

CARLOS EMMANUEL MONTANDON

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DA SALIVA DE *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* E *Panstrongylus herreri*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Montandon, Carlos Emmanuel, 1984-
M754a Análise proteômica comparativa da saliva de *Rhodnius*
2015 *prolixus*, *Triatoma lecticularia* e *Panstrongylus herreri* / Carlos
Emmanuel Montandon. – Viçosa, MG, 2015.
vii, 44f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Cláudio Lisias Mafra de Siqueira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.31-38.

1. *Triatoma*. 2. *Rhodnius prolixus*. 3. *Triatoma lecticularia*
. 4. *Panstrongylus herreri*. 5. Saliva - Análise. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica
Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 595.754

CARLOS EMMANUEL MONTANDON

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DA SALIVA DE *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* E *Panstrongylus herreri*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de setembro de 2015.



Leandro Licursi de Oliveira



Erika Toriyama



Luciano Gomes Fietto



Humberto Josué de Oliveira Ramos



Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:
à minha mãe, Lázara;
à memória de minha avó, Francisca e;
à minha companheira Elaine.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- A Deus, por tudo.
- À minha família, pela confiança e pelo apoio.
- A todos meus amigos do Laboratório de Epidemiologia e Parasitologia Molecular e do Núcleo de Análises de Biomoléculas, em especial ao Edvaldo, ao Rafael, ao Pedro, à Nívea, ao Camilo e à Larissa pelas conversas e pelo auxílio;
- Ao Prof. Dr. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira, por aceitar a orientação deste estudo e conduzir seu desenvolvimento, com muita sabedoria e paciência e também pelas conversas e ensinamentos e;
- Ao Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira por ceder o material biológico para realização deste estudo e ao Prof. Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos pela orientação nas realizações das análises proteômicas;
- À Universidade Federal de Viçosa e à CAPES, pelo suporte para a realização deste trabalho.

RESUMO

MONTANDON, Carlos Emmanuel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2015. **Análise proteômica comparativa da saliva de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* e *Panstrongylus herreri***. Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Triatomíneos são artrópodes hematófagos transmissores do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. É sabido que o comportamento alimentar e a transmissão de patógenos por estes vetores variam entre as diferentes espécies e são dependentes, direta ou indiretamente, de moléculas bioativas da saliva que auxiliam na interação vetor-parasito-hospedeiro. Neste sentido, caracterizamos e comparamos o repertório sialoproteômico de três importantes espécies dos principais gêneros de triatomíneos das Américas: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* e *Panstrongylus herreri*, identificando 221 proteínas, sendo 69 de *R. prolixus*, 100 de *T. lecticularia* e 52 de *P. herreri*. Dentre os principais achados, encontramos a alta prevalência de nitroforinas em *R. prolixus* (68%) e de lipocalinas em *T. lecticularia* (79%) e *P. herreri* (49%). Neste contexto, as proteínas mais significativas por *spot* de *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri* mais abundantes, apresentando expressiva diferença entre as outras, foram *Nitrophorin-4* (28,7%), *Salivary lipocalin 5* (65,2%) e *Putative triabin* (20,5%), respectivamente. Outro achado significativo foi a única molécula presente nas três espécies estudadas, a proteína não categorizada T1HT34, a qual atuaria como elo proteico entre elas, identificando-se como paróloga da *Putative fry-like conserved*. Os dados encontrados pela caracterização pelo *Gene Ontology*, vieram a corroborar achados anteriores, evidenciando-se todas as funções identificadas como beneficiadas pelo repasto sanguíneo dos triatomíneos.

ABSTRACT

MONTANDON, Carlos Emmanuel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2015. **Comparative proteomic analysis of the saliva of *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* and *Panstrongylus herreri***. Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Triatomine bugs are blood-sucking arthropods transmitters of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. It is known that eating behavior and the transmission of pathogens by these vectors vary between different species and are dependent, directly or indirectly, of bioactive molecules in saliva that help in vector-parasite-host interaction. In this sense, characterize and compare the sialoproteômico repertory of three important species of major triatomine genera of the Americas: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* and *Panstrongylus herreri*, identifying 221 proteins, 69 of *R. prolixus*, 100 *T. lecticularia* and 52 *P. herreri*. Among the main findings, we found a high prevalence of nitroforinas in *R. prolixus* (68%) and lipocalin in *T. lecticularia* (79%) and *P. herreri* (49%). In this context, the most significant protein per spot *R. prolixus*, *T. lecticularia* and *P. herreri* most abundant, with significant difference among others, were Nitrophorin-4 (28.7%) Salivary lipocalin 5 (65.2%) and Putative triabin (20.5%), respectively. Another significant finding was the single molecule presents the three species studied, not categorized protein T1HT34, which would act as a protein link between them, identifying themselves as paráloga of Putative fry-like conserved. The data obtained by the characterization by the Gene Ontology, came to corroborate previous findings, showing up all the functions identified as beneficiaries of the blood meal of the insects.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Triatomíneos	3
2.2	Proteínas presentes no repasto sanguíneo de artrópodes hematófagos.....	4
2.3	Uso da proteômica para estudos em triatomíneos	6
3	HIPÓTESE	9
4	OBJETIVOS	10
4.1	Objetivo geral	10
4.2	Objetivos específicos	10
5	MATERIAL E MÉTODOS	11
5.1	Triatomíneos utilizados e considerações éticas	11
5.2	Coleta da saliva e quantificação proteica	11
5.3	Eletroforese 2-D e análise do gel	12
5.4	Espectrometria de massas	13
5.5	Análise dos espectros e caracterização proteica	14
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6.1	Aquisição de amostras e análise dos perfis eletroforéticos 2-D .	17
6.2	Validação das proteínas identificadas.....	20
6.3	Diversidade e caracterização das proteínas.....	21
6.4	Comparação das mesmas proteínas entre as espécies	24
6.5	Caracterização funcional das proteínas com base no <i>Gene Ontology</i>	27

7	CONCLUSÃO.....	30
8	BIBLIOGRAFIA.....	31
	ANEXOS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Artrópodes hematófagos são responsáveis por inúmeros agentes que afetam o homem, podendo atuar como reservatórios e/ou vetores de diversos patógenos. Neste sentido, pesquisas têm sido realizadas buscando compreensão de sua história natural. Mais recentemente, com o desenvolvimento de ferramentas especializadas, alguns grupos têm buscado compreender a relação destes com os hospedeiros vertebrados quando da hematofagia, primeiro momento nesta complexa cadeia. Estudos em genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica têm permitido a identificação e caracterização de um grande número de moléculas em diferentes órgãos destes artrópodes. Dentre as moléculas presentes na saliva e glândulas salivares, destacam-se as de características anti-hemostáticas vasodilatadoras, anti-agregação plaquetária, anticoagulantes e anestésicas (ARAÚJO, DE et al., 2012) e também as com capacidade de modulação das respostas imune inata e adquirida do hospedeiro (RIBEIRO, 1995; FRANCISCHETTI et al., 2009; ARAÚJO, DE et al., 2012). Os artrópodes hematófagos utilizam estes artifícios para sucesso no repasto sanguíneo, buscando escapar do complexo sistema de defesa dos vertebrados (RIBEIRO et al., 2004; ASSUMPÇÃO et al., 2008; FRANCISCHETTI et al., 2008). Devido a essas e outras características, as moléculas proteicas encontradas na saliva destes vetores são consideradas de elevado potencial biotecnológico, tanto para utilização no controle do desenvolvimento destes artrópodes, quanto para o controle/prevenção da transmissão de patógenos e para o desenvolvimento de novos fármacos para outras ações diversas.

Especificamente no campo da proteômica, metodologias baseadas em espectrometria de massas têm auxiliado estudos prospectivos dessas biomoléculas (ZHANG et al., 2013). Dentre os artrópodes hematófagos estudados com esta estratégia, os membros da subfamília Triatominae tem recebido considerável atenção, devido sua importância na veiculação do

protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causal da Doença de Chagas. Devido a um potente conjunto de moléculas salivares, verifica-se uma vasta abrangência parasitaria dos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*, os quais compreendem 109 das 140 espécies dessa subfamília, representando as principais espécies vetoras daquele patógeno (JURBERG; GALVAO, 2006).

Neste trabalho, realizamos o estudo da diversidade sialoproteômica nas espécies *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* e *Panstrongylus herreri*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Triatomíneos

Os triatomíneos são insetos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, representando a subfamília Triatominae, a qual engloba seis tribos. Dentre os gêneros de maior significância estão *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*, representando 109 das 140 espécies existentes na subfamília, compreendendo as principais espécies vetoras do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas (JURBERG; GALVAO, 2006). Os primeiros relatos de triatomíneos foram realizados no século XVIII pelo Padre Reginaldo de Lizárraga, que ao viajar para o Peru e Chile evidenciou a presença de insetos hematófagos de hábito noturno, sendo as primeiras descrições científicas destes artrópodes realizadas por Charles De Geer em 1773 (LENT; WYGODZINSKY, 1979). Popularmente conhecidos como chupões, vum-vum e bicudos (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), esses artrópodes hematófagos são mais comumente denominados barbeiros devido ao hábito de picar geralmente a face de seu hospedeiro, associado também ao fato de que na época do Brasil Colônia, os profissionais que utilizavam de métodos terapêuticos com sanguessugas e sangrias em seus clientes também recebiam este nome (REZENDE; RASSI, 2008; GONÇALVES, 2012). Encontrados principalmente em ambientes silvestres, abrigando-se em árvores, tocas, ninhos, pedras e arbustos, os triatomíneos se alimentam de sangue de diversas espécies de mamíferos, podendo desenvolver-se também em domicílios e áreas peridomiciliares (GONÇALVES, 2012).

Artrópodes classificados como hemimetábolos, caracterizam-se pelos jovens se assemelharem aos adultos, com as asas e genitália menos desenvolvidas e sem ocelos. Até o estágio adulto, os triatomíneos passam por cinco mudas (JURBERG; GALVAO, 2006; GONÇALVES, 2012), sendo comumente insetos lentos e pouco agressivos. As fêmeas, relativamente mais ativas, possuem

uma maior capacidade de dispersão e longevidade, podendo atingir até dois anos de vida (GONÇALVES, 2012). Independente do sexo ou da idade, os triatomíneos são classificados como ectoparasitas temporários, mantendo o contato com o hospedeiro vertebrado somente durante o repasto sanguíneo (GUARNERI et al., 2000), quando obtêm alimento para seu desenvolvimento e também para a reprodução na fase adulta.

2.2 Proteínas presentes no repasto sanguíneo de artrópodes hematófagos

Para o repasto sanguíneo, os triatomíneos introduzem a probóscide na pele do hospedeiro através de vários movimentos circulares, indo até a localização de algum vaso capilar, injetando saliva e realizando sucção de sangue por ativação da bomba cibarial, interrompendo este processo quando ocorre distensão completa de sua parede abdominal (FRIEND; SMITH, 1971).

Apesar do complexo sistema de defesa existente nos vertebrados e de sua grande eficiência em sua proteção, os artrópodes hematófagos conseguem se evadir desse sistema com relativo sucesso devido a um conjunto de moléculas expressadas em suas glândulas salivares, as quais são injetadas no hospedeiro (RIBEIRO et al., 2004; CALVO et al., 2007; ASSUMPÇÃO et al., 2008; FRANCISCHETTI et al., 2008).

Assim, dentre as diversas propriedades farmacológicas conferidas às proteínas e lipídios presentes na saliva dos triatomíneos, destacam-se moléculas anti-hemostáticas com ação vasodilatadora, anti-agregadores plaquetários, anticoagulantes e anestésicas (CHAMPAGNE, 2005; ARAÚJO, DE et al., 2012), bem como moléculas com função moduladora da resposta imune inata e adquirida do sistema imune do hospedeiro (CHAMPAGNE et al., 1995; FRANCISCHETTI et al., 2009; GOURBIÈRE et al., 2012).

