



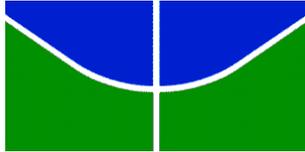
Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

# **Purificação Parcial e Caracterização da Apirase Salivar de *Rhodnius prolixus***

**Marta Carolina Deusdará Rosa**

Brasília-DF

2013



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

# **Purificação Parcial e Caracterização da Apirase**

## **Salivar de *Rhodnius prolixus***

**Marta Carolina Deusdará Rosa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

**Orientador:** Dr. Jaime Martins de Santana

**Co-Orientadora:** Dra. Carla Nunes de Araújo

Brasília-DF

2013

Pesquisa realizada no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas (UnB) sob a orientação do Dr. Jaime Martins de Santana e co-orientação da Dra. Carla Nunes de Araújo, com suporte financeiro do CNPq/UnB.

## RESUMO

A saliva do artrópode hematófago *Rhodnius prolixus* contém atividade apirásica (EC 3.6.1.5) que facilita a hematofagia inibindo a agregação plaquetária, no hospedeiro vertebrado, induzida por ADP. Este trabalho descreve a purificação de proteínas que representam membros da família das apirases da saliva de *R. prolixus*. O conteúdo das glândulas salivares foi injetado numa coluna Superdex 200 10/300 GL e eluída com o tampão (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5.0 mM CaCl<sub>2</sub>) no fluxo de 0,5 ml/min. Os picos eluídos foram monitorados a 280 nm em cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC). As frações contendo atividade foram reunidas e submetidas à cromatografia de afinidade (coluna Hi-Trap Blue-Sepharose). Após eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), as bandas foram visualizadas por coloração com nitrato de prata. O zimograma revelou bandas proteicas entre 60 e 130 kDa que exerceram atividade apirásica. Os resultados sugerem que pode ocorrer um arranjo oligomérico entre as apirases salivares de *R. prolixus*. As apirases purificadas da saliva de *R. prolixus* são capazes de clivar nucleotídeos di- e trifosfato de maneira cálcio dependente. A purificação destas enzimas permitirá a caracterização mais detalhada de sua relação estrutura/atividade.

**Palavras-chave:** Triatomíneos, *Rhodnius prolixus*, Saliva, Apirase.

## ABSTRACT

The saliva of the haematophagous arthropod *Rhodnius prolixus* contains apyrase (EC 3.6.1.5) activity that facilitates blood-feeding by inhibiting the ADP-induced aggregation of the host platelets. We report here the purification of proteins that likely represent the *R. prolixus* members of the apyrase family. Salivary glands content was injected into the Superdex 200 10/300 GL column and eluted with a buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5.0 mM CaCl<sub>2</sub>) at a flow rate of 0.5 ml/min. The eluted peaks were monitored at 280 nm on fast protein liquid chromatography. The fractions containing activity were pooled and subjected to affinity chromatography (Hi-Trap Blue-Sepharose column). Following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, protein bands were detected with silver staining. As revealed by zymography, protein bands between 60 and 130 kDa exerted ATPase activity. The results suggest that oligomeric assembly among *R. prolixus* members with apyrase activity may occur. The purified *R. prolixus* apyrases are capable of cleaving nucleotide tri- and diphosphates in a calcium-dependent manner. The purification of these enzymes will allow more detailed characterization of their structure/activity relationship and it is plausible that they might be promising therapeutic molecules to target disorders of platelet aggregation.

**Keywords:** Triatomine, *Rhodnius prolixus*, Saliva, Apyrase.

À minha filha Catarina Rosa.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pela paciência, compreensão e apoio incondicionais;

À minha filha que é a razão da minha felicidade cotidiana;

À amiga Roberta Salgueiro pelas conversas estimulantes e riquíssimas contribuições;

À amiga Luciana Guedes pela ajuda na imunização dos camundongos, pelo carinho e paciência tão importantes nas minhas horas mais difíceis;

Ao meu orientador Dr. Jaime Santana, que me proporcionou esta oportunidade, pelo apoio e estímulo no decorrer do trabalho;

À Dra. Carla Nunes de Araújo pela co-orientação e valiosas observações;

Aos Professores Izabela Dourado, Flávia Nader e Sébastien Charneau pela contribuição para o desenvolvimento do meu perfil acadêmico;

A todos os colegas do LIPH pela acolhida e inúmeros ensinamentos;

A Rayner Myr pela ajuda e lições sobre Espectrometria de Massas;

À Adriana Xavier da Silva pelo cuidado com os barbeiros no biotério;

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas-UnB pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

# Índice

INTRODUÇÃO .....	8
1. Panorama da Doença de Chagas .....	8
1.1 Sintomas da Doença de Chagas .....	10
1.2 Ciclo de Vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
2 Triatomíneos: Vetores da Doença de Chagas.....	12
3 <i>Rhodnius prolixus</i> .....	13
3.1 Genoma de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	15
3.2 Sialoma de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	17
4 Hemostasia .....	19
4.1 Vasoconstrição .....	19
4.2 Agregação plaquetária e coagulação .....	19
5 Saliva dos triatomíneos .....	21
6 Apirases .....	24
JUSTIFICATIVA.....	26
OBJETIVOS.....	27
MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
RESULTADOS .....	34
1. Purificação da apirase salivar de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	34
2. Análise por espectrometria de massas (MS) .....	43
3. Apirase no genoma de <i>R. prolixus</i> .....	46
4. Análise da imunogenicidade da apirase salivar de <i>R. prolixus</i> .....	47
5. O íon $Ca^{2+}$ e a atividade apirásica da saliva de <i>R. prolixus</i> .....	48
DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÃO .....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56

## INTRODUÇÃO

Esta dissertação apresenta e discute os resultados da pesquisa sobre a apirase salivar do triatomíneo *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas. A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro da Universidade de Brasília de março de 2011 a junho de 2013. Ao longo do trabalho, serão expostos aspectos da interação vetor-hospedeiro com enfoque nas substâncias presentes na saliva do artrópode, bem como os processos de investigação da molécula que é alvo da pesquisa.

A saliva de animais hematófagos, incluindo os triatomíneos, é um rico coquetel de moléculas farmacologicamente ativas que contrapõem a resposta às lesões teciduais e vasculares decorrentes da picada do inseto no hospedeiro vertebrado (RIBEIRO, 1995). A apirase é uma destas moléculas e interfere na sinalização nucleotídica entre as plaquetas sanguíneas, o que lhe confere o caráter de anti-agregador plaquetário (ARAUJO *et al.*, 2012).

Comumente conhecido como barbeiro, o *R. prolixus* é o principal vetor da doença de Chagas na América Central e o segundo principal na América do Sul, depois do *Triatoma infestans* (ABAD-FRANCH *et al.*, 2009). O ciclo de contaminação, por sua vez, depende diretamente do sucesso do repasto sanguíneo favorecido pelas substâncias presentes na saliva do vetor.

### 1. Panorama da Doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC), também chamada tripanossomíase americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, da Família Trypanosomatidae, endêmica de 21 países do continente Americano. É transmitida principalmente por insetos vetores hemípteros da Subfamília *Triatominae*, mas também pode ser transmitida por transfusão de sangue, transplante de órgãos, por via oral e por transmissão vertical da mãe infectada para o feto através da placenta. A descoberta dessa doença foi considerada um dos mais relevantes acontecimentos médicos nas Américas (SCHMUNIS, 1997) e da história da medicina tropical (COURA & BORGES-PEREIRA, 2010). Carlos Chagas identificou o vetor, o modo de transmissão e o agente etiológico em 1909.

Considerada entre as doenças tropicais negligenciadas, afeta de 8 a 10 milhões de pessoas matando 10 mil por ano (WHO, 2012). E apesar de não ocupar lugar de destaque nas agendas de saúde pública de muitos países endêmicos, houve uma drástica diminuição em sua incidência desde os anos 1980. Isto se deve a iniciativas governamentais de controle e prevenção adotada por países endêmicos na década de 1990. Desde então, no Brasil, o programa de combate à DC evitou 277 mil novas infecções e 85 mil mortes entre 1985 e 1995 (OPS, 2000).

Trata-se de uma doença de países em desenvolvimento cuja erradicação é dificultada por fatores sociais e ambientais. Tais fatores incluem as moradias inadequadas (feitas de adobe) tanto em áreas rurais como em áreas suburbanas, que possibilitam a presença e colonização por vetores; desmatamento desordenado e invasão de áreas silvestres por habitações humanas. Além disso, a DC contribui para a perpetuação do ciclo de pobreza, afetando a produtividade das pessoas infectadas (URBINA, 2009).

Atualmente, devido à intensa migração de pessoas de países latino-americanos para países desenvolvidos, diversos países considerados não endêmicos, dentre eles Canadá, Estados Unidos, Austrália, Espanha e Japão, vêm registrando um número cada vez maior de casos de DC (SCHUMUNIS & YADON, 2010). Na ausência da transmissão vetorial, a transmissão congênita e por transfusão de sangue têm maior importância (GASCON *et al.*, 2010).

Em 2006, a Comissão Internacional da Organização Pan-Americana de Saúde declarou o Brasil livre de transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. E, em junho de 2012, o Grupo de Trabalho de Prevenção de Chagas, reunido em Brasília, concluiu que houve grande redução nas taxas de transmissão vetorial da doença de Chagas humana no país (OPS, 2000).

Apesar do sucesso no combate à transmissão vetorial da DC, a transmissão congênita e por via oral ainda tem grande importância. Particularmente devido ao fato de que várias pessoas podem ser afetadas simultaneamente através de alimentos contaminados (MONCAYO & SILVEIRA, 2009). Além disso, foi demonstrado que os sintomas da doença de Chagas crônica podem estar associados à transferência lateral de genes do parasito para o hospedeiro vertebrado. Estes genes podem ser herdados pelos descendentes da pessoa infectada, causando risco de aparecimento de sintomas na ausência de infecção e parasitemia (HETCH *et al.*, 2010).

## 1.1 Sintomas da Doença de Chagas

Devastadora e socialmente desagregadora, a doença de Chagas pode se desenvolver em três fases: Na fase aguda, o humano pode apresentar mal-estar, febre prolongada, cefaléia, sonolência, mialgias, edema, hipertrofia de linfonodos. Há prevalência da fase aguda na infância e adolescência; entre adultos, a baixa incidência dessa fase deve-se provavelmente ao fato de que uma superinfecção dificilmente estimulará um segundo surto (TEIXEIRA, 1987). Assim, 75% dos casos sintomáticos são de crianças menores de dez anos de idade e os sintomas geralmente não são observados em indivíduos imunocompetentes (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Esta fase geralmente passa espontaneamente e a infecção entra no estado latente dentro de 3 a 4 meses após a infecção (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

A fase latente, como o nome indica, é caracterizada pela ausência de manifestação dos sintomas. Os maiores índices de mortalidade e morbidade são encontrados na fase crônica sintomática. A insuficiência cardíaca é a principal causa de morte, seguida por doenças digestivas, com desenvolvimento de megaesôfago e megacólon (TEIXEIRA, 1987). Pacientes nesta fase podem ainda, apresentar lesões generalizadas no sistema nervoso.

A patogênese da DC se deve à persistência do parasito e à auto-imunidade desenvolvida após a infecção. A transferência horizontal de DNA do cinetoplasto do parasito para o genoma da célula do hospedeiro mamífero é um processo que pode estar implicado no desenvolvimento das respostas auto-imunológicas observadas na DC (TEIXEIRA *et al.* 2006).

Somente na fase aguda é possível observar o parasito em amostras de sangue através de microscopia. Durante a fase crônica, pode-se determinar a infecção por xenodiagnóstico. Nesta técnica, a detecção do parasito é feita com o uso de insetos não infectados alimentados em pacientes com suspeita de DC. Os excrementos do vetor são examinados 30 dias depois e a detecção imediata é feita indiretamente utilizando anticorpos anti-*T. cruzi* em ensaio imunoenzimático (TEIXEIRA *et al.*, 2010)

A DC ainda não tem cura e os sintomas da fase crônica são muitas vezes irreversíveis. O tratamento da DC com o uso de nitroderivados é pouco eficaz, apresenta efeitos colaterais e não previne o aparecimento de doenças cardíacas associadas à

infecção (LAURIA-PIRES *et al* 2000). O controle do vetor continua sendo a principal forma de prevenção.

## 1.2 Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*

Um inseto vetor que se alimenta em um hospedeiro infectado ingere formas tripomastigotas de *T. cruzi* presentes em sua corrente sanguínea. No intestino médio do inseto, essas formas se diferenciam em formas replicativas denominadas epimastigotas. Essas últimas assimilam sua forma infectiva tripomastigota metacíclica no intestino posterior do inseto e serão excretadas após o repasto sanguíneo deste vetor (NOIREAU *et al*, 2009). A deposição do parasito nas proximidades do local da picada resulta na infecção do hospedeiro vertebrado. Ao invadir as células desse hospedeiro, o protozoário se diferencia na forma amastigota e prolifera causando lise celular. Após a proliferação, ele assume a forma tripomastigota, que é liberada com o rompimento da célula (HECHT *et al*, 2010). Esses tripomastigotas podem invadir células adjacentes ou atingir a corrente sanguínea alcançando diversos tecidos além de possibilitar a transmissão para o vetor durante o repasto sanguíneo.

Quando a infecção pelo parasito ocorre por via oral através de alimentos contaminados, observa-se em geral maior habilidade de infecção de algumas cepas de *T. cruzi* através da mucosa do trato digestório do hospedeiro vertebrado (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991). A contaminação dos alimentos ocorre devido à presença de barbeiros vetores infectados com *T. cruzi* em frutos de palmeiras que não foram sanitizados e processados adequadamente (MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

A transmissão congênita ocorre em bebês nascidos de mães infectadas e a transfusão sanguínea está se tornando um veículo de transmissão importante em países não endêmicos, onde não havia monitoramento do banco de sangue para este tipo de infecção (SCHMUNIS, 1991).

## 2 Triatomíneos: Vetores da Doença de Chagas

Triatomíneos são insetos também conhecidos como barbeiros pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Esta subfamília se divide em cinco tribos: Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini, Linshcosteini, Alberproseniini e Triatomini (TARTAROTTI *et al*, 2006). Todos os membros dessa subfamília são hematófagos em todas as fases do desenvolvimento. São classificados como hemimetábolos e apresentam cinco estágios de ninfa além do estágio adulto. O repasto sanguíneo é fundamental para regular a muda, crescimento e reprodução (TEIXEIRA *et al*. 2006).

O hábito hematofágico destes insetos provavelmente surgiu como fonte de alimentação secundária e, mais tarde, adaptações fisiológicas permitiram que sua alimentação se tornasse estritamente hematofágica. Tais adaptações incluem a digestão do sangue por processos hemolíticos e a excreção de água e sais para compensar a enorme quantidade de sangue ingerida em cada repasto sanguíneo (TEIXEIRA *et al*. 2006). Esta última característica, em particular, os torna excelentes transmissores do *T. cruzi*.

A espécie *Triatoma infestans* pertence à tribo Triatomini e é considerada o principal vetor da doença de Chagas no Brasil (WHO, 2000). A tribo Rodiniini apresenta espécies com diferentes graus de comportamento sinantrópico com algumas estritamente selvagens e outras plenamente adaptadas como vetores domésticos (ABAD-FRANCH, 2009). Dois Gêneros fazem parte desta tribo: *Psammolestes*, com três espécies e *Rhodnius*, com 16 espécies. Dentro do Gênero *Rhodnius*, as espécies *R. pallens* e *R. prolixus* têm importância epidemiológica. A primeira no Panamá e a segunda principalmente na Venezuela, Colômbia e América Central. (ARÉVALO, 2007). No Brasil, *R. robustus* e *R. prolixus* habitam a região amazônica e *R. neglectus* é encontrado no cerrado, enquanto *R. nasutus* ocupa a caatinga (COSTA *et al*, 2011).

*R. prolixus* é o principal transmissor da doença de Chagas na América Central e norte da América do Sul e talvez seja o principal vetor no mundo após a erradicação de populações domésticas de *T. infestans* na América do Sul (COSTA *et al*, 2011).

A identificação de espécies do Gênero *Rhodnius* é dificultada pela sua grande semelhança morfológica, por isso, métodos de caracterização molecular e por meio das

proteínas da saliva vêm sendo desenvolvidos para refinar a descrição das espécies e das diferenças entre elas (SOARES *et al.*, 2000).

### 3 *Rhodnius prolixus*

Essa espécie de triatomíneo habita a América Central e o norte da América do Sul. No ambiente silvestre está geralmente associado a palmeiras, ninhos de aves e de mamíferos roedores. Tem ciclo de vida de aproximadamente três meses e rápida reprodução (Figura 1). É classificado como solenófago, pois retira o sangue do hospedeiro diretamente de vasos sanguíneos com probóscida longa e flexível sem produzir micro-hemorragias (SILVA, 2009).

