



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterização de espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera,
Reduviidae, Triatominae) pelo método MALDI-TOF-MS**

ÉDER DOS SANTOS SOUZA

Araraquara – SP

2020

ÉDER DOS SANTOS SOUZA

Caracterização de espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método MALDI-TOF-MS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara – SP

2020

S728c

Souza, Éder dos Santos.

Caracterização de espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método MALDI-TOF-MS / Éder dos Santos Souza. – Araraquara: [S.n.], 2020. 68 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração Análises Clínicas.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

1. Triatominae. 2. *Rhodnius*. 3. Espectrometria de massas. 4. MALDI TOF MS. 5. Quimiometria. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

Ativar o Window

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: Caracterização de espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método MALDI-TOF-MS

AUTOR: ÉDER DOS SANTOS SOUZA

ORIENTADOR: JOAO ARISTEU DA ROSA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOÃO ARISTEU DA ROSA

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO OLIVEIRA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio Preto da UNESP

Profa. Dra. MARIA DAS GRAÇAS VALE BARBOSA GUERRA

Departamento de Pesquisa - Laboratório de Entomologia / Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado - Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Dra. SUELI GARDIM

Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 21 de julho de 2020

Seção Técnica de Pós Graduação


CLAUDIA LUCIA MOLINA
Supervisor Técnico de Seção



DEDICATÓRIA

À mulher da minha vida Sara Souza pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos anos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos, sem você nenhuma conquista valeria a pena.

Aos meus pais Maria de Jesus e Cristiano Souza, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência.

Aos Meus filhos **Ivan Souza e Maya Souza**, que sempre serão minhas fontes de energia para busca do sucesso.

Meu sogro **Werner Terrazas** e minha Sogra **Letícia Terrazas** que foram essências nessa caminhada, sempre dando estímulo para continuar e nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, por conceder-me a vida, saúde, força e motivação para trilhar uma carreira acadêmica.

Por preparar o caminho pelo qual consegui superar os desafios do Doutorado pelas oportunidades de adquirir sabedoria, paciência e amadurecimento de caráter em todos os sentidos.

O Prof^a. Dr^a. **João Aristeu da Rosa**, pela orientação deste trabalho, por ter concedido a oportunidade em 2013 começar esse trajeto inicial em minha carreira acadêmica, por seu exemplo e pelos recursos concedidos que fossem essências para este trabalho e por muitos anos dando sempre conselhos não apenas acadêmicos, mas para vida, serei eternamente grato.

A Prof^a. Dr^a. **Marcos Eberlin**, pela ajuda no Laboratório ThoMSom de Espectrometria de Massas-UNICAMP que concedeu o espaço para desenvolver a pesquisa pela ferramenta MALDI-TOF.

A professora Dra. **Mara Pinto** pela participação na comissão examinadora de todas as bancas que eu apresentei tanto Mestrado como Doutorado.

Ao Professor **Noberto Peporine** – USP- Ribeirão Preto pelas orientações e planejamento referente a este projeto de pesquisa.

A todos os funcionários e professores da pós-graduação, por seu comprometimento com a formação profissional dos alunos, concedendo-lhes todo suporte e orientações necessárias para o sucesso e conclusão de suas atividades na pós-graduação desta universidade.

Aos meus irmãos **Eduardo Souza** e **Ernand Pimenta** pela força durante esses anos de pesquisa.

A todos meus amigos do Laboratório (Vinícius, Gustavo, Nicolay, Tiago, Jader, Sueli, Juliana, Rossana, Heloísa, Danila, Carlos Almeida, Aline, Leticia, Lucas e Kaio), sentirei saudades lembrando sempre os dias de insetários.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido. A todos, meu muito obrigado!

Éder dos Santos Souza

“Nenhum sucesso na vida compensa o fracasso no lar”

David O. McKay

RESUMO

Triatominae são insetos hematófagos que transmitem a doença de Chagas. Entre os 19 gêneros da subfamília, aqueles com maior importância epidemiológica em relação à disseminação de *Trypanosoma cruzi* são *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. Dentre esses três gêneros, *Rhodnius* é o que apresenta maiores dificuldades para a definição específica, assim existe a necessidade de facilitar a identificação das espécies desse gênero. Neste estudo, a metodologia MALDI-MS foi utilizada para identificar 12 espécies de *Rhodnius*, dentre as 20 admitidas. A metodologia MALDI-MS permitiu a caracterização específica por meio da identificação de peptídeos e proteínas, a partir de quatro diferentes métodos de extração: A) Acetonitrila/ácido fórmico (ACN/AF), B) Acetonitrila/ ácido trifluoroacético (ACN/TFA), C) Isopropilamida/ácido fórmico (IPA/AF), e D) Metanol/ácido fórmico (MeOH/AF), e quatro tipos de matrizes MALDI/TOF: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), ácido sinápico (SA), 6-aza-2-tiotimina (ATT) e 2,6-di-hidroxiacetofenona (DHAP). Os experimentos foram realizados combinando os quatro solventes e quatro matrizes para selecionar a melhor extração/matriz de MALDI. A aplicação da técnica MALDI-TOF-MS, pela abordagem espectrométrica digital combinada com métodos quimiométricos foi capaz de distinguir com precisão as 12 espécies de *Rhodnius*. Assim, tendo em vista os resultados obtidos, a metodologia utilizada neste trabalho pode ser aplicada com rapidez, eficiência e para a identificação de espécies de *Rhodnius*.

Palavras chaves: Triatominae, *Rhodnius*, Espectrometria de massas, MALDI TOF MS, Quimiometria.

ABSTRACT

Triatominae are hematophagous insects involved in the transmission of Chagas disease. Among the 19 genera of the subfamily, those with the highest epidemiological importance regarding the dissemination of *Trypanosoma cruzi* are *Panstrongylus*, *Rhodnius*, and *Triatoma*. Of these three genera, *Rhodnius* presents the greatest difficulties for specific identification. Thus, there is a need to overcome the difficulties in identifying phenotypes of similar species of this genus. In the present study, the MALDITOF MS methodology was used to identify 12 *Rhodnius* species, among the 20 admitted. The MALDI-TOF MS methodology allowed specific characterization through the identification of peptides and proteins, starting from four different methods of extraction: (A) acetonitrile/formic acid (ACN/AF), (B) acetonitrile/trifluoroacetic acid (ACN/TFA), (C) isopropyl/formic acid (IPA/AF), and (D) methanol/formic acid (MeOH/AF), and four types of MALDI-TOF matrices: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapic acid (SA), 6-aza-2-thiothymine (ATT), and 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP). The experiments were performed by combining the four solvents and four matrices to select the best MALDI extraction/matrix. The application of the MALDI-TOF MS technique, through the digital mass spectrometry approach combined with chemometric tools, such as partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), was able to discriminate 12 species of *Rhodnius* genus, which are difficult to identify using morphological characteristics. Thus, in view of the results obtained, the methodology described in the presente article can be applied with speed and efficiency for the discrimination of Triatominae species.

Keywords: Triatominae, *Rhodnius*, Mass spectrometry, MALDI TOF MS, Chemometric.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - TESE DE DOUTORADO.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 A doença de Chagas.....	20
1.2 Triatominae, vetores de <i>T. cruzi</i>	22
1.3 Gênero <i>Rhodnius</i> Stal, 1859.....	23
1.4 Espectrometria de Massa	26
1.5 A ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)	29
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivos Específicos.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Química e Reagentes	35
3.2 Preparação de Amostras e Análise MALDI-MS	36
3.3 Dados MS	38
3.4 Análise de Dados Usando Técnicas Quimiométricas.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.1 Otimização da Extração de Peptídeo/Proteína e Matriz MALDI.....	40
4.2 Análise do Espectro de Massa de Cada Espécie de <i>Rhodnius</i>	41
4.3 Distinção das Espécies de <i>Rhodnius</i> por MALDI com Ferramentas Quimiométricas	43
5 CONCLUSÕES.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CAPÍTULO II – ARTIGOS PUBLICADOS	64
Rhodnius spp. are differentiated based on the peptide/protein profile by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and chemometric tools.	64
Distinguishing two species of Cavernicola (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry	64

CAPÍTULO I - TESE DE DOUTORADO

Caracterização de espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método MALDI TOF MS

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, em 1909, descreveu a tripanossomíase americana, que posteriormente foi denominada por doença de Chagas. Trata-se de uma enfermidade transmitida, principalmente, por insetos da subfamília Triatominae, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A doença é endêmica em 21 países da América Central e Latina e a transmissão vetorial de *T. cruzi* está restrita ao continente americano (Fig. 1) (CHAGAS, 1909; WHO, 2018).

A doença de Chagas constitui uma das mais importantes endemias do Brasil e da América Latina Coura (2009). O principal mecanismo de transmissão ocorre por meio das fezes infectadas dos triatomíneos, correspondendo a 80% dos casos da doença de Chagas, relacionadas às características próprias dos vetores, baixas condições sociais e ação desordenada do homem sobre o meio ambiente (WHO, 2018).

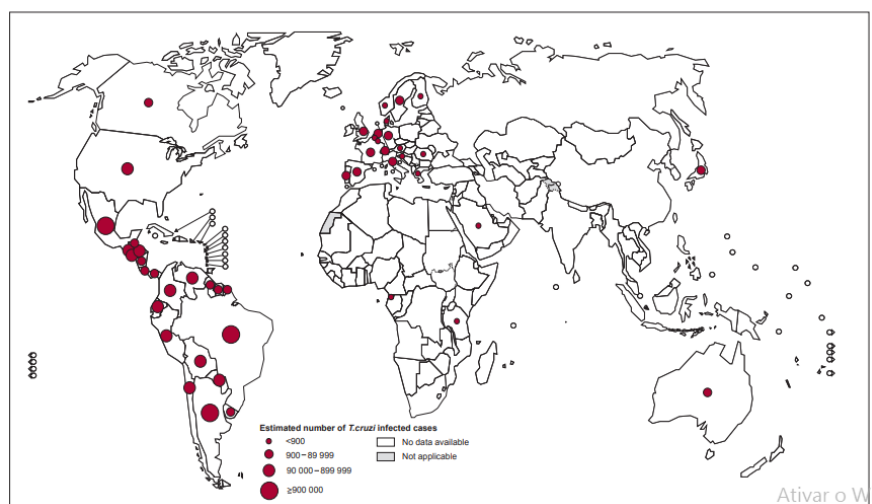


FIGURA 1. Distribuição global de casos de doença de Chagas (WHO, 2018).

O agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário eucarioto que se apresenta sob três formas principais: tripomastigota, forma flagelada não reprodutiva com membrana ondulante, seu cinetoplasto localiza-se na porção posterior do parasito e o núcleo é geralmente central; epimastigota, forma flagelada com capacidade reprodutiva por divisão binária no trato digestório do vetor, apresentando o cinetoplasto próximo ao núcleo na região central do parasito; amastigota, forma arredondada sem flagelo livre com capacidade de multiplicação intracelular (ARGOLO et al., 2008; NOIREAU et al., 2009). A forma infectante de *T. cruzi* é a tripomastigota metacíclica, que pode ser encontrada na ampola retal dos vetores, sendo liberada nas fezes. Durante o repasto sanguíneo o triatomíneo suga o sangue gerando compressão abdominal, que o leva a defecar próximo ao local da picada (Fig. 2 – etapa 1). O indivíduo então coça em resposta à reação alérgica causada pela saliva do inseto e pode contaminar a lesão da picada com fezes infectadas, ou ainda contaminar as mucosas e conjuntivas próximas, por onde o parasita penetra (Fig. 2 - etapa 2). Após a penetração no hospedeiro vertebrado, o parasito invade as células do sistema fagocítico mononuclear e assume a forma amastigota intracelular, multiplicando-se por divisão binária (Fig. 2 - etapas 3 e 4). Devido à elevação do número de parasitos a célula se rompe liberando formas tripomastigotas no interstício, que irão infectar células vizinhas disseminando-se pelo organismo por meio dos sistemas linfático e sanguíneo (Fig. 2 - etapa 5). As células mais atingidas são as do miocárdio e tecidos musculares lisos, gerando problemas principalmente no esôfago, cólon intestinal e coração,

podendo levar a insuficiência cardíaca, arritmias e em casos mais graves, ao óbito (ARGOLO et al, 2008). Durante o repasto sanguíneo, os triatomíneos podem ingerir as formas tripomastigotas circulantes no hospedeiro vertebrado (Fig. 2 - etapa 6), que ao atingirem o intestino posterior desses insetos, assumem a forma epimastigota. Então o protozoário volta a reproduzir-se assexuadamente, gerando uma infecção permanente no vetor. Esses flagelados migram para a ampola retal do inseto retomando a forma tripomastigota metacíclica, que será expelida com suas fezes (ARGOLO et al., 2008; NOIREAU et al., 2009) (Fig. 2 - etapa 1).

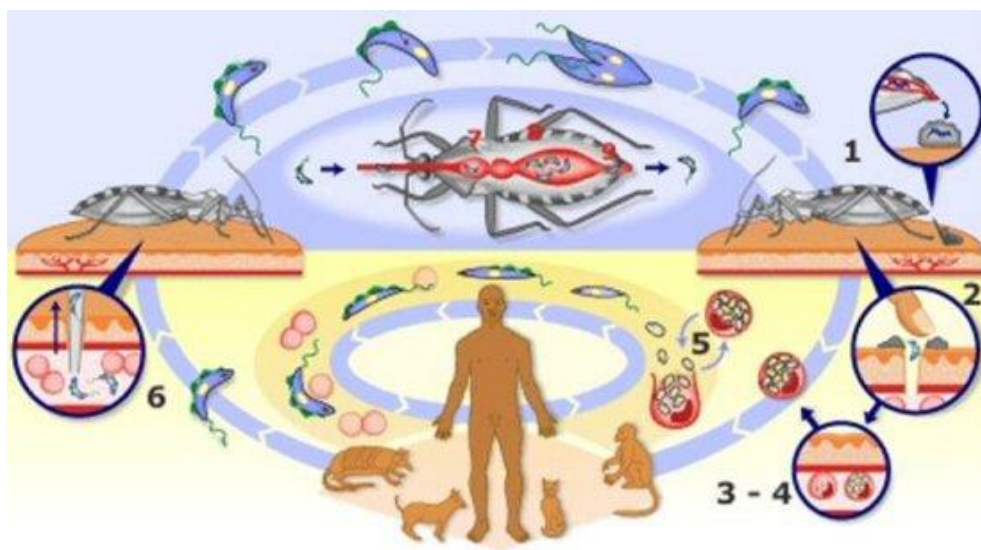


FIGURA 2. Ciclo da doença de Chagas (Argolo et al., 2008).

1.2 Triatominae, vetores de *T. cruzi*

Os triatomíneos são classificados como insetos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Descrita por Jeannel, em 1919, a subfamília Triatominae é caracterizada pela hematofagia obrigatória e pode ser diferenciada das demais subfamílias de reduviídeos por

apresentarem uma membrana entre o segundo e terceiro segmento do aparelho bucal picador-sugador. Composta, atualmente por 154 espécies e 19 gêneros, a subfamília Triatominae está dividida em cinco tribos: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodiniini e Triatomini, das quais as duas últimas são as mais diversas e epidemiologicamente relevantes (LENT; WYGODZINSKY, 1979; POINAR, 2019; DORN et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019, NASCIMENTO et al., 2019)

1.3 Gênero *Rhodnius* Stal, 1859

O gênero *Rhodnius*, foi descrito por Stal, em 1859, com base na espécie tipo *R. prolixus* Stal, 1859. Esse gênero é um dos mais estudados, não só pela sua importância epidemiológica, como também pela difícil diferenciação de suas espécies (LENT; JURBERG, 1969; LENT; WYGODZINSKY, 1979). Essa dificuldade de diferenciação foi observada, inicialmente, por Neiva e Pinto (1923). Porém, a distinção genérica não traz dificuldades conforme referido por Lent (1948) “Não existe gênero entre os Triatominae que tão bem e facilmente se caracterize, quanto o que Stal, em 1859, descreveu sob o nome de *Rhodnius*”. Com a descrição da doença de Chagas, em 1909, o estudo sobre esses vetores deu um grande impulso demonstrado nos trabalhos de Neiva a partir de 1910 (NEIVA, 1944).

Segundo Lent e Wygodzinsky (1979), as espécies de *Rhodnius* são pequenas, com comprimento total entre 11-26 mm, apresentam coloração variando desde o pardo-amarelado até o negro com manchas castanhas escuras ou pardo-negras, cabeça delgada e alongada, duas ou três vezes mais longa que a largura da cabeça e, em muitos, mais longa que o pronoto e, por fim, seus tubérculos anteníferos são curtos e inseridos na porção anterior do clipeo.

As espécies do gênero *Rhodnius* estão distribuídas em toda região amazônica, associadas, principalmente, a copas de palmeiras, embora também ocorram em ninhos de aves e habitats domésticos e peridomésticos. Por características morfológicas, comportamentais, anatômicas e genéticas, eles parecem formar um gênero monofilético com duas linhagens: o grupo “*prolixus robustus*” (*R. prolixus* Stål, 1859, *R. robustus* Larrousse, 1927, *R. milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001, *R. neglectus* Lent, 1954, *R. neivai* Lent, 1953, *R. dalessandroi* Carcavallo e Barreto, 1976, *R. domesticus* Neiva & Pinto, 1923, *R. nasutus* Stal, 1859, *R. barretti* Abad-Franch et al., 2013, *R. zeledoni* Rocha & Galvão, 2009, *R. montenegrensis* Rosa et al., 2012 e *R. marabaensis* Souza et al., 2016) principalmente no leste dos Andes, e o grupo “*pictipes*” compreende um subgrupo a leste dos Andes (*R. pictipes* Stal, 1872, *R. stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993, *R. brethesi* Matta, 1919, *R. paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977, *R. amazonicus* Almeida, Santos & Sposina, 1973) e um subgrupo oeste dos Andes (*R. pallescens* Barber, 1932, *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999, e *R. ecuadoriensis* Lent & Leon, 1958) (Abad-Franch et al., 2009, Dorn et al., 2018; Lima-Cordón et al., 2019, Nascimento et al., 2019). Algumas espécies de *Rhodnius* podem estar associadas a tipos particulares de palmeiras, como *R. brethesi* com *Leopoldinia piassaba* (Arecaceae) e *R. ecuadoriensis* com espécies *Phytelephas* Ruiz & Pav (Arecaceae). Consequentemente, a distribuição de *Rhodnius* silvestre coincide amplamente com a distribuição das palmeiras (MILLES, 1982). Trabalhos recentes sugerem que o desmatamento e a perda associada de habitat e diversidade de hospedeiros podem aumentar a frequência do contato humano com *Rhodnius* (ABAD-FRANCH et al., 2015).

Trata-se do segundo gênero mais diverso de Triatominae, depois de *Triatoma*, sendo considerados os de maior importância epidemiológica, por possuírem considerável sinantropia e capacidade de domiciliação acarretando dessa forma, no estabelecimento do elo entre o parasito e o ser humano (SCHOFIELD, 1994).

No gênero *Rhodnius* são admitidas 20 espécies e nos últimos anos as espécies desse gênero vêm ganhando destaque com relação ao surto na transmissão da doença de Chagas na região Amazônica. Isso em decorrência do aumento de número de casos na região principalmente nos estados do Pará e Amazonas, o que pode estar relacionado à migração de pessoas infectadas, ao desmatamento desenfreado e também ao consumo do açaí pela transmissão via oral (COURA et al., 2002a; 2002b; DIAS et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2019).

