



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



Kelly Cristine Borsatto

**Análise da Interação Parasito-Vetor da Doença de Chagas
– Perfil Metabólico –**

São José do Rio Preto

2024

Kelly Cristine Borsatto

**Análise da Interação Parasito-Vetor da Doença de Chagas
– Perfil Metabólico –**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas –UNESP, Campus de São José do Rio Preto, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni
Coorientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi
Coorientadora: Dra. Mônica Aparecida Coronado
Agência financiadora: CAPES e FAPESP
(2018/25458-3)

São José do Rio Preto

2024

B738a

Borsatto, Kelly Cristine

Análise da Interação Parasito-Vetor da Doença de Chagas – Perfil Metabólico – / Kelly Cristine Borsatto. -- São José do Rio Preto, 2024
118 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientador: Raghuvir Krishnaswamy Arni

Coorientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

1. Triatominae. 2. Metabolômica. 3. Doença de Chagas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Kelly Cristine Borsatto

**Análise da Interação Parasito-Vetor da Doença de Chagas
– Perfil Metabólico –**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, Campus de São José do Rio Preto, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Comissão examinadora

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi
IOC/FIOCRUZ
Coorientador

Prof. Dr. Danilo Grunig Humberto da Silva
UFMS

Prof. Dr. Cleber Galvão Ferreira
IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Jader de Oliveira
FSP/USP

Profª. Dra. Silvana Aparecida Rocco,
LNBio, CNPEM

São José do Rio Preto

08 de janeiro de 2024

Dedicatória

Pelas inúmeras horas de trabalho duro, as noites sem dormir e a persistência que nunca me deixou, dedico esta tese a mim mesma. Agradeço os momentos em que poderia ter desistido, mas optei por seguir em frente. Aprecio a coragem que descobri ter, que me permitiu sair da zona de conforto e buscar a excelência. Esta dedicatória é um lembrete de que a busca dos meus sonhos e objetivos não envolve apenas o resultado final, mas toda a jornada que me levou até ele.

Com esta dedicatória eu celebro a pessoa que me tornei e o crescimento que alcancei através de cada obstáculo durante essa jornada. Sigo acreditando que sou merecedora de todo sucesso, de cada conquista e de cada momento de alegria que meu trabalho trouxe/trará. Nunca desistirei de buscar meus sonhos, ser minha maior defensora, inspiração e, sobretudo, meu apoio inabalável.

Que essa dedicatória não mostre apenas a mim, mas a todos, que podemos ser sempre inspirados pela nossa própria força e, principalmente, que ela nos impulse para os mais belos caminhos que o destino nos reserva.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni, e meus coorientadores, Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi e Dra. Mônica Aparecida Coronado, pelas manifestações de incondicional apoio e disponibilidade, pela compreensão, pelo aconselhamento assertivo e pelo estímulo permanente que muito contribuíram para essa etapa da minha formação.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a Profa. Dra. Ljubica Tasic, por sua contribuição substancial ao meu projeto de doutorado. Sua generosidade ao ceder infraestrutura, tempo e equipe foi fundamental para o desenvolvimento do projeto. Sem o seu apoio dedicado, este trabalho não teria sido possível. Muito obrigado pela sua valiosa colaboração.

Minha gratidão ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa por ceder a infraestrutura do insetário e do seu laboratório para o desenvolvimento do meu projeto. Sua colaboração foi fundamental e tornou possível a realização deste trabalho. Muito obrigado pelo seu apoio.

Aos meus colaboradores Dr. Jader de Oliveira, Dr. Raphael Eberle, Erik Sobrinho Braga, Thyerre Santana da Costa, Gonzalo Garcia Delgado e Carolina Gismene, pela substancial contribuição com o projeto desenvolvido, por todo suporte técnico oferecido e por todo conhecimento agregado. A contribuição de vocês foi imprescindível para a execução desse trabalho e para essa etapa da minha formação. Sem o apoio de vocês não seria possível.

Quero expressar minha profunda gratidão ao meu colaborador, Lucas Gelain Martins, pela significativa contribuição no desenvolvimento do projeto. Seu tempo e conhecimento compartilhados foram essenciais para o sucesso desta empreitada. Um agradecimento especial à Rafaela dos Santos Peinado, cujo caminho cruzou o meu na graduação, mas foi no doutorado que nosso vínculo se estreitou. Juntas, enfrentamos essa etapa, sempre ajudando uma a outra, compartilhando conhecimentos e superando as angústias e dificuldades desta jornada desafiadora. Foi verdadeiramente um prazer ter você ao meu lado.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), seus docentes e funcionários, que desde 2014, quando ingressei no curso de graduação em Ciências Biológicas, me acompanham na minha jornada acadêmica e que contribuíram para me tornar a bióloga que sou hoje. Ao Instituto de Química da UNICAMP e ao Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, por terem cedido infraestrutura, apoio técnico/científico e amparo metodológico para execução do projeto.

O Presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nivel Superior – Brasil – (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de Doutorado (Processo 2018/25458-3) concedida, que possibilitaram a realização desta tese.

Agradeço aos meus pais que sempre priorizaram a minha educação. Obrigado Sr. Dejaime Borsatto e Dona Neiva Borsatto por, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre respeitaram minhas escolhas, me ensinaram amor, carinho, respeito e honestidade, e por sempre estarem ao meu lado. Ao meu irmão Matheus Borsatto por ser um ser humano tão incrível, acreditar em mim e estar ao meu lado sempre.

Agradeço os meus amigos, Mayara G. Ferraz, Henrique M. M. Gimenes, Nicoli Rodrigues, Sara Lima, Vinícius Gobbe, Luiz Otávio Maia, Gabriela Faria, Gabriela Harano, Karina Guimarães, Pedro Henrique, Danilo Grünig e Joyce por estarem ao meu lado na vida. Eu acredito que os amigos são a família que escolhemos e vocês são os melhores. Essa etapa foi mais leve com vocês ao meu lado. Agradeço de forma especial ao Kaio Cesar Chaboli Alevi, que além de meu coorientador é um grande amigo. Foi ele quem me introduziu à ciência, conhece profundamente meu percurso, e, diante dos desafios encontrados, esteve ao meu lado, ajudando-me a manter firme e concluir essa etapa. Sua amizade e apoio foram inestimáveis.

A saúde física e mental devem ser uma prioridade na vida de todos, assim as atividades que nos propomos a desenvolver podem ser desempenhadas com estabilidade e equilíbrio. Dessa forma, agradeço ao meu psiquiatra Dr. Marcos Uzelac, minhas psicólogas Dra. Thaissa e Marcela, minha neurologista Dra. Marina Pozzo e ao meu treinador pessoal Lucas Gonçalves, que me ajudaram nos momentos mais difíceis, que não foram raros nesses últimos anos, sempre me auxiliando e me ensinando a manter o equilíbrio para alcançar a estabilidade necessária para passar por essa etapa da minha vida.

E, acima de tudo, quero dedicar um agradecimento especial ao meu marido Tomás Fialho e aos meus leais filhos de quatro patas, Theodoro e Bartolomeu. Especialmente ao meu marido, cuja presença é constante e incondicional, nos momentos mais desafiadores em que a tentação de desistir era intensa, ele não apenas me impediu de desistir, mas também cultivou em mim a crença de que alcançaria o término desta difícil, porém incrivelmente gratificante, jornada. Agradeço por cada demonstração de carinho, resiliência, respeito e compreensão ao longo destes últimos anos.

***“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as
borboletas.”***

Saint-Exupéry, A. 1966, p.34

Resumo

Os organismos vivos possuem a capacidade de responder a vários sinais intra e extracelulares, o que, por sua vez, cria uma variedade de metabólitos na “sopa” celular. A metabolômica – ciência que lida com a identificação e quantificação de metabólitos num sistema biológico sob um conjunto de condições – está ganhando reconhecimento como uma ferramenta poderosa que ajuda a compreender o efeito de vários fatores de stress e condições ambientais sobre o metaboloma de um determinado sistema biológico. A metabolômica baseada em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) está sendo usada em diferentes áreas, incluindo biologia de doenças, medicina, farmácia, toxicologia, alimentos, ciências ambientais, entre outras, contribuindo com uma melhor compreensão de conjuntos de metabólitos de interesse. Além disso, a RMN é aplicada para obter a impressão digital metabólica associada a diferentes sistemas biológicos. Dessa forma, o trabalho realizado neste doutorado se concentrou na análise metabólica do TG de *Triatoma infestans*, um dos mais importantes vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC). De forma geral, considera-se que este parasito não apresenta patogenicidade aos hospedeiros invertebrados (triatomíneos); no entanto, existem estudos que relatam efeitos negativos causados pela infecção. Assim, neste estudo, abordamos a importância de compreender a relação entre parasito e vetor na DC, por meio da análise comparada do metaboloma do sistema gastrointestinal de exemplares de *T. infestans* infectados e sem infecção pelo *T. cruzi*, por RMN. Identificamos 22 metabólitos, destacando sete (isoleucina, lisina, prolina, colina, betaina, acetato e glicose) como estatisticamente significantes na distinção entre os dois grupos (infectados e sem infecção). Discutimos as implicações fisiológicas desses metabólitos, considerando sua possível relação com fatores epidemiológicos e a interação entre o protozoário e o vetor. Embora nossos achados sugiram alterações no metabolismo do vetor induzidas pela presença do *T. cruzi*, ressaltamos a necessidade de estudos adicionais para determinar se essas mudanças afetam negativamente o inseto. A escassez de dados na literatura sobre o metabolismo do vetor e a interação parasito-vetor destaca a importância de uma compreensão mais aprofundada desses processos, fornecendo *insights* para o desenvolvimento de estratégias de controle de vetores e, por conseguinte, da transmissão da DC.

Palavras-chave: Triatominae. Metabolômica. Doença de Chagas

Summary

Living organisms can respond to various intra- and extracellular signals, which, in turn, create a variety of metabolites in the cellular "soup". Metabolomics – the science that deals with the identification and quantification of metabolites in a biological system under a set of conditions – is gaining recognition as a powerful tool that helps understand the effect of various stress factors and environmental conditions on the metabolome of a given biological system. Metabolomics based on Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is being used in different areas, including disease biology, medicine, pharmacy, toxicology, food, environmental sciences, among others, contributing to a better understanding of sets of metabolites of interest. Furthermore, NMR is applied to obtain the metabolic fingerprint associated with different biological systems. Therefore, the work carried out in this doctorate focused on the metabolic analysis of the TG of *Triatoma infestans*, one of the most important vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease (CD). In general, it is considered that this parasite is not pathogenic to invertebrate hosts (triatomines); however, there are studies that report negative effects caused by the infection. Thus, in this study, we address the importance of understanding the relationship between parasite and vector in CD, through comparative analysis of the metabolome of the gastrointestinal system of specimens of *T. infestans* infected and without *T. cruzi* infection, by NMR. We identified 22 metabolites, highlighting seven (isoleucine, lysine, proline, choline, betaine, acetate and glucose) as statistically significant in distinguishing between the two groups (infected and without infection). We discuss the physiological implications of these metabolites, considering their possible relationship with epidemiological factors and the interaction between the protozoan and the vector. Although our findings suggest changes in the vector's metabolism induced by the presence of *T. cruzi*, we highlight the need for additional studies to determine whether these changes negatively affect the insect. The scarcity of data in the literature on vector metabolism and parasite-vector interaction highlights the importance of a more in-depth understanding of these processes, providing insights for the development of vector control strategies and, therefore, CD transmission.

Keywords: Triatominae. Metabolomics. Chagas disease

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Insetos	13
1.2 Metabolômica: uma breve introdução	14
1.3 Fluxo de trabalho	16
1.4 Espectroscopia de ^1H -RMN	17
1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional (2D)	20
1.5.1 COSY ^1H - ^1H	22
1.5.2 TOCSY ^1H - ^1H	23
1.5.3 HSQC ^1H - ^{13}C	24
1.6 Ressonância Magnética Nuclear com sonda HR-MAS (<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>), para análise de semissólidos	26
1.7 Quimiometria	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Obtenção e procedência dos insetos	28
3.2 Insetos sem infecção	28
3.3 Insetos infectados	30
3.4 Dissecção dos insetos	30
3.5 Preparação das amostras de <i>T. cruzi</i> para os estudos por RMN	30
3.6 Coleta de dados em RMN	31
3.7 Processamentos dos dados	33
3.8 Análises Estatísticas e Quimiométricas	33
3.9 Identificação dos metabólitos	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Perfil global de metabólitos usando espectroscopia de RMN	35
4.2 Análises Estatísticas e Quimiométricas	39
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	54
Referências	55
Apêndice	64

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma das 20 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2023). Estima-se que sete milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) em todo o mundo, principalmente na América Latina (WHO, 2023). Além disso, pressupõe-se que mais de 10 mil pessoas morram, todos os anos, de manifestações clínicas (WHO, 2023), e cerca de 70 milhões de pessoas vivam em área de risco (GUHL; RAMÍREZ, 2021; DE FUENTES-VICENTE et al., 2023; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022; WHO, 2023). Embora a DC seja endêmica de 21 países latino-americanos (DNDI, 2023), essa moléstia já foi relatada em áreas não endêmicas, como Canadá, Estados Unidos, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Suíça, Itália e Espanha (SORIANO-ARANDES et al., 2016).

O protozoário *T. cruzi* é o agente etiológico responsável por esta doença (HOTEZ et al., 2007; WHO, 2023), sendo a principal forma de transmissão por meio das fezes e/ou urina de triatomíneos, pois esses insetos possuem o hábito de defecar durante ou após o repasto sanguíneo e, uma vez infectados pelo *T. cruzi*, podem liberar o parasito sobre a pele do hospedeiro (ALEVI et al., 2021; GIL-SANTANA et al., 2022; OLIVEIRA CORREIA et al., 2022; TÉLLEZ-RENDÓN et al., 2023; ZHAO et al., 2023). Porém, a transmissão pode ocorrer por diversas outras vias, incluindo transmissão oral via alimentos contaminados com o parasito, transfusão de sangue de doadores infectados, transmissão vertical (transplacentária ou durante a amamentação), transplantes de órgãos de doadores chagásicos e, até mesmo, por acidentes laboratoriais (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006; JACKSON et al., 2010; BERN; MARTIN; GILMAN, 2011; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e constituído por diferentes fases que acontecem ora nos triatomíneos (vetores), ora nos vertebrados que atuam como hospedeiros/reservatórios (de forma geral, mamíferos) (TYLER; ENGMAN, 2001; BERN, 2015; BARISÓN et al., 2017). Durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, os insetos ingerem as formas tripomastigotas que passam por uma sequência de transformações ao longo do trato gastrointestinal (TG) do inseto: no estômago, a maioria dos tripomastigotas (forma presente no sangue dos vertebrados) se diferencia em epimastigotas (principal estágio de replicação) e esferomastigotas. Após a passagem para o intestino delgado e reto, os epimastigotas se dividem repetidas vezes e, na porção final do sistema digestório, se transformam em

tripomastigotas metacíclicos (forma infectante para os hospedeiros) que são eliminados nas fezes dos insetos durante o repasto sanguíneo (GARCIA et al., 2010).

Os únicos tratamentos disponíveis para a doença são os antitripanosomatódeos Benznidazol e Nifurtimox, que só são eficazes na fase aguda da doença (HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; CRESPILO-ANDÚJAR et al., 2022). A criação de novas abordagens medicinais para o tratamento da DC tem enfrentado muitos desafios. A complexidade da biologia da infecção, a complexidade da patologia e a natureza de longo prazo da doença são as principais barreiras para o desenvolvimento de novos tratamentos (MILES et al., 1981; BERN, 2015; MESSENGER; MILES; BERN, 2015; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022). Consequentemente, o controle vetorial é considerado a estratégia mais eficiente para combater a DC (WHO, 2023). Entretanto, o controle dos vetores apresenta vários obstáculos, pois os triatomíneos apresentam ampla distribuição geográfica, alto grau de domiciliação de algumas espécies e variações significativas entre vetores em termos de morfologia, fisiologia e genética (o que reflete em diferenças na capacidade e competência vetorial e resulta em resistência à inseticidas) (MESSENGER; MILES; BERN, 2015; DE FUENTES-VICENTE et al., 2023). Além disso, os desafios de implantar uma vigilância epidemiológica eficaz, que possua uma cobertura espacial e populacional adequada e que atue na detecção de novos casos de incidência e reincidência dos triatomíneos são as principais barreiras ao controle desse vetor (DE ARIAS et al., 2022).

1.1 Insetos

Atualmente, existem 160 espécies descritas na subfamília Triatominae (157 espécies existentes e três fósseis), agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (ALEVI et al., 2021; GIL-SANTANA et al., 2022; OLIVEIRA CORREIA et al., 2022; TÉLLEZ-RENDÓN et al., 2023; ZHAO et al., 2023). *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *T. sordida* (Stål, 1859) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), apresentam maiores competências vetoriais no Brasil (GALVÃO, 2014). No entanto, todos os triatomíneos, de ambos os sexos e em qualquer fase do desenvolvimento após a eclosão (N1, N2, N3, N4, N5 e adultos), são considerados como potenciais vetores da DC. Entre as espécies descritas, *T. infestans* é considerado um dos principais vetores, principalmente devido às suas características biológicas, tais como o alto grau de antropofilia, adaptação ao ambiente domiciliar, capacidade de suportar longos períodos em jejum e apresentar uma ampla distribuição, tornando-o um grande problema de saúde pública (DUJARDIN; SCHOFIELD; TIBAYRENC, 1998).

Após ações de controle realizadas pela Iniciativa do Cone Sul em que Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai uniram esforços para a eliminação do principal vetor na América do Sul, *T. infestans* teve sua distribuição reduzida (DIAS; SCHOFIELD, 1999). No entanto, essa espécie se tornou motivo de preocupação novamente devido aos relatos de reinfestação na Argentina, Bolívia e Paraguai (GÜRTLER et al., 2007) evidenciando a dificuldade do controle vetorial dessa espécie, principalmente devido a sua ampla extensão em áreas endêmicas e à dificuldade de implementar uma vigilância epidemiológica eficiente, a fim de evitar a recuperação de populações de insetos previamente tratados com inseticidas (PÉREZ DE ROSAS et al., 2013). Todavia, essa espécie ainda mantém sua importância epidemiológica devido à sua grande capacidade de adaptação ao meio domiciliar e peridomiciliar e, sendo deste modo, um importante vetor do protozoário *T. cruzi* (DUJARDIN; SCHOFIELD; TIBAYRENC, 1998).

De maneira geral, considera-se que o protozoário *T. cruzi* não apresenta patogenicidade aos hospedeiros invertebrados (triatomíneos) (DE OLIVEIRA et al., 2018). No entanto existem estudos que relatam efeitos negativos causados pela infecção, como, por exemplo: menor taxa de oviposição (3,5 vezes menor que em fêmeas sem infecção), de fertilidade e de eclosão dos ovos em *P. megistus* contaminados com o *T. cruzi* (LIMA et al., 1992). Além disso, foram observados tanto prejuízos no desempenho reprodutivo de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 – os quais podem reduzir o *fitness* do inseto e trazer consequências para a sua sobrevivência (FELLET et al., 2014) –, como alterações nos aspectos comportamentais em *Mepraia spinolai* (Porter, 1934) – como a diminuição do tempo entre a alimentação e a defecação, podendo influenciar diretamente na capacidade vetorial (BOTTO-MAHAN; CATTAN; MEDEL, 2006). Nesse contexto, é importante ressaltar que os vetores são comumente explorados pelos parasitos, e conhecer a relação entre eles, é um passo importante para a epidemiologia da DC (ELLIOT et al., 2015).

1.2 Metabolômica: uma breve introdução

A metabolômica é uma das ciências 'ômicas' que tem se expandido rapidamente na era pós genômica, possibilitando o estudo de perfis de metabólitos em um sistema (célula, tecido, organismo ou fluido biológico) em uma determinada condição (ROCHFORD, 2005). Os metabólitos não são apenas o produto da expressão gênica, eles são o resultado da interação do genoma de um determinado sistema biológico com o seu ambiente e servem como assinaturas diretas da atividade bioquímica de um organismo, sendo assim, são mais fáceis de correlacionar com o fenótipo (GOODACRE et al., 2004; ROCHFORD, 2005; SNART;

HARDY; BARRETT, 2015). Nesse contexto, a metabolômica tornou-se uma abordagem poderosa que tem sido amplamente adotada, uma vez que fornece informações do fenótipo metabólico funcional, detectando o metaboloma completo de um tecido ou organismo sob uma determinada condição (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; SNART; HARDY; BARRETT, 2015).

As estratégias para estudos com metabolômica foram divididas em duas abordagens distintas, metabolômica não direcionada e metabolômica direcionada (ALONSO; MARSAL; JULIÃ, 2015), cada uma com suas próprias vantagens e desvantagens, ambas muitas vezes utilizadas em combinação para obter informações mais precisas. A metabolômica não direcionada tem o objetivo de medir o maior número possível de metabólitos em uma amostra, permitindo uma análise abrangente de todos os metabólitos mensuráveis na amostra em estudo (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; ROBERTS et al., 2012). Os metabólitos observados pela estratégia não direcionada requerem uma identificação minuciosa usando metodologias analíticas adequadas. Essa estratégia permite a descoberta de novos alvos como biomarcadores, pois a cobertura do metaboloma é ampla, entretanto, os principais desafios dessa abordagem estão nos protocolos para preparação das amostras, geração de grandes quantidades de dados, além das dificuldades em identificar e caracterizar os metabólitos encontrados (GOODACRE et al., 2004; ROBERTS et al., 2012; ALONSO; MARSAL; JULIÃ, 2015).

A metabolômica direcionada tem como propósito a medição de conjuntos predefinidos de metabólitos com alto nível de precisão e exatidão, utilizando experimentos baseados em hipóteses bioquímicas específicas que visam identificar ou estudar uma ou mais vias em particular (GOODACRE et al., 2004; PUTRI et al., 2013). Com essa estratégia, a preparação de amostras pode ser otimizada, uma vez que todas as espécies analisadas estão claramente definidas, é possível reduzir a dominância de outras moléculas que poderiam estar presentes nas amostras (ROBERTS et al., 2012; PUTRI et al., 2013).

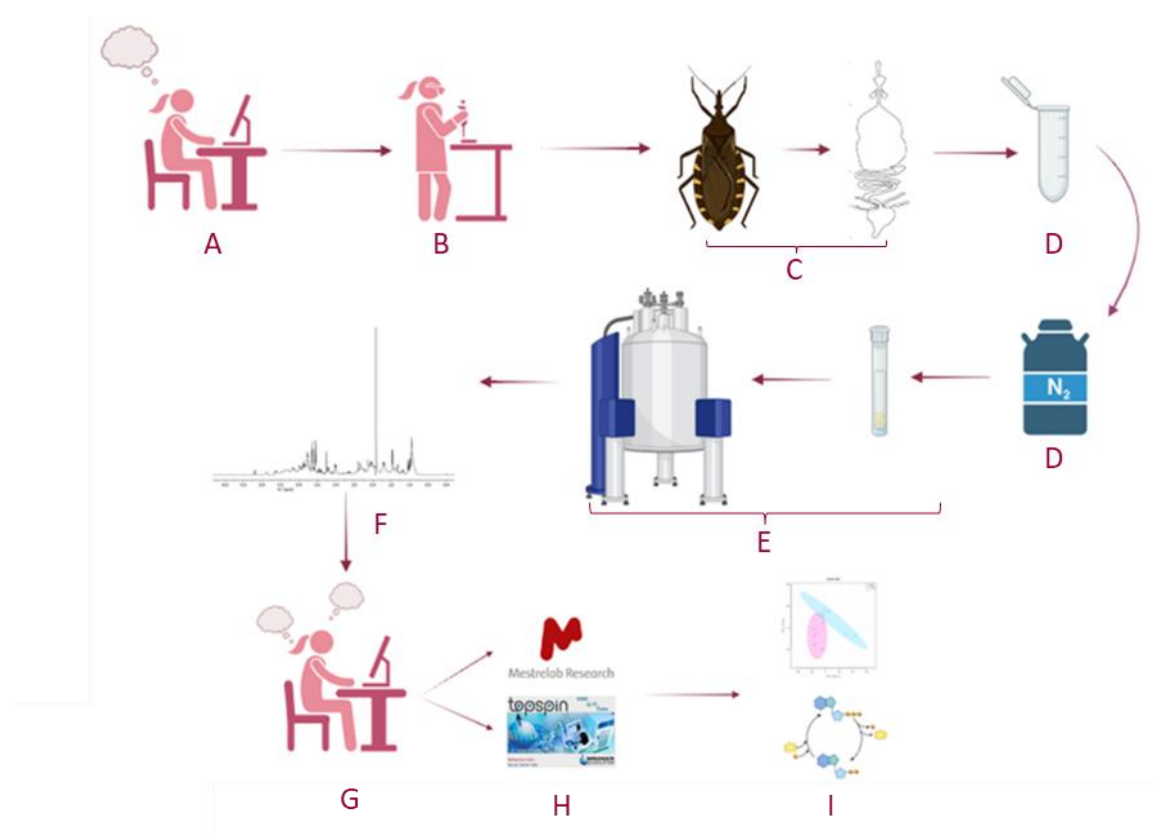
Na entomologia, o uso das técnicas metabolômicas ainda é pouco difundida e tem sido utilizadas para trazer uma variedade de aspectos da biologia dos insetos, incluindo comportamento, infecção, respostas ao estresse térmico, simbiose, etc (SNART; HARDY; BARRETT, 2015). Entretanto, as informações sobre o papel dos metabólitos na regulação do comportamento e dos fenótipos dos insetos permanecem escassas (SNART; HARDY; BARRETT, 2015). Na subfamília Triatominae, os estudos metabolômicos são restritos. A análise do metaboloma fecal de *R. prolixus*, *T. infestans* e *P. megistus* foi realizada e revelou grupos de metabólitos constantes entre as espécies e outros que variam entre elas (ANTUNES

et al., 2013). Recentemente, Eberhard et al. (2021) realizaram um estudo metabolômico do intestino com a proposta de prever a infecção por *T.cruzi*. Os autores observaram uma grande proporção de lipídios e moléculas lipídicas que desempenham um papel importante na regulação do processo metabólico fundamental, e o modelo estatístico utilizado sugeriu que as diferenças observadas no metaboloma do inseto poderiam ser usadas para determinar se ele foi ou não exposto ao parasito (EBERHARD et al., 2021).

1.3 Fluxo de trabalho

Independentemente do campo de aplicação, as investigações metabolômicas precisam seguir um fluxo de trabalho específico e sistemático para alcançar resultados apropriados e confiáveis. O fluxo de trabalho envolvido na obtenção da impressão digital (*fingerprint*) metabolômica do sistema biológico em estudo está apresentado na Figura 1. O primeiro e mais importante passo é a formulação de um hipótese ou problema biológico a ser resolvido pela metabolômica, seguido pela configuração do projeto experimental em que a amostra em questão é coletada e processada para extrair os metabólitos. Os métodos de extração precisam ser padronizados para cobrir o máximo de metabólitos que podem ser obtidos de uma amostra. Em sequência, os metabólitos extraídos serão analisados usando técnicas que os separam, identificam e quantificam. Isto, por sua vez, leva a geração de grandes conjuntos de dados, que são curados e depois analisados manualmente ou por pacotes de software pré-concebidos, seguidos de processamento rigoroso dos dados e análise.

Figura 1. Fluxo de trabalho envolvido na obtenção de dados metabolômicos de um sistema biológico. A: estruturação do projeto e formulação da hipótese; B: manutenção dos insetos e das cepas de *T. cruzi*; C: Dissecção do *T. infestans* e extração do sistema gastrointestinal; D: armazenamento do material em nitrogênio líquido; E: coleta de dados em aparelho de RMN; F: processamento de dados; G: análise dos dados; H: análise estatística; I: análise dos metabólitos.



Fonte: Autoria própria gerada pelo BioRender.

1.4 Espectroscopia de 1H -RMN

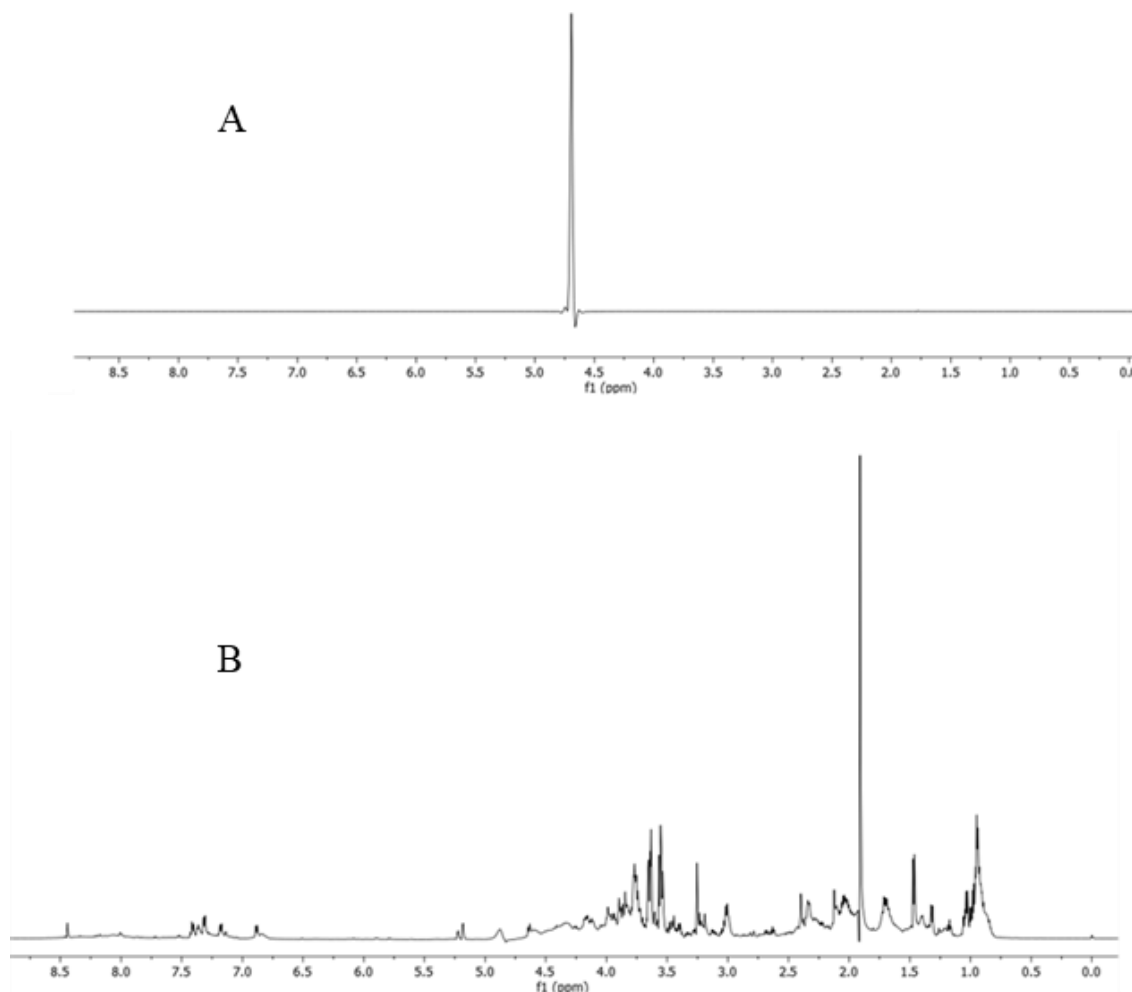
A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) desempenha um papel crucial nos estudos metabolômicos, oferecendo informações valiosas sobre a composição e estrutura das moléculas presentes nas amostras biológicas. Dentre as técnicas analíticas empregadas nos estudos metabolômicos, a RMN e a espectrometria de massa (EM) se destacam como as mais difundidas (EMWAS, 2015). Nos últimos anos, o uso da RMN nesses estudos tem crescido devido às suas vantagens em relação à EM. Quando comparada a EM, a RMN é uma técnica não destrutiva, permitindo a preservação das amostras durante a análise. Além disso, os metabólitos podem ser quantificados sem a necessidade de adicionar padrões,

e as amostras para análise por RMN requerem pouca ou nenhuma separação cromatográfica, reduzindo o tempo de preparação. A facilidade de identificação de novos compostos é outra vantagem significativa da RMN (EMWAS et al., 2019).

Fundamentalmente, a RMN baseia-se na interação entre ondas de radiofrequência e spins nucleares na presença de um campo magnético externo (B_0). O núcleo mais comumente observado é o do hidrogênio-1 (^1H), devido à sua alta sensibilidade na detecção. Além do ^1H , outros núcleos como ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{18}O e ^{31}P também são observáveis por RMN (MARTINS et al., 2015). Quando um campo magnético externo age sobre os núcleos, eles podem se orientar a favor ou contra o campo, gerando estados de energia diferentes. A diferença entre esses estados gera uma magnetização resultante, detectada como *free induction decay* (FID), que é processado através da Transformada de Fourier para gerar o espectro de RMN.

Na metabolômica baseada em RMN, a supressão de solventes é um dos importantes aspectos que tem o maior impacto na qualidade do espectro em geral. Assim, a supressão de solvente é necessária durante a medição, devido ao grande sinal de água, evitando assim sobreposição de sinais e distorções de linha de base. Em amostras biológicas a água se encontra muito presente, isso faz com que um grande pico seja visto no espectro de RMN, por isso esse sinal precisa ser suprimido para que os componentes restantes possam ser observados, para isso; utiliza-se um experimento com uma sequência de pulso denominada *noesygppr1d* que vai suprimir o sinal da água no espectro e permitir que os metabólitos sejam observados (Figura 2). Os esquemas de supressão de água mais comumente usados em metabolômica baseada em RMN incluem: 1) pré-saturação simples, onde é usado radiofrequência fraca para saturar a ressonância da água durante o atraso de relaxamento; 2) espectroscopia de efeito overhauser nuclear 1-D (NOESY), pré-saturação com gradientes (*noesygppr1d*); 3) supressão de água por WATERGATE, que usa excitação adaptada ao gradiente (SINGH et al., 2023) e para supressão de água. Entre estes, *noesygppr1d* tem sido amplamente utilizado para suprimir o sinal de água de forma eficiente em caso de amostras biológicas.

Figura 2. A: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, D_2O) de uma amostra de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Espectro adquirido utilizando a sequência de pulsos zg, B: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, D_2O) de uma amostra de *C. pseudotuberculosis*. Espectro adquirido utilizando a sequência de pulsos *noesygprr1d*. Ambos os espectros foram obtidos no espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600 MHz.



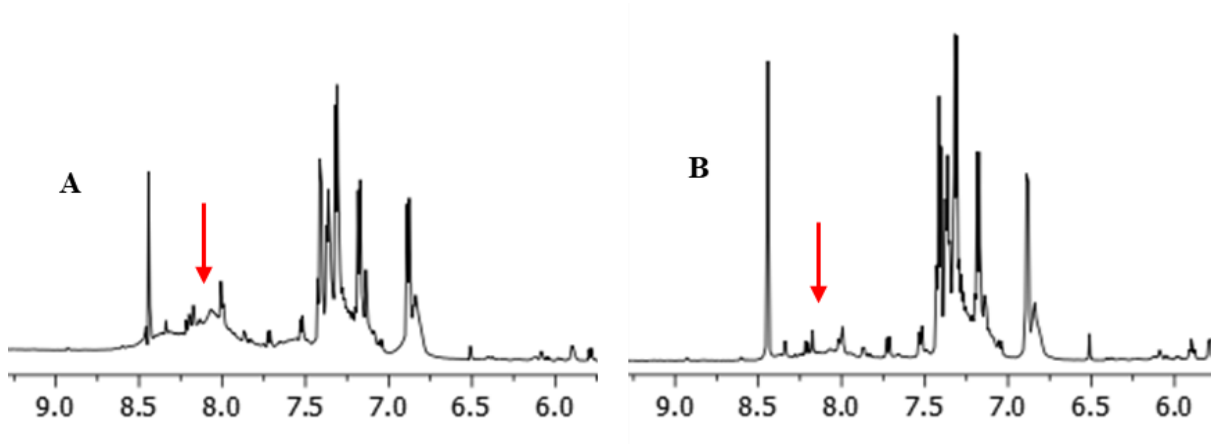
Fonte: Autoria própria obtida com o software MestreNova.

Outro importante experimento 1D comumente usado em metabolômica de RMN é editado por T_2 , o CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequence*) (CARR; PURCELL, 1954) que emprega um filtro T_2 para atenuar os sinais amplos de macromoléculas, principalmente proteínas e lipoproteínas, que possuem curto tempo de relaxamento T_2 em comparação com metabólitos de massa molecular menor que 1,2 kDa.

Além do sinal da água, compostos com alta massa molecular apresentam sinais alargados no espectro de RMN. Esses sinais muitas vezes sobrepõem sinais de menor

intensidade, para que esse problema não ocorra, utiliza-se o experimento CPMG. Esse experimento consiste basicamente na aplicação de uma sequência de pulsos que permite que os sinais das proteínas e lipídios aglomerados sejam filtrados virtualmente e, portanto, não irão aparecer no espectro (Figura 3) (CLARIDGE, 2016).

Figura 3. A: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, D_2O) de uma amostra de *C. pseudotuberculosis*. Espectro adquirido utilizando a sequência de pulsos *noesygprr1d*. B: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, D_2O) de uma amostra de *C. pseudotuberculosis*. Observe que a região apontada pela seta em A possui sinais mais alargados e pouco definidos, enquanto em B os sinais são menos alargados e mais definidos devido a filtragem promovida pelo CPMG. Ambos os espectros foram obtidos no espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600 MHz.