Palmeiras do Gênero *Attalea* são ecótopos onde se encontram populações de espécies de *Rhodnius*. A presença dessas palmeiras pode ser um indicativo da presença do vetor e do risco de transmissão da DC, pois ela também serve de abrigo aos hospedeiros vertebrados de *T. cruzi* que fazem parte do ciclo de transmissão da doença em ambiente silvestre (RICARDO-SILVA *et al.*, 2012)

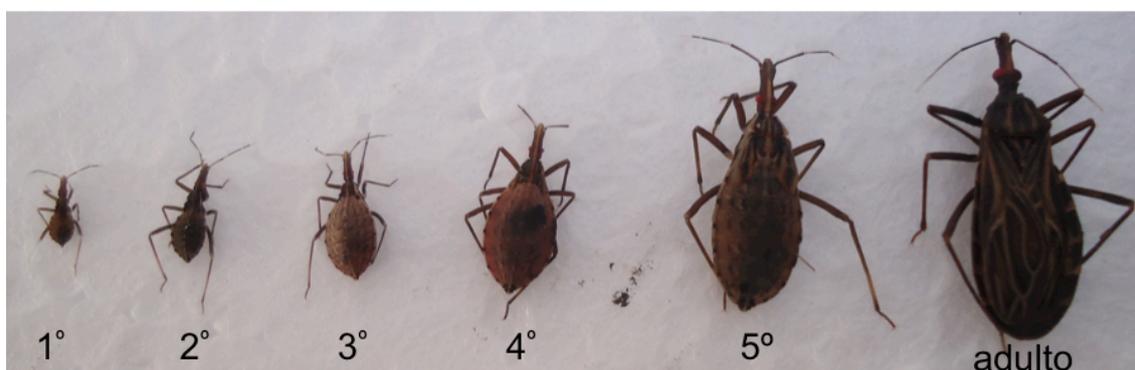
Após a picada na pele do hospedeiro vertebrado, ocorre a fase chamada de prova, caracterizada por movimentos rápidos intraderme da maxila do inseto. Então, quando o vaso sanguíneo é localizado começa a ingestão do sangue. A bomba cibarial é responsável pela sucção do sangue e seus movimentos são controlados por músculos que ocupam boa parte da cabeça do animal. *Rhodnius* é capaz de gerar uma pressão negativa de 1–2 atm durante o repasto (SOARES *et al.*, 2006).

A saliva é continuamente liberada tanto na fase de prova quanto no momento de ingestão do sangue. Ela garante o fluxo de sangue pelo canal de alimentação e é necessária para a localização do vaso sanguíneo durante a fase de prova (LAW *et al.*, 1992; RIBEIRO, 1987). Essa liberação contínua é possível devido ao fato de que triatomíneos possuem o canal alimentar independente do canal salivar (LAVOPIERRE *et al.*, 1959).

*R. prolixus* possui uma fase de prova mais rápida em comparação com *R. robustus* e *R. neglectus* apresentando, maior eficiência na taxa de ingestão total de sangue (SANT'ANNA *et al.*, 2001). Espécies que possuem maiores taxas de ingestão de

sangue tendem a atingir grande densidade populacional e isso pode explicar porque, dentre o Gênero *Rhodnius*, ele é o mais efetivo em adotar hábitos domiciliares (SCHOFIELD *et al.* 1999).

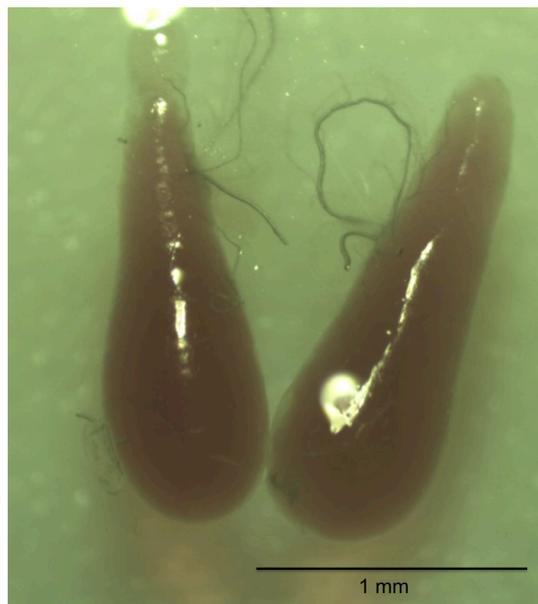
Membros desta espécie possuem características que não são encontradas em nenhuma outra espécie de triatomíneos, tais como a arquitetura da superfície dos ovos, calosidades pós-oculares, inserção apical das antenas e a presença de nitroforinas na saliva (TARTAROTTI *et al.*, 2006 e CHAMPAGNE, 2005). As nitroforinas são hemoproteínas responsáveis pela coloração avermelhada das glândulas salivares de *Rhodnius sp.*



**Figura 1. Estágios de desenvolvimento de *Rhodnius prolixus*** (arquivo pessoal). Ninfas de 1º, a 5º estágios e o inseto adulto com asas desenvolvidas.

As glândulas salivares estão localizadas no tórax do animal e se dispõem em um par de glândulas principal, onde se encontram as nitroforinas (Figura 2), e um par de glândulas acessórias que não têm cor.

Já foi descrito que animais que tiveram suas glândulas salivares retiradas têm maior dificuldade em obter o sangue e apresentam um aumento no tempo da fase de prova (RIBEIRO & GARCIA, 1981). A saliva dos animais hematófagos, portanto, é o principal fator que possibilita este tipo de alimentação. Rica em substâncias bioativas que agem no tecido do hospedeiro vertebrado, ela garante o sucesso do repasto sanguíneo e permite que estes animais ajam como vetores de doenças.



**Figura 2. Morfologia do par de glândulas salivares de *R. Prolixus*** (arquivo pessoal). A cor avermelhada característica das glândulas principais se deve à presença de nitroforinas.

### 3.1 Genoma de *Rhodnius prolixus*

O genoma compreende a sequência completa do DNA de um organismo e contém toda a informação genética que dá identidade a este organismo.

O sequenciamento de genomas de organismos têm avançado significativamente nos últimos anos devido a melhorias na tecnologia de sequenciamento com o desenvolvimento de sequenciadores automáticos de alto desempenho e de novos softwares para tratamento dos dados genômicos com diminuição de custos e diminuição do tempo requerido para tais pesquisas.

No ano de 2005 teve início o sequenciamento do genoma de *R. prolixus* com a criação do consórcio internacional de sequenciamento deste triatomíneo. numa colaboração entre centros de pesquisa do Canadá, Argentina, Brasil, Chile, Colombia, França, Paraguai, Uruguai e Estados Unidos (Dados obtidos através do site [www.genome.gov](http://www.genome.gov) do NIH).

É o primeiro inseto hemíptero a ter seu genoma sequenciado e a escolha da espécie *R. prolixus* se justifica por sua grande importância na transmissão da Doença de Chagas em países da América Central e norte da América do Sul. Seu genoma tem tamanho menor comparado a redúvidos de outras espécies, com 702 Mb, (PANZERA *et al.* 2004) e muitas pesquisas bioquímicas e moleculares acerca de diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento de *R. Prolixus* já foram feitas ou estão em andamento, incluindo cDNA e ESTs (RIBEIRO *et al.*, 2004).

A estratégia de sequenciamento inicialmente adotada foi baseada na genômica estrutural com criação de bibliotecas de BAC e fosmídeos combinada com *Whole Genome sequencing* (WGS) com uma produção estimada de 80000 clones de BAC para produzir uma cobertura de 10X do genoma de *R. prolixus*. Posteriormente, será possível realizar o chamado "prefinishing" ou "prime walker" (sequenciamento automatizado direcionado por primers) a fim de estender a sequência dos contigs (sequências derivadas da montagem) e fechar os gaps da montagem inicial.

O sequenciamento permitirá a integração de informações da biologia celular e fisiologia com os dados genômicos. As informações obtidas a partir desse sequenciamento contribuirão para gerar conhecimento sobre a biologia deste importante vetor e das interações entre vetor e parasito, uma vez que é preciso entender fatores fisiológicos e moleculares que permitem que insetos ajam como vetores de doenças. Além disso, será possível desenvolver mais ferramentas e estratégias para o controle vetorial e manipulação genética deste tipo de inseto, desenvolver estudos filogenéticos mais apurados a partir da comparação genômica com outros artrópodes e explorar o potencial biofarmacêutico de moléculas que este organismo oferece.

Um banco de dados inicial do sequenciamento de *R. prolixus* está disponível em [www.bionotes.com.br](http://www.bionotes.com.br) desenvolvido pelo Instituto de Bioinformática Virtual do Rio de Janeiro e é atualizado constantemente à medida que novos reads são gerados no sequenciamento que está em andamento. A partir desse banco de dados é possível acessar os dados já obtidos e acessar através de hiperlinks resultados de BLAST que mostram sequências similares do banco de dados do NCBI. No presente estudo, estes dados foram utilizados para identificar sequências que provavelmente representam a proteína alvo desta pesquisa: a apirase salivar de *R. prolixus*.

Regiões regulatórias de moléculas secretadas pela glândula salivar ainda não foram caracterizadas e o sequenciamento do genoma oferece a oportunidade de compreender a relação entre o processamento e reposição dos componentes salivares com a fisiologia do inseto como um todo.

### 3.2 Sialoma de *Rhodnius prolixus*

O sialoma compreende a genômica funcional da glândula salivar com análise da expressão de genes a partir da descrição de RNAm (transcriptoma) e das proteínas (proteoma) presentes na glândula salivar.

Em trabalho publicado em 2004, Ribeiro *et al.* descreveram que 64% dos transcritos da glândula salivar de *R. prolixus* são de proteínas secretadas e 23,5% são de proteínas endossomais. Os 12,4% restantes compreendem transcritos com função desconhecida.

Dentre os transcritos associados a produtos secretados, a maioria (83,78%) codifica proteínas da família das lipocalinas que se caracteriza por uma estrutura terciária comum e grande diversidade de funções (MONTFORT *et al.*, 2000).

As nitroforinas, descritas até o momento somente nas espécies do Gênero *Rhodnius*, são as lipocalinas mais abundantes na saliva de *R. Prolixus* com peso molecular entre 18 e 22 kDa (RIBEIRO *et al.* 2004). Estas proteínas contêm um grupo heme ao qual se liga o óxido nítrico (NO) de maneira pH dependente. Quando a saliva é injetada no tecido do hospedeiro vertebrado, há uma mudança do ambiente ácido da glândula salivar para um pH de aproximadamente 7,4 o que causa uma mudança conformacional na proteína levando à liberação de NO no tecido (WEICHSEL *et al.* 2000). Este NO liberado produz vasodilatação dos vasos sanguíneos ativando a guanilato ciclase e aumentando os níveis de cGMP na musculatura lisa que envolve estes vasos.

Outras lipocalinas identificadas no sialoma de *R. prolixus* são RPAI (*Rhodnius prolixus aggregation inhibitor*) e BABP (*biogenic amine binding protein*). A primeira se liga ao ADP quando este se encontra em baixas concentrações (<1µM), mas não possui atividade ADPásica (FRANCISCHETTI *et al.* 2002). Já o BABP inibe a

vasoconstrição por inibir mediadores adrenérgicos e serotonina (ANDERSEN *et al.*, 2007)

Um inibidor de trombina denominado triabina, um inibidor da função plaquetária chamado palidipina e a procalina, com função ainda desconhecida, são lipocalinas anteriormente identificadas em espécies do gênero *Triatoma* que também estão presentes nas glândulas salivares de *R. prolixus* (RIBEIRO & ANDERSEN, 2004).

Os produtos secretados não pertencentes à família das lipocalinas foram identificados como P450, com função de oxidação (RIBEIRO & NUSSENZVEIG, 1993); a mucina, que provavelmente auxilia na lubrificação do canal de alimentação; e similares a família do antígeno 5, amplamente distribuída entre animais e plantas cuja função é pouco conhecida (RIBEIRO & ANDERSEN, 2004).

Dois transcritos foram identificados como apirase com base em sequências previamente depositadas no banco de dados NCBI como *R. prolixus apyrase*. Atualmente estas sequências não se encontram neste banco de dados. Neste trabalho de Ribeiro *et. al* sobre o sialoma foi sugerido que as sequências identificadas como apirases são similares a inositol polifosfato 5-fosfatase e são responsáveis pela atividade apirásica observada na saliva de *R. prolixus*. No entanto, em trabalho publicado em 1986, Sarkis *et. al* já haviam caracterizado a existência de uma verdadeira nucleotídeo difosfohidrolase (apirase) na saliva.

Duas sequências nucleotídicas e suas respectivas sequências peptídicas foram cedidas por meio da colaboração do Dr. José Ribeiro do National Institute of Health – NIH com o Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro – LIPH da Universidade de Brasília – UnB, onde se desenvolveu o presente trabalho. Estas sequências foram usadas na comparação com os dados genômicos disponíveis de *R. prolixus* e em estudos de identificação e alinhamento de sequências descritos no capítulo referente aos resultados obtidos na presente pesquisa.

## 4 Hemostasia

A hemostasia é o processo fisiológico deflagrado pela lesão do endotélio vascular, que resulta no estancamento do sangramento e inicia o reparo dos tecidos e vasos lesionados. Ela é caracterizada pela seguinte sucessão de eventos: identificação do sítio de sangramento, parada do sangramento através da formação de um coágulo estável, lise do coágulo e reparo tecidual. Cada um destes eventos é controlado por diversas moléculas agonistas da agregação plaquetária, vasoconstritores e da coagulação sanguínea.

A hemostasia previne a perda de sangue após a lesão no tecido causada pela picada dos insetos hematófagos. Essa resposta do hospedeiro pode impedir o vínculo hematofágico do inseto com o vertebrado impedindo o repasto sanguíneo. A saliva dos barbeiros é uma rica fonte de substâncias bioativas com ação anti-hemostática.

### 4.1 Vasoconstrição

A vasoconstrição é o estreitamento de vasos sanguíneos derivado da contração da musculatura lisa que circunda estes vasos. Essa contração resulta do aumento da concentração de íons  $Ca^{2+}$  nas células musculares lisas que é estimulado pela epinefrina e norepinefrina.

### 4.2 Agregação plaquetária e coagulação

As plaquetas são células pequenas que possuem no citosol grânulos alfa que armazenam fibronectina, fibrinogênio,  $\beta$ -tromboglobulina. Os corpos densos destas células armazenam serotonina, cálcio, ADP, tromboxano A<sub>2</sub>. O dano ao endotélio expõe proteínas específicas (Fator von Willebrand – FvW). Estas proteínas promovem a ativação e adesão das plaquetas ao colágeno.

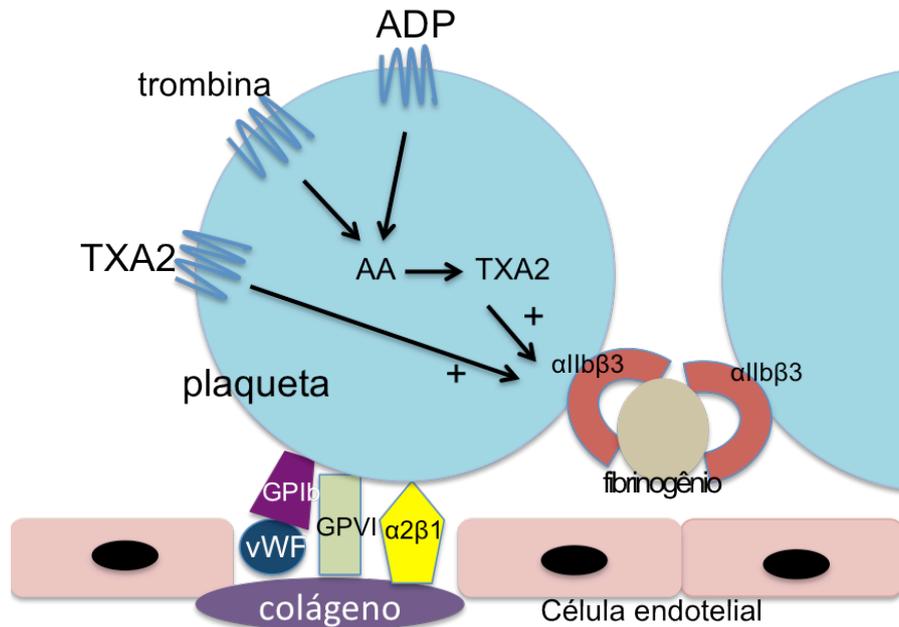
A ativação se dá a partir de receptores da membrana que, ao se ligarem aos agonistas (ADP, colágeno, trombina, Fator de Agregação Plaquetária – PAF), desencadeiam a resposta celular através do aumento do cálcio citoplasmático causando a contração dos microtúbulos circunferenciais e filamentos submembrana. Esta contração comprime elementos do citosol e provoca uma alteração morfológica na

célula que assume uma forma esférica irregular. Além disso, a exposição de receptores de superfície e a secreção do conteúdo dos grânulos e dos corpos densos, responsáveis pela ativação de outras plaquetas, são eventos decorrentes da ativação da célula plaquetária (BATLOUNI, 1993)

As plaquetas então aderem ao FvW e ao colágeno através de receptores, como GPIb, GPVI e a integrina  $\alpha 2\beta 1$ , presentes na membrana das plaquetas. A ligação a esses receptores ativam vias de sinalização intracelular que induzem a liberação dos agonistas da agregação plaquetária tromboxano A2 (TXA2), ADP e trombina que, por sua vez, ativam mais plaquetas. Esses agonistas também promovem a alteração conformacional da integrina  $\alpha IIb\beta 3$  que é responsável pela ligação ao fibrinogênio. Este se liga a outra plaqueta formando um trombo coeso (Figura 3).