O gênero *Rhodnius* é, atualmente, o mais estudado não só pela importância epidemiológica das suas espécies, mas também em função da difícil diferenciação dos taxons. Existe uma enorme similaridade morfológica entre algumas espécies, o que dificulta sua identificação por meio de chaves dicotômicas convencionais, tanto para agentes de saúde, envolvidos no controle desses vetores, como para taxonomistas treinados. (GALVÃO et al., 2003).

Com decorrer dos anos, vários caracteres e metodologias foram utilizadas para facilitar a classificação e caracterização desse gênero, dentre essas abordagens pode-se citar o estudos das estruturas fálicas (LENT; JUBERG, 1965, 1968, 1975; JUBERG 1995; MEJIA et al., 1999), análise dos exocórios dos ovos (LENT; WYGODZINSKY, 1979; BARATA 1981, 1998; JUBERG et al., 2002.; COSTA et. al., 1997), descrição de ninfas (CARCAVALLO et al., 1975; 1978.; GALVÃO; FUENTES, 1971.; JUBERG et.,

1980, 1991a, 1991b, 1998a, Rocha et al., 1996; Galíndez-Giron et al., 1999;. Juberg et al., 2002), ciclo biológico (Lent e Juberg, 1968, Rocha et., al 2001a, 2001b, Almeida et al., 2003) de estudos por microscopia eletrônica (Carcavallo et al., 1994a, 1994b,1994c, Catalá e Shofield, 1994, Catalá 1997, 1998.,Silva et al., 2002), microscopia eletrônica de Varredura (Rosa, 1999, 2000, 2014; de morfometria (Galindez-Girón et al., 1994, 1999., Dujardin et al., 1997., Matias et al., 2001., Galvão et al., 2002, Santos et al., 2003) bem como análises isoenzimáticos (Noireau et al., 2000; Almeida et al., 2002., Monteiro et al., 2002) e citogenética (Panzera, 1996, Perez et al., 2003; Alevi et al., 2013; 2015a; Rosa et al., 2017).

A correta identificação das espécies é necessária, pois as que apresentam características morfológicas parecidas podem apresentar capacidades vetoriais distintas (PAVAN; MONTEIRO, 2007). Entretanto o número de taxonomista e técnicos especialistas em identificação de triatomíneos tem diminuído muito no decorrer dos anos. A disponibilidade de descrições mais apuradas e diagnoses detalhadas não tem solucionado o problema de diferenciação das espécies semelhantes, pois mesmo com entendimento das chaves dicotômicas por parte dos agentes envolvidos no controle dessa endemia, ainda percebe-se uma grande dificuldade na diferenciação de grupos mais complexos.

1.4 Espectrometria de Massa

Espectrometria de massa não é uma técnica nova. A separação de carga em partículas baseadas na massa, carga e trajetória de voo são conhecidas desde J. J. Thomson, quando verificou que o Nêônio é uma mistura de dois isótopos ^{20}Ne e ^{22}Ne (BEYNON et al., 1984).

É atribuído às famosas experiências de Thomson, em 1897, medindo a razão carga/massa do elétron, a construção do primeiro espectrômetro de massa, em 1919, que foi destinado ao seu filho. Os três componentes principais necessários para produzir um espectrômetro de massa (Fig. 3), uma fonte de íons para vaporizar e ionizar amostras; um dispositivo chamado de analisador de íons separados com base em sua massa e, finalmente, um detector para medir os íons separados (Fig. 3), (ASHTON, 1920).

A primeira sugestão de que uma massa útil de espectrômetro poderia ser desenvolvida usando o princípio do tempo de voo é atribuído Stephens em 1946, quase 50 anos após os experimentos de Thomson e mais de 25 anos após o primeiro espectrômetro de massa de Ashton. Em 1948, Cameron e Eggars relataram dados experimentais obtidos usando um instrumento TOF-MS que denominavam por velocitron (STEPHENS, 1946, CAMERON et al., 1948).

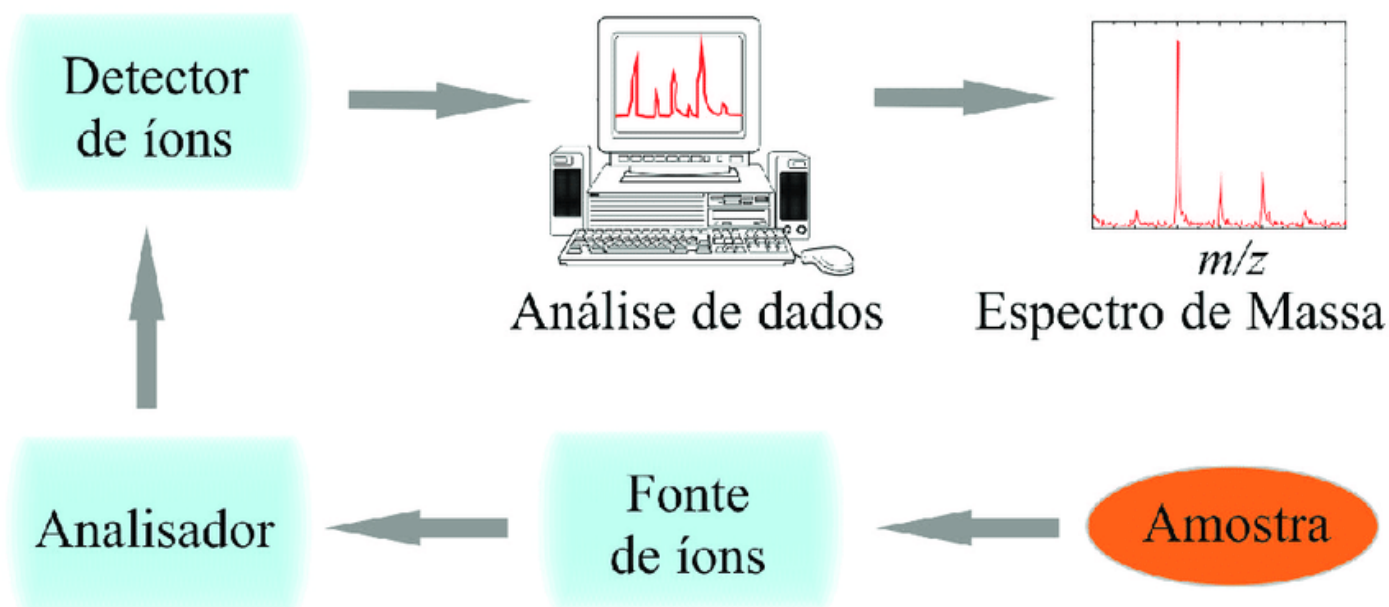


Figura 3. Componentes do espectrômetro de massas

Uma característica atraente de ambos os primeiros velocitrons e seus homólogos lineares TOF modernos é a simplicidade do projeto (Fig. 3). As três principais regiões desses instrumentos são a fonte de íons, a região de deriva (analisador de massa) e o detector. As amostras são evaporadas, ionizadas e aceleradas na fonte de íons. Tradicionalmente a evaporação é realizada por aquecimento simples, e a ionização é realizada por ionização usando elétrons de 70eV. O acelerador de íons obtêm uma velocidade dependente de massa e se move da fonte de íons para uma região de “separação”, em que íons são separados na região de deriva ou "livre de campo" (HILLENKAMP et al., 1990) (Figura 4).

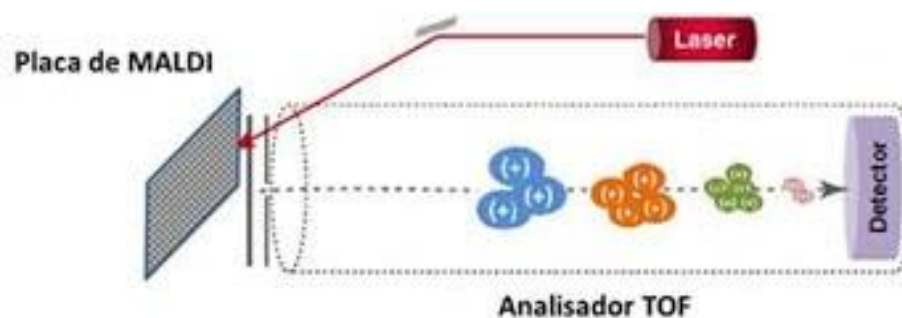


Figura 4 . Princípio do tempo de voo (TOF) de um espectrometro de massas

Suas diferentes velocidades (baseadas em massa e carga) diferenciam-nos na “Corrida” em direção ao detector. Na região do detector, os íons agora separados por massa são contados, dando origem a um sinal para cada valor m/z proporcional ao número de íons presentes (HILLENKAMP et al., 1990).

O espectrômetro de massa TOF opera em modo pulsado. Isso significa que cada espectro é produzido a partir de um “evento” discreto onde um pacote de íons é formado e acelerado. Todos esses íons do mesmo tipo (positiva ou negativamente carregados) formados no pacote original são separados no tempo (tempo de voo) com base na sua taxa de massa para carga e detectada (WILEY et al.,1955).

A diferença entre separação em “tempo” e “espaço” é uma das grandes diferenças entre TOF e muitos outros espectrômetros de massa. Com Espectrômetros de massa TOF todo o processo pode ser repetido muito rapidamente. Muitos espectros podem ser obtidos em poucos segundos, e normalmente vários espectros são calculados para produzir um espectro de massa final (SPIRIG et al., 1995).

1.5 A ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)

A ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) é uma das muitas vaporizações e métodos de ionização que foram desenvolvidos. MALDI na verdade realiza vaporização e ionização em uma única etapa. Por causa de sua aplicabilidade a biomoléculas frágeis tem sido uma das maiores conquistas em espectrometria de massa, e foi a base para parte do Prêmio Nobel de 2002 em Química concedida a Koichi Tanaka (TANAKA, 1988).

Suas vantagens podem ser mais facilmente explicadas considerando os primeiros passos necessários para obter um espectro de massa. As espécies analisadas devem ser convertidas da fase sólida (ou fase líquida) para íons de fase gasosa. Esse processo envolve vaporização e ionização (SMITH et al., 1991).

O processo MALDI é ilustrado na (Fig. 5). O analito é incorporado em um excesso muito grande de uma matriz composta depositada em uma superfície sólida chamada spot, geralmente feito de um metal (Placa de MALDI). Normalmente, cerca de 1 ml da solução de analito é misturada com o mesmo volume de uma solução de matriz saturada, antes ou durante a aplicação do spot. O solvente aquoso acetonitrila/água, ou acetona/água, seca completamente no spot que é então colocado na fonte de íons do espectrômetro de massas. Esse alvo é tipicamente feito de aço inoxidável, mas pode ser qualquer material condutor rígido (LIANG et al., 2013).

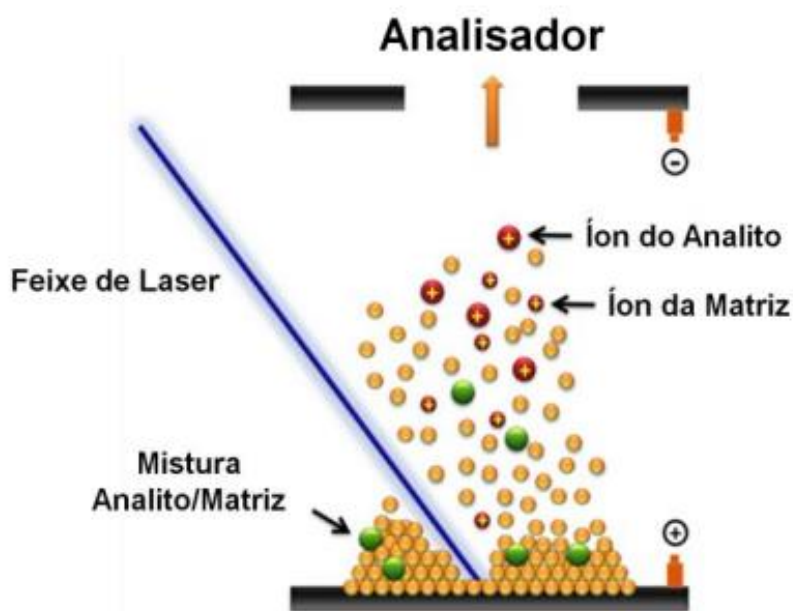


Figura 5. Princípio do MALDI-TOF, adaptado de Smith (1991).

O composto da matriz é tipicamente um ácido fraco que também absorve a luz no comprimento de onda do laser utilizado no experimento. Três compostos típicos de matriz são mostrados na (Fig. 6). Todos são compostos aromáticos, e cada um em uma porção do ácido carboxílico. Devido à matriz absorver fortemente no comprimento de onda do laser, haverá uma forte interação entre a camada sólida de matriz/analito,

independentemente das propriedades de absorção de luz do analito. Após um breve pulso de laser, o ponto irradiado é rapidamente aquecido e se torna vibracionalmente excitado, pois o processo não envolve equilíbrio, mas sim uma expansão explosiva em uma região de alto vácuo. A energia do laser é absorvida, e a energia vibracional resulta na expulsão do material acima do local irradiado (LASCH et al., 2009).

A emissão é acompanhada por uma mínima excitação vibracional dissociativa do analito. A expansão do composto de matriz "transporta" fisicamente o analito para o estado de vapor com pouco aquecimento da amostra. Por essa razão, as proteínas intactas podem ser transferidas para a fase gasosa sem a decomposição que seria esperada da evaporação induzida pelo calor normal (KARAS et al., 1987).

Esse processo resulta na transferência de espécies iônicas e neutras para o estado de vapor, pois o composto da matriz é também um ácido fraco, alguns dos analitos polares (como proteínas) atrairão prótons dos grupos de ácido carboxílico da matriz em um processo de equilíbrio ácido-base. Isso pode ocorrer no estado sólido ou por fase gasosa de transferência de prótons na região logo acima do local de dessorção. Em ambos os casos uma espécie de analito protonada em fase gasosa pode ser produzida. O espectrômetro de massa não detecta nenhum dos abundantes neutrons dessorvidos (FENSELAU, 1994).

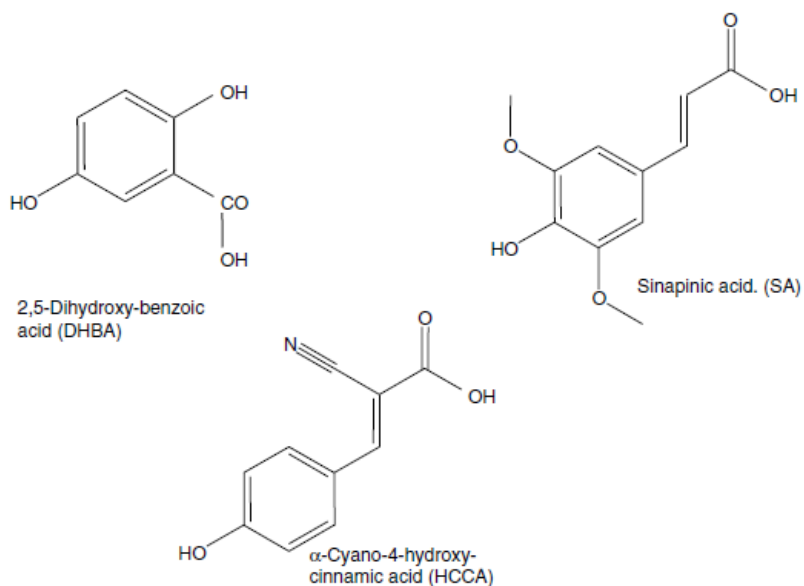


Figura 6. Fórmulas estruturais de três compostos típicos da matriz (Feltens 2010).

Na última década, o MALDI tem sido usado para identificar vários parasitas e seus vetores com base no perfil dos espectros (MURUGAIYAN; ROESLER, 2017). Os padrões foram analisados por conjuntos de softwares comerciais e técnicas quimiométricas que ajudam a processar dados, combinar semelhanças ou evidenciar perfis distintos (GIFFEN et al., 2017; ULRICH et al., 2017). Desenvolvimentos de trabalhos de campo são discutidos em algumas revisões e amostras de espécies de insetos são relatadas (Murugaiyan; Roesler, 2017; Yssouf et al., 2016), e assim identificação correta de mosquitos (Yssouf et al., 2014a), pulgas (Yssouf et al., 2014b), flebotomíneos (Dvorak et al., 2014), mosquitos picadores (Sambou et al., 2015), larvas (Steinmann et al., 2013), grilos, larvas e gafanhotos (Ulrich et al., 2017), finalmente, Laroche (2018) e Souza et al. (2019) mostraram que MALDI-TOF pode ser uma metodologia relevante para a identificação precisa de espécies de Triatominae.

Em relação às metodologias MALDI utilizadas, existem várias opções de matrizes, como o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA/CHCA), o ácido sinapínico (ácido 3, 5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico) (SA) e 2,5 ácido-dihidroxibenzóico (DHB) com protocolos de extração utilizando acetonitrila, água e ácido fórmico em diferentes proporções. Além das metodologias anteriores comentadas, não há um método universal recomendado (MURUGAIYAN; ROESLER, 2017). A rapidez dessa técnica faz dela uma abordagem adequada para estudos epidemiológicos e para o monitoramento de populações de Triatominae (LAROCHE et al., 2018).

Nesta tese, avaliou-se a eficácia da espectrometria de massas utilizando o método de ionização MALDI-MS para diferenciação rápida e segura de 12 espécies do gênero *Rhodnius*.

2 OBJETIVOS

Desenvolver metodologias analíticas por espectrometria de massas para detectar e diferenciar 12 espécies de *Rhodnius* por meio dos perfis de peptídeos/proteínas analisados por MALDI-TOF/MS.

2.1 Objetivos Específicos

A fim de se obter os melhores resultados quanto à aplicação das matrizes iônicas na análise qualitativa e quantitativa, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Escolha de uma metodologia simples e rápida para o preparo de matrizes iônicas;

- Síntese de novas matrizes que satisfaçam os parâmetros de eficiência de ionização para a análise em MALDI-MS;
- Avaliação das matrizes iônicas sintetizadas por meio do estudo de sua natureza, do preparo da amostra, da composição do analito e da intensidade do laser utilizado na análise;
- Escolha das melhores matrizes iônicas com a finalidade de aplicá-las na análise de 12 espécies de *Rhodnius*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As 12 espécies de *Rhodnius* adultos foram obtidas de colônias de Triatominae de Araraquara (CTA), mantidas no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Araraquara, (Tab. 1). De cada amostra foi dissecada um fêmur com uma lâmina cirúrgica estéril. Todos os triatomíneos vivos foram mortos por armazenamento em -80° C por 10 minutos antes do experimento. Todas as amostras foram lavadas em água estéril e secas em papel à temperatura ambiente.

Tabela 1. Relação das espécies de *Rhodnius* utilizadas.