Fonte: Autoria própria obtida com o software MestreNova.

1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear bidimensional (2D)

A estrutura geral de um experimento bidimensional é sempre a mesma. Um experimento de RMN 2D consiste em preparação, evolução (t_1), mistura e detecção (t_2). A preparação refere-se à excitação dos spins com uma ou uma sequência de vários pulsos após o relaxamento térmico. Durante a evolução, o spin se desenvolve apenas sob a influência do campo magnético estático e possíveis interações entre si. O *mixing period* seguinte é tal que a magnetização transversal é observada no período de detecção final. Ao variar o tempo de mistura, a correlação entre os spins individuais pode ser estimulada, o que pode finalmente ser detectado. Dependendo da seleção da sequência de mistura, diferentes correlações entre os sinais individuais podem ocorrer através de diferentes mecanismos que levam a uma transferência de magnetização. Existem experimentos de correlação que conectam sinais

especialmente adjacentes (NOESY), ligações químicas adjacentes (COSY) ou mesmo todos os sinais de um sistema de spin inteiro (TOCSY).

Ao analisar espectros de RMN com estruturas químicas muito complexas se observa muitas sobreposições dos sinais dos ^1H no espectro de RMN de ^1H , tornando difícil o processo de identificação das moléculas presentes na amostra. Para driblar esse problema e auxiliar na interpretação dos espectros utilizamos técnicas de ressonância magnética bidimensionais (2D) para analisar as correlações e identificar corretamente as moléculas presentes no espectro de RMN. Essa técnica apresenta muitas vantagens, o que permite análises moleculares complexas, correlacionar informações entre diferentes núcleos e é extremamente útil nas mais diversas áreas que aplicam RMN (JANOVICK et al., 2020). Entretanto, sua principal desvantagem está na sua longa duração experimental, a depender do experimento a coleta dos dados pode levar mais de 30 horas.

De uma forma bem simplista, a técnica de RMN 2D consiste em estabelecer uma correlação entre dois spins interconectados, através de uma série de aquisições de NMR 1D. Isso significa que um experimento 2D nada mais é do que uma série de vários experimentos unidimensionais que diferem na duração do tempo evolutivo t_1 . Você pode imaginar os FIDs registrados sucessivamente como uma matriz bidimensional (veja a Figura 10 à esquerda). Na primeira dimensão, todos os FIDs são alinhados de acordo com o seu tempo evolutivo.

Cada um desses pontos t_1 pode ser registrado com um certo número de transientes (número de varreduras/NS). A transformada de Fourier (TF) agora também pode ser aplicada uma após a outra. Se você primeiro transformar a segunda dimensão, obterá a sequência de espectros unidimensionais de acordo com o tempo evolutivo associado (ver Figura 10 no meio) e poderá ver que os sinais na primeira dimensão são modulados. Portanto, é possível também transformar os espectros ao longo da primeira dimensão. Isto resulta então num espectro que consiste em duas dimensões de frequência (Figura 10 à direita).

Na técnica de RMN convencional o espectro é obtido após a TF, que depende de apenas uma variável de tempo. Na técnica de RMN 2D, duas variáveis de tempo são consideradas, o tempo de evolução e o tempo de detecção. Os sistemas de spins evoluem sobre a influência de variáveis de interação e assumem no final deste intervalo um estado particular que depende dessas variáveis e do tempo decorrido t_1 (AUE; BARTHOLDI; ERNST, 1976; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2019). Após esse tempo, os sistemas continuam a se desenvolver, durante esse período a magnetização é detectada em função do tempo t_2 . Um FID é obtido e passa pela transformada de Fourier dando origem a um espectro 2D (AUE; BARTHOLDI; ERNST, 1976; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE,

2019).

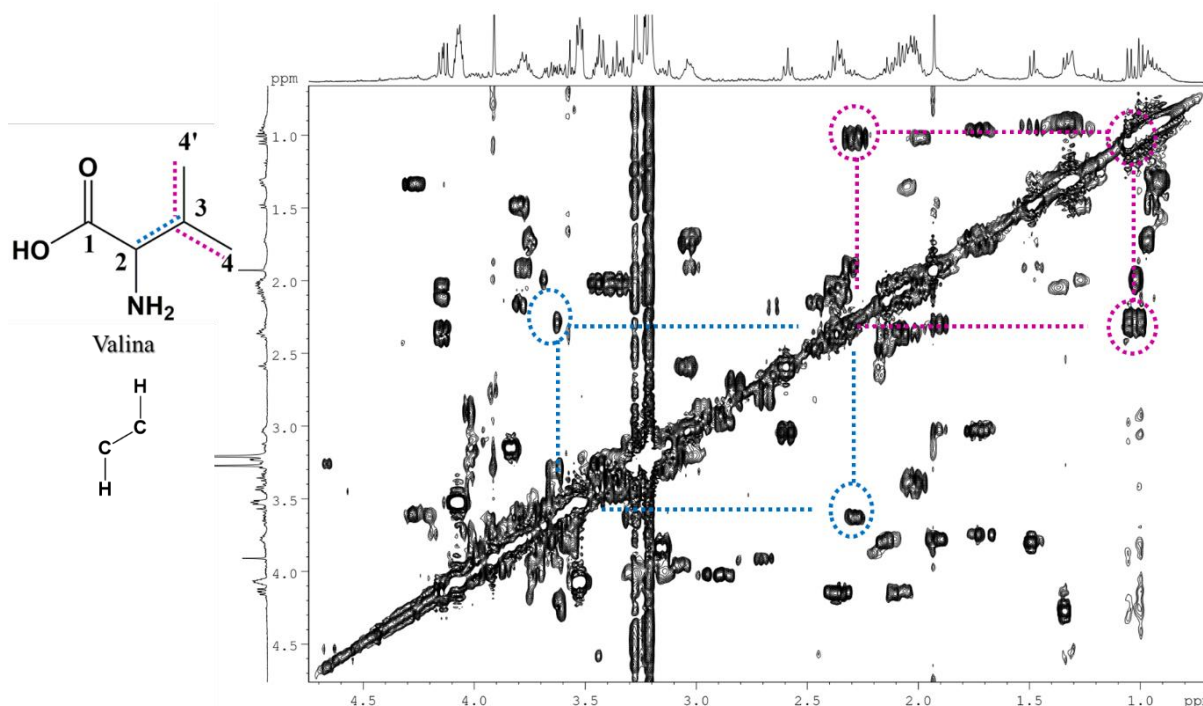
Para este trabalho vamos dar ênfase em três experimentos de correlação: *COSY* ^1H - ^1H (Correlation Spectroscopy), *TOCSY* ^1H - ^1H (Total correlation spectroscopy) e *HSQC* ^1H - ^{13}C (Heteronuclear single quantum coherence).

1.5.1 COSY ^1H - ^1H

A espectroscopia de correlação 2D ^1H - ^1H (COSY) é o experimento mais simples de todos os experimentos de RMN 2D usados para identificar correlações homonucleares entre núcleos ^1H acoplados. Ao analisar o espectro COSY de uma amostra, é possível mapear as interações entre prótons de hidrogênio em diferentes metabólitos, facilitando a identificação e a atribuição de sinais específicos a compostos individuais (AUE; BARTHOLDI; ERNST, 1976; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2019).

Durante o experimento COSY, prótons com correlações mútuas (geralmente até três ligações) de acoplamento spin-spin são observados e exibidos na forma de picos cruzados no espectro de COSY (Figura 4). Em um espectro COSY os eixos F1(Y) e F2(X) representam os hidrogênios e a diagonal contém as informações 1D. Os picos cruzados que aparecem próximos as diagonais mostram os spins que são acoplados uns aos outros, produzindo um sinal na interseção dos dois valores de frequência (Figura 4).

Figura 4. Espectro de correlação COSY ^1H - ^1H (400 MHz, D_2O) de TG de *T. infestans*. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado a 400 MHz equipado com uma unidade Bruker MAS II (Magic Angle Spinning) e com sonda HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning). Na imagem podemos observar os sinais dos hidrogênios presentes na valina que acoplam entre si.



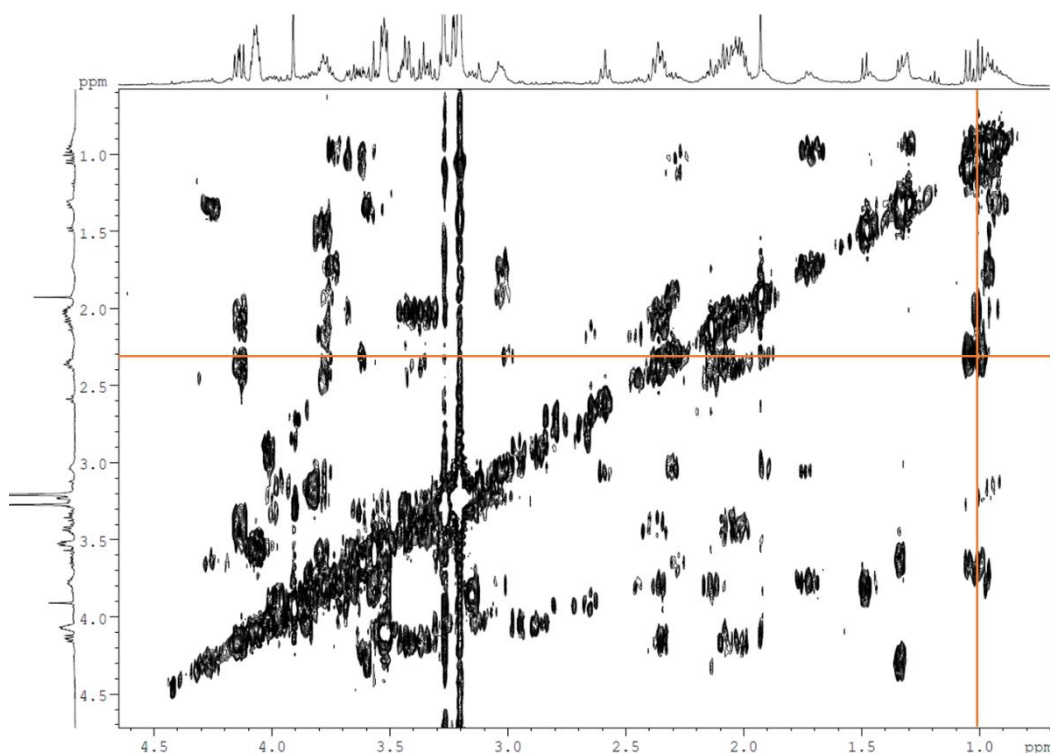
Fonte: Autoria própria obtida com o software MestreNova.

1.5.2 TOCSY ^1H - ^1H

Outra poderosa técnica de espectroscopia de correlação ^1H - ^1H é a Espectroscopia de Correlação Total (TOCSY), também conhecida como experimento homonuclear Hartmann-Hahn (HOHAHA). O experimento TOCSY ^1H - ^1H permite criar correlações entre todos os prótons dentro de um sistema de spin, não apenas entre prótons vizinhos, e são detectados e mostrados no modo 1D ou mais comumente na forma de picos cruzados em 2D. Em um estudo metabolômico, o experimento TOCSY é usado para fornecer a atribuição completa para ressonâncias de prótons de pequenas moléculas, já que todos os prótons correlacionados no mesmo resíduo de um único aminoácido, por exemplo, serão detectados. Essa técnica auxilia na elucidação de estruturas moleculares ao revelar as conexões entre átomos dentro de uma molécula o que é essencial para a identificação correta de compostos, pois muitos metabólitos têm estruturas complexas e, sem a elucidação adequada, a interpretação dos dados

pode ser ambígua (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2019). O aspecto do resultado de um experimento TOCSY é muito semelhante ao COSY, os eixos F1(Y) e F2(X) representam os hidrogênios e a diagonal contém as informações 1D. Entretanto, no COSY os picos cruzados mostram os spins diretamente acoplados, enquanto no TOCSY os picos cruzados não são apenas para spins que estão diretamente acoplados, mas para todos os spins que possuem acoplamento dentro de determinado sistema (Figura 5).

Figura 5. Espectro de correlação TOCSY ^1H - ^1H do TG de *T. infestans*. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado a 400 MHz equipado com uma unidade Bruker MAS II (Magic Angle Spinning) e com sonda HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning). As correlações da valina são traçadas com duas linhas laranjas que se cruzam entre o sinal a 1,00 ppm e o sinal a 2,28 ppm (deslocamentos químicos atribuídos à valina).



Fonte: Autoria própria gerada pelo software MestreNova.

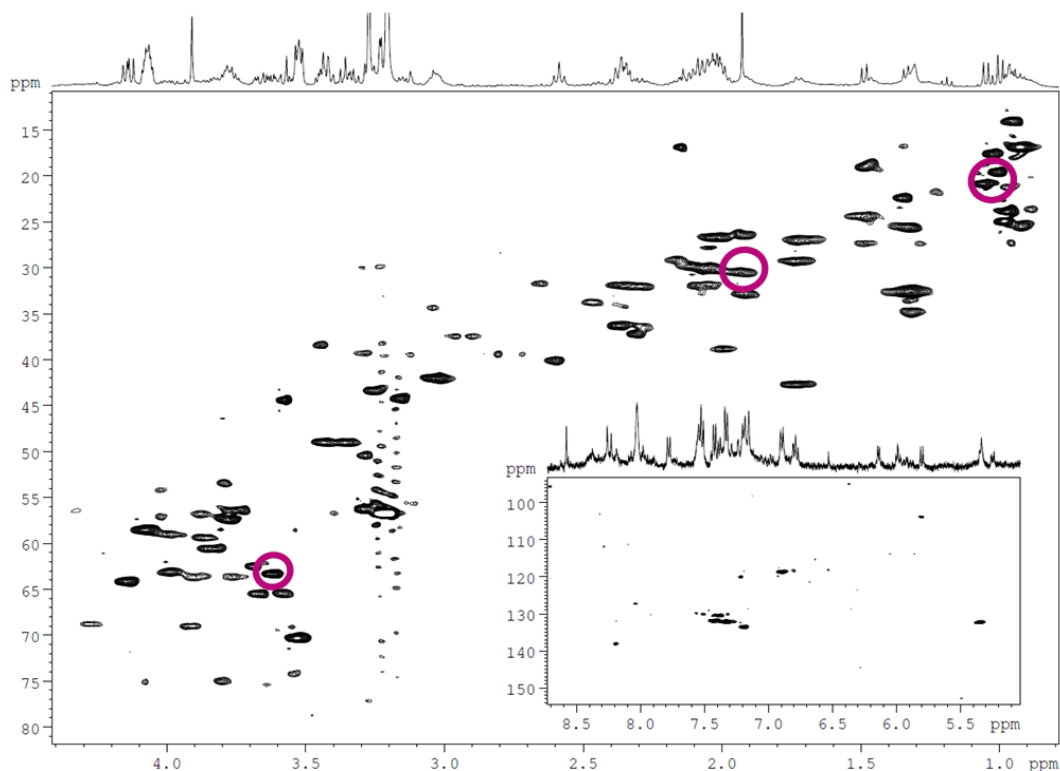
1.5.3 HSQC ^1H - ^{13}C

A espectroscopia de RMN heteronuclear 2D HSQC ^1H - ^{13}C em metabolômica representa uma ferramenta valiosa para resolver e atribuir picos de prótons sobrepostos, especialmente para sinais de metabólitos resultantes de amostras biológicas complexas (MAHROUS; FARAG, 2015). Ao correlacionar os sinais de ^1H e ^{13}C , a HSQC

facilita a distinção entre diferentes tipos de carbono em uma molécula, proporcionando uma visão detalhada da composição química dos metabólitos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2019). O experimento HSQC fornece a resolução mais alta em comparação com outros experimentos 2D. No entanto, o aumento da resolução está associado a uma redução na sensibilidade, especialmente na abundância natural relativamente baixa de ^{13}C .

HSQC ^1H - ^{13}C permite estabelecer as correlações entre os núcleos ^1H - ^{13}C que estão distantes por uma ligação química (Figura 6). Em um espectro de HSQC ^1H - ^{13}C os carbonos estão ao longo do eixo F1 (Y) e os prótons estão ao longo do eixo F2 (X).

Figura 6. Espectro de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do TG de *T. infestans*. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado a 400 MHz equipado com uma unidade Bruker MAS II (Magic Angle Spinning) e com sonda HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning). Na imagem podemos observar os sinais dos núcleos de carbono da valina.



Fonte: Autoria própria gerada pelo software TopSpin.

1.6 Ressonância Magnética Nuclear com sonda HR-MAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*), para análise de semissólidos

A rotação de ângulo mágico de alta resolução (HRMAS) é uma técnica estabelecida para análise de amostras não homogêneas e semissólidas. Com técnicas padrão de RMN em estado de solução, os espectros de tais amostras sofreriam ressonâncias amplas e não resolvidas. Em amostras no estado líquido, as moléculas estão se movimentando de forma rápida e aleatória. Já em amostras sólidas ou semissólidos as moléculas apresentam orientações espaciais muito bem definidas devido ao ambiente mais compacto. Essas moléculas, quando expostas a um campo magnético intenso irão se comportar de formas distintas, os núcleos de uma molécula de meio sólido ou semissólido não sofrerão reorientação molecular. Devido essa ausência total ou parcial de orientação os sinais obtidos nos espectros de amostras sólidas ou semissólidas são muito amplos (STANISIC et al., 2022)

Após estudos realizados por Andrew et al. (1958) e Lowe (1959), uma metodologia que simula o efeito da reorientação molecular para spins nucleares foi estabelecida para melhorar a resolução dos espectros obtidos. Os estudos mostraram que quando o ângulo (θ) entre o eixo de rotação da amostra e o campo magnético externo (B_0) é de $54,74^\circ$ os resultados são melhores. O ângulo θ ficou conhecido como ângulo mágico e a técnica foi denominada *Magic Angle Spinning* (MAS) (ANDREW; BRADBURY; EADES, 1958; LOWE, 1959).

Posteriormente, por volta de 1990 surgiu a técnica de RMN chamada rotação de ângulo mágico de alta resolução (HR-MAS), essa técnica estendeu as aplicações da RMN de alta resolução para amostras que possuem reorientação molecular limitada, como amostras de semissólidos. O HR-MAS resultou em espectros de RMN de semissólidos com uma resolução espectral tão boa quanto RMN de estado líquido (WONG; LUCAS-TORRES, 2018; STANISIC et al., 2022).

1.7 Quimiometria

Os dados de RMN não são facilmente adequados para análise por métodos quimiométricos. Portanto, esses dados precisam ser transformados em um formato adequado à realização de análises multivariadas. Isso pode ser alcançado por meio de várias etapas: categorização, alinhamento, normalização e dimensionamento.

Quimiometria é uma área da química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para aplicar a conjuntos de dados de caráter químico (FERREIRA, 2015). Em

conjuntos de dados multivariados como os dados metabolômicos, se faz necessário o uso de métodos quimiométricos para extrair as informações relacionadas ao objetivo principal do estudo. Dentre esses métodos estão o pré-processamento de dados, análises uni e multivariadas e técnicas de reconhecimento de padrão.

Sendo assim, o conjunto de dados metabolômicos passa inicialmente pela etapa de pré-processamento. Essa etapa pode ser realizada com auxílio de alguns softwares como MestreNova. O pré-processamento consiste em eliminar informações que não sejam relevantes quimicamente ou para o objetivo do estudo nessa etapa são feitos pequenos ajustes no espectro como ajuste de fase para promover uma simetria de todos os picos, ajuste da linha de base para remover artefatos espectrais que podem gerar distorções e referenciamento dos espectros para a identificação de compostos, alinhamento de pico e análises estatísticas (EMWAS et al., 2018). Além disso, uma técnica denominada *binning* também é aplicada a fim de solucionar algum desalinhamento existente e reduzir a dimensão da matriz de dados, com essa técnica os espectros são segmentados em regiões de mesma largura em ppm, denominadas *bins* (ENGELSEN; SAVORANI; RASMUSSEN, 2013). Uma das vantagens importantes do *binning* é que ele evita que as variações dos deslocamentos de RMN afetem o processamento estatístico, desde que tais deslocamentos permaneçam dentro dos limites dos compartimentos correspondentes.

Outra técnica empregada nessa etapa é a normalização, onde os dados coletados são transformados em valores comparáveis (STANISIC et al., 2022). A normalização é utilizada para remover qualquer variação nas intensidades do sinal devido às diluições de cada amostra ou à quantidade de material analisado.

Após o pré-processamento, métodos de análise univariada são realizados, esses métodos são os mais usados para análise exploratória de dados e fornecem uma visão geral preliminar sobre as características potencialmente significativas dentro das condições em estudo. Métodos de análise, como *Fold Change*, *T test* e *Volcano plot*, são alguns exemplos de análises que podem ser realizadas.

Os métodos de análise multivariada são cruciais nos estudos metabolômicos, uma vez que todos os metabólitos são considerados simultaneamente, permitindo a detecção de tendências entre amostras e metabólitos. As técnicas multivariadas de reconhecimento de padrão são ferramentas que visam identificar, caracterizar e avaliar semelhanças e diferenças entre as amostras de um conjunto de dados. Para isso utiliza-se análises supervisionadas e não supervisionadas. Como método de análise supervisionada temos o *Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (PLS-DA) em que o objetivo é discriminar duas ou mais classes nas

quais as amostras podem ser categorizadas (ENGELSEN; SAVORANI; RASMUSSEN, 2013). Como método de análise não supervisionada podemos citar o *Principal Component Analysis* (PCA) que identifica as direções das maiores variações que melhor explicam a variância em um conjunto de dados sem consultar a classe (STOYANOVA; BROWN, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter o perfil metabólico do TG do vetor da DC, assim como averiguar a associação entre o parasita e o inseto.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma análise abrangente e qualitativa dos metabólitos do TG do vetor da DC (*T. infestans*);
- Identificar os níveis de metabólitos do vetor que são modulados pelo parasito (vetor infectado com o parasito);
- Avaliar as vias metabólicas relacionadas com os perfis metabólicos encontrados e os possíveis mecanismos fisiológicos associados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e procedência dos insetos

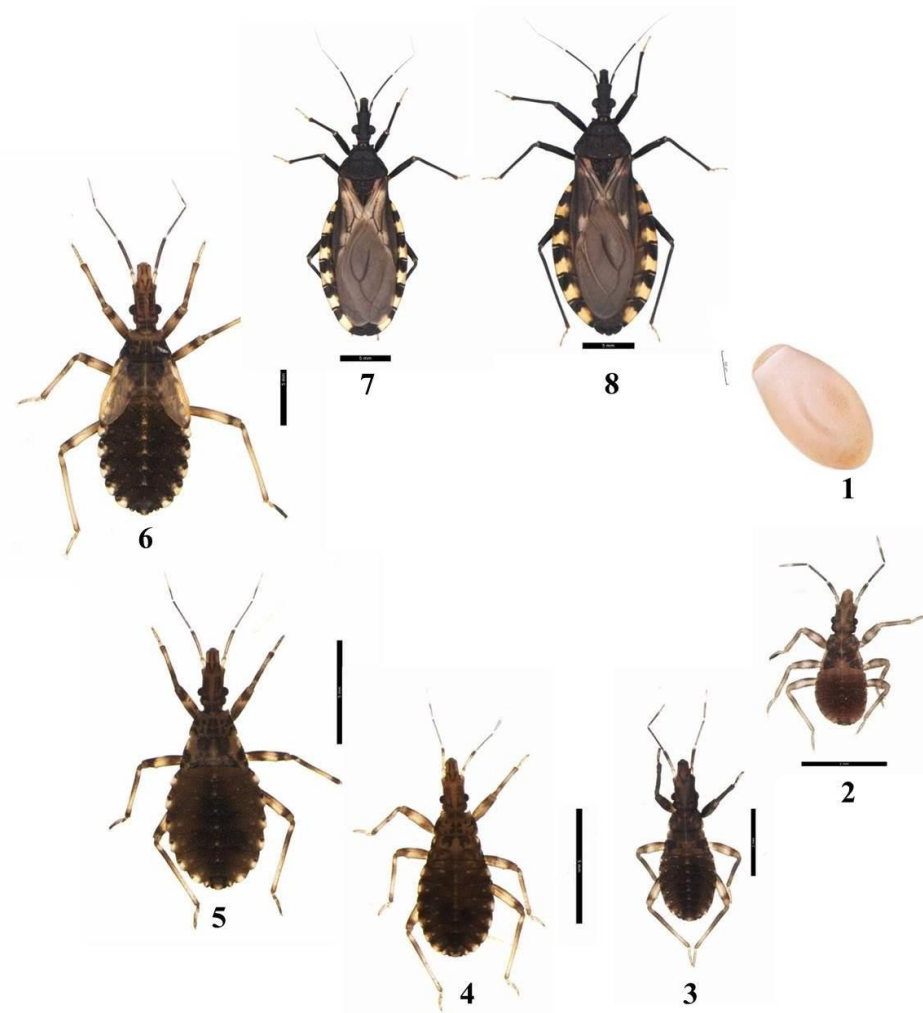
Os exemplares de *T. infestans* foram fornecidos pelo “Insetário de Triatomíneos”, instalado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP), do Câmpus de Araraquara, São Paulo. Os insetos utilizados no estudo foram obtidos da colônia CTA 121, iniciada a partir de espécimes coletadas em ambiente domiciliar do município de Corinto, Minas Gerais.

3.2 Insetos sem infecção

No insetário da UNESP de Araraquara, exemplares machos e fêmeas adultos de *T. infestans* (Figura 7) foram isolados da colônia original para formar a colônia utilizada nos experimentos propostos. Semanalmente, os insetos foram alimentados e os ovos separados

para obtenção das ninfas (Figura 7). Uma vez estabelecida a colônia, para otimizarção da metodologia, as ninfas de 5º ínstar (Figura 7) foram trazidas e mantidas no IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP, pois, após a muda imaginal, os adultos foram mantidos em jejum por 15 dias garantindo que o TG estivesse livre de resíduos de alimentos/fezes.

Figura 7. Ciclo de desenvolvimento de *Triatoma infestans*. 1: ovo. Barra representa: 500 µm, 2: ninfa de primeiro instar. Barra representa: 2 mm, 3: ninfa de segundo instar. Barra representa: 2 mm, 4: ninfa de terceiro instar. Barra representa: 5 mm, 5: ninfa de quarto instar. Barra representa: 5 mm, 6: ninfa de quinto instar. Barra representa: 5 mm, 7: macho adulto. Barra representa: 5 mm e 8: fêmea adulta. Barra representa: 5 mm.



Fonte: Imagem própria

3.3 Insetos infectados

A contaminação dos triatomíneos foi realizada no Laboratório de Parasitologia da FCFAR/UNESP através de hematofagia de ninfas N5 em camundongos contaminados com a cepa Y (Tc II) de *T. cruzi*. Devido a alta virulência, a cepa Y foi escolhida, apresentando alta parasitemia e alta mortalidade em camundongos (DEVERA et al., 2002). Vale ressaltar que esta cepa foi obtida, pela primeira vez, de um caso humano de DC (SILVA, 1953) e possui relevância clínica (ZINGALES et al., 2009, 2012).

3.4 Dissecação dos insetos

Após a muda imaginal e o período de jejum de 15 dias (para garantir que o TG esteja livre de resíduos de alimentos/fezes), 16 triatomíneos adultos infectados e 16 não infectados foram dissecados. Os materiais utilizados para dissecar os insetos foram submetidos à luz ultravioleta por 15 minutos para esterilização. Utilizando um microscópio estereoscópico Leica MZ APO, com sistema de análise de imagens Motic Advanced 3.2 plus, os insetos foram dissecados, e o órgão de interesse (TG) foi extraído (Figura 8). Subsequentemente o órgão extraído foi armazenado em microtubos e congelado em nitrogênio líquido, seguido pelo armazenamento em freezer a -80°C.

Figura 8. Trato gastrointestinal de *Triatoma infestans*. 1: estômago, 2: intestino e 3: reto.



Fonte: Imagem própria.

3.5 Preparação das amostras de *T. cruzi* para os estudos por RMN

Para obtenção de amostras de *T. cruzi* para os estudos por RMN, 10mL de meio de cultura contendo formas epimastigotas foram centrifugados a 8.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e em seguida o *pellet* contendo o protozoário foi ressuspensão em

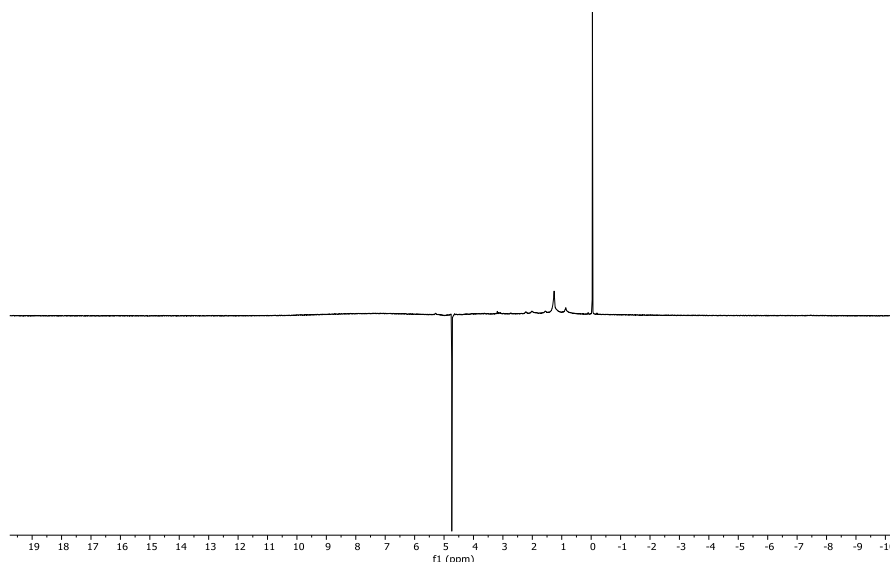
1mL de água deuterada (D₂O). Após ser ressuspenso, o material foi centrifugado novamente a 8.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido mais uma vez. O *pellet* foi imediatamente submetido a análise em aparelho de RMN.

3.6 Coleta de dados em RMN

As amostras do TG foram retiradas dos microtubos e imediatamente colocadas no rotor de diâmetro de 4mm com volume de 12 µL, com 10 µL de D₂O. Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos pela técnica de HR-MAS, usando um espectrômetro Bruker Avance III (Bruker Biospin, Alemanha) operando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, equipado com uma sonda de núcleo triplo de 4 mm d-HR-MAS 400 SB atuando no ângulo mágico em uma rotação frequência de 3,5 kHz e 298 K (para análise de semissólidos em rotor rotativo máximo de 15 kHz). O equipamento utilizado está no Laboratório Multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear da UNICAMP. Espectros unidimensionais de RMN de ¹H-NMR com supressão de água foram adquiridos com sequência de pulso noesygppr1 e espectros editados em T2 foram obtidos usando sequência de pulso cpmgpr1d, ambos com 256 transientes e reciclagem atraso de 4s. Os experimentos de espectroscopia de correlação total bidimensional (TOCSY, sequência de pulso mlevgpplhw5, ns = 128, tempo de mistura = 60 ms), HSQC¹H -¹³C (sequência de pulso hsqcetgpprpsisp2.2, ns = 250) e COSY ¹H-¹H (Correlação Espectroscopia) (sequência de pulso cosygpprqf, ns = 64) também foram realizadas para amostras selecionadas aleatoriamente.

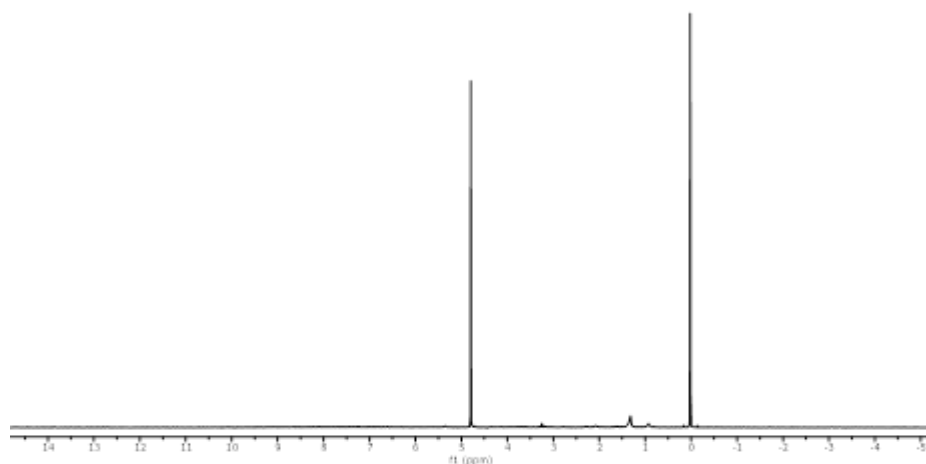
Espectros do protozoário *T. cruzi*, com as sequências de pulso noesypr1d (Figura 9) e cpmgpr1d (Figura 10), foram coletados para garantir que os sinais encontrados nas amostras infectadas estivessem relacionados apenas ao TG e não representassem sinais do protozoário. Para obtenção do espectro, o pellet contendo o protozoário foi ressuspenso em 10µL de água deuterada e transferido para o rotor (4mm, de12µL). O espectro foi obtido utilizando a técnica de RMN de alta resolução com rotação de ângulo mágico (RMN HR-MAS). Ao observar os espectros coletados para o *T. cruzi*, foi possível verificar que não há sinais significativos que possam interferir na análise dos dados das amostras infectadas.

Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do protozoário *T. cruzi*. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado em 400 MHz equipado com unidade Bruker MAS II com sonda HR-MAS, sequência de pulso noesypr1d.



Fonte: Autoria própria gerada no software MestreNova.

Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do protozoário *T. cruzi*. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado em 400 MHz equipado com unidade Bruker MAS II com sonda HR-MAS, sequência de pulso cpmgpr1d.



Fonte: Autoria própria gerada no software MestreNova.

3.7 Processamentos dos dados

Os espectros coletados foram salvos e uma série de pré-processamentos foi realizada utilizando os softwares TopSpin 3.5 (Bruker Biospin, Alemanha) e MestReNova (versão 12.0.2-20910). Em todos os espectros foi aplicada a transformada de Fourier (operação matemática que converte o FID para o domínio da frequência). Os dados obtidos foram processados manualmente para correções de fase, apodização, correção de linhas de base e alinhamento, utilizando o software TopSpin e MestReNova (12.0.2-20910). Utilizando os mesmos softwares, os espectros também foram normalizados em relação à área total (para reduzir o efeito das diferenças de concentração) e referenciados (o sinal TMS - tetrametilsilano- em δ 0,00 foi usado como referência) e foi aplicado binning de 0,005 ppm .

Após o processamento dos espectros, matrizes em formato .csv (com valores de deslocamento químico em ppm nas linhas e amostras nas colunas) foram geradas para análises estatísticas multivariadas. Algumas regiões do espectro foram excluídas manualmente das análises por serem regiões de ruído sem informações significativas (até δ 0,00 ppm e após δ 9,00 ppm) e a região composta por sinais de água (δ 4,50 – 5,00 ppm).

3.8 Análises Estatísticas e Quimiométricas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software online MetaboAnalyst 5.0 (PANG et al., 2021). As matrizes geradas no software MestReNova foram carregadas no Metaboanalyst, no módulo “Análise Estatística - um fator”, selecionando o tipo de dados como “*spectral bins*” e optando pelo formato de amostra nas colunas (não pareadas) que correspondiam à nossa matriz. A normalização foi feita através da média dos dados (Normalização por mediana), que transforma os dados proporcionando uma distribuição mais próxima da normal, tornando-os comparáveis para prosseguir com as análises estatísticas. O escalonamento automático (que centraliza os valores na média e os divide pelo desvio padrão de cada variável) foi escolhido para evitar que os sinais mais intensos se destacassem dos demais e influenciassem a construção dos modelos estatísticos.

Para realizar as análises multivariadas, utilizou-se o método de PCA para observar os agrupamentos naturais das amostras, reduzir a dimensionalidade dos dados e detectar amostras anômalas (REN et al., 2015). Para classificação das amostras foram construídos modelos supervisionados PLS-DA, LOOCV (*Leave-One-Out-Cross-Validation*) (BARKER; RAYENS, 2003). A Análise de Cluster Hierárquico (HCA) foi realizada e utilizada para visualizar os agrupamentos amostrais em forma de *heatmap*, que além dos agrupamentos

entre as amostras, demonstra a intensidade dos sinais do espectro na região determinada (em ppm) através das cores no mapa. Os escores VIP (Variáveis Importantes na Projeção) foram obtidos para identificar as variáveis de interesse utilizadas na construção do modelo PLS-DA, juntamente com a análise univariada (teste t). Além disso, também foram calculados os valores de precisão, especificidade e sensibilidade dos modelos validados (BERRUETA; ALONSO-SALCES; HÉBERGER, 2007).

Para análise univariada, utilizou-se o teste t para comparar condições infectadas e não infectadas (*Infect X NoInfect*). Do conjunto de dados coletados, as variáveis que apresentaram valor inferior a 0,05 ($p < 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas e foram anotadas para indicar os metabólitos. Os *boxplots* produzidos nas análises estatísticas foram salvos e posteriormente foram analisados para marcação dos metabólitos e análise das diferenças nas concentrações relativas dos metabólitos discriminantes em cada condição.

3.9 Identificação dos metabólitos

Para análise das estruturas químicas dos metabólitos, foram utilizados conhecimentos de química analítica, bem como bancos de dados *Human Metabolome Database* (HMDB) (WISHART et al., 2007) e *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB) (ULRICH et al., 2007) e consulta em espectros de correlação homonuclear unidimensional e bidimensional ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H COSY e heteronuclear (HSQC ^1H - ^{13}C). Apenas um espectro de correlação ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H COSY e HSQC ^1H - ^{13}C é necessário para identificação de metabólitos.

