posteriormente, o gel foi incubado com solução descorante (metanol 45%, 45% água e 10% ácido acético) sob agitação lenta até visualização das bandas proteicas. O gel foi lavado e fotografado.

4.6. Espectrometria de massas tipo LC-MS/MS

Quatro replicatas com 6 ug de peptídeos trípticos foram submetidos para análise LC-MS/MS na plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas (Plataforma RPT02H). Cada amostra foi analisada em triplicata totalizando 12 amostras que foram carregadas pelo *autosampler* do cromatógrafo líquido Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific) e os peptídeos separados em uma coluna analítica de 15 cm com 75 um de diâmetro interno, contendo partículas de C18 de 3 µm de diâmetro, com um fluxo constante de 250 nL/min. A fase A foi composta por 0,1% de ácido fórmico e a fase B por 0,1% de ácido fórmico e 95% acetonitrila e o gradiente linear de 5 a 40% de acetonitrila por 120 min. As amostras foram diretamente carregadas no espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific). Na fonte de íons, os peptídeos foram ionizados por nanoeletrospray (2,3 kV) com temperatura do tubo de transferência de íons de 175 °C. Os espectros MS1 foram obtidos no Orbitrap com uma resolução de 120.000. A faixa do scan foi de 300-1500 m/z. A rádio frequência nas lentes a 30%. O tempo máximo de injeção de 50 ms, com polaridade positiva e calibração interna EASY-IC[™] ativada. Os íons precursores incluídos com estado de carga 2 a 7. Os íons selecionados foram excluídos dinamicamente por 60 s com tolerância de massa de 10 ppm. O modo de aquisição dependente de dados foi por tempo de ciclo de 2 s (tempo entre scans). No MS2, os íons precursores foram isolados no quadrupolo com uma janela de isolamento de 1.6 m/z e fragmentados por HCD no Orbitrap com energia de colisão de 30%, tempo máximo de injeção de 22 ms e resolução de 15.000.

4.7. Busca de proteínas

Os dados brutos das corridas de LC-MS/MS foram analisados na plataforma MaxQuant, versão 2.4.7.0. e as proteínas foram identificadas usando um banco de dados contendo um total de 58.381 sequências de proteínas de triatomíneos, baixado em 12 de abril de 2024 do UniProt (<u>www.uniprot.org</u>). Proteínas contaminantes (queratinas humanas, BSA e tripsina suína) também foram incluídas na busca. A tolerância MS/MS (FTMS) foi de 20 ppm e a tolerância MS/MS (ITMS) de 0,5 Da. O tamanho dos peptídeos buscados considerou peptídeos com ao menos sete aminoácidos, tripsina com clivagem específica e permitindo duas clivagens perdidas. Carbamidometilação de cisteínas foi determinada como uma modificação fixa. Oxidação de metionina e acetilação N-terminal foram pesquisadas como modificações variáveis. O algoritmo *match between runs* foi usado, com janela de tempo de 0,4 minutos. Foi aplicado um FDR de 1% à nível de PSM e proteínas usando o banco de dados *target-decoy*. Os demais parâmetros foram *default* do programa.

4.8. Análises proteômica

O programa PEAKS Studio 7.0 (*Bioinformatics Solutions* Inc) foi utilizado para identificação das proteínas a partir dequatro réplicas biológicas. As proteínas foram identificadas usando um banco de dados contendo um total de 58.381 sequências de proteínas de triatomíneos, baixado do UniProtKB em 18 de abril de 2024 (www.uniprot.org). Os espectros de massa em formato.*raw* de 3 replicatas técnicas de cada réplica biológica foram submetidos à busca utilizando como parâmetros: tolerância de erro da massa do precursor de 10,0 ppm, tolerância de erro da massa

do fragmento de 0,02 Da, e busca da massa do precursor do tipo monoisotópica. A enzima utilizada foi tripsina modificada (Promega, EUA) e a endoproteinase Lys-C (Promega, EUA), com um máximo de duas clivagens perdidas e uma clivagem não-específica permitida. Foram consideradas as modificações fixas de carbamidometilação e as modificações variáveis de oxidação (M), com um máximo de cinco modificações pós-traducionais variáveis por peptídeo. O valor de taxa de *False Discovery Rate* (FDR) foi de 1%.

Após a identificação dos espectros pelo PEAKS foi gerada uma lista de identificações para cada réplica biológica. As quatro listas geradas foram unificadas em uma única planilha utilizando o Microsoft Excel®, permitindo a análise conjunta dos dados. Através do código de acesso das proteínas, extraído da base de dados UniProt, as proteínas duplicadas foram removidas, mantendo-se apenas uma entrada para cada proteína identificada.

A partir da entrada de um arquivo FASTA contendo as sequências identificadas pelo PEAKS, diferentes análises *in silico* foram realizadas. Primeiramente as sequências foram carregadas no software OmicsBox (OMICSBOX, 2019), e através do módulo de Análise Funcional, utilizou-se a funcionalidade *"Find Duplicates Sequence"*, para remover sequências duplicadas. Essa funcionalidade identifica e elimina sequências redundantes, ou seja, aquelas sequências que são exatamente iguais dentro do conjunto de dados. Em seguida, foi utilizada a funcionalidade *"Find Similar Sequence"*, que realiza uma busca por meio de alinhamentos BLAST, comparando a lista de sequências contra ela mesma e relatando alinhamentos com uma similaridade mínima de 95%. A função foi aplicada com os parâmetros padrão, incluindo o *"tile size"* de 5 (otimizado para proteínas), tipo de dado "aminoácido", e a ação final de remover as sequências similares detectadas. Um arquivo de texto foi gerado listando as sequências removidas. Um fluxograma de filtragem da lista de proteínas é apresentado na Figura 11.



Figura 11 - Fluxograma processamento da lista de proteínas. PTN - proteínas

4.9. Análise Funcional

As análises funcionais das sequências foram realizadas utilizando o software OmicsBox (Figura 11). Primeiro, o BLASTp foi realizado utilizando como banco de dados o arquivo FASTA de Triatomíneos extraído do UniProtKB (58.381 entradas), seguindo o protocolo de formatação de banco de dados personalizado a partir de um arquivo FASTA (<u>https://www.biobam.com/format-fasta-file-blast/</u>) (Anexo 1). O arquivo resultante foi um arquivo .xlm (-outfmt5), que pôde ser carregado diretamente no OmicsBox.



Figura 12 – Workflow OmicsBox. Etapas empregadas no módulo "Análise Funcional". Adaptado de (OMICSBOX, 2019)

Em seguida, as proteínas foram submetidas a análises funcionais por meio do InterProScan, serviço público do EMBL-EBI, para identificação de domínios, famílias, motivos e sítios importantes nas proteínas, integrando as informações de diversas bases de dados para prever a função das sequências analisadas (BLUM et al., 2021).

A etapa seguinte consistiu no processo de mapeamento e anotação utilizando termos *Gene Ontology (GO)*. Utilizando a ferramenta computacional Blast2GO integrada ao software OmicsBox, as sequências polipeptídicas das proteínas identificadas foram analisadas em relação aos processos biológicos, componentes celulares e função molecular, através das etapas de mapeamento (*GO Mapping*) que recupera termos GO associados aos *hits* obtidos pela busca BLAST, e a etapa de anotação (*GO Annotation*), que seleciona os termos GO obtidos no mapeamento e atribui às sequências de consulta.

Após a busca dos termos de *Gene Ontology,* a funcionalidade "*Merge GO Terms*" foi utilizada completando o processo de integração com os termos obtidos através da busca InterProScan. Em seguida, os termos GO associados a cada sequência foram utilizados para criar gráficos de pizza. Em cada termo GO foram indicados o número de proteínas correspondentes e a porcentagem relativa.

Outros softwares de análises de bioinformática, listados na Tabela 2, também foram utilizados para a predição de peptídeo sinal, localização subcelular, secreção por via clássica, não clássica e domínio transmembrana. Uma tabela foi construída usando Microsoft Excel® contendo os resultados obtidos com os softwares utilizados (Anexo 2).

Software	Predição	Referência	
SignalP	Peptídeo Sinal	(TEUFEL et al., 2022)	
_	Peptídeo Sinal, domínio		
Outcyte	transmembrana, intracelular,	(ZHAO et al., 2019)	
	Secreção Não Convencional		
	Topologia de proteínas	(HALL CREN at al. 2022)	
Беертмпий	transmembrana alfa e beta	(HALLGREN et al., 2022)	
DeepLoc	Localização subcelular de	(THUMULURI et al., 2022)	
	proteínas eucarióticas		

Tabela 2 - Softwares utilizados para a análise de bioinformática

O software SignalP 6.0 (TEUFEL et al., 2022) foi utilizado para prever as regiões de peptídeo sinal e identificar os sítios de clivagem, aplicando o parâmetro de organismo Eukarya e um limite de SP (Sec/SPI) maior que 0,5 (NIELSEN, 2017).

O OutCyte (http://www.outcyte.com/analyse/) é uma ferramenta projetada para prever proteínas que contêm peptídeos-sinal, domínios transmembrana, proteínas intracelulares ou aquelas secretadas de forma não convencional (UPS). O processo de predição do OutCyte envolve duas etapas: inicialmente, proteínas com sinais N-terminais são identificadas com precisão; em seguida, aquelas sem sinais Nterminais são classificadas como UPS ou proteínas intracelulares, baseando-se em características físico-químicas derivadas diretamente de suas sequências de aminoácidos (ZHAO *et al.*, 2019). Dessa forma, o programa foi utilizado para prever proteínas secretadas de forma não convencional (OutCyte-UPS), utilizando um limite de pontuação padrão de 0,5.

Para prever a localização das proteínas, dois softwares foram utilizados nas análises. O DeepLoc 2.0 é uma ferramenta mais abrangente que utiliza aprendizado

profundo para prever a localização subcelular de proteínas eucarióticas. O DeepLoc pode diferenciar entre 10 localizações distintas, como núcleo, citoplasma, extracelular, mitocôndria, membrana celular, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, entre outras. Além disso, o DeepLoc prevê a presença de sinais de classificação que influenciam a determinação das localizações celulares (THUMULURI *et al.*, 2022).

O DeepTMHMM foi empregado para a predição de hélices transmembrana nas proteínas, pois atualmente é o método mais completo e de melhor desempenho para a previsão da topologia de proteínas transmembrana alfa-helicoidais e betabarril. Além disso, o DeepTMHMM também pode prever a presença de um peptídeo sinal (HALLGREN *et al.*, 2022).

As ferramentas DeepTMHMM e DeepLoc foram utilizadas sem ajustes de parâmetros, pois não possuem parâmetros que alterem a sensibilidade ou especificidade das predições, apenas a forma de apresentação dos resultados.

A utilização de múltiplos programas se justifica pela sensibilidade variada entre os softwares na predição de peptídeo sinal e secreção. Como critério para inclusão no conjunto de proteínas "putativamente secretadas", consideraram-se apenas aquelas com predição de peptídeo sinal em pelo menos três softwares distintos. Em alguns casos, foi realizada uma revisão manual das sequências específicas para identificar proteínas com função na hematofagia já descrita na literatura, mas que poderiam não ter sido identificadas pelos programas devido à fragmentação das sequências ou ausência de um peptídeo sinal. Ao final dessas análises, foi possível identificar proteínas putativamente secretadas e proteínas constitutivas que não apresentaram sinalização e não possuem função descrita na saliva até o momento.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil eletroforético das proteínas do extrato salivar de Triatoma costalimai

Na extração salivar de *T. costalimai*, foram adquiridos quatro *pools* de saliva, correspondentes a cada réplica biológica (R1 a R4). As amostras foram quantificadas utilizando o Qubit, apresentando concentrações proteicas totais de 34,39 µg/µl em R1, 38,76 µg/µl em R2 e R4, e 43,13 µg/µL em R3. O perfil eletroforético unidimensional das proteínas salivares demonstra que as amostras apresentavam padrões consistentes entre as réplicas, com bandas proteícas semelhantes e maior intensidade observada na faixa de peso molecular entre 50 e 20 kDa (Figura 12).



Figura 13 – Perfil eletroforético unidimensional das proteínas do extrato salivar do *Triatoma costalimai* demonstra que as amostras apresentavam padrões consistentes entre as réplicas biológicas, SDS-PAGE 12%. 10μg de proteínas foram aplicados por poço. Ptn ladder: marcador de peso molecular Bench Mark Pre-Stained Protein Ladder. R1, R2, R3 e R4: réplicas biológicas.

5.2. Análise proteômica do extrato salivar de Triatoma costalimai

Na réplica biológica 1 (R1), foram identificadas 887 proteínas, que geraram 13.894 *Peptide-Spectrum Matches* (PSMs), número de vezes que um peptídeo da amostra corresponde a um espectro na base de dados utilizada. Essas proteínas foram agrupadas em 419 grupos de proteínas. Na réplica biológica 2 (R2), foram identificadas 854 proteínas, gerando 14.318 PSMs, agrupadas em 416 grupos de proteínas. Na réplica biológica 3 (R3), foram identificadas 858 proteínas, com 15.589 PSMs, agrupadas em 403 grupos de proteínas. Finalmente, na réplica biológica 4 (R4), foram identificadas 622 proteínas, gerando 11.446 PSMs, que foram agrupadas em 308 grupos de proteínas (Tabela 3).

Réplica	Proteínas	Grupos de proteínas*	PSMs**
R1	887	419	13.894
R2	854	416	14.318
R3	858	403	15.589
R4	622	308	11.446
Total	3.221	1.546	55.247

Tabela 3 - Total de identificações de proteínas na saliva de Triatoma costalimai.

* proteínas que compartilham peptídeos semelhantes ou idênticos foram agrupadas em grupos de proteínas; **Peptide-Spectrum Matches.

De modo geral, um total de 3.221 proteínas foram identificadas. Após a filtragem com base no código de acesso das proteínas, um total de 1.725 proteínas duplicadas foram removidas, restando 1.486 proteínas identificadas, uma diferença de apenas 60 em relação aos grupos de proteínas identificados. Utilizando a funcionalidade *"Find duplicates Sequences"* do OmicsBox, 212 sequências duplicadas foram removidas, totalizando uma lista de 1.486 proteínas. Em seguida, a funcionalidade *"Find Similar Sequeces"* foi utilizada, removendo 433 pares de sequência resultando em 841 proteínas distintas (Figura 11).

5.3. Análises in silico das proteínas identificadas

As sequências das 841 proteínas identificadas foram processadas pelo InterProScan e apresentaram resultados no BLAST. Das 841 sequências, 803 foram mapeadas (GO Mapping) com termos de *Gene Ontology* (GO), enquanto 801 foram anotadas (GO Annotation), refletindo que a maioria das sequências mapeadas também receberam atribuições específicas de função molecular, processos biológicos e componentes celulares (Figura 14).



Figura 14 - Progresso da análise das sequências submetidas ao OmicBox, com as funcionalidades BLASTp, InterProScan e *Gene Ontology*.

O comprimento médio das sequências das proteínas salivares de *T. costalimai* identificadas foi de 330 resíduos, que equivalem a um peso médio aproximado de 36 kDA. É possível observar um pico mais intenso entre 100 e 300 resíduos, indicando que as sequências correspondem a pesos moleculares variando aproximadamente entre 11 kDa e 33 kDa. Além disso, observou-se picos menores entre 300 e 600 aminoácidos, que equivalem a pesos moleculares entre 33 kDa e 66 kDa. Como mencionado anteriormente, a eletroforese em gel (Figura 12) revelou bandas mais fortes na faixa de 20 a 50 kDa. Isso sugere uma correlação com os picos identificados, indicando que a maioria das proteínas detectadas tanto no gel, quanto na análise por espectrometria de massas, se encontram dentro de faixas de comprimento observadas no gráfico (Figura 15).





Figura 15 - Distribuição do Comprimento das Sequências. Gráfico de área mostrando o número de sequências para cada comprimento (em aminoácidos). Comprimento médio (Avg).

5.3.1. Predição de peptídeo sinal nas sequências identificadas

Das 841 sequências identificadas, 168 (20%) foram preditas apresentaram peptídeo sinal segundo o software SignalP, sugerindo secreção pela via clássica, enquanto 673 sequências (80%) não apresentaram peptídeo sinal, indicando que podem ser secretadas por outra via ou permanecer em compartimentos intracelulares.

5.3.2. Predição de secreção por via não clássica

O programa Outcyte, utilizado para prever proteínas secretadas pela via não clássica, identificou que 166 proteínas (19,7%) apresentavam peptídeo sinal, enquanto 326 proteínas foram classificadas como secretadas de maneira não convencional (38,7%). Além disso, 37 (4,4%) proteínas continham domínios transmembrana. Por fim, as 312 proteínas restantes (37%), foram identificadas como intracelulares (Figura 16).



Figura 16 - Representação da distribuição do proteoma do extrato salivar de *Triatoma costalimai* após análise no programa Outcyte. Transmembrana: proteínas transmembranares; UPS: secreção não convencional; Intracelular: proteínas preditas intracelulares. Os números entre parênteses indicam a porcentagem em cada categoria

5.3.3. Predição de localização subcelular e sinais de classificação

O DeepLoc foi utilizado para prever a localização subcelular e os sinais de classificação que influenciaram a predição das localizações. Entre as proteínas analisadas, 208 (24,7%) sequências apresentaram peptídeo sinal. Das 841 proteínas analisadas, 816 foram categorizadas em 10 principais localizações subcelulares (Figura 17). As localizações mais frequentes incluíram citoplasma (330 proteínas), extracelular (188 proteínas), citoplasma e núcleo (133 proteínas), mitocôndria (56 proteínas), retículo endoplasmático (48 proteínas), núcleo (31 proteínas), citoplasma e membrana celular (9 proteínas), citoplasma e mitocôndria (9 proteínas), membrana celular (7 proteínas), e citoplasma e Golgi (5 proteínas). Proteínas com menos de cinco predições em determinadas localizações não foram destacadas. Como o foco principal deste trabalho está nas proteínas putativamente secretadas e relacionadas à hematofagia, a discussão prioriza as proteínas extracelulares com provável função na saliva.



Figura 17 - Localização das proteínas preditas numa variedade de componentes subcelulares no DeepLoc.

5.3.4. Predição de domínios transmembrânicos

O DeepTMHMM foi utilizado para a predição da topologia de proteínas transmembrana alfa-helicoidais e beta-barril, além de prever a presença de peptídeo sinal. A análise das 841 sequências submetidas revelou que 25 proteínas apresentaram topologia de membrana (TM). Entre essas, três proteínas foram classificadas com tanto topologia de membrana quanto peptídeo sinal (SP+TM), sendo elas A0A023F8B1, A0A023FAM5 e A0A224XLY2. No total, 180 proteínas foram identificadas com peptídeo sinal (SP), enquanto 635 foram classificadas como globulares (GLOB). Uma única sequência (A0A224XZX2) foi predita com topologia beta-barril.

5.4. Visão geral do sialoproteoma de Triatoma costalimai

Com base na preparação de amostra do extrato salivar de *Triatoma costalimai* e na quantificação, os conjuntos de dados adquiridos foram altamente reprodutíveis nas replicatas técnicas e biológicas (Figura 18). Os dados revelaram tanto proteínas detectadas em múltiplas réplicas biológicas quanto proteínas presentes em apenas uma réplica biológica. Do total, 475 proteínas foram comuns a pelo menos duas réplicas, constituindo um subconjunto de proteínas identificadas em 2, 3 ou 4 réplicas biológicas. Quanto às proteínas identificadas em apenas uma das réplicas biológicas, a distribuição ficou a seguinte: 96 proteínas exclusivas da réplica 1 (R1), 128 da réplica 2 (R2), 86 da réplica 3 (R3) e 56 da réplica 4 (R4) (Figura 18 e Tabela 4).



Figura 18 - Diagrama de Venn mostrando a interseção das 841 proteínas distintas identificadas. As áreas de sobreposição destacam as sequências identificadas em duas, três e quatro réplicas (475 sequências). As demais áreas mostram sequências de proteínas identificadas em apenas uma réplica: R1 – 96 ; R2 – 128; R3 – 86 e R4 – 56

 Tabela 4 - Quantidade de proteínas identificadas, exclusivas em apenas uma das réplicas biológicas e categorização dessas últimas em secretadas ou constitutivas

Réplicas	Proteínas	Proteínas exclusivas		
	identificadas	Total	Secretadas	Constitutivas
R1	478	96	19	77
R2	475	128	34	94
R3	444	86	11	75
R4	372	56	7	49
Total	-	366	71	295

As 841 proteínas identificadas foram classificadas em dois grandes grupos principais: putativamente secretadas ou constitutivas (Anexo 2). As proteínas salivares putativamente secretadas de *T. costalimai* foram categorizadas em 12 grupos (Tabela 5). Considerando apenas as 212 proteínas secretadas, a maioria das proteínas identificadas eram pertencentes à família das calicinas (36,32%), seguidas por enzimas (21,23%), relacionadas à imunidade (6,13%), proteases (6,60%), inibidores de proteases (2,36%), proteínas de ligação ao odorante (4,25%), e outras proteínas secretadas (24,11%). Em relação as proteínas constitutivas, foram agrupadas de acordo com o processo biológico relacionado, utilizando termos gerais para agrupar de forma mais didática. Como resultado, as 611 proteínas constitutivas foram agrupadas em 20 grupos, os cinco grupos mais representativos considerando apenas as 611 proteínas constitutivas, foram maquinaria de síntese proteica (18,49%), seguido por modificação de proteínas (16,53%), metabolismo energético (7.52%), detoxificação e antioxidantes (7.36%) e processo metabólico de proteínas (6.38%). Além disso, 18 sequências (2.84% entre as 841 proteínas identificadas) foram consideradas desconhecidas, não sendo incluídas em nenhum grupo.

Classificação	Nº de Proteínas	Total de Espectros
Calicinas		
Palidipina	7	806
Triatina	6	1465
Triabina	4	201
Outras Lipocalinas	60	17016
Total	77	19488
Inibidores de proteases		
Tipo Kazal	2	258
Pacifastina	1	83
Serpina	1	192
Tipo Kunitz	1	7
Total	5	540
Proteases		
Serina	8	2424
Cisteíno	3	30
Aspártico	1	12
Metalo	2	674
Total	14	3140
Relacionadas à imunidade		
Trialisina	5	3725

Tabela 5 - Famílias de proteínas salivares de Triatoma costalimai identificadas no sialoproteoma.