Nome	Quantidade/sexo		CTA	Origem Geográfica
<i>R. brethesi</i>	21	10 M, 11 F	222	Amazonas- Brasil
<i>R. colombiensis</i>	21	10 M, 11 F	267	Tolima – Colombia
<i>R. marabaensis</i>	21	10 M, 11 F	284	Pará – Brasil
<i>R. montenegrensis</i>	21	10 M, 11 F	264	Rondônia – Brasil
<i>R. milesi</i>	21	10 M, 11 F	283	Pará – Brasil
<i>R. nasutus</i>	21	10 M, 11 F	211	Rio Grande do Norte - Brasil
<i>R. neglectus</i>	21	10 M, 11 F	229	Goiânia-Brasil
<i>R. neivai</i>	21	10 M, 11 F	278	Valencia – Venezuela
<i>R. pallescens</i>	21	10 M, 11 F	270	Bolivar – Colombia
<i>R. pictipes</i>	21	10 M, 11 F	268	Pará – Brasil
<i>R. prolixus</i>	21	10 M, 11 F	74	Mérida - Venezuela
<i>R. robustus</i>	21	10 M, 11 F	280	Mérida – Venezuela
Total	252			

M: macho; F: fêmea; CTA: Colônia de Triatominae de Araraquara

3.1 Química e Reagentes

Os solventes acetonitrila (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), metanol (Burdik e Jackson, Muskegon, MI), clorofórmio (Burdik & Jackson, Muskegon, MI) e 2-propanol (Burdik & Jackson, Muskegon, MI) foram utilizados, assim como as soluções ácido trifluoracético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e ácido fórmico (SigmaAldrich, St. Louis, MO). A água ultrapura utilizada para a preparo de extratos foi purificada pelo sistema de água Direct-Q (Millipore, Bedford, MA). As matrizes MALDI empregadas foram ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), ácido sinapínico (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO), 6-aza-2- tiotimina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2,6-di-hidroxiacetofenona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 2,5-di-hidroxibenzco (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Padrões de fosfolipídios, 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfo-rac-1-glicerol (DMPG), 1,2-dipalmitoil , sal monossódico de fosfato de β -glicose-3-fosfato (DPPA) e sal de sódio de 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina (DPPS) foram obtidos da Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Al , EUA).

3.2 Preparação de Amostras e Análise MALDI-MS

Um processo de otimização foi realizado para testar quatro diferentes métodos de extração peptídica/proteica e quatro matrizes MALDI, ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), ácido sinapínico (SA), 6-aza-2-tiotimina (ATT), e 2,6-di-hidroxiacetofenona (DHAP). Os perfis peptídico/proteico foram obtidos por quatro extrações independentes de amostras.

Obtenção da amostra: As pernas das espécies de *Rhodnius* foram retiradas por meio de pinças estéreis, a seguir adicionadas ao nitrogênio líquido e triturado manualmente em um cadinho de porcelana. Em seguida, a eficiência de extração peptídica/proteica das 12 espécies foi testada usando diferentes métodos.

Protocolo (A) baseado em ACN/FA. As pernas esmagadas foram transferidas para um microtubo com um bisturi estéril e suspensas em 100 μ L de FA / ACN a 70% (1:1,v/v), seguidas de 1 min de agitação em vórtice 1000 RPM. A mistura foi centrifugada a 13.000 x g durante 5 min e o sobrenadante foi transferido para uma placa MALDI.

Protocolo (B) baseado em ACN/TFA. As pernas esmagadas foram transferidas para um microtubo com um bisturi estéril e suspensas em 100 μ L de 80% de TFA e homogeneizadas por 30 min a 1000 RPM. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de 23 água Milli-Q seguido de 150 μ L de ACN. A mistura foi centrifugada a 13.000 x g durante 5 min e o sobrenadante foi transferido para uma placa MALDI. Este método foi adaptado do método de extração de isolados de *Fusarium*.

Protocolo (C) baseado em IPA/FA. As pernas esmagadas foram transferidas para um microtubo com bisturi estéril e suspensas em 50 μ L de 70% de FA e homogeneizadas por 30 min a 1000 RPM. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de água Milli-Q seguido de 50 μ L de IPA. A mistura foi centrifugada a 13.000 x g durante 5 min e o sobrenadante foi transferido para uma placa MALDI.

Protocolo (D) baseado em MeOH/FA. As pernas esmagadas foram transferidas para um microtubo com bisturi estéril e suspensas em 50 μ L de 70% de FA e homogeneizadas por 30 min a 1000 RPM. Em seguida, 100 mL de água Milli-Q foi adicionado seguido por 150 mL de MeOH. A mistura foi centrifugada a 13.000 x g durante 5 min e o sobrenadante foi transferido para uma placa MALDI.

Os sobrenadantes (gotícula de 1 μ L) de cada um dessas quatro metodologias foram depositadas numa placa MALDI (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha) e depois secos ao ar. Posteriormente, 1 μ L de solução de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) foi adicionado sobre a amostra seca e 1 μ L de extrato de proteína DH5-alfa *Escherichia coli* (Bruker-Daltonik GmbH) foi depositado no local de calibração da placa para calibração externa. A solução de matriz de CHCA foi preparada na concentração de 50 mg mL⁻¹ em (1: 1) ACN / água com 0,1% de TFA, a

matriz SA foi preparada a 30 mg mL⁻¹ em (7: 3) ACN / água com 0,1% de TFA, a matriz de ATT foi preparada a 10 mg mL⁻¹ (1: 1) de ACN / água com 0,1% de TFA e a matriz de DHPA foi preparada a 10 mg mL⁻¹ (1: 1) de ACN / água com 0,1% de TFA.

3.3 Dados MS

O MALDI-MS foi realizado num espectrómetro de massa Bruker Autoflex III MALDI-TOF/TOF equipado com um laser de feixe inteligente de 334 nm. Os perfis peptídico/proteico foram adquiridos no modo TOF linear e no modo íon positivo com uma extração retardada de 260ns a 20kV de voltagem de aceleração. Cada espectro foi coletado manualmente como uma média de 5000 disparos a laser (1000 disparos a laser em cinco diferentes posições pontuais). A energia do laser foi definida logo acima do limite para a produção de íons. Uma faixa de m/z 2000–20.000 ou m/z 600–1000 foi usada para a impressão digital de peptídeos/proteínas, respectivamente. Os espectros foram adquiridos em triplicatas por meio de AutoExecute do software de aquisição Flexcontrol (versão 2.4; Bruker-Daltonik GmbH). A análise dos dados MALDI foi realizada por três etapas distintas: (1) pré-processamento, (2) processamento e (3) análise estatística. Os espectros brutos foram pré-processados no software FlexAnalysis (BrukerDaltonik) após a subtração da linha de base para remoção de fundo, alinhamento da escala de espectros, seleção de íons com uma relação S/R maior que 3 e normalização de intensidades.

3.4 Análise de Dados Usando Técnicas Quimiométricas

No pré-processamento de dados, todos os espectros de massa MALDI foram organizados em uma matriz e os dados foram normalizados, corrigidos na linha de base e centrados na média. Análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de agrupamento (HCA) e tratamento de dados foram realizados na linguagem de programação R usando os programas ChemoSpec e Chemometrics. O HCA foi realizado usando o método de Ward (R Core Team, 2016).

Posteriormente, a discriminação entre as 12 espécies do gênero *Rhodnius* foi realizada utilizando PLS-DA, cujos princípios matemáticos da modelagem e técnica já são estabelecidos (WARD,1963). O modelo PLS-DA foi calculado usando o MATLAB (The MathWorks Natick, EUA) e o PLS Toolbox 8.7.1 da Eigenvector Research, Inc. (Manson, WA, EUA). Um algoritmo bem estabelecido de Kennard e Stone (1969) foi aplicado para selecionar 67% das amostras para o conjunto de treinamento e 33% para o conjunto de validação. O modelo PLS-DA foi pré-processado usando validação cruzada de blocos contíguos. O desempenho do modelo PLS-DA foi avaliado por parâmetros como curvas de sensibilidades (positivo/verdadeiro) (verdadeiro positivo + falso negativo), especificidade (negativo verdadeiro / verdadeiro negativo + positivo falso) e receber característica operacional (ROC) (Brown et al., 2006) para cada classe e comparar os desempenhos de classificação das 12 espécies do gênero *Rhodnius*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização da Extração de Peptídeo/Proteína e Matriz MALDI

Primeiramente, a extração utilizando o protocolo ACN/FA (A), aplicado tradicionalmente às bactérias, foi testada para todas as espécies de *Rhodnius*. No entanto, esse método de extração forneceu poucos íons MALDI-MS principalmente de baixa abundância. Três outros métodos foram, portanto, testados. O melhor MALDI-MS, conforme julgado pelo número e abundância de íons, foi obtido quando da aplicação do método ACN/TFA B, independentemente da matriz MALDI utilizada, sendo, portanto, selecionado para caracterizar todas as espécies. Quatro diferentes matrizes MALDI (CHCA, SA, ATT e DHAP) comumente usadas para análise de peptídeos/proteínas foram então testadas. CHCA forneceu de longe o melhor espectro MALDI sobre a faixa de massa de interesse (2-8 kDa) (Fig.7) e, portanto, foi selecionado.

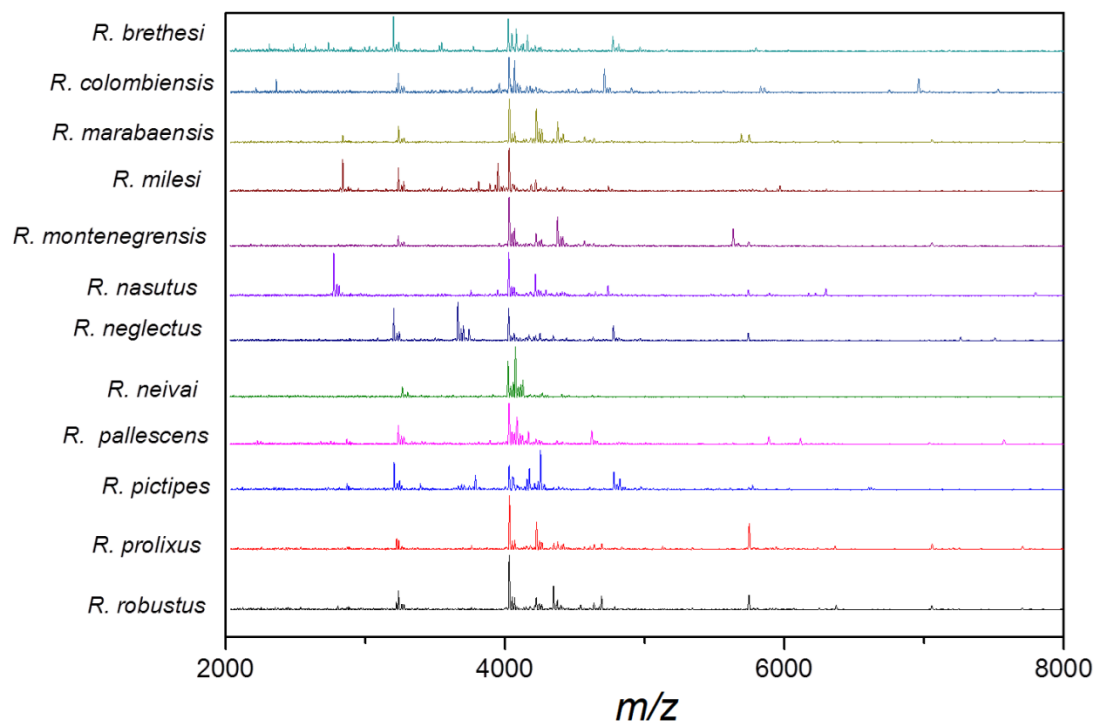


Figura 7. Espectros médios de MALDI-TOF MS das doze espécies de *Rhodnius* na região de 2.000 a 8.000 m/z .

4.2 Análise do Espectro de Massa de Cada Espécie de *Rhodnius*

Foi possível observar picos de massa de espécies, concentrados principalmente na região abaixo de 8.000 m/z , e alguns picos observados acima de 8.000 m/z . Além disso, notou-se que a região de 2.000 a 8.000 m/z apresentou um grau de variabilidade espectral dentro de cada espécie. Nessas, a intensidade dos sinais observados mostrou-se menor nas espécies de *R. neivai*, enquanto as espécies de *R. brethesi* demonstraram uma maior variedade de sinais. Portanto, uma análise espectral mais detalhada de cada espécie foi realizada nessa região (Fig. 7).

A região espectral de 4.000 a 5.000 m/z apresentou um fator de similaridade em todas as espécies, provavelmente associado ao que se estendem às demais espécies da subfamília Triatominae. No entanto, outros picos de massa no espectro pareciam ser específicos para cada espécie. Para obter uma melhor comparação dos perfis espectrais das espécies, a (Fig. 8) foi gerada a partir da lista de picos com intensidades maiores que 0,035 após a normalização dos sinais.

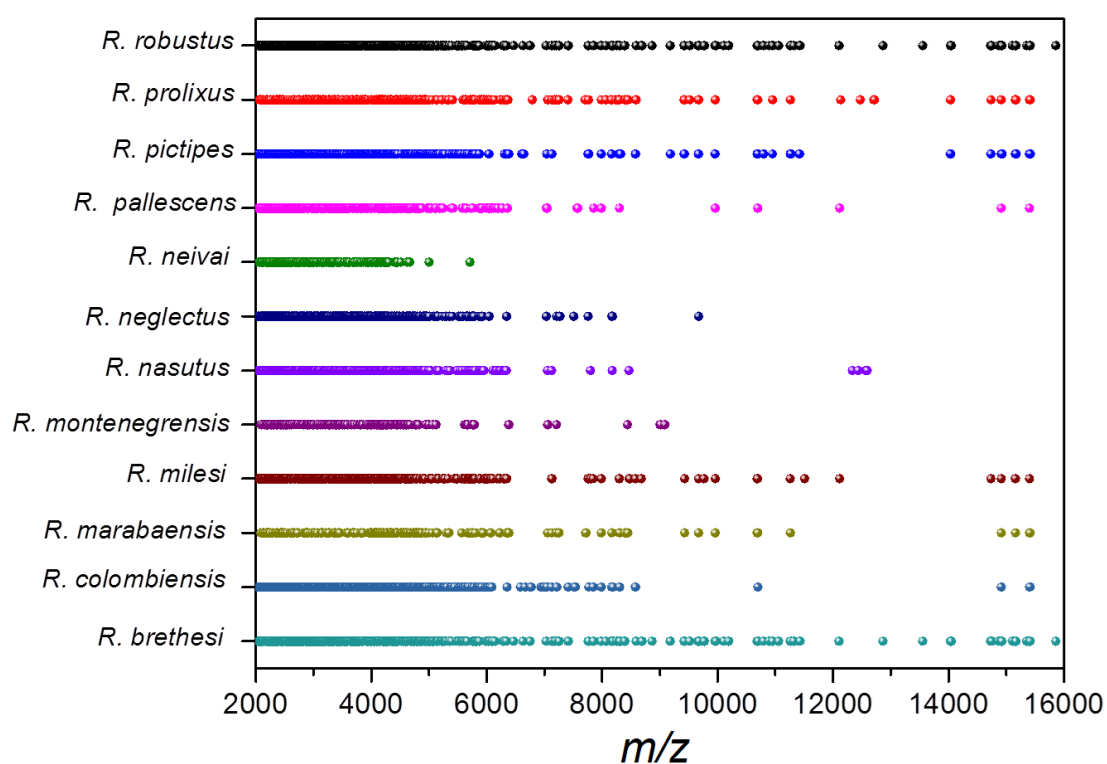


Figura 8. Pico (m/z) do espectro médio MS MALDI TOF das doze espécies de *Rhodnius* na região de 2000 a 16000 m/z .

Em relação às peculiaridades de cada espécie, a espécie *R. colombiensis* apresentou sinais únicos na região m/z baixa em 2217 e 2364, e é comparável apenas a *R. brethesi*, que apresenta uma ampla gama de sinais nessa região com valores m/z

de 2311, 2486, 2517, 2643 e 2735, entre outros. Os valores próximos a 2800 ocorrem com certa similaridade nas espécies *R. marabaensis* (2836-2840), *R. milesi* (2834-2841), *R. nasutus* (2795-2813, 2836) e na região em torno de 3220 a 3275 seis espécies, com sinais ligeiramente maiores nos outros cinco (3264-3302) e ausência dessas duas faixas na amostra de *R. nasutus*.

A inspeção visual dos espectros para a diferenciação dos espécimes é limitada tendo em conta o grande número de variáveis e quantidade de amostras. Portanto, métodos quimiométricos (HCA e PCA) foram aplicados ao conjunto de dados para facilitar a interpretação do espectro de massa MALDI-TOF (Figs. 9 e 10).

4.3 Distinção das Espécies de *Rhodnius* por MALDI com Ferramentas Quimiométricas

A análise do conjunto de dados por cluster foi utilizada devido à sua facilidade em observar similaridade entre as amostras. Dessa forma, é possível verificar mais claramente quais amostras demonstram similaridade entre elas. Com base no dendograma obtido pelas análises de MALDI TOF (Fig. 9), as amostras *R. colombiensis* e *R. pallescens* mostram a maior semelhança entre elas, fato relatado por Carcavallo no ano de 2000, Carcavallo et al. (2000), devido aos aspectos morfológicos e geográficos, seguido de *R. marabensis* e *R. prolixus*, reafirmando os achados da descrição de *R. marabaensis* (Souza et al., 2016), que difere de *R. robustus* e *R. prolixus* (Castro et al., 2020) e *R. montenegrensis* x *R. robustus*. (Carvalho et al., 2017) Três grupos com uma distância similar ao centro do cluster são formados próximos a 0,04: 1) *R. robustus*, *R. montenegrensis*, *R. prolixus* e *R. marabaensis*; 2) *R. neglectus*,

R. brethesi, *R. colombiensis*, *R. pallescens* e *R. pictipes*. 3) *R. milesi* e *R. nasutus*. Após certa distância, todas as espécies apresentam similaridade, como esperado, devido ao mesmo perfil proteômico na região 4000-5000 m/z, como discutido anteriormente.

Contudo a posição de *Rhodnius brethesi* no dendograma ilustra que essa metodologia não é adequada para obtenção de análise filogenética, como foi apontado em estudos anteriores (YOSSEF et al., 2013^a; LAROCHE et al., 2018).

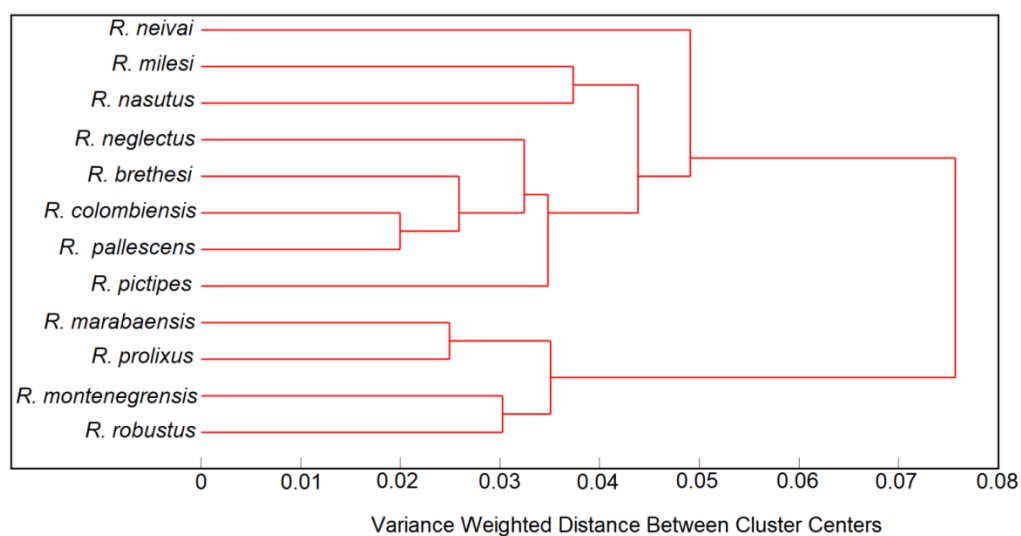


Figura 9. Dendograma por análise de agrupamento hierárquico (HCA) a partir dos dados do espectro de massa MALDI-TOF-MS das espécies de *Rhodnius*.

