



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



Identificação e Caracterização Funcional de Atividade Apirásica nas Salivas de Triatomíneos Vetores da Doença de Chagas

Danielle Lacerda Pires

Orientador: Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular

Brasília

2006

Trabalho desenvolvido no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, da Universidade de Brasília, com apoio financeiro da CAPES e CNPq.

*Este trabalho é dedicado às
mulheres da minha vida: minha mãe
e minha madrinha.*

Agradecimentos

Ao Professor Jaime Martins de Santana, pela orientação, paciência e principalmente por acreditar em mim. Obrigada.

Ao Professor Antônio Teixeira, pela oportunidade e estímulo constante.

À Professora Silene, pelo apoio, prontidão e sugestões na realização desse trabalho e principalmente pela sua amizade.

À minha família, muito mais do que eu mereço, especialmente à Thairine, minha irmã.

Aos amigos e colegas do LMPDC: Rubens, Flávia, Nadjar, Sebastien, Beto, Ana de Cássia, Malu, Thiago, Marol, Flávio, Cléver, Flávia Liara, Charley Adriana, Perla, Meire e principalmente às meninas: Teresa, Carol e Mariana por sempre estarem prontas a me ajudar e aos amigos Izabela e David, pela amizade e por todos os momentos compartilhados. Para a Glória, os comentários são dispensados. Sempre será uma pessoa muito querida.

Ao Paulo Hipólito Bezerra Leite, pelo excelente trabalho de foto documentação.

Aos funcionários do LMPDC: Márcia, Miguel, Geraldo, Adriana, Ana Lúcia e Eliete.

Aos meus amigos de uma vida toda Ligia, Dominique, Thayana, Gisele, Ana Paula, Suzane, Diogo, Paula e Thaís. Obrigada por tudo! Amo muito vocês!!!

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenosina di-fosfato
AMP	Adenosina mono-fosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
NBT	nitro azul tetrazólio
PBS	Tampão fosfato 50 mM, NaCl 0,15 M pH 7,2
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Duodecil Sulfato de Sódio

Índice

Introdução

1	Doença de Chagas.....	2
1.1	Vias de Transmissão.....	2
1.2	Manifestações Clínicas.....	3
1.3	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
2	Vetores e Importância Epidemiológica.....	5
2.1	Gênero <i>Rhodnius</i>	6
2.2	Gênero <i>Triatoma</i>	6
2.3	Gênero <i>Panstrongylus</i>	8
3	As Glândulas Salivares dos Triatomíneos.....	8
4	Repasto Sangüíneo.....	10
5	Hematofagia.....	11
5.1	Hemostasia.....	12
5.2	Inflamação.....	12
5.3	Imunidade.....	13
6	Propriedades Anti-hemostáticas das Glândulas Salivares de Artrópodes Hematófagos.....	13
6.1	Anticoagulantes.....	13
6.2	Vasodilatadores.....	15
6.3	Anti-agregadores de plaquetas.....	16
6.3.1	Apirases.....	18
	Objetivos.....	23

Materiais e métodos

1	Criação dos Triatomíneos.....	25
---	-------------------------------	----

2	Obtenção da Saliva.....	25
3	Determinação da Concentração de Proteínas.....	26
4	Purificação Parcial dos Extratos de Glândulas Salivares em Coluna de Oligo (dT).....	26
5	Atividade Apirásica.....	26
6	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	28
6.1	Coloração por Azul de Coomassie.....	28
6.2	Coloração por Prata.....	28
7	Atividade ATPásica e ADPásica em Gel SDS-PAGE.....	29
8	Imunização de coelhos e Obtenção de Anticorpos Policlonais.....	29
9	<i>Immunoblotting</i>	30
10	Inibição da Agregação Plaquetária.....	31

Resultados

1	As apirases de <i>Triatoma infestans</i> são antigenicamente distintas.....	33
2	As apirases localizam-se na unidade D2 da glândula salivar do <i>T. infestans</i>	34
3	Atividade Apirásica.....	35
4	As apirases da saliva de <i>Rhodnius brethesi</i> e de <i>Rhodnius pictipes</i> têm afinidade por coluna de Oligo (dT) Celulose.....	37
5	Salivas de Triatomíneos inibem diferencialmente a agregação plaquetária induzida por ADP.....	38
6	Atividade apirásica de <i>Rhodnius</i> spp. é mediada majoritariamente por proteínas de 44-45 kDa.....	42

Discussão.....	47
-----------------------	-----------

Conclusão	56
Perspectivas	58
Bibliografia	60

Resumo

Os artrópodes hematófagos são capazes de neutralizar defesas do hospedeiro durante repasto, devido à presença de ampla variedade de fatores anti-hemostáticos presentes em suas salivas como vasodilatadores, fatores anti-plaquetários e anticoagulantes. O principal mecanismo de transmissão da Doença de Chagas é a contaminação do hospedeiro por excretas de triatomíneos infectados. O *Triatoma infestans* Klug, 1834, o principal vetor do mal de Chagas no Brasil, possui várias apirases em sua saliva que inibem a agregação plaquetária do hospedeiro. Neste estudo, nós mostramos que as apirases de 88, 82 e 79 kDa desse inseto são antigenicamente distintas e localizam-se na unidade D2 de sua glândula salivar. O conteúdo de uma unidade D2, e não os das outras, foi capaz de inibir a agregação de plaquetas, induzida por ADP, presentes em 1 mL de sangue. Em adição, identificamos pela primeira vez atividades apirásicas nos conteúdos de glândulas salivares de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919; *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão, Jurberg & Valente 2001; *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 e *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 por meio de testes enzimáticos utilizando ATP e ADP como substratos. Os ensaios enzimáticos, realizados a 37 °C e pH 8,3, revelaram que as atividades apirásicas são dependentes de cálcio. As atividades apirásicas das glândulas salivares de *R. brethesi* e *R. pictipes* foram parcialmente purificadas em coluna de Oligo dT Celulose®. Para identificação de proteínas relacionadas com essa atividade, extratos glandulares e frações eluídas da coluna de Oligo dT, não fervidos e não reduzidos, foram submetidos à enzimografia após separação em SDS-PAGE. Este experimento revelou bandas de proteínas com atividades ATPásicas e ADPásicas de aproximadamente 44-45 kDa. Adicionalmente, experimentos de agregação plaquetária realizados *in vitro* demonstraram que 0,5 par de glândula salivar de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus* inibiram totalmente a agregação plaquetária induzida por ADP. Diferentemente das apirases de *T. infestans*, as de *Rhodnius* spp. são de baixa massa molecular e não fazem parte da família das 5' nucleotidases. A ampla distribuição das apirases nas salivas dos vetores da doença de Chagas e de

outros artrópodes indica que estas enzimas têm importância fundamental na hematofagia.