A trombina liberada por plaquetas ativa fatores de coagulação V, VIII e XIII. O sistema de coagulação é um conjunto de proteínas plasmáticas, inicialmente inativas (zimogênios) que ativam umas às outras numa sequência determinada, o que aumenta a quantidade de moléculas ativas progressivamente, amplificando a cascata de coagulação.

A coagulação tem início com a exposição da glicoproteína de membrana, denominada fator tecidual, que decorre da injúria vascular. O fator tecidual se liga ao fator VII formando VIIa que ativa o fator X. Fator Xa se liga ao fosfolípido plaquetário e converte protombrina (fator II) em trombina, na presença de  $Ca^{2+}$  e fator Va. A trombina transforma fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina que então formam polímeros. As ligações entre as fibrinas são estabilizadas pelo fator XIIIa e formam uma rede em volta do trombo plaquetário: o coágulo.



**Figura 3. Representação esquemática da ativação plaquetária.** Plaquetas ligam-se ao colágeno através dos receptores GPIb, GPVI e  $\alpha 2\beta 1$ . Moléculas agonistas da ativação (ADP, trombina, Tromboxano A2) ligam-se a receptores específicos levando à liberação do conteúdo dos grânulos e formação de Tromboxano A2 pela via do ácido araquidônico (AA) e ativação da integrina  $\alpha IIb\beta 3$  que permite a agregação. Modificado de Francischetti, 2010

## 5 Saliva dos triatomíneos

A saliva dos barbeiros faz parte do cenário de transmissão da Doença de Chagas e manutenção do ciclo. Uma das adaptações evolutivas que permitiu o surgimento da hematofagia foi o aparecimento de moléculas que contrapõem a hemostasia do hospedeiro e delas depende o sucesso deste tipo de alimentação (MANS, 2011). Essas moléculas proporcionam a fluidez do sangue durante o repasto sanguíneo, principalmente pela estimulação da vasodilatação e inibição da agregação plaquetária. A diversidade molecular da saliva é um campo rico para a descoberta de substâncias farmacologicamente ativas e para a compreensão dos mecanismos evolutivos que levaram a adaptações ao hábito da hematofagia (RIBEIRO & ANDERSEN, 2004).

Insetos hematófagos possuem em sua saliva pelo menos uma substância anti-coagulante, uma anti-agregadora de plaquetas e uma vasodilatadora (RIBEIRO e FRANCISCHETTI, 2002). Tais substâncias, chamadas de sialogeninas (do grego *sialo*, saliva), agem de maneira sinérgica e também redundante, visto que é comum encontrar mais de um tipo de molécula que age no mesmo alvo hemostático (FRANCISCHETTI,

2010). O estudo do sialoma (proteoma e transcriptoma salivares) de diversas espécies tem enriquecido o conhecimento sobre sialogeninas e a composição salivar de determinados hematófagos.

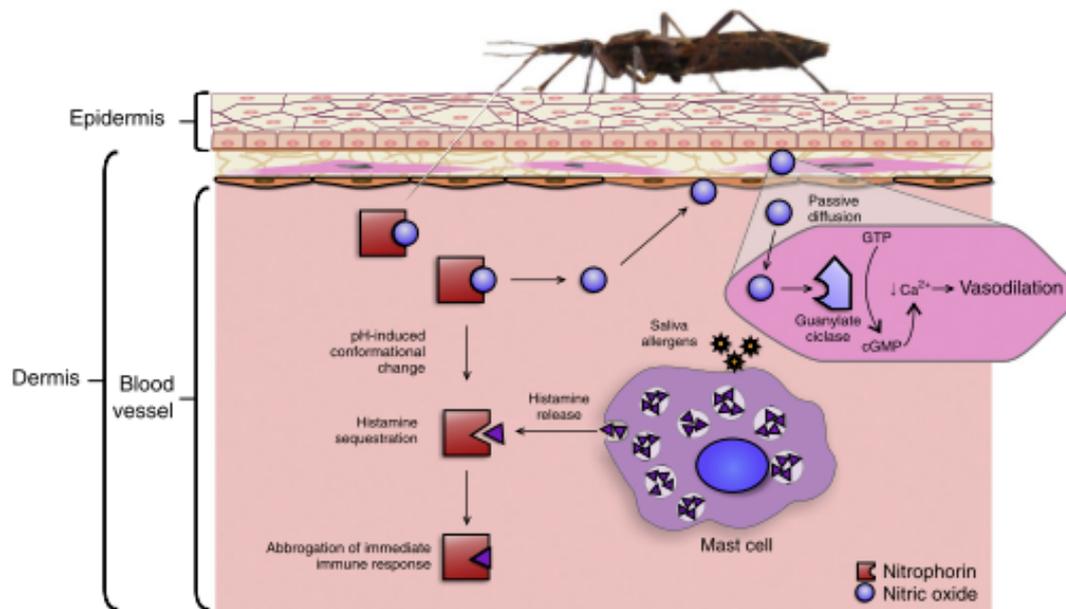
As lipocalinas são encontradas em grande quantidade na saliva de diversos triatomíneos. Estas proteínas compartilham homologia de sequências e estrutura terciária comum. Apresentam grande variedade de funções, dentre elas formação de complexos com macromoléculas solúveis e o transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas (FLOWER, 1995)

Um exemplo do potencial bioativo das moléculas salivares de insetos hematófagos é um inibidor de trombina denominado anofelina, um peptídeo de 6,5 KDa, encontrado na glândula salivar de *Anopheles albimanus*, vetor da malária (VALENZULA *et al*, 1999).

O triatomíneo *Triatoma pallidipennis* possui uma molécula que se liga à trombina e age na agregação plaquetária chamada triabina. A palidipina, também caracterizada na saliva deste inseto, inibe a via de coagulação sanguínea induzida por colágeno (NOESKE-JUNGBLUT *et al*. 1994).

O carrapato *Ornithodoros savignyi* possui na saliva a savignina, um inibidor de trombina que apresenta homologia com um anticoagulante de *Ornithodoros moubata*, a ornitorina (NIENABER *et al*, 1999) *O. moubata* também possui na saliva a moubatina que inibe a agregação plaquetária (KELLER *et al*, 1993).

As nitroforinas são lipocalinas que conferem a coloração avermelhada típica da glândula salivar dos triatomíneos do gênero *Rhodnius*. São hemeproteínas carreadoras de óxido nítrico – NO (Figura 4). NO é uma molécula pequena que passa diretamente através da membrana celular e interage com guanilato ciclase nas células do músculo liso que circundam os vasos sanguíneos causando vasodilatação (ARAUJO *et al*. 2012). A prolaxina-S também chamada de Nitroforina 2 (NP2) impede a ativação do fator X da cascata de coagulação (RIBEIRO *et al*, 1995). Existem quatro tipos de nitroforinas na saliva de *R. prolixus* e elas também se ligam à histamina interferindo no processo de inflamação e ativação da resposta imune do hospedeiro vertebrado (MONTFORT *et al*, 2000).



**Figura 4. Representação esquemática da interação de nitroforina com a célula do hospedeiro que leva à liberação de mediadores da vasodilatação.** No vaso sanguíneo, a nitroforina libera o NO e liga-se à histamina liberada por mastócitos. NO atua na célula muscular que reveste o endotélio causando vasodilatação Araújo *et al*, 2012 (com permissão do autor).

Existem ainda pelo menos três tipos de RPAI na saliva de *R. prolixus*. Estas moléculas apresentam similaridade de sequência com a triabina e palidipina e podem também interferir na agregação plaquetária mediada por colágeno (NOESKE-JUNGBLUT, 1994).

As moléculas anti-hemostáticas encontradas na saliva de insetos hematófagos também são encontradas em espécies com mesmo hábito alimentar pertencentes a outros Filos. É o caso da draculina encontrada na saliva do mamífero *Desmodus rotundus*, um morcego hematófago. A draculina inibe o fator Xa da cascata de coagulação sanguínea (FERNANDEZ *et al*, 1999). A sanguessuga *Hirudo medicinalis* possui um inibidor de trombina altamente específico denominado hirudina com potencial aplicação terapêutica como anticoagulante (MARAGANORE *et al*, 1989).

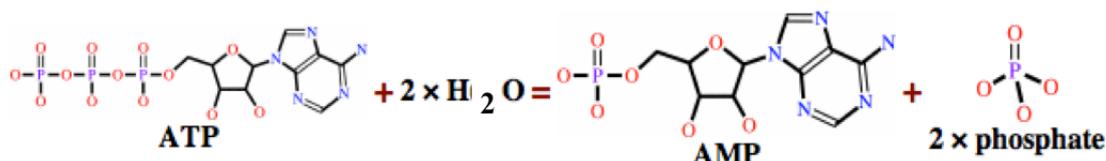
A complexidade e redundância moleculares da saliva garante uma alimentação hematofágica eficiente e demonstra um processo evolutivo convergente que possibilitou o surgimento deste hábito alimentar em diferentes organismos com estratégia anti-hemostática comum. A saliva destes animais fornece uma rica fonte de moléculas com aplicações farmacológicas e seu estudo proporciona uma interessante oportunidade para entender aspectos da interação do hematófago com o hospedeiro vertebrado, além de

possibilitar o esclarecimento de processos intrínsecos da homeostasia e ainda aspectos evolutivos da hematofagia.

## 6 Apirases

Apirases são enzimas que convertem adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofosfato (AMP) e fosfato inorgânico (Pi) pela hidrólise das ligações fosfato (Figura 5).

Também chamada de adenosina difosfatase, ADPase, ATP-difosfatase e ATP-difosfohidrolase (<http://enzyme.expasy.org/EC/3.6.1.5>). Já foi identificada na saliva de diversos insetos hematófagos (carrapatos, mosquitos, triatomíneos, pulgas), onde tem importante papel de anti-agregador de plaquetas (FRANCISCHETTI, 2010). Seu papel em outros organismos e tecidos tem sido atribuído ao processamento de proteínas no retículo endoplasmático e regulação das vias de sinalização celular (ZIMMERMAN *et al.* 2012).



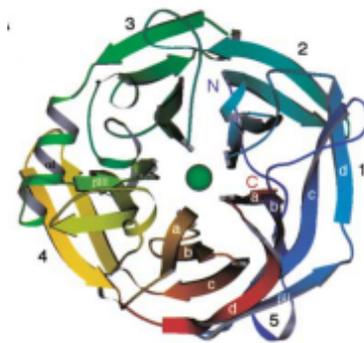
**Figura 5.** esquema representativo da reação catalisada pela apirase. ([http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec\\_number=3.6.1.5](http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3.6.1.5))

Em *Aedes aegypti* foi descrita uma apirase homóloga à 5'-nucleotidase de vertebrados (CHAMPAGNE, 2005). Caracteristicamente, a atividade das apirases depende de íons divalentes e elas apresentam baixa especificidade de substrato podendo hidrolisar outros tipos de nucleotídeos di- ou trifosfatos como GTP, UDP, CTP, GDP (FAUDRY *et al.*, 2004). Três famílias de apirase já foram descritas: 5'-nucleotidases, família CD39 e família *Cimex*.

A família 5' nucleotidase foi identificada inicialmente na saliva de *Aedes aegypti* (CHAMPAGNE . 2005) e posteriormente foi também identificada em *Triatoma infestans* (FAUDRY *et al.*, 2004) e no triatomíneo *Dipetalogaster maxima* (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011). Tipicamente, apirases pertencentes a essa família dependem de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou de  $\text{Mg}^{2+}$ . Apirase da família CD39 foi descrita na saliva da pulga *Xenopsylla cheopis* (ANDERSEN *et al.* 2007). Já a atividade das apirases da família *Cimex*, identificada em *Cimex lectularius*, depende exclusivamente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (FRANCISCHETTI, 2011).

Proteínas com função anteriormente desconhecida que foram encontradas na biblioteca de cDNA de *L. longipalpus*, outro inseto hematófago, e também nos genomas de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Cryptosporidium. parvum* e *Homo sapiens*, são homólogas à apirase de *Cimex* (CHAMPAGNE, 2005). A apirase humana pertencente a esta família foi chamada de *human Soluble Calcium Nucleotidase* (hSCAN) e teve sua estrutura cristalográfica descrita por Dai *et al.* em 2004 (Figura6). No centro da estrutura, em forma de hélice com cinco pás, se encontra um íon  $\text{Ca}^{2+}$ .

A apirase de *R. prolixus* descrita por Ribeiro *et al* em 1986 pertence à família *Cimex*. Sua atividade, portanto, depende de íons cálcio e, na saliva, a função de anti-agregador de plaquetas lhe tem sido atribuída. A presença ubíqua da apirase na saliva de animais hematófagos ilustra sua importância e sugere uma evolução convergente entre animais de hábito hematofágico.



**Figura 6. Estrutura da hSCAN.** Apirase da família *Cimex* que teve sua estrutura elucidada. Os números de 1 a 5 referem-se às pás da estrutura em hélice. As letras de a-d referem-se às cinco folhas  $\beta$  que compõem cada hélice. A esfera verde no centro representa o íon cálcio. N e C representam as extremidades N- e C-terminal da proteína. DAI *et al.*, 2004

## JUSTIFICATIVA

O conhecimento das interações moleculares que permitem que o inseto contorne as respostas imune e hemostática do hospedeiro vertebrado tem importância crítica, dada a relevância do *R. prolixus* como vetor da Doença de Chagas. A apirase é uma das substâncias que contribuem para contornar essas respostas.

As moléculas anti-hemostáticas da saliva de insetos hematófagos têm grande relevância no desenvolvimento de biofármacos direcionados ao tratamento de distúrbios circulatórios. Um desafio a ser superado com a investigação de moléculas anti-agregadoras de plaquetas é o desenvolvimento de substâncias que atinjam especificamente a trombose sem afetar a hemostasia. Os medicamentos em uso atualmente oferecem grande risco de hemorragias (FUNG *et al.*, 2009). O conhecimento da estrutura molecular e caracterização da atividade da apirase de *R. prolixus* amplia a possibilidade do uso desta molécula no desenvolvimento de medicamentos mais específicos.

Ademais, a transmissão do *Trypanosoma cruzi* pelo vetor está diretamente relacionada ao sucesso do repasto sanguíneo que, por sua vez, depende essencialmente do arsenal anti-hemostático presente na saliva dos insetos hematófagos. Esse arsenal possibilita que os triatomíneos ajam como vetores de doenças. A apirase, portanto, é um agente central na perpetuação do ciclo da doença de Chagas, visto que atua na agregação plaquetária, processo-chave na hemostasia.

## OBJETIVOS

Este estudo teve como finalidade principal estabelecer um método de purificação da apirase salivar de *Rhodnius prolixus* e, a partir de então, investigar suas propriedades bioquímicas. Os objetivos abaixo relacionados direcionaram a pesquisa.

- Purificar a apirase de *R. prolixus*;
- Estudar sua organização molecular;
- Investigar a influência de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na atividade apirásica da saliva;
- Investigar a influência de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na organização molecular da apirase de *R. prolixus*.

As atividades propostas a fim de alcançar esses objetivos foram:

- Coleta da saliva de *R. prolixus*;
- Fracionamento das proteínas salivares de *R. prolixus* por cromatografia de gel filtração;
- Separação por cromatografia de afinidade;
- Análise do perfil eletroforético resultante da purificação;
- Identificação das proteínas purificadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF);
- Produção de anticorpos para o estudo da imunogenicidade da apirase de *R. prolixus*.
- Ensaio de atividade e zimograma

## MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, são apresentadas as atividades realizadas a fim de atingir os objetivos propostos nesta pesquisa.

### 1) Criação de triatomíneos

Os triatomíneos da espécie *R. prolixus* utilizados nesta pesquisa foram gentilmente cedidos pelo Prof. Ionizete Garcia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP da Universidade Federal de Goiás – UFG. A colônia é mantida no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília numa temperatura de aproximadamente 26°C e umidade relativa de  $\pm 70\%$ . Os insetos foram alimentados em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) a cada 30 dias.