MYS/Hemolisina	5	717
Peptídeos antimicrobianos (AMPs)	3	249
Total	13	4691
Antígeno-5/CAP	2	115
Proteínas de ligação ao odorante	9	235
Enzimas		
Inositol 5-fosfatase	8	1857
Apirase	6	5490
Carboxilesterase	3	135
Proteína dissulfeto isomerase	7	799
ucleases	3	155
Ferritina	2	21
Transferrina	1	68
Outras enzimas	15	507
Total	45	9032
Receptor de baixa densidade lipoproteico	2	145
Vitelogenina/Apolipoforina	7	903
Saposina	3	200
Proteína de choque térmico (heat shock	3	310
protein)		
Calreticulina	3	833
Outras proteínas secretadas	29	561
Total Secretadas	212	40193
Proteínas constitutivas		
Atividade enzimática	16	827
Detoxificação e antioxidantes	45	2613
Divisão e organização celular	6	71
Ligação a ácidos nucleicos	36	2755
Maquinaria de síntese proteica	113	9353
Maquinaria de tradução	7	345
Maquinaria de transcrição	10	517
Matriz extracelular	2	31
Metabolismo de aminoácido	23	2138
Metabolismo de carboidratos	23	1002
Metabolismo de lipídios	34	3560
Metabolismo energético	46	2808
Modificação de proteína	101	8084
Processo metabólico de proteínas	39	1883
Proteína de exportação	2	168

Proteína citoesqueléticas	35	4814
Proteínas de ligação a RNA mensageiro	9	210
Sinalização	25	4516
Transportadores e canais	36	2351
Transporte de lipídios	3	78
Total Constitutivas	611	47934
Desconhecidas	18	638
Total	841	88765

5.5. Análise funcional das proteínas com base no Gene Ontology

A caracterização funcional foi realizada com a metodologia Blast2GO, integrada ao OmicsBox, utilizando as categorias de componente celular, processo biológico e função molecular. Vale destacar que, embora algumas proteínas apareçam em apenas uma réplica e com menor abundância, isso não diminui sua relevância, já que a abordagem adotada priorizou a inclusão de todas as proteínas, independentemente da quantidade de réplicas em que foram identificadas. Todas as proteínas identificadas foram, então, analisadas e agrupadas com base nas características atribuídas pelo *Gene Ontology* (GO).

As sequências obtidas apresentaram múltiplas classificações pelo GO. De forma geral, foram encontrados 42 termos relacionados a processos biológicos, 26 termos para funções moleculares e 20 termos para componente celular de acordo com o mapeamento realizado no OmicsBox. As ontologias mais expressivas estão diretamente relacionadas a processos intracelulares uma vez que as proteínas constitutivas representavam a maior parte do conjunto de proteínas identificadas.

A Figura 19 mostra os resultados da anotação para cada catálogo do GO. No total, foram identificados 12 processos biológicos diferentes (Figura 19, A), sendo o termo mais representado tradução (GO:0006412), anotado para 127 sequências (12,04%). Em contrapartida, o termo com menor número de anotações foi resposta ao estresse (GO:0006950), com 70 sequências (6,64%). Quanto às funções moleculares (Figura 19, B), foram anotadas 11 categorias diferentes. A atividade mais prevalente foi atividade de hidrolase (GO:0016787), com 159 sequências (14,38%), seguida por Ligação de proteína (GO:0005515), com 129 sequências (11,66%), e constituinte estrutural do ribossomo (GO:0003735), com 114 sequências (10,31%). No que se

refere aos componentes celulares (Figura 19, C), 7 categorias foram identificadas, sendo a mais frequente membrana (GO:0016020), com 157 sequências (20,13%), seguida por núcleo (GO:0005634), com 133 sequências (17,05%), e região extracelular (GO:0005576), com 118 sequências (15,13%). A categoria com o menor número de anotações foi sistema endomembranar (GO:0012505), com 86 sequências (11,03%).



- 12.04% Translation (GO:0006412)
- 11.18% Catabolic process (GO:0009056)
- 9.76% Nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0006139)
- 8.53% Cellular component organization (GO:0016043)
- **8.15%** Transport (GO:0006810)
- 8.15% Regulation of cellular process (GO:0050794)
- **7**.30% Carboxylic acid metabolic process (GO:0019752)
- 7.30% Symbiont-mediated perturbation of host defenses (GO:0030682)
- 7.20% Proteolysis (GO:0006508)
- 6.92% Phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)
- 6.82% Cellular response to stimulus (GO:0051716)
- 6.64% Response to stress (GO:0006950)





Figura 19 - Proteínas salivares de *T. costalimai.* Gráfico multinível gerado pelo OmicsBox. Em (A) distribuição dos GOs de Processo Biológico; (B) a distribuição de sequências dos GOs de Função Molecular e (C) os GOs de Componentes Celulares anotados para as proteínas salivares de *T. costalimai* utilizando o OmicsBox. Algumas proteínas obtiveram mais de uma classificação.

5.5.1. Caracterização proteínas secretadas

Considerando que o objetivo central é a identificação de proteínas com funções potenciais na saliva, o que direciona o foco para aquelas que provavelmente são secretadas, a análise de termos do GO foi conduzida de maneira separada para a lista de proteínas putativamente secretadas. Ao analisar as proteínas putativamente secretadas, foram anotados 35 termos relacionados a processos biológicos, 21 termos para funções moleculares e 13 termos para componentes celulares. Um gráfico de pizza foi gerado para ilustrar a distribuição de termos mais específicos da classificação (Figura 20).

O termo perturbação das defesas do hospedeiro mediada por simbiontes (GO:0030682) foi anotado para 77 sequências representando 29,39% das proteínas classificadas em processos biológicos, as quais correspondem às lipocalinas identificadas. Ainda em Processo Biológico, a segunda categoria mais anotada foi Resposta ao Estresse (*Response to stress* - GO:0006950), representando 34 sequências (12,98%), seguida por Transporte (*Transport* - GO:0006810), com 21 sequências (8,02%). O termo com o menor número de sequências anotadas foi Dobramento de Proteínas (*Protein folding* - GO:0006457), com 17 sequências (6,49%), abrangendo proteínas como as *heat shock proteins* 70 (HSP70).

Para Função Molecular, as classes mais representativas foram ligação a íon metálico (*metal ion binding* - GO:0046872), com 21%, que inclui principalmente as proteínas classificadas como metaloproteases, seguida por atividade de fosfatase (*phosphatase activity* - GO:0016791), com 15%, composta majoritariamente por inositol 5-fosfatases e apirases. A atividade de serino hidrolase (*serine hydrolase activity* - GO:0017171), predominantemente composta por tripsinas, e ligação a nucleotídeo (*nucleotide binding* - GO:000166) foram as classificações com menor representação, com 9%.

Em Componente Celular, 70,51% das sequências foram associadas à região extracelular (*extracellular region* - GO:0005576), 15,38% ao retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum* GO:0005783), seguidas pela membrana plasmática (*plasma membrane* - GO:0005886). Nesse sentido, a análise incluiu proteínas com potencial de secreção que, inicialmente, podem estar associadas a outras localizações subcelulares. Embora se esperasse que todas estivessem no meio extracelular,

identificaram-se proteínas no retículo endoplasmático (GO:0005783), como chaperonas de choque térmico (HSPs) e várias enzimas, que estão envolvidas em processos de dobramento e transporte proteico, frequentemente associados à via secretora. Já na membrana plasmática (GO:0005886), que delimita o espaço celular e medeia as interações entre a célula e o ambiente externo, foram encontradas proteínas que podem participar de processos de sinalização e de transporte, auxiliando na modulação da interação do triatomíneo com o hospedeiro.



Figura 20 - Proteínas salivares secretadas de *T. costalimai*. Gráfico multinível gerado pelo OmicsBox. Em (A) Processo Biológico; (B) Função Molecular e (C) Componentes Celulares.

6. DISCUSSÃO

Os triatomíneos desenvolveram adaptações ao longo da evolução que facilitam a alimentação através da pele de hospedeiros vertebrados (ARCÀ; RIBEIRO, 2018). A saliva dos triatomíneos é rica em moléculas bioativas que interferem na hemostasia, inflamação e imunidade do hospedeiro, facilitando o repasto sanguíneo (DE ARAÚJO et al., 2012; SANTIAGO *et al.*, 2020a). A análise proteômica da saliva de *T. costalimai* neste estudo resultou na identificação de 841 proteínas, das quais 475 foram detectadas em mais de uma réplica biológica. As proteínas encontradas nesse estudo foram classificadas entre proteínas putativamente secretadas (25,2%), e proteínas constitutivas (74,8%).

Os resultados mostraram uma predominância de proteínas mais associadas a funções celulares, como síntese e regulação proteica, processamento de DNA/RNA e estrutura citoesquelética, sugerindo que a técnica utilizada pode ter captado proteínas do tecido glandular, em vez de apenas proteínas salivares, conforme relatado em estudos anteriores (SANTIAGO *et al.*, 2018).

Entre as 212 proteínas classificadas como putativamente secretadas, 184 apresentaram predição de peptídeo sinal em três ou quatro dos softwares utilizados. No entanto, algumas sequências que foram descritas na literatura como secretadas e associadas à hematofagia não apresentaram essa predição. Dentre elas, 23 sequências foram identificadas como fragmentos, o que sugere que as sequências correspondentes ao peptídeo sinal poderia estar ausentes. Dessa forma, essas sequências foram revisadas manualmente e, com base em evidências da literatura, classificadas como putativamente secretadas.

A categoria de proteínas putativamente secretadas foi dividida em diferentes subcategorias de acordo com sua função. A superfamília das calicinas foi a mais abundante. As identificações restantes estão distribuídas em outras categorias, destacando proteínas relacionadas à imunidade, como trialisina, MYS/hemolisina, inibidores de proteases e proteases, ligação ao odorante e enzimas, como inositol monofosfato e apirases salivares. Algumas das famílias dessas proteínas já possuem função atribuída e estão relacionadas ao processo de hematofagia, as quais serão discutidas a seguir.

6.1. Proteínas secretadas

6.1.1. Lipocalinas

As lipocalinas formam uma família diversificada de proteínas, presentes em organismos como animais, plantas e bactérias (AKERSTROM; FLOWER; SALIER, 2000). As lipocalinas fazem parte da superfamília das calicinas, composta por proteínas que compartilham uma estrutura tridimensional conservada. Essa estrutura é formada por um barril β antiparalelo, composto por oito fitas que se conectam por meio de pontes de hidrogênio (SANTOS et al., 2022). A conformação do barril β é estabilizada por uma a três pontes dissulfeto, e sua principal função bioquímica é a interação e transporte de moléculas hidrofóbicas (GRZYB; LATOWSKI; STRZAŁKA, 2006). As cavidades internas desse barril, revestidas por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, variam em forma, profundidade e carga, o que confere uma grande diversidade estrutural e funcional às lipocalinas (FLOWER, 1996, 2000). Essa variação estrutural é uma característica evolutiva relevante observada no grupo, permitindo que as lipocalinas se liguem a diferentes ligantes, como pequenas moléculas lipofílicas, receptores celulares ou outras proteínas, desempenhando papéis essenciais na modulação de diversos processos biológicos (HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016; SANTOS et al., 2022)

As lipocalinas estão presentes na saliva de diversos artrópodes hematófagos, incluindo carrapatos e triatomíneos. Os triatomíneos, ao longo do processo evolutivo, desenvolveram lipocalinas salivares com funções anti-hemostáticas, incluindo vasodilatação, antiagregação plaquetária e anticoagulação sanguínea *(SANTOS et al.,* 2022). Elas foram identificadas em todos os sialotranscriptomas de Triatominae analisados, sendo a superfamília mais abundante e diversificada na saliva desses insetos (SANTIAGO *et al.,* 2020b). Dentre as espécies do gênero *Triatoma* foi descrita em *T. pallidipennis* (FUENTES-PRIOR *et al.,* 1997; HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016), *T. infestans* (ASSUMPÇÃO *et al.,* 2008; CHARNEAU et al., 2007), *T. rubida* (RIBEIRO *et al.,* 2012), *T. dimidiata* (SANTIAGO *et al.,* 2018), *T. matogrossensis* (ASSUMPÇÃO *et al.,* 2012) e *T. sordida (PRAÇA et al.,* 2022). Além disso foram identificadas no gênero *Rhodnius,* incluindo *R. neglectus* (SANTIAGO *et al.,* 2016), *R. prolixus* (RIBEIRO et al., 2004), *R. brethesi* e *R. robustus*

(COSTA et al., 2011), bem como em outras espécies, como *D. maxima* (ASSUMPÇÃO et al., 2011) e *P. megistus* (RIBEIRO; SCHWARZ; FRANCISCHETTI, 2015).

Na análise da saliva do *Triatoma costalimai*, a família das lipocalinas também foi a mais representativa dentre a classe secretada, foram identificadas 77 sequências de proteínas pertencentes à superfamília das calicinas, incluindo pallidipina, triatina, triabina e outras lipocalinas salivares.

Entre as sequências foram identificadas, 7 sequências classificadas como pallidipinas (A6YPP8, Q0MTE0, E2J705, E2J754, A0A023FAR2, E2J713, A0A023FB19) e 4 identificadas como triabinas (E2J767, A0A224XWZ3, A0A023F713 e A0A069DQK3). Identificada em *Triatoma pallidipennis*, a triabina é uma molécula anticoagulante que atua inibindo a ativação da trombina (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1995). Por sua vez, a pallidipina, também presente na mesma espécie, tem como função inibir especificamente a agregação plaquetária induzida pelo colágeno (HAENDLER et al., 1996).

A interrupção da continuidade endotelial resulta na exposição das fibras de colágeno e de outras proteínas da matriz subendotelial, o que induz a agregação plaquetária (NEUBAUER; ZIEGER, 2022). As plaquetas circulantes aderem rapidamente a essas estruturas, dando início ao processo hemostático (FERREIRA et al., 2010). A pallidipina inibe especificamente a agregação induzida pelo colágeno, bloqueando a interação entre plaquetas e colágeno (SANTIAGO et al., 2020b). A dipetalodipina de *D. maxima* apresenta uma forte similaridade com a pallidipina, sugerindo que possui propriedades anti-hemostáticas multifuncionais, como a redução da agregação plaquetária e da vasoconstrição, além de inibir a angiogênese (SANTIAGO et al., 2018). Entretanto, a dipetalodipina inibe especificamente a agregação plaquetária desencadeada pelo TXA₂ (ASSUMPÇÃO et al., 2010).

A trombina é uma protease crucial na cascata de coagulação sanguínea, responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, que forma a estrutura sólida do coágulo (GREEN, 2006). Nesse contexto, a triabina, uma proteína isolada da saliva do triatomíneo *Triatoma pallidipennis*, atua como um potente e seletivo inibidor da trombina (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1995). A triabina interage com a trombina especificamente em seu sítio de reconhecimento do fibrinogênio, formando um complexo não covalente com a trombina em proporção 1:1, inibindo assim a agregação plaquetária induzida por essa enzima e prolongando o tempo de

71

coagulação (FUENTES-PRIOR et al., 1997; HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016). Embora as triabinas compartilhem algumas características estruturais com as lipocalinas e pertençam à mesma superfamília calicina/lipocalina, elas diferem na disposição das fitas β em sua conformação geral (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1995; SANTIAGO et al., 2020b).

Seis sequências identificadas neste estudo foram classificadas como triatinas (E2J720, Q45KX3, E2J714, A0A0V0G2V8, A0A023FAX3, A0A023FD07). A triatina foi originalmente descrita nas glândulas salivares de *Triatoma infestans* (KATOA et al., 2010), e estudos sugerem que ela atua como um inibidor da trombina (ASSUMPÇÃO et al., 2011). No estudo de Bussacos *et al.* 2011, foram encontradas sequências correspondentes à triatina nas glândulas salivares de *P. megistus*, e os autores propuseram que essas proteínas poderiam estar envolvidas na formação de poros (BUSSACOS et al., 2011). Embora essa lipocalina tenha sido encontrada em diversos sialotranscriptomas de triatomíneos, sua função molecular exata ainda permanece desconhecida, indicando a necessidade de estudos mais detalhados sobre sua função na hematofagia (PRAÇA et al., 2022).

Durante a alimentação, aminas biogênicas, como serotonina e norepinefrina, são liberadas por plaquetas, mastócitos e outros componentes do sistema imune em resposta à lesão tecidual (VAN NUETEN; JANSSENS; VANHOUTTE, 1985). Esses mediadores desempenham um papel na resposta inflamatória, induzindo vasoconstrição e agregação plaquetária, o que pode dificultar a alimentação contínua de insetos hematófagos (DE ARAÚJO et al., 2012). As proteínas de ligação a aminas biogênicas (ABPs) encontradas na saliva de triatomíneos atuam como vasodilatador ou anti-agregador plaqueário, se ligando à serotonina, norepinefrina e histamina, impedindo que essas moléculas se liguem aos seus receptores no hospedeiro (ANDERSEN et al., 2003; MANS; RIBEIRO; ANDERSEN, 2008). No presente estudo, sequências (E2J733 Rhodnius biogenic aminebinding-like protein duas е A0A171AWI7 Biogenic amine-binding protein) foram identificadas como ABP. Essas moléculas também foram descritas na saliva de mosquitos, onde estão envolvidas no retardo da resposta imune do hospedeiro (CALVO et al., 2006; MANS et al., 2007), e em gêneros de carrapatos moles (Ornithodoros) e duros (Ixodes) (MANS; RIBEIRO; ANDERSEN, 2008).

72
Estudos anteriores sobre outras espécies de triatomíneos sugerem, por meio de análises sialotranscriptômicas e filogenéticas, que as lipocalinas evoluíram a partir de duplicações e divergências gênicas, resultando em uma família multigênica abundante (SANTIAGO et al., 2020a). Essa hipótese foi recentemente reforçada na análise do sialoma de *Triatoma sordida* (PRAÇA et al., 2022). Um exemplo adicional que reforça essa ideia é a similaridade observada entre a triabina e as lipocalinas, o que sugere que a triabina pode ter evoluído de um ancestral comum das lipocalinas (HERNÁNDEZ-VARGAS; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ; CORZO, 2016)

Um estudo recente identificou 29 lipocalinas na saliva de *Rhodnius prolixus*, utilizando dados de transcriptoma e genoma. Várias dessas lipocalinas foram encontradas em diferentes tecidos, como intestino, sistema nervoso central (SNC) e órgãos reprodutivos, sugerindo funções além das conhecidas nas glândulas salivares. A nitroforina-2, por exemplo, foi detectada no SNC, indicando papéis adicionais além da inibição da agregação plaquetária (SANTOS et al., 2022).

O estudo também revisou a nomenclatura das lipocalinas, propondo que sejam classificadas pelo mecanismo molecular, e não pelo papel fisiológico (que pode variar conforme o local de expressão) ou por outras escolhas arbitrárias, como a espécie em que foram encontradas ou o nome do pesquisador. No entanto, a nomenclatura atual tem sido utilizada pela comunidade científica há mais de duas décadas, e mudanças poderiam gerar confusão. Ainda assim, o estudo apresentou evidências de que, proteínas classificadas como inibidores de agregação plaquetária (PAI-5) em *R. prolixus*, poderia ser uma triabina, assim como a procalina-1 e a procalina-2, para as quais não há estudos sobre suas funções na hematofagia (SANTOS et al., 2022).

Os dados deste estudo são consistentes com a literatura, que indica que as lipocalinas são proteínas presentes na saliva de triatomíneos hematófagos durante o repasto, exercendo funções essenciais para o sucesso desse processo. A expansão dessas proteínas nesses insetos reflete-se na sua abundância e na redundância de suas funções. Altas concentrações de lipocalinas são cruciais para neutralizar agentes que ativam a resposta hemostática do hospedeiro. A diversidade e variação na expressão das lipocalinas podem representar uma estratégia para evitar as defesas imune e hemostática do hospedeiro.

6.1.2. Enzimas

A análise do proteoma de *T. costalimai* revelou uma variedade de enzimas na classe das proteínas secretadas. Entre os grupos mais representativos, foram identificadas 14 proteases, 8 inositol fosfato fosfatases (INP5), 7 proteínas dissulfeto isomerases (PDI) e 6 apirases salivares. Além disso, outras enzimas secretadas foram encontradas, incluindo carboxilesterases, nucleases, ferritina, transferrina, entre outras, associadas a processos como metabolismo de carboidratos e detoxificação.

6.1.2.1. Proteases

Proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas em proteínas. Elas podem ser classificadas em endopeptidases, que atuam em ligações internas, e exopeptidases, que clivam ligações nas extremidades N ou C de cadeias polipeptídicas (BARRETT, 2001; SANTIAGO et al., 2017). As proteases são agrupadas com base na estrutura de seus sítios ativos, e podem ser organizadas em nove famílias principais: aspártica, cisteína, glutâmico, metalo, serino, asparagina liase, misto, treonina e função desconhecida (RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2015).

Em artrópodes hematófagos, a descrição dos sialomas revelou que diversas proteases são sintetizadas nas glândulas salivares, como por exemplo a identificação de sequências de metaloprotease e serino protease nas glândulas de triatomíneos (BUSSACOS et al., 2011; DE ARAÚJO et al., 2012), mosquitos (CAO; GULATI; JIANG, 2017) e carrapatos (BHOWMICK; HAN, 2020). Os avanços nas técnicas transcriptômicas permitiu identificar sequências codificadoras de proteases nas glândulas salivares de artrópodes hematófagos (SANTIAGO et al., 2020b). No entanto, a presença dessas sequências não garante a expressão das proteínas. Nesse sentido, a análise proteômica desempenha um papel fundamental ajudando a confirmar quais proteínas são realmente expressas.

Em triatomíneos, estudos sugerem uma baixa atividade proteolítica na saliva, e a função dessas enzimas ainda não foi totalmente elucidada (SANTIAGO et al., 2017). No contexto da alimentação sanguínea, as proteases desempenham um papel essencial na digestão das proteínas do sangue, permitindo que os nutrientes sejam liberados e usados para processos vitais, como desenvolvimento e reprodução (REYNOSO-DUCOING et al., 2023). Como o sangue contém cerca de 95% de proteínas, principalmente albumina e hemoglobina, essas enzimas são fundamentais na digestão para quebrar essas proteínas. Durante o processo de digestão, essas proteases atuam de forma coordenada para degradar a hemoglobina (GUMIEL et al., 2020). Em mosquitos, predominam as serino proteases (CAO; GULATI; JIANG, 2017), enquanto em carrapatos e triatomíneos, são usadas principalmente proteases de cisteína e aspárticas (BHOWMICK; HAN, 2020; DE ARAÚJO et al., 2023).

Com base nos resultados obtidos, foram identificadas proteases do tipo serino e metaloproteases no proteoma das glândulas salivares de *T. costalimai*. Sequências de metaloproteases e serino proteases foram divulgadas nas glândulas salivares de triatomíneos (SANTIAGO et al., 2016), e carrapatos (DECREM et al., 2008).

Embora algumas proteases cisteína (A0A171AH64, A0A161MSP6, A0A171A467) e aspárticas (A0A170ZM10) tenham sido identificadas e atendido aos critérios de predição de sinal e localização extracelular, é provável que sua presença esteja relacionada a uma possível contaminação do intestino durante a preparação das amostras. O fato de terem aparecido em poucas réplicas reforça essa interpretação, sugerindo que essas proteínas podem não ter uma função direta na saliva dos triatomíneos. Assim sua função parece estar mais associada ao ambiente digestivo do intestino médio do que a uma atividade hemostática ou imunológica na saliva.