A partir de uma lista de metabólitos candidatos e um desenho de suas estruturas químicas preparadas de acordo com dados da literatura, primeiro escaneamos os espectros homonucleares TOCSY para visualizar os acoplamentos ^1H em todo o sistema de spin. Posteriormente, analisamos as correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C no espectro HSQC e ^1H - ^1H no espectro COSY. Após esta etapa de identificação, os metabólitos foram marcados no espectro unidimensional em seus respectivos deslocamentos, posteriormente os valores de deslocamento foram utilizados para identificar os metabólitos correspondentes às variáveis significativas obtidas por análises estatísticas e quimiométricas.

A identificação das vias metabólicas relacionadas aos metabólitos foi realizada utilizando o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG Pathway Maps*) (KANEHISA, 2000), além de pesquisa na literatura em artigos científicos e livros publicados envolvendo metabolismo e análise metabolômica de insetos e/ou vetores

hematófagos. Além disso, os metabólitos identificados, que foram marcados como significativamente relevantes para a separação de grupos, foram listados e esta lista foi carregada no modo *Pathway Analysis* no Metaboanalyst.

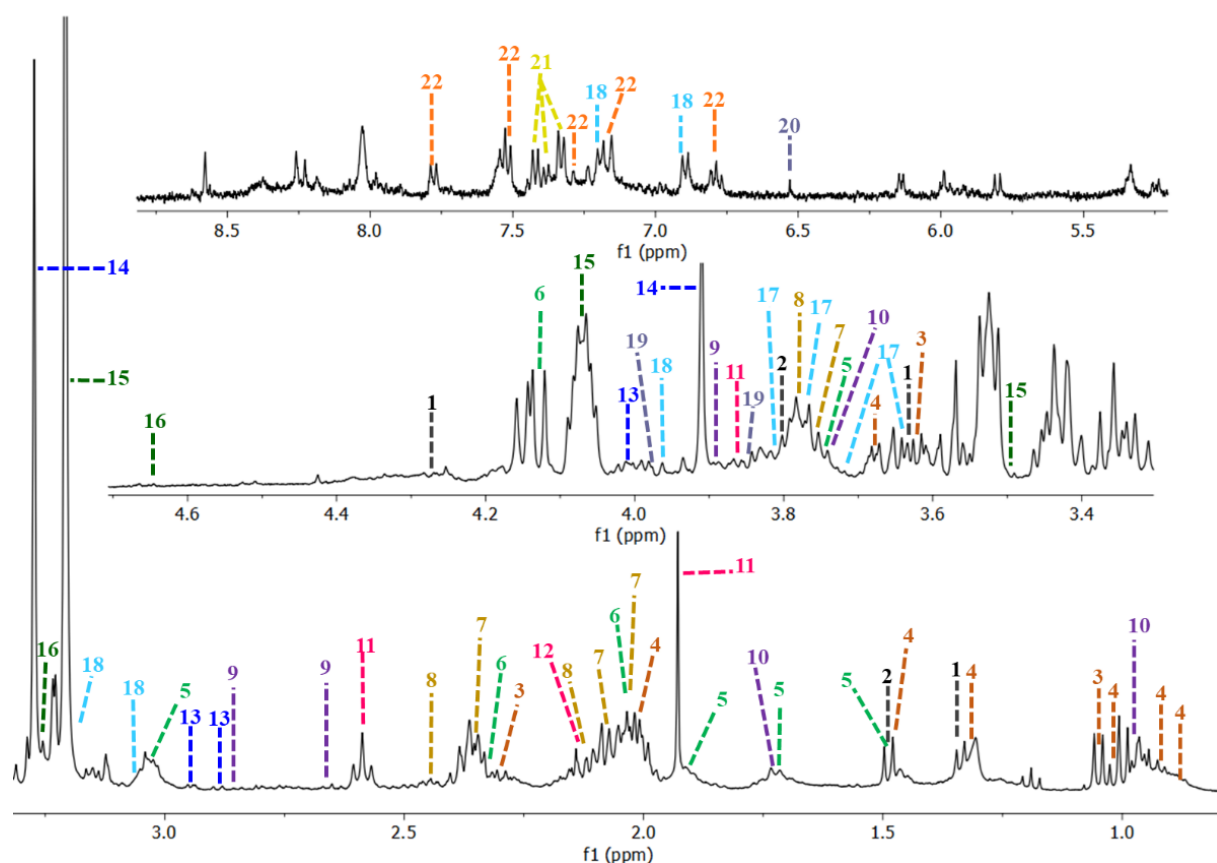
4. RESULTADOS

4.1. Perfil global de metabólitos usando espectroscopia de RMN

Perfil global de metabólitos do TG do vetor foi realizado e a identificação dos metabólitos no espectro foi alcançada através de uma análise abrangente dos espectros $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}^1\text{H}$ TOCSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, juntamente com pesquisas nos bancos de dados HMDB e BRMB, os metabólitos foram marcados no espectro 1D (Figura 11) e em seguida os sinais do carbono foram assinalados no espectro $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC (Figura 12). A partir deste processo foi possível identificar 22 metabólitos. Seus respectivos deslocamentos químicos no espectro, a multiplicidade de picos (s= singlete; d= duplete; dd= duplo duplete; t= tripleto; q= quarteto; m= multipleto), bem como suas constantes de acoplamento (J) em Hz são descrito na Tabela 1.

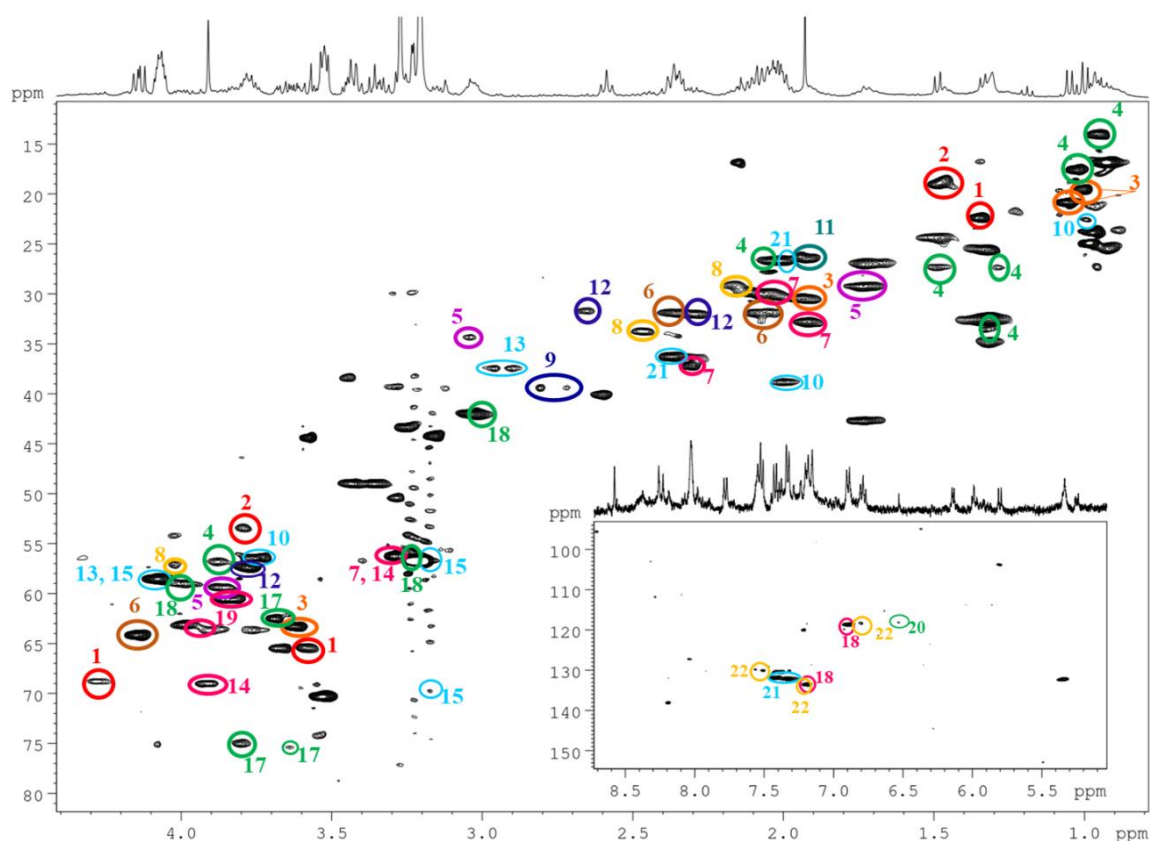
Um total de 22 metabólitos foram identificados utilizando padrão de uma dimensão ^1H NMR (Figura 11).

Figura 11. Espectro ^1H (400 MHz, D_2O) do TG de *T. infestans*. A imagem mostra os sinais dos metabólitos identificados (Tabela 1). 1. Treonina, 2. Alanina, 3. Valina, 4. Iso-leucina, 5. Lisina, 6. Prolina, 7. Glutamato, 8. Glutamina, 9. Aspartato, 10. Leucina, 11. Acetato, 12. Metionina, 13. Asparagina, 14. Betaína, 15. Colina, 16. Glicose, 17. Manitol, 18. Tirosina, 19. Serina, 20. Fumarato, 21. Fenilalanina, 22. Triptofano. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado em 400 MHz equipado com unidade Bruker MAS II com sonda HR-MAS.



Fonte: Autoria própria gerada no software MestreNova

Figura 12. Espectro de correlação HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (400 MHz, D_2O) do TG de *T. infestans*. A imagem mostra a posição do carbono dos metabólitos identificados (Tabela 1). 1. Treonina, 2. Alanina, 3. Valina, 4. Isoleucina, 5. Lisina, 6. Prolina, Glutamato, 8. Glutamina, 9. Aspartato, 10. Leucina, 11. Acetato, 12. Metionina, 13. Asparagina, 14. Betaína, 15. Colina, 16. Glicose, 17. Manitol, 18. Tirosina, 19. Serina, 20. Fumarato, 21. Fenilalanina, 22. Triptofano. Espectro obtido em equipamento Bruker AVANCE III operado em 400 MHz equipado com unidade Bruker MAS II com sonda HR-MAS.



Fonte: Autoria própria gerada no software TopSpin.

Tabela 1. Deslocamento químico ^1H e ^{13}C (ppm), multiplicidade de picos espectrais e constante de acoplamento (Hz); s = singlete; d = duplete; t = triplete; m = multipeto.

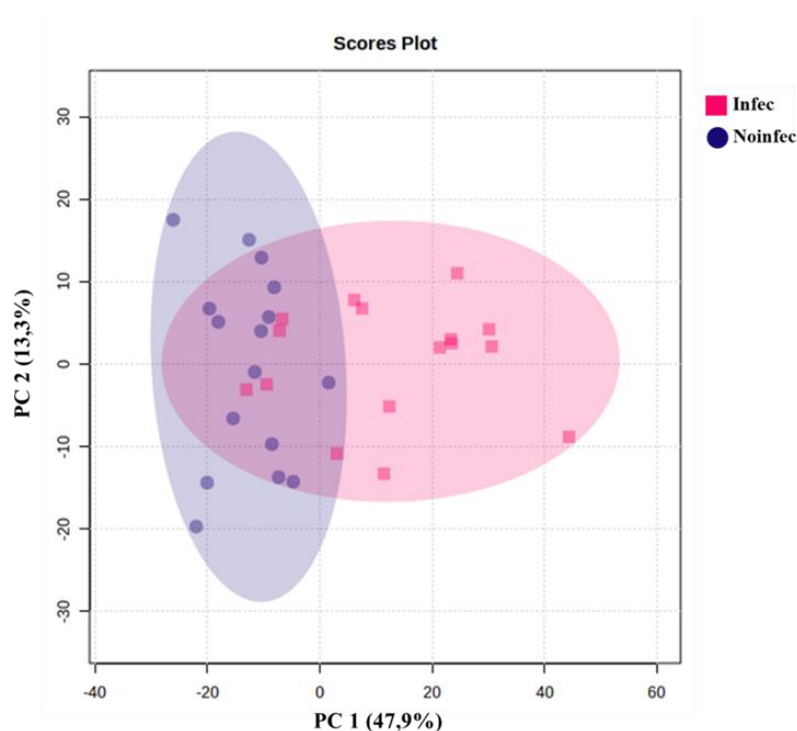
Metabólitos	Deslocamento químico ^1H (ppm), multiplicidade de sinais espectrais e constante de acoplamento (Hz)	Deslocamento químico ^{13}C (ppm)
Treonina	1.34 m; 3.63 d ($J=4.91\text{Hz}$); 4.27 m	22.6, 63.3, 68.8
Alanina	1.49 d ($J=7.28\text{Hz}$); 3.80 q ($J=7.28\text{Hz}$)	19.0, 53.3
Valina	1.00m, 1.05 d ($J=8\text{Hz}$); 2.28 d ($J=7\text{Hz}$); 3.62 m; ($J=4\text{Hz}$)	19.8, 20.8, 30.6, 65.8
Isoleucina	0.92 t ($J=8\text{Hz}$); 1.02 d ($J=9\text{Hz}$); 1.30m; 1.48 m; 2.02 m; 3.68 d ($J=4\text{Hz}$)	14.0, 17.6, 33.3, 24.2, 26.7, 57.1
Lisina	0.92 t ($J=8\text{Hz}$); 1.02 d ($J=9\text{Hz}$); 1.30m; 1.48 m; 2.02 m; 3.68 d ($J=4\text{Hz}$)	27.5, 27.0, 26.7, 32.0, 34.2, 57.0
Prolina	2.06 m; 2.34 m; 4.13 dd ($J=8.63, 6.42\text{Hz}$)	32.0, 31.9, 64.0
Glutamato	2.03m; 2.07 m; 2.35 m; 3.76m	30.7, 32.0, 36.3, 56.3
Glutamina	2.16 m; 2.45 m; 3.79m	29.0, 33.6, 53.1
Aspartato	2.68 dd ($J=17.45, 8.85\text{Hz}$); 2.84 dd ($J=17.45, 3.72\text{Hz}$); 3.90 m	40.0, 39.3
Leucina	0.97 m; 1.73 m; 3.75 m	23.6, 22.8, 56.4
Acetato	1.93 s	26.3
Metionina	2.15 m; 2.59 t ($J=7.587\text{Hz}$); 3.85 dd ($J=7.1,$ 5.382 Hz)	40.1, 29.2, 57.4
Asparagina	2.89 m; 2.95 m; 4.02 dd ($J=7.69, 4.26\text{Hz}$)	37.3, 37.4, 57.4
Betaina	3.27 s; 3.91 s	56.5, 68.4
Colina	3.20 s; 3.50 dd ($J=5.816, 4.162\text{Hz}$); 4.07 m	56.7, 58.7, 70.0
Glicose	3.26 m; 4.66 d;	-
Manitol	3.63 dd ($J=11.76, 6.26\text{Hz}$); 3.72m; 3.77 m; 3.81 m	75.0, 63.0, 75.0, 74.9
Tirosina	3.06m; 3.19m; 3.95m; 6.90 m; 7.19m	42.2, 56.6, 58.6, 118.0, 133.0
Serina	3.85m; 3.97m	60.5, 63.0
Fumarato	6.52s	118.2
Fenilalanina	7.33m; 7.38m; 7.42m	132.3, 130.4, 131.9
Triptofano	6.79t ($J= 7.4\text{Hz}$); 7.16s; 7.29t ($J= 7.4\text{Hz}$); 7.52d ($J= 8.0\text{Hz}$); 7.78d ($J= 8.0\text{Hz}$)	118.4, 133.7, -, 130.1, -

4.2. Análises Estatísticas e Quimiométricas

As matrizes geradas foram importadas para o software MetaboAnalyst 5.0 e todas as etapas de pré-processamento, conforme mencionado anteriormente, foram realizadas. Os resultados das análises foram obtidos para as duas condições em estudo e foram anotadas variáveis estatisticamente significativas. Para *Infect X NoInfect*, focamos na região alifática dos espectros adquiridos através do experimento NOESY (variando de 0,0 a 4,5 ppm). Esta escolha baseou-se em resultados estatísticos que indicaram diferenças mais significativas entre as condições analisadas.

As matrizes de dados geradas a partir dos espectros continham um total de 32 amostras [16 amostras de TG de *T. infestans* não infectados (TIC) e 16 amostras de TG de *T. infestans* infectados (TIP)] e 902 variáveis (caixas). A análise PCA foi utilizada como método de redução da dimensionalidade dos dados. Através da análise foi observado agrupamento intrínseco das amostras e não foram observadas amostras anômalas (Figura 13).

Figura 13. Gráfico de pontuação 2D da análise PCA dos dados das condições Infect X NoInfect (Infect em rosa e NoInfec em azul) com os respectivos percentuais de variância explicados pelos dois primeiros componentes do modelo.

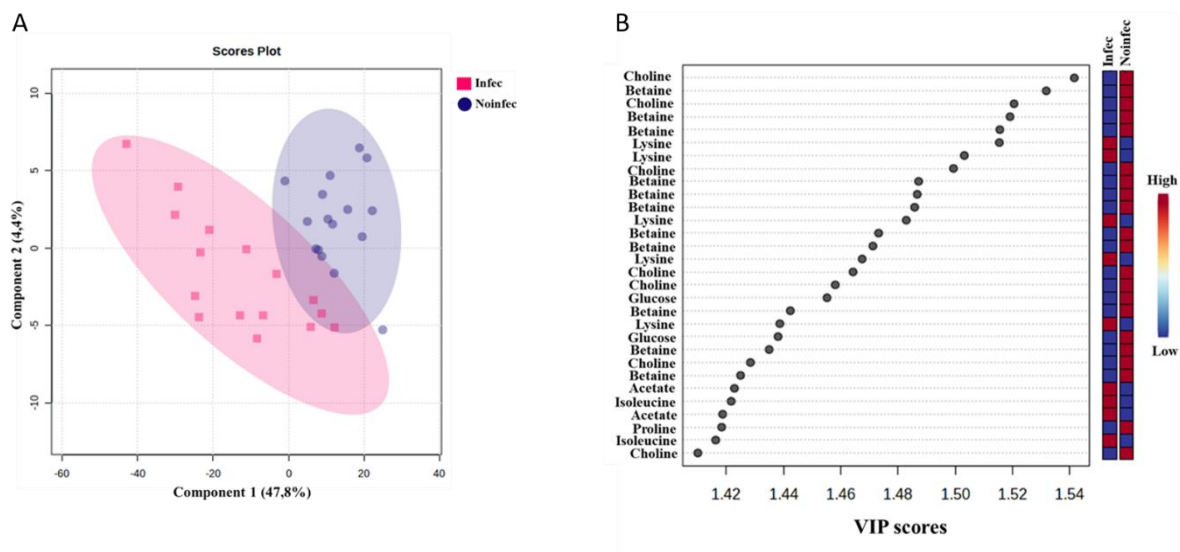


Fonte: Imagem de autoria própria geradas pelo software MetaboAnalyst

No presente estudo, a análise PLS-DA foi realizada para investigar as mudanças nos perfis metabólicos entre o grupo sem infecção e o grupo infectado, e para identificar as assinaturas metabólicas associadas a infecção (Figura 14). A análise PLS-DA tem sido amplamente utilizada para representar a diferença nos dados de um grande conjunto de variáveis como um conjunto menor de “variáveis principais” na forma de um gráfico de pontuações. Os gráficos de pontuação divergentes significaram uma separação entre infectados e não infectados ao longo dos eixos correspondentes a PC 1 e 2, com esses dois componentes principais representando 47,8% e 4,4% da variação nos dados, respectivamente (Figura 14A). Variáveis importantes na projeção (pontuações VIP) foram obtidas no modelo PLS-DA para identificar os metabólitos discriminatórios que mais contribuíram para a separação dos grupos nos modelos PLS-DA para cada condição. Os escores VIP (Figura 14B) e a análise univariada pelo teste t ($p < 0,05$) permitiram identificar variáveis importantes na diferenciação dos grupos. Os principais metabólitos nas amostras de TG discriminando entre infectados e não infectados correspondem às regiões do espectro de metabólitos identificados como Isoleucina (δ 0,89), Lisina (δ 1,85), acetato (δ 1,90), glicose (δ 3,25), betaína (δ 3,34), colina (δ 3,44), prolina (δ 4,16).

LOOCV foi utilizado para validação dos dados, apresentando valores satisfatórios (Precisão: 0,84; R^2 : 0,53; Q^2 : 0,46) (Tabela 2) conforme representado na Figura 14, demonstrando a separação das duas condições e classificação das amostras.

Figura 14. A) Gráfico 2D de pontuações da análise PLS-DA de dados das condições Infect X NoInfect (Infect em rosa e NoInfec em azul). Os dois primeiros componentes explicam 47,8% e 4,4% da variância dos dados, respectivamente, e classificam as amostras nas duas condições. B) Variáveis importantes na projeção (pontuações VIP) utilizadas na construção do modelo PLS-DA, contendo as 30 variáveis mais influentes que também foram confirmadas na análise univariada ($p < 0,05$), e a escala de cores indica intensidade maior (vermelho) ou intensidade mais baixa (azul) em suas respectivas regiões do espectro para cada condição.



Fonte: Imagem de autoria própria gerada pelo software MetaboAnalyst.

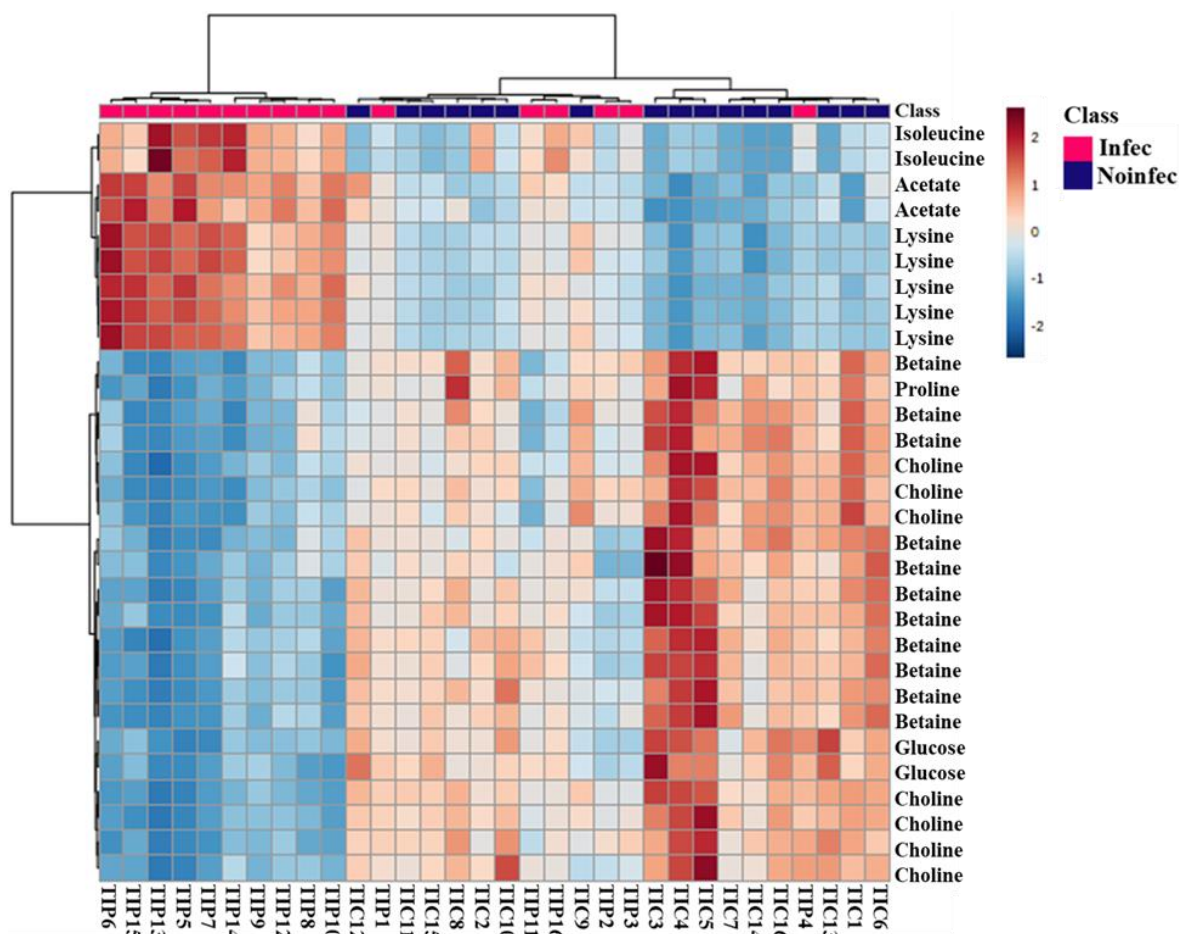
Tabela 2. Valores LOOCV do modelo PLS-DA.

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
Accuracy	0.84762	0.6619	0.75714	0.81429	0.81429
R2	0.53002	0.73972	0.8271	0.90156	0.93686
Q2	0.46241	0.14194	0.15385	0.16345	0.25138

As amostras foram analisadas por HCA a fim de explorar as mudanças substanciais nos metabólitos entre os dois grupos. Essa análise foi inicialmente aplicada para identificar padrões de similaridade entre as amostras, resultando na formação de clusters que foram organizados em forma de *heatmap* (Figura 15). As linhas e colunas do *heatmap* são rearranjadas de acordo com a ordem hierárquica dos clusters, criando uma representação visual onde as amostras com perfis metabólicos semelhantes estão agrupadas (PANG et al., 2021). Através do mapa também foi possível observar o aumento ou diminuição relativo dos

metabólitos diferenciais no TG de cada grupo. As diferentes tonalidades de cores no mapa refletem as diferentes concentrações dos metabólitos entre os grupos, o que permite uma rápida identificação de padrões e agrupamentos das amostras. O *heatmap* mostrou diferenças consideráveis e clusterização de grupos juntamente com diferenças nas concentrações relativas de metabólitos, demonstrando a variação metabólica causada pelas diferentes condições (Infec/Noinfec).

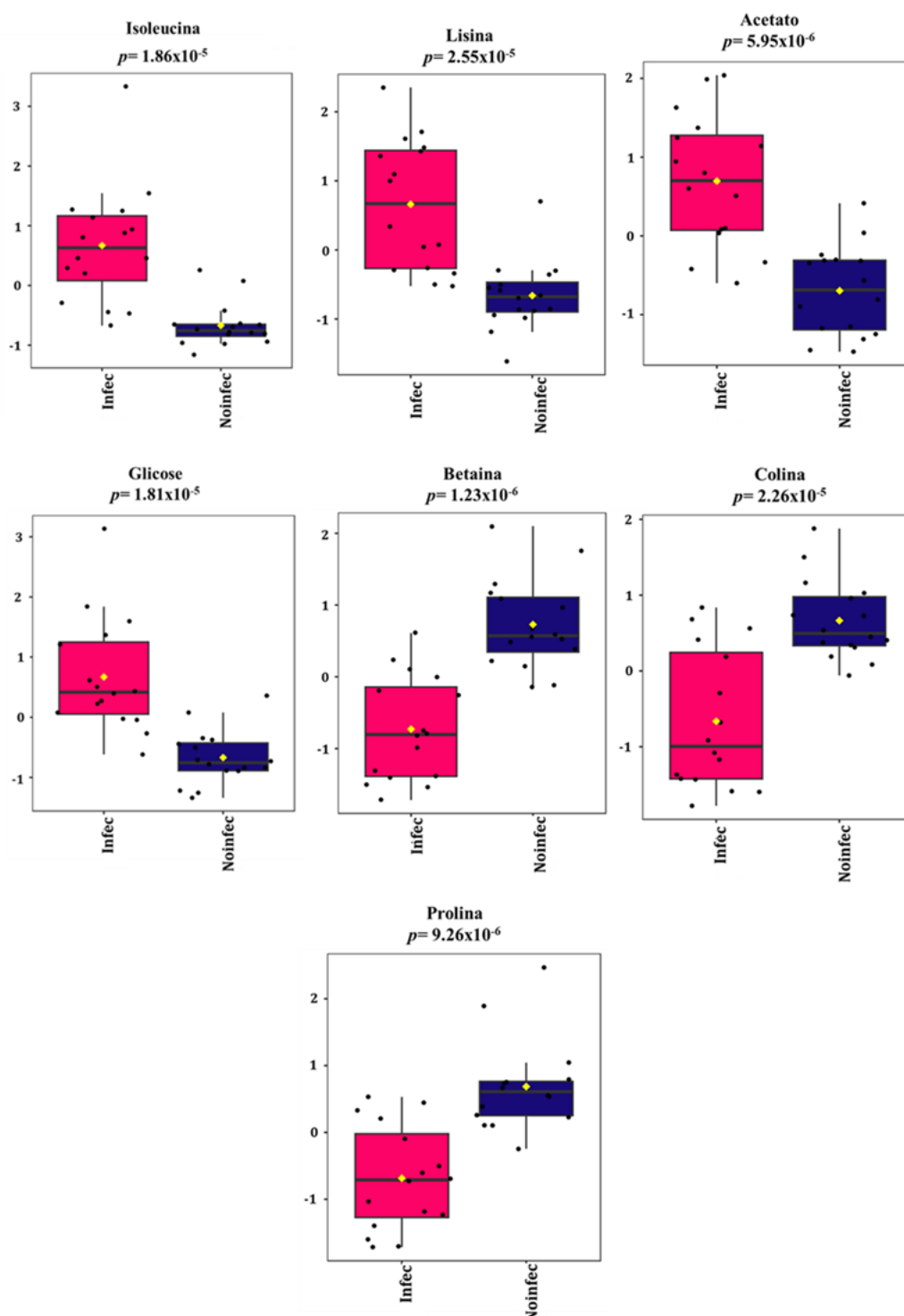
Figura 15. Análise de cluster utilizando *heatmap* representativo das variáveis discriminantes do modelo PLS-DA. As amostras abaixo na horizontal são TIC= *T. infestans* sem infecção e TIP= *T. infestans* infectado. Os metabólitos na coluna da direita são: Isoleucina, Lisina, Acetato, Glicose, Betaína, Colina, Prolina e as cores (vermelho/azul) representam as intensidades de sinal no espectro.



Fonte: Imagem gerada pelo software MetaboAnalyst.

Os gráficos Box-Whisker (Figura 16) mostram concentrações relativas para alguns metabólitos significativamente alterados ($p < 0,05$) nos dois grupos estudados. Sete dos 22 metabólitos identificados, apresentaram diferenças significativas entre os grupos infectados e não infectados; eles são: Isoleucina (δ 0,89), Lisina (δ 1,85), acetato (δ 1,90), glicose (δ 3,25), betaína (δ 3,34), colina (δ 3,44), prolina (δ 4,16).

Figura 16. Boxplots de metabólitos identificados por análise univariada utilizando teste t com valores de $p < 0,05$ comparando as médias das variáveis nas condições *Infect* X *NoInfect* (*Infect* em rosa e *NoInfect* em azul). Isoleucina $p=1.86 \times 10^{-5}$, Lisina $p=2,55 \cdot 10^{-5}$, Acetato $p=5.95 \times 10^{-6}$, Glicose $p=1.81 \times 10^{-5}$, Betaina $p=1.23 \times 10^{-6}$, Colina $p=2.26 \times 10^{-5}$, Prolina $p=9.26 \times 10^{-6}$.



Fonte: Software Metaboanalyst e autoria própria.

5. DISCUSSÃO

Para obter informações sobre os mecanismos metabólicos do vetor e avaliar a relevância biológica das alterações nos níveis de metabólitos após a infecção, a análise da via metabólica de metabólitos substancialmente diferenciais foi realizada utilizando a ferramenta MetaboAnalyst e o banco de dados de dados da via KEGG.

Antunes e colaboradores (2013) forneceram os primeiros indícios que o *fingerprint* metabólico dos triatomíneos pode afetar a competência vetorial para cepas específicas de *T. cruzi*. Além disso, já foi demonstrado que infecções por *T. cruzi* em hospedeiros mamíferos são acompanhadas por alterações bioquímicas distintas (GIRONÈS et al., 2014). Nosso objetivo aqui foi explorar alterações metabólicas causadas nos triatomíneos pela cepa Y de *T. cruzi*.

As análises de RMN nos triatomíneos não infectados geraram informações relevantes sobre os metabólitos mais significativos no TG do vetor (nas condições apresentadas no estudo). Primeiramente, foi realizada a identificação dos metabólitos mais significativos no TG de *T. infestans* após o período jejum. Foram identificados 22 metabólitos (treonina, alanina, valina, isoleucina, lisina, prolina, glutamato, glutamina, aspartato, leucina, acetato, metionina, asparagina, betaína, colina, glicose, manitol, tirosina, serina, fumarato, fenilalanina, triptofano), gerando, assim, uma impressão digital como ponto de partida para verificar as possíveis alterações causadas pelo parasita no TG do inseto.

Os artrópodes desenvolveram, ao longo do tempo, diversas adaptações para se alimentarem, dentre elas, a hematofagia. Os insetos hematófagos possuem uma dieta rica em aminoácidos proveniente da hemoglobina, uma proteína presente no sangue. A metabolização dessas moléculas pode gerar grandes quantidades de amônia, que em altas concentrações pode ser tóxica (PENNINGTON; GOLDSTROHM; WELLS, 2003; SCARAFFIA et al., 2005; FERREIRA et al., 2018).

Metabólitos como a prolina, glutamina, alanina e acetato desempenham papéis essenciais no metabolismo dos insetos, sendo a alanina precursora da prolina e auxiliar do transporte do acetato para os músculos (SCARAFFIA; WELLS, 2003; ARRESE; SOULAGES, 2010; RIBEIRO et al., 2014). A prolina e a glutamina podem funcionar como sumidouros de amônia (contribuindo, assim, para a desintoxicação de nitrogênio deste inseto vetor), pois, para evitar a toxicidade, a amônia sofre uma conversão e é incorporada em prolina e glutamina (PENNINGTON; GOLDSTROHM; WELLS, 2003; SCARAFFIA et al., 2005; FERREIRA et al., 2018). A prolina pode ser sintetizada no corpo gorduroso de insetos

a partir de acetil-CoA e alanina (SCARAFFIA; WELLS, 2003; ARRESE; SOULAGES, 2010; RIBEIRO et al., 2014). Este aminoácido é amplamente utilizado como substrato energético pelos músculos envolvidos na atividade de voo (SCARAFFIA; WELLS, 2003; ARRESE; SOULAGES, 2010; RIBEIRO et al., 2014). Além dos metabólitos citados acima, também identificamos a presença de glutamato. Ribeiro e colaboradores (2014) encontraram uma enzima que catalisa dois estágios iniciais da biossíntese de prolina a partir do glutamato, indicando que o glutamato pode ser um precursor da prolina, o que ajuda a explicar a presença desse metabólito em nossas análises.

Já é conhecido que o *T. cruzi* adere-se a parede do TG de triatomíneos (KOLLIEN; SCHAUB, 2000), pois é nesse órgão que o protozoário realiza parte do seu ciclo de vida (GARCIA; AZAMBUJA, 1991). Acredita-se que o desenvolvimento do protozoário no TG pode ser afetado pelos nutrientes disponíveis e pela superfície que ofereça propriedades de fixação adequadas para o parasito (KOLLIEN; SCHMIDT; SCHAUB, 1998). Um ambiente adequado para sobrevivência de *T. cruzi* envolve a presença, preferencialmente, de glicose e aminoácidos como substrato energético (ZELEDON, 1960; KOLLIEN; SCHMIDT; SCHAUB, 1998; KOLLIEN; SCHAUB, 2000; BRINGAUD; RIVIÈRE; COUSTOU, 2006). Entretanto sabe-se que no meio intracelular, os parasitas não transportam glicose, sendo o metabolismo da prolina um dos seus principais substratos energéticos (SILBER et al., 2009). No estudo aqui apresentado, a prolina foi um dos metabólitos que se destacou para separação dos grupos infectados e não infectados, pois estava presente em níveis menores no grupo de insetos infectados. Dado o exposto, acreditamos que este aminoácido está sendo utilizado pelo *T. cruzi* como substrato energético.

Já foi relatado que a prolina pode ser oxidada e metabolizada pelo ciclo de Krebs, sendo convertida a glutamato (SYLVESTER; KRASSNER, 1976; SILBER et al., 2005). Silber et al. (2002) demonstraram que o protozoário *T. cruzi* pode importar a prolina do meio extracelular. Além disso, os autores relataram que esse metabólito está associado à replicação e diferenciação das formas epimastigotas (metaciclogênese) (SILBER et al., 2002; TONELLI et al., 2004). Martins et al. (2009) demonstraram que, para o processo de invasão celular, as formas tripomastigotas metacíclicas necessitam de energia e essa energia é suprida pela prolina. Esse relato serve como um respaldo para explicar a presença de prolina diminuída observada no grupo infectado, uma vez que o *T. cruzi* precisa invadir as células do TG do vetor para completar sua metaciclogênese e, com isso, utilizar a prolina como substrato energético. Ademais, a prolina já foi descrita como substrato de várias enzimas metabólicas (REINA-SAN-MARTÍN et al., 2000) e possui função osmoprotetora, conferindo resistência

ao estresse osmótico a que o parasito é submetido durante as mudanças de ambientes (ROHLOFF; DOCAMPO, 2008). Os aminoácidos presentes nas excretas nitrogenadas dos triatomíneos são prolina, aspartato, glutamato, entre outros. Barrett e Friend (1975) descreveram que a metacicloênese ocorre na porção distal do intestino do vetor, e esse processo é alimentado pelos aminoácidos presentes na urina que está na porção distal (BARRETT; FRIEND, 1975). Essa informação contribui para corroborar nossos dados referentes à prolina diminuída no grupo infectado, pois esse aminoácido pode estar sendo utilizado como substrato energético para metacicloênese e, provavelmente, está sendo sequestrado da urina do vetor. Sendo assim, muito provável que o sequestro desse aminoácido não esteja causando prejuízo para o inseto, uma vez que a urina seria eliminada do organismo durante o processo de excreção.