Neste contexto, o hospedeiro, em condições fisiológicas normais, realiza uma vasoconstrição durante a picada dos insetos para restringir a perda de sangue. Em contrapartida, os artrópodes hematófagos produzem moléculas vasodiladoras, como as nitroforinas de *R. prolixus*, as quais são hemeproteínas carreadoras de óxido nítrico, importante vasodilatador, as quais podem ainda prevenir a resposta inflamatória ao se ligar a histamina liberada pelos mastócitos (MONTFORT et al., 2000). A maxadilan, presente em *Lutzomia longipalpis*, responsável pelo eritema no local da picada do vetor, é outra proteína com função vasodilatadora, a qual age de forma similar às nitroforinas (LERNER et al., 2007). Outra molécula com estas características é a sialocinina, encontrado na saliva de *Aedes aegypti*, a qual é responsável por induzir a produção de óxido nítrico junto ao endotélio (CHAMPAGNE et al., 1995).

Para evitar a coagulação sanguínea, outra resposta do organismo vertebrado à picada dos artrópodes é a ativação das plaquetas que se aglomeram no local do ferimento, a fim de evitar a hemorragia. Para escapar desta defesa, certos insetos, através de ação de proteínas, como as da família das apirases, inibem a atuação da trombina e do colágeno, removendo o fosfato inorgânico e hidrolisando ADP em AMP (VALENZUELA, 2002). Dentre as apirases (RIBEIRO et al., 2004; BUSSACOS et al., 2011), três famílias são descritas: 5'-nucleotidases (ARAÚJO, DE et al., 2012), GTPase (SMITH; KIRLEY, 1999) e Cimex (VALENZUELA et al., 1998).

Também a família das lipocalinas é outro importante grupo com função de inibição plaquetária. Elas são divididas em subfamílias, podendo ser (1) inibidoras de agregação plaquetária em *Rhodnius*, atuando por meio de ligação ao ADP; (2) proteínas ligadoras de aminas, responsáveis pela ligação à serotonina e à epinefrina liberadas; (3) proteínas ligadoras de aminas homólogas de Triabina, as quais inibem a agregação plaquetária por ligar-se de forma não-covalente à trombina; (4) palidipinas, atuando no bloqueio da via de transdução de sinal para liberação de ATP por plaquetas; e (5)

nitroforinas, como anteriormente citado (RIBEIRO, et al., 2004; ASSUMPÇÃO et al., 2008).

Outras proteínas que também atuam inibindo a coagulação sanguínea, são (1) a rodniina e a nitroforina 2, presentes em *R. prolixus*, as quais atuam como inibidoras da trombina (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1995) e da via intrínseca ao se ligar ao fator IX ou ao IXa (MOREIRA et al., 2003), respectivamente; e (2) as triafestinas presentes em *Triatoma infestans*, que inibem a via intrínseca, impedindo a conversão do fator XII em XIIa e inibem também a bradicinina, evitando o surgimento da inflamação no local da picada (ISAWA et al., 2007). Também foi descrita uma proteína com atividade anti-trombina em *Anopheles albimanus*, denominada anofelina (VALENZUELA et al., 1996).

Complementando as diversas atividades encontradas na saliva dos artrópodes hematófagos, têm-se proteínas, cuja principal função é a de potencializar a hematofagia, conferindo resistência dos insetos aos patógenos, inseticidas etc. (ASSUMPÇÃO et al., 2012).

2.3 Uso da proteômica para estudos em triatomíneos

Como citado anteriormente, os triatomíneos são ectoparasitas hematófagos que possuem em sua saliva inúmeras moléculas, as quais têm por finalidade favorecer sua alimentação no hospedeiro vertebrado (FRANCISCHETTI et al., 2008; ARAÚJO, DE et al., 2012; ÖNDER et al., 2014). Estudos recentes têm proposto que as moléculas proteicas na saliva de artrópodes hematófagos possuem uso biotecnológico potencial. Desta forma, o conhecimento do sialoproteoma possibilita um melhor entendimento da interface triatomíneo-hospedeiro, propiciando o desenvolvimento de novas estratégias de controle, tanto destes artrópodes, quanto da doença por estes transmitida (RENESTO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2011).

No estudo destas moléculas, ferramentas proteômicas possibilitam uma nítida visão a respeito das moléculas expressas na saliva dos artrópodes ou da ação dessas (RIBEIRO et al., 2011), podendo identificá-las individualmente a partir de um complexo de proteínas, o que possibilita mensurar seu nível de expressão em uma determinada amostra biológica. Diferentemente da análise genômica, esta abordagem implica em uma avaliação dinâmica do organismo, a qual pode ser influenciada por diversos fatores, dentre os quais, as condições do meio ambiente e as alterações implícitas da fisiologia da espécie, o que torna bastante atraente sua utilização, visto permitir esclarecer, de forma significativa, os achados genômicos de diversos organismos (LÓPEZ, 2007).

Dependendo do objetivo e objeto de trabalho, podem ser avaliadas diversas abordagens para o estudo da proteômica. Neste contexto de separação de proteínas intactas, uma das abordagens mais utilizadas é a eletroforese 2-D, visto permitir a diferenciação das proteínas conforme sua carga residual e a massa molecular do complexo de aminoácidos que a constitui (BERG et al., 2012). Com o propósito de complementar os processos de separação, as proteínas são submetidas a um processo de digestão e subsequente ionização por *Electrospray ionization* (ESI) ou *Matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), para uma posterior análise *in silico* dos dados adquiridos (AEBERSOLD; MANN, 2003).

Descrevendo estes resultados, um crescente número de trabalhos utilizando abordagens proteômicas junto de abordagens em transcriptômica de glândulas salivares e saliva de artrópodes hematófagos, incluindo os triatomíneos, têm sido publicados. Como marco, tem-se a primeira análise transcriptômica e proteômica de glândulas salivares de triatomíneos (RIBEIRO, et al., 2004), o qual possibilitou um grande progresso nesta área, em especial pelo conhecimento sobre a família das lipocalinas em *R. prolixus*. Posteriormente, foi realizado o primeiro estudo proteômico da saliva de *T. infestans*, pelo qual foram detectadas mais de 200 proteínas separadas

por eletroforese 2-D, sendo identificados 58 *spots*, encontrando-se basicamente proteínas com função anti-agregação plaquetária das famílias das lipocalinas e apirases (CHARNEAU et al., 2007). Ainda, buscando melhor conhecer os representantes da família Triatominae, sequenciou-se uma biblioteca de cDNA aleatória de glândulas salivares de *T. infestans* (ASSUMPÇÃO et al., 2008). Posteriormente, comparando-se os proteomas salivares de *Rhodnius brethesi* e *Rhodnius robustus*, verificou-se que os sialomas destas espécies eram ricos em lipocalinas, sendo demonstrada experimentalmente a primeira evidência de proteínas fosforiladas, as quais são homólogas às observadas no sialoproteoma de *R. prolixus* (COSTA et al., 2011).

Apesar dos trabalhos relatando achados em sialoproteoma de triatomíneos, verifica-se ainda como incipiente a quantidade de dados depositados em bancos de dados biológicos, o que vem a limitar estudos de identificação e caracterização de novas moléculas e análises posteriores. Para comparação, temos atualmente 31.340 sequências proteicas relativas à subfamília Triatominae anotadas, das quais apenas 34 possuem revisão pela plataforma UniProt. Desta maneira, além da busca por alvos com uso biotecnológico potencial e do melhor entendimento da relação dos triatomíneos com seus hospedeiros vertebrados, com a identificação de proteínas expressas em triatomíneos, investigações nesta área tem permitido o incremento das informações depositadas nos bancos de sequências desses insetos, os quais são ainda muito superficiais.

Visando incrementar a base de dados nesta área do conhecimento, neste trabalho realizamos o estudo da diversidade sialoproteômica nas espécies *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* e *Panstrongylus herreri*.

3 HIPÓTESE

Os perfis sialoproteômicos dos triatomíneos *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* e *Panstrongylus herreri* diferenciam-se quanto à diversidade e funcionalidade molecular de suas salivas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar e comparar em termos de expressão relativa e categorizar funcionalmente a saliva dos triatomíneos *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* e *Panstrongylus herreri*, adquirindo seus perfis proteicos.

4.2 Objetivos específicos

- Obter o perfil proteico da saliva de *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri* através da eletroforese bidimensional;
- Identificar por homologia as sequências proteicas da saliva de *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri* adquiridas por espectrometria de massa;
- Caracterizar, por homologia, as sequências proteicas da saliva de *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri* obtidas pela busca em bancos de dados biológicos;
- Estimar a diversidade de proteínas salivares entre *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Triatomíneos utilizados e considerações éticas

Foram utilizados 30 espécimes adultos de cada espécie, quais sejam, *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri*, de ambos os sexos, adquiridos à partir de colônias mantidas no insetário do Departamento de Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais.

5.2 Coleta da saliva e quantificação proteica

O procedimento para a obtenção da saliva dos triatomíneos foi realizado conforme descrito por Mesquita (MESQUITA et al., 2008). Após um período de jejum de 15 dias, os animais foram sedados com auxílio de gelo, higienizados com água e etanol 70% e imobilizados em placa de Petri, sendo as glândulas salivares da espécie *R. prolixus* expostas através do deslocamento e remoção da cabeça do inseto e as glândulas salivares das espécies *T. lecticularia* e *P. herreri*, extraídas através de um corte na lateral do abdômen e tórax. As glândulas salivares obtidas foram então armazenadas em microtubos com 10µL de solução salina (cloreto de sódio 0,9%) estéril para cada três pares, mantidos em gelo durante todo procedimento. Em sequência, as glândulas salivares foram perfuradas para a saída da saliva através da centrifugação dos tubos à 11.000g por 5min, sendo o sobrenadante separado em três *pools*, um para cada espécie. A seguir, a concentração das proteínas totais de cada *pool* foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Resumidamente, foram incubadas à temperatura ambiente por 30min padrões (1, 3, 5, 7, 9, 12 e 15 µg) de soro albumina bovina, 1µL dos *pools* de amostra e 1µL de branco (solução de amostra) com 0,9% do reagente de Bradford (Coomassie Blue G-250 0,01%; etanol 5%; 10% de ácido fosfórico 85%) e água q.s.p. 1.000µL. A seguir, realizou-se a análise pontual em triplicata com 300µL da solução incubada

em cada leitura através do espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, EUA) à absorvância de 595nm, sendo os valores médios subtraídos pela média do branco considerados como resultado final. Posteriormente, a saliva coletada foi armazenada à -80°C, até o momento do uso.

5.3 Eletroforese 2-D e análise do gel

A análise por eletroforese 2-D da saliva de triatomíneos foi feita em triplicata. Para a primeira dimensão, as proteínas foram separadas pelo pl em tiras de gel de poliacrilamida de 7cm em gradiente linear de pH de 3 à 10. Primeiramente, às tiras com os *pools* foram submetidas a reidratação com 200µg de amostra e 2,5% de IPG Buffer (GE Healthcare, Suécia) em solução DeSterak (GE Healthcare, Suécia) q.s.p. 125µL e depois colocadas no IPGBox (GE Healthcare, Suécia) por 16h. Em seguida, realizou-se focalização isoeletrica no IPGphor III (GE Healthcare, Suécia) por aproximadamente 23h (300V por 15h; 300Vh em gradiente até 1.000V; 4.000Vh em gradiente até 5.000V; 20.000Vh em gradiente até 5.000V; 200V por 10h).

Terminada a focalização isoeletrica as tiras foram armazenadas à -80°C até o momento do próximo procedimento. Para realizar a segunda dimensão, as tiras foram equilibradas em 5mL de solução Tris-HCl 75mM pH 8,8; uréia 6M; glicerol 29,3%; dodecil sulfato de sódio 2%; e azul de bromofenol 0,002% com 100µg de agente redutor ditioneitol (DTT) e 5mL da mesma solução com 250µg do agente alquilante iodoacetamida durante 30min cada etapa.