6.1.2.1.1. Serino protease

Entre as enzimas detectadas no proteoma das glândulas salivares de *T. costalimai*, várias proteases do tipo serino foram encontradas. As serino proteases são uma classe de enzimas amplamente distribuídas entre vertebrados e invertebrados, e utilizam o resíduo de serina em seu sítio catalítico para hidrolisar ligações peptídicas (BARRETT, 2001; RAO et al., 1998). Entre as mais conhecidas, a tripsina atua na clivagem de proteínas após aminoácidos básicos, como arginina e lisina, e desempenha um papel no processo digestivo (PATEL, 2017)

Proteases do tipo tripsina presentes na saliva de hemípteros hematófagos têm sido sugeridas como desempenhando funções especializadas, processando substratos específicos e atuando de maneira distinta das tripsinas digestivas convencionais (DE ARAÚJO et al., 2023). Essas enzimas parecem ter evoluído para neutralizar mecanismos hemostáticos do hospedeiro, contribuindo para o sucesso da alimentação sanguínea como uma adaptação evolutiva (OLIVEIRA et al., 2021).

Uma protease do tipo serino, semelhante à tripsina, chamada triapsina, foi descrita nas glândulas salivares de *T. infestans* (AMINO; TANAKA; SCHENKMAN, 2001). A triapsina é a serino protease mais bem caracterizada em triatomíneos, sendo expressa como um precursor inativo no par D2 das glândulas salivares, que é ativado durante a alimentação (SANTIAGO et al., 2017). No estudo de Oliveira *et al* 2021., foi demonstrado que a triapsina de *T. infestans*, atua como vasodilatador ao ativar o receptor PAR-2. Essa pesquisa marcou a primeira evidência de que uma protease salivar de um hematófago atua como um vasodilator. A triapsina apresentou preferência pela clivagem do peptídeo PAR-2, e análises por espectrometria de massa identificaram um único sítio de clivagem correspondente ao local de ativação do receptor. Além disso, também demonstraram que a triapsina induz a liberação de óxido nítrico (NO) (DE ARAÚJO et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2021).

Apesar de ser liberada durante a alimentação, é improvável que a triapsina participe diretamente da digestão, visto que nos Hemiptera, como *T. infestans*, a digestão de proteínas sanguíneas ocorre no intestino médio, onde predominam as proteases de cisteína e aspárticas (DE ARAÚJO et al., 2023; SANTIAGO et al., 2017). O papel da triapsina parece estar mais relacionado à modulação das respostas fisiológicas do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2021).

As proteases do tipo tripsina foram identificadas em outras espécies de triatomíneos, como *R. neglectus*, *T. infestans*, *T. dimidiata*, *P. megistus* (SANTIAGO et al., 2020b), *T. sordida* (PRAÇA et al., 2022) conforme revelado por estudos proteômicos. No contexto dos resultados obtidos neste estudo, a tripsina foi uma das serino proteases identificadas na análise proteômica das glândulas salivares do *T. costalimai*, e foi observada em múltiplas réplicas, sugerindo sua relevância nesse contexto. A presença dessa protease reforça a hipótese de que ela pode estar envolvida em processos relacionados à evasão da resposta hemostática do hospedeiro.

Outras serino proteases que foram identificadas pela análise proteômica, foram as duas identificações de proteases semelhantes a subtilisina, A0A023F185 e A0A0V0G395, em que a primeira foi identificada em três réplicas biológicas. As

subtilisinas são serina endopeptidases da família S8, que atuam na proteólise ao degradar precursores de proteínas *in vivo*. Amplamente distribuídas em diferentes organismos, essas enzimas têm um espectro diversificado de funções biológicas (FIGUEIREDO; SILVA; FIGUEIREDO, 2017). Elas clivam polipeptídeos em locais específicos, ativando moléculas como hormônios, receptores e toxinas bacterianas (GENSBERG; JAN; MATTHEWS, 1998). Em plantas, participam de processos de desenvolvimento e resposta imune, enquanto em insetos, como *Drosophila melanogaster*, estão associadas ao metabolismo de neuropeptídeos (FALKENBERG et al., 2022).

É interessante notar que a subtilisina está associada à facilitação da entrada de fungos patogênicos na cutícula dos insetos (GAO et al., 2020). *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são dois exemplos de fungos entomopatogênicos utilizados como agentes de controle biológico de pragas, sendo fontes de inseticidas e acaricidas fúngicos (FARIA; WRAIGHT, 2007). As enzimas responsáveis pela degradação da cutícula, como lipases, quitinases e proteases, desempenham papel essencial na virulência e na capacidade de penetração desses fungos (ZIBAEE; RAMZI, 2018) . Entre elas, a serina protease Pr1, similar à subtilisina, é uma das mais eficazes na penetração da cutícula (GAO et al., 2020; WANG; CHEN, 2023). Além disso, essa protease ativa uma cascata de reações que leva à produção de moléculas tóxicas, promovendo a melanização e contribuindo para a morte do inseto (NAKHLEH; EL MOUSSAWI; OSTA, 2017)

No contexto de triatomíneos, já foram identificados fungos em ambientes peridomiciliares. Um estudo detectou 31 isolados de *Metarhizium anisopliae* e 15 de *Beauveria bassiana* em 148 amostras coletadas de substratos infestados por triatomíneos em 24 fazendas no Centro do Brasil. Todos os isolados demonstraram patogenicidade para *T. infestans*, indicando o potencial de ambos os fungos como agentes de controle para os vetores da doença de Chagas (LUZ; ROCHA; NERY, 2004). Outro estudo demonstrou espécie de *T. sordida* coletado em área peridoméstica infectado com fungo (LUZ; ROCHA; HUMBER, 2003). Essas espécies ocorrem naturalmente em habitats peridomiciliares, contribuindo para o controle dos triatomíneos e a prevenção da reinfestação após a eliminação dos vetores em ambientes domiciliares (LUZ; ROCHA; NERY, 2004).

Fungos entomopatogênicos têm sido explorados como alternativas no controle de insetos vetores, incluindo triatomíneos, que transmitem o *Trypanosoma cruzi*, o agente da doença de Chagas (GARCIA et al., 2016). No presente estudo, os triatomíneos utilizados para a análise proteômica foram coletados em ambiente silvestre, associados a rochas (MIRANDA et al., 2023), conforme descrito na metodologia. Embora tenham se desenvolvido em colônias, os indivíduos analisados não eram nascidos da colônia, mas sim os que foram capturados diretamente da natureza. Com base nisso, é provável que os insetos estivessem infectados por fungos. Portanto, as proteínas detectadas na saliva podem estar mais associadas à presença desses fungos do que, de fato, à hematofagia.

Uma das serina proteases identificadas foi uma carboxipeptidase (A0A170XJP7), enzima que hidrolisa resíduos de aminoácidos na extremidade C-terminal de proteínas (BARRETT, 2001). As carboxipeptidases de serina (EC 3.4.16) possuem uma tríade catalítica composta por Ser, Asp e His, semelhante a outras serino endopeptidases (WANIEK et al., 2014). Essas enzimas têm diversas funções, como a digestão de proteínas no intestino de animais e processamento pós-traducional de outras enzimas (MITTAPALLI; WISE; SHUKLE, 2006). No transcriptoma da glândula salivar *de T. pallidipennis*, foram identificadas proteases com características de uma peptidase S10, presente no veneno de abelhas, sugerindo um papel potencial dessas enzimas como anti-hemostáticas (HERNÁNDEZ-VARGAS et al., 2017). Outros estudos, entretanto, indicam que triatomíneos podem usar essas carboxipeptidases para digestão no intestino médio posterior, onde estão mais associadas ao sistema digestivo do que à saliva (REYNOSO-DUCOING et al., 2023; WANIEK et al., 2014).

6.1.2.1.2. Metaloproteases

As metaloproteases são enzimas que atuam em diversos processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, processamento de hormônios peptídicos, liberação de citocinas, adesão e migração celular, digestão de nutrientes, processamento de proteínas virais, biossíntese da parede celular bacteriana e metabolismo de antibióticos (NAGASE, 2001).

78

Essas enzimas contêm um íon metálico divalente em seu sítio ativo. Esse íon participa da catálise auxiliando na hidrólise da ligação peptídica (NAGASE, 2001). A molécula de água, essencial para esse processo, também se liga ao íon metálico como um quarto ligante na forma ativa da enzima. Embora o zinco seja o íon metálico mais comum, em algumas ocasiões, cobalto, manganês ou níquel podem estar presentes (ALI et al., 2015a; BARRETT, 2001; NAGASE, 2001).

As metaloproteases são encontradas em grande quantidade nos venenos de serpentes, onde desempenham funções antitrombóticas e provocam hemorragias (GUTIÉRREZ et al., 2005; SILVEIRA et al., 2007). Essas enzimas interferem na coagulação sanguínea, degradam lâminas basais e matrizes extracelulares, contribuindo diretamente para o efeito hemorrágico do veneno (SAJEVIC; LEONARDI; KRIŽAJ, 2011). Na saliva de vários animais hematófagos, as metaloproteases atuam na desregulação da hemostasia. Essas enzimas inibem a agregação plaquetária e degradam fibrinogênio e fibronectina, bloqueando o processo de coagulação sanguínea (DECREM et al., 2008).

Duas metaloproteases (EC:3.4.24) foram identificadas nesse estudo, no grupo de putativamente secretada, e foram detectadas nas quatro réplicas. Ambas as metaloendopeptidase (E2J7A2, A0A224XIT7) pertencem à família M12 de peptidases, possuem um domínio semelhante à astacina (EC 3.4.24.21), e são ligantes de zinco. Na saliva de *T. matogrossensis* (ASSUMPÇAO et al., 2012) e no trato digestivo de *R. neglectus* (RIBEIRO et al., 2014), também foram encontradas sequências relacionadas à família astacina de metaloproteases. Em *R. neglectus*, o sialoma demonstrou a presença de sequências relacionadas à metaloproteases dependente de zinco semelhante a astacina (SANTIAGO et al., 2016). A família astacina, nomeada a partir da enzima digestiva do lagostim *Astacus astacus*, é composta por peptidases de zinco (DUMERMUTH et al., 1991). Essas enzimas, extracelulares ou ligadas à superfície celular, estão envolvidas no processamento de peptídeos, ativação de fatores de crescimento e degradação de polipeptídeos (STÖCKER et al., 1995).

Em carrapatos, as metaloproteases foram localizadas na saliva, intestino médio e ovários, desempenhando papéis importantes em processos como imunidade inata, alimentação sanguínea, digestão do sangue e vitelogênese (BHOWMICK; HAN, 2020). Metaloproteases putativas, como Metis 1 e Metis 2, foram identificadas nas glândulas salivares de *I. ricinus*, onde estão envolvidas na regulação da fibrinólise

(DECREM et al., 2008). Além disso, metaloproteases de carrapatos têm sido estudadas como potenciais candidatas a vacinas (MURFIN; FIKRIG, 2017). Pesquisas que investigam o silenciamento gênico dessas proteínas, assim como vacinas recombinantes, têm mostrado resultados promissores. Por exemplo, o silenciamento das metaloproteases Metis 1 e 2 via RNAi provocou alta mortalidade em carrapatos. A imunização de coelhos com a proteína recombinante Metis 1 resultou na redução do ganho de peso e da oviposição *de l. ricinus* (BHOWMICK; HAN, 2020; DECREM et al., 2008). Vacinas utilizando a metaloprotease HLMP1 de *Haemaphysalis longicornis* também aumentaram a mortalidade dos carrapatos (IMAMURA et al., 2009), enquanto a proteína BrRm-MP4, extraída das glândulas salivares de *Rhipicephalus microplus*, demonstrou uma eficácia de 60% como vacina (ALI et al., 2015b).

Os resultados relacionados às vacinas de carrapatos que utilizam metaloproteases indicam que, embora essas proteínas tenham um potencial terapêutico, sua estabilidade e a preservação da atividade a longo prazo podem representar desafios (BHOWMICK; HAN, 2020). No entanto, em outras áreas terapêuticas, o abametapir — um inibidor de metaloproteinase — tem se mostrado eficaz ao atuar em metaloproteinases essenciais para a eclosão de ovos e o desenvolvimento de piolhos (BOWLES et al., 2019).

Em triatomíneos, metaloproteases foram identificadas nas glândulas salivares de espécies dos gêneros *Triatoma* e *Rhodnius*, mas sua função ainda está em investigação (PRAÇA et al., 2022; SANTIAGO et al., 2020b). No estudo de sialocomplexomas de cinco espécies de Triatominae, foram exploradas as redes de interação proteína-proteína através da espectrometria de massas, resultando na identificação de três metaloproteases. Entre elas, uma aminopeptidase, classificada como um membro da família M1 de metaloproteases Zn²⁺, foi identificada em *D. maxima*. Outra metaloprotease dependente de zinco, pertencente à família M16 também foi identificada em *D. maxima*, e pode estar relacionada à digestão. Já em *R. neglectus* foi detectado um membro da família M13 de metalopeptidases dependentes de zinco (SANTIAGO et al., 2020a).

No sialoma mais recente de triatomíneos, referente à espécie *T. sordida*, foram encontradas sequências no transcriptoma mas com baixa abundância e expressão, sem detecção de metaloproteases no proteoma (PRAÇA et al., 2022). No

entanto, no presente estudo com o proteoma de *T. costalimai,* duas sequências foram identificadas como secretadas, sugerindo sua presença na saliva. É possível que as metaloproteases dos triatomíneos desempenhem funções semelhantes às observadas em carrapatos (SANTIAGO et al., 2017).

Os avanços nas pesquisas sugerem que o desenvolvimento de medicamentos baseados em metaloproteases pode ser promissor, resultando em opções terapêuticas mais eficazes e direcionadas. Esses medicamentos podem ser utilizados no tratamento de distúrbios hemorrágicos e trombóticos (DE ARAÚJO et al., 2023).

6.1.2.2. Apirases

As apirases (EC 3.6.1.5) são uma família de enzimas que desempenham a função de hidrolisar os nucleotídeos ATP e ADP, convertendo-os em AMP + Pi, e são encontradas em todos os animais (MEYERHOF, 1945; PLESNER, 1995). Em artrópodes hematófagos, já foi encontrada na saliva de carrapatos, mosquitos, triatomíneos e pulgas (HUGHES, 2013).

A apirase salivar interfere na sinalização nucleotídica entre as plaquetas, adquirindo caráter anti-agregador plaquetário, auxiliando a contornar as respostas imune e hemostática do hospedeiro vertebrado (DE ARAÚJO et al., 2012; SANTIAGO et al., 2016). Quando ocorrem lesões nos tecidos, como a danificação das células endoteliais, nucleotídeos como ATP e ADP são liberados no espaço extracelular, atuando na sinalização hemostática e na modulação do sistema imunológico (BROOS et al., 2011; FERREIRA et al., 2010; GREEN, 2006). Nesse sentido, a secreção dessa enzima ao hidrolisar o ADP, reduz sua disponibilidade no sangue, impedindo a formação de coágulos que poderiam interromper a alimentação (RIBEIRO; GARCIA, 1980; SANTIAGO et al., 2020a).

As apirases formam três famílias distintas: 5'-nucleotidases, *Cimex* e CD39 (HUGHES, 2013). As enzimas da família 5'-nucleotidase estão associadas à regulação da sinalização celular e são ativadas por íons Ca²⁺ ou Mg²⁺ (CHAMPAGNE et al., 1995; FAUDRY et al., 2004). A família *Cimex*, nomeada a partir do percevejo *Cimex lectularius*, é caracterizada pela dependência exclusiva do Ca²⁺ para ativação (DE ARAÚJO et al., 2012; VALENZUELA et al., 1998). Já as apirases da família CD39 são semelhantes a antígenos das células B humanas e exigem íons Ca²⁺ ou Mg²⁺

para sua ativação, sendo encontradas em espécies como a pulga *Xenopsylla cheopis* (DE ARAÚJO et al., 2012; RIBEIRO; VAUGHAN; AZAD, 1990).

No presente estudo, cinco apirases salivares foram identificadas em todas as quatro réplicas: E2J7A7, E2J7A6, A0A023FD86, Q70GK8 e A0A023FB45, enquanto A0A224XLI5 foi encontrada apenas nas réplicas 1 e 3. Essas apirases foram classificadas como pertencentes à família 5'-nucleotidase (InterPro ID: IPR006179). Da mesma forma, a análise no *Gene Ontology* (GO) as classificou como proteínas que possuem atividade de 5'-nucleotidase (GO:0008253), reforçando uma possível função enzimática na hidrólise de nucleotídeos. É interessante notar que, as E2J7A7 e E2J7A6 foram preditas pelo OutCyte como possuindo domínio transmembrana, e tanto o DeepTMHMM quanto o DeepLoc indicaram a presença de peptídeo sinal, sendo preditas pelo DeepLoc como proteínas extracelulares. Essas duas sequências foram incluídas manualmente no grupo de "putativamente secretadas".

Espécies de artrópodes filogeneticamente distantes podem compartilhar apirases salivares pertencentes à mesma família. Um exemplo disso é a presença de apirases salivares da família 5'-nucleotidase em diferentes famílias de insetos da ordem Diptera, como Culicidae (CHAMPAGNE et al., 1995; LOMBARDO et al., 2000) e Glossinidae (ALVES-SILVA et al., 2010). Essa mesma família de apirases também foi identificada em insetos da ordem Hemiptera (ASSUMPÇÃO et al., 2008; FAUDRY et al., 2004) e em carrapatos (STUTZER et al., 2009). Em Triatoma infestans, foram identificadas cinco isoformas glicosiladas de apirase na saliva, com massas moleculares de 88, 82, 79, 68 e 67 kDa, da família 5'-nucleotidases (DE ARAÚJO et al., 2012; FAUDRY et al., 2004, 2006). A apirase salivar também foi descrita em outros triatomíneos, como T. brasiliensis (SANTOS et al., 2007), T. dimidiata (KATOA et al., 2010), R. prolixus (RIBEIRO; GARCIA, 1980), P. megistus (RIBEIRO; SCHWARZ; FRANCISCHETTI, 2015), D. máxima (ASSUMPÇÃO et al., 2011) e T. sordida (PRAÇA et al., 2022). Estudos filogenéticos sustentam a ideia de que a expressão de apirases salivares evoluiu independentemente em diferentes grupos de artrópodes hematófagos (HUGHES, 2013).

Pala *et al.*2024 investigaram o papel da apirase salivar de *Anopheles gambiae* (AgApyrase) na regulação da hemostasia durante a alimentação sanguínea e na transmissão do *Plasmodium*, parasita causador da malária. Eles demonstraram que a apirase, além de inibir a agregação plaquetária, reduz a coagulação sanguínea e

facilita a transmissão do *Plasmodium*. Além disso, os resultados mostraram que os mosquitos ingerem uma quantidade significativa de apirase, o que aumenta a infecção por *Plasmodium* no intestino do mosquito. Além disso, a imunização com AgApyrase inibiu a infecção e a transmissão do parasita, sugerindo que a apirase tem um papel crucial na transmissão da malária e pode ser um alvo para estratégias de prevenção (PALA et al., 2024).

6.1.2.3. Inositol 5-fosfatase

No presente estudo, foram identificadas oito proteínas pertencentes à família Inositol 5-fosfatase (IPR046985) no proteoma das glândulas salivares de *T. costalimai*.

A família das inositol polifosfato 5-fosfatases (INP) compreende enzimas que removem especificamente o grupo fosfato da posição 5 do anel de inositol de moléculas como fosfoinositídeos (ASTLE et al., 2007). Essas enzimas atuam na regulação de diversos processos celulares, incluindo sinalização, organização do citoesqueleto e secreção (HAKIM et al., 2012). Elas modulam a concentração de fosfatos de inositol nas membranas plasmáticas, o que afeta processos como o tráfego vesicular, a endocitose e a secreção de vesículas, além de influenciar diretamente a forma da membrana (ANDERSEN; RIBEIRO, 2006).

A INP foi identificada pela primeira vez na saliva de *R. prolixus*, e é amplamente observada em sialomas de triatomíneos, como *Triatoma brasiliensis* (SANTOS et al., 2007), *T. infestans* (ASSUMPÇÃO et al., 2008; SCHWARZ et al., 2014), *T. matogrossensis* (ASSUMPÇÃO et al., 2012), *T. dimidiata* (KATOA et al., 2010; SANTIAGO et al., 2018), *T. pallidipennis* (HERNÁNDEZ-VARGAS et al., 2017), *P. chinai* (KATO et al., 2017), *P. megistus* (BUSSACOS et al., 2011) *e P. lignarius* (NEVOA et al., 2018), *T. sordida* (PRAÇA et al., 2022).

A função específica dessas enzimas na alimentação sanguínea não foi demonstrada e permanece incerta (SANTIAGO et al., 2020b). No caso de *R. prolixus*, inicialmente acreditava-se que estavam ligadas à atividade apirase salivar, mas estudos subsequentes demonstraram que essa associação não se confirmou (RIBEIRO et al., 2004). Sugeriu-se que o INP-5 de *R. prolixus* atua reduzindo a concentração de fosfolipídios nas membranas plasmáticas, incluindo plaquetas, alterando o tráfego de membranas e a secreção de vesículas, além de modificar a

forma da membrana (ANDERSEN; RIBEIRO, 2006). Os fosfatos de inositol desempenham um papel essencial na sinalização de membranas, influenciando processos como a hemostasia e a ativação plaquetária (PURVIS et al., 2008). Embora a interrupção da via nos hospedeiros possa gerar efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, essa via é predominantemente intracelular, o que dificulta tais atividades. No entanto, especula-se que as INP salivares possam ser internalizadas nas células, possivelmente com o auxílio de hemolisinas salivares (SANTIAGO et al., 2020b).

6.1.2.4. Outras enzimas

Outras enzimas como nucleases, isomerases, carboxilesterase, ferritina, transferrina, entre outras também foram identificadas no proteoma do *T. costalimai* (Tabela 4). Essas enzimas também foram relatadas no sialocomplexomas de triatomíneos (SANTIAGO et al., 2020a), e no sialoma do *T. sordida* (PRAÇA et al., 2022), com exceção das enzimas ligadas ao processo de homeostase do ferro. Conforme observado por Santiago e colaboradores, essas enzimas participam de cascatas enzimáticas que controlam diferentes processos biológicos. Além disso, a função específica dessas enzimas na saliva ainda não está completamente esclarecido (SANTIAGO et al., 2020a).