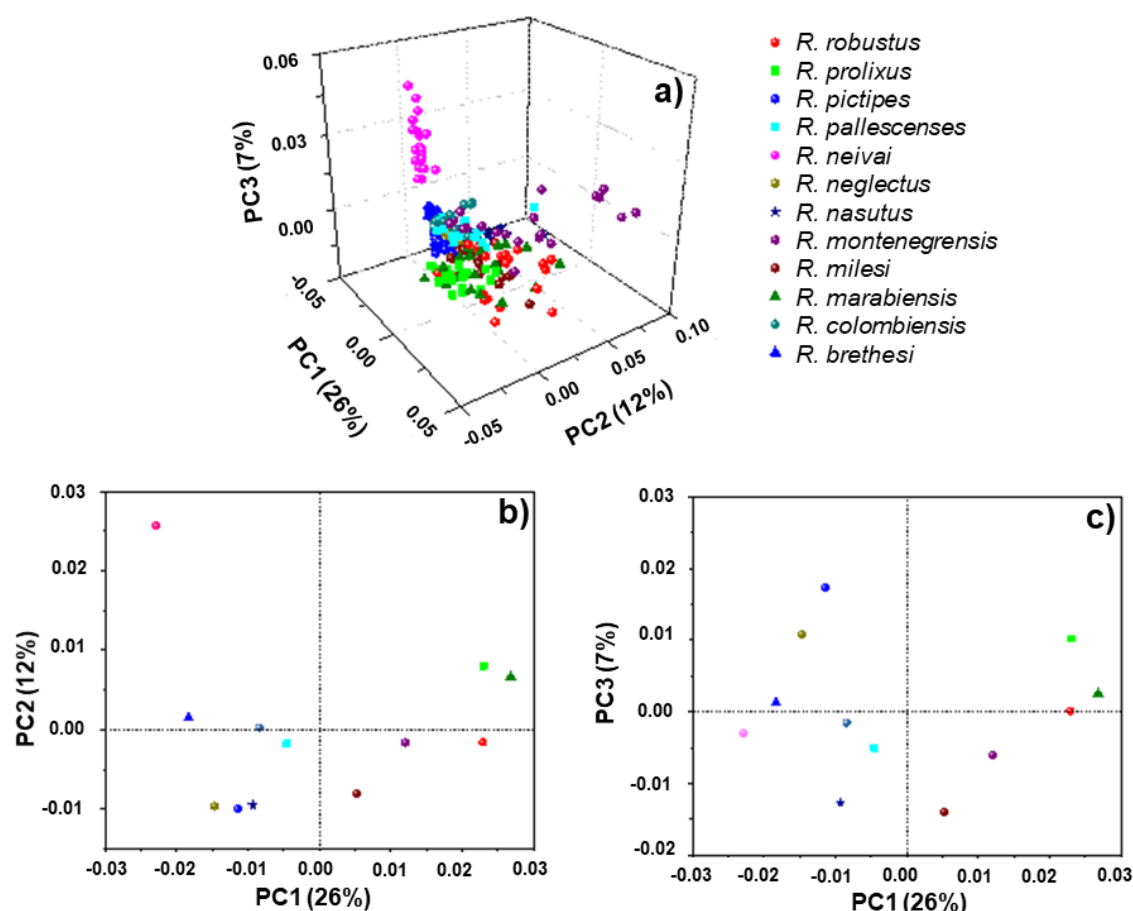


Figura 10. a) PC1, PC2 e PC3 plot score relacionados a todos os dados do espectro de massa MS MALDI-TOF das espécies de *Rhodnius* **b)** PC1xPC2 e PC1xPC2 plot score relacionados aos dados do espectro de massa MALDI-TOF-MS para cada espécie.

A análise quimiométrica PCA foi aplicada para verificar a similaridade entre as repetições estudadas pela separação das amostras no gráfico de escore (Fig. 11). A dispersão observada está relacionada à faixa dinâmica da proteômica, podendo cada espécie apresentar diferenças em proteínas e/ou peptídeos e outras moléculas complexas podem variar em cada indivíduo, além de possíveis variações no estado de carga e hidrofobicidade que podem alterar a característica da matriz e modificar a intensidade do sinal observado nas réplicas (R Core Team, 2016; Ward Jr, 1963). A dispersão das amostras em relação a cada espécie mostra espectros com

características semelhantes, fato que concorda com a massa do espectro MALDI-TOF das repetições observadas, (Fig. 10a), resulta em boa reprodutibilidade das medidas realizadas, com variações apenas nas intensidades dos sinais observados.

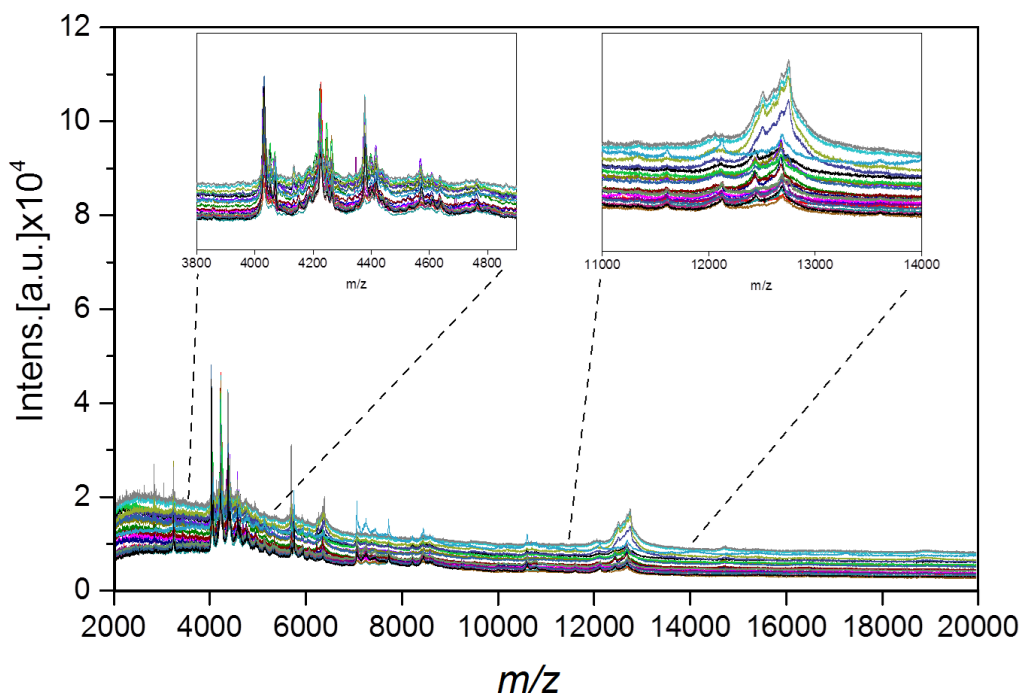


Figura 11. Espectro de massa MALDI de 21 espécimes de *R. marabaensis*.

O resultado global em relação à identificação de cada espécie por MALDI-TOF pode ser visto no gráfico de PCA dos dados médios para cada espécie (Fig. 10b), indicando claramente o sucesso na identificação pelo perfil proteômico.

O gráfico de cargas, mostrando no eixo x o número de variáveis (m/z) e no eixo y os valores de carga para PC1, PC2 e PC3 sobrepostos pode ser visualizado na Fig. 12. Na faixa de 4000 a 5000 m/z , os três PCs apresentam perfil semelhante de cargas positivas. No entanto, o PC3 tem maiores cargas positivas e maior importância na

separação de amostras. A boa reprodutibilidade das medições realizadas, com variações apenas nas intensidades dos sinais observados está representada na (Fig. 11). A discriminação entre as 12 espécies do gênero *Rhodnius* foi realizada por meio da análise parcial discriminante de mínimos quadrados (PLS-DA), pois essa técnica quimiométrica atribui uma amostra individual modelando a amostra de acordo com suas características para classes pertencentes ao conjunto de dados. Neste trabalho, o PLS-DA foi calculado relacionando a matriz X de sinais instrumentais do MALDI TOF MS a um vetor de classes de amostra nas unidades codificadas 0 e 1. Para cada amostra, o modelo prevê um valor em torno de 0 ou 1 que é então convertido em um rótulo de classe usando um limite otimizado (Biancolillo et al., 2014). Além disso, o PLS-DA é a técnica quimiométrica discriminante mais usada entre as técnicas de classificação multivariada, especialmente para matrizes de dados com um grande número de variáveis (MEHMOOD et al., 2012). O modelo PLS-DA foi construído com cinco variáveis latentes (LVs) com pré-processamento centrado na média, utilizando como critério o menor erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV), estimado usando os resultados obtidos pela validação cruzada de blocos contíguos. Esse número de VE representou 99% da variação explicada para o bloco X e 31% da variação explicada para o bloco y e foi adequado para evitar a superestimação das classificações previstas do modelo construído. Em seguida, uma seleção variável baseada na importância variável nos escores de projeção (VIP) (Mehmood et al., 2012) foi realizada nos dados, mas não mostrou melhora significativa nos resultados. Assim, os resultados obtidos pelo modelo foram obtidos sem seleção de variáveis. Os parâmetros como sensibilidade, especificidade, erro de classificação e curvas (ROC)

para conjuntos de treinamento e validação entre os valores de referência e previstos obtidos com o modelo estão representados na Tab. 2.

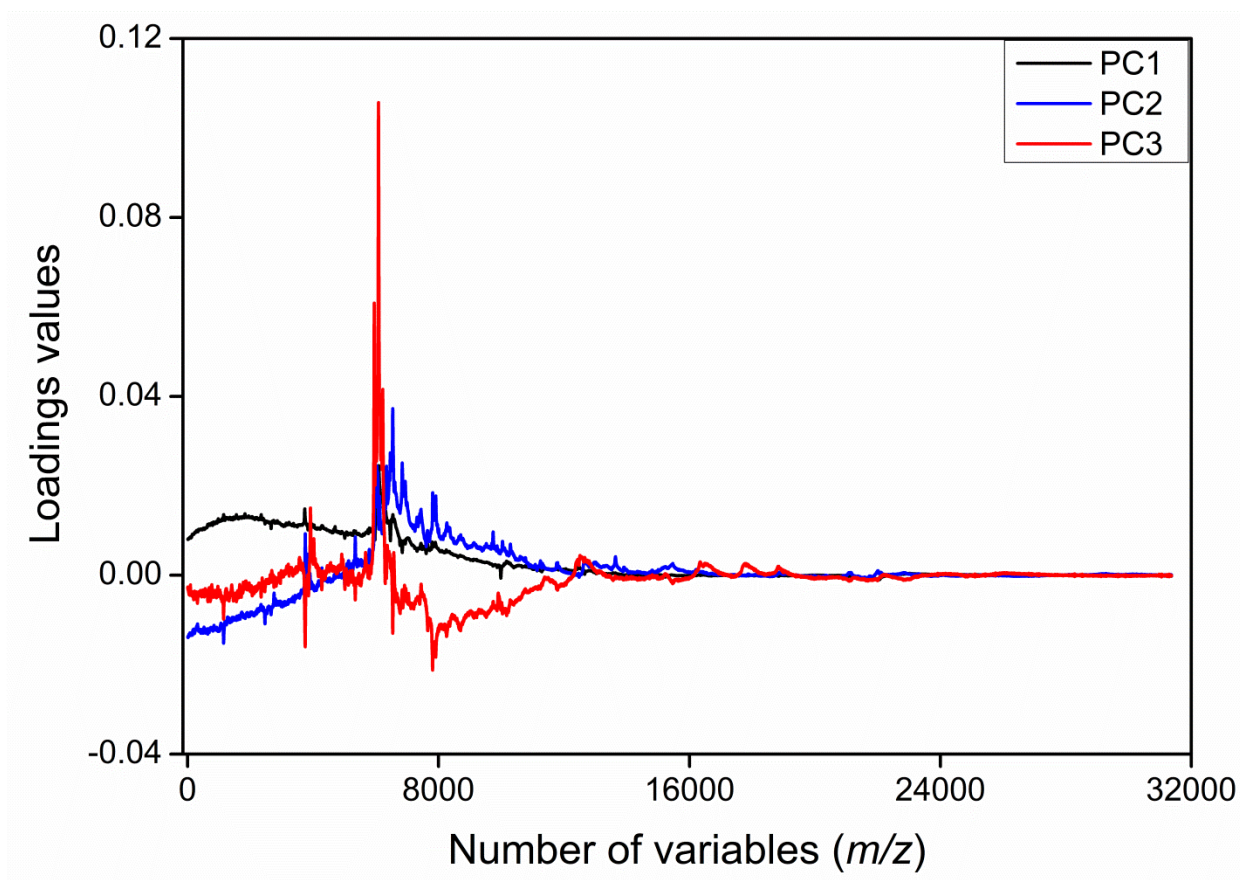


Figura 12. Gráfico de Cargas

Tabela 2 Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para conjuntos de treinamento e validação.

Parametros (%)		<i>brethesi</i>	<i>colo</i>	<i>mara</i>	<i>mlesi</i>	<i>monte</i>	<i>nasutus</i>	<i>neglectus</i>	<i>neivai</i>	<i>pallenscens</i>	<i>pictipes</i>	<i>prolixus</i>	<i>robustus</i>
Conj. treinamento	Sensibilidade	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Especificidade	83	97	89	80	93	39	88	97	80	84	89	87
Conj. Validação	Sensibilidade	100	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Especificidade	97	92	92	63	86	79	87	100	63	100	84	76
	Curva ROC	100	93	100	92	96	88	99	100	90	100	98	89

Colo = *colombiensis*; Mara = *marabaensis*; Monte = *montenegrensis*

A sensibilidade é a capacidade do modelo de classificar corretamente cada espécie do gênero *Rhodnius*. Os valores obtidos de sensibilidade foram excelentes, atingindo 100% para o conjunto de treinamento em todas as classes e variando de 75% a 100% para o conjunto de validação. Já a especificidade é a capacidade do modelo para identificar corretamente as amostras que não pertencem à classe modelada e também alcançou bons valores variando de 39% a 100% para o conjunto de treinamento e de 63% a 100% para o conjunto de validação. Os erros de classificação dos valores obtidos foram baixos, variando de 1 a 31% no conjunto de treinamento e de 0 a 19% no conjunto de validação, indicando que não há erros sistemáticos. A classificação correta global do modelo PLS-DA no conjunto de treinamento foi de 174 amostras de um total de 190 amostras, alcançando 92% de precisão. No conjunto de validação, a classificação correta global foi de 76 amostras de 95 amostras totais, alcançando 80% de precisão. As curvas ROC variaram de 88% a 100% no conjunto de validação, apresentando uma excelente capacidade de discriminação do modelo.

5 CONCLUSÕES

A aplicação da técnica MALDI-TOF-MS, por meio da técnica de espectrometria de massas combinada com métodos quimiométricos, foi capaz de distinguir com precisão 12 espécies do gênero *Rhodnius*, que tradicionalmente apresentam dificuldades de identificação por meio de caracteres morfológicos. No entanto, deve-se permanecer cauteloso, pois a confiabilidade do MALDI TOF MS para análise filogenética necessita ainda de melhor avaliação. Assim, a metodologia descrita nesta tese poderá ser aplicada de forma rápida, eficiente em um grande número de amostras, quando comparada a outras técnicas de alta precisão para identificação de espécies de Triatominae.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A.; JARAMILLO, N. O.; GURGEL-GONÇALVES, R.; DIAS, F. B. S.; DIOTAIUTI, L. Ecology, evolution and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe rhodniini (triatominae). **Acta Tropica**, [s. l.], v. 110, p. 15977, 2009.

ABAD-FRANCH, F.; LIMA, M. M.; SARQUI, O.; GURGEL-GONCALVES, R.; SANCHEZ-MARTIN, M.; CALZADA, J.; ET AL. On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 151, p. 12641, 2015.

ALEVI, K. C.; RODAS, L. A.; TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T.; GUIRADO, M. M. Entoepidemiology of Chagas disease in the Western region of the State of São Paulo from 2004 to 2008, and cytogenetic analysis in *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Triatominae). **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 14, p. 5775-5784, 2015.

ALMEIDA, C. E.; PACHECO, R. S.; NOIREAU, F. E.; COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: Isoenzymatic and chromatic factors of five populations from de state of Rio grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 829-834, 2002.

ALMEIDA, C. E.; FRANCISCHETTI C. N.; PACHECO, R. S.; E COSTA, J. *Triatoma Rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae) III: Patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 367-371, 2003.

ARGOLO, A. M; FELIZ, M; PACHECO, R; COSTA, J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008.

ASTON, F. W. The mass-spectra of chemical elements. **Philosophical Magazine**, [s. l.], v. 39, p. 611–625, 1920.

BARATA, J. M. S. Aspectos morfológicos de ovos de triatominae: II- Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera-Reduviidae). **Revista de Saúde pública**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 490-542, 1981.

BARATA, J. M. S. Macroscop and exochorial structures of Triatominae eggs/Estruturas macroscópicas e exocoriais de ovos de Triatominae. Vol. II, pp. 409-448. In Atlas of Chagas Disease Vectors in Américas/ Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas (Ru Carcavallo, I galíndez Girón, J Jurberg e H Lent eds.) Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1998.

BEYNON, J. H.; GILBERT, J. R. Applications of Transition State Theory to Unimolecular Reactions. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1984.

BIANCOLILLO, A.; BUCCI, R.; MAGRÌ, A. L.; MAGRÌ, A. D.; MARINI, F. Datafusion for multiplatform characterization of an italian craft beer aimed at its authentication. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 820. P. 23–31, 2014.

BROWN. C. D.; DAVIS, H. T. Receiver operating characteristics curves and related decision measures: a tutorial. **Chemom Intell Lab Syst**, [s. l.], v. 80. P. 24–38, 2006.

CATALÁ, S.; SHOFIELD, C. J. Antennal sensilla of *Rhodnius* **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 129, p. 193-203, 1994.

CATALÁ, S.; CROCCO, L.; MORALES, G. *Trypanosoma cruzi* transmission risk index (TcTRI): an entomological indicator of Chagas disease vectorial transmission to human. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 285-95, 1997.

CATALÁ, S. Morphology and external anatomy/Morfologia e anatomia externa. B: Antennae and rostrum/Antenas e rostro. In Atlas of Chagas' Disease Vectors in The Américas/ Atlas dos vetores da Doença de Chagas nas Américas (RU Carcavallo, I Galíndez Giron, J Juberg e H Lent eds.) Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1998.

CAMERON, A. E.; EGGERS, D. F. Ion "velocitron." **Review of Scientific Instruments**, [s. l.], v. 19, p. 605–607, 1948.

CARCAVALLO, R. U.; OTERO, M. A.; TONN, R. J.; ORTEGA, R. Notas sobre la Biología, ecología y distribución geográfica de *Psamolestes arthuri* (Pinto), 1926, (Hemiptera, Reduviidae). Descripción de los estadios preimagales. **Bol. Dir. Malariol. San. Amb**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 231-239, 1975.