### 2) Obtenção da saliva

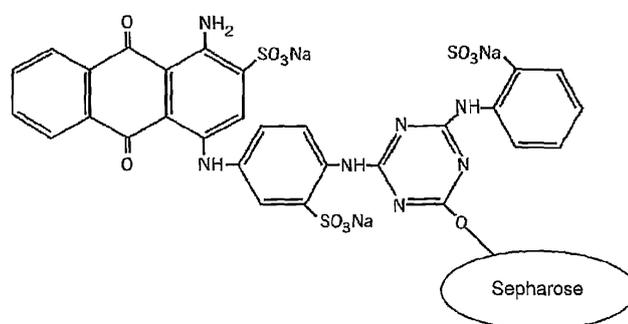
As glândulas salivares de *R. prolixus* foram extraídas de insetos adultos  $\pm 20$  dias após o repasto sanguíneo. Com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica binocular, cada triatomíneo foi posicionado sobre uma lâmina de vidro e a cabeça foi deslocada cuidadosamente com pinça cirúrgica expondo o par de glândulas que foi recolhido e perfurado e armazenado em um microtubo mantido em gelo. Cada tubo, com uma média de 50 pares de glândulas, foi centrifugado a 16000 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C ou utilizado imediatamente.

### 3) Purificação

O conteúdo de 200 pares de glândulas salivares foi injetado na coluna de gel-filtração Superdex<sup>TM</sup>200 100/300 GL, 24 ml (GE Healthcare) eluído com tampão 25 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 5,0 mM CaCl<sub>2</sub> a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. Os picos eluídos foram monitorados a 280 nm no equipamento AKTA Purifier Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC (GE Healthcare), operado com o sistema Unicorn. As frações contendo atividade apirásica foram reunidas e submetidas a cromatografia de afinidade. Para a cromatografia de afinidade, foi utilizada a coluna Hi Trap<sup>TM</sup>Blue HP Sepharose (Figura 7) e tampão de ligação 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Para a eluição da amostra foi utilizado tampão 25 mM Tris-HCl, pH 8,0

150 mM NaCl, 5,0 mM CaCl<sub>2</sub> com concentração de NaCl 1M. Foram testadas também eluições com 0,5 e 2M de NaCl.

Ao final das duas etapas de purificação, as frações foram concentradas em filtro Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 30K (Millipore) a uma velocidade de 5000 xg por 10 min.



**Figura 7. Fórmula esquemática do Cibacron™ Blue F3GA.**

(<http://www.google.com/patents/EP2089424A1?cl=en>)

#### 4) Teste de atividade apirásica em placa

O teste enzimático das frações eluídas após a cromatografia foi feito em placa de 96 poços, com base em método colorimétrico que corresponde à liberação de fosfato inorgânico Pi a partir do substrato ADP (FISKE & SUBBAROW, 1925). O ensaio foi realizado em triplicata e em cada poço foi aplicada amostra de 10 µL de cada fração eluída da cromatografia (tanto de afinidade quanto da gel filtração) com tampão de atividade (100 mM Tris HCl, 10 mM KCl, 450 mM sacarose, 20 mM glicose, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA) e 5mM ADP. Após 20 minutos de incubação a 37°C, a reação enzimática foi interrompida com adição de 10 µL de ácido tricloroacético (TCA) 75%. A coloração é obtida com adição de 30 µL de molibdato de amônio 2,5% diluído em HCl 2N e 12 µL de ácido aminonaftolsulfônico (Fiske e Subbarow, Sigma). Após 5 minutos de incubação, a absorbância foi medida a 630 nm no leitor de microplacas (Tp Reader, Thermoplate). O controle negativo foi obtido com incubação de tampão de atividade e ADP na ausência da amostra e para o controle positivo foi utilizada amostra de saliva total (1/2 glândula).

#### 5) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Tanto a saliva total quanto as frações eluídas das cromatografias foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, 12% e 8% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS). A amostra foi diluída em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 5 mM e no tampão de amostra (50 mM Tris HCl, pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%) com ou sem β-mercaptoetanol (β-ME), com ou sem fervura. O gel foi submetido à voltagem de 90 V no gel concentrador e 150 V no gel separador, com tampão de corrida Tris-Glicina (25mM Tris HCl, pH 8,8, 250 mM glicina e SDS 0,1%) em sistema MiniProtean<sup>®</sup> 3 Cell (Bio-Rad). Os marcadores BenchMark<sup>™</sup> Protein Ladder (Invitrogen) e Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad) foram usados como padrões de massa molecular.

Para visualização das bandas, o gel foi corado com azul de comassie ou com nitrato de prata. Após a eletroforese, o gel foi incubado sob agitação lenta por 2h em solução corante (metanol 45%, ácido acético 10%, Comassie Brilliant Blue R-250). Posteriormente o gel foi submerso em solução descorante (ácido acético 10%. Metanol 10%) e mantido sob agitação lenta até a visualização das bandas. A coloração com nitrato de prata foi feita em três etapas: sensibilização com tiosulfato de sódio, impregnação com nitrato de prata e revelação com carbonato de cálcio.

#### 6) Atividade apirásica em gel

A atividade apirásica de proteínas pode ser determinada pela observação do precipitado de fosfato de cálcio (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) em gel obtido por SDS-PAGE. O fosfato de cálcio é formado a partir da ligação do fosfato, liberado do ATP na reação enzimática, com o cálcio presente na solução de atividade. Forma-se um precipitado de cor branca, insolúvel e visível.

As frações eluídas das cromatografias e o conteúdo salivar total de *R. prolixus* foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 4°C. Posteriormente, o gel foi lavado 2X durante 20 minutos em Triton X-100 2,5% e 2X por 20 minutos em água Milli-Q sob agitação lenta à temperatura ambiente. Após a lavagem, o gel foi incubado na solução de atividade (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM

ATP) até a visualização das bandas de atividade. A reação foi parada com a mesma solução de atividade, porém, na ausência do nucleotídeo.

Com o objetivo de observar os efeitos do cálcio na atividade apirásica da proteína, foram realizados experimentos de atividade em gel na presença de EDTA 10 mM no tampão de diluição da saliva (conteúdo de duas glândulas) e também em diferentes concentrações de SDS no tampão de amostra utilizado na eletroforese (0%, 0,2%, 1% e 2%).

## 7) Espectrometria de massas

No esforço de identificar as proteínas eluídas após a cromatografia, foi realizada espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) no equipamento Autoflex II (Bruker Daltonics, Alemanha) operado com o sistema Flex Control versão 2.2 (Bruker Daltonics), conforme instruções do fabricante.

Cada banda do gel de poliacrilamida foi excisada e incubada com solução descorante contendo 50 mM tiosulfato de sódio e 15 mM ferrocianato de potássio por 10 minutos. Em seguida, foi submetido a três ciclos de lavagem com água Milli-Q e acetonitrila (ACN) 50% alternadamente. A seguir foram feitos mais dois ciclos de lavagem com bicarbonato de amônio 50 mM e ACN 100%, os pedaços de acrilamida foram imediatamente macerados e secos a vácuo em centrifuga SpeedVac por 20 minutos. Após reidratação com tampão de digestão (5 a 10 uL de NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, tripsina 12,5 ng/uL, Promega), foram incubados no gelo por 45 minutos. Após esse período, o excesso de tampão foi retirado para adicionar novo tampão de digestão, desta vez na ausência de tripsina. As amostras foram então incubadas de um dia para o outro a 37°C.

Na manhã seguinte foi adicionado 1 µL de ácido trifluoroacético 1% ao produto da digestão de 1 µL desta amostra acidificada foi aplicado na placa AnchorChip tm target (Bruker Daltonics, Alemanha). Depois de seca, foram aplicados 0,5 uL de matriz (ácido 2,5 dihidroxibenzoico, DHB, 5 mg/mL em solução aquosa de 30% ACN e 0,1% TFA) sobre esta amostra (CHARNEAU *et al*, 2007).

Cada espectro de massa obtido foi processado com o programa Flex Analysis versão 3.0 e Biotoools versão 2.2 (Bruker Daltonics, Alemanha) para gerar as listas de picos de massa. Usando o programa MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) as massas experimentais dos peptídeos foram comparadas às massas teóricas daqueles obtidos por digestão *in silico* das proteínas do banco de dados criado a partir da base de dados do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI e sequências protéicas de *R. prolixus* cedidas por meio da colaboração do Dr. José Ribeiro do *National Institute of Health* – NIH com o Laboratório de Interação Patógeno-hospedeiro – LIPH da Universidade de Brasília – UnB.

#### 8) Obtenção de anticorpos

Foram produzidos dois tipos de anticorpos contra duas bandas de proteínas obtidas por meio de SDS-PAGE após as cromatografias de gel filtração e afinidade. Uma banda de 60 KDa correspondente à banda mais ativa no ensaio de atividade em gel e outra de 45 KDa identificada como uma apirase por espectrometria de massa.

Quatro camundongos Swiss machos com idade de 8 semanas, mantidos no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, foram imunizados. Dois deles foram imunizadas com a banda de 45 KDa e os outros dois com a banda de 60 KDa. O gel de poliacrilamida submetido à eletroforese foi corado com azul de Comassie. As bandas foram retiradas do gel, maceradas e homogeneizadas em 100 µL de adjuvante completo de Freund na primeira aplicação e o mesmo volume do adjuvante incompleto na segunda aplicação. Para a terceira aplicação, foram utilizadas bandas maceradas na ausência de adjuvante. A aplicação foi feita por via intraperitoneal com intervalo de 15 dias entre as doses. Uma semana após a última dose, foi coletado por punção via retro-orbital com o animal previamente anestesiado com cetamina e xilasin (1:1) em solução com volume final de 50 uL por injeção intramuscular. O soro foi aliquoteado e mantido a -20° C.

#### 9) Imunodeteção

Para averiguar a reação com o anticorpo produzido, o conteúdo das glândulas salivares de *R. prolixus* foi separado em gel de poliacrilamida como descrito. As bandas

protéicas presentes no gel foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose em um sistema de transferência horizontal (MultiphorII). A transferência ocorreu a uma corrente constante de 0,8 mA e 90 V, por 90 minutos em tampão de transferência (Tris-HCl 48 mM, pH 9,2; glicina 39 mM; metanol 20%; SDS 0,037%). As bandas transferidas à membrana foram visualizadas após coloração com solução Ponceau (Ponceau S 0,2% p/v; ácidoacético 1%).

Para evitar a ligação inespecífica do anticorpo à superfície da membrana, esta foi incubada em solução PBS-leite 5% por toda a noite, a 4°C. Após o bloqueio a membrana foi submetida a três ciclos de lavagem em PBS, sob agitação constante por 5 min.

A seguir, a membrana foi incubada com o soro contendo os anticorpos primários, na diluição 1/500 em PBS-leite desnatado 1%, por 2 h sob agitação constante. A membrana sofreu novo ciclo de lavagem e foi incubada com o segundo anticorpo, anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Invitrogen) diluído na proporção 1/2000. Finalmente, a membrana foi novamente lavada, incubada por 10 min em tampão de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM) e revelada com substrato NBT/BCIP (Sigma) diluído no mesmo tampão. A reação foi interrompida com sucessivas lavagens em água Milli-Q.

#### 10) Alinhamento de sequências

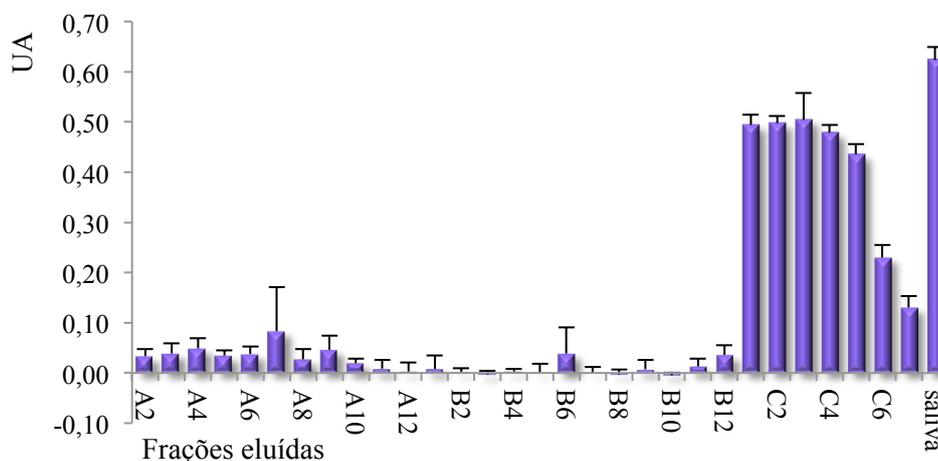
Os alinhamentos foram feitos utilizando o programa Clustal Omega ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_clustalo/toolform.ebi](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalo/toolform.ebi)) e BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). As sequências do genoma de *Rhodnius prolixus* foram obtidas no endereço eletrônico <http://rhodnius.iq.ufrj.br/>.

## RESULTADOS

### 1. Purificação da apirase salivar de *Rhodnius prolixus*

Sabendo que a apirase tem afinidade por nucleotídeos, foi realizada cromatografia de afinidade com o objetivo de purificar esta proteína. Um extrato salivar de 30 glândulas foi aplicado na coluna Hi Trap<sup>TM</sup>Blue HP Sepharose. Essa coluna possui imobilizado em sua fase estacionária o corante Cibacron<sup>TM</sup> Blue F3G-A, um corante derivado da triazina com estrutura química similar ao ATP, devido à presença de porção hidrofóbica, grupos carregados e elevada flexibilidade, e que não é clivável (Figura 7). Para eluir as proteínas ligadas à coluna foi utilizado o tampão de ligação adicionado de NaCl num gradiente de 0 a 2M.

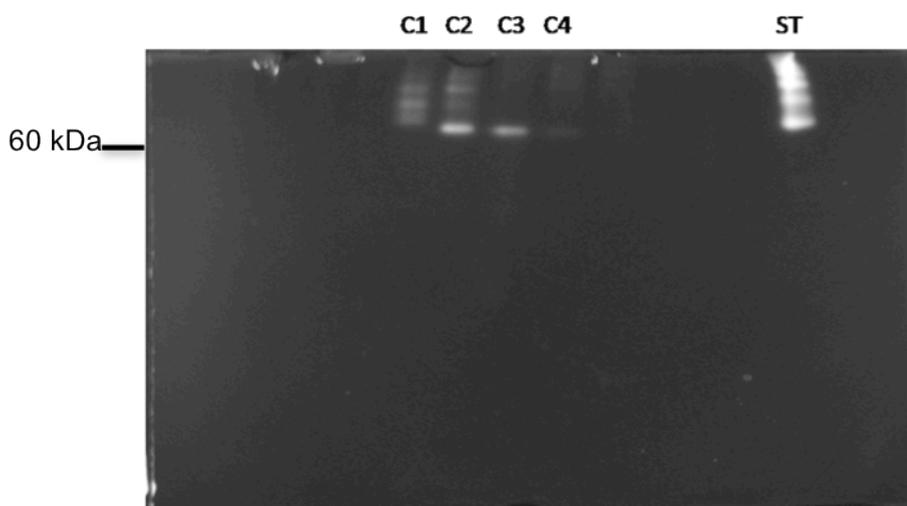
A atividade apirásica das frações eluídas foi analisada através do teste de atividade em placa (Figura 8). As frações que apresentaram atividade em placa correspondem àquelas que apresentaram atividade em gel.



**Figura 8. Teste de atividade em placa das frações eluídas na cromatografia de afinidade.** A unidade de absorvância foi medida a 630nm. O extrato total da saliva foi usado para o controle positivo ( $\frac{1}{2}$  glândula).

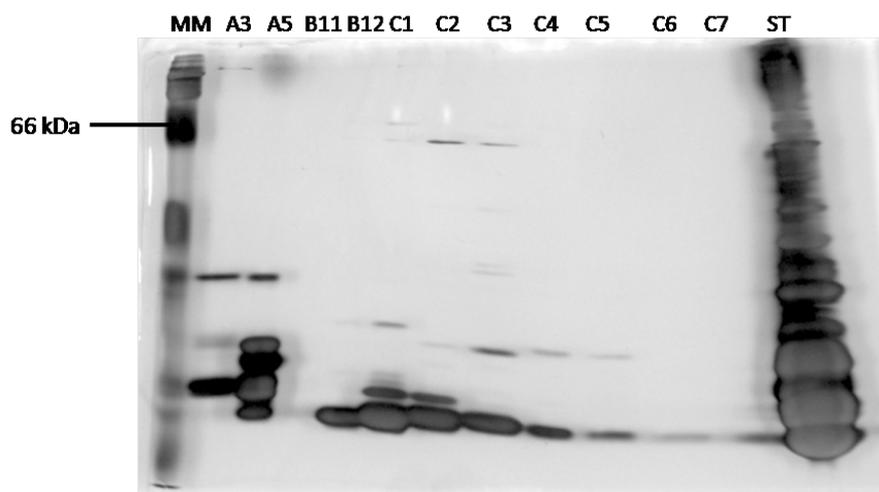
O zimograma realizado com as frações eluídas correspondentes aos picos observados no cromatograma mostrou que as proteínas com atividade apirásica possuíam pesos moleculares acima de 60 KDa (Figura 9). Observou-se a presença de três bandas bem visíveis nas frações C1 e C2, e apenas uma banda com atividade nas

frações C3 e C4. Pelo menos cinco bandas com atividade apirásica foram detectadas no extrato salivar total.