As esterases encontradas foram caracterizadas como carboxilesterases (EC 3.1.1) e colinesterase (EC 3.1.1.8). A família Carboxilesterase/Lipase Tipo B inclui enzimas que atuam em vários processos biológicos, como a desintoxicação de xenobióticos, o metabolismo de lipídios e a hidrólise de diferentes substratos éster (HOTELIER et al., 2010). A especificidade para diferentes substratos reflete sua função no metabolismo lipídico, atuando em ésteres de ácidos graxos de várias cadeias e triglicerídeos (YU et al., 2009). Essas enzimas foram previamente caracterizadas em espécies de triatomíneos (TRAVERSO et al., 2022). Em *R. prolixus*, por exemplo, estão relacionados a digestão de triacilgliceróis (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007). Esterases desse tipo foram identificadas nos venenos de insetos da família Apidae, como *Apis*, e de Aculeata (CUI et al., 2011). Em insetos, essas enzimas estão associadas à resistência a inseticidas por meio da hidrólise ou sequestro dede compostos organofosforados, que são amplamente

usados como base de inseticidas (SCHAMA et al., 2016). Nos reduvídeos hematófagos, as esterases podem ter um papel ainda indefinido, mas potencialmente relevante no processamento do sangue ingerido durante a alimentação (HERNÁNDEZ-VARGAS et al., 2017).

O ferro é fundamental para processos celulares essenciais, mas também é perigoso devido à sua tendencia a interagir e formar espécies reativas de oxigênio (KOSMAN, 2010). Além disso, o ferro é um elemento-chave no sistema imunológico, frequentemente se tornando um alvo na disputa entre o hospedeiro e patógenos invasores (BARBER; ELDE, 2015). Nesse sentido, os organismos desenvolveram um conjunto diversificado de proteínas responsáveis pela regulação, armazenamento, transporte e sequestro de ferro (BAKER; LINDLEY, 1992). Foram identificadas duas sequências caracterizadas como ferritina (A6YPI1, A0A171A632), e uma outra como transferrina (A0A170Y4Q2). Além disso, uma identificação "*Salivary secreted protein*" (A6YPD0), foi identificada como pertencente à família de redutases de quelato férrico e proteínas de defesas putativas (IPR051237).

A ferritina é uma das principais proteínas responsáveis pelo armazenamento de ferro não heme em animais, plantas e microrganismos (CRICHTON; CHARLOTEAUX-WAUTERS, 1987; THEIL, 1987). Na hemolinfa, a ferritina é encontrada como um complexo proteico secretado, facilitando a mobilização e utilização do ferro (PASKEWITZ; SHI, 2005). Além de seu papel no metabolismo do ferro, a ferritina também pode estar envolvida na resposta imunológica (NICHOL; LAW; WINZERLING, 2002). Estudos proteômicos mostraram que a ferritina é induzida em diferentes desafios patogênicos, sugerindo que ela pode atuar como um mediador na defesa do inseto contra infecções (PHAM; WINZERLING, 2010).

Em carrapatos, como o *I. ricinus*, foram descritos a proteína Fer2 e a proteína responsiva ao ferro (IRP), que são expressas exclusivamente no intestino do carrapato. Essas proteínas são essenciais para o transporte de ferro para os tecidos periféricos, desempenhando funções normais no organismo. (HAJDUSEK et al., 2009). Um estudo revelou que a vacinação com Fer2 recombinante tem potencial para controlar infestações de carrapatos em coelhos infectados por *I. ricinus* (HAJDUSEK et al., 2010).

Transferrinas são glicoproteínas presentes em diversos animais, incluindo mamíferos, marsupiais, peixes e mais de 34 espécies de invertebrados, como *R*.

prolixus (URSIC-BEDOYA; LOWENBERGER, 2007). Desempenham um papel no sequestro e transporte de ferro, graças à sua capacidade de ligação com alta afinidade ao ferro (BAKER; LINDLEY, 1992). Em insetos, essas proteínas desempenham papéis de defesa, sendo sintetizadas e armazenadas no corpo adiposo, de onde são posteriormente secretadas para a hemolinfa. Ali, elas atuam na absorção e distribuição de ferro em conjunto com a ferritina (YOSHIGA et al., 1997). As transferrinas encontradas na hemolinfa de insetos, como por exemplo a Tsf1s também têm funções relacionadas ao sequestro e transporte desse metal (WEBER; KANOST; GORMAN, 2020).

Em carrapatos, a transferência de transferrina proveniente do hospedeiro no carrapato duro *Haemaphysalis longicornis* foi estudada, mostrando que essa transferrina é transportada para o ovário através do intestino médio e da hemolinfa. Os resultados sugerem que a transferrina derivada do hospedeiro pode atuar como uma fonte de ferro para o ovário (MORI et al., 2014). No estudo dos sialocomplexomas, uma transferrina foi encontrada em *R. neglectus*, e foi classificada relacionada a imunidade do inseto (SANTIAGO et al., 2020a). No transcriptoma do corpo adiposo de *P. lignarius*, uma transferrina também foi identificada. A ferritina e a transferrina possivelmente desempenham papéis na regulação e desintoxicação do ferro em triatomíneos (HERNÁNDEZ-VARGAS et al., 2017).

No proteoma do *T. costalimai*, foram identificadas proteínas dissulfeto isomerase (PDI) (IPR005788), das quais quatro foram detectadas em mais de uma replicata. Todas as sete identificações apresentaram predição de peptídeo sinal e estão localizadas no retículo endoplasmático, apenas uma extracelular. A PDI atua no retículo endoplasmático, são proteínas multifuncionais responsáveis pela formação, quebra e rearranjo de ligações dissulfeto (WILKINSON; GILBERT, 2004). Geralmente, as PDI contêm quatro domínios semelhantes à tiorredoxina (LYLES; GILBERT, 1994). Além disso, a PDI atua como uma chaperona molecular no RE, desempenhando uma função fisiológica importante ao facilitar o correto dobramento das proteínas (WILSON; LEES; BULLEID, 1998). O volume de sangue ingerido pelos triatomíneos afeta seu desenvolvimento ninfal (KOLLIEN et al., 2001) e a metaciclogênese de *T. cruzi* (GARCIA et al., 1995). A molécula de heme livre é um pró-oxidante e agente citotóxico, promovendo estresse oxidativo e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem oxidar ligações dissulfeto e desnaturar proteínas

86

(GRAÇA-SOUZA et al., 2006). Chaperonas como a isomerase de dissulfeto, que foram identificadas no trato digestivo de triatomíneos como em *D. maxima* e *T. infestans*, auxiliam na proteção contra esses danos, facilitando o correto dobramento das proteínas e prevenindo sua agregação (GUMIEL et al., 2020).

6.1.3. Inibidores de proteases

Em relação aos inibidores de protease, um total de 5 inibidores de proteases foram encontrados na saliva de *T. costalimai.* Essas proteínas são classificadas com base em seus diferentes domínios, como o domínio Kazal e as serpinas (NEVOA et al., 2018). Isso corrobora outros estudos, em que os inibidores de proteases, principalmente inibidores de serino e cisteíno proteases, são encontrados com frequência no sialoma de artrópodes hematófagos (SANTIAGO et al., 2020b). Nos vetores que se alimentam de sangue, esses inibidores geralmente estão ligados à modulação da resposta imune do hospedeiro e à manutenção da homeostase (ABBAS et al., 2022). Em geral, inibidores de proteases que impactam a coagulação sanguínea tendem a direcionar sua ação ao fator Xa ou à trombina, elementos comuns às vias intrínseca e extrínseca da coagulação (LU et al., 2023).

Em mosquitos, estudos mostraram que a saliva de anofelinos inibe a trombina, enquanto a de culicíneos age principalmente sobre o fator Xa (STARK; JAMES, 1996). Inibidores tanto do fator Xa quanto da trombina foram identificados em carrapatos (MARTINS et al., 2020), flebotomíneos (COLLIN et al., 2012) e barbeiros (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1995). Em triatomíneos a ação antiprotease pode se manifestar tanto no ambiente extracelular quanto no conteúdo salivar (PRAÇA et al., 2022).

Os inibidores de serino protease são classificados em quatro principais grupos: Kunitz, domínio semelhante ao inibidor de tripsina, inibidores do domínio Kazal e serpinas. Já os inibidores de cisteíno protease pertencem à família das cistatinas (PARIZI et al., 2018).

6.1.3.1. Kazal

Os inibidores de serino protease do tipo Kazal são proteínas com domínio de 40 a 60 aminoácidos de comprimento, contendo seis resíduos de cisteína. Esses

inibidores de protease possuem um ou múltiplos domínios, e cada domínio Kazal contém uma sequência conservada. Além disso apresentam um padrão específico de cisteínas que formam ligações dissulfeto, conferindo uma estrutura tridimensional estável e altamente similar entre as proteínas dessa família (DONPUDSA; TASSANAKAJON; RIMPHANITCHAYAKIT, 2009; RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2010; VAN DE LOCHT et al., 1995). A família de inibidores de protease Kazal pertence ao Clã IA e à família I1 de inibidores de peptidase. Esses inibidores regulam a atividade de diversas serina proteases do Clã PA e da família S1, à qual pertence a trombina (RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2015; SANTIAGO et al., 2020b).

Diversas proteínas da família Kazal foram identificadas tanto em vertebrados quanto em invertebrados e exercem diversas funções biológicas, variando de acordo com a interação com o ambiente ou o hospedeiro (RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2010). Membros dessa família foram relatados na saliva de animais hematófagos, como tabanídeos, mosquitos, sanguessugas e triatomíneos 2002; LOVATO et al., 2011; RIMPHANITCHAYAKIT; (CAMPOS et al., TASSANAKAJON, 2010; TAKÁC et al., 2006). Eles atuam como vasodilatadores (TAKÁC et al., 2006), apresentam propriedades antibacteriana (DONPUDSA; RIMPHANITCHAYAKIT, TASSANAKAJON; 2009), efeitos anticoagulantes (FRIEDRICH et al., 1993) e ação antitripanossoma (LOVATO et al., 2011). Por exemplo, o Vasotab, um inibidor de protease do tipo Kazal identificado na saliva da mosca-dos-estábulos Hybomitra bimaculata (Diptera: Tabanidae), possui atividade vasoativa e antiplaquetária, atuando como vasodilatador por meio da inibição de canais iônicos (SANTIAGO et al., 2016; TAKÁC et al., 2006). Além disso, inibidores de protease dessa família também são componentes importantes do veneno de percevejos hemípteros, sugerindo uma origem ancestral desses inibidores (WALKER et al., 2019).

Em triatomíneos, vários inibidores de serino protease do tipo Kazal foram identificados no intestino médio. Entre eles estão a rhodniina de *Rhodnius prolixus* (VAN DE LOCHT et al., 1995), infestina de *Triatoma infestans* (CAMPOS et al., 2002), brasiliensina de *T. brasiliensis* (ARAUJO et al., 2007) e dipetalogastina de *D. maxima* (MENDE et al., 1999), e foram caracterizadas por inibir diversas enzimas como trombina, tripsina e quimiotrispina (RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2010).

Considerando que os triatomíneos consomem grandes quantidades de sangue, a presença da atividade anticoagulante nos intestinos é essencial para prevenir o aumento da viscosidade sanguínea no trato digestivo, que facilita tanto o armazenamento quanto a digestão do sangue ingerido.

Os inibidores de proteases do tipo Kazal também foram identificadas na saliva de barbeiros (ASSUMPÇÃO et al., 2008, 2011; KATO et al., 2017; RIBEIRO; SCHWARZ; FRANCISCHETTI, 2015; SANTIAGO et al., 2016; SANTOS et al., 2007). No proteoma de *Triatoma costalimai*, foram identificadas duas sequências, A6YPK0 e E2J791, ambas pertencentes à superfamília de domínios Kazal, com a primeira sequência sendo identificada nas quatro réplicas biológicas.

6.1.3.2. Serpina

Outro inibidor de protease identificado na saliva de *T. costalimai*, pertence à família Serpina (IPR000215). As serpinas (inibidores de serina protease, ou *SERine Proteinase INhibitors*) pertencem à família de inibidores I4 (ABBAS et al., 2022). As serpinas constituem o maior grupo de inibidores de serina proteases, entretanto, algumas apresentam inibição cruzada de cisteíno proteases, incluindo caspases e catepsinas (TAKEDA et al., 1995). Estas proteínas são compostas por 350 a 500 resíduos de aminoácidos, apresentando pesos moleculares entre 40 e 60 kDa (GETTINS, 2002). Amplamente distribuídas em eucariotos, as serpinas compartilham uma estrutura terciária típica, que inclui um conjunto de nove α -hélices e três folhas β (VAN GENT et al., 2003). Um dos componentes centrais da sua função é o loop reativo (RCL), que interage com a protease-alvo e leva à inativação de seu sítio catalítico (GETTINS, 2002).

As serpinas inibitórias exercem funções importantes no controle de vias fisiológicas mediadas por serina proteases tanto em vertebrados quanto em invertebrados (SPENCE et al., 2021). Entre suas principais funções, destacam-se a regulação da coagulação sanguínea, da fibrinólise, da inflamação e da ativação do sistema complemento (ABBAS et al., 2022). Sua deficiência ou superexpressão pode levar a condições como trombose ou sangramento anormal (RAU et al., 2007).

As serpinas ou proteínas com domínio semelhante (serpin-like) estão presentes na saliva de diversos artrópodes e desempenham funções relacionadas à

89

hemostasia, interferindo na adesão plaquetária, fibrinólise e coagulação, o que facilita o processo de alimentação sanguínea (NEVOA et al., 2018; RAU et al., 2007). Se destacam como um grupo diversificado de anticoagulantes salivares, direcionadas aos fatores da cascata de coagulação sanguínea do hospedeiro (DA SILVA VAZ JUNIOR et al., 2024)

Em mosquitos, a função das serpinas salivares está relacionada à regulação da hemostasia do hospedeiro, atuando como inibidores reversíveis do fator Xa. Estudos com extratos de glândulas salivares de culicíneos confirmaram a presença de um inibidor específico do fator Xa, posteriormente identificado como uma serpina (STARK; JAMES, 1996). As serpinas também foram descritas na saliva de carrapatos, onde atuam na modulação das respostas do hospedeiro, como a inibição da coagulação e na imunossupressão (ABBAS et al., 2022). Em *Ixodes ricinus*, essas moléculas regulam o equilíbrio entre trombina ativa e inativa, funcionando como anticoagulantes que bloqueiam a cascata de coagulação do hospedeiro vertebrado (PREVOT et al., 2009).

Em *P. lignarius*, foram identificadas duas serpinas com alta expressão salivar, conforme evidenciado em análises transcriptômica (NEVOA et al., 2018). Em outra espécie, *P. megistus*, foi caracterizada a PMSRP1, uma serpina expressa constitutivamente na hemolinfa, com cerca de 40 kDa e 404 resíduos de aminoácidos. A expressão do mRNA que codifica PMSRP1 sofre modulação nos hemócitos e no intestino em resposta à infecção por *T. cruzi*, indicando uma possível função dessa serpina nas interações entre o parasita e o vetor (MOREIRA et al., 2014).

6.1.3.3. Pacifistina

Pacifastina é uma família de inibidores de serino protease, primeiramente identificada no plasma do lagostim *Pacifastacus leniusculus*, onde atua como um inibidor eficaz de enzimas como tripsina e quimotripsina (BREUGELMANS et al., 2009). Essa família é formada principalmente por proteínas com múltiplos domínios, apresentando uma estrutura heterodimérica composta por uma cadeia de transferrina, conhecida como cadeia pesada (PHC), e uma cadeia inibidora de protease, chamada cadeia leve (PLC) (LIANG et al., 1997). A subunidade inibitória possui uma sequência

consenso com seis resíduos de cisteína, configurados de forma a criar três ligações dissulfeto (LIANG et al., 1997).

Estudos identificaram moléculas semelhantes à pacifastina em insetos hematófagos, onde são reguladas positivamente no corpo adiposo após a ingestão de sangue, indicando uma possível função no sistema imunológico do inseto ao lidar com microrganismos adquiridos durante a alimentação (DE MARCO et al., 2010). Embora ainda se conheça pouco sobre as proteases-alvo e os papéis fisiológicos exatos dessas pacifastinas, acredita-se que elas estejam ligadas à imunidade inata dos artrópodes e possivelmente a outros processos essenciais (SANTIAGO et al., 2016).

As pacifastinas podem regular diversos processos dependentes de serino peptidases, incluindo a imunidade e a reprodução (DE MARCO et al., 2010) . Em Hemiptera, por exemplo, foram caracterizados dois inibidores de protease semelhantes à pacifastina nos ovos de *T. infestans*, sugerindo seu envolvimento na resposta imune (DE MARCO et al., 2010). Entre os triatomíneos, membros dessa família foram identificados nos sialotranscriptomas de espécies como *R. neglectus*, *P. megistus (RIBEIRO; SCHWARZ; FRANCISCHETTI, 2015)*, *T. infestans*, *T. dimidiata* e *T. sordida* (PRAÇA et al., 2022; SANTIAGO et al., 2020b).

6.1.3.4. Kunitz

As proteínas da família Kunitz são geralmente pequenas, com peso molecular entre 18 e 24 kDa. Cada domínio Kunitz possui cerca de 60 resíduos de aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 7 kDa, apresentando uma estrutura composta por duas fitas β antiparalelas e uma ou duas hélices α (JMEL *et al.*, 2023) (MISHRA, 2020). Esse domínio possui seis cisteínas conservadas que formam três ligações dissulfeto, estabilizando a estrutura e, em alguns casos, os domínios de ligação (VENTURA *et al.*, 2013).

As proteínas que contêm o domínio Kunitz, que atuam como inibidores de serino protease (PIs), são encontradas em uma ampla variedade de organismos, incluindo animais, plantas e microrganismos (DE MAGALHÃES et al., 2018). O primeiro membro descrito dessa família, o inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI), foi identificado há mais de 80 anos e se tornou um dos modelos mais estudados para entender a estrutura e o dobramento de proteínas globulares

(ASCENZI et al., 2003; KUNITZ; NORTHROP, 1936). Além de inibir serino proteases, certas proteínas com domínio Kunitz funcionam como bloqueadores de canais iônicos, o que é particularmente comum em venenos de animais peçonhentos, sendo por isso conhecidas como toxinas do tipo Kunitz. Essas toxinas também foram encontradas em secreções de parasitas (FLÓ et al., 2017). Nos vertebrados, os inibidores do tipo Kunitz têm papel essencial na regulação de processos inflamatórios, enquanto nos invertebrados, suas funções são diversas, incluindo atividades anticoagulantes, fibrinolíticas e antimicrobianas (DE MAGALHÃES et al., 2018; RANASINGHE; MCMANUS, 2013).

Nos transcriptomas das glândulas salivares de carrapatos, os domínios do tipo Kunitz são frequentemente encontrados entre as cinco classes de proteínas mais expressas, juntamente com lipocalinas, por exemplo (JMEL et al., 2023). Esses inibidores de serina atuam em bloquear as respostas do hospedeiro, facilitando a alimentação sanguínea (DA SILVA VAZ JUNIOR et al., 2024). Essa predominância é observada tanto em carrapatos argasídeos (carrapatos moles) quanto em ixodídeos (carrapatos duros) em todas as fases de desenvolvimento — larvas, ninfas e adultos — embora haja uma variação significativa entre diferentes espécies (JMEL et al., 2023).

Nos triatomíneos, a presença de proteínas do tipo Kunitz na saliva não é comum (SANTIAGO et al., 2020b); no entanto, no transcriptoma de *T. sordida*, foram identificados sete CDS (sequências codificadoras) desse tipo (PRAÇA *et a*l., 2022). No proteoma do *T. costalimai* foi realizada uma identificação, mas são necessárias investigações adicionais para confirmar a presença e a funcionalidade dessas proteínas.

6.1.4. Hemolisina/MYS e Trialisina

No proteoma de *T. costalimai*, foram identificadas cinco proteínas MYS/hemolisina-like e cinco trialisinas. Essas proteínas são conhecidas pela capacidade de formar poros em membranas, o que as torna permeabilizadoras de diversos tipos de células, e tem propriedades antimicrobianas (PRAÇA *et a*l., 2022).

A família das hemolisinas inclui proteínas solúveis e secretadas, capazes de formar canais transmembrana poliméricos que permeabilizam diferentes células-alvo,

como eritrócitos e leucócitos, causando alteração nas funções celulares ou lise (ASSUMPÇÃO et al., 2008) (HYLAND et al., 2001). Comumente encontradas em microrganismos como *Escherichia coli* (BHAKDI et al., 1996), *Bacillus cereus* (RAMARAO; SANCHIS, 2013) e *Staphylococcus aureus*, essas proteínas são fatores de virulência importante para esses microrganismos e pertencem à família de proteínas RTX (*repeat in toxin*) (WELCH, 2001). O termo "hemolisina" deriva de sua ação lítica sobre glóbulos vermelhos (ROWE; WELCH, 1994). Além disso, essas toxinas também apresentam toxicidade para células epiteliais, endoteliais, imunes e para plaquetas (RAMARAO; SANCHIS, 2013). Homólogos dessas toxinas também são encontrados em venenos de artrópodes, com possível função defensiva ou proteção contra infecções (WALKER et al., 2017) . Além disso, proteínas do tipo hemolisina são abundantes na glândula de veneno do percevejo *P. plagipennis*, um predador da família dos reduvídeos (PRAÇA et al., 2022; ROWE; WELCH, 1994; WALKER et al., 2017).

Em insetos hematófagos, um evento importante na digestão do sangue é a lise dos eritrócitos, que permite a liberação do conteúdo celular, rico em proteínas (ARCÀ; RIBEIRO, 2018). Proteínas semelhantes à hemolisina da família MYS foram inicialmente relatadas no sialotranscriptoma de *R. prolixus* (RIBEIRO et al., 2004), e são comumente encontradas em trabalhos sobre saliva de triatomíneos (SANTIAGO et al., 2020b). Além disso, a trialisina é considerada um membro da família de hemolisinas, uma vez que é uma proteína lítica e formadora de poros (ROCHA et al., 2022) também presente no sialoma de triatomíneos (DE ARAÚJO et al., 2012). As funções dessas proteínas na saliva de triatomíneos podem envolver a lise de eritrócitos para facilitar as etapas iniciais da digestão, além de possivelmente atuar como agentes antimicrobianos (ASSUMPÇÃO et al., 2008).

6.1.5. Antígeno 5

As proteínas classificadas como antígeno 5 (Ag5) fazem parte da superfamília CAP, que inclui proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP) em mamíferos, proteínas do tipo antígeno 5 em insetos e proteínas relacionadas à patogênese (Pr-1) em plantas (GIBBS; ROELANTS; O'BRYAN, 2008; SCHREIBER; KARLO; KOVALICK, 1997). Membros dessa família em venenos de cobras, lagartos e caracóis *Conus* atuam como toxinas, inibidores de canais iônicos ou proteases (MILNE et al., 2003; YAMAZAKI; MORITA, 2004). Muitas subfamílias CAP, inicialmente caracterizadas em mamíferos, possuem homólogos específicos entre os invertebrados (ABRAHAM; CHANDLER, 2017). As proteínas Ag5 são alérgenos potentes para mamíferos, sendo o antígeno 5 descrito como o principal componente alergênico em venenos de vespas, marimbondos e formigas de fogo (HOFFMAN, 1993; KING; SPANGFORT, 2000).