Após o equilíbrio das tiras, a segunda dimensão foi realizada como descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Polimerizou-se o gel de separação à concentração de 12,5% de poliacrilamida (Acrilamida 30%; N,N'metilbisacrilamida 2,6%) realizando-se a corrida em sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad, EUA) à 80V constante até o momento que o azul de

bromofenol atingiu o limite inferior do gel. Para averiguar a corrida eletroforética foi utilizado kit composto por cinco proteínas de baixo peso molecular (PM) (97, 66, 45, 30, 20,1 e 14,4 kDa) (GE Healthcare, Suécia).

Após o processamento dos géis com Coomassie Blue G-250 para a evidência das proteínas, os géis foram fotodigitalizados com auxílio de equipamento Image Scanner III (GE Healthcare, Suécia), sendo as imagens calibradas com o aplicativo Labscan (GE Healthcare, Suécia). As imagens dos perfis proteicos foram analisados pelo aplicativo ImageMaster 2D Platinum, versão 7.5 (GE Healthcare, Suécia) para determinação da abundância dos spots proteicos determinados com o seguintes parâmetros: suavidade maior que 2, saliência maior que 50 e área maior que 50.

5.4 Espectrometria de massas

Os *spots* proteicos com maiores percentagens de volume (%V) foram excisados por apresentarem uma maior relevância funcional e em função de uma maior probabilidade de sucesso na abordagem de identificação por MALDI-TOF/TOF.

As proteínas contidas nas frações de gel foram então submetidas ao processo de tripsinólise em gel, conforme protocolo descrito por Shevchenko e cols. (2006). Inicialmente efetuou-se a descoloração do gel das proteínas utilizando-se solução de acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio 25mM, à temperatura ambiente. Em seguida, as proteínas foram reduzidas por DTT 65mM à 56°C e alquiladas por iodoacetamida sobre o abrigo de luz. A tripsinização ocorreu durante 20h à 37°C por ação de uma solução de tripsina (Sigma-Aldrich, EUA). Após a tripsinização, as proteínas foram extraídas por sucessivas etapas por meio de uma solução de ácido fórmico 5%/acetonitrila 50% com auxílio de banho ultrassônico e agitador vórtex. Por último, as amostras com os peptídeos tripticos foram concentradas em

speedvac e re-suspendidas em 10µL de acetonitrila 50%/ácido trifluoracético 0,1%.

Uma alíquota de 1µL da solução com a amostra foi aplicada em uma placa de aço polida, na proporção de 1:1 em relação a matriz α -Ciano-4-hidroxicinâmico. Os *spots* selecionados foram submetidos à espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha), o qual foi gerenciado pelo aplicativo Flexcontrol, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). Os dados de MS1 foram adquiridos pelo método refletivo no modo positivo, com uma faixa de detecção de 500-5.000Da e os dados de MS2 pelo método LIFT, também no modo positivo. Foram escolhidos os íons com maior intensidade em relação à razão massa/carga (m/z), para obtenção dos espectros de MS2. Os espectros resultantes foram processados com o auxílio do aplicativo FlexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha).

As amostras que não geraram resultados pela análise feita por MALDI-TOF/TOF foram novamente concentradas em equipamento de liofilização *speedvac*, sendo re-suspendidos em 60µL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%. Foram utilizados 10µL da solução com as amostras para a análise no espectrômetro de massas do tipo Ion trap LC-MS Amazon (Bruker Daltonics, Alemanha) acoplado ao sistema UPLC nanoACQUITY (WATERS, EUA), o qual possui uma coluna *trap* e uma capilar C18 BEH130, com 100µm × 100mm - 1,7µm de resolução. O espectrômetro operou no modo auto-MSn e os dados de MS1 e MS2 foram adquiridos pelo modo positivo em uma faixa de detecção de 300-1.500m/z e os dados de MS2, também no modo positivo, foram adquiridos com uma faixa de detecção de 70-3.000m/z a um limite de massas padrão de 27%.

5.5 Análise dos espectros e caracterização proteica

As listas de massas referentes aos espectros dos peptídeos obtidos por MALDI-TOF/TOF e Ion trap LC-MS foram analisadas pelo algoritmo MS/MS

Ion Search do aplicativo Mascot Daemon, versão 2.2.07 (Matrix Science, Inglaterra) e pelos algoritmos Peaks DB, Peaks PTM (modificações pós-traducionais), Spider (mutações) e Denovo (sequenciamento de novo) do aplicativo Peaks, versão 7 (Bioinformatics Solutions, Canadá).

Foi utilizado o banco de dados específico de triatomíneos montado em 12/02/2015 da plataforma online UniProt (UniProt Consortium) para rodar em servidores locais. Nas pesquisas dos espectros contra os bancos de dados foram utilizados valores de tolerância para a variação de massas da proteína de 0,2Da para os dados de MALDI-TOF/TOF e Ion trap LC-MS, respectivamente. Para as buscas e validações foi utilizado também a carbamidometilação dos resíduos de cisteína (alquilação com iodoacetamida) como modificação fixa e a oxidação da metionina como modificação variável.

Para validar as proteínas identificadas pelo Mascot Daemon foi utilizado o programa Scaffold, versão 3.6.4 (Proteome Software, EUA), utilizando o critério de pelo menos um peptídeo acima de 90% e 90% de probabilidade por proteína encontrada. O aplicativo Peaks também validou as proteínas identificadas por Ion trap LC-MS, utilizando abordagem estatística de *False Discovery Rate* menor a 1%.

Para as caracterizações dos *spots* e proteínas identificadas, foram utilizados os seguintes recursos: %V obtido pelo aplicativo ImageMaster referente a cada *spot* (que é a porcentagem de um *spot* sobre a porcentagem do volume total dos *spots*), para determinar a abundância relativa de proteínas nos géis e abundância de cada *spot*; score conferido pelos aplicativos Scaffold (identidade) ou Peaks, número de peptídeos e cobertura como critério de seleção da proteína mais significativa do *spot* (PMS); predição do PM e pl teóricos com o aplicativo Compute pI/Mw da plataforma ExPasy (Swiss Institute of Bioinformatics, Suíça); avaliação da inter-relação das proteínas com o aplicativo InteractiVenn (VICG-USP, Brasil); análises estatísticas com

o aplicativo GraphPad Prism, versão 6.1 (Graphpad Software); análises de interação metabólica pelo Cytoscape (*Cytoscape Consortium*); classificação do processo biológico e função molecular com o Gene Ontology (Gene Ontology Consortium); alinhamento de sequências proteicas disponíveis na plataforma UniProt através do BLAST.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Aquisição de amostras e análise dos perfis eletroforéticos 2-D

Na extração salivar de *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri*, adquiriu-se um *pool* de saliva por espécie, com concentração proteica de 20µg/µL, 25µg/µL e 26µg/µL, respectivamente. Pelos perfis eletroforéticos 2-D obtidos a partir da saliva das três espécies avaliadas, evidenciaram-se 131 *spots* mais abundantes através do ImageMaster, dos quais 52 foram de *R. prolixus*, 46 de *T. lecticularia* e 33 de *P. herreri*. Foram identificados, por espectrometria de massas, 82 *spots* dentre os 131 evidenciados, sendo observados 28 de *R. prolixus*, 34 de *T. lecticularia* e 20 de *P. herreri*. Do total dos *spots* identificados, 53 foram detectados por MALDI-TOF/TOF e 29 por Ion trap LC-MS (FIGURA 1).

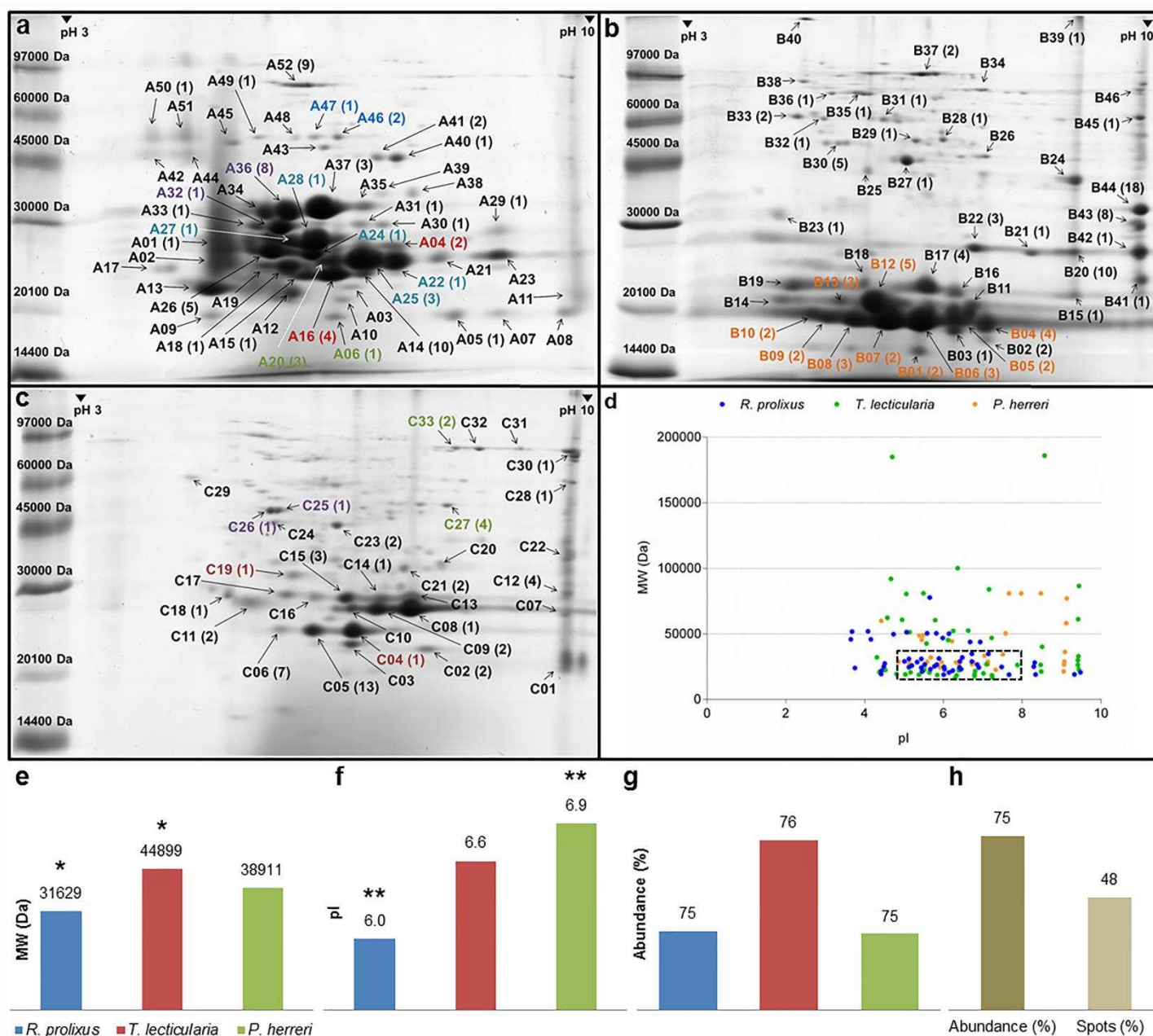


FIGURA 1 - (a) Perfil eletroforético 2-D de *R. prolixus*; (b) Perfil eletroforético 2-D de *T. lecticularia*; (c) Perfil eletroforético 2-D de *P. herreri*; Para as figuras "a", "b" e "c", os códigos são referentes aos spots identificados pelo ImageMaster, o número entre parênteses à frente do código é referente ao número de proteínas identificadas daquele spot, as cores iguais referem-se às mesmas PMS em spots diferentes; (d) Representação da dispersão dos spots das três espécies quanto ao PM e ao pI; A área delimitada na figura "d" é referente aos 10% da área total do gel que contém uma maior concentração de spots identificados; (e) Médias do PM de todos os spots identificados referentes às três espécies; (f) Médias do pI de todos os spots identificados referentes às três espécies; (g) Abundância (%V) de proteínas gerais (mesmo sem identificação) das três espécies em uma mesma área de 10% do gel (delimitação: PM entre 15.000Da e 35.000Da; pI entre 5 e 8), que contém um maior número de spots identificados; (h) Média da abundância de proteínas e porcentagem de spots identificados nas três espécies; Barras marcadas com * e ** diferem entre si, ao nível de significância de 5% pelo teste Tukey.