Summary

Blood-feeding arthropods are able to constraints barriers imposed by host defenses, due to the presence of a wide range of antihemostatic factors in their saliva, including vasodilators, antiplatelet factors and anticoagulant. The main Chagas disease transmission mechanism is contamination of a host by faeces from triatominae infected. *Triatoma infestans* Klug, 1834, the main vector of Chagas disease in Brazil, expresses several apyrases in its saliva that inhibit the vertebrate host platelet aggregation. We show in this report that the 88, 82 E 79 kDa apyrases of the insect are antigenically different and localize within the salivary gland D2 unit. The content of one D2 unit, and not that of the others, was able to mediate fully inhibition of platelet aggregation induced by ADP, from 1 mL of human blood. In addition, we identified for the first time apyrase activities in the saliva of *Rhodnius brethesi* Matta, 1919; *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão, Jurberg & Valente 2001; *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 e *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927. The tests, which were accomplished at 37 °C and pH 8,3, revealed that these apyrase activities are dependent upon Ca^{+2} . The apyrase activities present in the salivary glands of *R. brethesi* e *R. pictipes* were then partially purified on an Oligo dT Cellulose® column. To identify proteins related to apyrase activity, salivary gland content and eluted fractions from the Oligo dT column were submitted to SDS-PAGE enzymography without previous boiling or reduction of the samples. This experiment allowed the identification of 44-45 kDa protein bands displaying both ATPase and ADPase activities. *In vitro* platelet aggregation assays showed that the content of 0,5 salivary gland pair *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus* completely abolished platelets aggregation induced by ADP. Differently fromf *T. infestans* apirases, *Rhodnius* spp. express apyrases of low molecular masses that aren't members of the 5'nucleotidase family. The wide distribution of apyrases in the saliva of Chagas disease vectors and other arthropods indicate that these enzymes play an important role during the hematophagous process.

Introdução

Introdução

1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, foi descoberta por Carlos Chagas que identificou seu vetor e agente etiológico e descreveu suas características clínicas (Chagas, 1909). O mal de Chagas é prevalente no continente americano, representando a terceira maior endemia parasitária, atrás somente da Malária e da Esquistossomose (World Bank, 1993). Cerca de 16 milhões de pessoas estão infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), parasita que causa a doença, e mais de 100 milhões (25% da população da América Latina) estão sob o risco de adquirir a infecção (WHO, 2002).

Do ponto de vista econômico, a perda anual para o continente Latino Americano foi calculada em cerca de 6,5 bilhões de dólares (WHO, 1997); o Brasil gasta aproximadamente 750 milhões de dólares por ano no tratamento de pacientes chagásicos (WHO, 2000). Calcula-se que o investimento anual dos governos dos países latino-americanos, visando o controle da doença de Chagas, é muito inferior à perda econômica causada por esta endemia.

1.1. Vias de Transmissão

Existem várias vias de transmissão do *T. cruzi*, sendo que as principais são a vetorial ou via entomológica, a transfusional e a congênita, também chamada de transplacentária. Na vetorial, a via mais importante, as formas infectantes do parasita, presentes nas fezes dos triatomíneos, entram em contato com a mucosa ou com a pele do indivíduo durante o repasto do inseto vetor (Prata, 2001). Há três ciclos de transmissão vetorial. O ciclo doméstico é o de maior importância epidemiológica, pois perpetua a infecção em seres humanos. No ciclo silvestre, os triatomíneos, uma vez contaminados, infectam roedores, marsupiais e outros animais silvestres. O terceiro ciclo é o peridoméstico, no qual intervêm mamíferos

que, livremente, entram e saem das residências, atraindo os triatomíneos. Este ciclo serve de ligação entre os ciclos doméstico e silvestre (Brenner *et alii*, 2000). Há também relato de transmissão via oral por via de alimentos contaminados com o vetor da doença.

1.2. Manifestações Clínicas

As infecções causadas pelo *T. cruzi* podem ocorrer em três fases: aguda, latente ou indeterminada e crônica. A fase aguda é usualmente assintomática na maioria das pessoas infectadas e é caracterizada por febre, mialgia e mal-estar (Deghaide *et alii*, 1998). Em alguns pacientes, o sinal de Romaña (inchaço unilateral, bipalpebral) e o chagoma de inoculação são sinais indicativos da porta de entrada do parasita no hospedeiro (Brenner *et alii*, 2000). Miocardites e meningoencefalites podem ocorrer ocasionalmente (Deghaide *et alii*, 1998). Estima-se que metade dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* entram na fase latente, (Macedo, 1980) na qual não apresentam as alterações patológicas típicas da doença. Após 20 anos de fase indeterminada, aproximadamente 30% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica (ElMunzer *et alii*, 2004). As manifestações clínicas mais frequentes são as cardiopatias, disritmias, tromboembolismo e infarto do miocárdio, sendo que alterações no trato digestivo (megaesôfago e megacólon) e no sistema nervoso também podem ocorrer (Prata, 2001)

1.3. Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*

Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*



Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (TDR/Welcome Trust).