CARCAVALLO, R. U.; JUSTUS, N. S.; MARTINEZ, A. M. Description de las Ninfas de II, III Y IV estadio de *Alberprosenia goyovargasi* Martinez e Carcavallo, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Observaciones con microscopia eletrônica de barrido. **Bol. Dir. Malariol. San. Amb**, [s. l.], v. 18, p. 131-132, 1978.

CARCAVALLO, R. U.; GALINDEZ, GIRÓN, I.; MARTINEZ, A.; JURBERG J. Cuticular structures of Triatominae. Their Taxonomic significance. **Entomology Vectors**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 79-91, 1994a.

CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; MARTINEZ, A. La region óculo-ocular en el género *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) **Entomology Vectors**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 21–32, 1994b.

CARCAVALLO, R. U.; GALINDEZ-GIRÓN, I.; JURBERG, J.; MARTINEZ, A. La Region óculo-ocular en el género *Panstrongylus* Berg, 1879 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) **Entomology Vectors**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 113–120, 1994c.

CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. **Entomology Vectors**, [s. l.], v. 7, p. 1–99, 2000.

CASTRO, M. R. J.; GOUBERT, C.; MONTEIRO, F. A.; VIEIRA, C.; CARARETO, C. M. A. Homology-Free Detection of Transposable Elements Unveils Their Dynamics in Three Ecologically Distinct *Rhodnius* Species. **Genes**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 170, 2020.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. agente etiológico da nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 1, p. 161–218, 1909.

COSTA, J.; BARTH, O. M.; MARCHON-SILVA, V.; ALMEIDA, C. E.; FREITAS-SIBAJEV, M. G.; PANZERA, F. Morphological studie on the *Triatoma brasiliensis* Neivai, 1911 (Hemiptera, Reduviddae, Triatominae) – Genital structures and eggs of different choromatic forms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 92, p. 493–498, 1997.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 104, p. 31–40, 2009.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES O, VALENTE S. A. S.; MILLES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 171–176, 2002a.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; BÓIA, M. N.; FENANDES, O.; BONFACE, C.; CAMPOS, J. E.; SANTOS, L.; DEVERAS, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon. IV. A new cross-sectional study. **Revista Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 159–165 , 2002b.

DE CARVALHO, D. B.; CONGRAINS, C.; CHAHAD-EHLERS, S.; PINOTTI, H.; DE BRITO, R. A.; DA ROSA, J. A. Differential transcriptome analysis supports *Rhodnius montenegrensis* and *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) as distinct species. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1–16, 2017.

DIAS, J. C. P.; VINHAES, M. C.; SILVARES, A. C.; SHOFIELD, C.J.; CARDOSO, B. E.; COURA, J. R. Pesquisas prioritárias sobre doença de Chagas na Amazônia: agenda de curto-médio prazo. **Revista Sociedade Medicina Tropical**, [s. l.], v. 34, n. 5. P. 497–498, 2001.

DORN, P.L.; JUSTI, S.A., DALE, C.; STEVENS, L.; GALVÃO, C.; LIMA-CORDON, R.; MONROY, C. Description of *Triatoma mopan* n. sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Zookeys**, [s. l.], v. 775, p. 69–95, 2018.

DVORAK, V.; HALADA, P.; HLAVACKOVA, K.; DOKIANAKIS, E.; ANTONIOU, M.;

VOLF, P. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. **Parasite and Vectors**, [s. l.], v. 7, p. 1–7, 2014.

DUJARDIN, J. P.; BERMUDEZ, H.; ASINE, C.; SCHOFIELD, C. J.; TIBAYRENC, M. Metric differences between sylvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera-Reduviidae) In Bolívia. **Jornal Medical Entomology**, [s. l.], v. 34, p. 544–551, 1997.

FENSELAU, C. Mass spectrometry for characterization of microorganisms: An overview. **ACS Symposium Series**. [s. l.], v. 541, p. 1–7, 1994.

FELTENS, R.; GÖRNER, R.; KALKHOF, S.; GRÖGER-ARNDT, H.; VON BERGEN, M. Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **BMC Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 101, p. 95, 2010.

GALÍNDEZ-GIRÓN, I.; VALDERRAMA, A.; AÑES, N.; MARQUES, V.; TORRES, E.; MADRID, S.; BARAZARTE, R.; MARQUES, J.; GONZALES, R. Algunos estudios morfométricos en los Triatominae. I. *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae). **Entomology Vectors**, [s. l.], v. 1, n.3, p. 99–111, 1994.

GALÍNDEZ-GIRON, I.; TORRES.; GALVÃO, C.; SANTOS, C. M.; LIZANO, E.; BARAZARTE, R.; MARQUEZ, J. Influência da Manutenção em Laboratório sobre o fenótipo de *Rhodnius robustus* Laroousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomology Vectors**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 677–703, 1999.

GALÍNDEZ-GIRO´ N. I.; JURBERG, J.; LENT, H. Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, vol. II. Rio de Janeiro, Brazil: FIOCRUZ, p. 74792, 1999.

GALVÃO, A. B.; FUENTES, F. B. Descrição das ninfas de *Triatoma williamsi* (B. Galvão e Col., 1965) e *T. deanei* (B. Galvão e Col., 1967). Revista **Goiana de Medicina**, [s. l.], v. 17, p. 141–145, 1971.

GALVÃO, C. A Sistemática dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de De Geer ao DNA, **Entomology Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 511–530, 2003.

GALVÃO, C.; Patterson, J.; Rocha, D. S.; Jurberg, J.; Carcavallo, R. U.; Rajen, K.; Ambrose, D. P.; Miles, M. A. A new specie of Triatominae from Tamil Nadu, India. **Medical and Veterinary Entomology**, [s. l.], v. 16, p. 75–82, 2002.

GIFFEN, J. E.; ROSATI, J. Y.; LONGO, C. M.; MUSAH, R. A. Species identification of Necrophagous insect eggs based on amino acid profile differences revealed by direct analysis in real time-high resolution mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 89, p. 7719–26, 2017.

HILLENKAMP, F.; KARAS, M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrixassisted ultraviolet laser desorption/ionization. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 193, p. 280–295, 1990.

JURBERG, J.; RANGEL, E. Observações sobre *Rhodnius robustus* Larousse, 1927 e *Rhodnius pallences* Barber, 1932 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 569–577, 1980.

JURBERG, J.; FAGUNDES, L. M.; BARTH, O. M. Estudo Morfológico de ovos e Ninfas de *Dipetalogaster Maximus* (Uhler, 1984) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) **Revista Brasileira Biologia**, [s. l.], v. 53, p. 269–283 , 1991a.

JURBERG, J.; GALVÃO, C.; BARTH, O. M. Estudo morfológico de ovos e ninfas de *Triatoma nitida* Usinger, 1939 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasil Biologia**, [s. l.], v. 53, p. 365–372, 1991b.

JURBERG, J. Uma Abordagem filogenética entre os Triatomíneos baseada nas estruturas fálicas (Hemipteras, Reduviidae) **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 50, 1995.

JURBERG, J.; SILVA, M. B. A.; GALVÃO, C.; ROCHA, D. S.; BARBOSA, H. S. CARCAVALLO. R. U. Descrição de ovos e dos estádios ninfais de *Triatoma Jurbergi* Carcavallo, Galvão e Lent, 1988 vistos através de microscopia ótica e eletrônica de Varredura (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 209–216 , 2002.

JURBERG, J.; LIMA, M. G.; ROCHA, D. S.; CARCAVALLO, R. U.; GALVÃO, C. Descrição de ovos e ninfas de *Triatoma melanossoma* Martinez, Olmedo e Carcavallo, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). **Entomology Vectors**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 67–84, 1988.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. **International Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 78, p. 53, 1987.

KENNARD, R.; STONE, L. A. **Computer aided design of experiments. Technometrics**, [s. l.], v. 11, p. 137–48, 1969.

LASCH, P.; et al. Identification of *Bacillus anthracis* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 75, p. 7229–7242, 2009.

LAROCHE, M.; BÉRENGER, J. M.; GAZELLE, G.; BLANCHET, D.; RAOULT, D.; PAROLA, P. MALDI-TOF MS protein profiling for the rapid identification of Chagas disease triatomine vectors and application to the triatomine fauna of French Guiana. **Parasitology**, [s. l.], v. 145, p. 665–675, 2018.

Lent, H. The genus *Rhodnius* Stål, 1859, Hemiptera, Reduviidae. **Revista Brasileira de Biologia**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 297–339, 1948.

LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira Biologia**, [s. l.], v. 29, p. 48–560, 1969.

LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira Biologia**, [s. l.], v. 25, p. 349–376, 1965.

LENT, H.; JURBERG, J. Estudos morfológicos comparativos de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e suas genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) **Revista Brasileira Biologia**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 499–520, 1968.

LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Panstrongylus* Berg, 1879, com um estudo sobre genitália externa das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira Biologia**. [s. l.], v. 35, n. 3, p. 379–438, 1975.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, [s. l.], v. 163, p. 123–520, 1979.

LIANG, M.; ZHANG, P.; SHU, X.; LIU, C. G.; SHU, J. N. Characterization of pollen by MALDI-TOF lipid profiling. **International Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 334, p. 14–18, 2013.

LIMA-CORDÓN, R. A.; MONROY, M. C.; STEVENS, L.; RODAS, A.; RODAS, G. A.; DORN, P. L.; ET AL. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, [s. l.], v. 820, p. 51–70, 2019.

MATIAS, A.; DE LA RIVA J. X.; TORREZ, M.; DUJARDIN, J. P. *Rhodnius robustus* in Bolívia identified by its wing. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 96, n. 7, p. 947–950, 2001.

MEHMOOD, T.; LILAND, K. H.; SNI-PEN, L.; SÆBØ, S. A review of variable selection methods in partial least squares regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s. l.], v. 118, p. 62–9, 2012.

MONTEIRO, F. A.; LAZOSKI, C.; NOIREAU, F.; SOLÉ-CAVA, A. M. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini, showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. **Medical and Veterinary Entomology**, [s. l.], v. 16, p. 83–90, 2002.

MEJIA, J. M.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. *Rhodnius colombiensis* sp.n. da Colômbia, com quadros comparativos entre estruturas fálicas do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomologia y Vectores**, [s. l.], v. 6, p. 601–617, 1999.

MILES, M. A.; DE SOUZA, A. A.; POVOA, M. Chagas disease in the Amazon basin. III. Ecotopes of ten triatominae bug species (Hemiptera: Reduviidae) from vicinity of Belém, Pará State, Brazil, **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 18, p. 266–278 , 1982.

MURUGAIYAN, J.; ROESLER, U. MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 7, p. 184, 2017.

NASCIMENTO, J. D.; ROSA, J. A.; SALGADO-ROA, F. C.; HERNÁNDEZ, C.; PARDO-DIAZ, C.; ALEVI, K. C. C.; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, J.; AZEREDO OLIVEIRA, M. T. V.; SALAZAR, C.; RAMÍREZ, J. D. Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta:Hemiptera:Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al., 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species?. **PLoS One**, [s. l.], v. 14, p. 2, 2019.

NEIVA, A. Triatomídeos, Coletânia IV, 1911-1941. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1944.

NEIVA, A.; PINTO, C. Estado actual dos conhecimentos sôbre o gênero *Rhodnius* Stål, com a descrição de uma nova espécie. **Brasil-Médico**, [s. l.], v. 37, p. 20–24, 1923.

NOIREAU, F.; BASTRENTA, B.; CATALA, S.; DUJARDIN, J. P.; PANZERA, F.; TORRES, M.; ET AL. Sylvatic population of *Triatoma infestans* from the bolivian chaco: From field collection to characterization. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 11922, 2000.

PATEL, R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 57, p. 564–572, 2014.

PANZERA, F.; PEREZ, R.; PANZERA, Y.; ALVAREZ, F.; SCVORTZOFF, E.; SALVATELLA, R. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). **Chromosome Research**, [s. l.], v. 3, p. 14350, 1996.

PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F. A. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera:

Reduviidae). **Tropical Medicine & International Health**, [s. l.], v. 12, p. 751–758 , 2007.

PEREZ, R.; PANZERA, Y.; SCAFIEZZO, S.; MAZZELLA, M. C, PANZERA, F, DUJARDIN, J. P.; SCVORTZOFF, E. Cytogenetics as a tool for Triatomine species distinction (Hemiptera-Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 87, p. 353–361, 1992.

POINAR, G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. **Cretaceous Research**, [s. l.], v. 93, p. 90–97, 2019.

R CORE TEAM, R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. project.org, 2016. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 8 Dez 2016.

ROCHA, D. S.; JUBERG, J.; CARCAVALLO, R. U.; PRESGRAVA, O. A. F.; CUNHA, V. GALVÃO, C. Influência da temperature e úmidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus*. **Revista Saúde Pública**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 400–406 , 2001.

ROCHA, D. S. Estudos Comparativos do ciclo evolutivo de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 alimentando artificialmente em membrana de silicone e em camundongos albinos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). 1996. 69p. Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Itaguaí, 1996.

ROSA, J. A.; BARATA, J. M. S, CILENSE, M.; NETO, F. M. B. Head Morphology of 1st and 5th Instar nymphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera,Reduviidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, [s. l.], v. 28, p. 363–375 , 1999.

Rosa, J. A.; Barata, J. M. S.; Santos, J. L. F.; Cilense, M. Morfologia de ovos de *Triatoma circummacutata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae) **Revista Saúde Pública**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 538–542 , 2000.

ROSA, J.; MENDONÇA, V.; GARDIM, S.; DE CARVALHO, D.; DE OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J.; ET AL. Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. **Parasite and vectors**, [s. l.], v. 7, p. 1–17, 2014.

ROSA, J. A, JUSTINO, H. H. G.; NASCIMENTO, J. D.; MENDONÇA, V. J.; ROCHA, C. S.; DE CARVALHO, D. B.; ET AL. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, [s. l.], v. 675, p. 1, 2017.

SAMBOU, M.; AUBADIE-LADRIX, M.; FENOLLAR, F.; FALL, B.; BASSENE, H.; ALMERAS, L.; ET AL. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and molecular biology techniques for identification of culicoides (diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 53, p. 410–8, 2015.

SANTOS, C. M.; JUBERG, J.; GALVÃO, C.; ROCHA, D. C.; FERNANDEZ, J. I. R. Estudos Morfométricos comparativos do gênero *Panstrongylus* (Berg, 1879), (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 98, n. 7, p. 939–944, 2003.

SCHOFIELD, C. J.; DUJARDIN, J. P. Triatominae Biologia e Controle. UK: **Eurocomunica Publications**, p.77, 1994.

SILVA, M. B. A.; BARBOSA, H. S.; JURBERG, J.; GALVÃO, C.; E CARCAVALLO, R. U. Comparative Ultrastructural analysis of the antennae of *Triatoma guazu* and *Triatoma jubergeri* (Hemiptera: Reduviidae) during the nymphal stage development. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 705–715, 2002.

STEPHENS, W. **Physical Review**, [s. l.], v. 69, p. 691, 1946.

SOUZA, E. D.; VON ATZINGEN, N. C; FURTADO, M. B; DE OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J. D.; VENDRAMI, D. P.; et al. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. **ZooKeys**, [s. l.], v. 621, p. 45–62, 2016.

SOUZA, E. D.; et al. Distinguishing two species of *Cavernicola* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Acta tropica**, [s. l.], v. 198, p. 105071, 2019.

SMITH, P. B.; SNYDER, A. P. Characterization of bacteria by quartz tube pyrolysis-gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [s. l.], v. 24, p. 23–38, 1991.

SPIRIG, T.; SEITZ, P.; VIETZE, O.; HEITGER, F. The lock-in CCD—two-dimensional synchronous detection of light. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 1705–1708, 1995.

STEINMANN, I. C.; PFLÜGER, V.; SCHAFFNER, F.; MATHIS, A.; KAUFMANN C. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for the identification of ceratopogonid and culicid larvae. **Parasitology**, [s. l.], v. 140, p. 318–27, 2013.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, S.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 2, p. 151, 1988.

ULRICH, S.; KÜHN, U.; BIERMAIER, B.; PIACENZA, N.; SCHWAIGER, K.; GOTTSCHALK, C.; ET AL. Direct identification of edible insects by MALDI-TOF mass spectrometry. **Food Control**, [s. l.], v. 76, p. 96–101, 2017.

WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, [s. l.], v. 58, p. 236–244, 1963.

WILEY, W. C.; MCLAREN, I. H. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. **Review of Scientific Instruments**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 1150–1157, 1955.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Neglected Tropical Diseases. Genève: WHO; 2018. Disponível em: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso: 30 Ago 2018.

YSSOUF, A.; FLAUDROPS, C.; DRALI, R.; KERNIF, T.; SOCOLOVSCHI, C.; BERENGER, J. M.; ET AL. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 51, p. 522–528, 2013.

YSSOUF, A.; ALMERAS, L.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Emerging tools for identification of arthropod vectors future. **Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 49–566, 2016.

YSSOUF, A.; PAROLA, P.; LINDSTRÖM, A.; LILJA, T.; L'AMBERT, G.; BONDESSON, U.; ET AL. Identification of European mosquito species by MALDI- TOF MS. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, p. 2375–8, 2014a.

YSSOUF, A.; SOCOLOVSCHI, C.; LEULMI, H.; KERNIF, T.; BITAM, I.; AUDOLY, G.; ET AL. Identification of flea species using MALDI-TOF/MS. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 37, p. 153–7, 20

CAPÍTULO II – ARTIGOS PUBLICADOS

Rhodnius spp. are differentiated based on the peptide/protein profile by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and chemometric tools.

Éder dos Santos Souza^a, Richard Perosa Fernandes^b, Wesley Nascimento Guedes^b, Fábio Neves dos Santos^c, Marcos Nogueira Eberlin^c, Norberto Peporine Lopes^d, Victor Damasceno Padovani^b, João Aristeu da Rosa^a.

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, Araraquara, São Paulo 14800-903, Brasil.

^b Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, São Paulo 14800-060, Brasil.

^c ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Instituto de Química, Universidade de Cmapinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brasil.

^d Departamento de Química e Física, Escola de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP 14049-903, Brasil.

Distinguishing two species of Cavernicola (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

Éder dos Santos Souza^a, Richard Perosa Fernandes^b, Cleber Galvão^{c,*}, Vinícius Fernandes de Paiva^d, João Aristeu da Rosa^a

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara, SP, Brasil.

^b Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil.

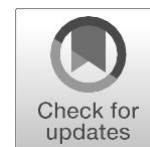
^c Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, Brasil ^d Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

RESEARCH PAPER

Rhodni Rhodnius spp. are differentiated based on the peptide/protein profile by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and chemometric tools

Éder dos Santos Souza¹  & Richard Perosa Fernandes² & Wesley Nascimento Guedes² & Fábio Neves dos Santos³ & Marcos Nogueira Eberlin³ & Norberto Peporine Lopes⁴ & Victor Damasceno Padovani² & João Aristeu da Rosa¹

Received: 27 September 2019 / Revised: 22 November 2019 / Accepted: 23 December 2019
 # Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020



Abstract

Triatominae are hematophagous insects involved in the transmission of Chagas disease. Among the 19 genera of the subfamily, those with the highest epidemiological importance regarding the dissemination of *Trypanosoma cruzi* are *Panstrongylus*, *Rhodnius*, and *Triatoma*. Of these three genera, *Rhodnius* presents the greatest difficulties for specific identification. Thus, there is a need to overcome the difficulties in identifying phenotypes of similar species of this genus. In the present study, the MALDI-TOF MS methodology was used to identify 12 *Rhodnius* species, among the 21 admitted. The MALDI-TOF MS methodology allowed specific characterization through the identification of peptides and proteins, starting from four different methods of extraction: (A) acetonitrile/formic acid (ACN/AF), (B) acetonitrile/trifluoroacetic acid (ACN/TFA), (C) isopropyl/formic acid (IPA/AF), and (D) methanol/formic acid (MeOH/AF), and four types of MALDI-TOF matrices: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapic acid (SA), 6-aza-2-thiothymine (ATT), and 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP). The experiments were performed by combining the four solvents and four matrices to select the best MALDI extraction/matrix. The application of the MALDI-TOF MS technique, through the digital mass spectrometry approach combined with chemometric tools, such as partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), was able to discriminate 12 species of *Rhodnius* genus, which are difficult to identify using morphological characteristics. Thus, in view of the results obtained, the methodology described in the present article can be applied with speed and efficiency for the discrimination of Triatominae species.