Um dos metabólitos encontrados nas nossas análises (e que também foi significativo para distinção dos grupos) foi o acetato. Esse metabólito demonstrou níveis aumentados no grupo infectado em relação ao sem infecção. Esse achado vai de encontro com alguns relatos da literatura que descrevem o acetato como produto do metabolismo da degradação da glicose e de alguns aminoácidos em *T. cruzi*, além de já ter sido descrito como composto associado à síntese de prolina (BURSELL, 1981; ARRESE; SOULAGES, 2010; DE-SIMONE et al., 2022). Assim, os níveis mais altos de acetato no grupo infectado, supostamente, se explicam devido à excreção de acetato pelo *T. cruzi*, uma vez que o parasito, provavelmente, estava realizando degradação de glicose e aminoácidos para sintetizar energia para metacicloênese.

A degradação parcial da glicose, bem como a degradação de prolina, glutamato, aspartato e treonina, resulta na formação de acetato nesse parasito. Além disso, a maior parte do acetil-CoA produzido durante a glicólise é convertido em acetato e excretado pelo parasito para o meio extracelular (BOWMAN; TOBIE; VON BRAND, 1963; VAN WEELDEN et al., 2005; VAN HELLEMOND; OPPERDOES; TIELENS, 2005). Sanchez-Moreno et al. (1995) realizaram um estudo com diferentes formas de *T. cruzi* e observaram que durante os primeiros oito dias de desenvolvimento em meio de cultura, as formas epimastigotas excretaram acetato e piruvato. Dessa forma, os achados desses estudos corroboram a presença elevada do acetato no grupo de vetores infectados pelo parasito. Não encontramos nenhum relato na literatura que indique que o acetato é prejudicial para o vetor, nem como esse acetato em maiores ou menores concentrações pode afetar o inseto. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel desse metabólito. No entanto, acreditamos que o acetato possa ser utilizado pelo inseto para desempenhar papel em outras atividades metabólicas, como nos eventos bioquímicos que envolvem a respiração.

Através de análises metabolômicas também foi possível identificar a presença da fenilalanina, que é um metabólito essencial e precursor da tirosina (metabólito também encontrado e discutido abaixo) (STERKEL; OLIVEIRA, 2017). Uma enzima (fenilalanina hidroxilase) que converte fenilalanina em tirosina já foi identificada em *R. prolixus* (STERKEL; OLIVEIRA, 2017) e quando a ação desta enzima é interrompida em insetos vetores [*R. prolixus* e *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (Diptera: Culicidae)], há acúmulo de fenilalanina, causando prejuízos à reprodução, ecdise e sobrevivência (FUCHS et al., 2014; STERKEL; OLIVEIRA, 2017).

A tirosina é um aminoácido essencial amplamente utilizado para síntese proteica, que apresenta importância para o endurecimento das cutículas e contribui para a melanização de patógenos (sendo considerado um importante componente do sistema imunológico dos insetos) (VAVRICKA et al., 2014), este aminoácido pode ser obtido de forma endógena (a partir da fenilalanina) e exógena (a partir da digestão dos alimentos – sangue, no caso dos insetos estudados) (FUCHS et al., 2014; STERKEL et al., 2016). Porém, o excesso de tirosina pode ser tóxico e fatal para insetos hematófagos (STERKEL et al., 2016), tornando a degradação enzimática desse metabólito essencial para a desintoxicação dos insetos vetores de hábitos hematófagos (BURSELL, 1975; SCARAFFIA; WELLS, 2003; STERKEL et al., 2016; FERREIRA et al., 2018). Estudos realizados por Sterkel et al. (2016) com artrópodes hematófagos (incluindo *R. prolixus*) já demonstraram que os insetos poderiam reduzir altos níveis de tirosina, sendo o processo uma adaptação metabólica essencial à hematofagia (STERKEL et al., 2016). Ribeiro et al. (2014) analisaram transcrições do TG de *R. prolixus* e descobriram que a tirosina pode ser degradada em acetoacetato e fumarato ao longo do TG – sendo o fumarato canalizado para ser utilizado no ciclo do ácido cítrico (RIBEIRO et al., 2014; STERKEL; OLIVEIRA, 2017). Esses dados demonstram a importância da fenilalanina, da tirosina e, principalmente, podem justificar a presença dessas moléculas, bem como do fumarato entre os metabólitos observados no metaboloma de *R. prolixus*. Entretanto, a fenilalanina e a tirosina não foram metabólitos significativos para separação dos grupos (*Infec X NoInfec*), provavelmente porque a presença ou ausência do protozoário não gera uma modulação significativa no metabolismo do vetor.

Além dos metabólitos mencionados acima, o triptofano também foi observado no metaboloma do *T. infestans* e não apresentou significância estatística para separação dos grupos. Ribeiro et al., (2014) identificaram, através de análises transcriptômicas, a via de degradação do triptofano super-representada no TG de *R. prolixus* (RIBEIRO et al., 2014), e sabe-se que em altas concentrações, o triptofano é tóxico para insetos (LINZEN, 1974;

SHAMIM et al., 2014; FIGON; CASAS, 2019). Diante disso, alguns autores acreditam que a produção de omocromo – moléculas responsáveis pela produção de cores que também atuam em processos metabólicos e biológicos (LINZEN, 1974; NEEDHAM, 1974; FIGON; CASAS, 2019), como homeostase celular, desintoxicação de triptofano livre e na redução do estresse oxidativo (FIGON; CASAS, 2019) – auxilia na remoção do excesso de triptofano, evitando assim a toxicidade por esse aminoácido, portanto essas moléculas são consideradas produtos da desintoxicação do triptofano (LINZEN, 1974; SHAMIM et al., 2014; FIGON; CASAS, 2019).

Ribeiro et al. (2014) realizaram um extenso estudo do transcriptoma do TG de *R. prolixus* e encontraram uma grande rede de transaminação no intestino deste vetor, além de algumas vias biossintéticas, envolvendo diversas enzimas e aminoácidos que permitem compreender a presença de alguns metabólitos identificados em nosso trabalho. Dentre as vias de biossíntese encontradas pelos autores, pode-se destacar a biossíntese de serina, regulada positivamente no intestino médio de *R. prolixus* (RIBEIRO et al., 2014). Além disso, os autores identificaram a presença de uma enzima específica (fosfoserina aminotransferase) que participa do metabolismo da glicina, serina e treonina, com altos níveis de expressão em todo o intestino deste inseto (RIBEIRO et al., 2014). Esses achados corroboram a presença de serina e treonina no TG de *T. infestans*.

Ainda, de acordo com Ribeiro et al. (2014), foram identificadas duas enzimas presentes ao longo do TG de *R. prolixus* (tirosina aminotransferase e aspartato aminotransferase). Os autores indicam que ambas as enzimas ligam as vias metabólicas da alanina, aspartato, glutamato, cisteína, metionina, arginina, prolina, tirosina, fenilalanina e triptofano (RIBEIRO et al., 2014). Além disso, observaram que a tirosina aminotransferase está restrita ao metabolismo da cisteína, metionina, tirosina e fenilalanina (RIBEIRO et al., 2014). Dentre as moléculas citadas anteriormente, apenas a cisteína e a arginina não foram identificadas no metaboloma do sistema digestivo de *T. infestans*. A ausência destes aminoácidos pode ser devido a limitações de resolução técnica, baixas concentrações ou simplesmente porque não estão presentes nesta espécie.

O papel dos aminoácidos cisteína e arginina em insetos hematófagos não foi encontrado na literatura. Por outro lado, a importância da alanina, glutamato, prolina, tirosina, fenilalanina e triptofano para o metabolismo do *T. infestans* já foi mencionada nos parágrafos anteriores. No estudo do metaboloma de *T. infestans* também foi possível observar a presença de isoleucina, leucina e valina. Embora Ribeiro et al. (2014) identificaram uma aminotransferase que transfere grupos $-NH_2$ de isoleucina, leucina e valina para

intermediários do ciclo do ácido carboxílico, não foi possível afirmar a função de cada um deles no metabolismo dos vetores da DC.

No presente estudo encontramos a isoleucina como um metabólito significativo para separação entre os grupos. Esse aminoácido foi encontrado com níveis aumentados no grupo infectado em relação ao grupo sem infecção. Homsy e colaboradores (1989) relataram que a isoleucina pode inibir a metaciclologênese induzida por prolina em *T. cruzi*, essa inibição ocorre porque a isoleucina inibe uma das etapas da oxidação da prolina (HOMSY; GRANGER; KRASSNER, 1989; MANTILLA et al., 2015). O protozoário não possui vias de biossíntese para isoleucina, assim esse aminoácido é obtido do meio extracelular ou pela degradação de proteínas (MANCHOLA et al., 2016). Não encontramos na literatura nenhum relato que ampare os resultados encontrados, entretanto, como a isoleucina funciona como um inibidor da metaciclologênese induzida por prolina, e essa via é mais utilizada pelo protozoário, é necessário investigar com mais estudos se esse aumento da isoleucina não poderia ser um mecanismo de defesa do inseto para inibir o crescimento do parasito.

Outro aminoácido observado no metaboloma do *T. infestans* foi o aspartato. Este metabólito também está presente na hemolinfa de *T. infestans* (SCHAUB; SCHMIDT; ULLRICH, 1990). Embora nenhum outro manuscrito tenha relatado a presença desse composto em insetos vetores, estudos realizados com o agente etiológico da DC permitiram encontrar três mecanismos de transporte de aminoácidos: um para prolina (identificado no metaboloma de *T. infestans*), outro para arginina (não identificado no metaboloma de *T. infestans*) e um terceiro para aspartato (identificado no metaboloma de *T. infestans*) (CANEPA, 2004; CANEPA et al., 2005; PEREIRA et al., 1999, 2002; SILBER et al., 2002). Ademais, estes três aminoácidos são considerados importantes para o metabolismo energético do *T. cruzi* (CANEPA et al., 2005). Canepa et al. (2005) propuseram que esses mecanismos de transporte são uma adaptação evolutiva a ambientes com diferentes concentrações de aminoácidos, como o sangue de mamíferos e, principalmente, o intestino posterior de insetos vetores. Córdoba-Aguilar (2020) destaca que a coevolução entre triatomíneos e *T. cruzi* resultou no desenvolvimento de estratégias poderosas e sofisticadas, uma vez que a presença do protozoário pode modificar uma ampla gama de processos fisiológicos dos insetos, incluindo aqueles relacionados à entrada, desenvolvimento e liberação do parasita (CÓRDOBA-AGUILAR, 2020). Pelo exposto, a necessidade de aspartato pelo *T. cruzi* seria uma justificativa plausível para a presença deste metabólito no TG do inseto estudado por ser hospedeiro do protozoário.

A asparagina também foi identificada no metaboloma de *T. infestans*, porém estudos

sobre a importância deste composto para insetos vetores são bastante escassos: Dadd, (1978) realizou um estudo com *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) e identificou a asparagina como sendo um aminoácido crucial para o desenvolvimento do inseto (DADD, 1978); Pickett e Friend (1966) descreveram a presença de aminoácidos livres na hemolinfa de *R. prolixus*, dentre estes, os autores observaram alanina, asparagina, cistina, isoleucina, fenilalanina e treonina (PICKETT; FRIEND, 1966). Schaub et al. (1990) realizaram estudo com hemolinfa de *T. infestans* e identificaram a presença de asparagina, além de aspartato, metionina, fenilalanina, valina e lisina (SCHAUB; SCHMIDT; ULLRICH, 1990). Vale ressaltar que os mesmos metabólitos encontrados por Schaub et al. (1990) também foram observados no metaboloma gastrointestinal de *T. infestans*.

Dos metabólitos citados anteriormente (asparagina, aspartato, metionina, fenilalanina, valina e lisina), apenas a lisina, dentre estes, foi encontrado no nosso estudo como sendo significativo para separar os grupos de insetos infetados e sem infecção pelo *T. cruzi*. Darlyuk et al. (2009) relataram que a lisina é um aminoácido essencial para síntese proteica e não parece estar envolvida em outros processos. Inbar et al. (2012), mostraram que *T. cruzi* adquire lisina do meio extracelular, ou seja, utiliza a lisina produzida pelo vetor. No nosso trabalho, identificamos a lisina como um aminoácido com níveis aumentados em *T. infestans* infectado, quando comparado aos sem infecção. Não encontramos dados suficientes que pudessem explicar essa condição, entretanto, uma vez que o protozoário não possui capacidade de sintetizar esse metabólito e o mesmo encontra-se em níveis aumentados na sua presença, uma possível explicação seria que o *T. cruzi* de alguma forma, pode estimular a síntese de lisina pelo vetor, entretanto essa hipótese precisa de mais estudos para ser comprovada.

A glicose, um dos metabólitos presentes no TG de *T. infestans*, apresentou relevância para separação dos grupos. Embora nenhum estudo sobre a presença desse composto tenha sido relatado em insetos vetores, Steele (1982) destaca que nos insetos a glicose é armazenada na forma de glicogênio, que pode ser facilmente degradado quando necessário para obtenção de energia. Além disso, a glicose é utilizada para a síntese de quitina (componente da cutícula dos insetos) (LOCKEY, 1988) e é utilizada para a síntese de álcoois de açúcar, como o manitol – composto utilizado por alguns insetos para adaptação ao frio ou à seca (STOREY, 1997; WATANABE et al., 2002). Em *T. cruzi* a taxa de consumo de glicose é a mesma, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, (CAZZULO, 1992, 1994). Dessa forma, a glicose não é completamente degradada, resultando em uma mistura final de diferentes compostos e pequenas quantidades de acetato e piruvato (CANNATA; CAZZULO, 1984; CAZZULO et

al., 1985; COUSTOU et al., 2008).

No presente trabalho, identificamos a glicose em maior quantidade no grupo de insetos infectados, isso pode ocorrer devido à alta taxa de replicação do parasito no TG, fazendo com que a glicose tenha níveis elevados na fase exponencial (de crescimento de epimastigotas) do protozoário. Barisón et al. (2017) realizaram um estudo sobre o perfil metabólico do metabolismo energético de *T. cruzi* e observaram os níveis de glicose relativamente mais elevados na fase exponencial, quando comparados a fase estacionária, sugerindo que esse achado pode ser devido a captação de glicose do meio extracelular pelas células replicantes, uma vez que na fase exponencial a glicose é o substrato preferido por esse parasito (BARISÓN et al., 2017). Entretanto, na fase estacionária, os autores também observaram presença de glicose. Com isso, inferiram que os aminoácidos poderiam estar servindo para a síntese de glicose e, conseqüentemente, mantendo um determinado nível intracelular dessa molécula (BARISÓN et al., 2017). Diante disso, a glicose aumentada no grupo infectado do nosso trabalho poderia ser corroborada com os achados de Barisón et al. (2017), uma vez que o parasito nessas amostras, provavelmente, passou pelas duas fases citadas (exponencial e estacionária) e pode estar sintetizando a glicose através dos aminoácidos. Outra hipótese pode estar relacionada com a interrupção do consumo desse açúcar, o que pode ocasionar um acúmulo de glicose, que foi detectado pelas nossas análises.

Canavoso e Rubiolo, (1993) avaliaram os componentes da hemolinfa de triatomíneos dos gêneros *Triatoma* Laporte, 1832 (incluindo *T. infestans*), *Panstrongylus* Berg, 1879 e *Dipetalogaster* Usinger, 1939 e observaram valores de carboidratos (incluindo glicose) inferiores aos já relatados para outros insetos (CANAVOSO; RUBIOLO, 1993). Além disso, Antunes e colaboradores (2013) relataram a presença de carboidratos no metaboloma fecal de triatomíneos (incluindo *T. infestans*), embora os autores não conseguiram concluir se provinham da dieta ou do metabolismo do inseto. Apenas com as nossas análises não é possível saber ao certo se o uso da glicose pelo protozoário traz algum tipo de prejuízo ao vetor. Entretanto, dado que a glicose é utilizada pelos insetos vetores para obtenção de energia (principalmente em situações de ausência de alimento como os insetos utilizados nesse estudo) (STEELE, 1982), síntese de quitina (LOCKEY, 1988) e para a síntese de compostos que promovem adaptação ao frio ou à seca (STOREY, 1997; WATANABE et al., 2002), o uso excessivo da glicose pelo *T. cruzi* poderia causar prejuízos ao vetor no que diz respeito a esses aspectos. Porém, mais estudos são necessários para comprovar esses possíveis prejuízos.

Dois metabólitos significativos para separação entre os grupos estudados foram a colina e a betaína. No entanto, pouca informação está presente na literatura sobre esses metabólitos

em insetos e protozoários (e nenhuma para insetos vetores): i. a betaína foi detectada como um metabólito proeminente em larvas de insetos (no entanto, isso pode ser um reflexo da colina na dieta dos insetos) (PHALARAKSH et al., 2008); ii. diversas espécies de insetos necessitam da adição de colina a uma dieta basal para atingir o crescimento máximo de seus juvenis (BRIDGES, 1972); iii. Dadd et al. (1967) demonstraram que a ausência de colina retarda o crescimento em insetos pulgões (Hemiptera: Aphididae); iv. Tahori e Hazan (1970) observaram que o pulgão preto dos cítricos poderia ser criado por pelo menos duas gerações com uma dieta de aminoácidos sem todas as vitaminas do complexo B (incluindo a colina); v. Rasso e Fraenkel (1954) demonstraram que a adição de colina à dieta de fêmeas adultas de mosca varejeira (Diptera: Calliphoridae) acelerou ligeiramente a produção de ovos; vi. Vanderzant e Richardson (1964) concluíram que besouros adultos (Coleoptera, Curculionidae) necessitavam de colina na dieta para continuar a botar ovos viáveis; vii. (Geer et al. (1970) observaram que a colina é necessária para a produção de óvulos e espermatozoides em drosophilídeos (Diptera: Drosophilidae). Entretanto, ainda não há informações suficientes aplicadas ao estudo dos insetos hematófagos que expliquem a presença e, sobretudo, a função desses metabólitos no TG de *T. infestans*.

Além do exposto, para *T. cruzi*, a colina (juntamente com o ácido fólico) foram considerados por Avila et al. (1983) como uma vitamina B essencial ao crescimento do protozoário em meio mínimo. No nosso trabalho, a colina está presente em níveis menores no inseto infectado em relação ao inseto sem infecção. Dado o exposto por Avila et al. (1983) e o observado em nossas análises, podemos inferir que o *T. cruzi* estaria utilizando a colina presente no TG de *T. infestans* e isso explicaria os níveis reduzidos no vetor infectado.

Dos 22 metabólitos identificados no TG de vetor com ausência do parasito, apenas sete foram significativos para diferenciar os grupos controle e infectado (isoleucina, lisina, prolina, colina, betaina, acetato e glicose). Isso se deu provavelmente, porque a presença ou ausência do protozoário não impactou de forma significativa os processos metabólicos que envolvem esses metabólitos, entretanto ressaltamos a importância da realização de mais estudos para comprovar se as vias bioquímicas do metabolismo que envolvem esses metabólitos são realmente afetadas ou não pelo protozoário.

6. CONCLUSÃO

Aqui apresentamos o primeiro estudo metabolômico do TG de *T. infestans*, o que nos permitiu caracterizar 22 metabólitos (treonina, alanina, valina, isoleucina, lisina, prolina, glutamato, glutamina, aspartato, leucina, acetato, metionina, asparagina, betaína, colina, glicose, manitol, tirosina, serina, fumarato, fenilalanina e triptofano), sendo sete, a saber, isoleucina, lisina, prolina, colina, betaina, acetato e glicose, significativos para diferenciar os grupos infectados e sem infecção. Este estudo permitiu investigar as intrincadas adaptações metabólicas de *T. infestans* após a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, fornecendo dados importantes para melhor compreensão da interação parasito-vetor. Embora as nossas descobertas ofereçam um primeiro passo a compreensão da dinâmica metabólica desta relação entre *T. infectans* e *T. cruzi*, é importante ressaltar que a escassez de dados metabolômicos sobre esta interação mostra a necessidade de estudos mais abrangentes. A disponibilidade limitada de tais dados destaca uma lacuna crítica para a discussão dos resultados, enfatizando a necessidade de investigações adicionais empregando técnicas complementares. A complexidade das interações entre o vetor e o protozoário exige uma abordagem multidisciplinar para desvendar os caminhos completos das alterações metabólicas observadas. Dessa forma, a incorporação de metodologias adicionais, como genômica, proteômica e transcriptômica proporcionará uma compreensão mais abrangente dos mecanismos moleculares que direcionam essa interação.

Referências

- 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, 15 dez. 2021.
- ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 5 mar. 2015.
- ANDREW, E. R.; BRADBURY, A.; EADES, R. G. Nuclear Magnetic Resonance Spectra from a Crystal rotated at High Speed. **Nature**, v. 182, n. 4650, p. 1659–1659, dez. 1958.
- ANTUNES, L. C. M. et al. Metabolic Signatures of Triatomine Vectors of *Trypanosoma cruzi* Unveiled by Metabolomics. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77283, 30 out. 2013.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 207–225, 1 jan. 2010.
- AUE, W. P.; BARTHOLDI, E.; ERNST, R. R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. **The Journal of Chemical Physics**, v. 64, n. 5, p. 2229–2246, 1 mar. 1976.
- AVILA, J. L.; PEREZ-KEPP, R.; BRETANA, A. A Minimal Medium For The Cultivation Of Infective *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes. **Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 285–291, 1 fev. 1983.
- BARISÓN, M. J. et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8964–8977, maio 2017.
- BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 3, p. 166–173, 24 mar. 2003.
- BARRETT, M. F.; FRIEND, W. G. Differences in the concentration of free amino acids in the haemolymph of adult male and female *Rhodnius prolixus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 52, n. 3, p. 427–431, nov. 1975.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and Congenital Chagas Disease. Em: [s.l: s.n.]. p. 19–47.
- BERRUETA, L. A.; ALONSO-SALCES, R. M.; HÉBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 196–214, jul. 2007.
- BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P. E.; MEDEL, R. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. **Acta Tropica**, v. 98, n. 3, p. 219–223, jul. 2006.
- BOWMAN, I. B. R.; TOBIE, E. J.; VON BRAND, T. CO₂ fixation studies with the culture form of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 9, n. 2, p. 105–114, jun. 1963.

- BRIDGES, R. G. Choline Metabolism in Insects. Em: [s.l: s.n.]. p. 51–110.
- BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1–9, set. 2006.
- BURSELL, E. Substrates of oxidative metabolism in dipteran flight muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 52, n. 2, p. 235–238, out. 1975.
- BURSELL, E. The Role of Proline in Energy Metabolism. Em: **Energy Metabolism in Insects**. [s.l: s.n.]. p. 135–154.
- CANAVOSO, L. E.; RUBIOLO, E. R. Hemolymphatic components in vectors of *Trypanosoma cruzi*: study in several species of the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 123–128, abr. 1993.
- CANEPA, G. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 1, p. 79–84, jul. 2004.
- CANEPA, G. E. et al. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 1, p. 65–71, jun. 2005.
- CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 79, n. 3, p. 297–308, jan. 1984.
- CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. **Physical Review**, v. 94, n. 3, p. 630–638, 1 maio 1954.
- CAZZULO, J. J. et al. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 329–343, set. 1985.
- CAZZULO, J. J. Energy Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Em: **Intracellular Parasites**. [s.l: s.n.]. p. 235–257.
- CAZZULO, J. J. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 26, n. 2, p. 157–165, abr. 1994.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Chagas Disease After Organ Transplantation --- Los Angeles, California**.
- CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2016.
- CÓRDOBA-AGUILAR, A. Chagas bugs and *trypanosoma cruzi*: Puppets and puppeteer? **Acta Tropica**, v. 211, p. 105600, nov. 2020.
- COUSTOU, V. et al. Glucose-induced Remodeling of Intermediary and Energy Metabolism in Procyclic *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 24, p. 16342–16354, jun. 2008.
- CRESPILLO-ANDÚJAR, C. et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas disease: An updated systematic review with a meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 5, p. e0010386, 16 maio 2022.

DADD, R. H. Amino acid requirements of the mosquito *Culex pipiens*: Asparagine essential. **Journal of Insect Physiology**, v. 24, n. 1, p. 25–30, jan. 1978.

DADD, R. H.; KRIEGER, D. L.; MITTLER, T. E. Studies on the artificial feeding of the aphid *Myzus persicae* (Sulzer)—IV. Requirements for water-soluble vitamins and ascorbic acid. **Journal of Insect Physiology**, v. 13, n. 2, p. 249–272, fev. 1967.

DARLYUK, I. et al. Arginine Homeostasis and Transport in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 30, p. 19800–19807, jul. 2009.

DE ARIAS, A. R. et al. Chagas disease control-surveillance in the Americas: the multinational initiatives and the practical impossibility of interrupting vector-borne *Trypanosoma cruzi* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.

DE FUENTES-VICENTE, J. A. et al. What Do You Need to Know before Studying Chagas Disease? A Beginner's Guide. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 7, p. 360, 10 jul. 2023.

DE OLIVEIRA, A. B. B. et al. Parasite–Vector Interaction of Chagas Disease: A Mini-Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 653–655, 7 mar. 2018.

DE-SIMONE, S. G. et al. Metabolic Alteration of *Trypanosoma cruzi* during Differentiation of Epimastigote to Trypomastigote Forms. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 268, 19 fev. 2022.

DEVERA, R. et al. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 323–330, ago. 2002.

DIAS, J.; SCHOFIELD, C. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. suppl 1, p. 103–121, set. 1999.

DNDI. **Chagas Disease**.

DUJARDIN; SCHOFIELD; TIBAYRENC. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 1, p. 20–29, 4 jan. 1998.

EBERHARD, F. E. et al. Metabolites as predictive biomarkers for *Trypanosoma cruzi* exposure in triatomine bugs. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 3051–3057, 2021.

ELLIOT, S. L. et al. *Trypanosoma cruzi*, Etiological Agent of Chagas Disease, Is Virulent to Its Triatomine Vector *Rhodnius prolixus* in a Temperature-Dependent Manner. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003646, 20 mar. 2015.

EMWAS, A.-H. et al. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. **Metabolomics**, v. 14, n. 3, p. 31, 12 mar. 2018.

EMWAS, A.-H. et al. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 123, 27 jun. 2019.

EMWAS, A.-H. M. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. Em: [s.l.: s.n.]. p. 161–193.

ENGELSEN, S. B.; SAVORANI, F.; RASMUSSEN, M. A. Chemometric Exploration of Quantitative NMR Data. Em: **eMagRes**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

FELLET, M. R. et al. Effects of Infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the Reproductive Performance of the Vector *Rhodnius prolixus*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105255, 19 ago. 2014.

FERREIRA, C. M. et al. Modulation of mitochondrial metabolism as a biochemical trait in blood feeding organisms: the redox vampire hypothesis redux. **Cell Biology International**, v. 42, n. 6, p. 683–700, 23 jun. 2018.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. [s.l.] Editora da Unicamp, 2015.

FIGON, F.; CASAS, J. Ommochromes in invertebrates: biochemistry and cell biology. **Biological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 156–183, 10 fev. 2019.

FUCHS, S. et al. Phenylalanine Metabolism Regulates Reproduction and Parasite Melanization in the Malaria Mosquito. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e84865, 7 jan. 2014.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. [s.l.] Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

GARCIA, E. S. et al. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 499–505, out. 2010.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitology Today**, v. 7, n. 9, p. 240–244, jan. 1991.

GEER, B. W.; OLANDER, R. M.; SHARP, P. L. Quantification of dietary choline utilization in adult *Drosophila melanogaster* by radioisotope methods. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, n. 1, p. 33–43, jan. 1970.

GIL-SANTANA, H. R. et al. *Panstrongylus noireaudi*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. **ZooKeys**, v. 1104, p. 203–225, 14 jun. 2022.

GIRONÈS, N. et al. Global Metabolomic Profiling of Acute Myocarditis Caused by *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. e3337, 20 nov. 2014.

GOODACRE, R. et al. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 245–252, maio 2004.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Poverty, Migration, and Chagas Disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 1, p. 52–58, 11 mar. 2021.

GÜRTLER, R. E. et al. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 41, p. 16194–16199, 9 out. 2007.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. et al. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1261–1266, 1 maio 2012.

- HOMSY, J. J.; GRANGER, B.; KRASSNER, S. M. Some Factors Inducing Formation of Metacyclic Stages of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Protozoology**, v. 36, n. 2, p. 150–153, 30 mar. 1989.
- HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018–1027, 6 set. 2007.
- INBAR, E. et al. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. **Amino Acids**, v. 42, n. 1, p. 347–360, 18 jan. 2012.
- JACKSON, Y. et al. Prevalence, Clinical Staging and Risk for Blood-Borne Transmission of Chagas Disease among Latin American Migrants in Geneva, Switzerland. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e592, 2 fev. 2010.
- JANOVICK, J. et al. Nuclear magnetic resonance. Em: **Chemical Analysis of Food**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 135–175.
- KANEHISA, M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000.
- KOLLIEN, A. H.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G. A. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. **Acta Tropica**, v. 70, n. 2, p. 127–141, jun. 1998.
- KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, n. 9, p. 381–387, set. 2000.
- LIMA, M. M. et al. Development and Reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) Infected with *Trypanosoma cruzi*, Under Laboratory Conditions. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, n. 4, p. 458–461, 1 jul. 1992.
- LINZEN, B. The Tryptophan → Ommochrome Pathway in Insects. Em: [s.l.: s.n.]. p. 117–246.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 89, n. 4, p. 595–645, jan. 1988.
- LOWE, I. J. Free Induction Decays of Rotating Solids. **Physical Review Letters**, v. 2, n. 7, p. 285–287, 1 abr. 1959.
- MAHROUS, E. A.; FARAG, M. A. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 3–15, jan. 2015.
- MANCHOLA, N. C. et al. Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 299–308, 13 maio 2016.
- MANTILLA, B. S. et al. Role of $\Delta 1$ -Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase Supports Mitochondrial Metabolism and Host-Cell Invasion of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 12, p. 7767–7790, mar. 2015.
- MARTÍN-ESCOLANO, J. et al. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 10 jun. 2022.

MARTINS, L. et al. USO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ALTA RESOLUÇÃO PARA ESTUDOS DE INTERAÇÕES RECEPTORES-LIGANTES: FUNDAMENTOS, MÉTODOS E APLICAÇÕES. Em: [s.l: s.n.].

MARTINS, R. M. et al. Use of γ -Proline and ATP Production by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms as Requirements for Host Cell Invasion. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 3023–3032, jul. 2009.

MESSENGER, L. A.; MILES, M. A.; BERN, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 8, p. 995–1029, 3 ago. 2015.

MILES, M. A. et al. DO RADICALLY DISSIMILAR TRYPANOSOMA CRUZI STRAINS (ZYMODEMES) CAUSE VENEZUELAN AND BRAZILIAN FORMS OF CHAGAS' DISEASE? **The Lancet**, v. 317, n. 8234, p. 1338–1340, jun. 1981.

NEEDHAM, A. E. Zoochromes in Other Aspects of Metabolism. Em: **The Significance of Zoochromes**. [s.l: s.n.]. p. 241–246.

OLIVEIRA CORREIA, J. P. S. et al. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky Is a Junior Synonym of *Triatoma williamsi* Galvão, Souza and Lima. **Insects**, v. 13, n. 7, p. 591, 28 jun. 2022.

PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2 jul. 2021.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 263–269, 22 abr. 2012.

PENNINGTON, J. E.; GOLDSTROHM, D. A.; WELLS, M. A. The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the Mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 2, p. 115–121, fev. 2003.

PEREIRA, C. A. et al. L-Arginine Uptake and L-Phosphoarginine Synthesis In *Trypanosoma Cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 566–570, 2 nov. 1999.

PEREIRA, C. A. et al. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. **FEBS Letters**, v. 526, n. 1–3, p. 111–114, 28 ago. 2002.

PÉREZ DE ROSAS, A. R. et al. Fine-scale genetic structure in populations of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). **Genetica**, v. 141, n. 1–3, p. 107–117, 7 mar. 2013.

PHALARAKSH, C. et al. A metabonomic analysis of insect development: ¹H-NMR spectroscopic characterization of changes in the composition of the haemolymph of larvae and pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **ScienceAsia**, v. 34, n. 3, p. 279, 2008.

PICKETT, C.; FRIEND, W. G. FREE AMINO ACIDS IN THE HAEMOLYMPH OF RHODNIUS PROLIUS STÅHL (HEMIPTERA: REDUVIIDAE). **Canadian Journal of Zoology**, v. 44, n. 2, p. 241–249, 1 mar. 1966.

PUTRI, S. P. et al. Current metabolomics: Practical applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 579–589, jun. 2013.

RASSO, S. C.; FRAENKEL, G. The Food Requirements of the Adult Female Blow-Fly, *Phormia Regina* (Meigen), in Relation to Ovarian Development. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 47, n. 4, p. 636–645, 1 dez. 1954.

- REINA-SAN-MARTÍN, B. et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. **Nature Medicine**, v. 6, n. 8, p. 890–897, ago. 2000.
- REN, S. et al. Computational and statistical analysis of metabolomics data. **Metabolomics**, v. 11, n. 6, p. 1492–1513, 28 dez. 2015.
- 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, 9 jan. 2014.
- ROBERTS, L. D. et al. Targeted Metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 98, n. 1, 15 abr. 2012.
- ROCHFORD, S. Metabolomics Reviewed: A New “Omics” Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1813–1820, 1 dez. 2005.
- ROHLOFF, P.; DOCAMPO, R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 17–24, jan. 2008.
- SANCHEZ-MORENO, M. et al. Metabolic studies by ¹ H NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by “in vitro” culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, n. 1–2, p. 119–125, nov. 1995.
- SCARAFFIA, P. Y. et al. Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 491–503, maio 2005.
- SCARAFFIA, P. Y.; WELLS, M. A. Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 6, p. 591–601, jun. 2003.
- SCHAUB, G. A.; SCHMIDT, A.; ULLRICH, J. The effect of moulting and of infection with *Blastocrithidia triatoma* (Trypanosomatidae) on the concentration of free amino acids in the haemolymph of the reduviid bug *Triatoma infestans*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 11, p. 843–853, jan. 1990.
- SHAMIM, G. et al. Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. **European Journal of Entomology**, v. 111, n. 2, p. 149–164, 5 maio 2014.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral Transmission of Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 15 mar. 2012.
- SILBER, A. et al. Amino Acid Metabolic Routes in *Trypanosoma cruzi*: Possible Therapeutic Targets Against Chagas Disease. **Current Drug Target -Infectious Disorders**, v. 5, n. 1, p. 53–64, 1 mar. 2005.
- SILBER, A. M. et al. Active Transport of L-Proline in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 441–446, 11 nov. 2002.
- SILBER, A. M. et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, n. 1, p. 102–108, nov. 2009.
- SILVA, L. H. P. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol Clin Biol**, p. 191–207, 1953.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS**. [s.l: s.n.].

- SINGH, U. et al. Compound-Specific 1D ^1H NMR Pulse Sequence Selection for Metabolomics Analyses. **ACS Omega**, v. 8, n. 26, p. 23651–23663, 4 jul. 2023.
- SNART, C. J. P.; HARDY, I. C. W.; BARRETT, D. A. Entometabolomics: applications of modern analytical techniques to insect studies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 155, n. 1, p. 1–17, 14 abr. 2015.
- SOLOMONS, T. W. G. **Química Organica**. 12. ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- SORIANO-ARANDES, A. et al. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. **Tropical Medicine & International Health**, v. 21, n. 5, p. 590–596, 17 maio 2016.
- STANISIC, D. et al. High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy for Evaluation of Cell Shielding by Virucidal Composites Based on Biogenic Silver Nanoparticles, Flexible Cellulose Nanofibers and Graphene Oxide. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 12 maio 2022.
- STEELE, J. E. Glycogen phosphorylase in insects. **Insect Biochemistry**, v. 12, n. 2, p. 131–147, jan. 1982.
- STERKEL, M. et al. Tyrosine Detoxification Is an Essential Trait in the Life History of Blood-Feeding Arthropods. **Current Biology**, v. 26, n. 16, p. 2188–2193, ago. 2016.
- STERKEL, M.; OLIVEIRA, P. L. Developmental roles of tyrosine metabolism enzymes in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1854, p. 20162607, 17 maio 2017.
- STOREY, K. B. Organic Solutes in Freezing Tolerance. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 117, n. 3, p. 319–326, jul. 1997.
- STOYANOVA, R.; BROWN, T. R. NMR spectral quantitation by principal component analysis. **NMR in Biomedicine**, v. 14, n. 4, p. 271–277, 12 jun. 2001.
- SYLVESTER, D.; KRASSNER, S. M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 55, n. 3, p. 443–447, jan. 1976.
- TAHORI, A. S.; HAZAN, A. Rearing of the black citrus aphid *Toxoptera aurantii* on chemically defined diets. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, n. 10, p. 1975–1981, out. 1970.
- TÉLLEZ-RENDÓN, J. et al. *Triatoma yelapensis* sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico, with a Key of *Triatoma* Species Recorded in Mexico. **Insects**, v. 14, n. 4, p. 331, 29 mar. 2023.
- TONELLI, R. R. et al. l-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 733–741, 4 maio 2004.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, maio 2001.
- ULRICH, E. L. et al. BioMagResBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database, p. D402–D408, 23 dez. 2007.