Este protozoário flagelado apresenta três formas de desenvolvimento durante o seu ciclo de vida que foram classificadas em função da sua morfologia e biologia (Brenner, 1973). As formas são: epimastigota, forma replicativa, presente no intestino médio do vetor; tripomastigota, forma infectante do parasita encontrada no hospedeiro vertebrado, também chamada de tripomastigota metacíclica, quando presente no vetor; amastigota, a forma intracelular replicativa do hospedeiro mamífero (Tanowitz *et alii*, 1992).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando as formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas nas fezes e urina do inseto, durante seu repasto sangüíneo, penetrando na mucosa do hospedeiro. Nas células do hospedeiro, as tripomastigotas convertem-se em amastigotas replicativas que residem no citoplasma da célula do hospedeiro. Independente da via de infecção, amastigotas intracelulares, após sucessivas divisões binárias, transformam-se em tripomastigotas flageladas que, após romper a célula do

hospedeiro, circulam na corrente sangüínea. As formas tripomastigotas podem invadir qualquer tipo celular, propagando a infecção pelo corpo (Brenner *et alii*, 2000). E os tripomastigotas adquiridos durante a alimentação do triatomíneo com o sangue contaminado transformam-se em epimastigotas no trato digestivo do inseto antes de diferenciarem-se em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes (Figura 1).

2. Vetores e Importância Epidemiológica

Os vetores da Doença de Chagas são insetos da ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, com ampla distribuição em diferentes ecótopos naturais de regiões tropicais e subtropicais do continente americano (Coura, 2005), popularmente conhecidos como barbeiros. O número de espécies e de gêneros de triatomíneos mudam constantemente em função do tipo de ferramenta utilizada para os estudos. Já foram descritas mais de 120 espécies, distribuídas em 16 gêneros (Harry, 1994).

Desde a eclosão do ovo até chegar à fase adulta, os triatomíneos passam por cinco estádios ninfais. As principais diferenças entre ninfas e adultos são a ausência total das asas posteriores e de ocelos, o caráter rudimentar dos hemélitros (pteroteca), os olhos menores que dos adultos e ausência de diferenciação sexual nas ninfas, dificultando o reconhecimento dos sexos antes do quinto estágio (Carvalho *et alii*, 1998). Independente do estágio e do sexo, todos são hematófagos estritos e podem ser classificados como ectoparasitas temporários, uma vez que mantêm contato com o hospedeiro unicamente durante o repasto (Guarneri *et alii*, 2000).

A importância epidemiológica da subfamília *Triatominae* reside na transmissão do *T. cruzi* a animais e ao homem. Embora todas as espécies de triatomíneos sejam vetores em potencial do protozoário, apenas aquelas que colonizam o domicílio e/ou peridomicílio reúnem melhores condições para transmitir a doença de Chagas humana. Neste aspecto, os gêneros de maior

importância epidemiológica são: *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius* (Rebêlo *et alii*, 1998).

2.1. Gênero *Rhodnius*

Com ampla distribuição geográfica, são encontrados principalmente na Região Amazônica, favorecidos pelo clima úmido. Muitas de suas espécies têm habitats exclusivamente silvestres, e as palmeiras como *Leopoldina piassaba*, *Acrocomia speciosa* (babaçu) e *Maximilianic regia* (inajá) são ectópos usuais (Gaunt & Miles, 2000; Texeira *et alii*, 2001 Valente, 2005). É comum a presença desses triatomíneos em abrigos de gambás e roedores e nos ninhos de pássaros. Entretanto, existem espécies sinantrópicas como o *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859), principal vetor da doença de Chagas na América Central, que embora sejam consideradas sinantrópicas, cuja presença em biótopos silvestres têm sido regularmente descrita. Porém sua migração das palmeiras para a habitação humana é tão intensa quanto a que ocorre de casa para casa (Fig. 2; WHO, 2002).

Devido à grande semelhança entre as espécies de *Rhodnius* spp., na sua anatomia externa, o uso da microscopia eletrônica tem se mostrado uma importante ferramenta para estudos da taxonomia, auxiliando na investigação e na análise detalhada de estruturas que permitem a diferenciação das espécies (Silva *et alii*, 2005). Com a utilização desta técnica, detalhes de algumas áreas da anatomia externa dos triatomíneos vêm sendo descritas, entre elas, suas características fállicas (Carvalho *et alii*, 1998).

2.2. Gênero *Triatoma*

Triatoma infestans e *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) estão entre as espécies que são domiciliadas, ou raramente são encontradas nos habitats silvestres. A associação aos seres humanos e animais domésticos fez do *T. infestans* (Fig. 2) o mais importante vetor da doença de Chagas humana. Foi verificado que esta espécie manifesta preferência quase que absoluta pelas casas

de barro, vindo em seguida, as casas de madeira, sendo pouco encontrada nas casas de alvenaria (WHO, 2002).



Rhodnius milesi



Rhodnius brethesi



Rhodnius pictipes



Rhodnius robustus



Triatoma infestans

Figura 2: Espécies de triatomíneos. Foto: Paulo H. B. Leite, UnB.

2.3. Gênero *Panstrongylus*

Encontra-se distribuído geograficamente em toda América do Sul e o centro de sua dispersão é o Brasil, onde ocorre em uma ampla variedade de habitats do estado do Pará até Santa Catarina, incluindo a floresta Atlântica, cerrado e caatinga, ocupando os meios silvestres, peridomicílios e domicílios.

Estas espécies exibem variações de comportamento e sua capacidade de colonizar e se adaptar as habitações humanas, faz desse gênero um dos de maior importância epidemiológica (Barbosa *et alii*, 2004).

3. As Glândulas Salivares dos Triatomíneos

As glândulas salivares têm grande diversificação quanto ao número, tamanho e forma nos diferentes triatomíneos (Lacombe, 1999).