**Figura 9. Zimograma realizado com as frações resultantes da cromatografia de afinidade do extrato salivar de *R. prolixus*.** Uma amostra de 10  $\mu$ L de cada fração eluída da cromatografia de afinidade foi submetida a SDS-PAGE 12% a 4°C na ausência de agente redutor e sem fervura. Posteriormente, o gel foi incubado em tampão de atividade contendo ATP 5 mM. A atividade hidrolítica em gel foi constatada pela formação de um precipitado de cor branca derivado do fosfato, liberado do ATP, com o cálcio presente no tampão de atividade. As frações de C1 a C4 possuem atividade apirásica. ST: saliva total (2 glândulas).

A Figura 10 apresenta a eletroforese em gel de poliacrilamida realizada com as mesmas amostras e corado com nitrato de prata. A análise mostrou que as frações eluídas possuem uma proteína de baixo peso molecular, aproximadamente 20 kDa, que aparece em grande quantidade e não possui atividade apirásica (Figura 10). Como o corante Cibacron Blue F3GA interage com uma variedade de proteínas, trata-se provavelmente de uma proteína que também se ligou à coluna por possuir afinidade por nucleotídeos. A proteína “*Rhodnius prolixus aggregation inhibitor 1*” (RPAI-1), de 19 kDa, está presente na saliva de *R. prolixus* e se liga a ADP (FRANCISCHETTI *et al*, 2002). Entretanto, outros experimentos seriam necessários para determinar se esta banda de menor peso molecular observada no gel corresponde realmente a esta lipocalina.

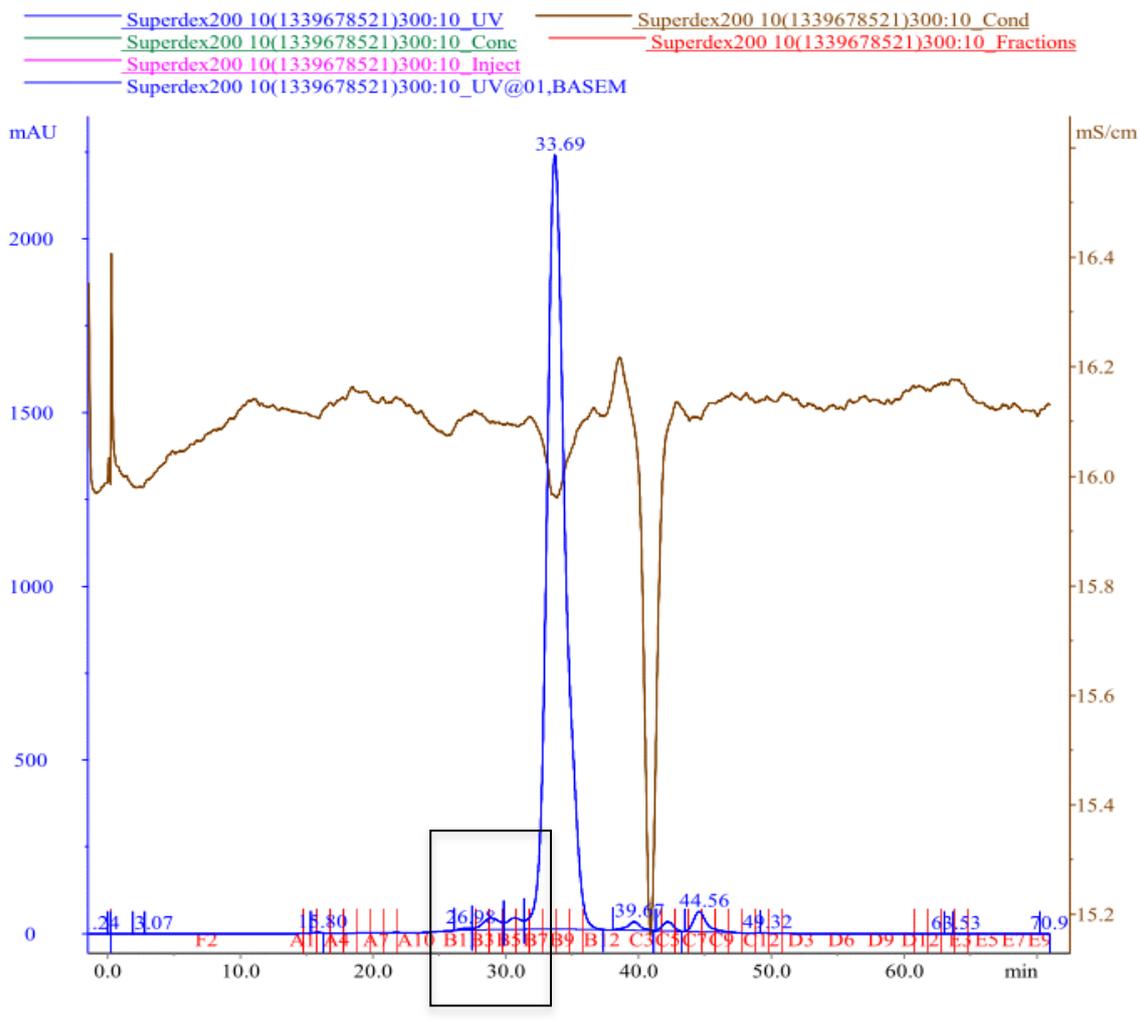


**Figura 10. Perfil eletroforético das frações resultantes da cromatografia de afinidade do extrato salivar de *R. prolixus*.** Amostras de 10  $\mu$ L de cada fração correspondentes aos picos no cromatograma foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE 12%) na ausência de agente redutor e sem fervura. O gel de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata. MM: marcador de peso molecular *Kaleidoscope prestained* (kDa); Frações: A3, A5, B11, B12, C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7. ST: saliva total (1/2 glândula).

No gel corado com prata, as bandas que correspondem àquelas do gel de atividade não estão plenamente visíveis, indicando pouca quantidade de proteína. É preciso destacar que o efeito da atividade em gel é cumulativo e depende tanto da estabilidade da proteína quanto da quantidade de substrato presente no tampão de atividade. Por isso, para a atividade em gel, foi usado ATP no lugar de ADP, potencializando a formação do precipitado de fosfato de cálcio devido à maior quantidade de fosfato liberado na reação enzimática.

Como o objetivo deste estudo é a purificação da apirase salivar de *R. prolixus*, foi realizada cromatografia de gel filtração em coluna Superdex<sup>TM</sup>200 100/300 GL para excluir as proteínas de baixo peso molecular observadas na cromatografia de afinidade. O perfil cromatográfico do extrato salivar aplicado na coluna apresentou cinco picos pequenos de eluição e um pico bem maior correspondente às lipocalinas, as quais estão presentes em grande quantidade na saliva de *R. prolixus* (Figura 11)

## Chromatogram



**Figura 11. Cromatograma obtido por gel filtração do extrato salivar de *R. prolixus*.** Foram utilizados 200 pares de glândulas. Condições cromatográficas: coluna Superdex<sup>TM</sup> 200 100/300 GL, fase móvel: Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5,0 mM, fluxo 0,5 mL/min. A apirase foi eluída entre 25 e 35min contados a partir do início do método. (retângulo em destaque).

As frações eluídas da cromatografia de gel filtração que apresentaram atividade apirásica em placa (Figura 12). correspondem àquelas que apresentaram atividade no zimograma (figura 13).

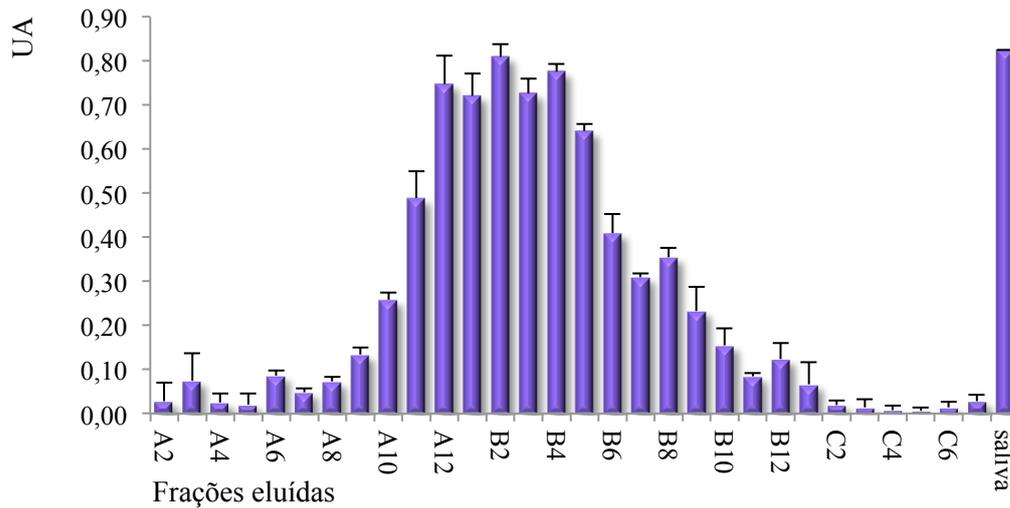
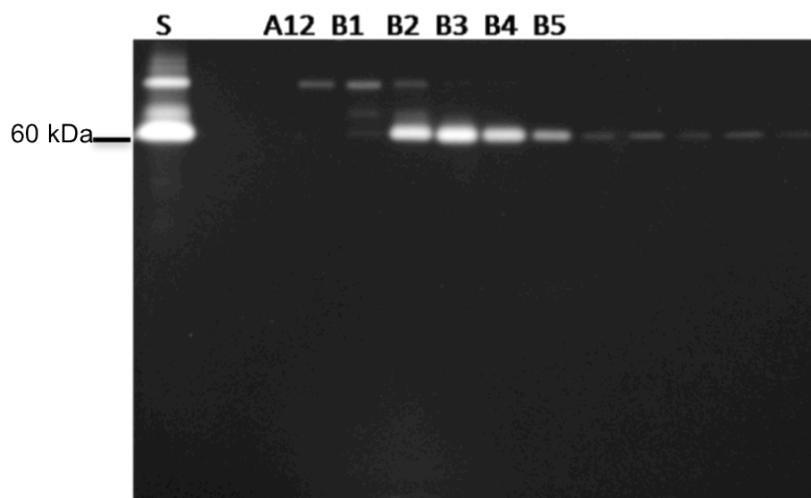
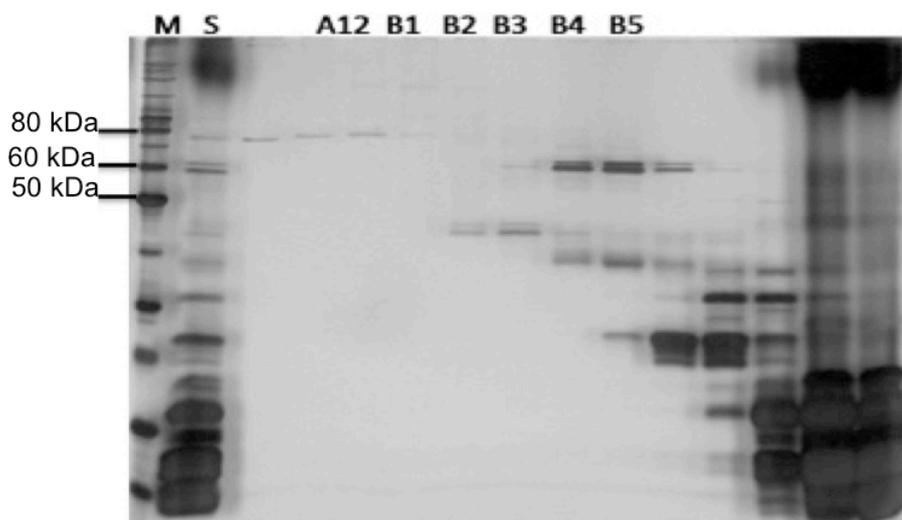


Figura 12. **Teste de atividade em placa das frações eluídas na gel filtração.** A unidade de absorvância foi medida a 630nm. O extrato total da saliva foi usado para o controle positivo (½ glândula).

A Figura 13 mostra a atividade em gel e a figura 14 mostra o perfil eletroforético das frações resultantes da coluna de gel filtração. Analisando o zimograma, observou-se que a atividade apirásica estava presente em 11 frações (A11, A12, B1 – B8). Observou-se ainda a presença de três bandas nas frações B1 e B2, e apenas uma banda com atividade nas frações B3-B8. A análise do extrato salivar total permitiu detectar pelo menos cinco bandas com atividade apirásica.



**Figura 13. Zimograma realizado com as frações resultantes da cromatografia de gel filtração do extrato salivar de *R. prolixus*.** Uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  de cada fração eluída da cromatografia de gel filtração foi submetida a SDS-PAGE 12% a 4°C na ausência de agente redutor e sem fervura. Posteriormente, o gel foi incubado em tampão de atividade contendo ATP 5 mM. A atividade hidrolítica em gel foi constatada pela formação de um precipitado de cor branca derivado do fosfato, liberado do ATP, com o cálcio presente no tampão de atividade. S: extrato salivar total de *R. prolixus* (2 glândulas).



**Figura 14. Perfil eletroforético das proteínas do extrato salivar de *R. prolixus* eluídas na gel filtração.** Amostras de 10  $\mu\text{L}$  de cada fração foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE 12%) na ausência de agente redutor e sem fervura. O gel de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata. M: marcador de peso molecular Bench Mark (em kDa); S: extrato total da saliva de *R. prolixus* (1/2 glândula)

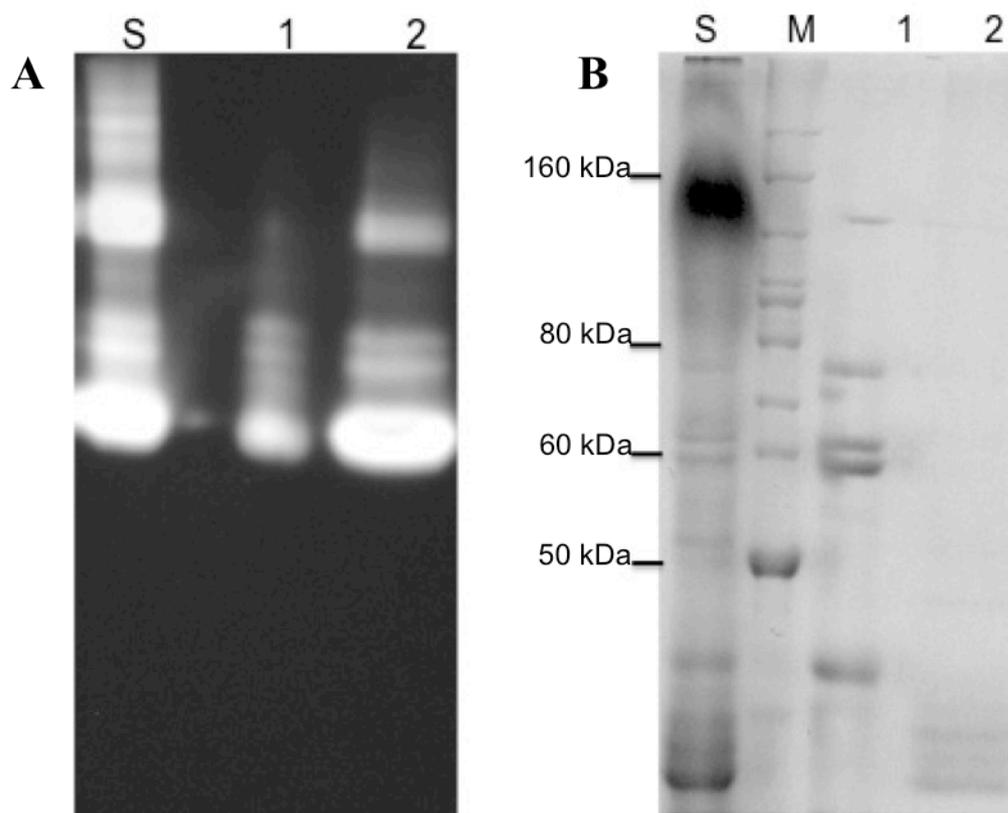
As frações contendo atividade apirásica apresentaram tempo de retenção na coluna de gel filtração entre 27,31 min. e 30,75 min. – equivalente a um volume entre 13,6 mL e 15 mL. De acordo com a curva de calibração da coluna (tabela 1), as proteínas apresentariam pesos moleculares entre 158 KDa e 67 KDa (fig 14).

**Tabela 1. Curva de calibração da coluna Superdex™200.**

<b>Proteína</b>	<b>MW (kDa)</b>	<b>Volume (mL)</b>
<b>Ferritina</b>	440	10,77
<b>Aldolase</b>	158	12,95
<b>Albumina</b>	67	14,5
<b>Ovalbumina</b>	43	15,55
<b>Ribonuclease</b>	13,7	18

As frações que apresentaram maior atividade, de A12 a B5, foram reunidas e então submetidas à cromatografia de afinidade utilizando a coluna HiTrap Blue com injeção manual da amostra. Para a eluição foi usado o tampão de ligação contendo NaCl 1M e 2M e coletadas frações de 500uL.