VAN WEELDEN, S. W. H. et al. New Functions for Parts of the Krebs Cycle in Procyclic *Trypanosoma brucei*, a Cycle Not Operating as a Cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12451–12460, abr. 2005.

VANDERZANT, E. S.; RICHARDSON, C. D. Nutrition of the adult boll weevil: Lipid requirements. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 2, p. 267–272, abr. 1964.

VAN HELLEMOND, J. J.; OPPERDOES, F. R.; TIELENS, A. G. M. The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 5, p. 967, 1 out. 2005.

VAVRICKA, C. J. et al. Tyrosine metabolic enzymes from insects and mammals: A comparative perspective. **Insect Science**, v. 21, n. 1, p. 13–19, 11 fev. 2014.

WATANABE, M. et al. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 18, p. 2799–2802, 15 set. 2002.

WHO. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**.

WISHART, D. S. et al. HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database, p. D521–D526, 3 jan. 2007.

WONG, A.; LUCAS-TORRES, C. NMR-based Metabolomics. Em: **NMR-based Metabolomics**. [s.l: s.n.]. p. 133–150.

ZELEDON, R. Comparative Physiological Studies on Four Species of Hemoflagellates in Culture. II. Effect of Carbohydrates and Related Substances and Some Amino Compounds on the Respiration. **The Journal of Parasitology**, v. 46, n. 5, p. 541, out. 1960.

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, 10 maio 2023.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, nov. 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, mar. 2012.

Apêndice

Capítulo publicado no livro “Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores”

Borsatto, K. C., Coronado, M. A., Arni, R. K., & Alevi, K. C. C. (2020). ATUALIDADES EM ENTOMETABOLÔMICA MÉDICA. In Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores (pp. 211–227). Stricto Sensu Editora. <https://doi.org/10.35170/ss.ed.9786586283129.12>

Artigo Publicado na revista The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Fator de Impacto 3,3

Borsatto, K. C., Coronado, M. A., Arni, R. K., & Cesar, C. A. K. (2021). Omics tools applied to the study of Chagas disease vectors: Cytogenomics and genomics. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 104(6). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1047>

Artigo Publicado na revista The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Fator de Impacto 3,3.

Borsatto, K. C., Coronado, M. A., Galvão, C., Arni, R. K., & Alevi, K. C. C. (2022). Transcriptomics Applied to the Study of Chagas Disease Vectors. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 106(4), 1042–1048. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0636>

Artigo aceito para publicação na revista The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Fator de Impacto 3,3, intitulado “Omics Tools Applied to the Study of Chagas Disease Vectors: Proteomics and Metabolomics” de autoria de Kelly Cristine Borsatto, Monika Aparecida Coronado, Cleber Galvão, Raghuvir Krishnaswamy Arni e Kaio Cesar Chaboli Alevi.

ATUALIDADES EM ENTOMETABOLÔMICA MÉDICA

Kelly Cristine Borsatto¹, Monika Aparecida Coronado^{1,2}, Raghuvir Krishnaswamy Arni¹, Kaio Cesar Chaboli Alevi³

1. Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil;
2. Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany;
3. Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil.

RESUMO

Metabolômica é a identificação e quantificação de todos os metabólitos (produtos intermediários ou finais do metabolismo) em uma amostra biológica. Essa ferramenta ômica é uma técnica relativamente nova que se expandiu rapidamente na última década, fornecendo uma nova abordagem ao estudo de sistemas biológicos. Na área da entomologia, a metabolômica tem sido usada basicamente para revelar informações bioquímicas que auxiliam na compreensão da fisiologia e do comportamento dos insetos. Já na entometabolômica médica, existem estudos associados apenas com os vetores de arboviroses, da malária e da doença de Chagas. Assim, realizamos uma mini-revisão sobre o panorama atual da aplicação da metabolômica no estudo desses insetos. A partir dos dados compilados, ficou evidente a importância da aplicação dessa técnica para a biologia dos vetores, uma vez que contribuiu significativamente para o conhecimento da fisiologia dos insetos.

Palavras-chave: Metabolômica, Vetores e Doenças neotrópicas.

ABSTRACT

Metabolomics is the identification and quantification of all metabolites (intermediate or final products of metabolism) in a biological sample. This omics tool is a relatively new technique that has expanded rapidly over the past decade, providing a new approach to the study of biological systems. In the area of entomology, metabolomics has been used basically to reveal biochemical information that helps in understanding the physiology and behavior of insects. In medical entometabolomics, there are studies associated only with vectors of arboviruses, malaria and Chagas disease. Thus, we conducted a mini-review on the current panorama of the application of metabolomics in the study of these insects. From the

compiled data, it became evident the importance of applying this technique to the biology of vectors, since it contributed significantly to the knowledge of the physiology of insects.

Keywords: Metabolomics, Vectors and Neotropical diseases

1. INTRODUÇÃO

A metabolômica é o estudo de processos bioquímicos envolvendo metabólitos – que são pequenos produtos do metabolismo celular, ou seja, são considerados como o resultado da interação do genoma do sistema com o ambiente e não apenas o produto final da expressão gênica (ROCHFORD, 2005) – em um sistema (célula, tecido ou organismo) sob um determinado conjunto de condições (GOODACRE et al., 2005). Essa ferramenta foi desenvolvida com base nos perfis iniciais de estudos dos metabólitos (metaboloma) e, em conjunto com outras ferramentas “ômicas”, a saber, genômica, transcriptômica e proteômica, permite a compreensão da biologia de sistemas globais (SCHMIDT, 2004).

Existem buscas constantes por estratégias terapêuticas inovadoras, sendo a metabolômica considerada como uma importante ferramenta, pois é uma técnica moderna que se expandiu rapidamente na última década, fornecendo uma nova abordagem ao estudo de sistemas biológicos (DETTMER; HAMMOCK, 2004; CANUTO et al., 2015; MARKLEY et al., 2017). No campo da entomologia, as técnicas metabolômicas têm sido usadas basicamente para revelar informações bioquímicas que auxiliam na compreensão da fisiologia e do comportamento dos insetos (SNART; HARDY; BARRETT, 2015).

Embora exista uma quantidade crescente de dados disponíveis em relação à regulação gênica, transcriptômica e proteômica em modelos de insetos, informações associadas à entometabolômica permanecem baixas (menor que 50 manuscritos), sendo a maioria deles associados com *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (SNART; HARDY; BARRETT, 2015). No campo da entometabolômica médica, existem estudos associados apenas com os vetores de arboviroses (RIVIEIRA-PEREZ et al., 2014), da malária (CHAMPION et al., 2017) e da doença de Chagas (ANTUNES et al., 2013).

Com base no exposto, realizamos uma mini revisão sobre o panorama atual da aplicação da metabolômica no estudo dos insetos vetores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MALÁRIA

A malária é uma infecção causada por protozoários do gênero *Plasmodium* transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (WHO, 2020). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2018, por exemplo, havia 228 milhões de casos de malária no mundo e uma estimativa de 405 mil mortes por complicações associadas à doença (WHO, 2020). No Brasil, a maioria dos casos de malária se concentra nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Nas demais regiões, existem poucas notificações, entretanto a doença não pode ser negligenciada, uma vez que nas regiões endêmicas a taxa de letalidade é elevada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). A compreensão da biologia e competência vetorial desses insetos pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de intervenção para o controle da malária (CHAMPION et al., 2017)

No campo da metabolômica são poucos os estudos com os vetores dessa doença de clima neotropical. Um estudo realizado no ano de 2014 analisou os fenótipos metabolômicos expressos por três colônias de mosquitos vetores da malária das savanas tropicais da África Ocidental, a saber, *A. gambiae* Giles, 1902, *A. arabiensis* Theobald, 1913 e as formas moleculares M e S de *A. gambiae*, em condições de estação seca e chuvosa (MAMAI et al., 2014.), pois ajustes metabólicos divergentes podem refletir em diferentes níveis de resistência a seca (GRAY; BRADLEY, 2005; LEHMANN et al., 2010; ADAMOU et al., 2011). Nas fêmeas criadas em estação seca, aminoácidos como: glicina, leucina, fenilalanina, serina, treonina e valina (comumente associados ao processo de esclerotização da cutícula em inseto) foram encontrados em concentrações elevadas nos mosquitos que acabaram de nascer e, com 24 horas de vida, seus níveis diminuíram (MAMAI et al., 2014). Essa remodelação no metabolismo dos insetos pode ser um reflexo da atividade metabólica envolvida na modulação da estrutura da cutícula, bem como do comportamento, que contribuem para maior sobrevivência do adulto (MAMAI et al., 2014). Ainda na condição de seca, a quantidade de alanina e prolina (aminoácidos importantes no fornecimento de energia para os músculos de voo) foram medidas em machos e fêmeas, e foram encontrados em quantidades mais elevadas nos insetos com 24 horas de vida (sem

divergências entre os sexos) (MAMAI et al., 2014). Nas amostras com uma hora de vida pós-eclosão as quantidades eram baixas, pois a atividade de voo ainda não havia sido iniciada (MAMAI et al., 2014). Assim, o acúmulo de prolina e alanina nos mosquitos com 24 horas de vida foi relacionado com a preparação das atividades de voo para esses insetos vetores (MAMAI et al., 2014).

Polióis e açúcares podem se acumular em espécies de insetos expostas a condições de estresse ambiental (YANCEY et al., 1982; KOŠT'ÁL; ŠLACHTA; ŠIMEK, 2001; RENAULT; HERVANT; VERNON, 2002; WATANABE, 2006; YODER et al., 2006; MICHAUD; DENLINGER, 2007). Esses polióis podem ser convertidos em outros compostos (HENDRIX; SALVUCCI, 1998; HAHN; DENLINGER, 2007), como estoques de glicose na forma de glicogênio (durante o estresse por dessecação, o glicogênio serve como combustível metabólico) (CHINO, 1958; ADEDOKUN; DENLINGER, 1985; STOREY; STOREY, 1986; ROBERTSON; MARGARIDA, 2004). Glicerol, inositol, trealose e xilitol também foram medidos em machos e fêmeas de *A. arabiensis* e nas formas M e S de *A. gambiae* expostos às condições de seca, em alguns casos apresentando redução ou não apresentaram alterações na sua composição (MAMAI et al., 2014). Os autores sugerem que a diminuição seja resultado da conversão dos compostos em glicogênio e que esses metabólitos não desempenham papel protetor direto contra a desidratação corporal (MAMAI et al., 2014).

As principais diferenças no fenótipo metabólico entre fêmeas em condições de estação seca e chuvosa foram relacionadas aos compostos do ciclo do ácido tricarboxílico (MAMAI et al., 2014). Ácido fumárico, ácido málico e ácido succínico foram encontrados em maior abundância nas fêmeas adultas das três colônias de mosquitos criadas em estação chuvosa, o que pode significar atividade metabólica mais elevada nas fêmeas mantidas nessas condições (MAMAI et al., 2014). Além disso, o aminoácido isoleucina – reduzido em fêmeas na estação seca – também foi importante para realizar a separação das fêmeas criadas em diferentes condições. (MAMAI et al., 2014). Para os machos, esse metabólito não teve significância estatística, o que não permitiu a separação em grupos (MAMAI et al., 2014).

Os níveis de ecdisteróides também foram quantificados: os machos exibiram níveis muito mais elevados do que as fêmeas que apresentaram as quantidades de ecdisteróides abaixo do limite de detecção (MAMAI et al., 2014). Além disso, os resultados obtidos sugerem um papel único para beta ecdisterona como alo-hormônio associado com o comportamento reprodutivo de *A. gambiae*, mostrando que desempenha um importante

papel nas glândulas acessórias masculinas (MAMAI et al., 2014). Embora não tenha sido observada diferença nos níveis de ecdisteróides entre os machos de *A. gambiae* em estação chuvosa e seca, os machos de *A. arabiensis* e as forma M e S de *A. gambiae* apresentaram conteúdo ecdisteróide significativamente maior quando criados em estação chuvosa (MAMAI et al., 2014). Essas diferenças demonstram que a dinâmica populacional do mosquito e de suas estratégias reprodutivas podem ser maiores e mais eficientes durante a estação chuvosa (MAMAI et al., 2014).

Em um estudo usando metabolômica não direcionada, Champion et al. (2017), examinou os metabólitos intestinais de *A. gambiae* alimentados com açúcar, sangue e *P. falciparum*. Os autores fizeram um levantamento dos perfis metabólicos do intestino desse vetor em resposta a diferentes tipos de dietas e à infecção pelo agente etiológico da malária. O conjunto de dados elaborado por Champion et al. (2017) teve como objetivo fornecer uma referência metabólica para que estudos posteriores, utilizando outras técnicas, estabeleçam relações com a fisiologia e as interações do inseto.

Na Austrália, foi relatada uma simpatria entre os mosquitos do gênero *Anopheles* e a endemicidade da Úlcera Buruli (doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium ulcerans*), na qual o DNA de *M. ulcerans* foi detectado em mosquitos capturados em regiões endêmicas, mas não encontrado em mosquitos capturados em regiões não endêmicas (JOHNSON et al., 2007; LAVENDER et al., 2011). Diante disso, Hoxmeier et al., (2015) examinaram a interação entre *A. gambiae* e *M. ulcerans*. As larvas dos insetos foram colocadas para se desenvolverem em três ambientes diferentes: um contendo bactérias *M. ulcerans* vivas, outro contendo bactérias mortas e outro sem a presença da bactéria. A grande maioria dos compostos identificados com acúmulo significativamente diferente entre os tratamentos realizados pertencem ao metabolismo lipídico (HOXMEIER et al., 2015). Em *A. gambiae* contaminada, observou-se que as moléculas de diacil-glicerofosfocolina (PC) aumentaram em abundância nos grupos expostos a *M. ulcerans* vivos, enquanto acúmulo de compostos liso-fosfatidilcolina (LysoPC) ocorreu principalmente nos mosquitos expostos a *M. ulcerans* mortos (HOXMEIER et al., 2015). Essa descoberta sugere que (i) a hidrólise do PC foi interrompida, (ii) que os mosquitos expostos às bactérias vivas aumentam sua atividade bioquímica associada à metabolização desse composto ou (iii) que esses vetores exibem vias de síntese alternativas interrompidas em comparação com os grupos controle (HOXMEIER et al., 2015).

Os triacilglicerídeos (TG) podem ser clivados para liberar ácidos graxos como fonte de energia, pois são os principais componentes do armazenamento de lipídios dos

mosquitos (ATELLA; SHAHABUDDIN, 2002). As análises realizadas por Hoxmeier et al., (2015) demonstraram que o TG teve um aumento significativo nos mosquitos expostos a *M. ulcerans* vivos e apresentou menor abundância nos mosquitos expostos a *M. ulcerans* mortos, quando comparados aos mosquitos do grupo controle. A perturbação do metabolismo de lipídeos do hospedeiro é uma característica já definida de muitas infecções por micobactérias e alguns patógenos intra e extracelulares (RAYNAUD et al., 2002). Considerando que desenvolvimento de *P. falciparum* em mosquitos infectados também envolve perturbação do metabolismo de lipídeos nos insetos (VLACHOU et al., 2005), os resultados de Hoxmeier et al. (2015) são consistentes com os mecanismos empregados por outros patógenos para a sobrevivência no mosquito.

Os eicosanoides são potentes moléculas sinalizadoras envolvidas na inflamação, imunidade e sistema nervoso dos invertebrados (STANLEY, 2006). A inibição da síntese dessa molécula no hospedeiro é um mecanismo utilizado por bactérias que afetam insetos durante a infecção e durante o desenvolvimento de protozoários em *Anopheles* (HWANG et al., 2013). Hoxmeier et al. (2015) observaram que os mosquitos tratados com *M. ulcerans* apresentaram menor abundância de eicosanoides e puderam inferir que a modulação da sinalização de eicosanóides por patógenos de invertebrados facilita a sobrevivência desses invasores.

Além dos compostos identificados que estavam relacionados ao metabolismo de lipídeos, outros dois compostos foram caracterizados: o 8-10-dodecadienol e a riboflavina (HOXMEIER et al., 2015). No entanto, a análise aprofundada deles não foi possível devido a falta de informações disponíveis sobre a dinâmica dessas moléculas em *Anopheles*. O 8-10-dodecadienol apresentou redução significativa em mosquitos expostos a *M. ulcerans* vivos e mortos quando comparado aos grupos controle (HOXMEIER et al., 2015). Os autores sugerem que isso pode indicar uma nova atividade desse composto em mosquitos que pode ser afetada pela contaminação bacteriana.

A riboflavina, também conhecida como B2 é essencial em quase todos os organismos procarióticos e eucarióticos, servindo como precursor para a síntese de coenzimas e transporte de elétrons (ABBAS, SIBIRNY, 2011), que também está envolvida em áreas de pigmentação amarela no mosquito, como nos olhos e nos túbulos malpighianos (NICKLA, 1972). Essa molécula foi identificada em níveis significativamente aumentados para os mosquitos expostos a *M. ulcerans* vivos em comparação com os do grupo controle e do grupo exposto a *M. ulcerans* mortos (HOXMEIER et al., 2015). Os autores sugerem que o acúmulo desse composto no modelo analisado pode ser devido a

uma superprodução da molécula contaminando bacilos ou a um mecanismo de resposta do mosquito devido à colonização por *M. ulcerans*.

2.2 ARBOVIROSES

Arbovírus são vírus transmitidos aos seres humanos e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). As arboviroses (doenças causadas por arbovirus) são de grande importância para a saúde pública, pois representam ameaças para as regiões tropicais devido às rápidas mudanças climáticas, ao desmatamento, as migrações populacionais, as ocupações desordenadas de áreas urbanas, bem como as precariedades das condições sanitárias, que são fatores que favorecem a amplificação da transmissão viral (RUST, 2012). No campo da entometabolômica os estudos para os vetores de arbovírus são mais voltados para os mosquitos do gênero *Aedes*, com ênfase em *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) e *A. albopictus* (Skuse, 1894) que são responsáveis pela transmissão de diferentes arbovírus em todo o mundo, como a dengue, zika, chikungunya e febre amarela (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016; WHO, 2020).

Muitos insetos desenvolveram um mecanismo para sincronizar seus ciclos de vida com períodos de variação sazonal – mecanismo denominado como diapausa [parada de desenvolvimento controlada por hormônios que se inicia antes das modificações do habitat (LEES, 1956; DENLINGER; YOCUM; RINEHART, 2012)] – (TAUBER; TAUBER; MASAKI, 1986; DANKS, 1987). *A. albopictus*, por exemplo, é um inseto modelo para o estudo da diapausa embrionária (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014, DENLINGER; ARMBRUSTER, 2016), pois as populações desse vetor associadas a regiões temperadas sofrem diapausa embrionária facultativa modulada pelo fotoperíodo (HAWLEY, 1988). Sob fotoperíodos de dias longos, as fêmeas produzem ovos que completam o desenvolvimento embrionário e que respondem rapidamente aos estímulos de eclosão. Já em fotoperíodos de dias curtos, as fêmeas produzem ovos que completam o desenvolvimento embrionário, mas passam por um período controlado geneticamente em que não respondem a estímulos de eclosão (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014).

Em 2018, Batz e Armbruster (2018) estudaram o metaboloma da diapausa embrionária em ovos de *A. albopictus* com uso de metabolômica não direcionada. Os autores observaram que o perfil geral do metaboloma era diferente entre ovos de diapausa e não diapausa. A quantidade de diversos metabolitos relacionados ao metabolismo de

lipídios foi alterada em diapausa, o que é consistente com a diminuição do catabolismo de lipídios e com o aumento de armazenamento de lipídios (BATZ; ARMBRUSTER, 2018). As fosfatidilcolinas são componentes importantes das membranas plasmáticas e, além disso, compõe parte da superfície das gotículas lipídicas (POL; GROSS; PARTON, 2014), que são o principal reservatório intracelular de lipídios como os triacilglicerídeos (SUZUKI et al., 2011) e desempenham papel importante no armazenamento de energia para insetos em diapausa (ARRESE; SOULAGES, 2010). Altos níveis de triacilglicerídeos ativam a via Kennedy, que produz fosfatidilcolina de superfície e permite a formação de gotículas lipídicas menores (BATZ; ARMBRUSTER, 2018). Nas análises do metaboloma de *A. albopictus*, os autores identificaram dois genes que codificam enzimas da via Kennedy e que são regulados negativamente durante a preparação para a diapausa (BATZ; ARMBRUSTER, 2018). Esses dados corroboram os achados de abundância reduzida de fosfatidilcolina e da produção de gotículas lipídicas maiores em *Aedes* (REYNOLDS et al., 2012; POELCHAU et al., 2013) e sugerem que ajustes na via de Kennedy podem desempenhar papel importante da supressão da lipólise em *A. albopictus* durante a diapausa.

Durante a diapausa, Batz e Armbruster (2018) observaram que duas catecolaminas, dopamina e octopamina, apresentam-se em quantidades significativamente menos abundantes. Além disso, os autores constataram que a via do metabolismo da tirosina que apresenta essas moléculas e a subvia de biossíntese da catecolamina (contida na via do metabolismo da tirosina) foram alteradas em diapausa. Esses metabólitos podem atuar como neuromoduladores que regulam a atividade hormonal dos insetos (GILBERT; GRANGER; ROE, 2000). Devido à falta de um mecanismo hormonal bem estabelecido para a diapausa de *A. albopictus* (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2016), é difícil prever como a repressão das catecolaminas e as alterações nas vias associadas podem contribuir para a regulação da diapausa nessa espécie (BATZ; ARMBRUSTER, 2018).

A oleoilglicina foi outro metabólito relevante identificado por Batz e Armbruster (2018) com menor abundância nos ovos em diapausa. Os autores sinalizam que esse metabólito é um aminoácido que não foi estudado em insetos e está envolvido com muitos componentes da via de sinalização da insulina. Como essa é uma via muito conservada em insetos e mamíferos (CLAEYS et al., 2002), os autores destacam que uma redução significativa desse metabólito na diapausa dos ovos de *A. albopictus* pode aumentar a atividade do fator de transcrição *forkhead*, como resultado da reduzida fosforilação mediada pela insulina. Além disso, Batz e Armbruster (2018) apontam que a ativação desse fator de

transcrição deve resultar em maior acúmulo de gordura e maior resistência ao estresse oxidativo.

Em *A. aegypti*, grande parte dos aminoácidos derivados das proteínas da alimentação de sangue é oxidada gerando amônia (BRIEGEL, 1986; ZHOU et al., 2004). A amônia é tóxica para os tecidos animais e pode ser excretada na forma de ureia ou ácido úrico (ZDOBNOV et al., 2002). Apesar dos mosquitos serem capazes de produzir ureia, eles não são capazes de excretar a amônia dessa forma porque esses insetos não possuem as enzimas necessárias para realizar o ciclo completo da ureia (ZDOBNOV et al., 2002). Em 2003, Goldstrohm, Pennington e Wells (2003) propuseram a existência de um ciclo de prolina em *A. aegypti* que permite o armazenamento temporário de amônia em uma forma não tóxica (GOLDSTROHM; PENNINGTON; WELLS, 2003).

Scaraffia et al. (2005) apresentaram evidências de que a glutamina e a prolina servem como vias de consumo de nitrogênio que contribuem para a desintoxicação de amônia em fêmeas de *A. aegypti*. Os autores observaram que, após uma refeição de sangue, ocorre um aumento na expressão e atividade do RNA mensageiro (RNAm) de algumas enzimas-chave que estão envolvidas no metabolismo da amônia e estão presentes no corpo adiposo e sugeriram que esse é o principal tecido envolvido na desintoxicação de amônia. Ao alimentar os mosquitos com cloreto de amônio, Scaraffia et al. (2005) observaram que os níveis de prolina e glutamina aumentavam, indicando que parte da amônia é armazenada e removida do corpo através da síntese destes aminoácidos.

A presença de ácido úrico, ureia e a amônia foi relatada nas fezes de fêmeas de *A. aegypti* após uma refeição de sangue (BRIEGEL, 1986; VON DUNGERN; BRIEGEL, 2001). Como não há um ciclo de ureia funcional em mosquitos devido à falta de algumas enzimas (BRIEGEL, 1986; VON DUNGERN; BRIEGEL, 2001), a pequena quantidade de ureia observada nas fezes após a alimentação com cloreto de amônio, provavelmente decorre do metabolismo da arginina (SCARAFFIA et al., 2005).

Na presença de um inibidor da síntese de glutamina, a concentração desse aminoácido diminuiu na hemolinfa de *A. aegypti* fêmeas (SCARAFFIA et al., 2005). Entretanto, a fim de lidar com o excesso de amônia, esses mosquitos foram capazes de produzir uma grande quantidade de prolina (SCARAFFIA et al., 2005), destacando, assim, a importância da prolina como reservatório de nitrogênio na desintoxicação da amônia. Além disso, esses resultados suportam a existência de um ciclo de prolina e concluem que uma alta concentração de amônia leva a um aumento na concentração de glutamina e

prolina em fêmeas de *A. aegypti* (GOLDSTROHM; PENNINGTON; WELLS, 2003; SCARAFFIA et al., 2005). A conversão do excesso de amônia nesses aminoácidos permite que os mosquitos armazenem a amônia tóxica em uma forma neutra até que os mesmos possam ser utilizados em outras vias (SCARAFFIA et al., 2005).

A produção de ureia em insetos foi atribuída à arginase, enzima responsável por catalisar a hidrólise da arginina, formando ureia e ornitina (SCARAFFIA et al., 2008). Scaraffia e colaboradores (2008) mostraram que mosquitos da espécie *A. aegypti* produzem ureia através de duas vias metabólicas diferentes, sendo que uma das vias envolve a ação da arginase e a outra ocorre por meio da via uricolítica. No primeiro caso, a ausência do gene da ornitina carbamoil-transferase (ZDOBNOV, 2002) demonstra que a única fonte de arginina disponível para a produção de ureia pela arginase é proveniente de fontes alimentares ou de renovação de proteínas endógenas. No segundo caso, a ureia é derivada da degradação do ácido úrico, que é um reservatório do excesso de amônia produzida durante o repasto sanguíneo (SCARAFFIA et al., 2008). Os autores apontam que a operação coordenada de ambas as vias pode ser um dos processos essenciais que garante a sobrevivência dos mosquitos hematófagos.

Em 2006, Scaraffia e colaboradores (2006) desenvolveram um protocolo para estudar a cinética de incorporação de nitrogênio (^{15}N) na glutamina, no ácido glutâmico, na alanina e na prolina de fêmeas de *A. aegypti*. Os dados obtidos confirmaram que as fêmeas de *A. aegypti* possuem uma grande capacidade de lidar com a amônia em seu organismo, principalmente através de vias metabólicas de síntese de glutamina e prolina (SCARAFFIA et al., 2006). Adicionando inibidores de enzimas-chave relacionadas ao metabolismo da amônia, os autores conseguiram confirmar que os mosquitos metabolizam a amônia de forma eficiente por uma via metabólica que envolve duas enzimas essenciais, a saber, glutamina sintetase e glutamato sintase. Nos insetos estudados, a via metabólica em questão participa da fixação e assimilação da amônia. Além disso, essa via é responsável por produzir o precursor da síntese de prolina, que é o principal aminoácido encontrado na hemolinfa dos mosquitos (SCARAFFIA et al., 2006).

Um sistema de cultura de tecidos *in vitro* e 15 compostos N-rotulados foi utilizado para mostrar que o corpo gorduroso e os tecidos do intestino médio de *A. aegypti* podem metabolizar eficientemente até 1 mM de NH_4Cl utilizando diferentes vias metabólicas (SCARAFFIA et al., 2010). O estudo realizado por Scaraffia e colaboradores (2010) mostrou que a presença de uma via glutamina sintetase/ glutamato sintase (GS/GltS), funcional no corpo adiposo, desempenha um papel singular no metabolismo da amônia em fêmeas de *A.*

aegypti, e que o intestino médio dos mosquitos também responde com eficiência a altos níveis de amônia através de reações catalisadas por GS. No intestino médio do mosquito, glutamina e a alanina foram detectadas (SCARAFFIA et al., 2010). Esses compostos foram sintetizados através de reações catalisadas por GS, glutamato desidrogenase (GDH) e alanina aminotransferase (ALAT) (SCARAFFIA et al., 2010). GltS não foi detectada no intestino do vetor, o que confirmou que nenhuma via GS/GltS é funcional neste tecido (SCARAFFIA et al., 2010). A ausência dessa via indica que este tecido pode metabolizar eficientemente a amônia usando outras vias metabólicas, além de desempenhar um papel fundamental durante a digestão sanguínea, removendo os níveis tóxicos de amônia por meio da síntese de aminoácidos específicos, que podem ser imediatamente liberados na hemolinfa por diversos destinos metabólicos (SCARAFFIA et al., 2010).

2.3 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), distribuída em 21 países da América Latina (CHAGAS, 1909; WHO, 2020). A transmissão pode ocorrer por via oral (pelo consumo de alimentos contaminados com o parasita), por transfusão de sangue de doadores infectados, congênita (transplacentária ou ao amamentar), por transplantes de órgãos de doadores chagásicos e até por acidentes de laboratório (VINHAES; DIAS, 2010; DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011; CARTER et al., 2012). No entanto, apesar dessas formas não vetoriais, o principal modo de transmissão do *T. cruzi* é por meio das fezes dos triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) infectados com o parasita, uma vez que esses insetos hematófagos têm o hábito de defecar durante o repasto sanguíneo (WHO, 2020).

Na subfamília Triatominae, os estudos metabolômicos são restritos à análise do metaboloma fecal de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859, *Triatoma infestans* Klug, 1835 e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (ANTUNES et al., 2013). Os autores estudaram o metaboloma fecal dessas três espécies e observaram que o núcleo uniforme (metabólitos conservados entre as três espécies que representava 78% dos metabólitos encontrados), era composto de metabólitos de várias categorias, incluindo ácidos graxos, esteróides, glicerolídeos, nucleotídeos, açúcares e outros. Por outro lado, o núcleo variável (metabólitos não conservados entre as três espécies que representou 22% dos metabólitos) foi composto principalmente de lipídios prenol, aminoácidos, glicerolídeos, esteróides,

fenóis, ácidos graxos e derivados, ácido benzóico e derivados, flavonóides, glicerofosfolípidos, benzopiranos e quinolinas (ANTUNES et al., 2013).

Além de descrever os metabólitos identificados e comparar as espécies estudadas, Antunes et al. (2013) correlacionaram os metabólitos encontrados nas fezes com a presença de *T. cruzi* e a interação parasita-vetor e destacam que as fezes dos triatomíneos apresentam uma variedade de moléculas químicas, que podem afetar seu desenvolvimento e infecciosidade. Os autores sugeriram que a competência vetorial desse inseto está relacionada à complexidade do metaboloma fecal de triatomíneos. Além dos efeitos dos metabólitos descritos como determinantes primários para a relação entre parasita e hospedeiro, a variação desses metabólitos tem o potencial de realizar efeitos sinérgicos ou antagonistas; no entanto, as proporções podem variar de acordo com o inseto/hospedeiro e são importantes para a relação parasita-vetor (ANTUNES et al., 2013).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no exposto, fica evidente a importância dos estudos metabolômicos para a biologia dos vetores, uma vez que contribuiu significativamente para o conhecimento da fisiologia dos insetos. Além disso, ressalta a necessidade da aplicação dessa ferramenta ômica no estudo dos vetores associados com estas e/ou outras doenças negligenciadas.

4. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido na forma de bolsa de Doutorado Direto (Processo FAPESP nº 2018/25458-3).

5. REFERÊNCIAS

ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 321-360, 2011.

ADAMOU, A.; DAO, A.; TIMBINE, S.; KASSOGUÉ, Y.; DIALLO, M.; TRAORÉ, S. F.; HUESTIS, D. L.; LEHMANN, T. The contribution of aestivating mosquitoes to the persistence of *Anopheles gambiae* in the Sahel. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 151, 2011.

- ADEDOKUN, T. A.; DENLINGER, D. L. Metabolic reserves associated with pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 31, n. 3, p. 229-233, 1985.
- ANTUNES, L. C. M.; HAN, J.; PAN, J.; MOREIRA, C. J.; AZAMBUJA, P.; BORCHERS, C. H.; CARELS, N. Metabolic signatures of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* unveiled by metabolomics. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.
- ATELLA, G. C.; SHAHABUDDIN, M. Differential partitioning of maternal fatty acid and phospholipid in neonate mosquito larvae. **Journal of experimental biology**, v. 205, n. 23, p. 3623-3630, 2002.
- BATZ, Z. A.; ARMBRUSTER, P. A. Diapause-associated changes in the lipid and metabolite profiles of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 24, 2018.
- BRADSHAW, W. E.; ZANI, P. A.; HOLZAPFEL, C. M. Adaptation to temperate climates. **Evolution**, v. 58, n. 8, p. 1748-1762, 2004.
- BRIEGEL, H. Protein catabolism and nitrogen partitioning during oögenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of insect physiology**, v. 32, n. 5, p. 455-462, 1986.
- CANUTO, G.A., DA CRUZ, P.L., FACCIO, A.T., KLASSEN, A., TAVARES, M.F. Neglected diseases prioritized in Brazil under the perspective of metabolomics: A review. **Electrophoresis**, v.36, n.18, p.2336-2347, 2015.
- CARTER, Y. L.; JULIANO, J. J.; MONTGOMERY, S. P.; QVARNSTROM, Y. Acute Chagas disease in a returning traveler. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 6, p. 1038-1040, 2012.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- CHAMPION, C. J.; KUKUTLA, P.; GLENNON, E. K.; WANG, B.; LUCKHART, S.; XU, J. *Anopheles gambiae*: metabolomic profiles in sugar-fed, blood-fed, and *Plasmodium falciparum*-infected midgut. **Dataset Papers in Science**, v. 2017, 2017.
- CHINO, H. Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*—II: conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. **Journal of Insect Physiology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 1958.
- CLAEYS, I.; SIMONET, G.; POELS, J.; VAN LOY, T.; VERCAMMEN, L.; DE LOOF, A.; BROECK, J. V. Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. **Peptides**, v. 23, n. 4, p. 807-816, 2002.
- DANKS, H. V. **Insect Dormancy: An Ecological Perspective**. Ottawa (Canada): Biological Survey of Canada, 1987.
- DENLINGER, D. L.; ARMBRUSTER, P. A. Molecular physiology of mosquito diapause. **Advances in Insect Physiology**, v. 51, p. 329-361, 2016.

- DENLINGER, D. L.; ARMBRUSTER, P. A. Mosquito diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 59, p. 73-93, 2014.
- DENLINGER, D. L.; YOCUM, G. D.; RINEHART, J. P. Hormonal control of diapause. In: **Insect endocrinology**. Academic Press, p. 430-463, 2012.
- DETTMER, K.; HAMMOCK, B.D. Metabolomics a new exciting field within the "omics" sciences. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 7, p. A396, 2004.
- DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. D. A. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 375-379, 2011.
- GILBERT, L. I.; GRANGER, N. A.; ROE, R. M. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 8-9, p. 617-644, 2000.
- GOLDSTROHM, D. A.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 2, p. 115-121, 2003.
- GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W. B.; HARRIGAN, G. G.; KELL, D. B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 245-252, 2004.
- GRAY, E. M.; BRADLEY, T. J. Physiology of desiccation resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 73, n. 3, p. 553-559, 2005.
- HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. **Journal of insect physiology**, v. 53, n. 8, p. 760-773, 2007.
- HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement**, v. 1, p. 1-39, 1988.
- HENDRIX, D. L.; SALVUCCI, M. E. Polyol metabolism in homopterans at high temperatures: accumulation of mannitol in aphids (Aphididae: Homoptera) and sorbitol in whiteflies (Aleyrodidae: Homoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 120, n. 3, p. 487-494, 1998.
- HOXMEIER, J. C.; THOMPSON, B. D.; BROECKLING, C. D.; SMALL, P.; FOY, B. D.; PRENNI, J.; DOBOS, K. M. Analysis of the metabolome of *Anopheles gambiae* mosquito after exposure to *Mycobacterium ulcerans*. **Scientific reports**, v. 5, p. 9242, 2015.
- HWANG, J.; PARK, Y.; KIM, Y.; HWANG, J.; LEE, D. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, suppresses expression of antimicrobial peptides controlled by Toll and Imd pathways by blocking eicosanoid biosynthesis. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 83, n. 3, p. 151-169, 2013.
- JOHNSON, P. D.; AZUOLAS, J.; LAVENDER, C. J.; WISHART, E.; STINEAR, T. P.; HAYMAN, J. A.; BROWN, L.; JENKIN, G. A.; FYFE, J. A. *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 11, p. 1653, 2007.

KOŠT'ÁL, V.; ŠLACHTA, M.; ŠIMEK, P. Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 130, n. 3, p. 365-374, 2001.

LAVENDER, C. J.; FYFE, J. A.; AZUOLAS, J.; BROWN, K.; EVANS, R. N.; RAY, L. R.; JOHNSON, P. D. Risk of Buruli ulcer and detection of *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes in southeastern Australia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, 2011.

LEES, A. D. The physiology and biochemistry of diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 1956.

LEHMANN, T.; DAO, A.; ADAMOU, A.; KASSOGUE, Y.; DIALLO, M.; SÉKOU, T.; COSCARON-ARIAS, C. Aestivation of the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* in the Sahel. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 601-606, 2010.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil/Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazonica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

MAMAI, W.; MOULINE, K.; BLAIS, C.; LARVOR, V.; DABIRÉ, K. R.; OUEDRAOGO, G. A.; SIMARD F.; RENAULT, D. Metabolomic and ecdysteroid variations in *Anopheles gambiae* sl mosquitoes exposed to the stressful conditions of the dry season in Burkina Faso, West Africa. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 87, n. 3, p. 486-497, 2014.