As espécies de *Rhodnius* apresentam um par de glândula salivar (Fig. 3) de coloração vermelha devido às heme-proteínas, conhecidas como nitroforinas, responsáveis por muitas de suas atividades anti-hemostáticas (Soares *et alii*, 2000; Montfort *et alii*, 2000). Do ponto de vista histológico, a glândula salivar do *R. prolixus* é formada por uma camada simples de células epiteliais binucleadas circundada por uma dupla camada de células musculares lisas orientadas transversalmente. Usando a microscopia eletrônica de transmissão observou-se que as células epiteliais são ricas em retículo endoplasmático, vesículas e mitocôndrias (Nussenzweig *et alii*, 1995), características de células especializadas em produzir e secretar proteínas.



Figura 3: Glândula Salivar de *Rhodnius brethesi*. Foto: Teresa C. F. Assumpção, UnB.

Já os insetos do gênero *Triatoma* apresentam um par de glândula salivar com três pares de unidades distintas (Barreto, 1920), chamadas de D1, D2 e D3, e cada uma parece secretar componentes salivares distintos (Barth, 1954). A unidade D1 é a principal, a D2 é suplementar e a D3 é acessória. No *T. infestans*, as três unidades da glândula salivar apresentam diferenças morfológicas, especialmente na coloração. A unidade principal é alongada, com coloração branca turva e tem 1,0 mm de comprimento; a unidade suplementar apresenta-se um pouco amarelada, com 0,5 mm de comprimento e a unidade acessória é arredondada e translúcida, medindo 1 mm de comprimento aproximadamente. Sob a análise microscópica, as três unidades apresentam-se compostas por uma camada simples de células epiteliais circundando um grande lúmen. Em nível ultra-estrutural, observam-se microvilosidades na porção apical da membrana plasmática das células epiteliais, aumentando significativamente a área disponível para a secreção salivar. A análise citoquímica demonstrou a presença de grande quantidade de retículo endoplasmático e também de gotículas de lipídeos no citoplasma e no lúmen das glândulas (Fig 4; Lacombe, 1999; Reis *et alii*, 2003).

A importância das glândulas salivares nos hábitos alimentares dos triatomíneos foi demonstrada em experimentos realizados com *R. prolixus* salivarectomizados por Ribeiro & Garcia (1981). O efeito observado foi uma ingestão menor de sangue por unidade de tempo e um número superior de perfurações na derme do hospedeiro em função do tempo, quando comparados

com os insetos controles com glândulas intactas. Essa observação evidencia a importância das secreções salivares no repasto sanguíneo.

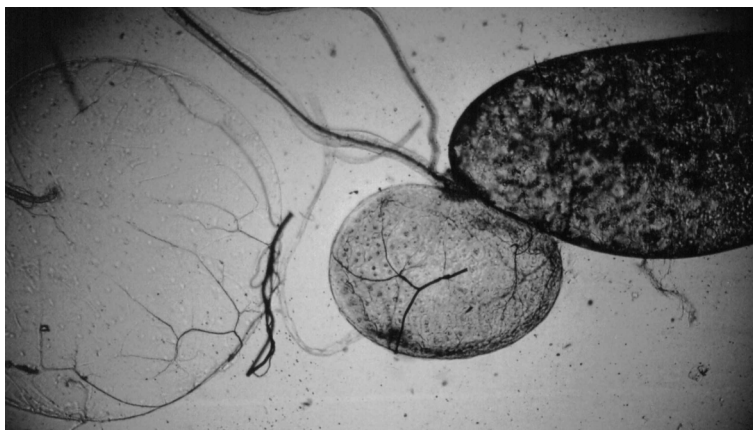


Figura 4: Glândula Salivar de *Triatoma infestans*. Da esquerda para a direita D1, D2 e D3. Foto: Paulo H. B. Leite, UnB.

4. Repasto Sanguíneo

A frequência de repastos tem implicações epidemiológicas, pois quanto mais contatos ocorrerem entre o vetor e o hospedeiro, maior será a probabilidade de infecção ou transmissão de *T. cruzi*. Por outro lado, quanto menos o vetor se expuser na procura pelo alimento, maiores são suas chances de sobrevivência (Rocha *et alii*, 2004).

O calor emitido pelo corpo da presa serve como principal estímulo para triatomíneos localizarem seus hospedeiros. Experimentos realizados com *T. infestans* mostraram que o inseto só se aproximava do alimento artificial mantido a 36 °C (Bernad *et alii*, 1970). A captação dessa fonte térmica é feita pelos receptores distribuídos por toda a superfície do corpo do inseto, encontrando-se concentrados nas antenas. Na estrutura das antenas encontram-se dos tipos i, ii, iii e iv. (Wigglesworth & Gillett, 1934; Flores & Lazzari, 1995). Morfologicamente, esses tipos de termoreceptores estão presentes em todas as espécies de triatomíneos estudadas por Gracco (2000). Porém a quantidade e a distribuição

deles variam entre as espécies e entre as ninfas e adultos. *T. infestans* antenectomizados transferem a função termoreceptora para outros órgãos sensoriais (Flores & Lazzari, 1996).

O calor emitido por animais serve como principal estímulo para triatomíneos localizarem seus hospedeiros. Isto foi demonstrado por meio de experimentos realizados com *T. infestans*, onde estes só se aproximavam do alimento artificial que estivesse a 36 °C (Bernad *et alii*, 1970). A captação dessa fonte térmica é feita por meio de receptores distribuídos por toda a superfície do corpo do inseto, encontrando-se concentrados nas antenas. Na estrutura das antenas encontram-se as sensillas do tipo i, ii, iii e iv, responsáveis por essa captação de temperaturas (Wigglesworth & Gillett, 1934; Flores & Lazzari, 1995). Morfologicamente, os tipos de sensillas são similares em todas as espécies de triatomíneos estudadas por Gracco & Catalá (2000), porém a quantidade e a distribuição delas variam entre as espécies e entre as ninfas e adultos. *T. infestans* antenectomizados transferem a função termoreceptora para outros órgãos sensoriais (Flores & Lazzari, 1996).