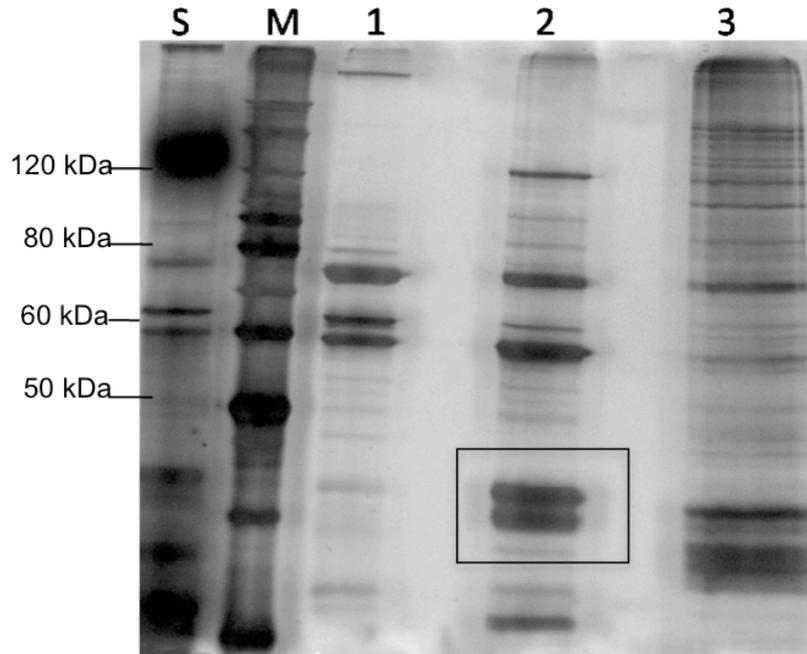
As frações resultantes dessa cromatografia foram concentradas em Amicon 30K a 2000 xg por 10 minutos. A solução então obtida apresentou uma concentração de proteínas 5 vezes maior que a solução inicial. Depois de concentradas, as amostras foram submetidas à eletroforese (Figura 15 A e B).



**Figura 15. Zimograma e perfil eletroforético de frações do extrato salivar de *R. prolixus* eluídas da coluna de afinidade. SDS-PAGE 10% sem agente redutor e sem fervura. A- Zimograma; B- Gel de poliacrilamida corado com azul de Coomassie Blue. M: marcador Bench Mark (em KDa) S: saliva total (2 glândulas); 1: eluição com 1M de NaCl; 2: eluição com 2M de NaCl.**

A Figura 15-A mostra que a proteína com maior atividade apirásica tem em torno de 60 KDa. Nesta faixa de tamanho, observa-se no gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue a presença de duas bandas distintas (Figura 15-B). Não foi possível determinar, neste experimento, se o precipitado de cálcio derivado da atividade apirásica na altura de 60 KDa correspondia a uma ou às duas bandas. No zimograma também é possível visualizar duas bandas de atividade na altura de 75 kDa e outra na altura de aproximadamente 130 kDa.

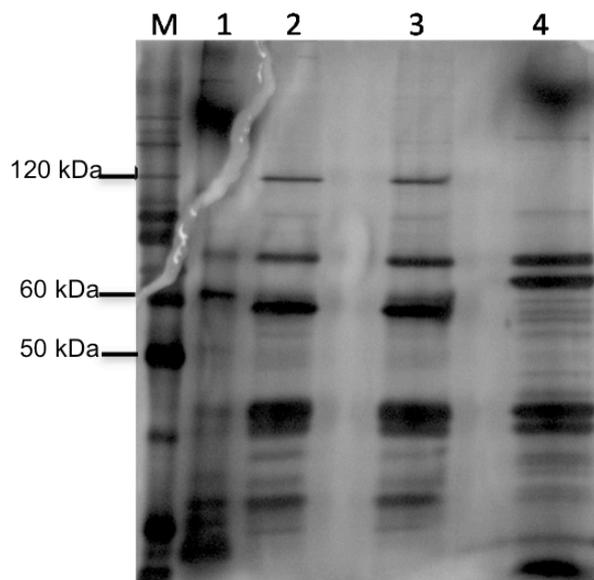
Uma nova tentativa de purificação foi realizado seguindo-se o mesmo protocolo de fracionamento em gel filtração seguido por cromatografia em coluna de afinidade. Desta vez, a eluição das proteínas salivares na última coluna foi realizada utilizando NaCl 0,5M, 1M e 2M. As frações contendo atividade apirásica em placa foram reunidas, concentradas em Amicon 30K e submetidas à eletroforese (Figura 16).



**Figura 16. Perfil eletroforético de frações eluídas da coluna de afinidade.** SDS-PAGE 10% sem agente redutor e sem fervura. O gel foi corado com nitrato de prata. M: marcador Bench Mark (em KDa) S: saliva total (1/2 glândula); 1: eluição com 0,5M de NaCl; 2: eluição com 1M de NaCl; 3: eluição com 2M de NaCl. Em destaque, as bandas identificadas como apirase por espectrometria de massas.

A partir de então, ficou estabelecida a concentração de 1M de NaCl para a eluição da coluna de afinidade e a concentração de 2M passou a ser utilizada somente para a lavagem da coluna.

Para avaliar o efeito do cálcio na atividade, foi utilizado EDTA, um potente agente quelante de íons metálicos bastante usado em estudos de interação entre proteínas, sobre o perfil das bandas observadas no zimograma e no gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata após a purificação em cromatografia de afinidade, a amostra eluída com 1M de NaCl foi incubada por 10 minutos em tampão contendo 10 mM de EDTA. A Figura 17 mostra que não foi observada nenhuma diferença entre a amostra não incubada e a amostra incubada com EDTA. Portanto EDTA até a concentração de 10 mM não foi suficiente para quelar todo o  $\text{Ca}^{2+}$  e alterar a estrutura das proteínas, bem como sua mobilidade no gel. Diferente do EDTA, a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol alterou a conformação das proteínas e, assim, o perfil de migração no gel SDS-PAGE. Esse resultado indica a presença de pontes dissulfeto intramoleculares nas proteínas.



**Figura 17. Perfil eletroforético da amostra obtidas na purificação na presença de EDTA e  $\beta$ -mercaptoetanol.** SDS-PAGE 10% corado com nitrato de prata. **M:** marcador Bench Mark (em KDa); **1:** saliva total (1/2 glândula); **2:** amostra da purificação fração eluída com 1M de NaCl); **3:** a mesma amostra na presença de EDTA 10 mM; **4:** a mesma amostra na presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol 10%.

## 2. Análise por espectrometria de massas (MS)

Para identificar as proteínas purificadas da saliva de *R. prolixus*, as bandas foram excisadas do gel (Figura 16) e analisadas por espectrometria de massas (MS) do tipo MALDI-TOF.

Até o momento foram identificadas duas bandas entre 40 e 45 kDa que não apresentaram atividade apirásica no zimograma (Figura 16). Estas proteínas foram identificadas como uma sequência peptídica, inserida no banco de dados como “apirase de *Rhodnius*” (Figura 18). Esta sequência proteica obtida na descrição do sialoma de *R. prolixus* foi cedida pelo Dr. José Ribeiro do National Institute of Health – NIH, com o qual Laboratório de Interação Patógeno-hospedeiro – LIPH/UnB mantém colaboração.

**Protein View**

Match to: [gi|007](#); Score: 58  
**Apyrase de rhodnius**

Nominal mass ( $M_r$ ): 42801; Calculated pI value: 8.31  
 NCBI BLAST search of [gi|007](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Fixed modifications: Propionamide (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Number of mass values searched: 23  
 Number of mass values matched: 6  
 Sequence Coverage: 14%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 KTLKMQTWYL SAITITALFL WTTRFVERA FKDNSGNTLL ESEVGDNSLE
51 KTSVYNSTYP ITKSEADGDK IVFKIAIISD MDKLSATVSN TWRSLYKKGT
101 LTWDKTSEKV DVVWDEEDRD LKSKYSYSGR GMELSELVTF NGKLFSPDDR
151 TGIVYLIENG NFYPWVMLLD GPGNINKGFK SEWATVKDEH LYVGSSGMEW
201 VTNGTIDNYN AMWVKRVNRY GNKTNINWQN NYEALRKKLK VTYPGYMWHE
251 AVVWSDIHKK WFFLPRKMSR KAYDSKKDEK KGTNKKLLITS DFKDIKVLII
301 HYIIVGEKNP EHGFSSEKFI PNTEKQVIVA LKSVEVGNLA ETYLAFTID
351 GKTLLDEMKV GDIKYEIEF I
  
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

Start	End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
125	130	732.36	731.36	731.32	0.04	0	<b>YSYSGR</b>
131	143	1424.77	1423.77	1423.70	0.07	0	<b>GMELSELVTFNGK</b>
131	143	1440.80	1439.80	1439.70	0.10	0	<b>GMELSELVTFNGK</b> Oxidation (M)
144	150	849.41	848.41	848.40	0.01	0	<b>LFSPDDR</b>
261	266	865.53	864.53	864.46	0.06	0	<b>WFFLPR</b>
333	352	2140.01	2139.00	2139.11	-0.11	0	<b>SVEVGNLAETYILAF</b> TIDGK

**Figura 18. Resultado da identificação da apirase por espectrometria de massas.** A análise foi feita pelo programa MASCOT mostrando a identificação de uma das proteínas resultantes da purificação como uma apirase.

Uma busca de sequências similares com a ferramenta BLAST foi realizada. A sequência identificada por MS tem identidade de 53% com a apirase de *Cimex lectularius* (Figura 19). A atividade catalítica de apirases desta família se deve ao posicionamento de peptídeos carregados negativamente no sítio de clivagem do substrato e, tipicamente, a sequência N-terminal apresenta maior variação comparada à sequência C-terminal (DAI *et al.*, 2004). Ademais, as sequências cedidas pelo Dr. Ribeiro não apresentam peptídeo sinal de secreção pela via clássica, o que pode explicar porque o alinhamento não considerou a parte N-terminal das sequências.

RecName: Full=Apyrase; Flags: Precursor

Sequence ID: [sp|O96559.1|APY\\_CIMLE](#) Length: 364 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#)

apyrase [*Cimex lectularius*]

Sequence ID: [gb|AAD09177.1](#)

Range 1: 37 to 364 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
344 bits(883)	7e-113	Compositional matrix adjust.	178/333(53%)	235/333(70%)	9/333(2%)
Query 43	EVGDNSLEKTSVYNSTYPITKSEADGDKIVFKIAIISDMDK--LSATVSNWRSLYKKG				100
	E+G S E + NS YP+T + K+ FKI +ISD DK +S SNTW S Y GT				
Sbjct 37	ELGHASGETNA--NSKYPLTTPVEENLKVRFKIGVISDDDKNAVSKDESNTWVSTYLTGT				94
Query 101	LTWDKTSEKVDVVWDE-EDRDLKSKYSYSGRGMELSELVTFNGKLFSPDDRTGIVYLIEN				159
	L W+K+++K+ V WD+ ++ +KSKYSY GRGMELSELVTFNG L + DDRTG+VY++++				
Sbjct 95	LEWEKSTDKITVQWDKGNKVKKYSYSGRGMELSELVTFNGNLLTFDDRTGLVYIILKD				154
Query 160	GNFYPWVMLLDGPGNINKGFKSEWATVKDEHLYVGSSEMEWVT-NGTIDNYNAMWVKRVN				218
	YPWV+L DG G +KGFKSEWAT K +LYVGSSG EW T GTI+NYN MWK +N				
Sbjct 155	DKVYPWVVLADGDGKNSKGFKSEWATEKAGNLYVGSSEMEWTTKEGTIENYNPMWVKMIN				214
Query 219	RYGNKTNINWQNNYEALRKKLKVTPGYMWHEAVVWSDIHKWFFLPRKMSRKAYDSKKD				278
	+ G T++NWQ NYE +R + +T+PGYMWHEA WSD + KWFFLPR +S++AYDSKK				
Sbjct 215	KNGEVTSLNWQTNYEKIRSSMNITFPGYMWHEAACWSDKYNKWWFFLPRALSQEAYDSKKF				274
Query 279	EKKGTNKLITSDFKDIKVLIIHYIIVGEKNPEHGFSFVKFIPNTEDKVIVALKSVEVGN				338
	E +G N ++I+ D K K I G+ + GFS+FKF+P +EDK+IV LK+VE +				
Sbjct 275	ETQGAN-VIISCDKFEKCEPTQ--IQKTEDKRGFSNFKFVPTSEDKIIVGLKTVEADD				331
Query 339	LAETYILAFITIDGKTLLEDKMGVDIKYEGIEFI		371		
	ETY AF ++GK LL+E K+ D KYEG++F+				
Sbjct 332	TTETYFTAFDLEGKVLLEETKIDDKHYEGVDFV		364		

**Figura 19. Resultado da busca através da ferramenta BLASTp.** A sequência identificada por MS possui identidade de 53% com a apirase de *Cimex lectularius*.

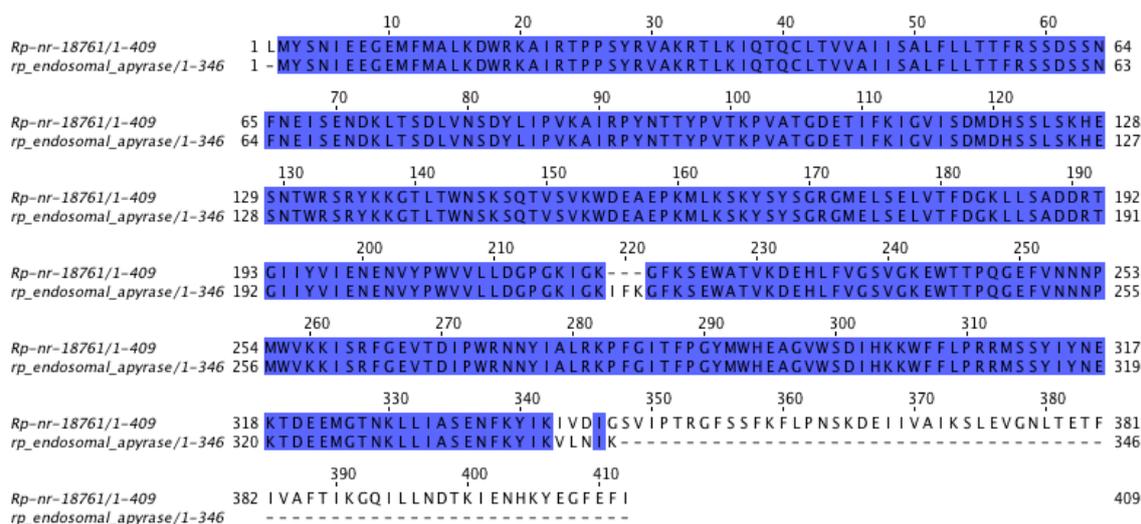
É possível que a banda identificada por MS seja o monômero da apirase salivar de *R. prolixus* e não possui atividade apirásica. As bandas presentes nos ensaios de atividade em gel sugerem que, sob estas condições, essa proteína forma oligômeros de tamanho crescente capazes de clivar ATP. Por outro lado, a formação de complexos proteicos pode dificultar a análise por espectrometria de massa, já que alguns peptídeos resultantes da fragmentação destes complexos podem conter sequências de mais de uma proteína e não serem compatíveis com nenhuma sequência presente no banco de dados.

### 3. Apirase no genoma de *R. prolixus*

Foi realizada uma busca por genes que codificam apirases no banco de dados do genoma de *R. prolixus*, que até o momento foi analisado parcialmente. Foram identificados 22 contigs e 16 sequências peptídicas como apirase. A fim de comparar as sequências derivadas do sialoma, cedidas pelo Dr. José Ribeiro (NIH), com as sequências do genoma, foram feitos alinhamentos em busca da apirase salivar, através do programa Clustal Omega.

As sequências de nucleotídeos tiveram homologia considerável com as sequências do sialoma, em torno de 51% de identidade. No entanto, foram encontradas apenas duas sequências peptídicas com homologia significativa com as sequências peptídicas derivadas do sialoma. (Figura 20)

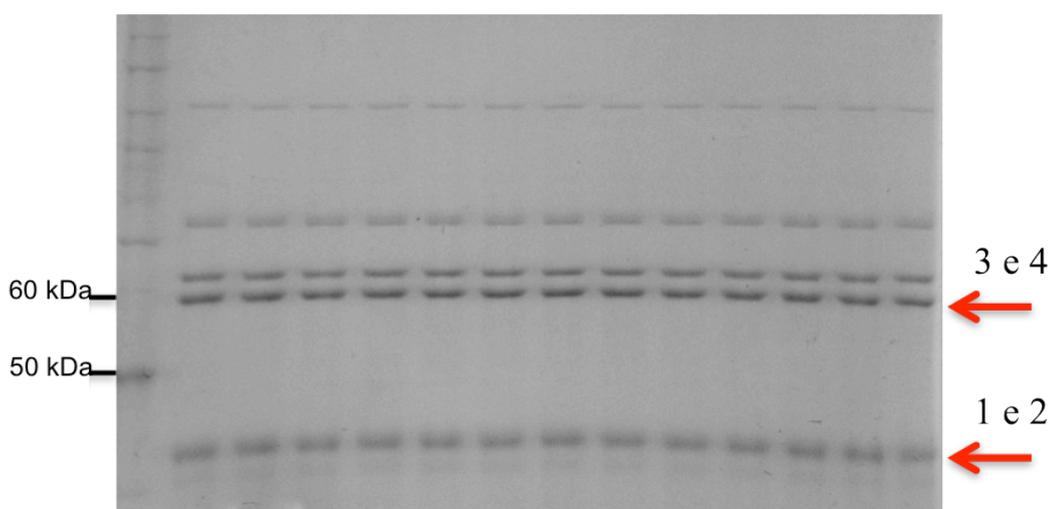
A predição bioinformática através do programa SignalP não identificou peptídeo sinal de secreção em nenhuma das sequências de apirase do genoma.