Pela avaliação realizada das médias de PM e pl entre *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri* pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%, observamos que *R. prolixus* se diferiu de *T. lecticularia* quanto ao PM (FIGURA 1e) e de *P. herreri* quanto ao pl (FIGURA 1f). Não houve diferença significativa entre *T. lecticularia* e *P. herreri* em ambas as avaliações. Ao se analisar uma mesma região do gel nas três espécies, referente à 10% da área total do gel que contém uma maior concentração de *spots* identificados (FIGURA 1d), verificamos que todas possuem uma abundância (%V) de proteínas, mesmo sem identificação, maior que 50%, sendo a abundância para *R. prolixus* 75%, para *T. lecticularia* 76% e para *P. herreri* 75%, com 56%, 37% e 52% *spots* identificados, respectivamente. Não houve diferença entre às abundâncias das três espécies, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (FIGURA 1g).

Estas características demonstram que a saliva é constituída, em maior abundância, de proteínas de baixo PM, 31.629Da, 44.899Da e 38.911Da para *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri*, respectivamente, conferindo um caráter neutro em *P. herreri* (pl 6,9) e levemente ácido em *T. lecticularia* (pl 6,6), se acentuando em *R. prolixus* (pl 6). Estes achados foram evidenciados em trabalhos anteriores com a saliva de triatomíneos, onde Charneau e cols. (2007) encontraram em uma análise proteômica de *T. infestans* características físico-químicas semelhantes à deste trabalho. Os resultados observados também demonstram que a área delimitada (10%) nos géis das três espécies contém, em média, 75% das proteínas estimadas por todos os *spots* identificados no gel, além de quase metade (48%) destes *spots* (FIGURA 1h). Uma abundância expressiva em apenas uma fração equivalente a um décimo do gel. Proteínas com delimitação de PM entre 15.000Da e 35.000Da, e pl entre 5 e 8, são evidenciadas por exemplo em estudos de saliva e glândula salivar de *R. prolixus*, cujas proteínas predominantes são as lipocalinas, destacando-se as nitroforinas (RIBEIRO,

JOSÉ M C et al., 2004; CHARNEAU et al., 2007), as quais possuem PM médio de 20.000Da e pl médio de 6,6 (“UniProt”; CHAMPAGNE et al., 1995).

6.2 Validação das proteínas identificadas

Foram identificadas e validadas 221 proteínas referentes aos espectros gerados por espectrometria de massas, encontrados nos 131 *spots* evidenciados nos géis, das quais 106 foram obtidas por MALDI-TOF/TOF e 115 por Ion trap LC-MS. Das 106 proteínas obtidas por MALDI-TOF/TOF, 16 foram validadas pelo Scaffold e PEAKS, 40 foram validadas somente pelo Scaffold e 50 foram validadas somente pelo PEAKS. Das 115 proteínas obtidas por Ion trap LC-MS, seis foram validadas pelo Scaffold e PEAKS, 47 foram validadas somente pelo Scaffold e 62 foram validadas somente pelo PEAKS. Destas 221 proteínas validadas, 69 são de *R. prolixus*, 100 de *T. lecticularia* e 52 de *P. herreri* (TABELA 1).

TABELA 1 - Número total de proteínas de *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri* identificadas por MALDI-TOF/TOF e Ion trap LC-MS e validadas por Scaffold e PEAKS.

			Triatomíneos			Total
			<i>R. prolixus</i>	<i>T. lecticularia</i>	<i>P. herreri</i>	
MALDI-TOF/TOF	Validação	Scaffold e PEAKS	6	4	6	16
		Scaffold	15	11	14	40
		PEAKS	16	22	12	50
	Total de proteínas validadas		37	37	22	106
Ion trap LC-MS	Validação	Scaffold e PEAKS	2	2	2	6
		Scaffold	9	30	8	47
		PEAKS	21	31	10	62
	Total de proteínas validadas		32	63	30	115
Total de proteínas validadas			69	100	52	221

A estratégia de se usar primeiramente o MALDI-TOF-TOF foi devido a sua maior acurácia, seguido então da utilização do Ion trap LC-MS nos *spots* não identificados anteriormente, por possuir uma maior sensibilidade. Esta estratégia, juntamente com a utilização de dois aplicativos de busca em banco de dados (Mascot Daemon e PEAKS) e dois de validação (Scaffold e PEAKS), aumentou a cobertura de detecção de proteínas nos *spots* identificados pelo ImageMaster, objetivo fundamental deste trabalho.

6.3 Diversidade e caracterização das proteínas

Na análise da diversidade das proteínas identificadas, ao se estimar o agrupamento delas e a abundância, foi considerado apenas as PMS, ou seja, as proteínas que obtiveram uma maior significância em spots que foram identificadas mais de uma proteína (ANEXO I). Através do agrupamento por número de proteínas identificadas, observa-se um maior número de nitroforinas em *R. prolixus* (39%), em contraste com um maior número de proteínas diversas em *T. lecticularia* (52%) e *P. herreri* (50%) (FIGURA 2a). Pelo agrupamento por abundância, observa-se, também, um maior número de nitroforinas em *R. prolixus* (68%), porém mais expressivo. Entretanto, pelo mesmo agrupamento, observa-se em *T. lecticularia* e *P. herreri* (50%) uma maior abundância de lipocalinas diversas, com 79% e 49%, respectivamente (FIGURA 2b). Não se encontrou nitroforinas em *T. lecticularia* e *P. herreri*.

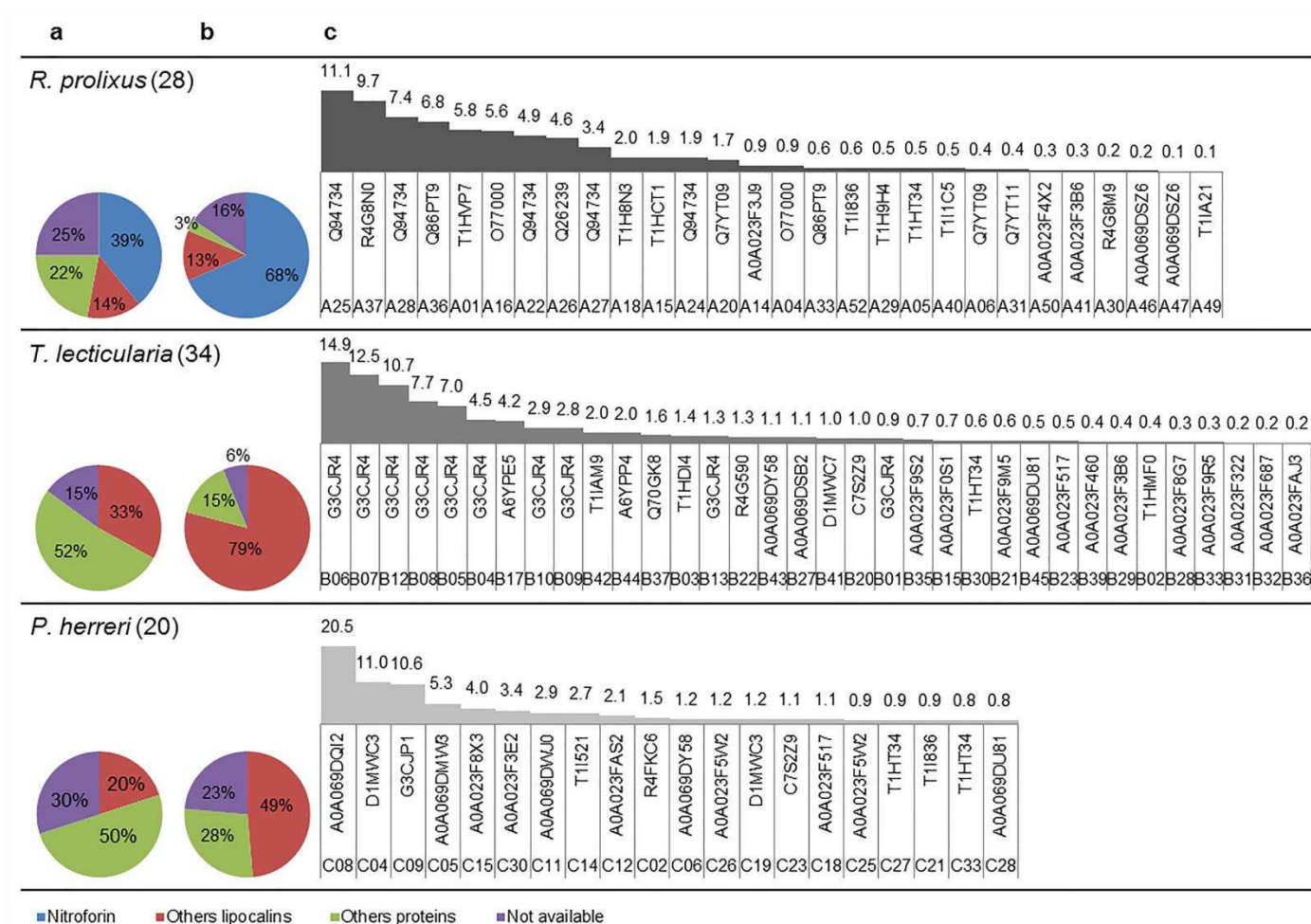


FIGURA 2 - (a) Agrupamento das PMS pelo número de proteínas identificadas em *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri*; (b) Agrupamento das PMS pela abundância (%V) nas três espécies; (c) Abundância (%V) PMS em cada spot nas três espécies; *others lipocalins*: lipocalinas com exceção nas nitroforinas; *others proteins*: proteínas com exceção das lipocalinas, incluindo as nitroforinas; *not available*: proteínas que não obtiveram classificação; O número entre parênteses à frente da espécie é referente ao número de PMS da espécie relacionada.

Esses achados demonstraram uma discrepância significativa da abundância das nitroforinas, em relação às outras proteínas em *R. prolixus*, corroborando trabalhos transcriptômicos anteriores de *R. prolixus*, os quais concluem ser esta família de proteínas a mais importante no repasto sanguíneo desses insetos (RIBEIRO, JOSÉ M C et al., 2004; ANDERSEN et al., 2005). O grupo de outras lipocalinas, excetuando-se as nitroforinas, incluiu as principais proteínas encontradas em *T. lecticularia* e *P. herreri*, o que também corrobora pesquisas sialômicas dos gêneros *Triatoma* (ASSUMPÇÃO et al., 2008, 2012; SCHWARZ et al., 2014) e *Panstrongylus* (RIBEIRO et al., 2015),

apesar do presente trabalho ser o primeiro estudo proteômica de *T. lecticularia* e *P. herreri*.

Dentre as PMS de *R. prolixus*, a mais abundante foi a *Nitrophorin-4* (UniProt: Q94734) identificada em cinco *spots* diferentes, totalizando 28,7% da quantidade de proteínas conferida a todos os *spots* identificados (FIGURA 2c). Esta proteína é uma das mais importantes na alimentação do *R. prolixus*, a qual age na liberação de óxido nítrico, atuando como importante vasodilatador (ANDERSEN et al., 2005). Na sequência, como a mais expressada, identificou-se a *Putative nitrophorin* (UniProt: R4G8N0), com 9,7% de abundância, seguida da *Biogenic amine-binding protein* (UniProt: Q86PT9), presente em dois *spots*, totalizando 7,4% da quantidade de proteínas (FIGURA 2c). Ao se analisar pelo BLAST a sequência da *Putative nitrophorin*, obteve-se uma identificação de 81% com a *Nitrophorin 1a* (UniProt: Q7YT11), a qual possui função semelhante à Nitroforina 4 (ANDERSEN et al., 2005). Com relação à *Biogenic amine-binding protein*, esta é caracterizada como sendo uma lipocalina que se liga à serotonina, epinefrina e norepinefrina, atuando como vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária (ANDERSEN et al., 2003). As funções descritas destas três proteínas explicam as suas significativas expressões.