No início do processo de alimentação, o inseto insere ativamente a probóscida (ferrão) na pele do homem. A interiorização do aparelho sugador é feita por movimentos vai-e-vem coordenados e a saliva flui na sua extremidade aprofundada na derme. Iniciando a sucção, o triatomíneo mostra estiramento gradual da parede abdominal pelo sangue ingerido. Receptores localizados na parte interna do canal alimentar identificam a distensão abdominal, interrompendo o repasto (Friend & Smith, 1971).

5. Hematofagia

O hábito da hematofagia evoluiu independentemente em mais de 14.000 espécies distribuídas em 400 gêneros de artrópodes hematófagos (Ribeiro, 1995a). Entretanto, a informação detalhada sobre a maquinaria molecular que leva a esse estilo de vida é restrita a poucas espécies (Adams, 1999). A hematofagia é essencial para a sobrevivência e desenvolvimento dos triatomíneos, tendo papel central na regulação e ativação de eventos endócrinos que regulam a diurese,

digestão, muda do exoesqueleto, acasalamento e reprodução. Uma refeição tomada entre cada estágio ninfal e antes da oviposição é capaz de sustentar o *R. prolixus* por até 90 dias (Friend & Smith, 1975).

A saliva dos insetos possui uma ampla variedade de moléculas anti-hemostáticas, tais como vasodilatadores e fatores anti-plaquetários e anticoagulantes, que são ejetadas durante o repasto sanguíneo, antagonizando os processos hemostáticos do hospedeiro vertebrado. Essas moléculas juntamente com adaptações mecânicas sofisticadas do aparelho sugador do inseto invertebrado permitem a obtenção do sangue (Ribeiro, 1995a; Champagne, 2004). Assim, a saliva dos insetos apresenta substâncias com grandes propriedades farmacológicas que afetam três sistemas do hospedeiro vertebrado: hemostático, inflamatório e imunológico (Ribeiro & Francischetti, 2003).

5.1. Hemostasia

A hemostasia é a resposta fisiológica do hospedeiro que controla a perda sanguínea após uma lesão vascular e consiste na agregação plaquetária, coagulação sanguínea e vasoconstrição. Existem vários agonistas para a agregação plaquetária (ADP, colágeno, trombina, fator ativador de plaquetas, tromboxano A₂) e pelo menos dois vasoconstritores liberados pelas plaquetas (serotonina e tromboxano A₂). A coagulação sanguínea tem duas vias: a intrínseca e a extrínseca que, por meio de mecanismos independentes, resultam na conversão do fator X em fator Xa que processa a protrombina em trombina, enzima que transforma fibrina em fibrinogênio (Law *et alii*, 1992). A cascata da coagulação é um sistema complexo e redundante com muitos pontos de amplificação e controle (Ribeiro & Francischetti, 2003).

5.2. Inflamação

Inflamação é a resposta do hospedeiro ao dano tecidual e consiste em dor, eritema, calor e edema, resultantes da vasodilatação tissular. O tecido lesado

produz uma série de eventos que conduzem ao seu reparo. Células polimorfonucleares e monócitos são importantes mediadores da inflamação. O ATP liberado pelas células lesadas ativa neutrófilos que se acumulam e degranulam no local da inflamação. A trombina da cascata da coagulação e outras moléculas pró-inflamatórias, como o PAF (Fator Ativador de Plaquetas), também ativam neutrófilos e o próprio PAF. A trombina também causa a proliferação de fibroblastos e o aumento da adesão de neutrófilos. A dor também é induzida por quimiocinas (proteínas inflamatórias) como a interleucina-1 (IL-1) gerada pelos neutrófilos e pela bradicinina produzida pela via intrínseca da coagulação sanguínea. O reparo do tecido envolve quatro componentes: angiogênese, migração e proliferação de fibroblastos, deposição da matriz extracelular e remodelagem (Ribeiro & Francischetti, 2003).

5.3. Imunidade

Depois de repetidas exposições aos antígenos salivares, o hospedeiro produz anticorpos que irão alterar a fisiologia do sítio no qual o artrópode se alimenta. As reações antígeno-anticorpo resultam na ativação do complemento e conseqüente produção de anafilatoxinas que juntamente com as reações celulares estimulam a agregação plaquetária e a degranulação de mastócitos e basófilos. Como resultado, há aumento da permeabilidade capilar (Ribeiro, 1987).

6. Propriedades Anti-hemostáticas das Glândulas Salivares de Artrópodes Hematófagos

Nas últimas décadas vários componentes anti-hemostáticos foram identificados na saliva de artrópodes hematófagos, tais como: anticoagulantes, vasodilatadores e anti-agregadores de plaquetas (Ribeiro *et alii*, 1998).

6.1. Anticoagulantes

Os anticoagulantes foram descritos pela primeira vez nas glândulas salivares de artrópodes hematófagos há 80 anos. Desde então, a diversidade molecular e o modo de ação dessas moléculas na cascata da coagulação têm sido bem documentado (Law *et alii*, 1992). Todos os fatores da coagulação existem na forma de zimogênio inativos na circulação sangüínea com exceção do fator tissular (FT), uma glicoproteína de membrana, que só entra em contato com o sangue após o dano vascular (Stark & James, 1996).

Durante o repasto dos insetos poderia haver formação de coágulos na probóscida e nos vasos sangüíneos, o que prejudicaria a eficiência da alimentação. Assim, a coagulação, no momento do repasto, representa uma ameaça ao sucesso da hematofagia. Os primeiros estudos moleculares sobre anticoagulantes em insetos hematófagos foram realizados em *R. prolixus* por Hellmann & Hawkins (1964; 1965) que identificaram duas moléculas com essa atividade denominadas de Prolixina-S e Prolixina-G presentes nas glândulas salivares e no intestino médio do triatomíneo, respectivamente. A Prolixina-S promove a inibição da ativação do fator X, enquanto que a Prolixina-G inibe a atividade da trombina. Ribeiro *et alii* (1995b) purificaram o anticoagulante Prolixina-S da saliva de *R. prolixus* e o nomearam de nitroforina-2 (NP-2), uma proteína carreadora de óxido nítrico. Yuda *et alii* (1997) caracterizaram a forma recombinante de Prolixina-S de *R. prolixus* e demonstraram sua função vasodilatadora. O mecanismo pelo qual a NP-2 (Prolixina-S), uma proteína de 19,7 KDa, inibe a ativação do fator X não é conhecido (Zhang *et alii*, 1998).