Keywords Triatominae · *Rhodnius* · Mass spectrometry · MALDI-TOF MS · Chemometric tools

Introduction

Neglected diseases represent a group of infectious and parasitic diseases that mainly affect populations that live in poor conditions around the world [1]. Among these conditions, Chagas disease affects 6 to 7 million people worldwide, causing more than 700 deaths per year, and has already been reported as an endemic disease in 21 countries in Latin America [2]. Trypanosomiasis American (1909) has the etiological agent flagellated *Trypanosoma cruzi*, which has Triatominae as a vector [3]. Most of the 154 species of Triatominae occur in the Neotropical region, including three fossils [4, 5]. However, seven *Triatoma* species, six *Linshcosteus* species, and a third fossil (*Paleotriatoma metaxytaxa*) are found in the Asian and Oceanic continents [4, 6]. The genera with the greatest epidemiological importance in

* Éder dos Santos Souza
 ederss1@hotmail.com

¹ School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (Unesp), Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, Araraquara, São Paulo 14800-903, Brazil

² Institute of Chemistry, São Paulo State University (Unesp), Araraquara, São Paulo 14800-060, Brazil

³ ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil

⁴ Department of Chemistry and Physics, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, São Paulo University, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP 14049-903, Brazil

the transmission of Chagas disease are *Panstrongylus*, *Rhodnius*, and *Triatoma*. The genus *Rhodnius* has 20 species, some of which recently described *R. montenegrensis*, *R. barretti*, and *R. marabaensis* [7–9]. The *Rhodnius* genus is one of the most commonly studied, not only due to its epidemiological importance but also because of its difficult specific distinction [10–12]. Specimens of this genus are associated with oral transmission outbreaks of Chagas disease through the ingestion of açai juice contaminated with *T. cruzi* [13–15].

Traditionally, the identification of Triatominae is performed visually or by observation of morphological characters in a stereomicroscope. However, the process is laborious and time consuming, and the possibility of misidentification frequently occurs, mainly in similar species, making identification challenging and often impossible [16–18].

The identification of Triatomines is very important in epidemiological surveillance, since the control of these vectors is fundamental for the prophylaxis of Chagas disease, helping in the diagnosis of parasites that can be transmitted [19–23]. New approaches have been used over the years to differentiate *Rhodnius* species, including cytogenetics, scanning electron microscopy (SEM), morphometry, and molecular methods [24–30]. The molecular methods as PCR are efficient as they can be used in all evolutionary stages of the vectors; however, they are laborious, expensive, and time consuming.

In the last decade, MALDI has been used to identify several parasites and their vectors based on spectra profile [31]. Patterns were analyzed by commercial software suites and chemometrics tool that help to process data, match similarities, or evidence distinct profiles [32, 33]. Developments in the field are discussed in some reviews and insect's species samples are previously reported

[31–34], with efficient distinction of mosquitos [35], fleas [36], sand flies [37], biting midges [38], larvae [39], crickets, buffalo worms, mealworm, and grasshoppers [33]. Finally, Laroche et al. and Souza et al. [40, 41] showed that MALDI-TOF MS appears to be a relevant tool for the precise identification of eight species included in four genera of Triatominae vectors in French Guiana and two species of genera *Cavernicola*. In that study, molecular biology techniques will be applied on differentiation of species and as a validation method of the MALDI-TOF data. However, their absence does not invalidate the results obtained by the MALDI-TOF technique.

In this work, the efficacy of MALDI-TOF MS combined with chemometric tools for rapid discrimination of 12 species of *Rhodnius* genus was evaluated, as well as improve the reference database of these species, in order to contribute to increasing the tools for discrimination and knowledge of the different species of Triatominae.

Materials and methods

Triatominae

The 12 species of *Rhodnius* genus comprising 285 samples were obtained from Triatominae Insectarium of the Faculty of Pharmaceutical Sciences/UNESP, Araraquara, kept alive in glass bottles, and designated by the acronym CTA (Triatominae Colony Araraquara) followed by a number that indicates the number of colonies already established (Table 1). The Triatominae Insectarium has operating permission for scientific research purposes, obtained from Animal Ethics Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara - UNESP (CEUA / FCF / CAR: 15/2017).

Table 1 Identification of the *Rhodnius* species used

Name	Quantity/sex	CTA	Geographical origin
<i>R. brethesi</i>	24—10 M, 14 F	222	Amazonas, Brazil
<i>R. colombiensis</i>	24—10 M, 14 F	267	Tolima, Colombia
<i>R. marabaensis</i>	24—10 M, 14 F	284	Pará, Brazil
<i>R. montenegrensis</i>	24—10 M, 14 F	264	Rondônia, Brazil
<i>R. milesi</i>	24—10 M, 14 F	283	Pará, Brazil
<i>R. nasutus</i>	24—10 M, 14 F	211	Rio Grande do Norte, Brazil
<i>R. neglectus</i>	24—10 M, 14 F	229	Goiânia, Brazil
<i>R. neivai</i>	24—10 M, 14 F	278	Valencia, Venezuela
<i>R. pallescens</i>	21—10 M, 11 F	270	Bolívar, Colombia
<i>R. pictipes</i>	24—10 M, 14 F	268	Pará, Brazil
<i>R. prolixus</i>	24—10 M, 14 F	74	Mérida, Venezuela
<i>R. robustus</i>	24—10 M, 14 F	280	Mérida, Venezuela
Total	285		

M male, F female, CTA Triatominae Colony of Araraquara

Chemicals and reagents

The chemical and reagent protocols used were previously described by our research group such as the following. The solvents acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), methanol (Burdik & Jackson, Muskegon, MI), chloroform (Burdik & Jackson, Muskegon, MI), and 2-propanol (Burdik & Jackson, Muskegon, MI) were used, and the solutions trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and formic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Ultrapure water used for the preparation of extracts was purified by the Direct-Q water system (Millipore, Bedford, MA). The MALDI matrices were α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), sinapinic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 6-aza-2-thiothymine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2,6-dihydroxyacetophenone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 2,5-dihydroxybenzoic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Phospholipids standards, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (DMPG), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium salt (DPPA), and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine sodium salt (DPPS) were obtained from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA) [42].

Sample preparation and MALDI-TOF MS analysis

Four different peptide/protein extraction methods were tested on four different MALDI matrices, such as α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapinic acid (SA), 6-aza-2-thiotimin (ATT), and 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP). Three individual extractions were performed on each strain sample to obtain the peptide/protein profiles.

Maceration was done using sterile tweezers to remove six legs of each specimen, and then added to liquid nitrogen and crushed manually in a porcelain crucible. Then the efficiency of peptide/protein extraction species of *Rhodnius* genus was tested using these different methods previously published, as described below.

Protocol (A) based on ACN/FA. The crushed legs were transferred to a microtube using a sterile spatula, where 100 μ L of 70% FA/ACN (1: 1, v/v) was added. This sample was vortexed at 1 min and then centrifuged at 13,000 $\times g$ for 5 min. The obtained supernatant was transferred to a MALDI plate [42].

Protocol (B) based on ACN/TFA. The crushed legs were transferred to a microtube using a sterile spatula, where 100 μ L 80% of TFA was added. This content was homogenized for 30 min at 1000 rpm. Thus, 100 μ L of water Milli-Q was added and then 150 μ L of ACN, followed by centrifugation at 13,000 $\times g$ for 5 min. The obtained supernatant was transferred to a MALDI plate. This method was adapted from Marinach-Patrice et al. [43].

Protocol (C) based on IPA/FA. The crushed legs were transferred to a microtube using a sterile spatula, where 50 μ L 70% of FA was added and homogenized for 30 min at 1000 rpm. Next, 100 μ L of water Milli-Q was added and then 50 μ L of IPA, followed by centrifugation at 13,000 $\times g$ for 5 min. The obtained supernatant was transferred to a MALDI plate [42].

Protocol (D) based on MeOH/FA. The crushed legs were transferred to a microtube using a sterile spatula, where 50 μ L 70% of FA was added and homogenized for 30 min at 1000 rpm. Next, 100 μ L of water Milli-Q was added and then 150 μ L of MeOH, followed by centrifugation at 13,000 $\times g$ for 5 min. The obtained supernatant was transferred to a MALDI plate [42].

After sample preparation described above, the supernatants were applied (1 mL droplet) upon a MALDI plate (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and then air-dried. Then the matrix solution was placed over the dried sample. For external calibration, 1 mL of DH5- α *Escherichia coli* protein extract (Bruker-Daltonik GmbH) was applied at the plate calibration point. For the preparation of the matrix solutions, a concentration of 50 mg mL⁻¹ in (1:1) ACN/water with 0.1% TFA for CHCA matrix was employed, 30 mg mL⁻¹ in (7:3) ACN/0.1% TFA water for SA matrix, 10 mg mL⁻¹ in (1:1) ACN/0.1% TFA water for ATT matrix and 10 mg mL⁻¹ in (1:1) ACN/water with 0.1% TFA for the DHPA matrix [42].

MS data

For analysis, a Bruker Autoflex III MALDI - TOF/TOF mass spectrometer equipped with a 334-nm smart beam laser was used, configured in linear TOF mode and positive ion mode with delayed extraction of 260 ns at 20 kV acceleration voltage, to obtain the peptide/protein profiles. Each spectrum was automatically collected with 1000 laser shots at five different point positions, averaging 5000 laser shots. Laser energy was set just above the threshold for ion production. A range of 600–1000 m/z or 2000–20,000 m/z was used for the peptide/protein fingerprint, respectively. Spectra were measured in triplicate using the AutoExecute tool from Flexcontrol acquisition software (version 2.4; Bruker-Daltonik GmbH). The MALDI data were analyzed in 3 steps: (1) preprocessing, (2) processing, and (3) statistical analysis. FlexAnalysis (BrukerDaltonik) software was employed for raw spectra preprocessing, such as baseline subtraction for background removal, spectral scale alignment, ion selection with an S/N ratio greater than 3 and intensity normalization[42].

Data analysis using chemometric tools

In the data preprocessing, all MALDI mass spectrums were organized in one matrix and data were normalized, baseline-corrected, and mean centered. Principal component analysis

(PCA), hierarchical clustering analysis (HCA), and data treatment were performed in R programming language using the following packages: *ChemoSpec* and *Chemometrics*. HCA was performed using Ward's method [44, 45].

Afterwards, the discrimination among 12 species of *Rhodnius* genus was performed using PLS-DA whose mathematical principles of the modeling of the technique is reported [46]. The PLS-DA model was computed using MATLAB 2014a (The MathWorks Natick, USA) and PLS Toolbox 8.7.1 from Eigenvector Research, Inc. (Manson, WA, USA). An established Kennard and Stone's algorithm [47] was applied to select 67% of the samples for training set and 33% for validation set. PLS-DA model was pre-processed using contiguous blocks cross-validation. The performance of the PLS-DA model was evaluated by parameters as sensitivity (true positive/(true positive + false negative)), specificity (true negative/(true negative + false positive)) and receive operating characteristic (ROC) curves [48] for each class to compare classification performances of the different species of *Rhodnius* genus.

Results and discussion

Optimization of peptide/protein extraction and MALDI matrix

The ACN/FA (A) protocol, normally used to bacteria, was tested for 12 *Rhodnius* species, but has provided few MALDI-TOF MS ions. The protocol that presented the highest abundance of MS MALDI-TOF ions in all matrices was the ACN/TFA (B) method, which was selected to

characterize all species. From the four MALDI matrices tested (CHCA, SA, ATT, and DHAP), the CHCA was selected because it presented MALDI spectra in the mass range of interest (2–8 kDa) (Fig. 1).

Mass spectrum analysis of each species of *Rhodnius* genus

It was possible to observe species mass peaks, mainly concentrated in the region below 8000 m/z , and a few peaks observed above 8000 m/z . In addition, it was noticed that the region of 2000 to 8000 m/z showed a degree of spectral variability within each species. In these, the intensity of the observed signals was shown to be lower in the *R. neivai* species, while the *R. brethesi* species demonstrated a greater variety of signals. Therefore, a more detailed spectra analysis of each species was performed in this region, as shown in Fig. 1.

The spectral region of 4000 to 5000 m/z showed a similarity factor in all species, probably associated with which probably extends to the other species of the subfamily Triatominae. However, other mass peaks in the spectrum seemed to be specific to each species. Laroche et al. [40] also reported the same intensity m/z for *Rhodnius* species. However, it is noteworthy that the present study used only adult stage species, favoring the reproducibility of the spectra, unlike Laroche et al. [40]. Figure 2 was generated from the list of peaks with intensities greater than 0.035 after normalization of the signals.

Regarding the peculiarities of each species, the *R. colombiensis* species showed unique signs in the low m/z region in 2217 and 2364, and is only comparable with *R. brethesi* which presents a wide range of signals in this

Fig. 1 Mean MALDI-TOF MS spectra of the 12 species of Triatominae in the region of 2000 to 8000 m/z

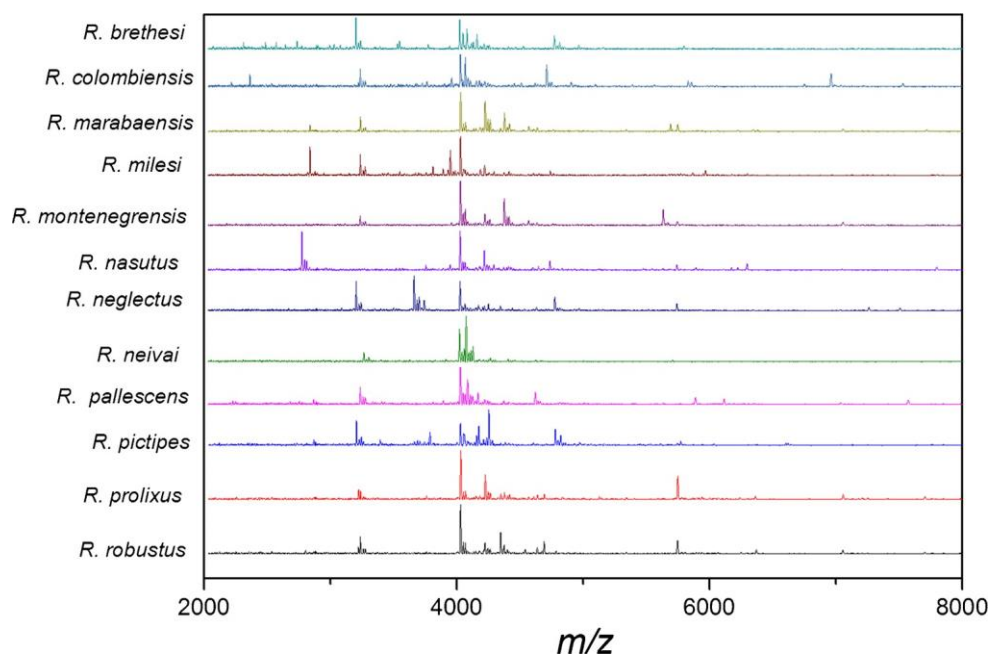
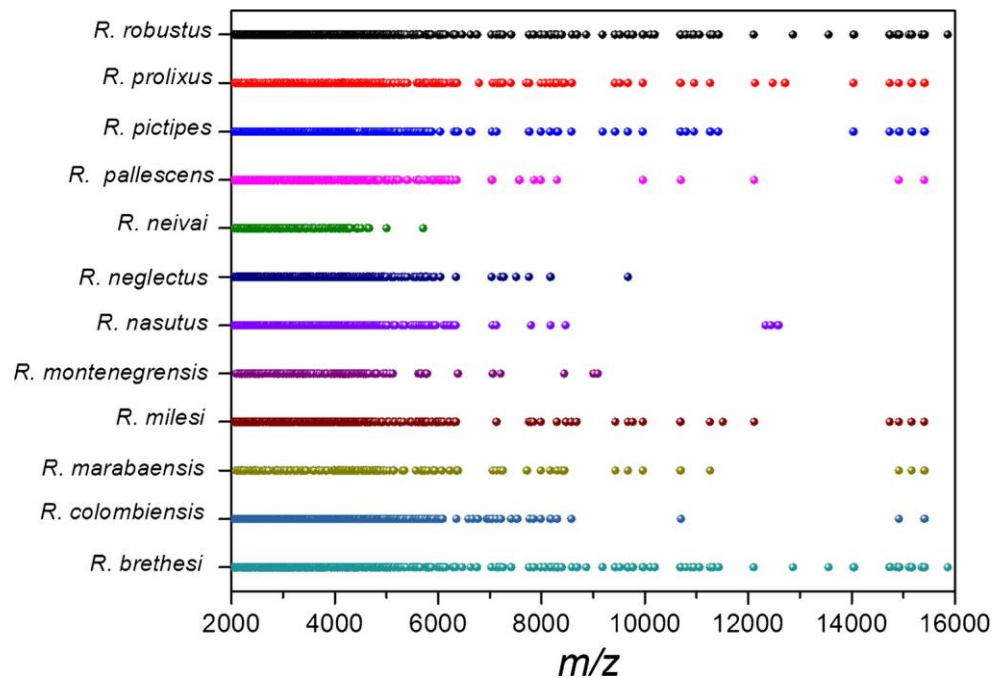


Fig. 2 Peak position (m/z) of the mean MALDI-TOF MS spectrum of the 12 species of Triatominae in the region of 2000 to 16,000 m/z



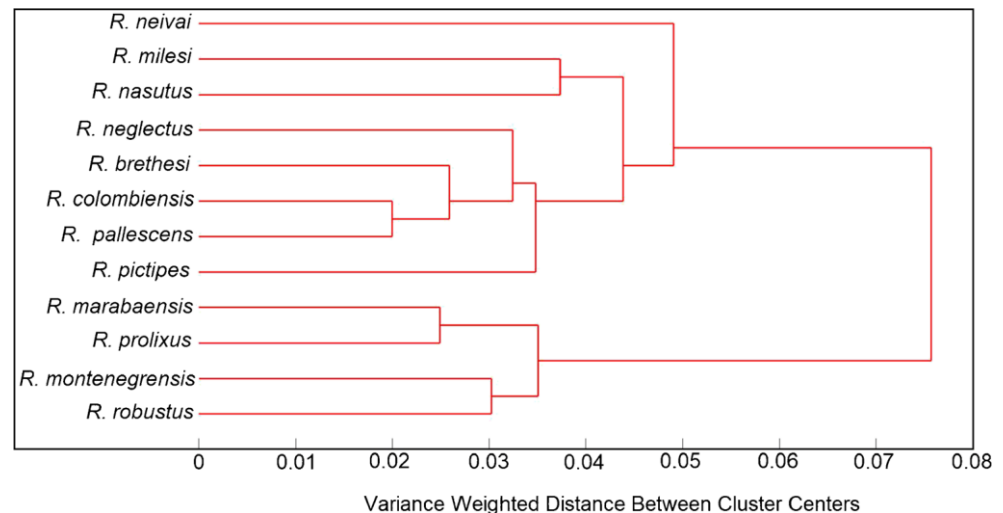
region with m/z values of 2311, 2486, 2517, 2643, and 2735, among others. The values close to 2800 occur with a certain similarity in the species *R. marabaensis* (2836–2840), *R. milesi* (2834–2841), *R. nasutus* (2795–2813, 2836), and the region around 3220 to 3275 presented in six species, with slightly larger signals in the other five (3264–3302) and absence of these two ranges in *R. nasutus* sample.