Pela análise das PMS mais expressas em *T. lecticularia*, observa-se um contraste na abundância da *Salivary lipocalin 5* (UniProt: G3CJR4) em relação às outras. Ela é expressa em 10 *spots* diferentes, com um total de 65,2% de abundância, uma grande discrepância ao se comparar com a segunda proteína de maior abundância, que é *Salivary lipocalin* (UniProt: A6YPE5) com 4,2% (FIGURA 2c). A grande expressão dessas lipocalinas, em especial à *Salivary lipocalin 5*, está fundamentada na sua caracterização, principalmente com a função de modulação do sistema imune do hospedeiro (ANDERSEN et al., 2005).

Em *P. herreri*, diferentemente das outras duas espécies, a proteína de maior expressão, a *Putative triabin* (UniProt: A0A069DQI2), não se repetiu em outros *spots*, tendo alcançado, no entanto uma abundância de 20,5%, seguida de uma proteína não categorizada (UniProt: D1MWC3), presente em dois *spots*, totalizando 12,2% e uma *Salivary lipocalin* (UniProt: G3CJP1), com 10,6% (FIGURA 2c). A *Putative triabin* é classificada como uma lipocalina, a qual forma um complexo com a trombina, causando o prolongamento do tempo de coagulação, possuindo importante papel no repasto sanguíneo dos triatomíneos (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1995), devido a isso, sua elevada expressão. Logo, a proteína não categorizada, a qual obteve a segunda maior expressão não obteve resultado significativo ao se analisar a sequência pelo BLAST.

O fato das diversas proteínas não categorizadas, que se repetiram em diferentes *spots* na mesma espécie, pode ser explicado por diversos fatores, entre eles, a presença de modificações pós-traducionais, mutações ou alterações na cadeia proteica ou mesmo isoformas diferentes, podendo ser consequência de um processo evolutivo (BERG et al., 2012). Sabe-se que existem diversas isoformas de proteínas presentes na saliva de artrópodes hematófagos, por exemplo, as apirases, as quais possuem por volta de quinze isoformas *T. infestans*, provavelmente resultado de modificações pós-traducionais (CHARNEAU et al., 2007).

6.4 Comparação das mesmas proteínas entre as espécies

Ao se comparar as mesmas PMS entre as espécies, encontrou-se uma proteína em comum entre *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri*, e outra entre *R. prolixus* e *T. lecticularia*. Na comparação de *T. lecticularia* e *P. herreri*, verificou-se quatro proteínas em comum entre eles (FIGURA 4a). Pela averiguação do pI e PM das PMS, observa-se uma maior discrepância da proteína não categorizada (UniProt: T1HT34) entre as três espécies, da proteína não categorizada (UniProt: T1I836) entre *R. prolixus* e *T. lecticularia*

e da *Putative 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase* (UniProt: A0A069DY58) e *Arginine kinase* (UniProt: C7S2Z9) entre *T. lecticularia* e *P. herreri* (FIGURA 3b). Pela análise da abundância das PMS em comum nos três modelos, observamos que as proteínas de *P. herreri* apresentam maior abundância em todas as comparações. Confrontando as proteínas de *R. prolixus* e *T. lecticularia*, nota-se uma maior abundância nas moléculas de *T. lecticularia* nas duas comparações realizadas (FIGURA 3c).

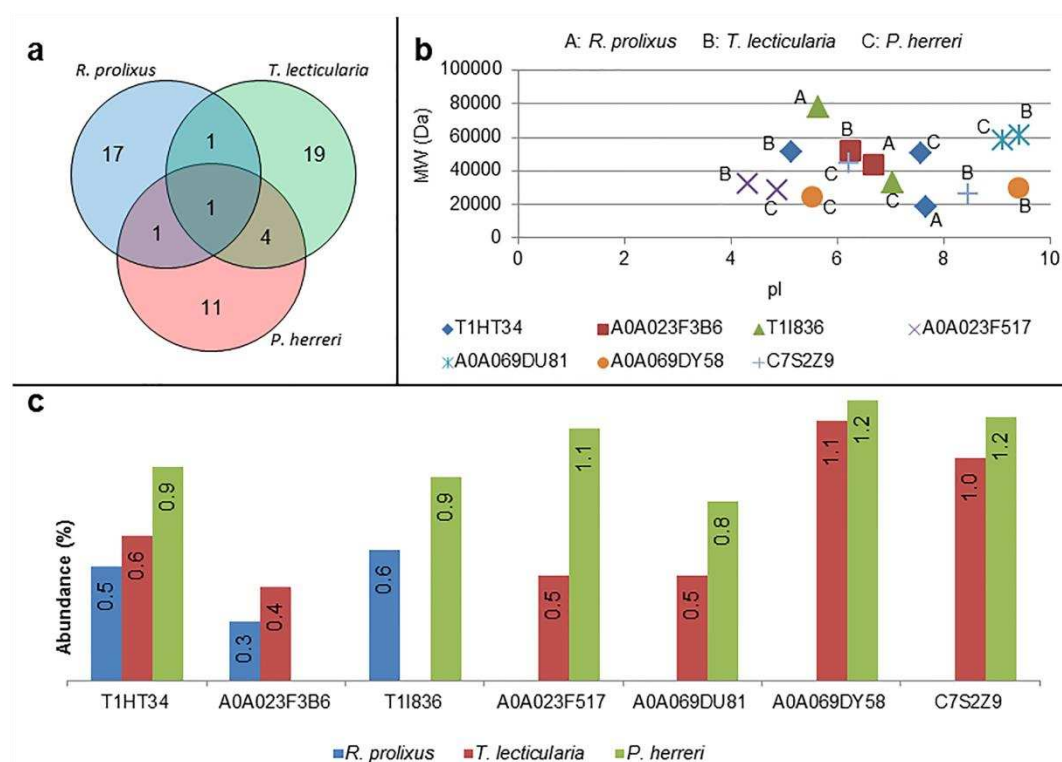


FIGURA 3 - (a) Relação das PMS entre *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri*; mesma proteína identificada em *spots* diferentes da mesma espécie são contabilizadas como uma única proteína; (b) Relação de PM e pI das PMS em comum das três espécies; (c) Relação da abundância das PMS em comum (código do UniProt) das três espécies.

Esta discrepância em relação ao PM e pI encontrada nas proteínas não categorizadas (UniProt: T1HT34; UniProt: T1I836), *Putative 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase* (UniProt: A0A069DY58) e *Arginine kinase* (UniProt: C7S2Z9) pode ser devido à presença de modificações pós-

traducionais, mutações ou alterações na cadeia proteica ou mesmo isoformas diferentes (BERG et al., 2012), como citado anteriormente.

A abundância mais expressiva das PMS em comum, presente em *P. herreri*, pode ser explicado pela maior abundância de outras proteínas que não lipocalinas nesta espécie (FIGURA 3b), em relação às outras duas, visto que das sete proteínas em comum encontradas, nenhuma está caracterizada como lipocalina, incluindo as nitroforinas.

A única molécula presente nas três espécies, a proteína não categorizada (UniProt: T1HT34) (FIGURA 4), serve como elo proteico entre elas, e ao se fazer seu BLAST, obteve-se identificação de 93% com a Putative fry-like conserved (UniProt: A0A023F4K0) de *T. infestans*. Nota-se que a Putative fry-like conserved é uma proteína, também, mantida nas três modelos estudados, sendo paróloga à FryL (UniProt: O94915), proteína intracelular envolvida no processo de transcrição dos genes (BECHTEL et al., 2007).

Dentre as PMS em comum entre *R. prolixus* e *T. lecticularia* e entre *R. prolixus* e *P. herreri*, temos a Putative inositol-145-triphosphate 5-phosphatase (UniProt: A0A023F3B6) e a proteína não categorizada (UniProt: T1I836), respectivamente (FIGURA 3). Embora a proteína não categorizada T1I836 não tenha uma identificação significativa pelo BLAST, através do UniProt encontrou-se algumas anotações relatando sua ação como hidrolase e protease, podendo atuar no repasto sanguíneo desses insetos. A *Putative inositol-145-triphosphate 5-phosphatase* age através da inativação das plaquetas do hospedeiro (CHARNEAU et al., 2007), atuando também no repasto sanguíneo.

Entre *T. lecticularia* e *P. herreri* identificou-se um número maior de PMS em comum em relação às outras comparações. São elas *Putative multifunctional chaperone* (UniProt: A0A023F517), Catalase (UniProt: A0A069DU81), *Putative 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase* (UniProt: A0A069DY58) e *Arginine kinase* (UniProt: C7S2Z9), cujas funções são correção da tradução,

degradação de água oxigenada, oxirredução e quebra de ATP ou ADP (BERG et al., 2012), respectivamente (FIGURA 3). Estas funções, com exceção da correção da tradução, podem vir a beneficiar na alimentação dos triatomíneos, devido a funções semelhantes atribuídas à outras moléculas (ANDERSEN et al., 2005; CHARNEAU et al., 2007).

6.5 Caracterização funcional das proteínas com base no *Gene Ontology*

Diversas proteínas identificadas não apresentadas nos itens 6.3 e 6.4 devido ao critério adotado de análise de dados nestes tópicos, onde foram consideradas somente as moléculas mais abundantes. Entretanto, vale ressaltar que o fato de serem menos abundantes não exclui o fato de sua importância, uma vez que em outros modelos biológicos algumas proteínas pouco expressas são fundamentais para o funcionamento do organismo (RIBEIRO et al., 2004). Desta forma, todas as proteínas identificadas foram analisadas e agrupadas através de características encontradas no *Gene Ontology*.

Outro fato importante, é que, ao se analisar as interações metabólicas intrínsecas, utilizando a extensão CluoGO do Cytoscape, não se obteve resultado, isto pode ser explicado pelo fato que a saliva de artrópodes hematófagos é constituída de moléculas que possuem ação efetora no hospedeiro, não integrando com vias metabólicas do próprio inseto (ANDERSEN, 2010). Entretanto, ao se caracterizar pontualmente as proteínas mais abundantes encontradas, como visto anteriormente e ao classificá-las diretamente no *Gene Ontology*, observa-se o seu grande potencial efetivo em relação às funções na modulação da defesa e da homeostase nos invertebrados.

Na classificação feita através do *Gene Ontology*, 31% das proteínas identificadas e validadas de *R. prolixus*, 51% de *T. lecticularia* e 43% de *P.*

herrerii obtiveram classificação por processo biológico e função molecular. As proteínas com suas respectivas classificações, com base no *Gene Ontology*, podem ser observadas nos Anexos 2, 3 e 4. Pela classificação por função molecular foram identificadas 77% de *R. prolixus*, 70% de *T. lecticularia* e 77% de *P. herrerii*. (FIGURA 4).