A análise bioquímica da saliva do culicídeo *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) mostrou a presença de um novo inibidor do fator Xa que se caracteriza por ser específico, não competitivo e reversível (Stark & James, 1995). Mais tarde, esse mesmo grupo isolou e caracterizou o gene deste anticoagulante que passou a ser designado de AFXa (Anticoagulante do fator Xa), uma proteína de 47,8 KDa (Sark & James, 1998). Outro exemplo de inibidor de trombina é a anofelina, um peptídeo presente na saliva do *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820). Seu gene foi clonado e esse peptídeo anti-trombina não apresentou homologia com nenhuma (Valenzuela *et alii*, 1999). No homogeneizado das glândulas salivares do *Cimex*

lectularius (Linnaeus, 1758) foi identificada uma proteína de 17 KDa responsável também por uma atividade de inibição da ativação do fator X em fator Xa (Valenzuela *et alii*, 1996a). Atividades anticoagulantes também foram identificadas na saliva de *T. infestans*, interferindo principalmente na ativação do fator VIII e secundariamente nos fatores II e V da via comum da coagulação. Interferências na via intrínseca da coagulação também ocorrem na presença da saliva (Pereira *et alii*, 1996). de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835).

6.2. Vasodilatadores

Os vasodilatadores estão amplamente distribuídos nas salivas de artrópodes hematófagos; facilitam a alimentação destes animais porque neutralizam os vasoconstritores liberados pelas plaquetas agregadas, resultando em aumento do fluxo sangüíneo no local da picada (Law *et alii*, 1992).

A saliva de numerosas espécies de carrapatos contém altos níveis de prostaglandinas (PGL), consideradas vasodilatadores de ação potente. A PGI₂ é conhecida por ser um poderoso inibidor da agregação plaquetária e da secreção de ADP, atua em concentrações menores que 1,0 ng.mL⁻¹. PGE₂, PGI₂ e PGD₂ causam relaxamento da musculatura lisa, e conseqüentemente, aumento do fluxo sangüíneo (Bowman *et alii*, 1996). A saliva do mosquito-palha, do gênero *Lutzomyia*, apresenta um peptídeo de ação vasodilatadora muito potente e de longa duração, chamado de Maxadilan (Lerner *et alii*, 1991). Qureshi *et alii* (1996) mostraram que o Maxadilan também apresenta propriedades imuno-regulatórias sendo capaz de intensificar a infecção de camundongos por *Leishmania major*. A imunização com o Maxadilan protegeu camundongo contra a infecção por este cinetoplastídeo (Morris *et alii*, 2001).

As nitroforinas de *R. prolixus*, que consistem em quatro proteínas de tamanho aproximado de 20 KDa cada (NP1-NP4), possuem a propriedade de armazenar e transportar óxido nítrico (ON) das glândulas salivares ao tecido lesado do hospedeiro. O ON liberado liga-se à guanilato ciclase, resultando em relaxamento muscular e vasodilatação (Monfort *et alii*, 2000). Todas as quatro

nitroforinas também apresentam atividade anti-histamínica porque se ligam à histamina liberada no local da lesão, impedindo o exercício de sua função de iniciadora do processo inflamatório durante o repasto (Walker & Montfort, 2001). As nitroforinas ainda apresentam uma atividade de tiol-oxidase que pode levar à inativação da noradrenalina, interrompendo uma das vias de vasoconstrição, o que resulta numa potencialização da ação vasodilatadora do óxido nítrico (Ribeiro, 1996). A nitroforina da saliva de *Cimex lectularius* não apresenta nenhuma homologia com as nitroforinas de *R. prolixus* (Valenzuela & Ribeiro, 1998; Walker, 2005), sugerindo evolução convergente.

6.3. Anti-agregadoras de plaquetas

As plaquetas regulam a hemostasia principalmente por alterarem a fisiologia da parede vascular (Basanova *et alii*, 2002). Após lesão vascular, as plaquetas são ativadas por uma variedade de agonistas como o ADP, colágeno, trombina, tromboxano A₂, epinefrina e o PAF, que se ligam aos receptores membrana-específicos localizados na superfície das plaquetas. Muitos desses receptores são integrinas, família de glicoproteínas heterodiméricas constituídas de unidades α e β . Esses receptores agem de acordo com as mudanças das plaquetas e imediatamente traduzem essa informação para o interior da célula, ativando a via da fosfolipase C ou da ciclooxigenase ou ainda inibindo a via adenilato ciclase, promovendo uma mudança na forma das plaquetas de discóide para esférica (Mans & Neitz, 2004). Um antagonista da agregação de plaquetas induzida por colágeno foi bem caracterizado na saliva de *Triatoma pallidipennis* (Stal, 1872), uma proteína denominada palidipina de 19 KDa (Noske-Jungblutt *et alii*, 1994; Noeske-Jungblut *et alii*, 1995). Feijó, em 2001, no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doenças de Chagas (LMPDC), expressou uma proteína de 14 KDa, infestilina, da saliva do *T. infestans* com alta identidade à palidipina. Uma proteína com estrutura semelhante à palidipina também foi encontrada na saliva de (Sant Anna *et alii*, 2002) *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911).

A trombina, ativada via cascata da coagulação, é a principal promotora da coagulação sangüínea; ligando-se a receptores das plaquetas e induz a agregação plaquetária por meio do exo-sítio de ligação de ânion. A triabina, presente na saliva do *T. pallidipennis*, liga-se a este exo-sítio, impedindo a ativação da trombina. A estrutura tridimensional do complexo triabina-trombina demonstrou que a triabina liga-se somente ao sítio de interação da trombina ao fibrinogênio (Fuentes-Prior *et alii*, 1997). Feijó (2001) expressou em sistema heterólogo uma proteína da saliva do *T. infestans*, a Triatina, de 22 KDa, com alta identidade à Triabina, mas não realizou testes funcionais.