**Figura 20.** Alinhamento da sequência do sialoma (*rp\_endossomal\_apirase*) com sequência do genoma (*Rp\_nr-18761*). As duas sequências possuem identidade de 97%.

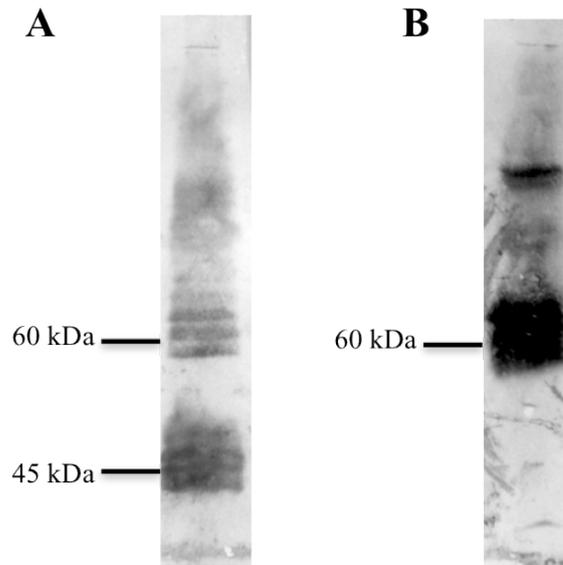
#### 4. Análise da imunogenicidade da apirase salivar de *R. prolixus*

A partir da purificação parcial da apirase, e, após SDS-PAGE, duas bandas foram escolhidas para produção de anticorpos. A banda de 45 kDa não apresenta atividade sob as condições utilizadas nos testes de atividade em gel, mas foi identificada por MS como uma apirase descrita no sialoma de *R. prolixus*. Ela foi escolhida para obtenção de anticorpos juntamente com a banda de 60 kDa (Figura 21) que apresenta maior atividade em gel. Para a imunização, foram utilizados quatro camundongos. Os camundongos 1 e 2 foram imunizados com a banda de 45 kDa, enquanto a banda de 60 kDa foi utilizada para imunizar os camundongos 3 e 4, conforme descrito anteriormente na seção Material e Métodos.



**Figura 21: Gel utilizado para imunodeteccção.** Foram utilizadas as frações resultantes da purificação. Os camundongos 1 e 2 foram imunizados com a banda de 45 kDa e os camundongos 3 e 4 foram imunizados com a banda de 60 kDa.

A fim de testar a especificidade dos anticorpos policlonais produzidos para as proteínas da saliva de *R. prolixus* foi realizado teste de imunodeteccção (*western blot*) com a saliva total. Os anticorpos contra a proteína de 45 kDa ligaram-se a proteínas com peso molecular na faixa de 45 kDa e também na de 60 kDa. Mas os anticorpos dos camundongos 3 e 4 ligaram-se apenas a proteínas com peso acima de 60 kDa (Figura 22).



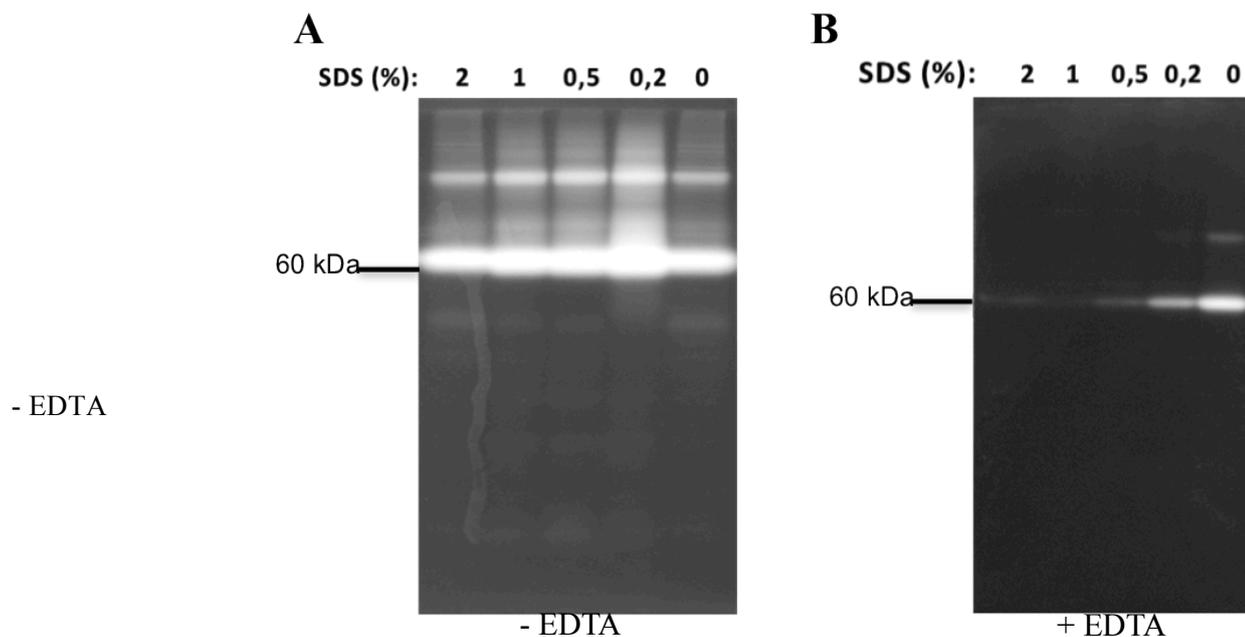
**Figura 22: Imunodeteccção da apirase salivar de *R. prolixus*.** Foi utilizada amostra de saliva total (duas glândulas). A) Anticorpos contra proteína de 45 KDa; B) anticorpos contra proteína de 60 kDa.

## 5. O íon $\text{Ca}^{2+}$ e a atividade apirásica da saliva de *R. prolixus*

A atividade de apirases da família *Cimex*, como a da saliva de *R. prolixus*, depende estritamente de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Para verificar a importância do  $\text{Ca}^{2+}$  na atividade e estrutura da proteína, foram feitos testes de atividade em gel na presença de EDTA 10 mM no tampão de diluição da amostra. O EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) é um agente quelante de íons divalentes. O efeito do EDTA foi testado em diferentes concentrações de SDS (dodecil sulfato de sódio) no tampão de amostra. O SDS é utilizado na eletroforese tem a função de conferir uma carga negativa às proteínas. Devido à repulsão eletrostática na molécula, este surfactante aniônico pode causar desnaturação, que resulta da quebra de ligações não covalentes.

Foi testada a inibição da atividade em gel do extrato total da saliva de *R. prolixus* em concentrações de 0%, 0,2%, 0,5%, 1% e 2% de SDS na presença e na ausência de EDTA 10 mM (Figura 23). Na ausência de EDTA, o SDS não teve influência na atividade da proteína em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura

23A). No entanto, a inibição por EDTA aumentou proporcionalmente à concentração de SDS (Figura 23B).



**Figura 23. Análise da atividade apirásica da saliva de *R. prolixus* na presença de EDTA 10 mM em diferentes concentrações de SDS.** SDS-PAGE 10% na ausência de agente redutor. Foi utilizado extrato total da saliva (2 glândulas em cada poço). Os números indicam a quantidade (em %) de SDS utilizado em cada amostra. A: atividade em gel na ausência de EDTA. B: atividade em gel na presença de EDTA 10 mM.

Foi possível observar que, na ausência de cálcio, o aumento da concentração de SDS afeta negativamente a atividade apirásica o que não se observa nas amostras sem EDTA. Estes resultados sugerem que o SDS possivelmente facilita o efeito quelante do EDTA, pois aumenta a instabilidade da proteína e dificulta a oligomerização.

Este estudo, portanto, propõe um protocolo para purificação da apirase salivar de *R. prolixus* com resultados satisfatórios e reprodutíveis. Além disso, pode-se afirmar que se trata de uma proteína oligomérica cuja atividade depende de íons cálcio.

## DISCUSSÃO

Nucleotídeos e nucleosídeos, como o ATP e a adenosina, são moléculas que agem como sinalizadores celulares e exercem efeitos sobre uma variedade de tecidos e sistemas metabólicos dos organismos. Tais efeitos afetam diversos processos biológicos como a transmissão nervosa, inflamação, dor, contração muscular, câncer e coagulação sanguínea (BATTASTINI *et al.* 2011). O ATP e o ADP compõem a sinalização purinérgica de processos inflamatórios e hemostáticos com efeitos em células endoteliais, leucócitos e plaquetas (LUTHJE, 1989).

A apirase salivar dos insetos hematófagos interfere na sinalização plaquetária clivando o ADP, importante agonista da ativação e agregação de plaquetas. A purificação da apirase de *R. prolixus*, objetivo deste trabalho, foi o primeiro passo para a caracterização desta enzima e conhecimento de suas potenciais propriedades farmacológicas e biotecnológicas. Com o procedimento de duas etapas adotado para a purificação nesse estudo, cromatografia de exclusão molecular seguida por cromatografia de afinidade, foi possível obter a purificação parcial da apirase salivar de *R. prolixus*. A partir desta purificação foi possível observar que a apirase é uma proteína estável, pois a atividade em gel se manteve até 72h depois da eletroforese nas condições do protocolo utilizado. Testes em placa demonstraram a ausência de atividade na presença de íons magnésio, cobalto, zinco e cobre (dados não mostrados).

A coluna de afinidade escolhida para a segunda etapa da purificação possui imobilizado em sua fase estacionária o corante Cibacron<sup>TM</sup> Blue F3G-A. Esse corante é derivado da triazina e possui estrutura química similar ao ATP, no entanto não é clivável. Essa etapa permitiu a obtenção de proteínas com atividade apirásica no zimograma. No entanto, outras proteínas que não apresentaram atividade no zimograma também foram observadas. Esse dado não nos causou surpresa, pois a cromatografia de afinidade utilizando o corante Cibacron Blue F3GA tem sido utilizada para purificação de várias proteínas e enzimas, incluindo desidrogenases, quinases, albumina, interferons, proteínas plasmáticas, entre outras. Essa diversidade se deve à capacidade do corante realizar interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas com as diferentes proteínas de acordo com as condições do microambiente (SUBRAMANIAN, 1984).

Considerando que as apirases em geral são proteínas glicosiladas e que algumas se organizam em oligômeros (FAUDRY *et al*, 2006), a observação em nosso estudo de várias bandas com atividade apirásica no zimograma nos levou a sugerir que também em *R. prolixus* a apirase salivar forma complexos e que essa oligomerização é importante para sua atividade.

A análise por MS das bandas excisadas do gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata levou-nos a suspeitar que o monômero da apirase de *R. prolixus* apresentasse peso molecular de aproximadamente 45 kDa, o que estaria de acordo com a predição do peso molecular das duas sequências peptídicas gentilmente fornecidas pelo Dr. Ribeiro do NIH. Pires (2006) mostrou que as apirases salivares de outras espécies do gênero *Rhodnius* apresentam peso molecular em torno de 45 kDa.

Nesse trabalho, a banda de 45 kDa foi identificada como sendo uma apirase do transcriptoma da saliva de *R. prolixus*, denominada *rp\_salivary\_apyrase*. No entanto, esta não apresentou atividade apirásica no zimograma. O perfil eletroforético das eluições da coluna de afinidade em diferentes concentrações de NaCl nos permitiu observar que esta proteína de 45 kDa possui maior afinidade com a coluna, pois as proteínas que apresentaram atividade em gel foram eluídas com 0,5 M de NaCl, enquanto que a de 45 kDa só se desligou da coluna com 1M de NaCl. Por isso, seria interessante considerar se esta proteína teria um papel apenas de ligante de nucleotídeos, já que não apresentou atividade hidrolítica, ou se seria o monômero da apirase. Mas outros experimentos seriam necessários para a investigação desta proteína como ligante, o que poderia descaracterizar sua classificação como uma hidrolase.

A colaboração com o Dr. Ribeiro do NIH nos permitiu a identificação das sequências de apirase presentes no genoma de *R. prolixus* que possivelmente são salivares. Essas duas proteínas descritas no transcriptoma guardam entre si uma identidade peptídica de 53% e a maior similaridade está na porção C-terminal. O alinhamento das sequências destas proteínas com sequências do genoma identificou dois genes. Um deles codifica uma proteína que apresenta 97,9% de identidade com uma das sequências do transcriptoma que foi anteriormente denominada *rp\_endosomal\_apyrase*, pois havia dúvida sobre seu papel salivar em *R. prolixus*. Esta sequência do genoma apresenta 51% de identidade com hSCAN, uma apirase humana. A identificação desses dois genes nos leva a sugerir que possivelmente, *R. prolixus*

possui isoformas da apirase salivar e ambas podem se organizar em oligômeros, como observado no perfil do ensaio imunoenzimático.

A identificação das demais proteínas não foi possível por MS, já que alguns peptídeos resultantes da fragmentação podem conter sequências presentes em mais de uma proteína e/ou não serem compatíveis com nenhuma sequência presente no banco de dados (GINGRAS *et al*, 2007).

Os antissoros obtidos a partir da imunização realizada neste estudo são anticorpos policlonais que podem estar reconhecendo uma variedade de diferentes sítios antigênicos dentro da molécula. A consideração de que a proteína de 45 kDa talvez seja o monômero das proteínas ativas com maior peso molecular pode explicar porque os anticorpos contra as proteínas de 45 kDa reconhecem as proteínas de 60 kDa. Por outro lado, anticorpos contra a proteína de 60 kDa não reconheceram a banda de 45 kDa. Novos determinantes antigênicos devem ter sido expostos na proteína com maior peso que possivelmente não estão visíveis na unidade de 45 kDa, impossibilitando seu reconhecimento pelos anticorpos anti-banda de 60 kDa.

O EDTA tem sido bastante utilizado em ensaios de interação entre proteínas, como inibidor de metaloproteases e de DNases e como quelante de íons metálicos. Nas concentrações de 0,1 a 5 mM são utilizados nos tampões de purificação de proteínas. Ainda, é frequentemente utilizado em tampões de corrida (por exemplo, Tris/borato/EDTA) para estudo da mobilidade eletroforética de proteínas em sua estrutura nativa (NYBORG & PEERSEN, 2004). EDTA 0,1 mM estava presente no tampão de atividade apirásica em placa e, nessa concentração baixa aparentemente não pôde quelar todo o cálcio e alterar a estrutura dos sítios de ligação ao cálcio nas apirases, pois a saliva total e as alíquotas retiradas das frações das purificações apresentaram atividade. Ainda, a formação de oligômeros, como já sugerida, deve estabilizar a estrutura da apirase ligada ao íon  $\text{Ca}^{+2}$  e diminuir a dissociação dos complexos, como já foi visto para outras proteínas ligantes de cálcio (FALKE *et al*, 1994). Um dos objetivos deste trabalho era esclarecer o papel do cálcio na atividade e na organização estrutural da apirase de *R. prolixus*. Na presença de EDTA e SDS não houve formação do precipitado de fosfato de cálcio em nenhum nível de oligomerização. No entanto, o detergente não influenciou a atividade da apirase na ausência de EDTA. Além do efeito do EDTA sobre os íons  $\text{Ca}^{+2}$ , sabe-se que o SDS

minimiza a interação entre as cargas da proteína e pode, portanto, influenciar negativamente a interação da proteína com os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e a oligomerização. A presença de mais de uma banda de atividade na concentração de 0% de SDS, sugere que nestas condições, o cálcio possivelmente tem importância na oligomerização da proteína e oligômeros mantêm sua atividade mesmo na presença de EDTA. Os resultados observados neste experimento sugerem que o EDTA pode não ser o agente quelante ideal nestas condições, pois a atividade persiste na ausência de SDS, provavelmente devido à presença de mais de um íon  $\text{Ca}^{+2}$  na organização estrutural da apirase, ou à glicosilação da molécula.