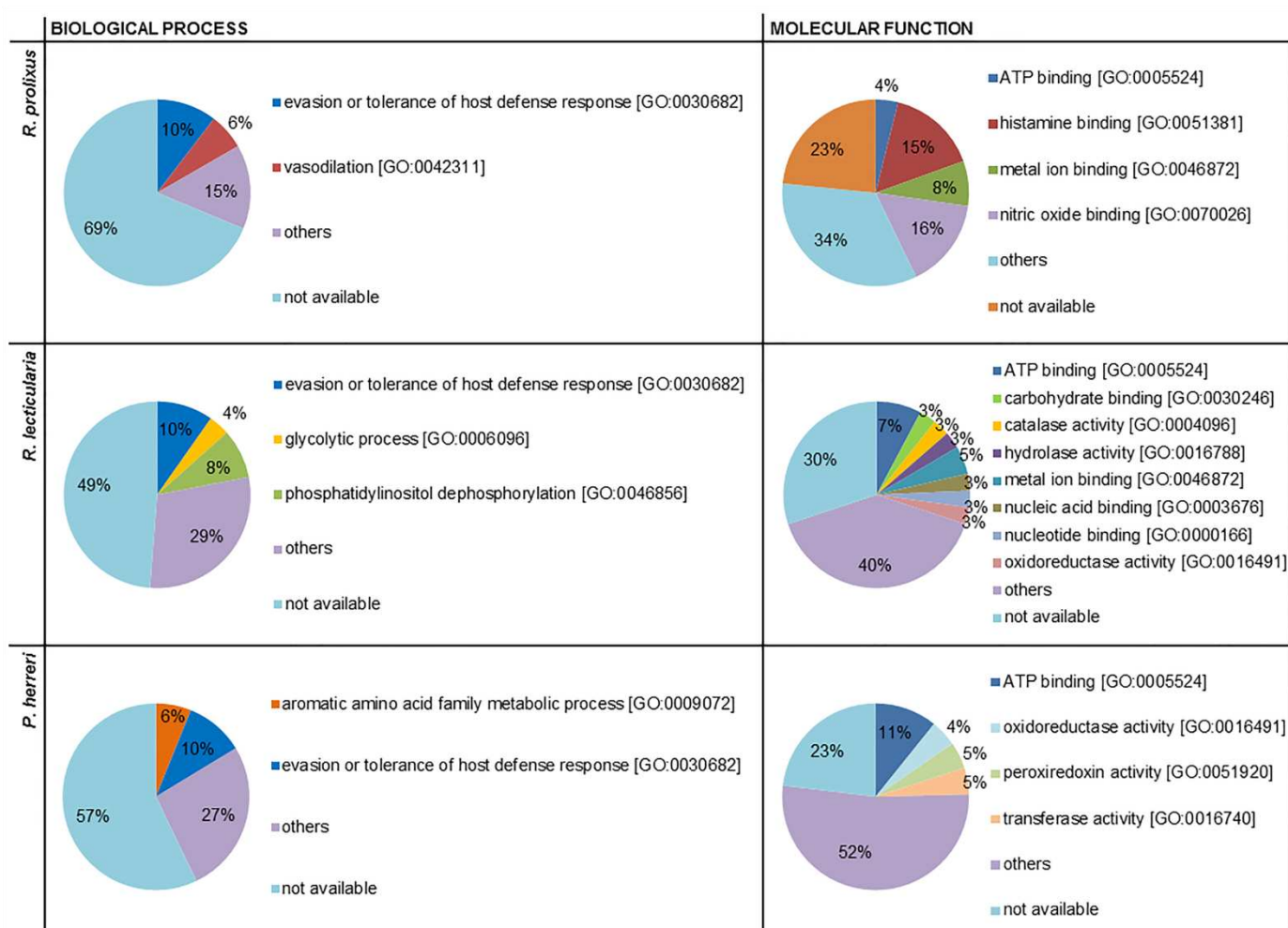


FIGURA 4 - Classificação de processo biológico e função molecular pela plataforma *Gene Ontology* das proteínas identificadas e validadas de *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herrerii*; *others*: proteínas com classes menos presentes (até duas proteínas por classe); *not available*: proteínas que não obtiveram classificação; Algumas proteínas obtiveram mais de uma classificação; O número em frente à espécie é referente ao número de proteínas identificadas e validadas.

Observamos que a classe dentro de processo biológico mais presente nas proteínas de todas as espécies, a qual representa 10% das características

para cada espécie, foi evasão ou tolerância à resposta de defesa do hospedeiro (GO: 0030682). Para função molecular, as classes mais presentes foram ligante de oxido nítrico (GO: 0051381), com 16% para *R. prolixus*; e ligante de ATP (GO: 0005524), com 7% para *T. lecticularia* e 11% para *P. herreri*. Algumas proteínas contabilizaram mais de uma classe (FIGURA 4). Estas funções, conferidas pelas proteínas da saliva dos triatomíneos, vem ressaltar a sua principal função, a qual é driblar o sistema de defesa do hospedeiro, seja através de funções anti-hemostáticas vasodilatadoras, anti-agregadoras plaquetárias, anticoagulantes, anestésicas ou moduladoras das respostas imune inata e adquirida do hospedeiro (RIBEIRO, 1995; FRANCISCHETTI et al., 2009; ARAÚJO, DE et al., 2012). Estas funções também reafirmam os achados anteriores referentes às caracterizações pontuais das PMS.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho traz relevantes achados acerca da proteômica da saliva de *R. prolixus*, incrementando o conhecimento sobre esta espécie e comparações com os dois outros alvos do estudo, *T. lecticularia* e *P. herreri*, para os quais ainda não dispomos de estudos sob uma abordagem proteômica.

Dentre os principais achados, destacamos a elevada prevalência de nitroforinas em *R. prolixus* (68%) e de lipocalinas diversas em *T. lecticularia* (79%) e *P. herreri* (49%). Neste contexto, as PMS de *R. prolixus*, *T. lecticularia* e *P. herreri* mais abundantes, e com uma expressiva diferença entre as outras, foram *Nitrophorin-4* (28,7%), *Salivary lipocalin 5* (65,2%) e *Putative triabin* (20,5%), respectivamente. Outro achado significativo foi a única molécula presente nas três espécies, a proteína não categorizada T1HT34, que serve como elo proteico entre elas, e se identificou como uma paróloga da *Putative fry-like conserved*. Os dados encontrados pela caracterização pelo *Gene Ontology*, vem a corroborar achados anteriores do trabalho, sendo que todas as funções evidenciadas beneficiam o repasto sanguíneo dos triatomíneos.

Estas descobertas enriquecem os bancos de dados proteicos destas três espécies, incrementando a base de conhecimentos quanto à diversidade molecular e a relação entre os gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*. Desta maneira, esperamos que os achados aqui apresentados possam vir a subsidiar projetos futuros destinados a prospecção de alvos com uso biotecnológico potencial e do melhor entendimento da relação dos triatomíneos com seus hospedeiros vertebrados.

8 BIBLIOGRAFIA

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003.

ANDERSEN, J. F. Structure and mechanism in salivary proteins from blood-feeding arthropods. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 7, p. 1120–9, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2889010&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6/9/2015.

ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; VALENZUELA, J. G.; SCHUCK, P.; RIBEIRO, J. M. C. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 7, p. 4611–7, 2003. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/278/7/4611.full>>. Acesso em: 2/9/2015.

ANDERSEN, J. F.; GUDDERRA, N. P.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; RIBEIRO, J. M. C. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 58, n. 2, p. 97–105, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2915583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/9/2015.

ARAÚJO, C. N. DE; BUSSACOS, A. C.; SOUSA, A. O.; HECHT, M. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3829–41, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391912002710>>. Acesso em: 20/8/2015.

ASSUMPÇÃO, T. C. F.; EATON, D. P.; PHAM, V. M.; et al. An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with fogo selvagem in South America. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 6, p. 1005–14, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3366513&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/9/2015.

ASSUMPÇÃO, T. C. F.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; ANDERSEN, J. F.; et al. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 2, p. 213–32, 2008. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2262853&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/9/2015.

BECHTEL, S.; ROSENFELDER, H.; DUDA, A.; et al. The full-ORF clone resource of the German cDNA Consortium. **BMC genomics**, v. 8, p. 399, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213676&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/9/2015.

BERG, J. M.; LEARNING, S.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry + Sapling Learning Access Card, 12 Month Access**. Macmillan Higher Education, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>>. Acesso em: 9/7/2014.

BUSSACOS, A. C. M.; NAKAYASU, E. S.; HECHT, M. M.; 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. 1693–700, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391911001874>>. Acesso em: 3/11/2015.

CALVO, E.; TOKUMASU, F.; MARINOTTI, O.; et al. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin $\alpha 2\beta 1$, and von Willebrand factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 37, p. 26928–38, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2913440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/9/2015.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiology of haemostasis and thrombosis**, v. 34, n. 4-5, p. 221–7, 2005. Karger Publishers. Disponível em: <<http://www.karger.com/Article/FullText/92428>>. Acesso em: 2/9/2015.

CHAMPAGNE, D. E.; NUSSENZVEIG, R. H.; RIBEIRO, J. M. C. Purification, Partial Characterization, and Cloning of Nitric Oxide-carrying Heme Proteins (Nitrophorins) from Salivary Glands of the Blood-sucking Insect *Rhodnius*

prolixus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 15, p. 8691–8695, 1995. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/270/15/8691.long>>. Acesso em: 2/9/2015.

CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA, M.; COSTA, C. M.; 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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387380607002217>>. Acesso em: 2/9/2015.

COSTA, C. M.; SOUSA, M. V; RICART, C. A. O.; 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. 1652–63, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391911000601>>. Acesso em: 2/9/2015.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MENG, Z.; MANS, B. J.; et al. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. **Journal of proteomics**, v. 71, n. 5, p. 493–512, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391908001309>>. Acesso em: 2/9/2015.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; SA-NUNES, A.; MANS, B. J.; SANTOS, I. M.; RIBEIRO, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2051–88, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2785505&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14/7/2015.

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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022191071902071>>. Acesso em: 2/9/2015.

GONÇALVES, R. **Guia de triatomíneos da Bahia**. Feira de Santana BA: EDUEFS, 2012.

GOURBIÈRE, S.; DORN, P.; TRIPET, F.; DUMONTEIL, E. Genetics and

evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heredity**, v. 108, n. 3, p. 190–202, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3282395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/9/2015.

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, 2000. Entomological Society of America. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2000\)037\[0373:IOTBMS\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2000)037[0373:IOTBMS]2.0.CO;2)>. Acesso em: 2/9/2015.

ISAWA, H.; ORITO, Y.; JINGUSHI, N.; et al. Identification and characterization of plasma kallikrein-kinin system inhibitors from salivary glands of the blood-sucking insect *Triatoma infestans*. **The FEBS journal**, v. 274, n. 16, p. 4271–86, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645545>>. Acesso em: 3/11/2015.

JURBERG, J.; GALVAO, C. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) vectors of Chagas disease and implications for human health. **Denisia**, v. 19, p. 1095–1116, 2006. Disponível em: <<Go to ISI>://ZOOREC:ZOOR14302010889>. .

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>>. Acesso em: 10/7/2014.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the AMNH; v. 163, article 3. , 1979. New York : American Museum of Natural History. Disponível em: <<http://digitallibrary.amnh.org/handle/2246/1282>>. Acesso em: 2/9/2015.

LERNER, E. A.; IUGA, A. O.; REDDY, V. B. Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. **Peptides**, v. 28, n. 9, p. 1651–4, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2074892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2015.

LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the**

biomedical and life sciences, v. 849, n. 1-2, p. 190–202, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023206010014>>. Acesso em: 2/9/2015.

MESQUITA, R. D.; CARNEIRO, A. B.; BAFICA, A.; et al. Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infection and immunity**, v. 76, n. 12, p. 5543–52, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2583594&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/9/2015.

MONTFORT, W. R.; WEICHSEL, A.; ANDERSEN, J. F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from Rhodnius prolixus and other blood-sucking arthropods. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1482, n. 1-2, p. 110–118, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483800001655>>. Acesso em: 3/11/2015.

MOREIRA, M. F.; COELHO, H. S. L.; ZINGALI, R. B.; OLIVEIRA, P. L.; MASUDA, H. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug Rhodnius prolixus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 23–28, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174802001637>>. Acesso em: 3/11/2015.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; HAENDLER, B.; DONNER, P.; et al. Triabin, a Highly Potent Exosite Inhibitor of Thrombin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 48, p. 28629–28634, 1995. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/270/48/28629.long>>. Acesso em: 2/9/2015.