O Aq5 é encontrado na saliva de insetos hematófagos, como flebotomíneos (CHARLAB et al., 1999), mosquitos (CALVO et al., 2007; VALENZUELA et al., 2002) carrapatos (MANS et al., 2008) e triatomíneos (ASSUMPÇAO et al., 2012; ASSUMPÇÃO et al., 2008, 2011; RIBEIRO et al., 2004), e pode estar relacionado à modulação do sistema imunológico do hospedeiro ou à inibição da coagulação, visando prolongar o processo de hematofagia (GIBBS; ROELANTS; O'BRYAN, 2008). Em moscas hematófagas, a função de certos membros da família Ag5 presentes na saliva de insetos hematófagos foi elucidada. Exemplos incluem os inibidores plaquetários de Tabanus yao (XU et al., 2008), e uma proteína de ligação à imunoglobulina de 27 kDa de Stomoxys calcitrans, que pode atuar como inibidor da via clássica do complemento (AMERI et al., 2008). Em outros insetos, como da ordem Hymenoptera, o Ag5 é um alérgeno potente, sendo as picadas desses insetos uma causa de anafilaxia mediada por IgE em adultos (BAZON et al., 2018; KING; SPANGFORT, 2000; PANTERA et al., 2003; WORM* et al., 2014). Devido a isso, o Ag5 tem se mostrado relevante para o diagnóstico de reações alérgicas graves a venenos, pela identificação de anticorpos IgE específico especialmente em pacientes sensibilizados (VOS et al., 2013).

Em triatomíneos, o antígeno 5 foi descrito nos proteomas das espécies *T. pallidipennis* (HERNÁNDEZ-VARGAS et al., 2017), *T. dimidiata* (SANTIAGO et al., 2018), *R. neglectus* (SANTIAGO et al., 2016), *D. maxima* (ASSUMPÇÃO et al., 2011), *T. sordida* (PRAÇA et al., 2022) sendo descrito pela primeira vez na saliva de *R. neglectus* (RIBEIRO et al., 2004). Além disso, no estudo dos sialocomplexomas de cinco espécies de triatomíneos, o antígeno 5 foi identificado apenas na saliva de *D. maxima* (SANTIAGO et al., 2020a). Além disso, sequências da família do antígeno 5 são comumente encontrados em trabalhos de transcriptomas, como em *P. liganarius* (NEVOA et al., 2018), *P. chinai* (KATO et al., 2017), *P. megistus* (RIBEIRO;

SCHWARZ; FRANCISCHETTI, 2015), *T. infestans* (SCHWARZ et al., 2014), *T. rubida* (RIBEIRO et al., 2012), *T. matogrossensis* (ASSUMPÇAO et al., 2012), *T. dimidiata* (KATO et al., 2010) e *T. brasiliensis* (SANTOS et al., 2007).

Estudos com o Ag-5 da saliva de *D. maxima* e *T. infestans* mostraram que ele possui atividade antioxidante e capacidade de inibir a agregação plaquetária induzida por baixas doses de colágeno e o estresse oxidativo em neutrófilos (ASSUMPÇÃO et al., 2013).

Embora amplamente descrito na saliva de artrópodes hematófagos, a função do Ag5 não é totalmente compreendida (NEVOA et al., 2018). Estudos recentes sobre sua atividade em triatomíneos e outros insetos hematófagos são escassos, mesmo que demonstre ser uma molécula promissora, com potencial para o desenvolvimento de novos biomarcadores (VOS et al., 2013) e terapias para doenças trombóticas (SANTIAGO et al., 2020b).

6.1.6. Proteínas de Ligação a Odorantes (OBP)

As Proteínas de Ligação a Odorantes (OBPs) são proteínas solúveis de baixo peso molecular, que constituem uma superfamília extensa e diversa de proteínas (PELOSI, 1994). O nome deriva da expressão dessas proteínas no sistema olfativo dos animais, onde são fundamentais para a ligação a odorantes e essenciais na transdução de sinais quimiossensoriais (ZHOU, 2010).

As OBPs estão presentes tanto em vertebrados quanto em insetos, mas com estruturas diferentes (SUN; XIAO; CARLSON, 2018). OBPs de vertebrados possuem semelhança de sequência com as lipocalinas, composta por oito folhas β dispostas em um formato de barril, criando uma cavidade de ligação adequada para moléculas hidrofóbicas de pequeno porte (GONÇALVES et al., 2021). Em insetos, as OBPs possuem uma conformação característica com seis α-hélices e seis resíduos de cisteína que formam três pontes dissulfeto. Essas proteínas têm massa entre 13 e 16 kDa, contêm um peptídeo sinal e apresentam uma cavidade interna para ligação de moléculas hidrofóbicas pequenas (PELOSI, 1994; PELOSI et al., 2018; SUN; XIAO; CARLSON, 2018)

As OBPs podem ser divididas em quatro subcategorias: OBPs de insetos, OBPs de vertebrados, proteínas quimiossensoriais (CSPs) e Niemann-Pick C2 (NPC2) (PELOSI; ZHU; KNOLL, 2018). Outra classificação se baseia na afinidade de ligação das OBPs, dividindo-as em subgrupos funcionais. As proteínas de ligação a feromônios (PBPs) preferencialmente se ligam a feromônios (VOGT; RIDDIFORD, 1981); já as proteínas de ligação a odorantes gerais (GOBPs) se ligam a compostos voláteis, para detectar odores de alimentos e hospedeiros (PELOSI; ZHU; KNOLL, 2018). As proteínas específicas de antenas (ASPs ou ABPs) estão presentes nas antenas dos insetos e auxiliam na localização de locais de oviposição, alimentos e parceiros, especialmente em fêmeas (PICIMBON, 2020). Ainda, as OBPs de insetos podem ser classificadas com base em seu tamanho e número de resíduos de cisteína, OBPs clássicas com seis cisteínas, OBPs C-plus com oito cisteínas conservadas, C-minus com quatro e OBPs atípicas com nove a dez cisteínas conservadas (FAN et al., 2011).

Cada vez mais estudos mostram que as OBPs, além de solubilizar compostos odorantes hidrofóbicos na linfa sensilar das antenas, são expressas em outros tecidos, desempenhando funções mais amplas e apresentando afinidades variadas para diferentes ligantes (PELOSI et al., 2018). Encontradas também em órgãos gustativos, essas proteínas, como a Obp49a de *Drosophila*, podem inibir neurônios de paladar doce em resposta a compostos amargos (JEONG et al., 2013), enquanto outras, como Obp57d e Obp57e, influenciam a escolha de plantas hospedeiras nas moscas-das-frutas (MATSUO et al., 2007). Além disso, OBPs foram detectadas na hemolinfa (KIM et al., 2017), em tecidos reprodutivos (PITTS et al., 2014), cascas de ovos de mosquitos (AMENYA et al., 2010) e glândulas salivares de insetos (SANTIAGO et al., 2020b), demonstrando uma distribuição e funcionalidade mais ampla do que inicialmente se pensava. Dados de RNA-seq em *Drosophila* revelaram a expressão de mais de 25 OBPs em tecidos fora dos órgãos olfativos (LEADER et al., 2017).

As OBPs salivares são mais bem caracterizadas em mosquitos, onde formam a família multigênica D7, uma das mais abundantes nas glândulas salivares desses insetos (ARCÀ; RIBEIRO, 2018). As proteínas da família D7 atuam na modulação de respostas inflamatórias e na inibição da coagulação sanguínea. Elas fazem isso ao se ligarem a aminas biogênicas e leucotrienos, pequenas moléculas envolvidas na inflamação, alergias, permeabilidade vascular e regulação do tônus vascular. Funcionando como *kratagonistas*, as D7 se ligam a moléculas pró-inflamatórias, como serotonina, epinefrina, histamina e cisteinil-leucotrienos, reduzindo seus efeitos no hospedeiro e, assim, contribuindo para a eficácia da alimentação sanguínea. Fora a família D7, o conhecimento sobre as OBPs salivares é limitado. Observou-se que a maioria das proteínas D7 são reguladas positivamente nas glândulas salivares das fêmeas de mosquitos, o que destaca seu papel na aquisição de sangue (ARCÀ; RIBEIRO, 2018; CALVO et al., 2006, 2009; CHEA et al., 2024; MANS et al., 2007; WANG et al., 2020; ZAFAR et al., 2022) . Em um estudo recente, mosquitos *Aedes aegypti* com *knock-out* da proteína salivares AeD7L precisaram de mais tempo de sondagem em comparação aos mosquitos *wildtypes*, confirmando a importância das D7 na alimentação sanguínea (MARTIN-MARTIN et al., 2023)

A expressão das OBPs varia entre as espécies de insetos, com algumas apresentando de dezenas a centenas dessas proteínas (SUN; XIAO; CARLSON, 2018). Por exemplo, em *Aedes aegypti*, durante a alimentação sanguínea, as proteínas D7 estão entre as mais abundantes nas glândulas salivares das fêmeas (VALENZUELA et al., 2002). Nos triatomíneos, as OBPs são identificadas no sialoma, mas com uma expressão geralmente baixa. As sequências de OBPs foram encontradas no sialoproteoma de espécies como *P. lignarius* (NEVOA et al., 2018), *P. megistus* (RIBEIRO; SCHWARZ; FRANCISCHETTI, 2015), *T. infestans* (SCHWARZ et al., 2014), *T. rubrofasciata* (MIZUSHIMA et al., 2020), *T. dimidiata* (SANTIAGO et al., 2018) e *R. neglectus* (SANTIAGO et al., 2016). Em relação ao proteoma, até o momento, foram identificados em *T. dimidiata* (SANTIAGO et al., 2018) e *T. sordida* (PRAÇA et al., 2022). Na presente análise LC-MS do grupo de proteínas de ligação a odorantes, foram realizadas 9 identificações. No entanto, é relevante observar que apenas duas dessas proteínas apareceram em mais de uma réplica, e nenhuma identificação foi feita na réplica 3.

A baixa expressão das OBPs na saliva de triatomíneos levanta questões sobre seu papel na hematofagia. A OBP pode exercer sua função de maneira eficaz mesmo em concentrações baixas, possivelmente agindo de forma sinérgica com outras proteínas salivares (SILVA, 2024). Nesse sentido, mais estudos são necessários para esclarecer o papel das OBPs na saliva de triatomíneos.

As OBPs têm despertado crescente interesse e podem ser aplicadas em biotecnologia, como na produção de biossensores (LONDONO-RENTERIA et al., 2018). Nas últimas décadas, as OBPs têm sido exploradas como alvos promissores devido às suas características favoráveis, como solubilidade natural, estabilidade

estrutural e resistência à degradação térmica e proteolítica (GONÇALVES et al., 2021). Por exemplo, O D7L é reconhecido por sua imunogenicidade em humanos e tem sido sugerido como um possível marcador de exposição ao *Anopheles gambiae* (OSENO et al., 2022). Em um outro estudo, foi demonstrado que a resposta de IgG contra as proteínas recombinantes AeD7L1+2 serve como um marcador altamente sensível e específico para a exposição humana às picadas de *Aedes* spp. Com isso, os autores propuseram uma nova ferramenta sorológica que facilita a triagem rápida de indivíduos expostos a mosquitos potencialmente infectados (CHEA et al., 2024).

Foi descoberto que a expressão das OBPs é modulada em resposta a estímulos específicos, como infecções virais. Um exemplo relevante é o AeOBP22, uma OBP do *Aedes aegypti*, cuja expressão nas glândulas salivares é aumentada em resposta à infecção pelo vírus da dengue (DENV), em combinação com outros genes quimiossensoriais (LONDONO-RENTERIA et al., 2018; WANG et al., 2020). No entanto, estudos semelhantes ainda não foram realizados em triatomíneos. Existe uma lacuna significativa na pesquisa sobre as sequências das OBPs em triatomíneos, o que dificulta uma compreensão mais profunda sobre o papel dessas proteínas na alimentação sanguínea e na transmissão de doenças. A aplicação de técnicas como a proteômica pode ser fundamental para preencher essa lacuna, permitindo uma compreensão mais detalhada dos mecanismos moleculares envolvidos e potencialmente contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens para o controle de vetores.

6.1.7. Relacionado à imunidade

Durante a aquisição de sangue, os insetos hematófagos estão expostos a uma variedade de microrganismos que podem ser adquiridos tanto durante a alimentação quanto pela coprofagia, incluindo bactérias não simbióticas (EICHLER; SCHAUB, 2002). Diferentemente dos mosquitos, que também se alimentam de néctar e apresentam uma diversidade microbiana elevada na saliva (SHARMA et al., 2014), os triatomíneos consomem exclusivamente sangue, substância estéril, e aparentemente não necessitam de compostos antimicrobianos salivares (MEISER et al., 2023). Ainda assim, investigações revelam que as glândulas salivares de diferentes espécies de triatomíneos contêm uma variedade de bactérias, como *Candidatus Arsenophonus triatominarum* (HYPSA; DALE, 1997; LIMA et al., 2018).

Além da coprofagia, outras vias de infecção incluem o contato das partes bucais com a pele do hospedeiro antes e depois da alimentação e, em estágios de desenvolvimento, a ingestão de ar durante a muda (GUARNERI; SCHAUB, 2021; SALCEDO-PORRAS; LOWENBERGER, 2021). Além das bactérias simbióticas, os triatomíneos também entram em contato com o *Trypanosoma cruzi*, o que reforça a importância de seus mecanismos imunológicos na contenção desses patógenos (SALCEDO-PORRAS; LOWENBERGER, 2019, 2021).

A invasão de microorganismos desencadeiam uma resposta imune humoral, que resulta na produção e liberação de peptídeos antimicrobianos (KURATA, 2006). Nas glândulas salivares de triatomíneos, diversos genes que codificam esses peptídeos de diferentes massas moleculares são expressos e apresentam regulação positiva após a alimentação sanguínea, indicando uma função essencial da imunidade logo após a refeição (DE MARCO et al., 2010; KOLLIEN et al., 2001; MEISER et al., 2023). Entre esses AMPs destacam-se defensinas (4 kDa), inibidores de protease tipo pacifastina (4 kDa), diptericina (9 kDa), prolixicina (11 kDa), histonas (13 e 15 kDa), triatox (14,8 kDa), lisozimas (15 kDa), proteínas do tipo hemolisina (16 kDa), atacinas (20 kDa) e trialisinas (22 kDa) (ASSUMPÇAO et al., 2012; FLORES-VILLEGAS et al., 2015; MEISER et al., 2023; PRAÇA et al., 2022; RIBEIRO et al., 2012, 2014; SALCEDO-PORRAS; LOWENBERGER, 2019, 2021; SANTIAGO et al., 2020b). Na saliva de várias espécies de triatomíneos, foram encontradas proteínas antimicrobianas diversas, incluindo uma atacina, uma prolixicina, uma triatox e uma diptericina, além de oito defensinas, oito trialisinas e cinco lisozimas (MEISER et al., 2023; SALCEDO-PORRAS; LOWENBERGER, 2019).

No proteoma de *T. costalimai*, foram identificadas proteínas associadas à resposta imunológica, como Triatox (Q45KX2), Atacina putativa (A0A224XZX2) e uma Proteína bactericida de aumento de permeabilidade (*Bactericidal permeability-increasing protein* - BPI) (E2J7B6), além das hemolisinas e trialisinas que já foram discutidas.

A Triatox foi identificada na saliva de *T. infestans* (CHARNEAU et al., 2007). A triatox possui uma estrutura α-hélice anfipática, característica comum de peptídeos antimicrobianos, que lhe permite interagir com membranas celulares. Essa estrutura sugere que o triatox pode atuar como um peptídeo antimicrobiano, desempenhando um papel na defesa inata do triatomíneo (ASSUMPÇÃO et al., 2008). No sialoma de *T. sordida*, que também foi coletado em ambiente silvestre e peridomiciliar, foi encontrada uma sequência codificando a Triatox, entre os 100 contigs mais expressos na classe secretada, sugerindo sua relevância para a espécie (PRAÇA et al., 2022). Contudo, a eficácia da triatox em relação a bactérias Gram-positivas ou Gramnegativas ainda não foi explorada.

Uma proteína bactericida de aumento da permeabilidade (BPI) (E2J7B6) foi identificada no proteoma de T. costalimai em todas as réplicas, apresentando 100% de similaridade com uma BPI encontrada no transcriptoma de T. matogrossensis (ASSUMPÇAO et al., 2012). Essa proteína foi identificada também no transcriptoma das glândulas salivares de um percevejo predador Orius laevigatus (Hemiptera: Anthocoridae) (BAEK; LEE, 2014). Em triatomíneos, é a primeira vez que aparece no proteoma. A BPI é uma proteína antimicrobiana que participa da defesa dos insetos e tem alta afinidade pelos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa de bactérias Gram-negativas, às quais se liga e neutraliza (ELSBACH, 1998). Essa afinidade permite que a BPI interrompa rapidamente o crescimento bacteriano ao se ligar ao LPS de bactérias vivas, resultando em efeito citotóxico específico contra essas bactérias (WEISS, 2003). Além disso, a BPI atua na defesa contra infecções Gramnegativas e inibe processos inflamatórios ao interagir com a LBP (proteína de ligação a LPS), que, por sua vez, facilita a formação do complexo LPS-CD14, essencial para a resposta inflamatória mediada pelo receptor TLR4 (receptor Toll-like 4) (BAEK; LEE, 2014; KRASITY et al., 2011).

O desenvolvimento bacteriano em triatomíneos é controlado ou inibido por compostos antimicrobianos (LIMA al.. 2018: SALCEDO-PORRAS; et LOWENBERGER, 2019). Isso sugere que essas proteínas atuam na defesa desde o início da alimentação, e também têm um papel na proteção e digestão no estômago e intestino (GUMIEL et al., 2020). Nesse sentido, o mapeamento do proteoma permite entender a diversidade e a abundância dessas proteínas antimicrobianas, ampliando o conhecimento sobre os mecanismos de defesa e resistência dos triatomíneos silvestres. Além disso, contribui para elucidar a interação do vetor com os patógenos, como T. cruzi, que pode modular a produção de AMPs, influenciando a resposta imune do inseto e seu papel na transmissão da doença (SCHAUB, 2021).

100

6.2. Outras proteínas secretadas

6.2.1. Vitelogenina/Apolipoforina

Entre as proteínas secretadas no proteoma de *T. costalimai*, foram encontradas proteína cognata de choque térmico de 70 kDa (HSP70), a lipoproteína vitelogenina e a apolipoforina. Esses achados também aparecem no sialoma de *T. sordida* (PRAÇA et al., 2022), e sialocomplexomas de outros triatomíneos (SANTIAGO et al., 2020a), indicando uma possível função comum dessas proteínas no contexto da hematofagia.

A vitelogenina é uma lipoproteína precursora da vitelina que contribui de forma essencial para o desenvolvimento do oócito, fornecendo nutrientes necessários nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário (TUFAIL et al., 2014). Além de ser uma proteína de transporte de lipídios, a vitelogenina apresenta potencial para exercer funções fisiológicas distintas (SANTIAGO et al., 2020a). Em insetos hematófagos, sua presença pode estar associada à absorção e ao transporte de lipídios provenientes da dieta sanguínea (PRAÇA et al., 2022; SANTIAGO et al., 2020a).

As lipoforinas, lipoproteínas específicas de insetos, são compostas por lipídios e proteínas que transportam lipídios pela hemolinfa (DHAWAN et al., 2017). Foram descritas três apolipoforinas, sendo elas ApoLp-I, ApoLp-II e ApoLp-III (BLACKLOCK; RYAN, 1994). A apolipoforina-III (ApoLp-III) é uma proteína anfipática da hemolinfa que se liga hidrofobicamente a superfícies de lipoproteínas, facilitando o transporte de lipídios em meios aquosos (KIM et al., 2004). A apoLp-III tem papel importante na imunidade; além de atuar como uma molécula de reconhecimento de padrões na resposta imune, ela se liga e neutraliza componentes da parede celular de microrganismos (WHITTEN et al., 2004). A apoLp-III também auxilia na produção e na ativação de peptídeos antimicrobianos, regula o sistema de fenoloxidase e participa da coagulação da hemolinfa (DHAWAN et al., 2017).

Embora tanto a apolipoforina quanto a vitelogenina sejam proteínas transportadoras de lipídios na hemolinfa, foi proposto que cada uma possa desempenhar papéis alternativos na saliva: enquanto a apolipoforina pode estar

envolvida na mediação de respostas imunes, a vitelogenina parece mais relacionada ao transporte de lipídios alimentares (PRAÇA et al., 2022; SANTIAGO et al., 2020a).

6.2.2. Proteínas de choque térmico (Heat Shock protein)

As proteínas de choque térmico HSP70 e HSP90 foram identificadas como proteínas secretadas no proteoma de *T. costalimai.* As proteínas de choque térmico, também chamadas de chaperonas moleculares, ajudam a manter o correto dobramento de proteínas celulares, incluindo o redobramento de proteínas desnaturadas após estresse (KING; MACRAE, 2015). Elas podem ser expressas de forma contínua ou induzida por estresse, e são organizadas em cinco famílias principais com base no tamanho molecular: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e pequenas Hsps, cada uma com funções específicas no auxílio à manutenção proteica (KING; MACRAE, 2015).

Embora HSPs já tenham sido identificadas na saliva de triatomíneos, seu papel ainda não está claro. Foi proposto que a presença dessas proteínas pode ser resultado de uma contaminação acidental por proteínas do tecido das glândulas salivares, durante a dissecação e coleta de saliva (SANTIAGO et al., 2018, 2020a). Contudo, tanto nos estudo dos sialocomplexos de triatomíneos (SANTIAGO et al., 2020a) quanto no sialoma de *T. sordida* (PRAÇA et al., 2022), a HSP70 foi identificada entre as proteínas salivares, e aqui observou-se novamente sua presença como proteína putativamente secretada. Estudos anteriores indicam que a HSP70 poderia ter uma função no local da picada, interferindo na fibrinogenólise do hospedeiro, como observado em carrapatos (VORA et al., 2017).

Dessa forma, as mesmas proteínas foram novamente identificadas, agora no proteoma de *T. costalimai*, indicando sua possível secreção. Contudo, é necessário que estudos adicionais sejam realizados para elucidar de maneira mais precisa o papel dessas proteínas no processo de hematofagia.

6.2.3. Calreticulina

A calreticulina é uma proteína de ligação ao cálcio com diferentes funções, inicialmente reconhecida como uma chaperona molecular no retículo endoplasmático.

No entanto, investigações subsequentes demonstraram que ela também exerce papéis em ambientes intra e extracelulares, incluindo a saliva de artrópodes hematófagos (MICHALAK et al., 1999). A estrutura da calreticulina é composta por aproximadamente 400 resíduos de aminoácidos, organizados em três domínios principais. O primeiro é o domínio N-terminal, com cerca de 180 resíduos, que provavelmente adota uma estrutura globular. O segundo, o domínio central, possui cerca de 70 resíduos e contém três repetições de um motivo ácido de 17 aminoácidos. Esse domínio é responsável pela ligação ao cálcio com alta afinidade, mas com baixa capacidade. O terceiro domínio, o C-terminal, é rico em resíduos ácidos e lisina, ligando o cálcio com alta capacidade, porém com baixa afinidade (BAKSH; MICHALAK, 1991; COPPOLINO; DEDHAR, 1998; MICHALAK et al., 1999).