MARKLEY, J. L., BRÜSCHWEILER, R., EDISON, A. S., EGHBALNIA, H. R., POWERS, R., RAFTERY, D., WISHART, D. S. The future of NMR-based metabolomics. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 43, p.34-40, 2017.

MICHAUD, M. R.; DENLINGER, D. L. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 177, n. 7, p. 753-763, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>> acesso em 13/04/2020.

NICKLA, H. Interaction between pteridine synthesis and riboflavin accumulation in *Drosophila melanogaster*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 14, n. 1, p. 105-111, 1972.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and chikungunya: emerging arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671, 2016.

POELCHAU, M. F.; REYNOLDS, J. A.; ELSIK, C. G.; DENLINGER, D. L.; ARMBRUSTER, P. A. RNA-Seq reveals early distinctions and late convergence of gene expression between diapause and quiescence in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 21, p. 4082-4090, 2013.

POL, A.; GROSS, S. P.; PARTON, R. G. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. **Journal of Cell Biology**, v. 204, n. 5, p. 635-646, 2014.

RAYNAUD, C.; GUILHOT, C.; RAUZIER, J.; BORDAT, Y.; PELICIC, V.; MANGANELLI, R.; SMITH, I.; GICQUEL, B.; JACKSON, M. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular microbiology**, v. 45, n. 1, p. 203-217, 2002.

RENAULT, D.; HERVANT, F.; VERNON, P. Comparative study of the metabolic responses during food shortage and subsequent recovery at different temperatures in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Physiological Entomology**, v. 27, n. 4, p. 291-301, 2002.

REYNOLDS, J. A.; POELCHAU, M. F.; RAHMAN, Z.; ARMBRUSTER, P. A.; DENLINGER, D. L. Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 7, p. 966-973, 2012.

RIVEIRA-PEREZ, C.; NOUZOVA, M.; LAMBOGLIA, I.; NORIEGA, F. G. Metabolic analysis reveals changes in the mevalonate and juvenile hormone synthesis pathways linked to the mosquito reproductive physiology. **Insect Biochemical and Molecular Biology**, v. 51, p. 1-9, 2014.

ROBERTSON, R. M.; MARGARIDA, M. **Methuselah flies: a case study in the evolution of aging**. World Scientific, 2004.

ROCHFORD, S. Metabolomics Reviewed: A New “Omics” Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1813-1820, 2005.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. In: **Seminars in pediatric neurology**, WB Saunders, p. 130-151, 2012.

SCARAFFIA, P. Y.; ISOE, J.; MURILLO, A.; WELLS, M. A. Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 5, p. 491-503, 2005.

SCARAFFIA, P. Y.; TAN, G.; ISOE, J.; WY SOCKI, V. H.; WELLS, M. A.; MIESFELD, R. L. Discovery of an alternate metabolic pathway for urea synthesis in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 2, p. 518-523, 2008.

SCARAFFIA, P. Y.; ZHANG, Q.; THORSON, K.; WY SOCKI, V. H.; MIESFELD, R. L. Differential ammonia metabolism in *Aedes aegypti* fat body and midgut tissues. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 9, p. 1040-1049, 2010.

SCARAFFIA, P. Y.; ZHANG, Q.; WY SOCKI, V. H.; ISOE, J.; WELLS, M. A. Analysis of whole-body ammonia metabolism in *Aedes aegypti* using [15N]-labeled compounds and mass spectrometry. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 8, p. 614-622, 2006.

SCHMIDT, C. Metabolomics Takes Its Place as Latest Up-and-Coming “Omic” Science. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, p. 732-734, 2004.

SNART, C. J. P.; HARDY, I. C. W.; BARRETT, D. A. Entometabolomics: applications of modern analytical techniques to insect studies. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v. 155, n. 1, p.1-17, 2015.

STANLEY, D. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 25-44, 2006.

STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Winter survival of the gall fly larva, *Eurosta solidaginis*: profiles of fuel reserves and cryoprotectants in a natural population. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, n. 6, p. 549-556, 1986.

SUZUKI, M.; SHINOHARA, Y.; OHSAKI, Y.; FUJIMOTO, T. Lipid droplets: size matters. **Journal of electron microscopy**, v. 60, n. suppl_1, p. S101-S116, 2011.

TAUBER, M. J.; TAUBER, C. A.; MASAKI, S. **Seasonal adaptations of insects**. Oxford University Press on Demand, 1986.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. S7-S12, 2000.

VLACHOU, D.; SCHLEGELMILCH, T.; CHRISTOPHIDES, G. K.; KAFATOS, F. C. Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in *Anopheles* during *Plasmodium* invasion. **Current Biology**, v. 15, n. 13, p. 1185-1195, 2005.

VON DUNGERN, P.; BRIEGEL, H. Enzymatic analysis of uricotelic protein catabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 1, p. 73-82, 2001a.

WATANABE, M. Anhydrobiosis in invertebrates. **Applied Entomology and Zoology**, v. 41, n. 1, p. 15-31, 2006.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>, acesso em 13/04/2020.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/malaria/en/>>, acesso em 13/04/2020.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/disease/en/>>, acesso em 13/04/2020.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 217, n. 4566, p. 1214-1222, 1982.

YODER, J. A.; BENOIT, J. B.; DENLINGER, D. L.; RIVERS, D. B. Stress-induced accumulation of glycerol in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*: evidence indicating anti-desiccant and cryoprotectant functions of this polyol and a role for the brain in coordinating the response. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 2, p. 202-214, 2006.

ZDOBNOV, E.M.; VON MERING, C.; LETUNIC, I.; TORRENTS, D.; SUYAMA, M.; COPLEY, R.R.; et al. Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 149-159, 2002.

ZHOU, G.; FLOWERS, M.; FRIEDRICH, K.; HORTON, J.; PENNINGTON, J.; WELLS, M. A. Metabolic fate of [14C]-labeled meal protein amino acids in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 4, p. 337-349, 2004.

Review Article

Omics Tools Applied to the Study of Chagas Disease Vectors: Cytogenomics and Genomics

Kelly Cristine Borsatto,^{1*} Monika Aparecida Coronado,¹ Raghuvir Krishnaswamy Arni,¹ and Chaboli Alevi Kaio Cesar²

¹Departamento de Física, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São José do Rio Preto, Brazil; ²Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Parasitologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara, Brazil

Abstract. Chagas disease is an illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* that is distributed in 21 countries of Latin America. The main way of transmission of *T. cruzi* is through the feces of triatomines infected with the parasite. With technological advances came new technologies called omics. In the pre-genomic era, the omics science was based on cytogenomic studies of triatomines. With the *Rhodnius prolixus* genome sequencing project, new omics tools were applied to understand the organism at a systemic level and not just from a genomic point of view. Thus, the present review aims to put together the cytogenomic and genomic information available in the literature for Chagas disease vectors. Here, we review all studies related to cytogenomics and genomics of Chagas disease vectors, contributing to the direction of further research with these insect vectors, because it was evident that most studies focus on cytogenomic knowledge of the species. Given the importance of genomic studies, which contributed to the knowledge of taxonomy, systematics, as well as the vector's biology, the need to apply these techniques in other genera and species of Triatominae subfamily is emphasized.

MINI-REVIEW

Chagas disease is an illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastea, Trypanosomatida) that is distributed in 21 countries of Latin America.¹ The transmission may occur orally (by the consumption of food contaminated with the parasite), by blood transfusion from infected donors, congenitally (transplacental or breast-feeding), by organ transplants from organs of chagasic donors, and even by laboratory accidents.² However, despite these nonvector forms, the main mode of transmission of *T. cruzi* is through the feces of triatomines (Hemiptera, Triatominae) infected with the parasite because these hematophagous insects have the habit of defecating during their blood repast.¹

The Triatominae subfamily is composed of 154 species distributed in 18 genera and five tribes.³ The *Triatoma* Laporte, 1832, *Rhodnius* Stål, 1859, and *Panstrongylus* Berg, 1879 genera are the most important from the epidemiological point of view.³ As Chagas disease has no cure in the chronic phase and the acute phase is usually asymptomatic, the WHO points out that vector control is considered as the main measure to reduce the incidence of this neglected disease.¹

With technological advances came new technologies called omics.⁴ In the pre-genomic era, the omics science was based on cytogenomic studies of triatomines.⁵ With the *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 genome sequencing project,⁶ new omics tools were applied to understand the organism at a systemic level and not just from a genomic point of view. Thus, the present review aims to put together the cytogenomic and genomic information available in the literature for Chagas disease vectors.

Cytogenomics. The application of cytogenomics in the study of triatomines began in 2005 with the study of the physical mapping of chromosomes, with emphasis on the number and arrangement of the 45S ribosomal DNA (rDNA) probe (which characterizes nucleolus organizing regions [NORs]) by the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique.⁷ Currently, the distribution of NORs is known for more than 50 species of triatomines that allow to clarify systematic, taxonomic, and evolutionary issues (Table 1).^{5,7–14} The NORs have been described in the X chromosome, in the X and Y chromosomes, in one autosomal pair, two autosomal pairs, in the X chromosome plus one autosomal pair, in two autosomal pairs plus X chromosome, or two autosomal pairs (with one heterozygote) plus X chromosome (Table 1).

In the Rhodniini tribe, the location of the rDNA clusters was restricted to sex chromosomes with two patterns: either on one (X chromosome) or both sex chromosomes (X and Y chromosomes).^{5,12} The cytogenomic characterization of the Rhodniini tribe species made it possible to suggest that three evolutionary events may have happened during the chromosomal evolution of this tribe, namely, ectopic recombination and/or rDNA transposition (if the ancestor is marked only on sex X chromosomes) or loss of rDNA loci on the Y chromosome (if the ancestor is marked on both sex chromosomes).¹²

The Triatomini tribe has the most diversity in the location of the rDNA clusters (Table 1). The species that make up the genera *Dipetalogaster* Usinger, 1939, *Eratyrus* Stål, 1859, *Panstrongylus*, *Mepraia* Mazza Gajardo and Jörg, 1940, *Nesotriatoma* Usinger, 1944, and *Meccus* Stål, 1859 have the same location for the rDNA clusters (Table 1). On the other hand, species of the genus *Triatoma* present all the possibilities of NORs described for Triatominae (Table 1).

Based on this, it was observed that, in general, evolutionarily related species (grouped into complexes and sub-complexes by Schofield and Galvão¹⁵—and reorganized by Pita et al.¹³ and Alevi et al.¹⁶) present the same FISH markings: a large autosomal pair for *Triatoma dimidiata* subcomplex species, one autosomal pair for *Triatoma protracta* and *Triatoma lecticularia* complexes, X chromosome for *Triatoma dispar*

* Address correspondence to Kelly Cristine Borsatto, Departamento de Física, Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto 15054-000, Brazil. E-mail: kellyborsatto@gmail.com

TABLE 1
Review of chromosomal location of 45S rDNA in triatomines

Cytogenomics	
Chromosomal location of 45S rDNA	Genus: Species
X chromosome	<i>Rhodnius</i> : <i>R. prolixus</i> , <i>R. colombiensis</i> , <i>R. nasutus</i> , <i>R. robustus</i> , <i>R. ecuadoriensis</i> <i>Dipetalogaster</i> : <i>D. maxima</i> <i>Mepraia</i> : <i>M. gajardoi</i> , <i>M. spinolai</i> <i>Triatoma</i> : <i>T. carrioni</i> , <i>T. boliviana</i> , <i>T. sordida</i> sensu stricto, <i>T. garciabesi</i> , <i>T. platensis</i> , <i>T. infestans</i> non-Andean group
X and Y chromosomes	<i>Rhodnius</i> : <i>R. domesticus</i> , <i>R. pallescens</i> , <i>R. neglectus</i> , <i>R. neivai</i> , <i>R. milesi</i> , <i>R. ecuadoriensis</i> , <i>R. pictipes</i> , <i>R. stali</i> <i>Psammolestes</i> : <i>P. tertius</i> <i>Triatoma</i> : <i>T. matogrossensis</i> , <i>T. vandae</i> , <i>T. maculata</i> , <i>T. jurbergi</i> , <i>T. rosai</i>
1X and Y chromosomes	<i>Triatoma</i> : <i>T. vitticeps</i> <i>Eratyrus</i> : <i>E. cuspidatus</i>
Autosomal pair	<i>Panstrongylus</i> : <i>P. megistus</i> , <i>P. lignarius</i> , <i>P. chinai</i> <i>Triatoma</i> : <i>T. dimidiata</i> , <i>T. nitida</i> , <i>T. protrata</i> , <i>T. lecticularia</i> , <i>T. sherlocki</i> , <i>T. brasiliensis</i> , <i>T. pseudomaculata</i> , <i>T. wygodzinsky</i> , <i>T. infestans</i> Andean group, <i>T. tibiamaculata</i> , <i>T. carvalhoi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. rubrovaria</i> , <i>T. pintodiasi</i> , <i>T. baratai</i> , <i>T. costalimai</i> , <i>T. guazu</i> , <i>T. jatai</i> , <i>T. williami</i> , <i>T. patagonica</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. sordida</i> La Paz, <i>T. rubrofasciata</i> <i>Meccus</i> : <i>M. pallidipennis</i> , <i>M. phyllosoma</i> , <i>M. mazzotti</i> <i>Nesotriatoma</i> : <i>N. flavida</i>
Two autosomal pairs	<i>Triatoma</i> : <i>T. infestans</i> Andean group
Autosomal pair and X chromosome	<i>Triatoma</i> : <i>T. delpontei</i> , <i>T. infestans</i> Andean group
Two autosomal pairs plus X chromosome	<i>Triatoma</i> : <i>T. infestans</i> Andean group
Two autosomal pairs (with one heterozygote) plus X chromosome	<i>Triatoma</i> : <i>T. infestans</i> Andean group

rDNA = ribosomal DNA.

complex, one autosomal pair for the *Triatoma rubrovaria* subcomplex, one (X) or two sex chromosomes (XY) for the *Triatoma sordida* subcomplex, sex chromosomes (XY) for the *Triatoma maculata* subcomplex, one autosomal pair for the *Triatoma pseudomaculata* subcomplex, the largest autosomal pair for the *Triatoma brasiliensis* subcomplex, and X sex chromosomes for the *Triatoma vitticeps* subcomplex. The same evolutionary phenomena suggested for *Rhodnius*¹² possibly are related to the great diversification of NORs in *Triatoma*; as for triatomines, heterologous associations among heterosomes (Xs/Y sex chromosomes), as well as nonhomologous autosomes, are very common phenomena and could favor the observed rDNA variation.⁵

In addition to the application of cytogenomics in taxonomy, systematics, and evolution (as discussed earlier), this tool has also been used in studies associated with population genetics: Panzera et al.^{5,11} analyzed the karyotype, heterochromatin distribution, and 45S rDNA gene mapping of *Triatoma infestans* (Klug, 1834), from seven different countries using the techniques of C-banding and FISH. The authors observed that all individuals had 20 autosome chromosomes and two sex chromosomes ($2n = 22$). However, through the analyses with FISH, the authors observed different intraspecific chromosomal patterns between the Andean and non-Andean groups (Table 1), as well as a high diversity of rDNA in the Andean group compared with the non-Andean group, so they suggested that the Andean group is ancestral in *T. infestans*, with the non-Andean being a derived group.^{5,11} Taking into account the two most common patterns of the Andean group (autosomal pair and autosomal pair and X chromosome), Panzera et al.¹¹ conclude that a single event of autosomal loss is the most accepted hypothesis to explain the pattern of the non-Andean group (X chromosome). Thus, they support the hypothesis that *T. infestans* originated in the Andean valleys of

Bolivia, as a wild species with polymorphic populations in terms of high amounts of heterochromatic autosomes and variant positions of the ribosomal cluster.¹¹

Besides that, a third group of chromosomes (intermediate) for *T. infestans* was identified by Panzera et al.¹¹ This group had three chromosomal characteristics: 1) the number of heterochromatic autosomes is less in the Andean group, but more in the non-Andean group; 2) this group includes individuals with and without heterochromatic X chromosome, as observed in Andean and non-Andean individuals; and 3) about 50% of individuals have an exclusive rDNA pattern. Thus, the authors suggested two hypotheses to explain the origin of this intermediate group. In the first hypothesis, called "ancestral origin," the authors suppose that the intermediate group represents an intermediate stage of the gradual variation of heterochromatin that occurred during the initial divergence between the Andean and non-Andean groups. In the second hypothesis, called "secondary contact," they assume that the intermediate group is a very recent formation and not a legacy of the old process of divergence between Andean and non-Andean groups.¹¹ The authors suggest that the intermediate group has recently originated from crossing between Andean and non-Andean individuals, which were previously isolated.¹¹

The FISH technique was also used by Pita et al.¹³ to analyze whether telomeric regions were present in triatomines, because there was a chance of loss of this region in insects of the Cimicomorpha order.¹⁷ For this analysis, the TTAGG telomeric probe was used in four triatomine species, namely, *T. infestans*, *T. dimidiata* (Latreille, 1811), *Dipetalogaster maxima* (Uhler, 1894), and *R. prolixus*. All species showed evident telomeres at the end of the chromosomes, contradicting the currently accepted hypothesis¹⁷ that evolutionary recent heteropterans lack this ancestral insect telomeric sequence.

Pita et al.,¹⁸ using in situ hybridization by genomic probes DNA of *Triatoma delponte* (Romaña and Abalos 1947) and *T. infestans* (genomic in situ hybridization [GISH]), showed that the repetitive sequences are shared in closely related species. Two different hybridization patterns were demonstrated by the probes: 1) strong signals accumulated in some regions along the chromatin and 2) strong signals scattered throughout the chromosome.

The Triatomini tribe species analyzed (*T. delponte*, Andean *T. infestans*, non-Andean *T. infestans*, *Triatoma platensis* Neiva, 1913, *T. dimidiata*, *Triatoma carrioni* Larrousse, 1926 and *T. protracta* (Uhler, 1894), *Mephaia spinolai* (Porter, 1934), *D. maxima*, *Eratyrus mucronatus* Stål, 1859, and *Panstrongylus geniculatus*) presented the Y chromosome with highly repeated sequences. These results show that the genomes of Triatomini species share scattered sequences of repetitive DNA: *T. infestans*, *T. delponte*, *T. platensis*, and *M. spinolai* share accumulated repetitive sequences in the same regions, whereas other species exhibit these sequences only on the heterochromatic Y chromosome. Among Triatomini species and *R. prolixus* (Rhodniini tribe), only repeated and scattered DNA sequences are shared. All species studied exhibit a strong hybridization pattern in the autosome chromosome and/or sex chromosome regions, except for *R. prolixus* which showed a scattered hybridization pattern without strong hybridization regions. These scattered signals in chromatin in all species show that transposition elements were an important component in genomes.¹⁸

Pita et al.¹⁹ using genomic probes of *T. dimidiata* and *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) observed Y chromosome-restricted GISH markings for *T. dimidiata*, *T. lecticularia* (Stål, 1859), and *Triatoma nitida* (Usinger, 1939), whereas *M. spinolai* and *Triatoma barberi* (Usinger, 1939) showed Y-marking and one of the X chromosomes. *Triatoma infestans* was already in the Y mark and three autosomes (using *T. dimidiata* probe), and in the Y and five autosomes (using *T. rubrofasciata* probe). Similarly, using genomic probes of *T. infestans*, Pita et al.¹⁹ observed markings restricted to the sex chromosomes of *T. dimidiata* and *T. rubrofasciata*.

Pita et al.^{18,19} also suggested that X and Y sex chromosomes' triatomines present differences in DNA composition because the authors confirmed that the Y chromosome of the North and South American *Triatoma* share repeated DNA sequences and that this Y heterochromatic chromosome conservation may be an ancestral characteristic of the Triatomini tribe. Although the X chromosome is euchromatic, it has no fluorescent staining, but in some species (*T. barberi*, Andean *T. infestans*, *T. platensis*, and *T. delponte*), X chromosomes have heterochromatic regions similar to those observed in Y chromosomes, may be due to transfer of sequences from Y to X chromosome. Transfer of repeated sequences between sex chromosomes without recombination or pairing events may occur because of transposition elements, as it was already suggested by Pita et al.¹²

Pita et al.²⁰ performed analyses with three new satellite DNAs (satDNAs) in *T. infestans* using the FISH technique and revealed that these satDNAs are located in the euchromatic regions of the autosomes and the X chromosome. The authors also showed that only four satDNA families of the 42 families that were isolated of the *T. infestans* genome had some similarity to the *R. prolixus* genome. The data show that the differentiation between the species of triatomines was accompanied by major changes in their repetitive DNAs. One of the most

striking differences between the hybridization patterns in these species is the uneven distribution of the four satDNA families on the Y chromosome. The role of satDNA in speciation processes has been a topic of discussion for a long time; several mechanisms have been proposed in which satDNA could interrupt chromosomal pairing in hybrids, acting as a reproductive barrier.^{20–22}

Genomics. The first use of genomic techniques for triatomines was in 1998, where mitochondrial DNA sequences from the 12S, 16S genes, and the genes encoding cytochrome oxidase I were used to establish phylogenetic relationships between *Triatoma* species.²³ In 1999, Lyman et al.²⁴ used fragments of the mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtlsurRNA) and cytochrome B (mtCytB) to differentiate triatomine species. The following year, Monteiro et al.²⁵ used the same gene fragments (mtlsurRNA and mtCytB) as well as the 28S nuclear RNA variable region D2 to establish phylogenetic analyses among 11 *Rhodnius* species. However, it was not until 2001 that the first complete mitochondrial genome of a triatomine species (*T. dimidiata*) was published and the analysis of the mitochondrial genome supported the theory that crustaceans and insects are more related to each other than to other arthropods, providing more information on the phylogenetic position of arthropods.²⁶

In 2015, the complete genome of a triatomine species (*R. prolixus*) was sequenced.⁶ According to the analyses performed on its genome, transposable elements (TEs) (5.6%) were identified; immune-mediated immune responses (IMD) and toll effectors (immune pathway) and IMD were found to control the intestinal microbiota of the insect, but do not affect the development of *T. cruzi*. Furthermore, the work showed that *R. prolixus* lost selenoprotein-related genes and has only two proteins related to glutathione peroxidase. Many lineage-specific gene expansions and absence of genes have been observed in these triatomines through protein comparison (these expansions are from genes that are related to chemoreception, feeding, and digestion, and may have contributed to the evolution of lifestyle of these insects).⁶

Castro et al.²⁷ analyzed the genome of *Rhodnius montenegrensis* Rosa et al. (2012) and *Rhodnius marabaensis* Souza et al. (2016) and reanalyzed the totality of repetitive genome sequences (repeatome) of *R. prolixus*. The analyses revealed that the total amount of TEs present in *Rhodnius* genomes (19–23.5%) is three to four times greater than that expected, based on the quantifications already performed for *R. prolixus* by Mesquita et al.⁶ The three species showed similar proportions of TEs in their genomes: 19% in *R. prolixus*, 21.2% in *R. marabaensis*, and 23.5% in *R. montenegrensis*. Of the TEs listed, the most abundant were classified as DNA transposons (class II), with 61.4% of the total TEs analyzed being correspondent to the genome of *R. prolixus*, 63% to that of *R. montenegrensis*, and 66.3% to that of *R. marabaensis*.²⁷ Long terminal repeat retrotransposons (class I) were the least represented class of TEs, with a minimum value of 0.8% in *R. prolixus* and *R. marabaensis* and a maximum of 1.1% in *R. montenegrensis*.²⁷

Comparative analyses between the three *Rhodnius* genomes based on the presence/absence pattern showed that a high percentage of TE families is shared between the pairs of genomes (74% for *R. prolixus*–*R. montenegrensis*; 76% for *R. prolixus*–*R. marabaensis*; and 80% for *R. montenegrensis*–*R. marabaensis*).²⁷ The three genomes compared revealed three characteristics necessary to

understand the evolutionary dynamics of their repeatome: 1) the size of the TE families shared between the genomes is highly correlated, both in high and low abundance; 2) several identical families are present in very different proportions between pairs of genomes; and 3) some families seem unique to a species, but this event is observed only for families with very low proportion estimates.²⁷ The comparable proportions of TEs noted in the three species suggest that stochastic events and/or different selective pressures acting during speciation did not affect the general evolutionary routes of TEs. Alternatively, they could have provided the molecular basis that led to the radiation of the *R. prolixus*-*Rhodnius robustus* species complex.²⁷

The mitochondrial genome of five other species has already been sequenced: *Triatoma migrans* Breddin, 1903, *Panstrongylus rufotuberculatus* (Champion, 1899), *Rhodnius pictipes* Stål, 1872, *T. infestans*, and *T. rubrofasciata*.^{28–30} For *T. infestans*, the number, order, and orientation of mitochondrial genes are the same as *T. dimidiata*; the main differences are found in the control region and in the intergenic spacer between the nd1 and tRNA-Ser genes.²⁸ The *T. rubrofasciata* species was characterized through genomic analysis and the phylogenetic tree with the genes that encode *T. rubrofasciata* proteins, and 13 other related species of hemiptera established and demonstrated the phylogenetic relationships.²⁹ For *T. migrans*, *P. rufotuberculatus*, and *R. pictipes*, it can be observed that mitochondrial genomes shared a similar pattern (nucleotide composition, gene order, and control region structure), a high conservation of genome organization, that different genes protein coders have different rates of molecular evolution and some genes had higher evolutionary rates.³⁰ Furthermore, genome and molecular phylogeny analysis using all available genomes of Reduviidae species allowed the authors to confirm a close relationship between Triatominae and Stenopodainae.^{28–30}

Recently, Liu et al.³¹ analyzed a chromosomal-level genome assembly of the *T. rubrofasciata*. The application of a combination of techniques allowed researchers to assemble the genome with higher quality than the other sequenced and assembled genomes. Protein sequences of the single copy genes were aligned along with molecular clock data and divergence time analysis, phylogenetic relationships were constructed to conclude that *T. rubrofasciata* is closely related to *R. prolixus*, and the two species diverged from their common ancestor about 60–95 million years ago.³¹ In addition, the work of Liu et al.³¹ resulted in a successfully reconstructed entire genome assembly (680-Mb) that covers 90% of the nuclear genome (757 Mb) and also reconstructed complete female chromosomes using 13 unique chromosomes.

Henriques et al.³² showed that the number and diversity of peptidases found in *R. prolixus* are within the normal values found in arthropods. These proteins are essential for various functions in animal metabolism (like digestion, blood clotting, and immune system), which explain the high diversity of this type of molecule among different arthropods.³² When the authors compared the frequencies of the *R. prolixus* peptidase families with the other genomes of arthropods, only eight families had higher gene frequencies, suggesting that, during the evolution of hematophagy in this group, gene duplication for new physiological functions occurred only on a limited set of proteases.³² Genetic expansion was observed in three families with a large number of peptidases in the *R. prolixus*

genome, namely, pepsin A, calpain-2, and leucyl aminopeptidase, which suggests that these families may be involved in the process of adapting to blood feeding in triatomines.³²

This study suggested that there was a horizontal transfer of six genes belonging to three different peptidase families associated with bacteria or viruses (M74, S24, and S29) to the *R. prolixus* genome, one these families are not common in any eukaryotic organism, but most of them have been found in genomic regions that are surrounded by genes associated with insect metabolism.³² By amplifying the genomic DNA of *R. prolixus*, the presence of these proteins was confirmed and they were expressed in the intestine of adults fed with blood. It is not clear how the genes can be transferred to the insect's genome from vertebrate viruses, but the authors suggest that the infection may occur during blood meal in a contaminated vertebrate host.³² The RPRC003168 gene was identified in *R. prolixus* genome as a peptidase of the M74 family, and this peptidase is closely related to genes of Gram-negative bacteria, such as *Dickeya* spp. and *Yersinia* spp., that may be associated with hematophagous arthropods.³² The similarity reinforces the hypothesis of horizontal gene transfer from the microorganism to the *R. prolixus* genome because this type of bacteria had previously been implicated in horizontal gene transfer in arthropods.³³

CONCLUSION AND PROSPECTS

Here, we review all studies related to cytogenomics and genomics of Chagas disease vectors, contributing to the direction of further research with these insect vectors because it was evident that most studies focus on cytogenomic knowledge of the species. Given the importance of genomic studies, which contributed to the knowledge of taxonomy, systematics, as well as the vector biology, the need to apply these techniques in other genera and species of subfamily Triatominae is emphasized.

Received August 19, 2020. Accepted for publication December 14, 2020.

Published online April 19, 2021.

Financial support: This work was financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2018/25458–3) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Authors' addresses: Kelly Cristine Borsatto, Monika Aparecida Coronado, and Raghuvir Krishnaswamy Arni, Departamento de Física, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), São José do Rio Preto, Brazil, E-mails: kellyborsatto@gmail.com, monikacoronado@gmail.com, and raghuvir.arni@unesp.br. Kaio Cesar Chaboli Alevi, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Parasitologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Araraquara, Brazil, E-mail: kaiochaboli@hotmail.com.

REFERENCES

1. World Health Organization, 2020. *Chagas Disease (American Trypanosomiasis)*. Geneva, Switzerland: WHO. Available at: <https://www.who.int/chagas/disease/en/>. Accessed May 5, 2020.
2. Dias JCP, Amato Neto V, Luna EJDA, 2011. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and

- proposals for their prevention. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 375–379.
3. Galvão C, 2020. Taxonomia dos Vetores da Doença de Chagas da Forma à Molécula, quase três séculos de história. Oliveira J, Alevi KCC, Camargo LMA, Meneguetti DUO, eds. *Atualidades Em Medicina Tropical No Brasil: Vetores*. Rio Branco, Brazil: Stricto Sensu Editora, Rio Branco, 9–37.
 4. De Keersmaecker SC, Thijs IM, Vanderleyden J, Marchal K, 2006. Integration of omics data: how well does it work for bacteria? *Mol Microb* 62: 1239–1250.
 5. Panzera Y, Pita S, Ferreiro MJ, Ferrandis I, Lages C, Pérez R, Silva AE, Guerra M, Panzera F, 2012. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenet Genome Res* 138: 56–67.
 6. Mesquita RD et al., 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Nat Acad Sci U S A* 112: 14936–14941.
 7. Severi-Aguiar GDDC, Oliveira MTVDA, 2005. Localization of rDNA sites in holocentric chromosomes of three species of triatomines (Heteroptera, Triatominae). *Genet Mol Res* 4: 704–709.
 8. Severi-Aguiar GDC, Lourenço LB, Bicudo HEMC, Azeredo-Oliveira MTV, 2006. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetica* 126: 141–151.
 9. Morielle-Souza A, Oliveira MTVA, 2007. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Genet Mol Res* 6: 713–720.
 10. Bardella VB, Gaeta ML, Vanzela ALL, Azeredo-Oliveira MTV, 2010. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Compar Cytogen* 4: 141–149.
 11. Panzera F, Ferreiro MJ, Pita S, Calleros L, Pérez R, Basmaadján Y, Guevara Y, Brenière SF, Panzera Y, 2014. Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of Chagas disease, by chromosomal markers. *Inf Gen Evo* 27: 105–113.
 12. Pita S, Panzera F, Ferrandis I, Galvão C, Gómez-Palacio A, Panzera Y, 2013. Chromosomal divergence and evolutionary inferences in *Rhodniini* based on the chromosomal location of ribosomal genes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 376–382.
 13. Pita S, Panzera F, Mora P, Vela J, Palomeque T, Lorite P, 2016. The presence of the ancestral insect telomeric motif in kissing bugs (Triatominae) rules out the hypothesis of its loss in evolutionarily advanced Heteroptera (Cimicomorpha). *Comp Cytogenet* 10: 427–437.
 14. Dujardin JP, Thi KP, Xuan LT, Panzera F, Pita S, Schofield CJ, 2015. Epidemiological status of kissing-bugs in south east Asia: a preliminary assessment. *Acta Trop* 151: 142–149.
 15. Schofield CJ, Galvão C, 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88–100.
 16. Alevi KCC, Oliveira J, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA, 2017. *Triatoma vitticeps* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): a new grouping of Chagas disease vectors from South America. *Parasit Vectors* 10: 180–186.
 17. Mason JM, Randall TA, Frydrychová RC, 2016. Telomerase lost? *Chromosoma* 125: 65–73.
 18. Pita S, Panzera F, Sánchez A, Panzera Y, Palomeque T, Lorite P, 2014. Distribution and evolution of repeated sequences in genomes of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae) inferred from genomic in situ hybridization. *PLoS One* 9: e114298.
 19. Pita S, Lorite P, Vela J, Mora P, Palomeque T, Thi KP, Panzera F, 2017. Holocentric chromosome evolution in kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): diversification of repeated sequences. *Parasit Vectors* 10: 410.
 20. Pita S, Mora P, Vela J, Palomeque T, Sánchez A, Panzera F, Lorite P, 2018. Comparative analysis of repetitive DNA between the main vectors of chagas disease: *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*. *Int J Mol Sci* 19: 1277.
 21. Ferree PM, Prasad S, 2012. How can satellite DNA divergence cause reproductive isolation? Let us count the chromosomal ways. *Genet Res Int* 2012: 1–11.
 22. Plohl M, Meštrović N, Mravinac B, 2012. Satellite DNA evolution. *Gen Dyn* 7: 126–152.
 23. Garcia BA, Powell JR, 1998. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *J Med Entomol* 35: 232–238.
 24. Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB, 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377–386.
 25. Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB, 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 62: 460–465.
 26. Dotson EM, Beard C, 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Ins Mol Biol* 10: 205–215.
 27. Castro MRJ, Goubert C, Carareto CMA, Monteiro FA, Vieira C, 2020. Homology-free detection of transposable elements unveils their dynamics in three ecologically distinct *Rhodnius* species. *Genes* 11: 1–14.
 28. Pita S, Panzera F, Vela J, Mora P, Palomeque T, Lorite P, 2017. Complete mitochondrial genome of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), main vector of Chagas disease. *Infect Gen Evol* 54: 158–163.
 29. Dong L, Ma X, Wang M, Zhu D, Feng Y, Zhang Y, Wang J, 2018. Complete mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma rubrofasciata*. *Korean J Parasit* 56: 515–519.
 30. Zhao Y, Jiang M, Wu Y, Song F, Cai W, Li H, 2019. Mitochondrial genomes of three kissing bugs (Reduviidae: triatominae) and their phylogenetic implications. *Int J Biol Macromol* 134: 36–42.
 31. Liu Q, Guo Y, Zhang Y, Hu W, Li Y, Zhu D, Zhou Z, Wu J, Chen N, Zhou XN, 2019. A chromosomal-level genome assembly for the insect vector for Chagas disease, *Triatoma rubrofasciata*. *Giga Sci* 8: giz089.
 32. Henriques BS, Gomes B, da Costa SG, Moraes CS, Mesquita RD, Dillon VM, Garcia ES, Azambuja P, Dillon RJ, Genta FA, 2017. Genome wide mapping of peptidases in *Rhodnius prolixus*: identification of protease gene duplications, horizontally transferred proteases and analysis of peptidase a1 structures, with considerations on their role in the evolution of hematophagy in triatominae. *Front Physiol* 8: 1–22.
 33. Dillon RJ, Dillon VM, 2004. The gut bacteria of insects: non-pathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* 49: 71–92.

Review Article

Transcriptomics Applied to the Study of Chagas Disease Vectors

Kelly Cristine Borsatto,¹ Monika Aparecida Coronado,² Cleber Galvão,^{3*} Raghuvir Krishnaswamy Arni,¹ and
Kaio Cesar Chaboli Alevi⁴

¹Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, Brazil; ²Institute of Biologic Information Processing (IB-7: Structural Biochemistry), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany; ³Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Brazil

Abstract. Chagas disease is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, and is transmitted mainly by the feces of contaminated triatomines. Knowledge of the biological, ecological, behavioral, genetic, taxonomic, and systematic aspects of these vectors can contribute to the planning of vector control programs, because all species are considered to be potential vectors of Chagas disease. Transcriptomic studies, in general, provided a new view of the physiology of triatomines (aiding in the knowledge of reproductive aspects of the hematophagy process and even the immune system and the sensory apparatus) and even contributed, as a new tool, to the taxonomy and systematics of these insects. Thus, we conducted a review of the transcriptomic studies on Chagas disease vectors.

INTRODUCTION

Chagas disease is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), and is transmitted mainly by the feces of contaminated triatomines (Hemiptera: Triatominae) (hematophagous insects that have a habit of defecating/urinating during or after the blood meal, which can release blood parasites in excreta if they are infected).¹ Currently, there are about 8 million people infected and other 25 million at risk of infection, with vector control being the main measure to prevent new incidences of Chagas disease.¹

Although the first species of triatomine (*Triatoma rubrofasciata*) was described in 1773, Chagas disease was only discovered after 136 years.² Currently, there are 157 species of triatomines described.^{3–5} Knowledge of the biological, ecological, behavioral, genetic, taxonomic, and systematic aspects of these vectors can contribute to the direction of vector control programs, because all species are considered to be potential vectors of Chagas disease.^{3,6}

One of the milestones of the application of omic tools in the study of these insect vectors was the characterization of the genome of *Rhodnius prolixus*.⁷ However, before knowledge of the genome, omic studies had already been applied to triatomines, contributing the knowledge of taxonomy, systematics, as well as vector biology.⁸

Transcriptomic studies, in general, provided a new view of the physiology of triatomines (aiding in the knowledge of reproductive aspects,^{9,10} of the hematophagy process,^{11,12} and even the immune system¹³ and the sensory apparatus¹⁴), and also contributed to the taxonomy and systematics of these insects.^{15,16} Thus, we conducted a review of the transcriptomic studies on Chagas disease vectors.