Visual inspection of the spectra for the differentiation of the specimens is limited in view of the large number of variables and quantity of samples. Thus, the chemometric tools PCA and HCA were applied to improve the interpretation of the MALDI-TOF MS data (Figs. 3, 4, and 5) and the PLS-DA performed for discriminating the 12 species of *Rhodnius* genus.

Distinction of *Rhodnius* species by MALDI-TOF MS with chemometric tools

The analysis of the data set per cluster was utilized due to its facility to observe similarity among samples. In this way, it is possible to verify more clearly which samples demonstrate similarity among them. Based on the dendrogram obtained by MALDI-TOF MS analyses (Fig. 3), the samples *R. colombiensis* and *R. pallescens* show the greatest similarity between them, a fact related by Carcavallo in the year 2000 [49], due to the morphological and geographical similarities between them, followed by *R. marabaensis* and *R. prolixus*, reaffirming the findings of the description of *R. marabaensis* [9], which differs from *R. robustus* and *R. prolixus*. Three

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis (HCA) from the MALDI-TOF-MS mass spectrum data of the Triatominae species



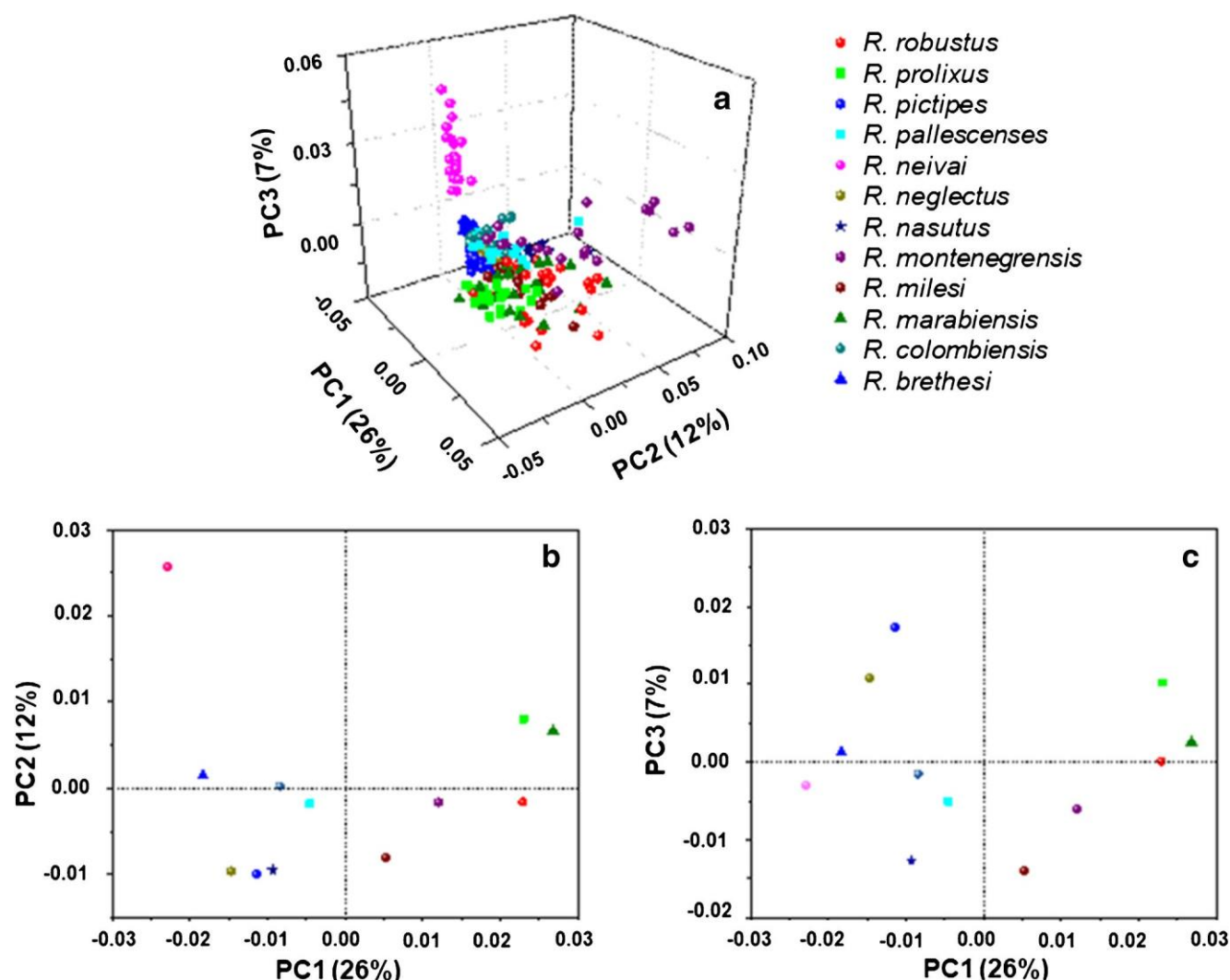


Fig. 4 a PC1, PC2, and PC3 score plot related to all MALDI-TOF MS mass spectrum data from Triatominae species. b PC1xPC2 and PC1xPC3 score plot related to mean MALDI-TOF-MS mass spectrum data for each species

groups with a similar distance from the cluster center are formed close to 0.04: (1) *R. robustus*, *R. montenegrensis*,

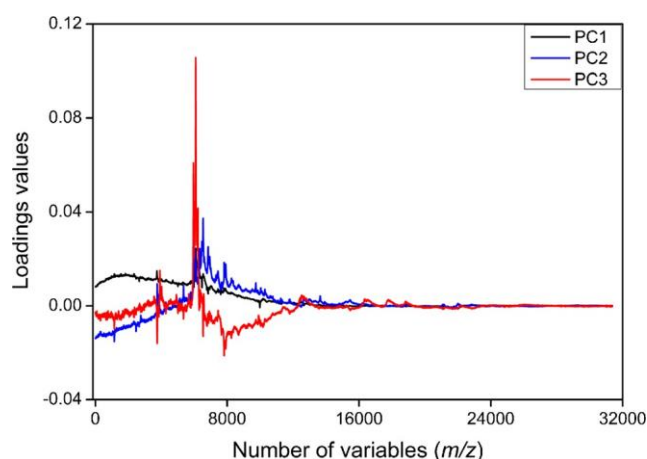
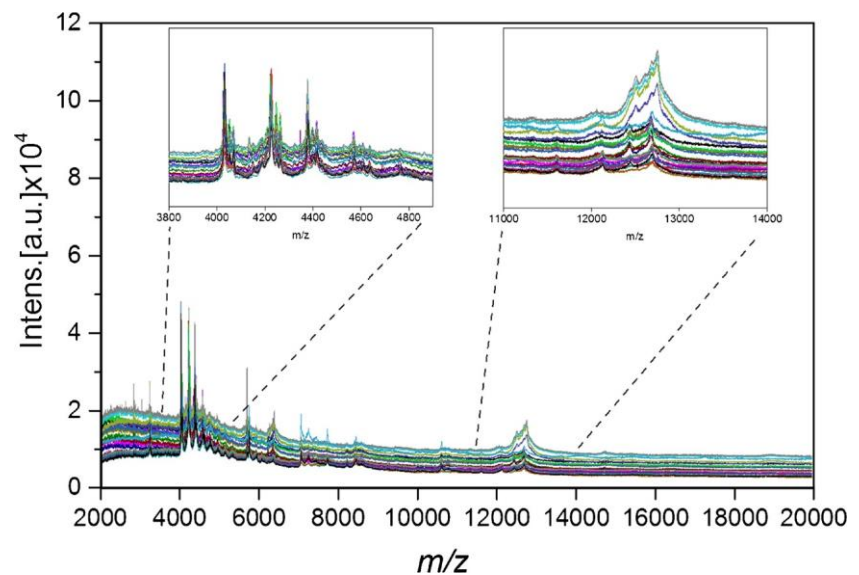


Fig. 5 Loadings plot, showing in x-axis the number of variables (m/z) and y-axis the loadings values for PC1, PC2, and PC3 overlaid

R. prolixus, and *R. marabaensis*; (2) *R. neglectus*, *R. brethesi*, *R. colombiensis*, *R. pallescens*, and *R. pictipes*; and (3) *R. milesi* and *R. nasutus*. After a certain distance, all species present similarity, as expected, due to the same proteomic profile in the region 4000–5000 m/z as previously discussed.

The PCA chemometric tool was applied to verify the similarity between the replicates studied by the separation of the samples in the score plot, Fig. 4a. The dispersion observed is related to the dynamic range of the proteomics; each species can present differences in proteins and/or peptides may vary in each individual, in addition to possible variations in the charge state and hydrophobicity that can change the characteristic of the matrix and modify the intensity of the observed signal in replicates. Dispersion of the samples in relation to each species shows spectra with similar characteristics, a fact in agreement with the MALDI-TOF MS of the replicates observed. The overall result in relation to the identification of each species

Fig. 6 MALDI mass spectrum of the 21 species of *R. marabaensis*



by MALDI-TOF MS can be seen in the PCA plot of the mean data for each species in Fig. 4b for scores PC1 $\times$ PC2 and in Fig. 4c for scores PC1 $\times$ PC3, clearly indicating the success in the identification by the proteomic profile. Figure 5 presents the loadings plot, showing in x-axis the number of variables (m/z) and y-axis the loadings values for PC1, PC2, and PC3 overlaid. In range of 4000 to 5000 m/z , the three PCs present similar profile of positive loadings. However, the PC3 has greatest positive loadings and greater importance in separation of samples. Figure 6 results in good reproducibility of the measurements carried out, with variations only in the intensities of the observed signals.

The discrimination among the 12 species of *Rhodnius* genus was performed PLS-DA because this chemometric technique assigns one sample individual modeling the sample according its features for classes belonging to the data set. In this work, the PLS-DA was calculated relating the X-matrix of instrumental signals of the MALDI-TOF MS to a y vector of sample classes in coded units 0 and 1. For each sample, the model predicts a value around 0 or 1 that is then converted into a class label using an optimized threshold [50]. Besides, the PLS-DA is the most widely used discriminant chemometric technique among multivariate classification techniques, especially for data matrices having a large number of variables [51].

PLS-DA model was built with 5 latent variables (LVs) with mean-centered preprocessing using as criteria the smaller root mean square error of cross-validation (RMSECV), estimated using results obtained by contiguous blocks cross-validation. This number of LVs accounted for 99% of variance explained for X-block and was adequate to avoid overestimation of predicted classifications of the constructed model.

Following, a variable selection based on variable importance in projection (VIP) scores [51] was performed in the data but showed no significant improvement in results. Thus, the results achieved by model were obtained without variable selection. Table 2 shows the parameters as sensitivity, specificity, and ROC curves for training and validation sets between reference and predicted values obtained with the PLS-DA model.

The sensitivity is the ability of the model to correctly classify each class of *Rhodnius* genus. The values obtained of sensitivity were excellent achieving 100% of correct classifications for training and validation sets for all classes, except for *R. colombiensis* class that achieved only 75% in validation set, as shown in Table 2. Already, the specificity is the capacity of the model to correctly identify the samples that do not belong to the modeled class. The obtained values were good being $\leq 80\%$ for training set for all classes, except for *R. nasutus* class that the obtained values was very worst from 39%. In validation set, the results

Table 2 Parameters of performance of the PLS-DA model for training and validation sets

Parameters (%) *Brethesi* *Colo* *Mara* *Milesi* *Monte* *Nasutus* *Neglectus* *Neivai* *Pallescents* *Pictipes* *Prolixus* *Robustus*

Training set	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sensitivity												
Specificity	83	97	89	80	93	39	88	97	80	84	89	87
Validation set	100	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sensitivity												
Specificity	97	92	92	63	86	79	87	100	63	100	84	76
ROC curve	100	93	100	92	96	88	99	100	90	100	98	89

Colo, *Colombiensis*; Mara, *Marabaensis*; Monte, *Montenegrensis*

were good achieving values $\leq 84\%$ for eight classes; acceptable values for the classes *R. nasutus* (79%) and *R. robustus* (76%); and worst values for the *R. milesi* (63%) and *R. pallescens* (63%) classes (Table 2).

The ROC curve is created by plotting sensitivity against the specificity at various threshold settings. The value of area under ROC curve varies from 0 to 1, being that 0 represents a very bad performance and 1 represents an ideal performance of correct classification for each class [48]. ROC curves varied area from 0.88 to 1 in validation set, that corresponding 88 to 100%, as shown in Table 2. The global correct classification of the PLS-DA model in training set was of 174 samples from 190 total samples, achieving 92% of accuracy. In validation set the global correct classification was of 76 samples from 95 total samples, achieving 80% of accuracy. The results obtained presented a good discrimination capacity of the model.

Conclusion

The application of the MALDI-TOF MS technique combined with chemometric tools was able to accurately distinguish 12 species of the *Rhodnius* genus, which traditionally present difficulties for identification through morphological characteristics. Thus, the methodology described in this article can be applied quickly and efficiently in a large number of samples when compared to other high precision techniques for identification/discrimination of Triatominae species, and still has good reproducibility and robustness, even without concomitant molecular assay.

Acknowledgments We thank the researchers Sebastião Aldo of the Evandro Chagas Institute (IOC), Brazil, who sent us species of *R. milesi* and Elis Jose Aldana of the University of the Andes of the Department of Biology of Venezuela for granting specimens of *R. neivai* for the development of this study.

Funding information This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)- Finance Code 001.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

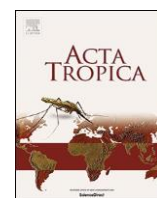
- World Health Organization (WHO). Neglected tropical diseases. Genève: WHO; 2018. http://www.who.int/neglected_diseases/en/. Accessed 30 Aug 2018.
- World Health Organization (WHO). Neglected tropical diseases. Genève: WHO; 2018. [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Accessed 30 Aug 2018.
- Chagas C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:161–218.
- Lima-Cordón RA, Monroy MC, Stevens L, Rodas A, Rodas GA, Dorn PL, et al. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). ZooKeys. 2019;820:51–70.
- Poinar G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. Cretac Res. 2018;93: 90–7.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DDS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa. 2003;202:1.
- Rosa JA, Rocha CS, Gardim S, Mendonça MCPVJ, Filho, Júlio CRF, et al. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. Zootaxa. 2012;3478:62–76.
- Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo-ON, Palomeque FS, Dale C, Chaverra D, et al. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:92–9.
- Souza ED, Von Atzingen NC, Furtado MB, de Oliveira J, Nascimento JD, Vendrami DP, et al. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. ZooKeys. 2016;621:45–62.
- Soares RP, Sant'Anna MR, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. Am J Trop Med Hyg. 2000;62:157–61.
- Perez R, Panzera Y, Scafiezzo S, Mazzella MC, Panzera F, Dujardin JP, et al. Cytogenetics as a tool for Triatomine species distinction (Hemiptera-Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87:353–61.
- Monteiro FA, Lazoski C, Noireau F, Solé-Cava AM. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini, showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. Med Vet Entomol. 2002;16: 83–90.
- Teixeira ARL, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L, et al. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. Emerg Infect Dis. 2001;7:100–12.
- Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:296–300.
- Pinto AY, Valente SA, Valente VC, Ferreira Junior AG, Coura JR. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988–2005. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:602–14.
- Gillett JD. The genital sterna of the immature stages of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). Trans R Entomol Soc of Lond. 1935;83:1–5.
- Soares RP, Barbosa S, Dujardin JP, Schofield CJ, Siqueira AM, Diotaiuti L. Characterization of *Rhodnius neglectus* from two regions of Brazil using isoenzymes, genitalia morphology and morphometry. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:161–6.
- Harry M. Morphometric variability in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. The Jap J of Genet. 1994;69:233–50.
- Dias JCP. Epidemiological surveillance of Chagas disease. Cad Saúde Pública. 2000;16:S43–59.
- Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:31–40.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 2006;22:583–8.

22. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:277–82.
23. Alevi KC, Rodas LA, Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MT, Guirado MM. Entoepidemiology of Chagas disease in the Western region of the state of São Paulo from 2004 to 2008, and cytogenetic analysis in *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Triatominae). *Genet Mol Res*. 2015;14:5775–84.
24. Díaz S, Panzera F, Jaramillo-O N, Pérez R, Fernández R, Vallejo G, et al. Genetic, cytogenetic and morphological trends in the evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) trans-Andean group. *PLoS One*. 2014;9:e87493.
25. Da Rosa J, Mendonça V, Gardim S, de Carvalho D, de Oliveira J, Nascimento JD, et al. Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. *Parasit Vectors*. 2014;7:1–17.
26. Alevi KC, Ravazi A, Mendonça VJ, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MT. Karyotype of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Triatominae). *Genetic Mol Res*. 2015;12:222–6.
27. Alevi KC, Ravazi A, Franco-Bernardes MF, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MT. Chromosomal evolution in the *pallenscens* group (Hemiptera, Triatominae). *Genetic Mol Res*. 2015;14:12654–9.
28. Brenière SF, Condori EW, Buitrago R, Sosa LF, Macedo CL, Barnabé C. Molecular identification of wild triatomines of the genus *Rhodnius* in the Bolivian Amazon: strategy and current difficulties. *Infect Genet Evol*. 2017;51:1–9.
29. Justi SA, Russo CAM, Mallet J, Obara M, Galvão C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit Vectors*. 2014;7:149.
30. Barges MD, Schofield C, Dujardin JP. Classification and systematics of the Triatominae. *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)*. 2017:113–43.
31. Murugaiyan J, Roesler U. MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:184.
32. Giffen JE, Rosati JY, Longo CM, Musah RA. Species identification of Necrophagous insect eggs based on amino acid profile differences revealed by direct analysis in real time-high resolution mass spectrometry. *Anal Chem*. 2017;89:7719–26.
33. Ulrich S, Kühn U, Biermaier B, Piacenza N, Schwaiger K, Gottschalk C, et al. Direct identification of edible insects by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Control*. 2017;76:96–101.
34. Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Emerging tools for identification of arthropod vectors future. *Microbiol*. 2016;11:49–566.
35. Yssouf A, Parola P, Lindström A, Lilja T, L'Ambert G, Bondesson U, et al. Identification of European mosquito species by MALDI-TOF MS. *Parasitol Res*. 2014a;113:2375–8.
36. Yssouf A, Socolovschi C, Leulmi H, Kernif T, Bitam I, Audoly G, et al. Identification of flea species using MALDI-TOF/MS. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2014;37:153–7.
37. Dvorak V, Halada P, Hlavackova K, Dokianakis E, Antoniou M, Volf P. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasit and Vectors*. 2014;7:1–7.
38. Sambou M, Aubadie-Ladrix M, Fenollar F, Fall B, Bassene H, Almeras L, et al. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and molecular biology techniques for identification of culicoides (diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal. *J Clin Microbiol*. 2015;53:410–8.
39. Steinmann IC, Pflüger V, Schaffner F, Mathis A, Kaufmann C. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for the identification of ceratopogonid and culicid larvae. *Parasitology*. 2013;140:318–27.
40. Laroche M, Bérenger JM, Gazelle G, Blanchet D, Raoult D, Parola P. MALDI-TOF MS protein profiling for the rapid identification of Chagas disease triatomine vectors and application to the triatomine fauna of French Guiana. *Parasitology*. 2018;145:665–75.
41. Souza ES, Fernandes RP, Galvão C, de Paiva VF, da Rosa JA. Distinguishing two species of *Cavernicola* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Acta Trop*. 2019;198: 105071–3.
42. Dos Santos FN, Tata A, Belaz KRA, Magalhães DMA, Luz EDMN, Eberlin MN. Major phytopathogens and strains from cocoa (*Theobroma cacao* L.) are differentiated by MALDI-MS lipid and/or peptide/protein profiles. *Anal Bioanal Chem*. 2016;409: 1765–77.
43. Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, Gene J, Symoens F, et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:634–42.
44. R Core Team, R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. <http://www.R-project.org>. Accessed 08 Dec 2018.
45. Ward JH. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Stat Assoc*. 1963;58:236–44.
46. Brereton RG, Lloyd GR. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J Chemom*. 2014;28:213–25.
47. Kennard R, Stone LA. Computer aided design of experiments. *Technometrics*. 1969;11:137–48.
48. Brown CD, Davis HT. Receiver operating characteristics curves and related decision measures: a tutorial. *Chemom Intell Lab Syst*. 2006;80:24–38.
49. Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvão C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol Vector*. 2000;7:1–99.
50. Biancolillo A, Bucci R, Magri AL, Magri AD, Marini F. Data-fusion for multiplatform characterization of an Italian craft beer aimed at its authentication. *Anal Chim Acta*. 2014;820:23–31.
51. Mehmood T, Liland KH, Snipen L, Sæbø S. A review of variable selection methods in partial least squares regression. *Chemom Intell Lab Syst*. 2012;118:62–9.