A calreticulina tem mostrado propriedades imunomoduladoras, sendo capaz de inibir a ativação da via clássica do complemento e do sistema de coagulação sanguínea em parasitas, como *Trypanosoma cruzi* (RAMÍREZ et al., 2011) e *Hemonchus contortus* (NARESHA et al., 2009). Além disso, foi proposto que a calreticulina pode atuar como um biomarcador de exposição a carrapatos em humanos ou até ser considerada um antígeno potencial para vacinas (DA SILVA VAZ JUNIOR et al., 2024).

Em relação a *Triatoma infestans*, foi identificado que a calreticulina (TiCRT) secretada nas glândulas salivares pode ter um papel importante na alimentação, ao inibir a via clássica de ativação do complemento. Estudos demonstraram que o domínio S da calreticulina, responsável pela interação com o componente C1 do complemento, tem capacidade de bloquear essa via, prevenindo a geração de C4b, um dos primeiros produtos da ativação do complemento. Essa adaptação pode ser um mecanismo de defesa do inseto contra os danos do sistema imunológico do hospedeiro durante a alimentação sanguínea, ajudando a proteger o trato digestivo anterior do inseto (WEINBERGER et al., 2017).

6.3. Proteínas constitutivas

O proteoma do extrato salivar de *T. costalimai* revelou a presença de diversas proteínas constitutivas, responsáveis por funções celulares essenciais e pela manutenção estrutural. Do total de 841 proteínas identificadas, 611 (aproximadamente

72,64%) corresponderam a proteínas constitutivas. Essas proteínas constitutivas foram agrupadas em 20 subcategorias, de acordo com os processos biológicos aos quais estão associadas. Entre as 611 proteínas constitutivas, os grupos mais representativos foram: maquinaria de síntese proteica (18,49%), modificação de proteínas (16,53%), metabolismo energético (7,52%), detoxificação e antioxidantes (7,36%) e processos metabólicos relacionados a proteínas (6,38%). Essas proteínas são expressas de forma constante e estão envolvidas em processos celulares essenciais. Embora inicialmente tenham sido consideradas como contaminação de outros tecidos durante a extração (SANTIAGO et al., 2020a), na realidade, elas contribuem para a formação de moléculas com funções importantes na saliva (PRAÇA et al., 2022).

6.4. Distribuição das proteínas nas réplicas analisadas

As análises das diferentes réplicas revelaram variações nas proteínas identificadas, com a presença de proteínas exclusivas em cada uma delas (Tabela 4). Essas diferenças podem estar associadas a variações biológicas, à sensibilidade técnica ou a condições experimentais.

Entre as proteínas exclusivas em cada uma das réplicas, algumas desempenham papéis relevantes na fisiologia salivar dos triatomíneos. Por exemplo, na réplica 2 (R2), foi identificado o inibidor de protease A0A224X4N3, descrito como um '*Putative serine proteinase inhibitor kunitz family with thrombospondin repeat*', além de duas serino proteases (A0A170XJP7 e A0A0V0G395), todas com funções potenciais na regulação da hemostasia do hospedeiro. Ainda em R2, foram encontradas duas cisteíno proteases, como A0A161MSP6, e a proteína antimicrobiana '*Putative attacin*' (A0A224XZX2), com provável função de defesa contra microrganismos. Na réplica 4 (R4), foi constatada a presença de uma protease do tipo aspártico (A0A170ZM10), que pode estar envolvida na digestão de proteínas do sangue. Já na réplica 3 (R3), um membro da família do antígeno 5, E2J7I3, foi identificado, uma proteína conhecida por seu papel na modulação da resposta imune do hospedeiro. Em R1 e R4, diferentes sequências de proteínas de ligação a odorantes (*odorant binding proteins*) foram detectadas.

Essas identificações reforçam a importância de considerar as proteínas exclusivas de cada réplica, uma vez que muitas delas possuem funções significativas na saliva dos triatomíneos e poderiam ser ignoradas se apenas as proteínas comuns entre as réplicas fossem avaliadas. A lista completa dessas proteínas exclusivas pode ser encontrada no Anexo 2. Embora a inclusão dessas proteínas exclusivas não aumente de forma tão significativa o número total de achados, o padrão de presença na saliva se mantém consistente. A adição de novas identificações é interessante pois algumas dessas proteínas ainda não haviam sido identificadas em análises proteômicas de outros triatomíneos, apesar de suas sequências terem sido detectadas em estudos transcriptômicos.

No entanto, como o transcriptoma de *T. costalimai* não está disponível, as identificações de proteínas neste estudo foram feitas com o banco de dados de triatomíneos do Uniprot, o que limitou a análise, já que um transcriptoma específico das glândulas salivares poderia melhorar a precisão e revelar proteínas exclusivas dessa espécie. Diante disso, embora as proteínas putativamente secretadas e relacionadas à hematofagia tenham sido identificadas em menor abundância em comparação com proteínas constitutivas, foi possível confirmar a presença de proteínas cruciais para o processo de alimentação sanguínea.

Por fim, análise realizada pelo *Gene ontology* demonstrou que uma única sequência esteve atribuída a mais de um termo GO. No contexto da saliva, essa redundância reflete as múltiplas funções das proteínas presentes, destacando sua principal atividade: interferir no sistema de defesa do hospedeiro. Isso ocorre por meio de mecanismos como a inibição da hemostasia, vasodilatação, bloqueio da agregação plaquetária, ação anticoagulante, anestésica e a modulação das respostas imunes inata e adquirida do hospedeiro (ARCÀ; RIBEIRO, 2018; DE ARAÚJO et al., 2012; MONTANDON et al., 2016). Esses papéis reforçam os resultados previamente observados, que evidenciam a complexidade das interações entre o vetor e o hospedeiro.

7. CONCLUSÃO

Nesse estudo, foi possível estabelecer uma colônia de *T. costalimai,* um vetor secundário da doença de Chagas, no Insetário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília a partir de indivíduos coletados em ambientes peridomiciliares. O extrato salivar de *T. costalimai* adultos foi coletado e submetido a análise proteômica, permitindo a realização da primeira descrição do sialoproteoma da espécie.

Em concordância com estudos anteriores sobre a saliva de triatomíneos, a família das lipocalinas foi a mais abundante dentro do grupo de proteínas putativamente secretadas em *T. costalimai*. Além das lipocalinas, foram identificadas proteínas frequentemente encontradas na saliva de triatomíneos, como hemolisinas/trialisinas, antígeno-5 e proteínas de ligação a odorantes. A análise do proteoma de *T. costalimai* também revelou uma diversidade de enzimas, bem como várias proteínas relacionadas à imunidade, incluindo peptídeos antimicrobianos.

As funções desempenhadas pelas proteínas salivares dos triatomíneos apresentam redundância, reforçando o papel dessas moléculas na superação das defesas do hospedeiro. A análise das glândulas salivares de *T. costalimai* contribui, portanto, para aumentar o conhecimento sobre as adaptações moleculares específicas dessa espécie e seu potencial papel na transmissão da doença de Chagas.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar a análise transcriptômica das glândulas salivares de Triatoma costalimai;
- ✓ Validar as identificações de proteínas, investigando a presença de proteínas exclusivas dessa espécie e avaliando a abundância relativa das mesmas;
- ✓ Elaborar uma descrição detalhada do sialoma completo de *T. costalimai*, proporcionando uma visão mais aprofundada sobre suas proteínas salivares.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS,

- ABBAS, M. N. et al. Serpins in Tick Physiology and Tick-Host Interaction. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 12, p. 892770, 2022.
- ABRAHAM, A.; CHANDLER, D. E. Tracing the Evolutionary History of the CAP Superfamily of Proteins Using Amino Acid Sequence Homology and Conservation of Splice Sites. **Journal of Molecular Evolution**, v. 85, n. 3–4, p. 137–157, out. 2017.
- AKERSTROM, B.; FLOWER, D. R.; SALIER, J. P. Lipocalins: unity in diversity. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1482, n. 1–2, p. 1–8, 18 out. 2000.
- ALEVI, K. C. C. et al. Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1627, dez. 2021.
- ALI, A. et al. Probing the functional role of tick metalloproteases. **Physiological Entomology**, v. 40, n. 3, p. 177–188, 2015a.
- ALI, A. et al. Immunoprotective potential of a Rhipicephalus (Boophilus) microplus metalloprotease. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 1–2, p. 107–114, 15 jan. 2015b.
- ALVES-SILVA, J. et al. An insight into the sialome of Glossina morsitans morsitans. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 213, 30 mar. 2010.
- AMENYA, D. A. et al. Proteomics reveals novel components of the Anopheles gambiae eggshell. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 10, p. 1414, 5 maio 2010.
- AMERI, M. et al. An immunoglobulin binding protein (antigen 5) of the stable fly (Diptera: Muscidae) salivary gland stimulates bovine immune responses. Journal of Medical Entomology, v. 45, n. 1, p. 94–101, jan. 2008.
- AMINO, R.; TANAKA, A. S.; SCHENKMAN, S. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 4–5, p. 465–472, 15 mar. 2001.
- ANDERSEN, J. F. et al. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 4611–4617, 2003.
- ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. C. A secreted salivary inositol polyphosphate 5phosphatase from a blood-feeding insect: allosteric activation by soluble phosphoinositides and phosphatidylserine. **Biochemistry**, v. 45, n. 17, p. 5450–5457, 2 maio 2006.
- ANDRADE, M. V. et al. The economic burden of Chagas disease: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 11, p. e0011757, 22 nov. 2023.
- ARAUJO, R. N. et al. Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from Triatoma brasiliensis (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 12, p. 1351–1358, out. 2007.
- ARCÀ, B.; RIBEIRO, J. M. Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit. **Current opinion in insect science**, v. 29, p. 102–109, 2018.
- ASCENZI, P. et al. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 231–251, jun. 2003.
- ASSUMPÇÃO, T. C. et al. An insight into the sialome of the blood-sucking bug Triatoma infestans, a vector of Chagas' disease. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 2, p. 213–232, 2008.
- ASSUMPÇAO, T. C. et al. An insight into the sialotranscriptome of Triatoma matogrossensis, a kissing bug associated with fogo selvagem in South America. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 6, p. 1005, 2012.
- ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. Dipetalodipin, a Novel Multifunctional Salivary Lipocalin That Inhibits Platelet Aggregation, Vasoconstriction, and Angiogenesis through Unique Binding Specificity for TXA2, PGF2α, and 15(S)-HETE *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 50, p. 39001–39012, 10 dez. 2010.
- ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. Insight into the salivary transcriptome and proteome of Dipetalogaster maxima. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 2, p. 669–679, 4 fev. 2011.
- ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. Salivary antigen-5/CAP family members are Cu2+-dependent antioxidant enzymes that scavenge O₂₋. and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 20, p. 14341–14361, 17 maio 2013.
- ASTLE, M. V. et al. The inositol polyphosphate 5-phosphatases: traffic controllers, waistline watchers and tumour suppressors? Biochemical Society Symposia. Anais...Portland Press Ltd., 2007. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemsocsymp/articleabstract/doi/10.1042/BSS2007c15/51002>. Acesso em: 27 out. 2024
- BAEK, J. H.; LEE, S. H. Differential gene expression profiles in the salivary gland of *Orius laevigatus*. Journal of Asia-Pacific Entomology, v. 17, n. 4, p. 729–735, 1 dez. 2014.
- BAKER, E. N.; LINDLEY, P. F. New perspectives on the structure and function of transferrins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 147–160, 15 ago. 1992.
- BAKSH, S.; MICHALAK, M. Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca2+ binding domains. The Journal of Biological Chemistry, v. 266, n. 32, p. 21458– 21465, 15 nov. 1991.
- BARBER, M. F.; ELDE, N. C. Buried Treasure: Evolutionary Perspectives on Microbial Iron Piracy. **Trends in genetics: TIG**, v. 31, n. 11, p. 627–636, nov. 2015.
- BARBOSA, H. J. et al. Comparative proteomic analysis of the hemolymph and salivary glands of Rhodnius prolixus and R. colombiensis reveals candidates associated with differential lytic activity against Trypanosoma cruzi I and T. cruzi II. **bioRxiv**, p. 2023–06, 2023.
- BARRETT, A. J. Proteases. **Current Protocols in Protein Science**, v. Chapter 21, p. Unit 21.1, maio 2001.
- BAZON, M. L. et al. Current Advances in Immunological Studies on the Vespidae Venom Antigen 5: Therapeutic and Prophylaxis to Hypersensitivity Responses. **Toxins**, v. 10, n. 8, p. 305, 24 jul. 2018.

- BENNET-CLARK, H. C. Negative pressures produced in the pharyngeal pump of the bloodsucking bug, Rhodnius prolixus. Journal of Experimental Biology, v. 40, n. 1, p. 223–229, 1963.
- BENSIMON, A.; HECK, A. J. R.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry–Based Proteomics and Network Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 379–405, 7 jul. 2012.
- BEZERRA, C. M. et al. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of Trypanosoma cruzi in the Caatinga area colonised by Triatoma brasiliensis. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, v. 109, n. 7, p. 887–898, nov. 2014.
- BHAKDI, S. et al. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. **Archives of Microbiology**, v. 165, n. 2, p. 73–79, fev. 1996.
- BHOWMICK, B.; HAN, Q. Understanding Tick Biology and Its Implications in Anti-tick and Transmission Blocking Vaccines Against Tick-Borne Pathogens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 9 jun. 2020.
- BLACKLOCK, B. J.; RYAN, R. O. Hemolymph lipid transport. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 24, n. 9, p. 855–873, out. 1994.
- BLUM, M. et al. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. **Nucleic** Acids Research, v. 49, n. D1, p. D344–D354, 8 jan. 2021.
- Boletim Epidemiológico Volume 55 nº 08 Ministério da Saúde. Disponível em: ">https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-08.pdf/view>. Acesso em: 9 nov. 2024.
- BOWLES, V. M. et al. Effect of a New Head Lice Treatment, Abametapir Lotion, 0.74%, on Louse Eggs: A Randomized, Double-Blind Study. **Global Pediatric Health**, v. 6, p. 2333794X19831295, 2019.
- BREUGELMANS, B. et al. Identification, distribution and molecular evolution of the pacifastin gene family in Metazoa. **BMC evolutionary biology**, v. 9, p. 97, 12 maio 2009.
- BROOS, K. et al. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Reviews**, v. 25, n. 4, p. 155–167, jul. 2011.
- BUSSACOS, A. C. et al. Redundancy of proteins in the salivary glands of Panstrongylus megistus secures prolonged procurement for blood meals. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1693–1700, 2011.
- CALVO, E. et al. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 1935–1942, 2006.
- CALVO, E. et al. An insight into the sialome of Anopheles funestus reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 164–175, fev. 2007.
- CALVO, E. et al. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, n. 10, p. 3728–3733, 10 mar. 2009.

- CAMPOS, F. F. et al. One genome, multiple phenotypes: Would Rhodnius milesi Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001 (Hemiptera, Triatominae) be a valid species or a phenotypic polymorphism of R. neglectus Lent, 1954? **Diversity**, v. 16, n. 8, p. 472, 2024.
- CAMPOS, I. T. N. et al. Infestin, a thrombin inhibitor presents in Triatoma infestans midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 9, p. 991–997, set. 2002.
- CANAVOSO, L. E.; RUBIOLO, E. R. Interconversions of lipophorin particles by adipokinetic hormone in hemolymph of *Panstrongylus megistus*, *Dipetalogaster maximus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, v. 112, n. 1, p. 143–150, 1 set. 1995.
- CAO, X.; GULATI, M.; JIANG, H. Serine protease-related proteins in the malaria mosquito, Anopheles gambiae. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 88, p. 48, 2 ago. 2017.
- CARLOS SILVEIRA, A.; RAMOS FEITOSA, V.; BORGES, R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975-83, Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 36, p. 15–312, 1984.
- CARVALHO, B. M. DE et al. Vector-borne diseases in Brazil: climate change and future warming scenarios. **Sustainability in Debate**, v. 11, n. 3, p. 361–404, 31 dez. 2020.
- CAVASSIN, F. B. et al. Genetic variability and geographical diversity of the main Chagas' disease vector Panstrongylus megistus (Hemiptera: Triatominae) in Brazil based on ribosomal DNA intergenic sequences. **Journal of medical entomology**, v. 51, n. 3, p. 616–628, 2014.
- CEVALLOS, A. M.; HERNÁNDEZ, R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 401864, 2014.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159–218, ago. 1909.
- CHAMPAGNE, D. E. et al. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito Aedes aegypti is a member of the 5'-nucleotidase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 3, p. 694–698, 31 jan. 1995.
- CHANCEY, R. J.; EDWARDS, M. S.; MONTGOMERY, S. P. Congenital Chagas Disease. **Pediatrics in Review**, v. 44, n. 4, p. 213–221, 1 abr. 2023.
- CHARLAB, R. et al. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings** of the National Academy of Sciences, v. 96, n. 26, p. 15155–15160, 21 dez. 1999.
- CHARNEAU, S. et al. The saliva proteome of the blood-feeding insect Triatoma infestans is rich in platelet-aggregation inhibitors. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 268, n. 2–3, p. 265–276, 2007.
- CHEA, S. et al. Antibodies to Aedes aegypti D7L salivary proteins as a new serological tool to estimate human exposure to Aedes mosquitoes. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1368066, 1 maio 2024.

- COLINGE, J.; BENNETT, K. L. Introduction to computational proteomics. **PLoS** computational biology, v. 3, n. 7, p. e114, 2007.
- COLLIN, N. et al. Lufaxin, a novel factor Xa inhibitor from the salivary gland of the sand fly Lutzomyia longipalpis blocks protease-activated receptor 2 activation and inhibits inflammation and thrombosis in vivo. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2185–2198, set. 2012.
- COPPOLINO, M. G.; DEDHAR, S. Calreticulin. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 30, n. 5, p. 553–558, maio 1998.
- COSTA, C. M. et al. 2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: Rhodnius brethesi and Rhodnius robustus. **Journal** of proteomics, v. 74, n. 9, p. 1652–1663, 2011.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, maio 2015.
- CRICHTON, R. R.; CHARLOTEAUX-WAUTERS, M. Iron transport and storage. European Journal of Biochemistry, v. 164, n. 3, p. 485–506, 1987.
- CROWELL, A. M. J.; WALL, M. J.; DOUCETTE, A. A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica Chimica Acta**, v. 796, p. 48–54, 24 set. 2013.
- CUI, F. et al. Two single mutations commonly cause qualitative change of nonspecific carboxylesterases in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2011.
- DA SILVA VAZ JUNIOR, I. et al. Changes in saliva protein profile throughout Rhipicephalus microplus blood feeding. **Parasites & Vectors**, v. 17, n. 1, p. 36, 27 jan. 2024.
- DE ALMEIDA, P. S. et al. New occurrence of Triatoma costalimai Verano e Galvão, 1958 (Hemiptera, Triatominae) in Mato Grosso do Sul, Brazil, a vector of Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909), endemic to the Brazilian Cerrado. Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology, v. 48, n. 2, p. 138–140, dez. 2023.
- DE ARAÚJO, C. N. et al. Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3829–3841, 2012.
- DE ARAÚJO, C. N. et al. The biotechnological potential of proteases from hematophagous arthropod vectors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1287492, 2023.
- DE MAGALHÃES, M. T. Q. et al. Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 9–10, p. 606–609, 2018.
- DE MARCO, R. et al. The first pacifastin elastase inhibitor characterized from a blood sucking animal. **Peptides**, v. 31, n. 7, p. 1280–1286, jul. 2010.

- DE MIRANDA, V. L. et al. Triatoma costalimai, a neglected vector of Trypanosoma cruzi in the Cerrado savannas of South America: A comprehensive review. Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases, v. 2, p. 100102, 2022.
- DE SOUSA, A. S. et al. Chagas disease. **The Lancet**, v. 403, n. 10422, p. 203–218, 13 jan. 2024.
- DECREM, Y. et al. A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick lxodes ricinus. **The FEBS journal**, v. 275, n. 7, p. 1485–1499, abr. 2008.
- DHAWAN, R. et al. Apolipophorin-III Acts as a Positive Regulator of Plasmodium Development in Anopheles stephensi. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 185, 7 abr. 2017.
- DIOTAIUTI, L. et al. Aspectos operacionais do controle do Triatoma brasiliensis. **Cadernos** de Saúde Pública, v. 16, p. S61–S67, 2000.
- DONPUDSA, S.; TASSANAKAJON, A.; RIMPHANITCHAYAKIT, V. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp Penaeus monodon. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 4, p. 481–488, abr. 2009.
- DOS SANTOS SOUZA, É. et al. Rhodnius spp. are differentiated based on the peptide/protein profile by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and chemometric tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 6, p. 1431–1439, fev. 2020.
- DUMERMUTH, E. et al. The astacin family of metalloendopeptidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 32, p. 21381–21385, 15 nov. 1991.
- DUPREE, E. J. et al. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of this Field. **Proteomes**, v. 8, n. 3, p. 14, 6 jul. 2020.
- DURÃES-OLIVEIRA, J. et al. Chagas Disease: A Silent Threat for Dogs and Humans. International Journal of Molecular Sciences, v. 25, n. 7, p. 3840, 29 mar. 2024.
- DURAND, M. J.; GUTTERMAN, D. D. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. Microcirculation (New York, N.Y.: 1994), v. 20, n. 3, p. 239–247, abr. 2013.
- ECHAVARRÍA, N. G. et al. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Current Problems in Cardiology**, v. 46, n. 3, p. 100507, mar. 2021.
- EHRMAN, M.; TOTH, E.; FROJMOVIC, M. A platelet procoagulant activity associated with platelet shape change. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 92, n. 3, p. 393–401, set. 1978.
- ELIUK, S.; MAKAROV, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 61–80, 22 jul. 2015.
- ELSBACH, P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. Journal of Leukocyte Biology, v. 64, n. 1, p. 14–18, 1 jul. 1998.
- FALKENBERG, F. et al. Phylogenetic survey of the subtilase family and a data-mining-based search for new subtilisins from Bacillaceae. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1017978, 26 set. 2022.