METHODS

The review was based on scientific articles published from 2004 to 2021, with 2004 being the year for the first publication

of transcriptomic data in triatomines.^{17,18} Based on the keywords “transcriptome,” “transcripts,” and “transcriptomics,” which were combined with the keywords “triatominae/triatomines,” searches were performed in the Scientific Electronic Library Online (SciELO), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE/PubMed), SCOPUS, Web of Science, and Web Bibliografia de Triatomíneos (Bib-Tri) V3.0 databases, which resulted in 70 articles. Of the total scientific articles retrieved, 62 articles were used to write the review article.

TRANSCRIPTOMICS

Saliva/salivary gland transcriptome. The transcriptome of a cell or tissue is the collection of RNAs transcribed in it (composed of messenger RNA (mRNA) or coding RNAs and a variety of non-coding RNAs).¹⁷ For triatomines, the first work published with transcriptome analysis was that of Ribeiro et al.,¹⁸ who analyzed the transcriptome of the *R. prolixus* salivary gland (sialotranscriptome or sialoma) to gain further insight into the biochemistry and potent pharmacological substances of its saliva.

Transcriptomic analyses made it possible to observe a large expansion of lipocaine family proteins, as well as members of the nitrophorine families (with vasodilatory properties),¹⁹ and triabine (a potent and selective thrombin inhibitor)^{20,21} and palidipine (an inhibitor of platelet aggregation)—both also identified from the *T. pallidipennis* saliva transcriptome.^{21–23} The most abundant transcripts and proteins in *T. pallidipennis* saliva were anti-hemostatic triabines, although others involving antimicrobial and thrombolytic polypeptides were also found in addition to unique proteins such as angiotensin-converting enzyme.²³

In *Panstrongylus megistus*, *P. chinai*, *R. neglectus*, *T. matogrossensis*, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. dimidiata*, and *T. rubida* sialoma, high numbers and a variety of lipocalins were found, as observed in *R. prolixus* saliva: palidipine, triabine, and procaline (a salivary allergen), in addition to a large number of Kazal-type proteins (serine protease inhibitors).^{13,18,21,24–35} In *P. megistus* and *T. infestans*, relatively well-expressed transcripts for the enzymes apyrase, inositol phosphatase, serine proteases, peptides containing the Kazal domain, family of

*Address correspondence to Cleber Galvão, IOC/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Pavilhão Rocha Lima, Sala 505, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: clebergalvao@gmail.com

antigen 5, family of hemolysin and trypsin, and some families of desorphanized proteins have also been identified.^{31,32}

In *P. lignarius* salivary transcripts lipocalins, small-molecule binding proteins, two apyrases-like proteins of the hydrolysat adenosine triphosphate and adenosine diphosphate, and proteins of the Kazal family have been found.¹³ In *Dipetalogaster maxima*, a salivary transcriptome was observed that includes lipocalins like salivary proteins of other triatomines species, such as palidipine and procaline.³⁶ However, when comparing sets of the *D. maxima* salivary transcriptome with other triatomines, it was possible to see that *Dipetalogaster* has a less complex sialome compared with species of the *Triatoma* genus, which presents a set of extra proteins such as trypsin, trypsin, Kazal, pheromone binding, inositol phosphatase, and serine protease.^{21,23,37–39} It was suggested that these proteins may be related to the adaptation of *Triatoma* to feeding on mammalian blood, whereas *Dipetalogaster* feeds mainly on lizards.³⁶

Metabolism transcriptome. Martínez-Barnette et al.⁴⁰ analyzed transcripts involved in the metabolism of three species of triatomines (*T. pallidipennis*, *T. dimidiata*, and *T. infestans*). They identified a numerical enrichment of transcripts that encode the protease inhibitor domains of the pacifastin (*T. dimidiata* and *T. pallidipennis*) and cystatin (the three species) families. Pacifastins are a family of protease inhibitors belonging to the MEROPS family of inhibitors, involved in the regulation of different proteolytic cascades, including phenoloxidase-dependent melanization.⁴¹ The representation of pacifastin was most notable in *T. pallidipennis*, with 17 unique transcripts compared with nine genes in the *R. prolixus* genome.⁴⁰ Cystatins belong to a large and widespread family of cysteine inhibitors in plants, prokaryotes, and animals.⁴² Cystatins also play an anti-hemostatic role during the blood meal in ticks,^{43,44} but they appear to be absent in the *Triatoma* sialotranscriptomes described so far.^{21,26,29,30,36} There is only one protease inhibitor gene with cystatin domain in *R. prolixus* (IPR000010), and cystatins were more abundant in *T. dimidiata* ($n = 9$), *T. pallidipennis* ($n = 6$), and *T. infestans* ($n = 4$).⁴⁰ However, the authors point out that the cystatin expansion documented in *T. pallidipennis* and *T. dimidiata* deserves further studies to elucidate its biological significance.⁴⁰

Martínez-Barnette et al.⁴⁰ found an important difference between the three *Triatoma* species. The largest number of transcriptionally active transposable elements is in *T. infestans*, particularly non-LTR retrotransposons (increased between 8 and 12 times),⁴⁰ which may be related in part to the size of the *T. infestans* genome, which is one of the largest among all analyzed reduviids.⁴⁵ Although most enzymes in the glycolytic pathway have been highly conserved in the three species of *Triatoma*, a sequence divergence has been identified in the enzymes involved in anabolism (gluconeogenesis, glycogen synthesis, and pentose phosphate pathway), and an enzyme that participates in glycolysis.⁴⁰ Greater evolution rates in critical enzymes that control the metabolic flow may represent genetic adaptations favoring characteristics of lifestyles of triatomines. Glycogen storage serves to deal with prolonged hunger and reproductive success; antioxidant mechanisms can be used to deal with oxidative stress, which favors longevity; and optimization of aerobic metabolism meets the energy demands of hematophagy.⁴⁰

Kazal inhibitors have also been found and characterized in the midgut of some triatomines, including *D. maxima* (dipeptalogastin), *R. prolixus* (rhodinin), *T. infestans* (infestin), and *T. brasiliensis* (brasiliensina).²³ Among the gastrointestinal tract transcripts of *R. prolixus*, digestive enzymes, protease inhibitors, lipocalin family proteins, carrier proteins, cytoskeleton-related genes, immunity-related transcripts (such as PAMP recognition molecules and signal transducers), effector proteins, as well as genes that belong to the TOLL pathway were found.⁴⁶ Furthermore, lipid metabolism-related transcripts showed genes involved in β -oxidation, suggesting that the *Rhodnius* midgut uses fatty acid oxidation as the main energy source whereas amino acid metabolism-related transcripts showed a marked predominance of β -oxidation enzymes and amino acid degradation.⁴⁶

For *R. prolixus*, an insulin receptor has also been identified that is present in 10 tissues studied, and it is expressed in different ways in each tissue, suggesting that this receptor is probably involved in a variety of physiological processes.⁴⁷ For *P. lignarius* fatty body transcripts, the predominant protein subclass was classified as secreted proteins related to peptide synthesis with distinct functions, many of which were intended for the hemolymph compartment, and the other highly expressed subclass was also associated with storage of the secreted proteins intended for hemolymph.¹³ In addition, transferrin (which is synthesized and stored in the adipose body for later hemolymph secretion and may function in insect defense mechanisms) has also been identified in the fatty body.¹³

Reproductive system transcriptome. Analyses of ovarian follicular tissue and testis transcripts of *R. prolixus* have been performed.^{48,49} In the study of ovarian follicular tissue, the most abundant transcript was a small proline-rich secreted protein (S) that may play a role in oocyte maturation.⁴⁸ A protein called Rp45 was also identified and described as a component of *Rhodnius* eggshell. Furthermore, VASA-type transcripts that may play a role in oocyte development have also been found. The overall analysis of the transcript classification showed that almost two thirds of all expressed proteins were functional type and somehow related to transcription, translation, protein turnover, and vesicular traffic, reflecting the immense metabolic effort for egg maturation.⁴⁸ In testis, the most abundant families of transcripts were related to spermatogenesis and fertility, such as myosins, actins, tubulins, and dyneins.^{49,50} Myosins may be related to acrosome development, vesicle transport, gene transcription, and nuclear modeling, whereas actins may be related to correct nuclear positioning, germinal vesicle breakdown, spindle migration and rotation, and chromosome segregation in spermatogenesis.^{49,50} Dyneins and tubulins are involved with flagella structure and motility.^{49,51} Also, transcripts of lipocalin family proteins and serine protease inhibitors were found, showing an important role in sperm maturation and the role of serine protease inhibitors in spermatogenesis, respectively.⁴⁹ In addition, immunity-related transcripts have also been identified, and most of them are lysozymes.⁴⁹

Brito et al.,⁹ investigated the molecular mechanisms that coordinate and direct oogenesis in *Rhodnius* using transcriptomic analyses in ovaries of females fed with blood. The study focused on the pre-vitellogenic phase of oogenesis and used the transcriptome profile to determine the extent

of evolutionary and functional conservation of the piwi-interacting RNA (piRNA) pathway in *R. prolixus*.⁹ They found a helicase, critical to producing piRNAs in *Drosophila*, as well as the piwi orthologist *Rp-piwi1*, which appears to be expressed at very modest levels or not expressed in *Rhodnius* ovaries. Furthermore, analysis of normalized RNAseq readings showed that *Rp-piwi2*, *Rp-piwi3*, and *Rp-ago3* are expressed at intermediate or low levels during *Rhodnius* oogenesis.⁹

Brito et al.⁹ proposed that *Rp-piwi1* is a pseudogene, resulting from the absence of intronic sequences, and that it may not be necessary for the development of *Rhodnius*. Transcriptomic data supported this hypothesis, although the authors have not ruled out that *Rp-piwi1* can be expressed in tissues other than the ovary.⁹ With this work, it was demonstrated that the central components of the piRNA pathway, first described in *Drosophila*, are conserved in *R. prolixus* and that this insect houses four putative piwi genes. In addition, it was possible to observe that *Rp-piwi2*, *Rp-piwi3*, and *Rp-ago3*, but not *Rp-piwi1*, are expressed in ovaries.⁹ The experiments carried out using piRNA against the *Rp-piwi2* gene resulted in the interruption of oogenesis and complete sterility of the adult female. Data also revealed that a variety of transposable elements are expressed in the early stages of oogenesis, and their transcripts accumulate in the developing oocyte.¹⁰ Thus, the authors suggest that the piRNA pathway decreases the transposable and repetitive sequences efficiently in *R. prolixus* oogenesis, and proves that piwi genes are essential for adult *Rhodnius* oogenesis and fertility, and probably have similar functions in other species of triatomines.^{9,10}

Analyzing the ovary transcriptome of *R. prolixus*, Coelho et al.¹⁰ were able to observe many genes that probably encode critical factors in the development of this insect, as they include histone-modifying enzymes, chromatin remodeling factors, homeotic genes, signaling molecules, kinases, and metabolic enzymes. Moreover, they were able to determine transcription variants generated by alternative splicing events for more than 6,000 genes. Through data related to the production of oocytes, they observed that the production of oocytes in *R. prolixus* seems to be restricted to the stages of nymph, and that the expression of several orthologous genes occurs in pre-vitellogenic stages and their transcripts are deposited in mature eggs. It may represent a consequence of the structure of the egg chambers and ovarioles of *R. prolixus*.¹⁰

The data presented also showed that the transcripts encoding a variety of ribosomal proteins are among the top 25 genes expressed at the beginning of oogenesis; however, they are underrepresented in unfertilized mature eggs. The authors then suggested that it is possible that in *R. prolixus*, ribosomal proteins, instead of the corresponding transcripts, are deposited in the egg and used in the early stages of embryogenesis, and this can ensure that ribosomal proteins are readily available to assemble ribosomes quickly.¹⁰ In addition, a differentially expressed gene (Yellow-g2 [RPRC009244]) has been identified that has been associated with the resistance of the insect's eggs to desiccation and the production of cuticle pigments, and at least two genes that can be activated in oogenesis to control oxidative stress caused by blood ingestion.^{10,52}

Detoxification system transcriptome. Traverso et al.⁵³ carried out a study of superfamily genes of triatomines

related to detoxification by analyzing the transcriptomes of three species of triatomines *T. infestans*, *T. dimidiata*, and *T. pallidipennis*, and also used data extracted from genomic sequences of *R. prolixus*. They reported that P450 cytochromes are actively involved in the detoxification response of synthetic insecticides.⁵³ The insect CYP genes fall into four main classes: CYP2, CYP3, CYP4, and mitochondrial clade, with each class being subdivided into several families and subfamilies.⁵⁴ The authors noted that CYP3 is the most abundant class in insects,⁵³ and its members are generally the genes that belong to the CYP6 and CYP9 families that are involved with insecticide resistance.⁵⁴ The CYP9 family was not found in triatomines⁵⁵; thus, CYP6 is the only family in the CYP3 clade of triatomines that is involved with insecticide resistance.⁵⁵

Carboxyl/cholinesterases hydrolyze carboxylic esters to alcohols and acids.⁵⁶ They are subdivided into three main classes, according to their function: 1) the food class, 2) the degradation class of hormones and pheromones, and 3) the neuro group.⁵⁶ The authors noted that, of the observed SCCs, those belonging to the food class were absent in the four species of triatomines analyzed, and suggest an absence or extremely low representation of this class in triatomines, and that almost all detected SCCs are included in the class of hormones that degrade hormones and pheromones.⁵³ The absence of the food class may be a result of a blood-only diet, with the absence of other types of metabolites. In addition, the deficiency of an entire class of SCC may be associated with a lesser potential for the detoxification of chemical insecticides compared with other species.⁵³

Glutathione transferases (GSTs) are a family of enzymes that can use glutathione in reactions, contributing to the biodegradation and elimination of xenobiotics and reactive oxygen species generated during aerobic metabolism.⁵⁷ Of the existing GST classes, the Delta and Epsilon classes are exclusive to insects and are the main classes associated with resistance to insecticides.⁵³ However, they were observed with little abundance in the insects studied (*T. infestans*, *T. dimidiata*, and *T. pallidipennis*).⁵³ The levels of three *T. infestans* genes, related to insecticide resistance, were compared between sensitive and pyrethroid-resistant populations (CYP4, carboxyl/cholinesterases Clade ii, and GST Delta).⁵³ The authors realized that the analyzed CYP4 gene was overexpressed in insects in the resistant population, suggesting that this could be an expanded mechanism of resistance to pyrethroids in this species. The expression of the other studied enzymes did not differ significantly between sensitive and resistant populations.⁵³

Immune system transcriptome. Some work on triatomines using the transcriptomic technique has already identified components of the insect's immune system.^{13,49} Recently, Zumaya-Estrada et al.⁵⁸ performed a transcriptomic analysis of the reproductive and digestive tracts, Malpighian tubules, brain, adipose body, and salivary glands to describe innate immune response genes to triatomines. Through the analyses, the authors were able to provide evidence of the presence of important immune components in four important Chagas disease vectors (*T. pallidipennis*, *T. dimidiata*, *T. infestans*, and *R. prolixus*), as well as identify molecules related to the main immune categories (microbial recognition and activation, signaling, effectors, regulation, antioxidant system, RNA interference, and coagulation).⁵⁸

Proteins involved in microbial recognition, immune activation, and various antimicrobial peptides have been documented in most species analyzed; lysozymes related to digestive and immune defense functions and defensins were detected.⁵⁸ Most canonical components of the TOLL and Jak-STAT signaling cascades are conserved in the studied insects; however, the major components of the immunodeficiency pathway were absent.⁵⁸

Sensory system transcriptome. Aspects of the sensory apparatus of triatomines, such as the use of thermal and humidity signals, as well as vibratory signals, were also studied. As in other insects, antennae are the main chemosensory structures.¹⁴ In addition, the expression of a variety of modulating process components, such as neuropeptides, GPCRs, and nuclear receptors, has already been observed in the *R. prolixus* antenna.⁵⁹ Latorre-Estivalis et al.^{14,59} developed works related to the sensory apparatus of triatomines using transcriptomics. The study involving the *R. prolixus* antenna showed that these insects seem to increase the expression of several chemosensory genes after reaching adulthood. This can serve to improve the most necessary chemosensory skills in adulthood, as activities that require sensory action from the device, such as sexual behavior, oviposition, and escape, are activities performed exclusively by adult insects.¹⁴

A large number of mechanoreceptors have also been observed, and this seems to correspond to the known ability of triatomines to detect vibratory signals.⁶⁰ Several genes belonging to this category seem to have a more intense expression in male insect antennae, known in triatomines to detect vibratory sexual signals.^{14,60} It has also been reported that *R. prolixus* antennae produce a diversity of neuropeptide coding transcripts, with significantly lower expression of some neuropeptides in male antennae, which may suggest a specific role for the sex antenna.¹⁴ In addition, some nuclear receptors are expressed on the antennae of this insect, suggesting that these organs have a wide capacity to respond to endocrine signals.¹⁴

In addition to nuclear receptors, one study by Latorre-Estivalis et al.⁵⁹ showed that *R. prolixus* antennae produce a diversity of neuropeptide coding transcripts, including high levels of allatostatin-CC peptide transcripts and ITG, in addition to orcokinin and IDLSRF-type peptide, which showed increased antennal expression after imaginal change, suggesting that these peptides can modulate sensory processes specific to adults underlying dispersion by flight and mating. However, the significantly lower expression of allatostatin-CC in male antennae may suggest a sex-specific antennal role.⁵⁹ With the data analyzed, the authors were able to show that most nuclear insect receptors are expressed in an insect's antennae, suggesting that these organs have a wide capacity to respond to endocrine signals.⁵⁹

Transcriptome applied in taxonomic and systematic studies. Transcriptomics has also been shown to be useful for triatomine systematics.¹⁵ The identification of triatomines has been largely based on the observation of morphological characteristics.⁶ As a result of the existence of cryptic or closely related species, many authors resorted to molecular data to differentiate these species.⁶¹ In 2017, Carvalho et al.¹⁵ used transcriptomics to look for differences in cephalic transcripts of *R. montenegrensis* and *R. robustus*. They were able to identify several sequences with a high

level of differentiation between these species—in addition to the substantial number of fixed polymorphisms suggesting a clear separation of lineages—and these results support the hypothesis that these species are valid and genetically distinct.¹⁵

A subsequent study using a transcriptome from members of the *R. prolixus*–*R. robustus* cryptic species complex found evidence confirming that *R. montenegrensis* and *R. robustus* genotype II are genetically identical and therefore are representative of the same species.¹⁶ However, the authors point out that their findings do not invalidate *R. montenegrensis*; they only show that “*R. montenegrensis*” is the specific name to the so-called “*R. robustus* genotype II.”¹⁶ In addition, the researchers found genetic evidence that the reference stocks for “*R. robustus*” used in the description of *R. montenegrensis* and transcriptome-based studies are from *R. prolixus*, probably mixed with *R. robustus* of type II genotype (known as also as *R. montenegrensis*).¹⁶

Multiple-organ transcriptome. Leyria et al.^{11,12} analyzed how a blood meal influences the expression of mRNA in the central nervous system (CNS), adipose body, and ovaries of *R. prolixus* and did not observe major genetic differences in the CNS between the non-fed condition and the fed condition.^{11,12} Vitellogenins, the main precursors of yolk protein, are large molecules synthesized predominantly by the adipose body.¹² The results of the study by Leyria et al.¹² showed that the levels of mRNA for vitellogenins are considerably greater in the adipose body in relation to the ovaries, and there was no significant difference between the fed and unfed conditions. The authors showed that in the adipose body, the levels of *Rhodnius* heme binding protein mRNA (which functions as an antioxidant in hemolymph) were regulated positively in females after feeding. In addition, the authors identified that the metabolism of arginine and proline is regulated positively in the adipose body after a meal of blood, and that proline metabolism can also contribute to the energy required by the ovary during vitellogenesis.¹²

In *R. prolixus*, the data showed that Hsp70 (considered a good marker for an inducible stress response^{62,63}) is regulated positively in the adipose body of unfed females, a condition inherently associated with a stress condition. A member of the Hsp70 family, Grp78 has already been reported as a regulatory factor for vitellogenin synthesis and homeostasis in the adipose body.⁶⁴ In the studied insect, regulation of a protein like Grp78 was observed in the adipose body and the ovaries of fed insects, which led the authors to suggest a new regulatory mechanism involved in the vitellogenic process of *R. prolixus*.¹²

Notch is a receptor that directly translates information from cell–cell contact to gene expression in the nucleus.⁶⁵ By analyzing the KEGG database, Leyria et al.^{11,12} showed that Notch signaling is regulated positively in the ovaries of fed females,¹¹ and that the transcripts involved in Notch developmental functions are regulated upward in ovaries in the fed condition.¹² By KEGG analysis, two pathways related to the juvenile hormone—insect hormone biosynthesis and terpenoid backbone biosynthesis—are regulated positively in the adipose body and ovaries during the fed condition.¹¹ The authors also found five other related enzymes that are involved in the mevalonate pathway that are regulated positively in ovaries after a blood meal, enzymes that convert inactive juvenile hormone precursors into active juvenile

hormones in the final stage of the juvenile hormone biosynthesis pathway in insects.^{12,66} Some precursors of the juvenile hormone have been identified, and all are present in the adipose body and ovaries. The authors suggest that the majority of vitellogenic ovaries and the adipose body may have the potential to synthesize juvenile hormone in *R. prolixus*.¹²

The data showed a differentiated pattern of expression of *takeout* (*To*) genes that changes according to the tissue analyzed and the feeding condition.¹² The mRNA expression of *To1*, *To2*, *To4*, and *To7* is highly expressed in the CNS of unfed insects, and the authors suggest that hunger may induce the expression of these genes. The mRNA expression of *To9*, *To11*, *To12*, and *To15* is increased in the adipose body of females after a blood meal, whereas the transcripts of *To5*, *To12*, and *To13* show a significantly increased expression in ovaries in the fed condition.¹² Thus, Leyria et al.¹² presented the first report of an analysis of *To* genes in different tissues involved in reproduction in *R. prolixus*, providing new information on the mechanisms involved in the formation of eggs.

Leyria et al.¹² found a trehalose transporter (the main blood sugar of insects) regulated more than six times in fed-insect ovaries and, with this finding, they support the hypothesis that a direct capture of hemolymph trehalose through this transporter can be an important process for the storage of carbohydrates in the ovaries. Because the vitellogenic process is an event with a high energy demand, trehalose uptake is necessary for the development of oocytes.^{12,67}

The analyses made it possible to observe seven enzymes involved in the processing of neuropeptides, and all of them are expressed in the CNS, adipose body, and ovaries in both nutritional conditions. The results support the contribution of adipose body and ovaries to the production of neuropeptides in both nutritional conditions.¹² The authors found a positive regulation of NPLP1 transcript expression (NPLP1 peptides are involved in the food response⁶⁸) in ovaries in the unfed condition, and the physiological role of NPLP1 signaling in reproduction is still unknown. In addition, they found a positive regulation of the corticotropin releasing factor receptor mRNA CRF/DH in ovaries and adipose body of unfed insects, where vitellogenesis is inhibited. This result supports its effects as a negative reproduction regulator, as it has been reported by Mollayeva et al.⁶⁹ that the adult female of *R. prolixus*, injected with CRF/DH, produces and lays significantly fewer eggs.

The signaling pathway of the insulin-like peptide/rapamycin target (ILP/ToR) is responsible for nutritional detection.⁷⁰ Leyria et al.¹¹ analyzed the transcripts involved in ILP/ToR signaling. The data showed a positive regulation of ILP/ToR transcripts in unfed insects and demonstrated that this signaling is only activated in fed-insect tissues. The authors also noted that the forkhead box O, or FoxO, transcription factor, which regulates longevity through ILP signaling, is responsible for the positive regulation of transcripts related to ILP/ToR signaling in unfed insects. Given this, they found that unfed females quickly activate ILP/ToR signaling because they are in a sensitive state to respond to changes in ILP levels.¹¹

CONCLUSION AND PROSPECTS

We reviewed all studies related to transcriptomics of Chagas disease vectors, contributing to the direction of further

research with these insects, because it was evident that most studies focus on the physiological knowledge of the triatomines, contributing to the knowledge of saliva/salivary gland and metabolism, as well as the immune, reproductive, sensory, and detoxification systems of Chagas disease vectors. Given the importance of transcriptomics for taxonomy and systematics of *Rhodnius*, the need to apply this technique in other genera and species of the subfamily Triatominae (especially in those with taxonomic problems) is evident.

Received June 7, 2021. Accepted for publication November 17, 2021.

Published online February 28, 2022.

Financial support: This work was financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (process no. 2018/25458-3), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brazil (finance code 001, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Authors' addresses: Kelly Cristine Borsatto and Raghuvir Krishnaswamy Ami, Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho," Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, Brazil, E-mails: kellyborsatto@gmail.com and raghuvir.ami@unesp.br. Monika Aparecida Coronado, Institute of Biologic Information Processing (IB-7: Structural Biochemistry), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany, E-mail: monikacoronado@gmail.com. Cleber Galvão, Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: clebergalvao@gmail.com. Kaio Cesar Chaboli Alevi, Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho," Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Brazil, E-mail: kaiochaboli@hotmail.com.

REFERENCES

1. World Health Organization, 2021. *Chagas Disease (American Trypanosomiasis)*. Available at: <http://www.who.int/chagas/en/>. Accessed March 10, 2021.
2. Chagas C, 1909. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159–218.
3. Galvão C, 2020. Taxonomia dos vetores da doença de Chagas da forma à molécula, quase três séculos de história. Oliveira J, Alevi KCC, Camargo LMA, Meneguetti DUO, eds. *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores*. Acre, Brasil: Editora Athenas, 9–37.
4. Alevi KCC et al., 2020. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): a new species of Argentinian Chagas disease vector described based on integrative taxonomy. *Insects* 11: 830.
5. Zhao Y, Galvão C, Cai W, 2021. *Rhodnius micki*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys* 1012: 71–93.
6. Galvão C, 2014. *Vetores da Doença de Chagas no Brasil*. Brasil: Sociedade Brasileira de Zoologia.
7. Mesquita RD et al., 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 14936–14941.
8. Borsatto KC, Coronado MA, Arni RK, Alevi KCC, 2021. Omics tools applied to the study of Chagas disease vectors: cytogenomics and genomics. *Am J Trop Med Hyg* 104: 1973–1977.
9. Brito T, Julio A, Berni M, de Castro Poncio L, Bernardes ES, Araujo H, Sammeth M, Pane A, 2018. Transcriptomic and functional analyses of the piRNA pathway in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl Trop Dis* 12: 1–20.
10. Coelho VL, de Brito TF, de Abreu Brito IA, Cardoso MA, Berni MA, Araujo HMM, Sammeth M, Pane A, 2021. Analysis of

- ovarian transcriptomes reveals thousands of novel genes in the insect vector *Rhodnius prolixus*. *Sci Rep* 11: 1–17.
11. Leyria J, Orchard I, Lange AB, 2020. Transcriptomic analysis of regulatory pathways involved in female reproductive physiology of *Rhodnius prolixus* under different nutritional states. *Sci Rep* 10: 1–16.
 12. Leyria J, Orchard I, Lange AB, 2020. What happens after a blood meal? A transcriptome analysis of the main tissues involved in egg production in *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 14: e0008516.
 13. Nevoa JC, Mendes MT, da Silva MV, Soares SC, Oliveira CJ, Ribeiro JM, 2018. An insight into the salivary gland and fat body transcriptome of *Panstrongylus lignarius* (Hemiptera: Heteroptera), the main vector of Chagas disease in Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006243.
 14. Latorre-Estivalis JM, Robertson HM, Walden KK, Ruiz J, Gonçalves LO, Guarneri AA, Lorenzo MG, 2017. The molecular sensory machinery of a Chagas disease vector: expression changes through imaginal moult and sexually dimorphic features. *Sci Rep* 7: 1–16.
 15. Carvalho DB, Congrains C, Chahad-Ehlers S, Pinotti H, De Brito RA, Da Rosa JA, 2017. Differential transcriptome analysis supports *Rhodnius montenegrensis* and *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) as distinct species. *PLoS One* 12: e0174997.
 16. Brito RN, Geraldo JA, Monteiro FA, Lazoski C, Souza RCM, Abad-Franch F, 2019. Transcriptome-based molecular systematics: *Rhodnius montenegrensis* (Triatominae) and its position within the *Rhodnius prolixus*–*Rhodnius robustus* cryptic-species complex. *Parasit Vectors* 12: 1–16.
 17. Srivastava A, George J, Karuturi RKM, 2019. Transcriptome analysis. *Encyclop Bioinf Comp Biol* 3: 792–805.
 18. Ribeiro JMC, Andersen J, Silva-Neto MAC, Pham VM, Garfield MK, Valenzuela JG, 2004. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 61–79.
 19. Champagne DE, Nussenzveig RH, Ribeiro JM, 1995. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 270: 8691–8695.
 20. Noeske-Jungblut C, Haendler B, Donner P, Alagon A, Possani L, Schleuning WD, 1995. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J Biol Chem* 270: 28629–28634.
 21. Assumpção TC, Francischetti IM, Andersen JF, Schwarz A, Santana JM, Ribeiro JM, 2008. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 213–232.
 22. Noeske-Jungblut C, Krätzschar J, Haendler B, Alagon A, Possani L, Verhallen P, Donner P, Schleuning WD, 1994. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J Biol Chem* 269: 5050–5053.
 23. Hernández-Vargas MJ, Gil J, Lozano L, Pedraza-Escalona M, Ortiz E, Encarnación-Guevara S, Alagón A, Corzo G, 2017. Proteomic and transcriptomic analysis of saliva components from the hematophagous reduviid *Triatoma pallidipennis*. *J Proteomics* 162: 30–39.
 24. Paddock CD, McKerrow JH, Hansell E, Foreman KW, Hsieh I, Marshall N, 2001. Identification, cloning, and recombinant expression of procalin, a major triatomine allergen. *J Immunol* 167: 2694–2699.
 25. Santos A, Ribeiro JMC, Lehan MJ, Gontijo NF, Veloso AB, Sant'Anna MR, Araújo RN, Grisard EC, Pereira HM, 2007. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol* 37: 702–712.
 26. Kato H, Jochim RC, Gomez EA, Sakoda R, Iwata H, Valenzuela JG, Hashiguchi Y, 2010. A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. *Infect Genet Evol* 10: 184–191.
 27. Bussacos AC, Nakayasu ES, Hecht MM, Parente JA, Soares CM, Teixeira AR, Almeida IC, 2011. Diversity of anti-haemostatic proteins in the salivary glands of *Rhodnius* species transmitters of Chagas disease in the greater Amazon. *J Proteomics* 74: 1664–1672.
 28. Bussacos AC, Nakayasu ES, Hecht MM, Assumpção TC, Parente JA, Soares CM, Santana JM, Almeida IC, Teixeira AR, 2011. Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. *J Proteomics* 74: 1693–17008.
 29. Assumpção TC, Eaton DP, Pham VM, Francischetti IM, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Valenzuela JG, Diaz LA, Ribeiro JM, 2012. An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with *Fogo selvagem* in South America. *Am J Trop Med Hyg* 86: 1005–1014.
 30. Ribeiro JM, Assumpção TC, Van Pham M, Francischetti IM, Reisenman CE, 2012. An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma rubida* (Hemiptera: Heteroptera). *J Med Entomol* 49: 563–572.
 31. Schwarz A, Medrano-Mercado N, Schaub GA, Struchiner CJ, Barges MD, Levy MZ, Ribeiro JM, 2014. An updated insight into the sialotranscriptome of *Triatoma infestans*: developmental stage and geographic variations. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3372.
 32. Ribeiro JM, Schwarz A, Francischetti IM, 2015. A deep insight into the sialotranscriptome of the Chagas disease vector, *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Heteroptera). *J Med Entomol* 52: 351–358.
 33. Santiago PB et al., 2016. A deep insight into the sialome of *Rhodnius neglectus*, a vector of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004581.
 34. Kato H, Jochim RC, Gomez EA, Tsunekawa S, Valenzuela JG, Hashiguchi Y, 2017. Salivary gland transcripts of the kissing bug, *Panstrongylus chinai*, a vector of Chagas disease. *Acta Trop* 174: 122–129.
 35. Santiago PB et al., 2018. Exploring the molecular complexity of *Triatoma dimidiata* sialome. *J Proteomics* 174: 47–60.
 36. Assumpção TC et al., 2011. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. *J Proteome Res* 10: 669–679.
 37. Amino R, Tanaka AS, Schenkman S, 2001. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol* 31: 465–472.
 38. Faudry E, Lozzi SP, Santana JM, D'Souza-Ault M, Kieffer S, Felix CR, Ricart CAO, Sousa MV, Vernet T, Teixeira ARL, 2004. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *J Biol Chem* 279: 19607–19613.
 39. Martins RM, Amino R, Daghestanli KR, Cuccovia IM, Juliano MA, Schenkman S, 2008. A short proregion of trialysin, a pore-forming protein of *Triatoma infestans* salivary glands, controls activity by folding the N-terminal lytic motif. *FEBS J* 275: 994–1002.
 40. Martínez-Barnetteche J, Lavore A, Beliera M, Téllez-Sosa J, Zumaya-Estrada FA, Palacio V, Godoy-Lozano E, Rivera-Pomar R, Rodríguez MH, 2018. Adaptations in energy metabolism and gene family expansions revealed by comparative transcriptomics of three Chagas disease triatomine vectors. *BMC Genomics* 19: 1–23.
 41. Breugelmans B, Simonet G, van Hoef V, Van Soest S, Vanden Broeck J, 2009. Pacifastin-related peptides: structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. *Peptides* 30: 622–632.
 42. Turk V, Stoka V, Turk D, 2008. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front Biosci* 13: 5406–5420.
 43. Kotsyfakis M, Sá-Nunes A, Francischetti IMB, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro JMC, 2006. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem* 281: 26298–26307.
 44. Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC, 2007. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem* 282: 29256–29263.
 45. Panzera F et al., 2007. Genome size determination in Chagas disease transmitting bugs (Hemiptera–Triatominae) by flow cytometry. *Am J Trop Med Hyg* 76: 516–521.
 46. Ribeiro JMC et al., 2014. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2594.

47. Defferrari MS, Da Silva SR, Orchard I, Lange AB, 2018. A *Rhodnius prolixus* insulin receptor and its conserved intracellular signaling pathway and regulation of metabolism. *Front Endocrinol* 9: 745.
48. Medeiros MN et al., 2011. Transcriptome and gene expression profile of ovarian follicle tissue of the triatomine bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 41: 823–831.
49. Cardoso et al., 2020. Analysis of the Testicle's Transcriptome of the Chagas Disease Vector *Rhodnius prolixus*. Available at: <https://doi.org/10.1101/616193>. Accessed December 11, 2021.
50. Sun X, Kovacs T, Hu YJ, Yang WX, 2011. The role of actin and myosin during spermatogenesis. *Mol Biol Rep* 38: 3993–4001.
51. Gibbons IR, 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. *J Cell Biol* 91: 107–124.
52. Berni M, Bressan D, Simão Y, Julio A, Oliveira PL, Pane A, Araujo HM, 2020. Pigmentation loci as Markers for Genome Editing in the Chagas Disease Vector *Rhodnius prolixus*. Available at: <https://doi.org/10.1101/2020.04.29.067934>. Accessed December 11, 2021.
53. Traverso L et al., 2017. Comparative and functional triatomine genomics reveals reductions and expansions in insecticide resistance-related gene families. *PLoS Negl Trop Dis* 11: 1–25.
54. Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochem Soc Trans* 34: 1252–1255.
55. Feyereisen R, 2012. *Insect CYP Genes and P450 Enzymes*. Gilbert LI, ed. Insect Molecular Biology and Biochemistry, Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 236–316.
56. Oakeshott JG, Claudianos C, Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ, 2005. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. *Compr Mol Insect Sci* 5–6: 309–381.
57. Enayati AA, Ranson H, Hemingway J, 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* 14: 3–8.
58. Zumaya-Estrada FA, Martínez-Barnette J, Lavore A, Rivera-Pomar R, Rodríguez MH, 2018. Comparative genomics analysis of triatomines reveals common first line and inducible immunity-related genes and the absence of Imd canonical components among hemimetabolous arthropods. *Parasit Vectors* 11: 1–16.
59. Latorre-Estivalis JM, Sterkel M, Ons S, Lorenzo MG, 2020. Transcriptomics supports local sensory regulation in the antenna of the kissing-bug *Rhodnius prolixus*. *BMC Genomics* 21: 101.
60. Roces F, Manrique G, 1996. Different stridulatory vibrations during sexual behaviour and disturbance in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Insect Physiol* 42: 231–238.
61. Justi SA, Russo CA, dos Santos Mallet JR, Obara MT, Galvão C, 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit Vectors* 7: 149.
62. Kollien AH, Billingsley PF, 2002. Differential display of mRNAs associated with blood feeding in the midgut of the bloodsucking bug, *Triatoma infestans*. *J Parasitol Res* 88: 1026–1033.
63. Bettencourt BR, Hogan CC, Nimali M, Drohan BW, 2008. Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of Hsp70 copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in Hsp70 null flies. *BMC Biol* 6: 1–15.
64. Luo M, Li D, Wang Z, Guo W, Kang L, Zhou S, 2017. Juvenile hormone differentially regulates two Grp78 genes encoding protein chaperones required for insect fat body cell homeostasis and vitellogenesis. *J Biol Chem* 292: 8823–8834.
65. Bi P, Kuang S, 2015. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 26: 248–255.
66. Rivera Pérez C, Clifton ME, Noriega FG, Jindra M, 2019. Juvenile hormone regulation and action. Saleuddin S, Lange AB, Orchard I, eds. *Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology: A Collection of Reviews in the Post-Genomic Era*. Burlington, Canada: Apple Academic Press/CRC Press, 1–77.
67. Atella GC, Gondim KC, Machado EA, Medeiros MN, Silva-Neto MA, Masuda H, 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *An Acad Bras Cienc* 77: 405–430.
68. Sterkel M, Urlaub H, Rivera-Pomar R, Ons S, 2011. Functional proteomics of neuropeptide dynamics during the feeding process of *Rhodnius prolixus*. *J Proteome Res* 10: 3363–3371.
69. Mollayeva S, Orchard I, Lange AB, 2018. The involvement of Rhopr-CRF/DH in feeding and reproduction in the blood-gorging insect *Rhodnius prolixus*. *Gen Comp Endocrinol* 258: 79–90.
70. Badisco L, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J, 2013. Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects. *Front Physiol* 4: 202.