A agregação plaquetária pode ainda ser induzida pelo PAF (1-O-alkyl/acyl/alkenyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine), um fosfolípido acetilado com potentes atividades pró-inflamatórias que participa de diversos eventos fisiológicos tais como interação célula-célula, apoptose, angiogênese, hemostasia cardiovascular, fisiologia ocular e reações alérgicas, entre outros (McManus, L.M., 2000). Uma fosfolipase C com afinidade pelo PAF foi identificada na saliva do *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) e uma fosfolipase A₂ com atividade também sobre o PAF foram identificadas e caracterizadas, em nosso laboratório, na saliva do *T. infestans* (Ribeiro & Francischetti, 2001; Assumpção, 2003). Francischetti *et alii* (2000) caracterizaram uma lipocalina na glândula salivar do *R. prolixus* que inibe a agregação plaquetária por um novo mecanismo de ligação ao ADP, denominada de inibidor da agregação plaquetária em *R. prolixus* 1 (RPAI-1) de 19 KDa. RPAI-1 atua por captura e remoção de ADP livre, inibindo a agregação plaquetária induzida por baixas doses de ADP, colágeno, ácido araquidônico, mimético do tromboxano A₂ e também por doses muito baixas de trombina. A RPAI-1 possui uma notável especificidade por moléculas que possuem adenosina em sua estrutura. O papel do ADP na agregação plaquetária é essencial e sua degradação, na maioria dos artrópodes hematófagos, é realizada por apirases, que serão descritas mais adiante. Dados gerados pelo emprego da bioinformática indicam que a RPAI-1 não substitui a apirase de *R. prolixus*. Devido às diferenças cinéticas, ambas as moléculas têm funções complementares e precisas na prevenção da agregação plaquetária (Francischetti *et alii*, 2002).

6.3.1. Apirases

A apirase salivar de insetos é sabidamente um inibidor de agregação plaquetária, função importante para o sucesso da alimentação dos hematófagos. Por isso, há interesse crescente em estudar essa atividade nas glândulas salivares de diferentes espécies de insetos hematófagos.

O nome apirase (ATP difosfohidrolase, EC 3.6.1.5) foi primeiramente usado por Meyerhof (1945), para descrever uma enzima em levedura que hidrolisava ATP e ADP em AMP, com a liberação de fosfato inorgânico. Logo depois a enzima foi identificada no músculo, e sua atividade poderia ser explicada pela combinação das ações da miosina e da mioquinase, embora no fígado tivesse sido encontrada essa atividade sem a contaminação da adenilatoquinase (Kalckaret, 1945). Traverso-Cori *et alii* (1965) caracterizaram e purificaram uma apirase verdadeira da batata, cuja função ainda é desconhecida.

A descrição de atividades apirásicas em vários tecidos de mamíferos foi feita utilizando anticorpos. Em pulmões de bovinos, a apirase foi localizada com anticorpos anti-FSBA e anti-apirase de pâncreas, como uma enzima de massa molecular em torno de 78 KDa (Sevigny *et alii*, 1997). Foram encontradas também no endotélio da aorta bovina e em células musculares lisas (Yagi *et alii*, 1991). Em invertebrados, a apirase foi caracterizada em *Schistosoma mansoni* como uma proteína de 63 KDa, identificada no tegumento desse helminto (Vasconcelos *et alii*, 1996). As enzimas com atividade difosfohidrolásica apresentam ampla distribuição como, por exemplo, o CD39, identificado primeiramente como um marcador de células B, mas presente também em células NK, linfócitos T e células endoteliais (Chen & Guidotti, 2001).

As glândulas salivares de várias espécies de artrópodes hematófagos apresentam atividade apirásica, onde um papel anti-hemostático tem lhe sido atribuído (Ribeiro *et alii*, 1987). Sua importância foi demonstrada por Ribeiro *et alii* (1995a) por meio da identificação de atividades difosfohidrolásicas em 19 gêneros de artrópodes como carrapatos, moscas tsé-tsé, mosquitos, barbeiros, moscas e

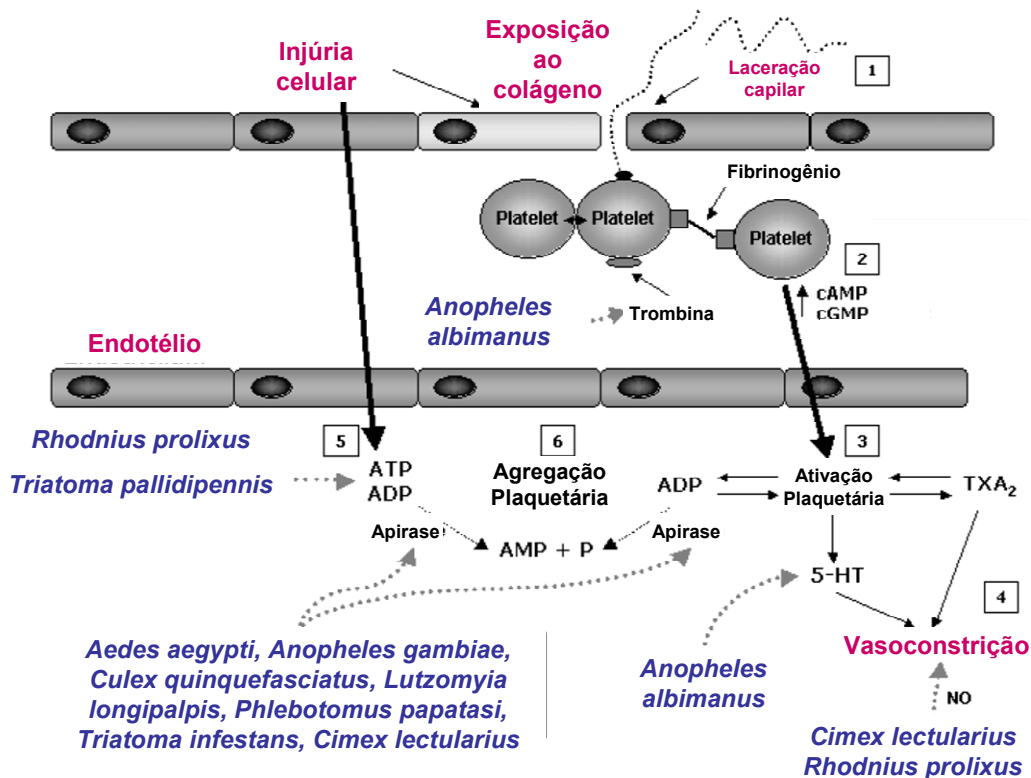
mosquito-palha (Fig. 5). Esta atividade difere quanto ao pH ótimo e à dependência de cátions bivalentes (Valenzuela *et alii*, 1996).