ÖNDER, Ö.; SHAO, W.; LAM, H.; BRISSON, D. Tracking the sources of blood meals of parasitic arthropods using shotgun proteomics and unidentified tandem mass spectral libraries. **Nature protocols**, v. 9, n. 4, p. 842–50, 2014. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2014.048>>. Acesso em: 2/9/2015.

RENESTO, P.; SAMSON, L.; OGATA, H.; et al. Identification of two putative rickettsial adhesins by proteomic analysis. **Research in microbiology**, v. 157, n. 7, p. 605–12, 2006. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092325080600057X>>.

Acesso em: 2/9/2015.

REZENDE, J. M. DE; RASSI, A. R. POR QUE OS TRIATOMÍNEOS SÃO CHAMADOS DE “BARBEIROS”? **Revista de Patologia Tropical**, 9. Jun. 2008. Disponível em:

<<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/4035>>. Acesso em: 2/9/2015.

RIBEIRO, J. M.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M. A. .; 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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174803001759>>.

Acesso em: 2/9/2015.

RIBEIRO, J. M.; ANDERSON, J. M.; MANOUKIS, N. C.; MENG, Z.; FRANCISCHETTI, I. M. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 136, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/136>>. Acesso em: 19/8/2015.

RIBEIRO, J. M. C. How ticks make a living. **Parasitology Today**, v. 11, n. 3, p. 91–93, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169475895801626>>.

Acesso em: 2/9/2015.

RIBEIRO, J. M. C.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M. A. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976983>>. Acesso em: 3/9/2015.

RIBEIRO, J. M. C.; CHARLAB, R.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M.; VALENZUELA, J. G. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 6, p. 543–63, 2004. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174804000323>>.

Acesso em: 21/7/2015.

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

n. 3, p. 351–358, 2015. The Oxford University Press. Disponível em: <<http://jme.oxfordjournals.org/content/early/2015/03/28/jme.tjv023.abstract>>. Acesso em: 2/9/2015.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 88–100, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X0900028X>>. Acesso em: 2/9/2015.

SCHWARZ, A.; MEDRANO-MERCADO, N.; SCHAUB, G. 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, 2014. Public Library of Science. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003372>>. Acesso em: 2/9/2015.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–60, 2006. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.468>>. Acesso em: 9/7/2014.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. **Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 321–8, 1999. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/bi9820457>>. Acesso em: 3/11/2015.

UniProt. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/>>. Acesso em: 2/9/2015.

VALENZUELA, J. G. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 10, p. 1199–1209, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174802000838>>. Acesso em: 3/11/2015.

VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; GALPERIN, M. Y.; RIBEIRO, J. M. C. 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, 1998. Disponível em:

<<http://www.jbc.org/content/273/46/30583.long>>. Acesso em: 3/11/2015.

VALENZUELA, J. G.; GUIMARAES, J. A.; RIBEIRO, J. M. A novel inhibitor of factor X activation from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. **Experimental parasitology**, v. 83, n. 2, p. 184–90, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448949690065X>>. Acesso em: 3/11/2015.

ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M.-C.; YATES, J. R. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343–94, 2013. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/cr3003533>>. Acesso em: 25/1/2015.

ANEXOS

ANEXO 1 - PMS e seu respectivo spot nome e grupo.

SPOT	UNIPROT CODE	NOME	GRUPO
A01	T1HVP7	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	<i>Not available</i>
A04	O77000	<i>Nitrophorin-3</i>	<i>Nitrophorin</i>
A05	T1HT34	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	<i>Not available</i>
A06	Q7YT09	<i>Lipocalin AI-4</i>	<i>Others lipocalins</i>
A14	A0A023F3J9	<i>Putative nudix hydrolase fgf-2</i>	<i>Others proteins</i>
A15	T1HCT1	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
A16	O77000	<i>Nitrophorin-3</i>	<i>Nitrophorin</i>
A18	T1H8N3	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	<i>Not available</i>
A20	Q7YT09	<i>Lipocalin AI-4</i>	<i>Others lipocalins</i>
A22	Q94734	<i>Nitrophorin-4</i>	<i>Nitrophorin</i>
A24	Q94734	<i>Nitrophorin-4</i>	<i>Nitrophorin</i>
A25	Q94734	<i>Nitrophorin-4</i>	<i>Nitrophorin</i>
A26	Q26239	<i>Nitrophorin-1</i>	<i>Nitrophorin</i>
A27	Q94734	<i>Nitrophorin-4</i>	<i>Nitrophorin</i>
A28	Q94734	<i>Nitrophorin-4</i>	<i>Nitrophorin</i>
A29	T1H9H4	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
A30	R4G8M9	<i>Putative nitrophorin 1-like</i>	<i>Nitrophorin</i>
A31	Q7YT11	<i>Nitrophorin 1A</i>	<i>Nitrophorin</i>
A33	Q86PT9	<i>Biogenic amine-binding protein</i>	<i>Others lipocalins</i>
A36	Q86PT9	<i>Biogenic amine-binding protein</i>	<i>Others lipocalins</i>
A37	R4G8N0	<i>Putative nitrophorin</i>	<i>Nitrophorin</i>
A40	T111C5	<i>Metalloendopeptidase (Fragment)</i>	<i>Others proteins</i>
A41	A0A023F3B6	<i>Putative inositol-145-triphosphate 5-phosphatase</i>	<i>Others proteins</i>
A46	A0A069DSZ6	<i>Putative cell surface atp diphosphohydrolase apyrase (Fragment)</i>	<i>Others proteins</i>
A47	A0A069DSZ6	<i>Putative cell surface atp diphosphohydrolase apyrase (Fragment)</i>	<i>Others proteins</i>
A49	T1IA21	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
A50	A0A023F4X2	<i>Putative junctophilin (Fragment)</i>	<i>Others proteins</i>
A52	T1I836	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	<i>Not available</i>
B01	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B02	T1HMF0	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
B03	T1HDI4	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
B04	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B05	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B06	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B07	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B08	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B09	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B10	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B12	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B13	G3CJR4	<i>Salivary lipocalin 5</i>	<i>Others lipocalins</i>
B15	A0A023F0S1	<i>Putative nhap-type na+/h+ and k+/h+ (Fragment)</i>	<i>Others proteins</i>
B17	A6YPE5	<i>Salivary lipocalin</i>	<i>Others lipocalins</i>
B20	C7S2Z9	<i>Arginine kinase</i>	<i>Others proteins</i>
B21	A0A023F9M5	<i>Putative glutathione s-transferase</i>	<i>Others proteins</i>
B22	R4G590	<i>Putative galactose binding lectin domain protein (Fragment)</i>	<i>Others proteins</i>
B23	A0A023F517	<i>Putative multifunctional chaperone</i>	<i>Others proteins</i>
B27	A0A069DSB2	<i>Putative creatine kinase</i>	<i>Others proteins</i>

SPOT	UNIPROT CODE	NOME	GRUPO
B28	A0A023F8G7	<i>Putative fumarylacetoacetase</i>	<i>Others proteins</i>
B29	A0A023F3B6	<i>Putative inositol-145-triphosphate 5-phosphatase</i>	<i>Others proteins</i>
B30	T1HT34	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	<i>Not available</i>
B31	A0A023F322	<i>Putative metalloexopeptidase (Fragment)</i>	<i>Others proteins</i>
B32	A0A023F687	<i>Putative vacuolar h⁺-atpase v1 sector subunit b</i>	<i>Others proteins</i>
B33	A0A023F9R5	<i>Putative the tubulin superfamily includes five distinct family (Fragment)</i>	<i>Others proteins</i>
B35	A0A023F9S2	<i>Putative heat shock 70 kDa protein cognate 4</i>	<i>Others proteins</i>
B36	A0A023FAJ3	<i>Putative vacuolar h⁺-atpase v1 sector subunit a</i>	<i>Others proteins</i>
B37	Q70GK8	<i>79 kDa salivary apyrase</i>	<i>Others proteins</i>
B39	A0A023F460	<i>Putative alternative splicing factor asf/sf2 rrm superfamily</i>	<i>Others proteins</i>
B41	D1MWC7	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
B42	T1IAM9	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
B43	A0A069DY58	<i>Putative 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase</i>	<i>Others proteins</i>
B44	A6YPP4	<i>Salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase</i>	<i>Others proteins</i>
B45	A0A069DU81	<i>Catalase</i>	<i>Others proteins</i>
C02	R4FKC6	<i>Putative start domain-containing protein</i>	<i>Others proteins</i>
C04	D1MWC3	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
C05	A0A069DMW3	<i>V-type proton ATPase subunit F</i>	<i>Others proteins</i>
C06	A0A069DY58	<i>Putative 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase</i>	<i>Others proteins</i>
C08	A0A069DQI2	<i>Putative triabin</i>	<i>Others lipocalins</i>
C09	G3CJP1	<i>Salivary lipocalin (Fragment)</i>	<i>Others lipocalins</i>
C11	A0A069DWJ0	<i>Putative lipocalin-like tilipo37 lipocalin (Fragment)</i>	<i>Others lipocalins</i>
C12	A0A023FAS2	<i>Putative salivary lipocalin (Fragment)</i>	<i>Others lipocalins</i>
C14	T1I521	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
C15	A0A023F8X3	<i>Putative peroxiredoxin posttranslational modification</i>	<i>Others proteins</i>
C18	A0A023F517	<i>Putative multifunctional chaperone</i>	<i>Others proteins</i>
C19	D1MWC3	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>
C21	T1I836	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	<i>Not available</i>
C23	C7S2Z9	<i>Arginine kinase</i>	<i>Others proteins</i>
C25	A0A023F5W2	<i>Putative actin-2</i>	<i>Others proteins</i>
C26	A0A023F5W2	<i>Putative actin-2</i>	<i>Others proteins</i>
C27	T1HT34	<i>Uncharacterized protein (Fragment)</i>	<i>Not available</i>
C28	A0A069DU81	<i>Catalase OS=Panstrongylus megistus</i>	<i>Others proteins</i>
C30	A0A023F3E2	<i>Putative glycoprotein glucosyltransferase</i>	<i>Others proteins</i>
C33	T1HT34	<i>Uncharacterized protein</i>	<i>Not available</i>

ANEXO 2 - Proteínas de *R. prolixus* caracterizadas no Gene Ontology quanto ao processo biológico e função molecular