Artigo aceito para publicação na revista The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, com fator de impacto 3,7.

Running title: **Proteomics and Metabolomics of triatomines**

Omics Tools Applied to the Study of Chagas Disease Vectors: Proteomics and Metabolomics

Kelly Cristine Borsatto¹, Monika Aparecida Coronado², Cleber Galvão^{3*}, Raghuvir Krishnaswamy Arni¹, Kaio Cesar Chaboli Alevi³

¹ Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

² Institute of Biologic Information Processing (IB-7: Structural Biochemistry), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany.

³ Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Pavilhão Rocha Lima, sala 505, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

***Corresponding author:** Cleber Galvão, IOC/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Pavilhão Rocha Lima, sala 505, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: clebergalvao@gmail.com

Abstract

Chagas disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* and is transmitted mainly by insect vectors of the Triatominae subfamily. Proteomics and metabolomics studies, in general, provided a new view of the physiology [aiding in the knowledge of the hematophagy process, of the digestive system, of the defense and the sensory apparatus (antenna)] and behavior of triatomines, besides the vector-host and parasite-vector relationship, and of the interspecific relationship both in the Triatominae subfamily (based on proximity relationship between species and triatomine genera) and between Triatominae and other groups (Diptera and order Hemiptera). Thus, we conducted a review of the proteomics and metabolomics studies on Chagas disease vectors.

Key words: Triatominae; proteome; metabolome; Chagas disease

Introduction

Chagas disease (CD) is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) and transmitted to animals and people mainly by insect vectors of the Triatominae subfamily (Hemiptera, Reduviidae)^{1,2}. It is estimated that as many as 8 million people have CD, most of whom do not know they are infected¹. If untreated in the acute phase, infection is lifelong and can be life-threatening¹.

Triatomines are hematophagous insects that have the habit of defecating/urinating during or after a blood meal^{1,2}. If infected with *T. cruzi*, they release the protozoan in feces/urine, which may result in infection of the vertebrate host^{1,2}. There are currently 157 extant species and three fossils grouped into 18 genera and five tribes that are potential vectors of *T. cruzi*³⁻⁵. The Triatomini and Rhodniini tribes (which group species of genera *Triatoma*, *Panstrongylus*, and *Rhodnius*, respectively) are the most important from an epidemiological point of view⁶.

As CD has no cure in chronic phase, vector control is the main tool to reduce the incidence of new cases^{1,2}. Thus, the World Health Organization highlights that the study of triatomines is of great epidemiological importance, as it can contribute to vector control programs in mitigating CD⁷.

Recently, Borsatto et al.^{8,9} reviewed the omics studies applied to CD vectors, with emphasis on the cytogenomics, genomics and transcriptomics of these insects, contributing knowledge of taxonomy, systematics, biology (saliva/salivary gland and metabolism, as well as the immune, reproductive, sensory, and detoxification systems) and vector control. Based on the importance of these review articles, we present a new review of the proteomic and metabolomic knowledge of triatomines.

Transcriptomics

Proteomics

Proteomics aims to identify and quantify the cellular levels of each protein encoded by the genome¹⁰. In 2007, Charneau et al.¹¹ identified 34 individual proteins in *T. infestans*, which were grouped into proteins with unknown or unidentified function, proteins supposed to function in the blood-feeding and proteins with known function (involved in blood-feeding of these vector insects).

Among the proteins identified for *T. infestans*, the sequences of three saliva proteins were combined with the translated sequence of a *triatox* gene¹¹. *Triatox* showed no sequence similarity with proteins of other organisms, and its function is still unknown; this is the first time that the *triatox* gene product has been detected, and the authors pointed out that it can comprise a new class of *Triatoma* secreted salivary proteins¹¹. Six sites of *T. infestans* crude saliva shared sequence similarities with ATPases. Besides that, phosphate-binding proteins and one spot with hydrolase were also identified. These identified salivary proteins maybe are involved in the energy metabolism associated with protein synthesis and secretion¹¹. In addition, apyrases and six lipocalin sequences with a putative triabine domain have also been identified¹¹. In the saliva of *T. infestans*, an inhibitor of collagen-induced platelet aggregation, triplatins 1 and 2, prostanoid-binding proteins modulating platelet function and vessel tonus were also identified. These proteins act by inhibiting platelet aggregation and vasoconstriction at sites of vascular injury and blood feeding, which may contribute to a successful vector-host relationship^{12,13}.

Three types of salivary lipocalins from *R. prolixus* were functionally characterized: the most abundant saliva lipocalins, which are nitrophorins, a group of nitric oxide transport proteins; lipocalins containing the protein RPAI1, which binds adenosine and its phosphates with high affinity and acts to inhibit platelet activation and aggregation;

and uncharacterized lipocalins related to thrombin inhibitor (triabine)¹⁴. All observed proteins have vasodilatory, anticoagulant, anti-inflammatory and antiplatelet activities that allow triatomines to efficiently consume a blood meal¹⁴. Besides that, an enzyme called Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase has already been found in *R. prolixus*, which may also play a role during insect feeding¹⁵.

Ribeiro et al.¹⁶ conducted a study of four genera of triatomines (*Dipetalogaster*, *Triatoma*, *Panstrongylus*, and *Rhodnius*) involving 24 species. They identified many equal proteins between species but with different expression levels from one species to another. The study showed that ATPase activity is higher than ADPase activity in *Rhodnius* (except in *R. pictipes*), whereas the genus *Triatoma* generally has higher ADPase activity than ATPase. The effect of salivary homogenates was tested on rabbit aortic rings containing and not containing functional endothelium, showing that North American *Triatoma* has potent vasodilators both in the presence and absence of endothelium. In contrast, other species of the genus, mainly from South America, have vasodilators dependent on endothelium. Most *Rhodnius* species produced more vasodilation in the absence of endothelium than in their presence (no other genera behaved this way)¹⁶.

Insect feed efficiency was also studied by Ribeiro et al.¹⁶, who observed significant qualitative and/or quantitative differences in anticoagulant, apyrase and vasodilator activities. Qualitative differences were found in the pattern of activation of cation apyrase, where *Rhodnius* is the most distinct among the insects analyzed¹⁶. *Dipetalogaster maxima* feeding on platelet-free lizards have the lowest salivary apyrase¹⁶. Based on this information, the authors suggest that other species with low apirases feed on lizards or birds; however, due to a lack of data in the literature, it was not possible to establish a relationship between salivary apyrase activity and the host for

each triatomine species. The anticoagulant activity showed a sizeable quantitative variation. However, no correlation was found with the feeding efficiency of insects – this may be because the use of anticoagulant may be for functions other than blood ingestion, such as maintaining a clear alimentary canal or fluidity of the meal in the anterior intestine after feeding¹⁶. The vasodilatory activity showed differences in quantity and quality in the insects studied, and it was possible to establish a significant relationship with feed efficiency¹⁶.

Proteomic studies with *T. pallidipennis* saliva allowed the identification of a factor that explicitly inhibits collagen-induced platelet aggregation; the protein was called pallidipine¹⁷. Studies have shown that the protein is highly specific for collagen-induced platelet aggregation. Since no effect was observed on platelet aggregation stimulated by ADP, thrombin, or thromboxane agonists, pallidipine appears to block the transduction of a signal which leads to activation platelets^{17,18}. Forty-two triabine-like proteins were obtained from *T. pallidipennis* salivary glands that were grouped according to their functions: five of them belong to the pallidipin and dipetalodipin clade; five belong to the triafestins clade; one of them to the triabin clade and thirty-one protein sequences were not grouped because they did not have a specific activity¹⁹. In addition, another study allowed the characterization of proteins present in *T. pallidipennis* saliva, being the most abundant group of proteins belonging to the triabine family²⁰. From this characterization, it was possible to observe that there are evident differences in the proteomic composition of *T. infestans* and *T. pallidipennis* saliva, once *T. infestans* has an abundance of trypsin and phosphatase, while these proteins are poorly represented in *T. pallidipennis*²⁰. Curiously, a type of enzyme converted to angiotensin has been found in *T. pallidipennis* and has not been found yet in the proteome of South American species²⁰.

Through proteomics, Assumpção et al.²¹ identified lipocalins, palidipines, antigen-5 proteins and apyrase in *D. maxima*. When comparing this set of proteins identified with what has already been described for the genus *Triatoma*, *Dipetalogaster* has a less complex set of salivary proteins, trialysin, *triatox*, kazal inhibitors, pheromone binding proteins, inositol phosphatase and serine are missing²¹. As mentioned earlier, these extra proteins presented in *Triatoma* may reflect their adaptation to mammalian feeding²¹. Proteomic studies in *T. dimidiata*, for example, have shown something already expected since this insect belongs to the genus *Triatoma*. Of the group of proteins described, 90% of the readings corresponded to lipocalin family proteins. The remaining readings were distributed among other genes expressed, such as inositol polyphosphate phosphates, protease inhibitors, antigen-5, apirases, immunity-related molecules, serine proteases, hemolysin and odorant-binding protein²².

Costa et al.²³ carried out a proteomic investigation in the saliva of *R. brethesi* and *R. robustus*, where four groups of proteins from the lipocalin family were identified: nitrophorins constituted 38% of the total identified, aggregation inhibitor proteins constituted 38%, 13% were triabin-type, and 8% were amine-binding proteins²³. All identified proteins were targeted to respond to hemostatic events, promoting the insect's blood-feeding. In addition, the authors presented, for the first time, evidence of lipocalin phosphorylation in triatomine saliva (although the biological relevance of protein phosphorylation in triatomines still needs to be explored)²³.

Rhodnius prolixus, *Paratriatoma lecticularia* and *P. lignarius* had their salivary proteomes described and compared. In grouping proteins by number, *R. prolixus* had the highest number of nitrophorines and *P. lecticularia* and *P. lignarius* had the highest number of diverse proteins²⁴. Regarding the abundance of proteins, there is also a higher number of nitrophorins in *R. prolixus* and revealed a higher abundance of diverse

lipocalins in *P. lecticularia* and *P. lignarius* once no nitrophorines were detected in *P. lecticularia* and *P. lignarius*. The lipocalin group is the main protein found in *P. lecticularia* and *P. lignarius*. Furthermore, a common protein for *R. prolixus*, *P. lecticularia* and *P. lignarius*, and another for *R. prolixus* and *P. lecticularia* has been identified. In comparing *P. lecticularia* with *P. lignarius* they found four common uncategorized proteins; besides that, between *R. prolixus* and *P. lecticularia* the protein found was 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and between *P. lecticularia* and *P. lignarius* arginine kinase ²⁴.

In order to better understand the involvement of protease in the evolutionary adaptation of hematophagy in Hemiptera, Henriques et al.²⁵ examined peptidases in the genome of *R. prolixus* and characterized them. They observed a gene expansion in three families with many peptidases (pepsin A, A1; calpain-2, C2; and leucyl aminopeptidase, M17), and suggested that these families may be involved in the process of adapting to blood-feeding in triatomines. The A1 family was the only extended gene family involved directly in the digestion of blood proteins (hemoglobin and albumin). This role is suggested by a signal peptide and expression in the intestine²⁵.

Most members of the A1 family in *R. prolixus* were grouped in phylogenetic analyses using arthropod genomic or Hemiptera transcriptomic datasets²⁵. The similarity between the A1 sequences suggests that the duplication and diversification of these genes may be an adaptation involved in the digestion of blood components in the evolutionary lineage of triatomines (the authors highlight this gene expansion as a particular characteristic of triatomines)²⁵. The other two expanded families (C2 and M17) are commonly described as cytosolic enzymes²⁵. The increased calpain genes in *Rhodnius* may be related to the need for intense intracellular traffic after a blood meal due to the secretion of induced digestive enzymes²⁵. In phylogenetic analyses, the

authors noted that most of the C2 sequences of *R. prolixus* were grouped; this grouping suggests that the expansion of the C2 family occurred after the diversification of the subtypes of hemipterans, which may be an adaptation to blood-feeding²⁵.

Even with the well-known cytosolic nature of most members of the M17 peptide family, these peptidases have already been described as important in the digestion of many organisms²⁵. Several M17 sequences in *R. prolixus* showed putative signal peptide sequences or non-cytosolic and transmembrane topologies. Hence, the authors suggest that further studies are needed to unravel the exact participation of M17 genes in the digestion of *R. prolixus*, as these proteins can be involved in the intracellular processing of secreted proteins and vesicular traffic or directly in the hydrolysis of proteins in the ingested blood²⁵. The authors also emphasize the importance of verifying whether expansions A1, C2 and M17 occurred in other members of the Triatominae family (Reduviidae) or were restricted to the species *R. prolixus* and thus, further studies are needed to corroborate their role in *R. prolixus* and other hematophagous insects²⁵.

In the C1 protease family, another important protease group in *R. prolixus*, no gene expansion was observed in the C1 gene family²⁵. One hypothesis is that the recruitment of C1 peptidases in digestion in triatomines involves other mechanisms besides the duplication of genes²⁵. Thus, overexpression of C1 genes in the midgut would be expected, which was observed in a recent analysis of the transcriptome of *R. prolixus*²⁶. Henriques et al.²⁵ emphasize that C1 peptidases should be analyzed in more detail to understand why they did not follow the same evolutionary trend as families A1, C2 and M17.

In addition, Henriques et al.²⁵ described for the first time transcripts from the M74 and S29 families in *R. prolixus*. They suggest that this great diversity of proteases may

be related not only to adaptations for the digestion of different blood proteins but also to expressions and differential roles in the different compartments (for example, salivary glands, mid and posterior intestines) and also between the various physiological moments that the insect's intestine faces during development (such as hunger, early, intermediate and final stages of blood digestion and imaginal molt)²⁵.

Oliveira et al.²⁷ compared the female and male *R. prolixus* antenna proteomes with proteins described in the genome of this species to examine their roles in chemical communication. The authors analyzed the presence of odorant-binding proteins (OBP) and phosphorylated chemosensory proteins (CSP), classified *Rhodnius* OBPs using phylogenetic analysis and verified the differences in protein expression profiles of female and male antennae of *R. prolixus*. In addition to the detection of odorous molecules, the authors suggest that the *Rhodnius* antenna may be a place where defense mechanisms are performed because a large number of proteins closely linked to detoxification, defense response and oxidative stress have been identified²⁷. Two isoforms of ferritin have also been identified in the antennae: one in the female and one in the male, which indicates that intensive iron transport can occur in the antennae, which is associated with the defense mechanisms²⁷. Have been identified: five proteins associated with vasodilation, nitrophorins (first reported on antennae), six CSPs (two of which were found exclusively on female antennae, and one was identified only on male antennae) and 17 OBPs, some of which were found in more than one location, which suggests the presence of isoforms²⁷.

The authors performed a phylogenetic analysis using amino acid sequences to obtain information about the relationships between *Rhodnius*' OBPs and propose their functions²⁷. Based on the amino acid identities, the tree obtained suggested that *Rhodnius* OBPs are grouped into four different groups, each comprising proteins related

to the OBPs of three hemipterans, namely: *R. prolixus*²⁶, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera, Aphididae)²⁸ and *Adelphocoris lineolatus* (Hemiptera, Miridae)²⁹ and two dipterans, *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae)³⁰ and *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae)³¹. The *Rhodnius* OBP cluster grouped eight proteins containing six cysteines. These proteins may be involved in transporting specific molecules related to *Rhodnius*' behavior²⁷.

In the hemipteran cluster, six OBPs were joined to *A. lineolatus* and *A. pisum*^{27,32}. This cluster reflected the evolutionary interrelationship between Heteroptera (*Rhodnius* and *Adelphocoris*) and Sternorrhyncha (*Acyrtosiphon*), suggesting that the OBPs probably maintained a conserved function even after the divergence time experienced by the Hemiptera²⁷. Despite the evolutionary distance between Diptera and Hemiptera, two *R. prolixus* OBPs were grouped with the orthodontic binding protein Lush (OBP-Lush)²⁷. OBP-Lush was first identified in the *D. melanogaster* fruit fly and was associated with alcohol detection³³. An OBP was grouped in a branch together with the OBPs of the bug *A. lineolatus*²⁷. Two OBPs identified in *Rhodnius* exhibit higher affinities to the host plant's volatile compounds³⁴. This finding suggests that *Rhodnius* may retain the ancestral ability of Cimicomorpha to detect plant volatiles compounds²⁷.

Santiago et al.³⁵ analyzed salivary multiprotein complexes from *T. infestans*, *T. dimidiata*, *D. maxima*, *R. prolixus* and *R. neglectus*. The authors identified 72 groups of proteins (PGs), which were separated into five categories (based on their biological functions): hypothetically secreted, enzyme, housekeeping, unknown and proteins derived from the mutualistic symbiont *Rhodococcus rhodnii* (Nocardiaceae). 32% of the identified proteins were assigned to the Housekeeping class, proteins associated with DNA or RNA binding/processing, protein synthesis, regulation and cytoskeleton structure. Enzymes (trypsin, metalloprotease, nuclease, isomerase, carboxylase,

transferase, among others) account for 16% of the identified proteins³⁵. Nine proteins were classified in the category of unknown function; however, only one was present in the five species analyzed. *Rhodococcus rhodnii* proteins were observed in the five species studied. The authors suggest that the roles of *R. rhodnii* proteins in the saliva of these insects need further studies as they are still poorly understood³⁵.

The hypothetically secreted category proteins are involved in the triatomine-host relationship and represent 32% of the identified proteins. Actin, thioredoxin peroxidase, triabine, hemocyanin/hexamerin, heat shock protein, histone and uncharacterized protein (T1HZ69) were present in this category and were identified in practically all species (except the species *T. dimidiata*, *T. infestans* and *R. prolixus*, that didn't present the proteins hemocyanin/hexamerin, heat shock protein and histone, respectively)³⁵. The authors point out that, in addition to triabine, none of these proteins had been previously described in triatomine saliva. Salivary proteins already known in the saliva (related to immunity, apyrases, antigen 5, procalins and nitrophorins) were also identified in this study^{17,19,22,35-37}.

The characterization of the protein profile of the digestive tract of *D. maxima*, *P. megistus*, *R. prolixus* and *T. infestans* was done by Gumiel et al.³⁸. The authors identified proteins related to the metabolic processes of cellular amides, including several enzymes involved in the activity of transcription factors and post-translational modifications, enzymes of transmembrane transport activity, proteins involved in protein digestion and carbohydrate metabolism, and enzymes associated with lipid metabolism. Furthermore, proteins related to canonical immune signaling pathways (Toll, IMD and JAK/STAT), antimicrobial peptides and annexin were also identified in the digestive tract of the four studied species³⁸.

In a proteomic study of the midgut of *R. prolixus*, proteins were identified in the anterior (AM) and posterior (PM) midgut³⁹. In terms of molecular function, the most abundant category of proteins identified was catalytic function, with hydrolases being the most represented class³⁹. Furthermore, the binding activity also presented a significant value³⁹. Other categories observed were structural functions, transporters, and gene regulators³⁹. At the biological level, the most abundant categories are cellular processes, metabolic processes and the organization or biogenesis of the cellular components³⁹. Thus, the authors show that most of the identified proteins have catalytic activity and indicate that they may be vital for the insect and those involved in the energy-related metabolism of blood proteins in *R. prolixus*³⁹.

In addition, 12 Heat Shock Proteins (HSPs) belonging to four HSP families (Hsp20, Hsp60, Hsp70 and Hsp90) were identified (HSPs identified in AM were also found in PM)³⁹. The authors suggest that the large number of HSP proteins expressed in the midgut of *R. prolixus* may be correlated with the arrival of a large amount of warm blood, which induces an increase in the insect's body temperature³⁹. Six protease inhibitors were found in AM, three of them being shared with PM³⁹. The authors propose that protease inhibitors be expressed in the midgut of *R. prolixus* due to their importance for maintaining blood fluidity in the insect's digestive tract through inhibition of thrombin activity^{39,40}. Proteins involved in hemoglobin digestion, the proteases, were also identified. In addition, lysozymes with multiple functions have been identified in AM, including bacterial digestion enzymes associated with the regulation of the bacterial flora and with the immune response³⁹.

Ouali et al.⁴¹ analyzed the initial effect of blood-feeding on protein expression in the intestine of *R. prolixus*, comparing insect midgut tissues. Of the 124 proteins expressed in the AM, 41 were classified as having an unknown function. The remaining proteins

belong to a wide range of functional classes, including i. proteases and proteins involved in gene expression; ii. lipocalins and proteins involved in signal transduction mechanisms; iii. proteins involved in amino acid metabolism; iv. protease and peritrophin inhibitors; v. some in smaller functional categories represented by proteins involved in detoxification processes; iv. involved in processing primary metabolites (carbohydrates and lipids); vii. involved in cellular metabolism; viii. protein folding; ix. involved in antimicrobial response; x. proteins involved in transport; xi. proteins involved in cytoskeleton modulation; xii. proteins involved in regulation; and xiii. proteins involved in cell cycle control and gene silencing. The level of variation in the expression of these proteins in response to blood ingestion was not uniform⁴¹.

In the PM, of the 40 identified proteins, 25 are upregulated after blood ingestion, of which 36% were lipocalins, 20% of them involved in protein folding, 12% were related to detoxification and transport, 8% in proteolysis and translation and 4% in amino acids and metabolism. Of the 15 downregulated, 20% were involved in signal transduction, 13% in detoxification processes, amino acid metabolism and cytoskeleton modulation⁴¹. Analysis of the proteins showed a potential role of the foregut in the digestion of proteins. In addition, proteins related to detoxification processes and innate immunity have also been identified⁴¹.

Henriques et al.⁴² described, for the first time, different pools of proteases involved in the digestion of blood outside the order Diptera. In experiments using cathepsin D enzyme substrate, the authors observed high proteolytic activity in tissue homogenates from the anterior and posterior midgut. They attributed this high activity to the enzyme's role in lysosomal digestion. Using a substrate for cathepsin L, it was observed that most of the activity against this substrate is in the luminal fraction of the PM of *R. prolixus*, showing that there is a secreted protease activity in this compartment, corroborating the

findings of some authors who suggest that this is the proper digestive compartment of the midgut^{42,43}.

A leucine aminopeptidase substrate was also tested, and the authors observed that the highest activity against this substrate is in the AM, with maximal activity at pH 9 (as already observed for others insects⁴⁴)⁴². To analyze the midgut's total proteolytic activity, casein, albumin, and hemoglobin substrates were used under conditions that favored the activity of cathepsin L⁴². It was observed that each substrate resulted in a different activity pattern during digestion, which means a possible division of the digestion of proteins in phases⁴². The authors suggest that this phased division may mean that alternative sets of cathepsin genes are being expressed at different time intervals during protein digestion and hypothesize that the entire digestive process may be controlled by the passage of foregut contents to the posterior through the pyloric valve.

Praça et al.⁴⁵ analyzed the proteins in the salivary gland of *T. sordida* and detected triallysin, hemolysin, Kazal-type inhibitors, salivary trypsin, metalloproteases, salivary apyrase, nucleases, secreted carboxylesterase, lysosomal aspartic protease, lipases, antigen-5 and lipocalins. Furthermore, they established evolutionary relationships between triallysin/redulisin members, showing that the short triallysins from *T. infestans*, *T. matogrossensis* and *T. sordida* are monophyletic, and that gene duplication events occurred, resulting in short trialisin homologs in *T. infestans* and *T. sordida*. The authors also suggest that short triallysin and r-triallysin were recruited into saliva before the division of triatomines and assassin bugs⁴⁵.

Relationships between the sequences of *T. sordida* lipocalins were also established, and the analyzes suggest that the salivary lipocalins of *T. sordida* evolved through gene duplication and divergence events, originating an abundant multigene family of salivary

lipocalin⁴⁵. Furthermore, the branching patterns obtained suggest that *T. sordida* is closely related to *T. matogrossensis*⁴⁵.

Metabolomic

Metabolomics is the identification and quantification of all metabolites (intermediate or end products of metabolism in a biological sample) in a sample⁴⁶. In the Triatominae subfamily, metabolomic studies are restricted to the analysis of the fecal metabolome of *R. prolixus*, *T. infestans* and *P. megistus*⁴⁷. The authors studied the fecal metabolome of these three species and observed that the uniform nucleus (conserved metabolites among the three species), which represented 78% of the metabolites found, was composed of metabolites of various categories, including fatty acids, steroids, glycerolipids, nucleotides, sugars and others. The variable nucleus (non-conserved metabolites among the three species), which represented 22% of the metabolites, was composed mainly of prenol lipids, amino acids, glycerolipids, steroids, phenols, fatty acids and derivatives, benzoic acid and derivatives, flavonoids, glycerophospholipids, benzopyranes and quinolines⁴⁷.

In addition to describing the metabolites found and comparing the species under study, Antunes et al.⁴⁷ correlated the metabolites found in the feces with the presence of *T. cruzi* and the parasite-vector interaction. The feces of Triatominae present a variety of chemical molecules, which may affect its development and infectivity⁴⁷. The authors suggest that the competence of this insect is related to the complexity of the triatomine fecal metabolome. Besides the effects of the metabolites described as a primary determinant for the relationship between parasitic and host, the variance of those metabolites has the potential to perform synergistic effects or antagonism, however,

proportions may vary according to the host insect and are important for the parasite-host relation⁴⁷.

Eberhard et al.⁴⁸ performed a metabolomic study to predict *T. cruzi* infection in *R. prolixus*. The authors observed a large proportion of lipids and lipid-like molecules that play an important role in the regulation of the fundamental metabolic process. Furthermore, the authors found a group of compounds related to immunity (eicosanoids) that act as lipid mediators, leading to specific cellular reactions to the invasion of pathogens⁴⁸. Through the statistical analysis, the authors observed a clear separation of insects exposed and not exposed to *T. cruzi* and suggest that feeding infected blood is sufficient to alter the metabolic profile of insects, regardless of whether the insect is colonized by the parasite⁴⁸. This change may be due to altered microbiota with the presence of *T. cruzi* or an insect's reaction to exposure. The statistical model suggested that these differences in the insect's metabolome could be used to determine whether or not it was exposed to the parasite with up to 94.2% accuracy⁴⁸.

Conclusion and prospects

We reviewed all studies related to proteomics and metabolomics of Chagas disease vectors, allowing for the first time, all knowledge related to the triatomine proteome and metabolome were grouped. The review made it clear that most proteomics studies focus on the physiological knowledge of the triatomines, contributing to the knowledge of saliva/salivary gland, hematophagy and metabolism, as well as of the vector-host relationship and the defense, sensory, digestive and detoxification systems of Chagas disease vectors. Already metabolomic studies were directed to characterize the fecal metabolome, emphasizing the parasite-vector relationship.

Acknowledgments

This work was financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2018/25458-3), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Ethical standards

Not applicable.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' addresses:

Kelly Cristine Borsatto, Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: kellyborsatto@gmail.com.

Monika Aparecida Coronado, Institute of Biologic Information Processing (IB-7: Structural Biochemistry), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany. E-mail: m.coronado@fz-juelich.de.

Cleber Galvão, Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Pavilhão Rocha

Lima, sala 505, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: clebergalvao@gmail.com.

Raghuvir Krishnaswamy Arni, Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: raghuvir.arni@unesp.br.

Kaio Cesar Chaboli Alevi, Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Pavilhão Rocha Lima, sala 505, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: kaiochaboli@hotmail.com.

References

1. Centers for Disease Control and Prevention, 2023. Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html>. Accessed June 08, 2023.
2. World Health Organization. Available at: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1. Accessed June 08, 2023.
3. Oliveira Correia JPSO, Gil-Santana HR, Dale C, Galvão C, 2022. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky is a junior synonym of *Triatoma williami* Galvão, Souza and Lima. *Insects* 13:591.
4. Gil-Santana HR, Chavez T, Pita S, Panzera F, Galvão C, 2022. *Panstrongylus noireaui*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys* 1104:203–225.
5. Zhao Y, Fan M, Li H, Cai W, 2023. Review of Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from China with Descriptions of Two New Species. *Insects* 14:450.

6. Justi SA, Russo CAM, Mallet JRDS, Obara MT, Galvão C, 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit. Vect.* 7:149.
7. Guhl F, Pinto N, Aguilera G, 2009. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104:71–75.
8. Borsatto KC, Coronado MA, Arni RK, Alevi, KCC. 2021. Omics Tools Applied to the Study of Chagas Disease Vectors: Cytogenomics and Genomics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 104:1973–1977.
9. Borsatto KC, Coronado MA, Galvão C, Arni RK, Alevi KCC, 2022. Transcriptomics Applied to the Study of Chagas Disease Vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 106:1042–1048.
10. Joyce AR, Palsson BØ, 2006. The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 198–210.
11. Charneau S, Junqueira M, Costa CM, Pires DL, Fernandes ES, Bussacos AC, Marcelo VS, Carlos AOR, Andrej S, Teixeira AR, 2007. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. *Int. J. Mass Spectrom.* 268:265–276.
12. Morita A, Isawa H, Orito Y, Iwanaga S, Chinzei Y, Yuda M, 2006. Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. *FEBS J.* 273:2955–2962.
13. Ma D, Assumpção TC, Li Y, Andersen JF, Ribeiro JM, Francischetti IM, 2012. Triplatin, a platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the triatomine vector of Chagas disease, binds to TXA2 but does not interact with glycoprotein PVI. *Thromb. Haemost.* 107:111–123.

14. Andersen JF, Gudderra NP, Francischetti IM, Ribeiro JM, 2005. The role of salivary lipocalins in blood-feeding by *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 58:97–105.
15. Andersen JF, Ribeiro JM, 2006. A secreted salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase from a blood-feeding insect: allosteric activation by soluble phosphoinositides and phosphatidylserine. *Biochem.* 45:5450–5457.
16. Ribeiro JM, Schneider M, Isaias T, Jurberg J, Galvão C, Guimarães JA, 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J. Med. Entomol.* 35:599–610.
17. Noeske-Jungblut C, Krätzschmar J, Haendler B, Alagon A, Possani L, Verhallen P, Donner P, Schleuning WD, 1994. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J. Biol. Chem.* 269:5050–5053.
18. Noeske-Jungblut C, Haendler B, Donner P, Alagon A, Possani L, Schleuning WD, 1995. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J. Biol. Chem.* 270:28629–28634.
19. Hernández-Vargas MJ, Santibáñez-López CE, Corzo G, 2016. An insight into the Triabin protein family of American hematophagous Reduviids: functional, structural and phylogenetic analysis. *Toxins.* 8:44.
20. Hernández-Vargas MJ, Gil J, Lozano L, Pedraza-Escalona M, Ortiz E, Encarnación-Guevara S, Alagón A, Corzo G, 2017. Proteomic and transcriptomic analysis of saliva components from the hematophagous reduviid *Triatoma pallidipennis*. *J. Proteom.* 162:30–39.
21. Assumpção TC, Charneau S, Santiago PB, Francischetti IM, Meng Z, Araújo CN, Pham VM, Queiroz RML, Castro CN, Ricart CA, Santana JM, Ribeiro

- JMC, 2011. Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*. *J. Proteom. Res.* 10:669–679.
22. Santiago PB, de Araújo CN, Charneau S, Bastos IMD, Assumpção TCF, Queiroz RML, Praça YR, Cordeiro TM, Garcia CHS, Silva IG, Raiol T, Motta FN, Oliveira JVA, Sousa MV, Ribeiro JMC, Santana JM, 2018. Exploring the molecular complexity of *Triatoma dimidiata* sialome. *J. Proteom.* 174:47–60.
23. Costa CM, Sousa MV, Ricart CAO, Santana JM, Teixeira AR, Roepstorff P, Charneau S, 2011. 2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*. *J. Proteom.* 74:1652–1663.
24. Montandon CE, Barros E, Vidigal PM, Mendes MT, Anhf ACBM, de Oliveira Ramos HJ, Oliveira CJF, Mafra C, 2016. Comparative proteomic analysis of the saliva of the *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* and *Panstrongylus herreri* triatomines reveals a high interespecific functional biodiversity. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 71:83–90.
25. Henriques BS, Gomes B, da Costa SG, Moraes CS, Mesquita RD, Dillon VM, Garcia ES, Azambuja P, Dillon RJ, Genta FA, 2017. Genome wide mapping of peptidases in *Rhodnius prolixus*: Identification of protease gene duplications, horizontally transferred proteases and analysis of peptidase a1 structures, with considerations on their role in the evolution of hematophagy in triatominae. *Front. Physiol.* 8:1–22.
26. Ribeiro JMC, et al., 2014. An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Plos. Negl. Trop. Dis.* 8: e2594.

27. Oliveira DS, Brito NF, Nogueira FCS, Moreira MF, Leal WS, Soares MR, Melo ACA, 2017. Proteomic analysis of the kissing bug *Rhodnius prolixus* antenna. *J. Insect. Physiol.* 100:108–118.
28. De Biasio F, Riviello L, Bruno D, Grimaldi A, Congiu T, Sun YF, Falabella P, 2015. Expression pattern analysis of odorant-binding proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect. Sci.* 22:220–234.
29. Gu SH, Wang SP, Zhang XY, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 41:254–263.
30. Laughlin JD, Ha TS, Jones DNM, Smith DP, 2008. Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell.* 133:1255–1265.
31. Pelletier J, Leal WS, 2009. Genome analysis and expression patterns of odorant-binding proteins from the Southern House mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *PLoS One.* 4:e6237.
32. Li M, Tian Y, Zhao Y, Bu W, 2012. Higher level phylogeny and the first divergence time estimation of Heteroptera (Insecta: Hemiptera) based on multiple genes. *PLoS One.* 7:e32152.
33. Kim MS, Repp A, Smith DP, 1998. LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 150:711–721.
34. Sun L, Gu SH, Xiao HJ, Zhou JJ, Guo YY, Liu ZW, Zhang YJ, 2013. The preferential binding of a sensory organ specific odorant binding protein of the

- alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* AlinOBP10 to biologically active host plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 39:1221–1231.
35. Santiago PB, Charneau S, Mandacaru SC, Bentes KL, DS, Bastos IMD, de Sousa MV, Ricart CAO, de Araújo CN, Santana JM, 2020. Proteomic Mapping of Multifunctional Complexes Within Triatomine Saliva. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10: 459.
 36. Paddock CD, McKerrow JH, Hansell E, Foreman KW, Hsieh I, Marshall N, 2001. Identification, cloning, and recombinant expression of procalin, a major triatomine allergen. *J. Immunol.* 167:2694–2699.
 37. Faudry E, Lozzi SP, Santana JM, D'Souza-Ault M, Kieffer S, Felix CR, Ricart CAO, Sousa MV, Vernet T, Teixeira ARL, 2004. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *J. Biol. Chem.* 279: 19607–19613.
 38. Gumiel M, Mattos DPD, Vieira CS, Moraes CS, Moreira CJDC, Gonzalez MS, Teixeira-Ferreira A, Waghabi M, Azambuja P, Carels N, 2020. Proteome of the Triatomine Digestive Tract: From Catalytic to Immune Pathways; Focusing on Annexin Expression. *Front. Mol. Biosci.* 7:589435.
 39. Ouali R, Valentim de Brito KC, Salmon D, Bousbata S, 2020. High-throughput identification of the *Rhodnius prolixus* midgut proteome unravels a sophisticated hematophagic machinery. *Proteomes.* 8:16.
 40. Friedrich T, Kroger B, Bialojan S, Lemaire HG, Hoffken HW, Reuschenbach P, Otte M, Dodt J, 1993. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 268:16216–16222.
 41. Ouali R, Vieira LR, Salmon D, Bousbata S, 2021. Early post-prandial regulation of protein expression in the midgut of Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*

- highlights new potential targets for vector control strategy. *Microorganisms*. 9:804.
42. Henriques BS, Gomes B, Oliveira PL, Garcia EDS, Azambuja P, Genta FA, 2021. Characterization of the temporal pattern of blood protein digestion in *Rhodnius prolixus*: first description of early and late gut cathepsins. *Front. physiol.* 11:509310.
 43. Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P, 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. *J. Insect Physiol.* 53:11–21.
 44. Terra WR, Ferreira C, 2012. Biochemistry and molecular biology of digestion. In *Insect molecular biology and biochemistry*. Academic press 1, 365–418.
 45. Praça YR, et al., 2021. An integrative sialomic analysis reveals molecules from *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:798924.
 46. Dayalan S, Xia J, Spicer RA, Salek R, Roessner U, 2019. Metabolome Analysis. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*; Ranganathan S, Gribskov M, Nakai K, Schönbach C. Academic Press: Massachusetts, 396–409.
 47. Antunes LCM, Han J, Pan J, Moreira CJ, Azambuja P, Borchers CH, Carels N, 2013. Metabolic signatures of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* unveiled by metabolomics. *PLoS One*. 8:e77283.
 48. Eberhard FE, Klimpel S, Guarneri AA, Tobias NJ, 2021. Metabolites as predictive biomarkers for *Trypanosoma cruzi* exposure in triatomine bugs. *Comput. Struct. Biotechnol.* 19:3051–3057.