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica



Distinguishing two species of *CAVERNICOLA* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Éder dos Santos Souza^a, Richard Perosa Fernandes^b, Cleber Galvão^{c,*},
Vinícius Fernandes de Paiva^d, João Aristeu da Rosa^a

^a FACULDADE de CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), ARARAQUARA, SP, BRASIL

^b UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Química, ARARAQUARA, SP, BRASIL

^c LABORATÓRIO NACIONAL e INTERNACIONAL de REFERÊNCIA em TAXONOMIA de TRIATOMÍNEOS, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, BRASIL

^d Instituto de Biologia, UNIVERSIDADE ESTADUAL de CAMPINAS (UNICAMP), CAMPINAS, SP, BRASIL

ARTICLE INFO

Keywords:

CAVERNICOLA MALDI

TOF

Mass spectrometry

ABSTRACT

The blood-sucking insects of the subfamily Triatominae are vectors of Chagas disease, the most impairing protozoan parasitic infection in Latin America. Among the five tribes known in the subfamily, one of the least studied is Cavernicolini. It has only two species within *CAVERNICOLA* genus (Barber, 1937), little is known about the biochemistry of the species of this genus, therefore, using MALDI-TOF MS we provide a better understanding of the two species and differentiates them. The distinction was made by the different spectral profile of the species, where *C. lenti* presents unique signals in many regions, while the *C. PILOSA* shows high-intensity signals and *m/z* in high bands. The application of digital mass spectrometry combined with chemometric methods was able to accurately distinguish two species of the genus *CAVERNICOLA*.

1. Introduction

The blood-sucking insects of the subfamily Triatominae are vectors of Chagas disease, an infection caused by the protozoan *TRYPANOSOMA cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). This subfamily includes 151 extant and 3 fossil species assigned to five tribes in 19 genera (Justi and Galvão, 2017; Dorn et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Lima-Cordon et al., 2019; Ponair, 2019). The tribe Cavernicolini (Usinger, 1944), one of the least studied, has only two species within *CAVERNICOLA* genus (Barber, 1937). *CAVERNICOLA PILOSA* Barber, 1937 was described in Panama, featuring cave habitats where suck bat blood specially, however, It has been reported in many others localities from Brazil, Colombia, Panama, Peru and Venezuela (Galvão et al., 2003; Gurgel-Goncalves et al., 2012; Gil-Santana et al., 2014). With the description of *CAVERNICOLA lenti* Barrett and Arias, 1985 in Amazonas State, Brazil, associated with *Rhipidomys* sp. (Rodentia), the morphological characters began to conflict with the original Cavernicolini tribe definition (Usinger, 1944). Based on theses incongruousness Oliveira et al. (2007) redescribed the Cavernicolini tribe based on morphological and morphometric parameters including new diagnostic characters to species of *CAVERNICOLA*.

Corresponding author.

E-MAIL ADDRESS: galvao@ioc.fiocruz.br (C. Galvão).

In addition to morphological and epidemiological studies (Dias et al., 1942; Baker et al., 1978; Silva et al., 1992), reproductive and ecological aspects were available to valid the taxonomic position of both species (Oliveira et al., 2008; Souza et al., 2015). The biochemical knowledge about *CAVERNICOLA* spp. is scarce, while the tribes Rhodniini and Cavernicolini are strongly supported as sister taxa, by molecular data (Hwang and Weirauch, 2012). Other previous studies have characterized its morphology and morphometry (Oliveira et al., 2007), ecology (Oliveira et al., 2008) and epidemiology (Dias et al., 1942; Baker et al., 1978; Silva et al., 1992). MALDI-TOF mass spectrometry was used by Laroche et al. (2018) to identify and separate other triatomines and has proved to be a powerful tool. Therefore, this study aimed to grow up the knowledge of both species by using the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to characterize the protein profile of this genus.

2. Materials and methods

2.1. TRIATOMINAE

In the year 2017, eight adult specimens of *CAVERNICOLA PILOSA* were

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105071> Received 26 April 2019; Received in revised form 18 June 2019; Accepted 26 June 2019

Available online 16 July 2019

0021-9045/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

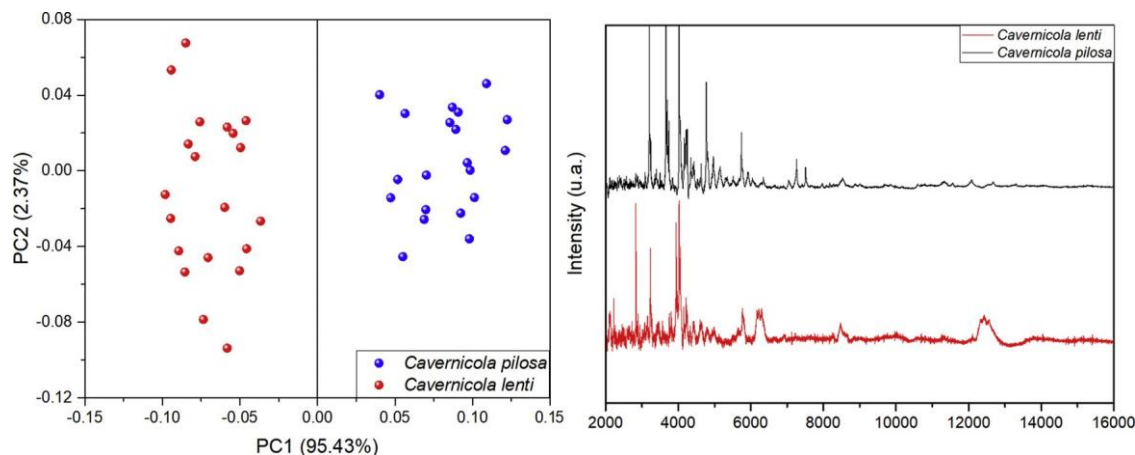


Fig. 1. Peak positions (m/z) of the 20 replicates of *C. lenti* and *C. PILOSA* in the region of 2000 to 8000 m/z .

collected from a cave in the municipality of Xambioa, Tocantins state, Brazil. The specimens of *CAVERNICOLA lenti* were obtained from the colonies of the “Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos” at the Oswaldo Cruz Institute.

2.2. CHEMICALS AND REAGENTS

The solvents acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), methanol (Burdik & Jackson, Muskegon, MI), chloroform (Burdik & Jackson, Muskegon, MI), and 2-propanol (Burdik & Jackson, Muskegon, MI) were used, and the solutions trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and formic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Ultrapure water used for the preparation of extracts was purified by the Direct-Q water system (Millipore, Bedford, MA). The MALDI matrixes were α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), sinapinic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 6-aza-2-thiothymine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2,6-dihydroxyacetophenone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 2,5-dihydroxybenzoic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Phospholipids standards, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (DMPG), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium salt (DPPA), and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine sodium salt (DPPS) were obtained from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA).

2.3. SAMPLE PREPARATION AND MALDI-MS ANALYSIS

For rapid differentiation of two species of *CAVERNICOLA* was using a sterile tweezers, six legs of each specimen were removed, which for added liquid nitrogen and crushed manually in porcelain crucible. The method used was trifluoroacetic acid and acetonitrile acid ACN/TFA. The crushed legs were transferred to microtube with a sterile scalpel and suspended in 50 μ L 80% of TFA and homogenized for 30 min at 1000 rpm to disrupt the cell wall. Then, 100 μ L of water Milli-Q was added followed by 150 μ L of ACN. The mixture was centrifuged at 13,000 $\times$ g for 5 min and the supernatant was transferred to a microtube. This method was adapted from the *Fusarium* isolates extraction method. The supernatants from each of these four methods were spotted (1 μ L droplet) onto a MALDI plate (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and then air-dried. Then, 1 μ L of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix solution was spotted over the dried sample and 1 μ L of DH5- α *ESCHERICHIA coli* protein extract (Bruker-Daltonik GmbH) was deposited on the calibration spot of the plate for external calibration. CHCA matrix solution was prepared at a concentration of 50 mg mL⁻¹ in (1:1) ACN/water with 0.1% TFA, ATT matrix was prepared at 10 mg mL⁻¹ in (1:1).

2.4. MS DATA

MALDI-MS was performed on a Bruker Autoflex III MALDI-TOF/TOF mass spectrometer equipped with a 334-nm smart beam laser. Peptide/protein profiles were acquired in the TOF linear mode and in the positive ion mode with a delayed extraction of 260 ns at 20 kV accelerating voltage. Each spectrum was manually collected as an average of 5000 laser shots (1000 laser shots at five different spot positions). Laser energy was set just above the threshold for ion production. A range of m/z 2000–20,000 or m/z 600–1000 was used for the peptide/protein fingerprinting, respectively. Spectra were acquired in triplicates via the AutoExecute tool of the Flexcontrol acquisition software (version 2.4; Bruker-Daltonik GmbH). Analysis of MALDI data was done by three distinct steps: (1) pre-processing, (2) processing, and (3) statistical analysis. Raw spectra were pre-processed in the FlexAnalysis software (BrukerDaltonik) after baseline subtraction for background removal, alignment of the spectra scale, ion selection with an S/N ratio greater than 3, and normalization of intensities.

2.5. DATA ANALYSIS using chemometrics tools

In the data pre-processing, all MALDI mass spectrum were organized in one matrix and data was normalized, baseline-corrected and mean centered. Principal component analysis (PCA), hierarchical clustering analysis (HCA) and data treatment were performed in R programming language (R Core team, 2017) using the followed packages: *ChemoSpec* and *Chemometrics*. HCA was performed using Ward's method (Ward, 1963).

3. Results and discussion

From the results obtained from the MALDI analysis, the mass spectra were organized into a matrix containing all the spectra obtained for the two species, the matrix was normalized and a baseline correction was performed, signals with intensity greater than 0.035 was peaked and Fig.1 was obtained, the reproducibility of the methodology is verified from the similarity between the replicates, as well as the existing differences between the studied species.

In order to better visualize the differences between species and similarities between the replicates, the PCA chemometric tool was applied and the spectra were compared, Fig. 2, where it is possible to observe the distribution of the samples in the dimension space of the plot of scores, *C. PILOSA* is located on the positive side of PC1 and the *C. lenti* species is located on the negative side of PC1. The distinction was made by the different spectral profile of the species, where the species *C. lenti* presents unique signals in the region of 3206, 3667, 4779 and 7000–7500, while the *C. PILOSA* shows high intensity signals at 2227,

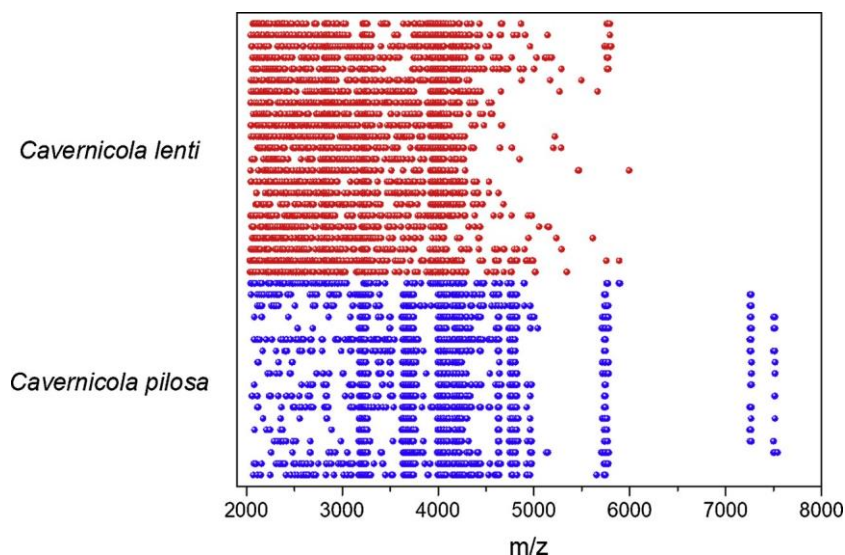


Fig. 2. Score plot from PCA analysis and mean spectra of *C. lenti* and *C. pilosa* species, respectively

2832, 3994 and m/z in high bands as in the region near 5770, 6230, 8470, 12,410.

4. Conclusion

The application of the MALDI-TOF-MS technique, by the digital mass spectrometry approach combined with chemometric methods, was able to accurately distinguish two species of the genus *CAVERNICOLA*. Thus the methodology described in this short communication can be applied quickly, efficiently and inexpensively when compared to other high precision techniques in a large number of samples for the identification of Triatominae species.

Conflict of interests

All authors have declared that there is no conflict of interest.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, Finance Code 001.

References

- Baker, J.R., Miles, M.A., Godfrey, D.G., Barrett, T.V., 1978. Biochemical characterization of some species of *TRYPANOSOMA* (*SCHIZOTRYPANUM*) from bats (Microchiroptera). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 483–491. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.483>.
- Barber, H.G., 1937. A new bat-cave bug from Panama (Hemiptera, Heteroptera: Reduviidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 39, 61–63.
- Barrett, T.V., Arias, J.R., 1985. A new triatominae host of *TRYPANOSOMA* from the Central Amazon of Brazil: *CAVERNICOLA lenti* n.sp. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80, 91–96. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761985000100014>.
- 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 (2), 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.
- Dias, E., Dias, E., Mello, G.P., Costa, O., Damasceno, R., 1942. Investigações sobre esquistotripanose de morcegos no Estado do Para. Encontro do barbeiro “*CAVERNICOLA PILOSA*” como transmissor. *Rev. Bras. Biol.* 2, 103–110.
- Dorn, P.L., Justi, S.A., Dale, C., Stevens, L., Galvão, C., Lima-Cordon, R., Monroy, C., 2018. Description of *TRIATOMA MOPAN* n. sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Zookeys* 775, 69–95. <https://doi.org/10.3897/zookeys.775.22553>.
- Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D.S., Jurberg, J., 2003. A checklist of the current

- species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202, 1–36. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.202.1.1>.
- Gil-Santana, H.R., Galvão, C., Mielke, C.G.C., 2014. *CAVERNICOLA PILOSA* Barber, 1937 (Hemiptera: Reduviidae: triatominae): first report in the state of Maranhão, Brazil. *Check List* 10, 944–946. <https://doi.org/10.15560/10.4.944>.
- Gurgel-Goncalves, R., Galvão, C., Costa, J., Peterson, A.T., 2012. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J. Trop. Med.* 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/705326>.
- Hwang, W.S., Weirauch, C., 2012. Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Reduviidae): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. *PLoS One* 7 (9), e45523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045523>.
- Justi, S.A., Galvão, C., 2017. The Evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. *Trends Parasitol.* 33, 1. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.002>.
- Laroche, M., Bérenger, J.M., Gazelle, G., Blanchet, D., Raoult, D., Parola, P., 2018. MALDI-TOF MS protein profiling for the rapid identification of Chagas disease triatomine vectors and application to the triatomine fauna of French Guiana. *Parasitology* 145, 665–675. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001342>.
- Lima-Cordon, R.A., Monroy, M.C., Stevens, L., Rodas, A., Rodas, G.A., Dorn, P.L., Justi, S.A., 2019. Description of *TRIATOMA HUEHUETENANGUENSIS* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys* 820, 51–70. <https://doi.org/10.3897/zookeys.820.27258>.
- Oliveira, M.A., Souza, R.C.M., Diotaiuti, L., 2007. Redescription of the genus *CAVERNICOLA* and the tribe Cavernicolini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), with morphological and morphometric parameters. *Zootaxa* 1457, 57–68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1457.1.4>.
- Oliveira, M.A., Ferreira, R.L., Carneiro, M.A., Diotaiuti, L., 2008. Ecology of *CAVERNICOLA PILOSA* Barber, 1937 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the Boa Esperança Cave, Tocantins, Brazil. *Biotropica* 14, 63–68.
- Oliveira, J., Ayala, J.M., Justi, S.A., Rosa, J.A., Galvão, C., 2018. Description of a new species of *NEOSOTRIATOMA* Usinger, 1944 from Cuba and revalidation of synonymy between *NEOSOTRIATOMA bruneri* (Usinger, 1944) and *N. flavidia* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *J. Vector Ecol.* 43, 148–157. <https://doi.org/10.1111/jvec.12294>.
- Ponair, G., 2019. A primitive triatomine bug, *PALEOTRIATOMA METAXYTAXA* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. *Cretac. Res.* 93, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.09.004>.
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria March. <http://www.R-project.org/>.
- Silva, I.G., Silva, H.H.G., Elias, M., 1992. Invasão de *CAVERNICOLA PILOSA* Barber, 1937 (Hemiptera, Reduviidae) em habitação humana na periferia de Goiânia. *Rev. Patol. Trop.* 21, 263–264. <https://doi.org/10.5216/rpt.v21i2.20111>.
- Souza, E.S., Alevi, K.C.C., Ribeiro, A.R., Furtado, M.B., Atzingen, C.B.V., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Rosa, J.A., 2015. First cytogenetic study of *CAVERNICOLA PILOSA* Barber, 1937 (Hemiptera, Triatominae). *Genet. Mol. Res.* 144, 13889–13893. <https://doi.org/10.4238/2015>.
- Usinger, R.L., 1944. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. *US Public Health Bull.* 288, 1–83.
- Ward, J.H., 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58, 236–24