- FAN, J. et al. An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 10, n. 4, p. 3056–3069, 8 dez. 2011.
- FARIA, M. R. DE; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control, v. 43, n. 3, p. 237–256, 1 dez. 2007.
- FAUDRY, E. et al. Triatoma infestans apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19607–19613, 7 maio 2004.
- FAUDRY, E. et al. Salivary apyrases of Triatoma infestans are assembled into homooligomers. **The Biochemical Journal**, v. 396, n. 3, p. 509–515, 15 jun. 2006.
- FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 32, n. 5, p. 416–421, 2010.
- FIGUEIREDO, J.; SILVA, M. S.; FIGUEIREDO, A. Subtilisin-like proteases in plant defence: the past, the present and beyond. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 4, p. 1017, 26 jul. 2017.
- FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Orally-transmitted Chagas disease. **Medicina Clinica**, v. 148, n. 3, p. 125–131, 9 fev. 2017.
- FLÓ, M. et al. Functional diversity of secreted cestode Kunitz proteins: Inhibition of serine peptidases and blockade of cation channels. PLoS pathogens, v. 13, n. 2, p. e1006169, 2017.
- FLORES-VILLEGAS, A. L. et al. Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. Bulletin of Entomological Research, v. 105, n. 5, p. 523– 532, 2015.
- FLOWER, D. R. The lipocalin protein family: structure and function. **The Biochemical Journal**, v. 318 (Pt 1), n. Pt 1, p. 1–14, 15 ago. 1996.
- FLOWER, D. R. Experimentally determined lipocalin structures. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1482, n. 1–2, p. 46–56, 18 out. 2000.
- FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 964–998, 2006.
- FRANCISCHETTI, I. M. et al. The role of saliva in tick feeding. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, v. 14, p. 2051, 2009.
- FRIEDRICH, T. et al. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from Rhodnius prolixus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 22, p. 16216–16222, 5 ago. 1993.
- FRIEND, W. G.; SMITH, J. J. B. Feeding in Rhodnius prolixus: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. Journal of insect Physiology, v. 17, n. 2, p. 233–243, 1971.
- FUENTES-PRIOR, P. et al. Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 94, n. 22, p. 11845–11850, 28 out. 1997.

- GAO, B.-J. et al. Subtilisin-like Pr1 proteases marking the evolution of pathogenicity in a widespectrum insect-pathogenic fungus. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 365–380, dez. 2020.
- GARCIA, A. R. M. et al. Screening of Fungi for Biological Control of a Triatomine Vector of Chagas Disease: Temperature and Trypanosome Infection as Factors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005128, 17 nov. 2016.
- GARCIA, E. S. et al. Induction of Trypanosoma cruzi metacyclogenesis in the gut of the hematophagous insect vector, Rhodnius prolixus, by hemoglobin and peptides carrying αD-globin sequences. **Experimental parasitology**, v. 81, n. 3, p. 255–261, 1995.
- GENSBERG, K.; JAN, S.; MATTHEWS, G. M. Subtilisin-related serine proteases in the mammalian constitutive secretory pathway. Seminars in cell & developmental biology. Anais...Elsevier, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952197901968>. Acesso em: 25 out. 2024
- GETTINS, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4751–4804, dez. 2002.
- 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. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 865–897, dez. 2008.
- GILLET, L. C.; LEITNER, A.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing. **Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)**, v. 9, n. 1, p. 449–472, 12 jun. 2016.
- GOLDING, N. et al. Integrating vector control across diseases. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 249, 1 out. 2015.
- GOMEZ, M. et al. Revised New World bioregions and environmental correlates for vectors of Chagas disease (Hemiptera, Triatominae). Acta Tropica, v. 249, p. 107063, 2024.
- GÓMEZ-OCHOA, S. A. et al. Global, regional, and national trends of Chagas disease from 1990 to 2019: comprehensive analysis of the global burden of disease study. **Global heart**, v. 17, n. 1, 2022.
- GONÇALVES, F. et al. Biotechnological applications of mammalian odorant-binding proteins. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 441–455, maio 2021.
- GRAÇA-SOUZA, A. V. et al. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 4, p. 322–335, 2006.
- GREEN, D. Coagulation cascade. Hemodialysis International. International Symposium on Home Hemodialysis, v. 10 Suppl 2, p. S2-4, out. 2006.
- GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae): role of a midgut triacylglycerol-lipase. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 37, n. 6, p. 579–588, jun. 2007.

- GRZYB, J.; LATOWSKI, D.; STRZAŁKA, K. Lipocalins a family portrait. Journal of Plant Physiology, v. 163, n. 9, p. 895–915, set. 2006.
- GUARNERI, A. A.; PEREIRA, M. H.; DIOTAIUTI, L. Influence of the blood meal source on the development of Triatoma infestans, Triatoma brasiliensis, Triatoma sordida, and Triatoma pseudomaculata (Heteroptera, Reduviidae). Journal of Medical Entomology, v. 37, n. 3, p. 373–379, maio 2000.
- GUARNERI, A. A.; SCHAUB, G. A. Interaction of Triatomines with Their Bacterial Microbiota and Trypanosomes. Em: GUARNERI, A.; LORENZO, M. (Eds.). Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors. Entomology in Focus. Cham: Springer International Publishing, 2021. v. 5p. 345–386.
- GUARNERI, A.; LORENZO, M. (EDS.). Triatominae The Biology of Chagas Disease Vectors. Cham: Springer International Publishing, 2021. v. 5
- GUHL, F. Chagas disease in pre-Colombian civilizations. Em: American Trypanosomiasis Chagas Disease. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 23–46.
- GUMIEL, M. et al. Proteome of the Triatomine Digestive Tract: From Catalytic to Immune Pathways; Focusing on Annexin Expression. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 589435, 9 dez. 2020.
- GURGEL-GONÇALVES, R. et al. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 997–1011, 15 jun. 2005.
- HAENDLER, B. et al. Expression, purification and characterisation of recombinant pallidipin, a novel platelet aggregation inhibitor from the haematophageous triatomine bug Triatoma pallidipennis. Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis, v. 7, n. 2, p. 183–186, mar. 1996.
- HAJDUSEK, O. et al. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 4, p. 1033–1038, 27 jan. 2009.
- HAJDUSEK, O. et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. **Vaccine**, v. 28, n. 17, p. 2993–2998, 9 abr. 2010.
- HAKIM, S. et al. Inositol polyphosphate phosphatases in human disease. Current Topics in Microbiology and Immunology, v. 362, p. 247–314, 2012.
- HALLGREN, J. et al. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. **BioRxiv**, p. 2022–04, 2022.
- HAMER, G. L. et al. Development of an operational trap for collection, killing, and preservation of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): the kissing bug kill trap. **Journal of Medical Entomology**, p. tjae087, 18 jul. 2024.

- HASIN, Y.; SELDIN, M.; LUSIS, A. Multi-omics approaches to disease. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 83, 5 maio 2017.
- HERNÁNDEZ-VARGAS, M. J. et al. Proteomic and transcriptomic analysis of saliva components from the hematophagous reduviid Triatoma pallidipennis. Journal of proteomics, v. 162, p. 30–39, 2017.
- HERNÁNDEZ-VARGAS, M. J.; SANTIBÁÑEZ-LÓPEZ, C. E.; CORZO, G. An Insight into the Triabin Protein Family of American Hematophagous Reduviids: Functional, Structural and Phylogenetic Analysis. **Toxins**, v. 8, n. 2, p. 44, 15 fev. 2016.
- HOFFLIN, J. M. et al. Laboratory-acquired Chagas disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 81, n. 3, p. 437–440, 1987.
- HOFFMAN, D. R. Allergens in Hymenoptera venom XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 92, n. 5, p. 707–716, 1 nov. 1993.
- HOTELIER, T. et al. Insecticide resistance through mutations in cholinesterases or carboxylesterases: data mining in the ESTHER database. **Journal of pesticide science**, v. 35, n. 3, p. 315–320, 2010.
- HOTEZ, P. J. Forgotten people, forgotten diseases: the neglected tropical diseases and their impact on global health and development. [s.l.] John Wiley & Sons, 2021.
- HUGHES, A. L. Evolution of the salivary apyrases of blood-feeding arthropods. **Gene**, v. 527, n. 1, p. 123–130, 15 set. 2013.
- HUGO, R. L. E.; BIRRELL, G. W. Proteomics of Anopheles Vectors of Malaria. Trends in Parasitology, v. 34, n. 11, p. 961–981, nov. 2018.
- HYLAND, C. et al. Membrane Interaction of Escherichia coli Hemolysin: Flotation and Insertion-Dependent Labeling by Phospholipid Vesicles. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5364, set. 2001.
- HYPSA, V.; DALE, C. In Vitro Culture and Phylogenetic Analysis of "Candidatus Arsenophonus triatominarum," an Intracellular Bacterium from the Triatomine Bug, Triatoma infestans. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 47, n. 4, p. 1140–1144, 1 out. 1997.
- IMAMURA, S. et al. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from Haemaphysalis longicornis. **Experimental & Applied Acarology**, v. 48, n. 4, p. 345–358, ago. 2009.
- JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. C. Trypanosoma cruzi enzootic cycle: General aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. Em: **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 265–282.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. The multiple and complex and changeable scenarios of the Trypanosoma cruzi transmission cycle in the sylvatic environment. Acta Tropica, v. 151, p. 1–15, nov. 2015.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. Ecological aspects of Trypanosoma cruzi: wild hosts and reservoirs. Em: American Trypanosomiasis Chagas Disease. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 243–264.

- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. D. C.; ROQUE, A. L. R. Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. Parasites & Vectors, v. 11, n. 1, p. 502, dez. 2018.
- JEONG, Y. T. et al. An Odorant Binding Protein required for suppression of sweet taste by bitter chemicals. **Neuron**, v. 79, n. 4, p. 725, 21 ago. 2013.
- JMEL, M. A. et al. Tick Salivary Kunitz-Type Inhibitors: Targeting Host Hemostasis and Immunity to Mediate Successful Blood Feeding. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 2, p. 1556, 13 jan. 2023.
- JUSTI, S. A. et al. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 149, 31 mar. 2014.
- KATO, H. et al. A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the bloodsucking bug, Triatoma dimidiata, a vector of Chagas disease. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, v. 10, n. 2, p. 184–191, mar. 2010.
- KATO, H. et al. Salivary lipocalin family proteins from Panstrongylus chinai, a vector of Chagas disease. **Data in Brief**, v. 15, p. 272–280, dez. 2017.
- KATOA, H. et al. A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the bloodsucking bug, Triatoma dimidiata, a vector of Chagas. Infect Genet Evol, v. 10, n. 2, p. 184– 191, 2010.
- KIM, H. J. et al. Immune activation of apolipophorin-III and its distribution in hemocyte from Hyphantria cunea. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 34, n. 10, p. 1011– 1023, out. 2004.
- KIM, I. H. et al. A mosquito hemolymph odorant-binding protein family member specifically binds juvenile hormone. The Journal of Biological Chemistry, v. 292, n. 37, p. 15329– 15339, 15 set. 2017.
- KING, A. M.; MACRAE, T. H. Insect heat shock proteins during stress and diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 59–75, 7 jan. 2015.
- KING, T. P.; SPANGFORT, M. D. Structure and Biology of Stinging Insect Venom Allergens. International Archives of Allergy and Immunology, v. 123, n. 2, p. 99–106, 2000.
- KOLLIEN, A. H. et al. lonic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug Triatoma infestans. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 7, p. 739–747, 2001.
- KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. The development of Trypanosoma cruzi in triatominae. **Parasitology today**, v. 16, n. 9, p. 381–387, 2000.
- KOLLIPARA, L.; ZAHEDI, R. P. Protein carbamylation: in vivo modification or in vitro artefact? **Proteomics**, v. 13, n. 6, p. 941–944, mar. 2013.
- KOSMAN, D. J. Redox cycling in iron uptake, efflux, and trafficking. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 35, p. 26729–26735, 27 ago. 2010.
- KRASITY, B. C. et al. LBP/BPI proteins and their relatives: conservation over evolution and roles in mutualism. Biochemical Society Transactions, v. 39, n. 4, p. 1039–1044, 20 jul. 2011.

- KUNITZ, M.; NORTHROP, J. H. ISOLATION FROM BEEF PANCREAS OF CRYSTALLINE TRYPSINOGEN, TRYPSIN, A TRYPSIN INHIBITOR, AND AN INHIBITOR-TRYPSIN COMPOUND. **The Journal of General Physiology**, v. 19, n. 6, p. 991, 20 jul. 1936.
- KURATA, S. Recognition and elimination of diversified pathogens in insect defense systems. **Molecular Diversity**, v. 10, n. 4, p. 599–605, nov. 2006.
- LACOMBE, D. Anatomia e histologia das glândulas salivares nos triatomíneos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 557–564, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.
- LAROCHE, M. et al. MALDI-TOF MS protein profiling for the rapid identification of Chagas disease triatomine vectors and application to the triatomine fauna of French Guiana. **Parasitology**, v. 145, n. 5, p. 665–675, abr. 2018.
- LAVOIPIERRE, M. M. J.; DICKERSON, G.; GORDON, R. M. Studies on the Methods of Feeding of Blood-sucking Arthropods: I—The Manner in Which Triatomine Bugs Obtain Their Blood-Meal, as Observed in the Tissues of the Living Rodent, with Some Remarks on the Effects of the Bite on Human Volunteers. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 53, n. 2, p. 235–250, jun. 1959.
- LAZZARI, C. R. The Behaviour of Kissing Bugs. Em: GUARNERI, A.; LORENZO, M. (Eds.). Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors. Entomology in Focus. Cham: Springer International Publishing, 2021. v. 5p. 215–238.
- LEADER, D. P. et al. FlyAtlas 2: a new version of the Drosophila melanogaster expression atlas with RNA-Seq, miRNA-Seq and sex-specific data. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. Database issue, p. D809, 24 out. 2017.
- LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. 1979.
- LIANG, Z. et al. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 94, n. 13, p. 6682–6687, 24 jun. 1997.
- LIMA, M. S. et al. Bacterial community composition in the salivary glands of triatomines (Hemiptera: Reduviidae). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006739, 13 set. 2018.
- LOMBARDO, F. et al. Promoter Sequences of the Putative Anopheles gambiae Apyrase Confer Salivary Gland Expression in Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31, p. 23861–23868, 4 ago. 2000.
- LONDONO-RENTERIA, B. L. et al. Serosurvey of Human Antibodies Recognizing Aedes aegypti D7 Salivary Proteins in Colombia. **Frontiers in Public Health**, v. 6, 18 maio 2018.
- LORENZO, M. G. et al. Microclimatic properties of the Triatoma brasiliensis habitat. **Cadernos** de Saúde Pública, v. 16, p. S69–S74, 2000.
- LOSHOUARN, H.; GUARNERI, A. A. The interplay between temperature, Trypanosoma cruzi parasite load, and nutrition: Their effects on the development and life-cycle of the Chagas

disease vector Rhodnius prolixus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 18, n. 2, p. e0011937, fev. 2024.

- LOVATO, D. V. et al. Infestin 1R, an intestinal subtilisin inhibitor from Triatoma infestans able to impair mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 4, p. 362–367, dez. 2011.
- LU, S. et al. Revisiting the sialome of the cat flea Ctenocephalides felis. **PloS One**, v. 18, n. 1, p. e0279070, 2023.
- LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; HUMBER, R. A. Record of Evlachovaea sp. (Hyphomycetes) on Triatoma sordida in the state of Goiás, Brazil, and its activity against Triatoma infestans (Reduviidae, Triatominae). Journal of Medical Entomology, v. 40, n. 4, p. 451–454, jul. 2003.
- LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; NERY, G. V. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic triatomine-infested areas in central Brazil and fungal activity against Triatoma infestans (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 783–791, dez. 2004.
- LYLES, M. M.; GILBERT, H. F. Mutations in the thioredoxin sites of protein disulfide isomerase reveal functional nonequivalence of the N- and C-terminal domains. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 49, p. 30946–30952, 9 dez. 1994.
- MACHINER, F. et al. Occurrence of Triatoma costalimai (Hemiptera: Reduviidae) in different environments and climatic seasons: a field study in the Brazilian savanna. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 567–571, out. 2012.
- MAGALHÃES, A. R. et al. Neglected tropical diseases risk correlates with poverty and early ecosystem destruction. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 12, n. 1, p. 32, 10 abr. 2023.
- MANS, B. J. et al. The Crystal Structure of D7r4, a Salivary Biogenic Amine-binding Protein from the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae**. Journal of Biological Chemistry, v. 282, n. 50, p. 36626–36633, 14 dez. 2007.
- MANS, B. J. et al. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p. 42–58, jan. 2008.
- MANS, B. J.; RIBEIRO, J. M. C.; ANDERSEN, J. F. Structure, Function, and Evolution of Biogenic Amine-binding Proteins in Soft Ticks*. Journal of Biological Chemistry, v. 283, n. 27, p. 18721–18733, 4 jul. 2008.
- MARTIN-MARTIN, I. et al. Aedes aegypti D7 long salivary proteins modulate blood feeding and parasite infection. **mBio**, v. 14, n. 6, p. e02289, 1 nov. 2023.
- MARTINS, L. A. et al. Small protease inhibitors in tick saliva and salivary glands and their role in tick-host-pathogen interactions. **Biochimica Et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 2, p. 140336, fev. 2020.
- MATSUO, T. et al. Odorant-Binding Proteins OBP57d and OBP57e Affect Taste Perception and Host-Plant Preference in Drosophila sechellia. **PLoS Biology**, v. 5, n. 5, p. e118, 24 abr. 2007.

- MEISER, C. K. et al. Bacteriolytic activity in saliva of the hematophagous *Triatoma infestans* (Reduviidae) and novel characterization and expression site of a third lysozyme. **Archives** of Insect Biochemistry and Physiology, v. 113, n. 3, p. e22013, jul. 2023.
- MELLO, D. A.; BORGES, M. M. [Initial discovery of Triatoma costalimai naturally infected with Trypanosoma cruzi: study of the biological aspects of an isolated sample]. **Memorias Do** Instituto Oswaldo Cruz, v. 76, n. 1, p. 61–69, 1981.
- MENDE, K. et al. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. Dipetalogaster maximus cDNA cloning, expression and characterization. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, n. 2, p. 583–590, dez. 1999.
- MESQUITA, R. D. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Is Enhanced by Vector Saliva through Immunosuppressant Mechanisms Mediated by Lysophosphatidylcholine. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 12, p. 5543–5552, dez. 2008.
- MEYERHOF, O. THE ORIGIN OF THE REACTION OF HARDEN AND YOUNG IN CELL-FREE ALCOHOLIC FERMENTATION. Journal of Biological Chemistry, v. 157, n. 1, p. 105–119, 1 jan. 1945.
- MICHALAK, M. et al. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. **The Biochemical Journal**, v. 344 Pt 2, n. Pt 2, p. 281–292, 1 dez. 1999.
- MILNE, T. J. et al. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 31105–31110, 15 ago. 2003.
- MIRANDA, V. L. DE et al. **THE PRESENCE OF CHICKENS INCREASES THE INFESTATION OF ROCKY OUTCROPS BY TRIATOMA COSTALIMAI, A NEGLECTED VECTOR OF TRYPANOSOMA CRUZI.** . Em: ANAIS DO XXVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA. 19 maio 2023. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/parasito-2023-280030/605164-the-presence-ofchickens-increases-the-infestation-of-rocky-outcrops-by-triatoma-costalimai-a-neglectedvector-o>. Acesso em: 26 out. 2024
- MISHRA, M. Evolutionary Aspects of the Structural Convergence and Functional Diversification of Kunitz-Domain Inhibitors. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 7, p. 537–548, set. 2020.
- MITTAPALLI, O.; WISE, I. L.; SHUKLE, R. H. Characterization of a serine carboxypeptidase in the salivary glands and fat body of the orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 154–160, 1 fev. 2006.
- MIZUSHIMA, D. et al. Transcriptome data on salivary lipocalin family of the Asiatic Triatoma rubrofasciata. **Data in Brief**, v. 30, p. 105647, jun. 2020.
- MONTANDON, C. E. et al. Comparative proteomic analysis of the saliva of the Rhodnius prolixus, Triatoma lecticularia and Panstrongylus herreri triatomines reveals a high interespecific functional biodiversity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 71, p. 83–90, 2016.
- MONTEIRO, F. A. et al. Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 99, p. 265–344, 2018.

- MOREIRA, C. J. C. et al. Isolation and molecular characterization of a major hemolymph serpin from the triatomine, Panstrongylus megistus. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 23, 14 jan. 2014.
- MORETTI, N. S.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S. Trypanosoma cruzi. Trends in Parasitology, v. 36, n. 4, p. 404–405, 1 abr. 2020.
- MORI, H. et al. Host-derived transferrin is maintained and transferred from midgut to ovary in Haemaphysalis longicornis ticks. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 5, n. 2, p. 121–126, mar. 2014.
- MURFIN, K. E.; FIKRIG, E. Tick Bioactive Molecules as Novel Therapeutics: Beyond Vaccine Targets. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 7, p. 222, 6 jun. 2017.
- MWANGI, V. I. et al. Resisting an invasion: A review of the triatomine vector (Kissing bug) defense strategies against a Trypanosoma sp infection. **Acta Tropica**, v. 238, p. 106745, fev. 2023.
- NAGASE, H. Metalloproteases. Current Protocols in Protein Science, v. Chapter 21, p. 21.4.1-21.4.13, ago. 2001.
- NAKHLEH, J.; EL MOUSSAWI, L.; OSTA, M. A. The Melanization Response in Insect Immunity. Em: Advances in Insect Physiology. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 52p. 83–109.
- NARESHA, S. et al. Mapping the complement C1q binding site in Haemonchus contortus calreticulin. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 166, n. 1, p. 42–46, 2009.
- NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. Endothelial cells and coagulation. Cell and Tissue Research, v. 387, n. 3, p. 391–398, mar. 2022.
- NEVOA, J. C. et al. An insight into the salivary gland and fat body transcriptome of Panstrongylus lignarius (Hemiptera: Heteroptera), the main vector of Chagas disease in Peru. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006243, 20 fev. 2018.
- NICHOL, H.; LAW, J. H.; WINZERLING, J. J. Iron metabolism in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 535–559, 2002.
- NIELSEN, H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. Em: KIHARA, D. (Ed.). Protein Function Prediction: Methods and Protocols. New York, NY: Springer, 2017. p. 59–73.
- NOESKE-JUNGBLUT, C. et al. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 48, p. 28629–28634, 1 dez. 1995.
- NOGUEIRA BRITO, R. et al. Triatoma costalimai (Hemiptera: Reduviidae) in and Around Houses of Tocantins State, Brazil, 2005-2014. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 6, p. 1771–1774, 7 nov. 2017a.
- NOGUEIRA BRITO, R. et al. Triatoma costalimai (Hemiptera: Reduviidae) in and Around Houses of Tocantins State, Brazil, 2005-2014. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 6, p. 1771–1774, 7 nov. 2017b.
- NOIREAU, F.; DUJARDIN, J.-P. Biology of triatominae. Em: American trypanosomiasis. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 149–168.