ACESSO	PROCESSO BIOLÓGICO	FUNÇÃO MOLECULAR
Q7YT08	<i>evasion or tolerance of host defense response</i> [GO:0030682]	
Q7YT09	<i>evasion or tolerance of host defense response</i> [GO:0030682]	
T1H9H4	<i>evasion or tolerance of host defense response</i> [GO:0030682]	
T1HVP7	<i>evasion or tolerance of host defense response</i> [GO:0030682]	
T1I8F2	<i>evasion or tolerance of host defense response</i> [GO:0030682]	
A0A069DTI5	<i>glutamine biosynthetic process</i> [GO:0006542]	ATP binding [GO:0005524]; glutamate-ammonia ligase activity [GO:0004356]
T1HSX8	<i>glycerol metabolic process</i> [GO:0006071]	glycerone kinase activity [GO:0004371]
A0A069DU61	<i>N-terminal protein myristoylation</i> [GO:0006499]	glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase activity [GO:0004379]
A0A023F3B6	<i>phosphatidylinositol dephosphorylation</i> [GO:0046856]; <i>signal transduction</i> [GO:0007165]	
T1HCT1	<i>regulation of mitotic cell cycle</i> [GO:0007346]	
T1HLD4	<i>tricarboxylic acid cycle</i> [GO:0006099]	isocitrate dehydrogenase (NAD+) activity [GO:0004449]; magnesium ion binding [GO:0000287]; NAD binding [GO:0051287]
Q26239	<i>vasodilation</i> [GO:0042311]	histamine binding [GO:0051381]; metal ion binding [GO:0046872]; nitric oxide binding [GO:0070026]
Q94733	<i>vasodilation</i> [GO:0042311]	histamine binding [GO:0051381]; metal ion binding [GO:0046872]; nitric oxide binding [GO:0070026]
Q94734	<i>vasodilation</i> [GO:0042311]	histamine binding [GO:0051381]; metal ion binding [GO:0046872]; nitric oxide binding [GO:0070026]; oxidoreductase activity [GO:0016491]
A0A023F9S2		ATP binding [GO:0005524]
T1HSR0		ATP binding [GO:0005524]
A0A069DSZ6		calcium ion binding [GO:0005509]; pyrophosphatase activity [GO:0016462]
T1H8D6		calcium ion binding [GO:0005509]; pyrophosphatase activity [GO:0016462]
T1I107		carboxypeptidase activity [GO:0004180]; metal ion binding [GO:0046872]; metallopeptidase activity [GO:0008237]; peptidyl-dipeptidase activity [GO:0008241]
A0A023F6N9		endonuclease activity [GO:0004519]; RNA-directed DNA polymerase activity [GO:0003964]
O77000		histamine binding [GO:0051381]; nitric oxide binding [GO:0070026]
Q7YT11		histamine binding [GO:0051381]; nitric oxide binding [GO:0070026]
Q86PT9		histamine binding [GO:0051381]; nitric oxide binding [GO:0070026]
R4FLH5		histamine binding [GO:0051381]; nitric oxide binding [GO:0070026]
R4G8M9		histamine binding [GO:0051381]; nitric oxide binding [GO:0070026]
R4G8N0		histamine binding [GO:0051381]; nitric oxide binding [GO:0070026]
T1H8H2		histamine binding [GO:0051381]; nitric oxide binding [GO:0070026]
T1H8M2		histamine binding [GO:0051381]; nitric oxide binding [GO:0070026]
T1H8N3		histamine binding [GO:0051381]; nitric oxide binding [GO:0070026]
A0A023F3J9		hydrolase activity [GO:0016787]
A0A023F0S5		ligase activity [GO:0016874]; zinc ion binding [GO:0008270]
A0A023F0S8		metal ion binding [GO:0046872]; nucleic acid binding [GO:0003676]
A0A023F4S6		metal ion binding [GO:0046872]; nucleotide binding [GO:0000166]; RNA binding [GO:0003723]

ACESSO	PROCESSO BIOLÓGICO	FUNÇÃO MOLECULAR
T11C5		metalloendopeptidase activity [GO:0004222]; zinc ion binding [GO:0008270]
A0A023F268		protein tyrosine phosphatase activity [GO:0004725]
T1I836		serine-type endopeptidase activity [GO:0004252]

ANEXO 3 - Proteínas de *T. lecticularia* caracterizadas no Gene Ontology quanto ao processo biológico e função molecular

ACESSO	PROCESSO BIOLÓGICO	FUNÇÃO MOLECULAR
A0A023F9W1	actin filament depolymerization [GO:0030042]	
A0A023F8G7	aromatic amino acid family metabolic process [GO:0009072]	fumarylacetoacetase activity [GO:0004334]
A0A023F687	ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]; ATP metabolic process [GO:0046034]	ATP binding [GO:0005524]; hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances [GO:0016820]
A0A023FAJ3	ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]; ATP metabolic process [GO:0046034]	ATP binding [GO:0005524]; proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]
T1HZL8	biosynthetic process [GO:0009058]	hydrolase activity, acting on ester bonds [GO:0016788]; oxidoreductase activity [GO:0016491]
E2J7J4	cell redox homeostasis [GO:0045454]	isomerase activity [GO:0016853]
T1IGH8	cilium assembly [GO:0042384]; intraciliary transport [GO:0042073]	
A0A023EYY6	DNA replication [GO:0006260]	DNA binding [GO:0003677]
T1HMF0	DNA-dependent DNA replication [GO:0006261]	DNA binding [GO:0003677]; DNA-directed DNA polymerase activity [GO:0003887]
A6YPE5	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
D1MWC7	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
E2J711	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
G3CJM6	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
G3CJR4	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
G8JKC6	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
G8JKF6	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
Q9U6R6	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
A0A069DYS3	glycolytic process [GO:0006096]	fructose-bisphosphate aldolase activity [GO:0004332]
A0A023F824	glycolytic process [GO:0006096]	magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]
A0A069DTH3	glycolytic process [GO:0006096]	magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]
A0A069DU81	hydrogen peroxide catabolic process [GO:0042744]; response to oxidative stress [GO:0006979]	catalase activity [GO:0004096]; heme binding [GO:0020037]; metal ion binding [GO:0046872]
A0A023F3A0	isoleucyl-tRNA aminoacylation [GO:0006428]	aminoacyl-tRNA editing activity [GO:0002161]; ATP binding [GO:0005524]; isoleucine-tRNA ligase activity [GO:0004822]
A0A023F5V1	microtubule-based process [GO:0007017]; protein polymerization [GO:0051258]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
A0A023F9R5	microtubule-based process [GO:0007017]; protein polymerization [GO:0051258]	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
A0A023FAR7	nucleotide catabolic process [GO:0009166]	hydrolase activity, acting on ester bonds [GO:0016788]; metal ion binding [GO:0046872]; nucleotide binding [GO:0000166]
Q70GK8	nucleotide catabolic process [GO:0009166]	hydrolase activity, acting on ester bonds [GO:0016788]; metal ion binding [GO:0046872]; nucleotide binding [GO:0000166]
A0A023FCQ4	phosphatidylinositol dephosphorylation [GO:0046856]	
A6YPP4	phosphatidylinositol dephosphorylation [GO:0046856]	
D1MWE9	phosphatidylinositol dephosphorylation [GO:0046856]	

ACESSO	PROCESSO BIOLÓGICO	FUNÇÃO MOLECULAR
E2J7A3	<i>phosphatidylinositol dephosphorylation</i> [GO:0046856]	
E2J7A4	phosphatidylinositol dephosphorylation [GO:0046856]	
E2J7A5	phosphatidylinositol dephosphorylation [GO:0046856]	
A0A023F3B6	phosphatidylinositol dephosphorylation [GO:0046856]; signal transduction [GO:0007165]	
T1HD14	regulation of apoptotic process [GO:0042981]	ADP binding [GO:0043531]
A0A023F986	ubiquitin-dependent protein catabolic process [GO:0006511]	threonine-type endopeptidase activity [GO:0004298]
A0A023F5W2		ATP binding [GO:0005524]
A0A023F9S2		ATP binding [GO:0005524]
A0A069DSB2		ATP binding [GO:0005524]; kinase activity [GO:0016301]
C7S2Z9		ATP binding [GO:0005524]; kinase activity [GO:0016301]
A0A023F4E0		ATP binding [GO:0005524]; protein kinase activity [GO:0004672]
T1IAM9		calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity [GO:0004198]
R4G590		carbohydrate binding [GO:0030246]
R4G7N4		carbohydrate binding [GO:0030246]
T1I6G0		carbohydrate binding [GO:0030246]
R7WP97		catalytic activity [GO:0003824]
T1I9V4		catalytic activity [GO:0003824]
A0A023FBJ5		cysteine-type peptidase activity [GO:0008234]
A0A023F322		dipeptidase activity [GO:0016805]; metalloproteinase activity [GO:0008237]; tripeptidase activity [GO:0034701]
A0A023F6C2		endonuclease activity [GO:0004519]; RNA-directed DNA polymerase activity [GO:0003964]
T1HQ17		metal ion binding [GO:0046872]
T1HJH8		metal ion binding [GO:0046872]; nucleic acid binding [GO:0003676]
A0A023F460		nucleic acid binding [GO:0003676]; nucleotide binding [GO:0000166]
T1HBM5		nucleic acid binding [GO:0003676]; zinc ion binding [GO:0008270]
A0A069DY58		oxidoreductase activity [GO:0016491]
G8JKE8		oxidoreductase activity [GO:0016491]
R7WJE8		oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016620]
R4G3E0		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity [GO:0003755]; phosphatase activator activity [GO:0019211]
T1H9N3		phosphorelay sensor kinase activity [GO:0000155]
A0A023F0S1		solute:proton antiporter activity [GO:0015299]
A0A069DXZ5		structural molecule activity [GO:0005198]
A0A023F9M5		transferase activity [GO:0016740]

ANEXO 4 - Proteínas de *P. herreri* caracterizadas no Gene Ontology quanto ao processo biológico e função molecular

ACESSO	PROCESSO BIOLÓGICO	FUNÇÃO MOLECULAR
A0A023FAZ9	aromatic amino acid family metabolic process [GO:0009072]	transferase activity [GO:0016740]
A0A069DPN4	aromatic amino acid family metabolic process [GO:0009072]	transferase activity [GO:0016740]
R4G8N1	aromatic amino acid family metabolic process [GO:0009072]	transferase activity [GO:0016740]
A0A069DMW3	ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]	proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]
R7WKP6	biosynthetic process [GO:0009058]	transferase activity, transferring glycosyl groups [GO:0016757]
T1HFG5	cilium movement [GO:0003341]	ATPase activity [GO:0016887]; ATP binding [GO:0005524]; microtubule motor activity [GO:0003777]

ACESSO	PROCESSO BIOLÓGICO	FUNÇÃO MOLECULAR
A0A023F102	DNA integration [GO:0015074]	nucleic acid binding [GO:0003676]; zinc ion binding [GO:0008270]
D1MWC3	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
A0A069DWJ0	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
A0A069DQI2	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
G3CJP1	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
A0A023FAS2	evasion or tolerance of host defense response [GO:0030682]	
A0A069DTH3	glycolytic process [GO:0006096]	magnesium ion binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]
A0A069DU81	hydrogen peroxide catabolic process [GO:0042744]; response to oxidative stress [GO:0006979]	catalase activity [GO:0004096]; heme binding [GO:0020037]; metal ion binding [GO:0046872]
E2J7A7	nucleotide catabolic process [GO:0009166]	hydrolase activity, acting on ester bonds [GO:0016788]; metal ion binding [GO:0046872]; nucleotide binding [GO:0000166]
A0A023F3E2	protein glycosylation [GO:0006486]	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase activity [GO:0003980]
T1HEX3	protein targeting to peroxisome [GO:0006625]	ATPase activity, coupled [GO:0042623]; ATP binding [GO:0005524]
A0A069DU04	pyrimidine nucleobase metabolic process [GO:0006206]; pyrimidine nucleoside metabolic process [GO:0006213]	phosphorylase activity [GO:0004645]; pyrimidine-nucleoside phosphorylase activity [GO:0016154]; thymidine phosphorylase activity [GO:0009032]
A0A069DRQ6	transport [GO:0006810]	
A0A023EX46		acyl-CoA dehydrogenase activity [GO:0003995]; flavin adenine dinucleotide binding [GO:0050660]
A0A023F5W2		ATP binding [GO:0005524]
C7S2Z9		ATP binding [GO:0005524]; kinase activity [GO:0016301]
A0A069DSB2		ATP binding [GO:0005524]; kinase activity [GO:0016301]
T1HGW4		ATP binding [GO:0005524]; motor activity [GO:0003774]
T1I521		calcium ion binding [GO:0005509]
A0A069DTQ4		heme binding [GO:0020037]; iron ion binding [GO:0005506]; monooxygenase activity [GO:0004497]; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen [GO:0016705]
R4FKC6		lipid binding [GO:0008289]
A0A069DQN4		N-acetyltransferase activity [GO:0008080]
A0A069DY58		oxidoreductase activity [GO:0016491]
G8JKD9		oxidoreductase activity [GO:0016491]
G8JKE8		oxidoreductase activity [GO:0016491]
A0A023F8X3		peroxiredoxin activity [GO:0051920]
A0A069DQA0		peroxiredoxin activity [GO:0051920]
R4FPY0		peroxiredoxin activity [GO:0051920]
T1I836		serine-type endopeptidase activity [GO:0004252]
T1I127		substrate-specific transmembrane transporter activity [GO:0022891]
A0A023F663		substrate-specific transmembrane transporter activity [GO:0022891]