Enquanto este estudo estava sendo realizado, a estrutura cristalizada da *human soluble calcium-activated nucleotidase 1* (hSCAN) foi descrita. Rooklin *et al.* sugeriram, em 2012, baseado num estudo *in silico* que a atividade desta família de apirases depende, na verdade, de dois íons  $\text{Ca}^{+2}$  em cada molécula. A estrutura terciária da proteína se mantém através de um íon  $\text{Ca}^{+2}$  chamado estrutural, anteriormente descrito por Dai *et al* (2004). Outro íon  $\text{Ca}^{+2}$ , chamado catalítico, interage diretamente com o substrato além de coordenar e direcionar os resíduos do sítio catalítico e da molécula de água nucleofílica que participa da reação enzimática. Novos experimentos para avaliar a glicosilação da apirase de *R. prolixus* e para entender o mecanismo de formação dos oligômeros a partir dos monômeros de apirase deverão ser conduzidos.

No decorrer do estudo foi observado também uma grande variação na nomenclatura para denominar as apirases. Estas proteínas são também chamadas de ecto-nucleotidases, ATP-difosfolidrolases, ATP-difosfatases, ADPases e adenosina difosfatases (<http://enzyme.expasy.org/EC/3.6.1.5>). Alguns artigos referem-se à apirase como E-NTPDases (ZIMMERMAN, 2012) e a apirase humana da família *Cimex* foi denominada SCAN (*Soluble Calcium Activated Nucleotidase*) por Dai *et al* (2004). Apesar dessa diversidade, o termo apirase emerge como o epíteto mais recorrente na literatura que aborda a saliva de insetos hematófagos.

A apirase tem potencial uso terapêutico em trombofilias, como a trombose venosa profunda, e situações de risco de trombose, como gravidez, imobilização prolongada, pós-operatório de grandes cirurgias e até na metástase. O processo de metástase do câncer está relacionado à habilidade de células tumorais ligarem-se a plaquetas e migrarem para outros tecidos através do sistema vascular do organismo. As

plaquetas agregadas revestem a superfície da célula tumoral facilitando sua evasão do sistema de defesa (BAMBACE & HOLMES, 2011). A utilização de anticoagulantes e anti-plaquetários aumenta expressivamente o risco de hemorragias e uma substância que atue na inibição da trombose sem aumentar esse risco é de grande interesse.

## CONCLUSÃO

A partir da purificação parcial, os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que, nas condições observadas, a apirase salivar de *R. prolixus* é uma proteína estável, organiza-se em oligômeros, cliva tanto ATP como ADP e sua atividade depende de íons cálcio. Além disso, ela possivelmente se apresenta em duas isoformas, o que poderá ser comprovado com estudos posteriores e a publicação da montagem final do genoma deste importante triatomíneo.

## BIBLIOGRAFIA

- ABAD-FRANCH, Fernando *et al*, “Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe *Rhodniini* (*Triatominae*)”. In: *Acta Tropica*. 110 (2009) pp 159-177.
- ALBERTS, B. *et al*. *Biologia Molecular da Célula*. São Paulo: Editora Artes médicas, 1997.
- ANDERSEN, J. F. *et al*. “An insight into the sialome of the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis*” In: *BMC genomics* (2007) 8:102
- ARAUJO, Carla Nunes *et al*. “Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition” In: *Journal of Proteomics* 75 (2012) pp 3829–3841.
- AREVALO, Andrea; CARRANZA, Julio Cesar. “Patrones electroforéticos de hemoproteínas salivares (nitroforinas) de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) “. In: *Biomédica* 27 (supl. 1) (2007) pp 137-42.
- ASSUMPCÃO, Teresa C. F. *et al* “Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of *Dipetalogaster maxima*” In: *J Proteome Res*. 10 (2011) pp 669–679.
- BAMBACE, N. M. & HOLMES C. E. “The Platelet Contribution to Cancer Progression” In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9 (2011) pp 237-249.
- BATLOUNI, M. 1993. “Ativação plaquetária e trombose arterial”. In: *Arq Bras Cardiol* 60 (1993) pp 425-31.
- BATTASTINI, Ana Maria Oliveira; ZANIN, Rafael Fernandes; BRAGANHOL Elizandra “Recentes avanços no uso das enzimas que hidrolisam ATP extracelular” In: *Cienc. Cult.* 63 (2011). pp 26-28

- CHAMPAGNE, D. E. “Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods” *Pathophysiol Haemost Thromb* 34 (2005). pp 221-227.
- CHARNEAU, Sebastien *et al* 2007 “Characterization of PfDYN2, a dynamin-like protein of Plasmodium falciparum expressed in schizonts” In: *Microbes Infect.* 9 (2007) pp 797-805
- COSTA, Camila *et al.* 2 DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*”. In: *Journal of Proteomics.* 74 (2011) pp 1652–1663.
- COURA, José Rodrigues & BORGES-PEREIRA, José. “Chagas Disease: 100 years after its discovery. A systemic review” In: *Acta Tropica.* 115 (2010). pp 5-13.
- DAI, Jiayin *et al.* “Structure and Protein Design of a Human Platelet Function Inhibitor” In: *Cell.* 116 (2004) pp 649-659.
- DONG, Fang *et al.* “Cloning, expression, and characterization of salivary apyrase from *Aedes albopictus*”. In: *Parasitol Res.* 110 (2011) 931
- FALKE, J. J *et al* “Molecular Tuning of Ion Binding to Calcium Signaling Protein” In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 27-3 (1994) pp 219-290.
- FAUDRY, Eric *et al* “*Triatoma infestans* Apyrases Belong to the 5'-Nucleotidase Family” In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) pp. 19607–19613.
- FAUDRY, Eric *et al* “Salivary apyrases of *Triatoma infestans* are assembled into homo-oligomers” In: *Biochem. J.* 396 (2006), pp. 509–515
- FENCKOVA, Michaela; HOBIZALOVA, Radka. “Functional characterization of ecto-50-nucleotidases and apyrases in *Drosophila melanogaster*”. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 41(12) (2011) pp 956-67
- FERNANDEZ, Ana Z. *et al.* “Draculin, the anticoagulant factor in vampire bat saliva, is a tight-binding, noncompetitive inhibitor of activated factor X” In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1434 (1999) pp 135-142

- FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. "The colorimetric determination of phosphorus". In: *J. Biol. Chem.* 66 (1925) pp. 375-400.
- FLOWER, Darren R. "Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family". In: *J. Mol. Recogn.* 8 (1995) 185-195.
- FLOWER, Darren R.; NORTH, Anthony C.T.; SANSOM, Clare E. "The lipocalin protein family: structural and sequence overview" In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1482 (2000) 924.
- FRANCISCETTI, Ivo, RIBEIRO, Jose. "Purification, Cloning, Expression, and Mechanism of Action of a Novel Platelet Aggregation Inhibitor from the Salivary Gland of the Blood-sucking Bug, *Rhodnius prolixus*" In: *The Journal of Biological Chemistry.* 275 (2000) pp. 12639–12650
- FRANCISCETTI, Ivo; ANDERSEN, John; RIBEIRO, Jose. "Biochemical and Functional Characterization of Recombinant *Rhodnius prolixus* Platelet Aggregation Inhibitor 1 as a Novel Lipocalin with High Affinity for Adenosine Diphosphate and Other Adenine Nucleotides". In: *Biochemistry* 41 (2002) pp 3810-3818.
- FRANCISCETTI, Ivo *et al.* "An insight into the sialome of the bed bug, *Cimex lectularius*". In: *J Proteome Res.* 9- 8 (2010) pp 3820–3831
- FRANCISCETTI, Ivo, VALENZUELA, Jesus G.; RIBEIRO, Jose "Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition". In: *Biochemistry* 38 (1999) pp 16678–16685.
- FUNG, C.Y. Eleanor, MARCUS, Aaron J. BROEKMAN, M. Johan and MAHAUT-SMITH, Martyn P. P2X<sub>1</sub> receptor inhibition and soluble CD39 administration as novel approaches" to widen the cardiovascular therapeutic window." In: *Trends Cardiovasc Med.* 19 (2009) pp 1-5.
- GARCIA, Eloi *et al.* "Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions." In: *Journal of Insect Physiology* 53 (2007) pp 11-21.

- GARCIA, E., *et al.* “Rhodnius prolixus. Salivary antihemostatic components decrease with Tripanossoma rangeli infection . ” In: *Experimental Parasitology* 78-3 (1994) pp 287–293.
- GASCON, Joaquim, BERN, Caryn and PINAZO, María-Jesús. “Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries.” In: *Acta Tropica* 115 (2010) pp 22–27.
- GINGRAS, Anne-Claude *et al.* “Analysis of Protein Complexes Using Mass Espectrometry” In: *Molecular Cell Biology* 8 (2007) pp 645-653.
- GURGEL-GONCALVES, Rodrigo; ABAD-FRANCH, Fernando. “Is Rhodnius prolixus (*Triatominae*) invading houses in central Brazil?” In: *Acta Tropica* 107 (2008) pp 90-98.
- HAMASAKI, Ryoichi; KATO, Hiromoto. “Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, Phlebotomus duboscqi, a vector of Leishmania Major” In: *Journal of Insect Physiology* 55 (2009) pp 1044–1049.
- HECHT, Mariana M. *et al.* “Inheritance of DNA Transferred from American Trypanosomes to Human Hosts” In: *PLoS ONE* 5 (2010) pp 9181.
- KELLER, Lloyd *et al.*, 1993 “Cloning of the cDNA and Expression of Moubatin, an Inhibitor of Platelet Aggregation” In: *The Journal of Biological Chemistry*. 268 No. 8, (1993) pp 5450-5456
- KIM, H. *et al.* “Enhancement of crystallization with nucleotide ligands identified by dye-ligand affinity chromatography” In: *J Struct Funct Genomics* 13 (2012) pp 71–79.
- KOMOSZYNSKI, Michael; WOJTCZAK, Andrzej. “Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases”. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1310 (1996) pp 233-241.
- LAURIA-PIRES, L. *et al.* “Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives” In: *Am J Trop Med Hyg.* 63(3-4) (2000) pp 111-8.

- LAW, J. H.; RIBEIRO, JM; WELLS, MA “Biochemical insights derived from insect diversity” In: *Annual review of biochemistry* 61 (1992) pp 87-111.
- LAVOPIERRE M. M.; DICKERSON G; GORDON R.M. “Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers” In: *Ann Trop Med Parasitol.* 53 (1959) pp 235-50
- LIU, Yanshun & EISENBERG, David. “3D domain swapping: As domains continue to swap” In: *Protein Science* 11 (2002) pp 1285–1299.
- LUTHJE, J. “Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood” In: *Klin Wochenschr.* 15;67(6) (1989) pp 317-27
- MANS, Bem. “Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods” In: *J. Innate Immunity* vol3 n.01 (2011) pp 41-51.\
- MARAGANORE, John M. *et al* “Anticoagulant Activity of Synthetic HirudinPeptides” In: *The Journal of Biological Chemistry* 264, No.15, (1989) pp. 8692-69
- MONCAYO, Álvaro and SILVEIRA, Antonio Carlos.“Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy”. In:*Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 2009, vol.104, suppl.1, pp. 17-30. ISSN 0074-0276.
- MONTFORT, William, WEICHSEL, Andrzej, ANDERSEN, John. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. In *Biochimica et Biophysica Acta* 1482 (2000) pp 110-118.
- NIENABER J.; GASPAR, A. R.; NEITZ, A. W. “Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae)” In: *Exp Parasitol.* 93(2) (1999) pp 82-91.
- NOESKE-JUNGBLUT, C., KRATZCHMAR, J., HAENDLER, B., ALAGON, A., POSSANI, L, VERHALLEN, P., “An inhibitor of collagen-induced platelet

- aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*". In: *J Biol Chem.* 269(7) (1994) 5.050-3.
- NOIREAU, François; DIOSQUE, Patrício, JANSEN, Ana Maria "Trypanosoma cruzi: adaptation to its vectors and its hosts" In: *Vet. Res.* 40 (2009) 26
- NYBORG, Jennifer K. & PEERSEN, Olve B. "That zincing feeling: the effects of EDTA on the behaviour of zinc-binding transcriptional regulators" In: *Biochem. J.* (2004) 381, e3–e4
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD.- OPS *Análise de custo-efetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil.* Brasília: OPS; 2000
- PANZERA, F. *et al.* 2004 "Genomic changes of Chagas disease vector, South America" In: *Emerg Infect Dis.* 10(3) (2004) pp 438-46.
- PIRES, Danielle L. "Identificação e caracterização funcional de atividade apirásica nas salivas de triatomíneos vetores de doença de Chagas" Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília – UnB (2006)
- RICARDO-SILVA, Alice H. *et al* "Correlation between populations of *Rhodnius* and presence of palm trees as risk factors for the emergence of Chagas disease in Amazon region, Brazil" In: *Acta Tropica* 123 (2012) pp. 217–223
- RIBEIRO, J.; ANDERSEN, J. "Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*." In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (2004) pp 61–79
- RIBEIRO, Jose M. "Role of saliva in blood-feeding by arthropods" In: *Annu Rev Entomol.* 32 (1987) pp 463-78.
- RIBEIRO, J. M. and GARCIA, E. S. "The Role of The Salivary Glands in Feeding in *Rhodnius prolixus*" In: *Exp. Biol.* 94 (1981) pp 219-230.
- RIBEIRO, J. M. and NUSSENZVEIG, R. H. "Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland" In: *FEBS Lett.* 330(2) (1993) pp 165-8.

- ROCHA, Fernanda; ARAUJO, Ricardo. "Primary culture of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland cells." In: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 105(2): 132-136, March 2010.
- ROOKLIN, David W.; LU, Min; ZHANG, Yingkai "Revelation of a catalytic calcium-binding site elucidates unusual metal dependence of a human apyrase" In: *J Am Chem Soc.* 134(37) (2012) pp 15595-603.
- SANT'ANNA, Mauricio; DIOUTAIUTI, Lileia et al. "Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species" In: *Journal of Insect Physiology* 47 (2001) pp 1459–1465
- SARKIS, João; GUIMARÃES, Jorge; RIBEIRO, José. "Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus* kinetics and purification". In: *Biochem. J.* (1986) 233. pp 885-891.
- SCHMUNIS, Gabriel. "Tripanossomíase Americana: Seu impacto nas américas e perspectivas de eliminação". DIAS, João Carlos & COURA, José Rodrigues (orgs.) *Clínica Terapêutica da Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997.
- SCHMUNIS, Gabriel A. and YADON, Zaida E. "Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem." *Acta Tropica* 115 (2010) 14–21
- SCHMUNIS G. A 1991. "Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and non endemic countries". In: *Transfusion* 31: 547-557. ANO??
- SCHOFIELD, C. J.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J. P "The process of domestication in Triatominae" In: *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1 (1999) pp 375-8.
- SECOM. "Anticoagulante na saliva do barbeiro". In: *Jornal da Ciencia* 04 2006. <http://www.secom.unb.br/unbclipping2/2006/cp060704-11.htm> - acesso em janeiro de 2013.
- SILVA, Francinaldo S. "A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos". In: *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* V. 3, N. 3, p. 3, 2009

- SOARES, R. P. “Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins” In: *Am J Trop Med Hyg.* 62(1) (2000) pp157-61.
- SOARES, Adriana C. “Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin” In: *Journal of Insect Physiology* 52 (2006) pp 468–472
- SOUSA, Daniel Xavier & LIFSCHITZ, Sérgio. “Avaliação do E-value para Execução do BLAST sobre Bases de Dados Fragmentadas” Monografias em Ciência da Computação, 17/07 Julho, 2007
- SUBRAMANIAN, S. “Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes.” In: *CRC Crit Rev Biochem.* 16(2) (1984) pp169-205.
- TARTAROTTI, E. AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. and CERON, C. R. “Phylogenetic approach to the study of Triatomines (*Triatominae*, *Heteroptera*)” In: *Braz. J. Biol.*, 66(2B) (2006) 703-708,
- TEIXEIRA, Antonio. *Doença de Chagas e Outras Doenças por Tripanossomos*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1987.
- URBINA, J.”Bases Científicas Del Tratamiento Específico de Pacientes Adultos com Enfermedad de Chagas Crónica: Una Evaluación Crítica.” In: *Informe a OPS*, 34pp. Cincinnati, 2009.
- VALENZUELA, Jesus; BELKAID, Yasmine et al. “The Salivary Apyrase of the Blood-sucking Sand Fly *Phlebotomus papatasi* Belongs to the Novel Cimex Family of Apyrases”. In: *The Journal of Experimental Biology* 204 (2001) pp 229–237
- VALENZUELA, J.G., FRANCISCHETTI, I.M., RIBEIRO, J.M. 1999. “Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*”. In: *Biochemistry* 38 (1999) pp 11209–11215.
- WEICHSEL, A. *et al* “Nitric oxide binding to nitrophorin 4 induces complete distal pocket burial” In: *Nat Struct Biol.* 7(7) (2000) pp 551-4.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO “Weekly epidemiological record” No. 51/52 (2012) 87, 509–526

YANG, Mingyan; HORII, Katsunori et al. “Calcium-dependent Dimerization of Human Soluble Calcium Activated Nucleotidase. Characterization of the dimer interface.” In: *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 281, n.38 (2006) .pp 28307-28317

ZIMMERMAN H., ZEBISCH, M., STRATER, N. “Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases” In: *Purinergic Signalling* 8 (2012) pp. 437–502