- OCAÑA-MAYORGA, S. et al. Triatomine Feeding Profiles and Trypanosoma cruzi Infection, Implications in Domestic and Sylvatic Transmission Cycles in Ecuador. **Pathogens**, v. 10, n. 1, p. 42, 7 jan. 2021.
- OLIVEIRA, D. S. et al. Proteomic analysis of the kissing bug Rhodnius prolixus antenna. **Journal of Insect Physiology**, v. 100, p. 108–118, jul. 2017.
- OLIVEIRA, A. W. S. DE; SILVA, I. G. DA. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 204–208, abr. 2007.
- OLIVEIRA, K. A. et al. Proteolytic activity of Triatoma infestans saliva associated with PAR-2 activation and vasodilation. The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, v. 27, p. e20200098, 8 mar. 2021.
- OMICSBOX. Bioinformatics made easy. BioBam bioinformatics, , 2019.
- ONS, S. et al. The neuropeptidome of Rhodnius prolixus brain. **Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 788–792, fev. 2009.
- OSENO, B. et al. Characterization of Anopheles gambiae D7 salivary proteins as markers of human-mosquito bite contact. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 11, 8 jan. 2022.
- OUALI, R. et al. High-throughput identification of the Rhodnius prolixus midgut proteome unravels a sophisticated hematophagic machinery. **Proteomes**, v. 8, n. 3, p. 16, 2020.
- OUALI, R. et al. Rhodnius prolixus hemolymph immuno-physiology: Deciphering the systemic immune response triggered by Trypanosoma cruzi establishment in the vector using quantitative proteomics. **Cells**, v. 11, n. 9, p. 1449, 2022.
- PALA, Z. R. et al. Mosquito salivary apyrase regulates blood meal hemostasis and facilitates malaria parasite transmission. **Nature Communications**, v. 15, p. 8194, 18 set. 2024.
- PANTERA, B. et al. Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp Polistes gallicus. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1623, n. 2–3, p. 72–81, out. 2003.
- PARIZI, L. F. et al. Peptidase inhibitors in tick physiology. **Medical and Veterinary** Entomology, v. 32, n. 2, p. 129–144, jun. 2018.
- PASKEWITZ, S. M.; SHI, L. The hemolymph proteome of Anopheles gambiae. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 35, n. 8, p. 815–824, ago. 2005.
- PATEL, S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. Allergologia Et Immunopathologia, v. 45, n. 6, p. 579–591, 2017.
- PELOSI, P. Odorant-binding proteins. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, v. 29, n. 3, p. 199–228, 1994.
- PELOSI, P. et al. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, v. 93, n. 1, p. 184– 200, fev. 2018.
- PELOSI, P.; ZHU, J.; KNOLL, W. Odorant-Binding Proteins as Sensing Elements for Odour Monitoring. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 10, p. 3248, 27 set. 2018.

- PEREIRA, K. S. et al. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. Journal of Food Protection, v. 72, n. 2, p. 441–446, 1 fev. 2009.
- PEREIRA, M. H. et al. Competitive displacement in Triatominae: the Triatoma infestans success. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 11, p. 516–520, nov. 2006.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. Lancet (London, England), v. 391, n. 10115, p. 82–94, 6 jan. 2018.
- PHAM, D. Q. D.; WINZERLING, J. J. Insect Ferritins: typical or atypical? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1800, n. 8, p. 824, 15 mar. 2010.
- PICIMBON, J.-F. Interpopulational Variations of Odorant-Binding Protein Expression in the Black Cutworm Moth, Agrotis ipsilon. **Insects**, v. 11, n. 11, p. 798, 13 nov. 2020.
- PITTS, R. J. et al. Odorant receptor-mediated sperm activation in disease vector mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 7, p. 2566–2571, 18 fev. 2014.
- PLESNER, L. Ecto-ATPases: Identities and Functions. Em: JEON, K. W.; JARVIK, J. (Eds.). International Review of Cytology. [s.l.] Academic Press, 1995. v. 158p. 141–214.
- PRAÇA, Y. R. et al. An integrative sialomic analysis reveals molecules from Triatoma sordida (Hemiptera: Reduviidae). Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 11, p. 798924, 2022.
- PREVOT, P.-P. et al. Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick Ixodes ricinus. **The FEBS journal**, v. 276, n. 12, p. 3235–3246, jun. 2009.
- PURVIS, J. E. et al. A molecular signaling model of platelet phosphoinositide and calcium regulation during homeostasis and P2Y1 activation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 112, n. 10, p. 4069–4079, 2008.
- RAMARAO, N.; SANCHIS, V. The Pore-Forming Haemolysins of Bacillus Cereus: A Review. **Toxins**, v. 5, n. 6, p. 1119, 7 jun. 2013.
- RAMÍREZ, G. et al. Trypanosoma cruzi calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. **Immunobiology**, v. 216, n. 1–2, p. 265–273, 2011.
- RANASINGHE, S.; MCMANUS, D. P. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 39, n. 3, p. 219– 227, mar. 2013.
- RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597, set. 1998.
- RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, prefractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Nature Protocols, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, ago. 2007.
- RAU, J. C. et al. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. Journal of thrombosis and haemostasis: JTH, v. 5 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 102–115, jul. 2007.

- RAVAZI, A. et al. Climate and Environmental Changes and Their Potential Effects on the Dynamics of Chagas Disease: Hybridization in Rhodniini (Hemiptera, Triatominae). Insects, v. 14, n. 4, p. 378, 12 abr. 2023.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. Database issue, p. D343, 2 nov. 2015.
- REYNOSO-DUCOING, O. A. et al. Expression of Proteins, Glycoproteins, and Transcripts in the Guts of Fasting, Fed, and Trypanosoma cruzi-Infected Triatomines: A Systematic Review. **Pathogens**, v. 12, n. 9, p. 1124, 2 set. 2023.
- RIBEIRO, J. M. et al. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). Journal of Medical Entomology, v. 35, n. 4, p. 599–610, 1998.
- RIBEIRO, J. M. et al. An insight into the sialotranscriptome of Triatoma rubida (Hemiptera: Heteroptera). Journal of medical entomology, v. 49, n. 3, p. 563–572, 2012.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. Exploring the sialome of the blood-sucking bug Rhodnius prolixus. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 1, p. 61–79, 2004.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, Rhodnius prolixus. PLoS neglected tropical diseases, v. 8, n. 1, p. e2594, 2014.
- RIBEIRO, J. M. C.; ASSUMPÇÃO, T. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. An Insight into the Sialomes of Bloodsucking Heteroptera. Psyche: A Journal of Entomology, v. 2012, p. 1– 16, 2012.
- RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 48, n. 1, p. 73–88, jan. 2003.
- RIBEIRO, J. M. C.; GARCIA, E. S. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 26, n. 5, p. 303–307, 1 jan. 1980.
- RIBEIRO, J. M.; SCHWARZ, A.; FRANCISCHETTI, I. M. A deep insight into the sialotranscriptome of the Chagas disease vector, Panstrongylus megistus (Hemiptera: Heteroptera). Journal of medical entomology, v. 52, n. 3, p. 351–358, 2015.
- RIBEIRO, J. M.; VAUGHAN, J. A.; AZAD, A. F. Characterization of the salivary apyrase activity of three rodent flea species. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 215–219, 1990.
- RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 4, p. 377–386, abr. 2010.
- ROCHA, F. F. et al. Effect of Triatoma infestans saliva on mouse immune system cells: The role of the pore-forming salivary protein trialysin. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 143, p. 103739, abr. 2022.
- ROCKLÖV, J.; DUBROW, R. Climate change: an enduring challenge for vector-borne disease prevention and control. **Nature Immunology**, v. 21, n. 5, p. 479–483, maio 2020.

- ROWE, G. E.; WELCH, R. A. Assays of hemolytic toxins. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 657–667, 1994.
- RUGGERI, Z. M. Platelets in atherothrombosis. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1227–1234, nov. 2002.
- S, O. et al. Neuropeptide precursor gene discovery in the Chagas disease vector Rhodnius prolixus. **Insect molecular biology**, v. 20, n. 1, fev. 2011.
- SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, v. 57, n. 5, p. 627– 645, abr. 2011.
- SAKARIASSEN, K. S.; BOLHUIS, P. A.; SIXMA, J. J. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. **Nature**, v. 279, n. 5714, p. 636–638, 14 jun. 1979.
- SALCEDO-PORRAS, N.; LOWENBERGER, C. The innate immune system of kissing bugs, vectors of chagas disease. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 98, p. 119–128, 1 set. 2019.
- SALCEDO-PORRAS, N.; LOWENBERGER, C. The Immune System of Triatomines. Em: GUARNERI, A.; LORENZO, M. (Eds.). Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors. Entomology in Focus. Cham: Springer International Publishing, 2021. v. 5p. 307– 344.
- SAN JUAN, E. et al. Humans as blood-feeding sources in sylvatic triatomines of Chile unveiled by next-generation sequencing. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 225, 6 jul. 2023.
- SANT'ANNA, M. R. V. et al. Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) blood intake: Physical constraints and biological adaptations. **Journal of Insect Physiology**, v. 97, p. 20–26, 2017.
- SANTIAGO, P. B. et al. A Deep Insight into the Sialome of Rhodnius neglectus, a Vector of Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004581, abr. 2016.
- SANTIAGO, P. B. et al. Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in bloodfeeding, yolk formation and immunity - a review. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 79, 13 fev. 2017.
- SANTIAGO, P. B. et al. Exploring the molecular complexity of Triatoma dimidiata sialome. **Journal of Proteomics**, v. 174, p. 47–60, 1 mar. 2018.
- SANTIAGO, P. B. et al. Proteomic mapping of multifunctional complexes within triatomine saliva. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 10, p. 459, 2020a.
- SANTIAGO, P. B. et al. The pharmacopea within triatomine salivary glands. **Trends in** parasitology, v. 36, n. 3, p. 250–265, 2020b.
- SANTOS, A. et al. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Triatominae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 37, n. 7, p. 702–712, jul. 2007.

- SANTOS, D. V. et al. An updated catalog of lipocalins of the chagas disease vector Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, p. 103797, jul. 2022.
- SCHAMA, R. et al. Rhodnius prolixus supergene families of enzymes potentially associated with insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 91–104, fev. 2016.
- SCHAUB, G. A. An Update on the Knowledge of Parasite–Vector Interactions of Chagas Disease. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 12, p. 63–76, 28 maio 2021.
- SCHAUB, G. A. Interaction of Trypanosoma cruzi, Triatomines and the Microbiota of the Vectors-A Review. **Microorganisms**, v. 12, n. 5, p. 855, 25 abr. 2024.
- SCHOFIELD, C. J.; MARSDEN, P. D.; DAS VIRGENS, D. Notes on the biology of Triatoma costalimai Verano & Galvão, 1958.(Hemiptera; Reduviidae; Triatominae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 9, n. 2, p. 295–301, 1980.
- SCHREIBER, M. C.; KARLO, J. C.; KOVALICK, G. E. A novel cDNA from Drosophila encoding a protein with similarity to mammalian cysteine-rich secretory proteins, wasp venom antigen 5, and plant group 1 pathogenesis-related proteins. **Gene**, v. 191, n. 2, p. 135–141, jun. 1997.
- SCHWARZ, A. et al. An Updated Insight into the Sialotranscriptome of Triatoma infestans: Developmental Stage and Geographic Variations. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 8, n. 12, p. e3372, 4 dez. 2014.
- SCIGELOVA, M.; MAKAROV, A. Orbitrap Mass Analyzer Overview and Applications in Proteomics. **PROTEOMICS**, v. 6, n. S2, p. 16–21, set. 2006.
- SEGOVIA, M. et al. Vector mapping and bloodmeal metabarcoding demonstrate risk of urban Chagas disease transmission in Caracas, Venezuela. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 17, n. 3, p. e0010613, 17 mar. 2023.
- SHARMA, P. et al. Salivary glands harbor more diverse microbial communities than gut in Anopheles culicifacies. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 235, dez. 2014.
- SHI, Y. et al. Morphological and molecular characteristics of a Trypanosoma sp. from triatomines (Triatoma rubrofasciata) in China. **Parasites & Vectors**, v. 17, n. 1, p. 214, 10 maio 2024.
- SHUKEN, S. R. An Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. Journal of Proteome Research, v. 22, n. 7, p. 2151–2171, 7 jul. 2023.
- SILVA, G. DOS S. Integração de estratégias computacionais e experimentais para a investigação da proteína ligante de odor (OBP) salivar de Rhodnius Neglectus, vetor da Doença de Chagas. 11 jul. 2024.
- SILVEIRA, R. B. DA et al. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **The Biochemical Journal**, v. 406, n. Pt 2, p. 355, 13 ago. 2007.
- SOARES, A. C. et al. Salivation pattern of Rhodnius prolixus (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 5, p. 468–472, 2006.

- SOARES, A. C. et al. Features of Interaction Between Triatomines and Vertebrates Based on Bug Feeding Parameters. Em: GUARNERI, A.; LORENZO, M. (Eds.). Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors. Entomology in Focus. Cham: Springer International Publishing, 2021. v. 5p. 239–264.
- SOUZA-FERREIRA, P. S. et al. Molecular characterization of Rhodnius prolixus' embryonic cuticle. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51, p. 89–100, ago. 2014.
- SPENCE, M. A. et al. A Comprehensive Phylogenetic Analysis of the Serpin Superfamily. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 2915, 21 mar. 2021.
- STARK, K. R.; JAMES, A. A. Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (Diptera:Culicidae). Journal of Medical Entomology, v. 33, n. 4, p. 645–650, jul. 1996.
- STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 317, 10 jul. 2014.
- STÖCKER, W. et al. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. Protein Science: A Publication of the Protein Society, v. 4, n. 5, p. 823– 840, maio 1995.
- STOJANOVSKI, B. M.; MOHAMMED, B. M.; DI CERA, E. The Prothrombin-Prothrombinase Interaction. Em: HARRIS, J. R.; MARLES-WRIGHT, J. (Eds.). Macromolecular Protein Complexes V: Structure and Function. Cham: Springer International Publishing, 2024. p. 409–423.
- STUTZER, C. et al. Ornithodoros savignyi: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 318–327, ago. 2009.
- SUN, J. S.; XIAO, S.; CARLSON, J. R. The diverse small proteins called odorant-binding proteins. **Open Biology**, v. 8, n. 12, p. 180208, 19 dez. 2018.
- Symptoms, transmission, and current treatments for Chagas disease | DNDi. Disponível em: https://dndi.org/diseases/chagas/facts/. Acesso em: 27 set. 2024.
- TAKÁC, P. et al. Vasotab, a vasoactive peptide from horse fly Hybomitra bimaculata (Diptera, Tabanidae) salivary glands. The Journal of Experimental Biology, v. 209, n. Pt 2, p. 343– 352, jan. 2006.
- TAKEDA, A. et al. Squamous cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L. **FEBS letters**, v. 359, n. 1, p. 78–80, 6 fev. 1995.
- TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). Brazilian Journal of Biology = Revista Brasleira De Biologia, v. 66, n. 2B, p. 703–708, maio 2006.
- TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. American trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research. [s.l.] Elsevier, 2017.
- TEUFEL, F. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1023–1025, jul. 2022.

- TEVES, S. C. et al. Triatoma costalimai Naturally Infected by Trypanosoma cruzi: A Public Health Concern. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 1, p. 90–92, jan. 2019.
- THEIL, E. C. FERRITIN: STRUCTURE, GENE REGULATION, AND CELLULAR FUNCTION IN ANIMALS, PLANTS, AND MICROORGANISMS. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, n. Volume 56, 1987, p. 289–315, 1 jul. 1987.
- THUMULURI, V. et al. DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. **Nucleic acids research**, v. 50, n. W1, p. W228–W234, 2022.
- TRAVERSO, L. et al. Transcriptomic modulation in response to an intoxication with deltamethrin in a population of Triatoma infestans with low resistance to pyrethroids. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 16, n. 6, p. e0010060, jun. 2022.
- TROVO, J. V. S. et al. The risk of vector transmission of Trypanosoma cruzi remains high in the State of Paraná. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 119, p. e230226, 2024.
- TUFAIL, M. et al. Regulation of vitellogenin genes in insects. **Entomological Science**, v. 17, n. 3, p. 269–282, jul. 2014.
- URSIC-BEDOYA, R. J.; LOWENBERGER, C. A. Rhodnius prolixus: identification of immunerelated genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 2, p. 109–120, 2007.
- VALENZUELA, J. G. et al. Purification, Cloning, and Expression of an Apyrase from the Bed Bug Cimex lectularius: A NEW TYPE OF NUCLEOTIDE-BINDING ENZYME *. Journal of Biological Chemistry, v. 273, n. 46, p. 30583–30590, 13 nov. 1998.
- VALENZUELA, J. G. et al. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito Aedes aegypti. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 9, p. 1101–1122, set. 2002.
- VAN DE LOCHT, A. et al. Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin. **The EMBO journal**, v. 14, n. 21, p. 5149–5157, 1 nov. 1995.
- VAN GENT, D. et al. Serpins: structure, function and molecular evolution. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 11, p. 1536–1547, 1 nov. 2003.
- VAN NUETEN, J. M.; JANSSENS, W. J.; VANHOUTTE, P. M. Serotonin and vascular reactivity. **Pharmacological research communications**, v. 17, n. 7, p. 585–608, 1985.
- VENDRAMI, D. P. et al. Phenotypic and genetic variation of Triatoma costalimai (Hemiptera: Reduviidae). Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, v. 54, p. e00282020, 2020.
- VENTURA, J. S. et al. A Kunitz-type FXa inhibitor affects tumor progression, hypercoagulable state and triggers apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 3, p. 192–196, 2013.
- VERANO, O.; GALVÃO, A. Triatoma costalimai sp. n. **Triatoma costalimai sp. n.**, v. 10, p. 199–205, 1958.

- VERSTEEG, H. H. et al. New Fundamentals in Hemostasis. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 327–358, jan. 2013.
- VIEIRA, C. B. et al. Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 8, 16 nov. 2018.
- VILLÉN, J.; GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 3, n. 10, p. 1630–1638, out. 2008.
- VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina (Philadelphia, Pa.)**, v. 29, n. 1, p. 1–7, jan. 2009.
- VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature**, v. 293, n. 5828, p. 161–163, set. 1981.
- VORA, A. et al. Ticks elicit variable fibrinogenolytic activities upon feeding on hosts with different immune backgrounds. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44593, 16 mar. 2017.
- VOS, B. et al. Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to Vespula venom. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 131, n. 4, p. 1225–1227, 1227.e1, abr. 2013.
- WALECKX, E.; GOURBIÈRE, S.; DUMONTEIL, E. Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 110, n. 3, p. 324–338, maio 2015.
- WALKER, A. A. et al. Melt With This Kiss: Paralyzing and Liquefying Venom of The Assassin Bug Pristhesancus plagipennis (Hemiptera: Reduviidae) *. Molecular & Cellular Proteomics, v. 16, n. 4, p. 552–566, 1 abr. 2017.
- WALKER, A. A. et al. Missiles of Mass Disruption: Composition and Glandular Origin of Venom Used as a Projectile Defensive Weapon by the Assassin Bug Platymeris rhadamanthus. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 673, 18 nov. 2019.
- WALSH, J. F.; MOLYNEUX, D. H.; BIRLEY, M. H. Deforestation: effects on vector-borne disease. **Parasitology**, v. 106 Suppl, p. S55-75, 1993.
- WANG, J. et al. Aedes aegypti Odorant Binding Protein 22 selectively binds fatty acids through a conformational change in its C-terminal tail. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3300, 24 fev. 2020.
- WANG, W.; CHEN, F. Role of the Subtilisin-like Serine Protease CJPRB from Cordyceps javanica in Eliciting an Immune Response in Hyphantria cunea. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 4, p. 4170, 20 fev. 2023.
- WANIEK, P. J. et al. Serine carboxypeptidases of Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Reduviidae): Sequence characterization, expression pattern and activity localization. Journal of Insect Physiology, v. 63, p. 9–20, abr. 2014.
- WEBER, J. J.; KANOST, M. R.; GORMAN, M. J. Iron binding and release properties of transferrin-1 from Drosophila melanogaster and Manduca sexta: Implications for insect iron homeostasis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, p. 103438, out. 2020.

- WEINBERGER, K. et al. Triatoma infestans Calreticulin: Gene Cloning and Expression of a Main Domain That Interacts with the Host Complement System. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 2, p. 295, 8 fev. 2017.
- WEISS, J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 4, p. 785–790, 1 ago. 2003.
- WELCH, R. A. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 257, p. 85–111, 2001.
- WHITTEN, M. M. A. et al. A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in beta-1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), v. 172, n. 4, p. 2177–2185, 15 fev. 2004.
- WHO, W. H. O. Vector-borne diseases. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases. Acesso em: 25 jul. 2024.
- WHO, W. H. ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases -- GLOBAL**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases>. Acesso em: 25 jul. 2024a.
- WHO, W. H. ORGANIZATION. Chagas disease. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)>. Acesso em: 25 jul. 2024b.
- WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochimica et biophysica acta** (BBA)-proteins and proteomics, v. 1699, n. 1–2, p. 35–44, 2004.
- WILSON, A. L. et al. The importance of vector control for the control and elimination of vectorborne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007831, 16 jan. 2020.
- WILSON, R.; LEES, J. F.; BULLEID, N. J. Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. Journal of Biological Chemistry, v. 273, n. 16, p. 9637–9643, 1998.
- WORM*, M. et al. Triggers and Treatment of Anaphylaxis: An Analysis of 4000 Cases From Germany, Austria and Switzerland. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 111, n. 21, p. 367, 23 maio 2014.
- XU, X. et al. Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 7, n. 3, p. 582–590, mar. 2008.
- YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 3, p. 227–231, 1 set. 2004.
- YOSHIGA, T. et al. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 94, n. 23, p. 12337–12342, 11 nov. 1997.
- YU, Q.-Y. et al. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, Bombyx mori. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 553, dez. 2009.

- ZAFAR, Z. et al. Odorant Binding Proteins (OBPs) and Odorant Receptors (ORs) of Anopheles stephensi: Identification and comparative insights. **PLoS ONE**, v. 17, n. 3, p. e0265896, 22 mar. 2022.
- ZHANG, Z. et al. High-Throughput Proteomics. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 7, n. Volume 7, 2014, p. 427–454, 12 jun. 2014.
- ZHAO, L. et al. OutCyte: a novel tool for predicting unconventional protein secretion. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19448, 19 dez. 2019.
- ZHAO, Y. et al. Review of kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from China with descriptions of two new species. **Insects**, v. 14, n. 5, p. 450, 2023.
- ZHOU, J.-J. Chapter Ten Odorant-Binding Proteins in Insects. Em: LITWACK, G. (Ed.). Vitamins & Hormones. Pheromones. [s.l.] Academic Press, 2010. v. 83p. 241–272.
- ZIBAEE, A.; RAMZI, S. Cuticle-degrading proteases of entomopathogenic fungi: from biochemistry to biological performance. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 51, n. 13–14, p. 779–794, 27 ago. 2018.
- ZUBAREV, R. A.; MAKAROV, A. Orbitrap Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 11, p. 5288–5296, 4 jun. 2013.

10. ANEXO 1

Linha de comando BLATSP executado via terminal



11. ANEXO 2

Lista de proteínas identificadas no proteoma das glândulas salivares do *Triatoma costalimai.*

Para visualizar a planilha no google drive:

https://drive.google.com/drive/folders/1dIOEsSIAxx3QiK4hY0TUo1i9Og9Rx3E i?usp=sharing