A atividade apirásica da saliva de *R. prolixus* depende estritamente do íon Ca^{+2} (Smith *et alii*, 1980). A enzima que medeia essa atividade foi purificada e estudada quanto à inibição da agregação plaquetária induzida por ADP (Sarkis *et alii* 1986). A apirase do percevejo *Cimex lectularius* não apresentou, à época de sua caracterização, nenhuma similaridade com apirases já descritas, o que levou os autores a classificá-la como membro de uma nova família de ATPases (Valenzuela *et alii*, 1996b; Valenzuela *et alii*, 1998). Entre os flebotomínios, o *Phlebotomus papatasi*, popularmente chamado de mosquito palha e transmissor da *Leishmania* spp., tem uma apirase semelhante à encontrada no *C. lectularius*, apresentando 37% de identidade, também caracterizada por ser ativada somente pelo Ca^{+2} (Valenzuela *et alii*, 2001). *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é outro mosquito transmissor da *Leishmania* spp. que tem uma apirase estritamente dependente de Ca^{+2} similar à encontrada em *Cimex* e com 31% de identidade com a mesma e

o cDNA obtido pelo seqüenciamento das suas glândulas salivares revelou uma apirase com similaridade substancial às 5' nucleotidases (Charlab *et alii*, 1999). Ribeiro *et alii* (2000) mostraram que essa apirase também apresentava uma atividade fosfodiesterase, a qual foi perdida após a alimentação, sugerindo secreção. Mais tarde, Valenzuela *et alii* (2004) sugeriram que essa apirase é candidata à vacina para o controle da infecção por *Leishmania* spp.

Os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles* apresentam apirases em suas glândulas salivares pertencentes à família 5' nucleotidase, caracterizadas por hidrolisar o fosfato esterificado no carbono 5' de ribose e desoxiribose de nucleotídeos (Arca *et alii*, 1999). Todas as sete regiões conservadas observadas nas 5' nucleotidases foram encontradas equivalentes em *Aedes aegypti* (Champagne *et alii*, 1995) e sua atividade apirásica mostrou ser ativada tanto por Mg^{+2} quanto por Ca^{+2} (Ribeiro *et alii*, 1984), sendo expressa especificamente nas glândulas salivares de fêmeas adultas (Smartt *et alii*, 1995). A caracterização molecular e bioquímica da apirase da saliva de *T. infestans* foi feita por Lozzi, em

1999. A análise em SDS-PAGE, em condições redutoras e não-redutoras, mostrou a existência de bandas de proteínas de 88, 82 e 79 KDa, formando oligômeros. Em seguida, outras duas proteínas de 67 e 68 KDa foram identificadas como tendo atividade apirásica. A banda de apirase de 79 KDa foi clonada e expressada por Faudry *et alii* (2004a) e a espectrometria de massa mostrou que essas apirases também pertencem à família das 5' nucleotidasas e apresentam 32% de identidade com a de *Ae. aegypti*.



Adaptado de Andrade *et alii*, 2005.

Figura 5. As salivas dos vetores hematófagos atuam na ativação e agregação das plaquetas. 1) Durante o repasto, os vetores provocam a laceração dos vasos e a lesão tecidual, resultando na exposição do colágeno. 2) A hemostasia é promovida

pela agregação plaquetária, coagulação sanguínea e liberação de mediadores da vasoconstrição. Os insetos hematófagos podem inibir a agregação plaquetária impedindo a ativação da trombina (*An. albimanus*). 3) A ativação das plaquetas e do tromboxano A₂ resulta na vasoconstrição 4) e o óxido nítrico presente na saliva (*C. lectularius* e *R. prolixus*) podem prevenir os efeitos da hemostasia. 5) A saliva (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma pallidipennis*) pode quelar o ADP ou 6) prevenir sua ação por meio da apirase, inibindo a agregação plaquetária (*Ae. aegypti*, *A. gambiae*, *C. quinquefasciatus* *L. longipalpis*, *P. papatasi*, *T. infestans*, *C. lectularius*).

Objetivos

Objetivos

A linha de pesquisa entomologia molecular em nosso laboratório visa conhecer a diversidade molecular, funcional e imunológica de substâncias farmacologicamente ativas nas salivas de triatomíneos vetores da doença de Chagas. Neste trabalho, nossos objetivos são:

Objetivos específicos:

- Imunocitocalização das apirases de 88, 82 e 79 kDa na glândula salivar do *Triatoma infestans*.
- Estudar a especificidade pelo substrato e a dependência iônica das apirases nas salivas de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus*.
- Purificar parcialmente as apirases nas salivas de *R. brethesi* e *R. pictipes* em coluna de afinidade a oligonucleotídeos (dT) e estudar as mesmas com relação a preferência pelo substrato e dependência iônica.
- Comparar os efeitos das salivas das 4 espécies de *Rhodnius* sobre a agregação plaquetária.

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

1. Criação dos Triatomíneos

Os triatomíneos utilizados neste estudo (*R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes*, *R. robustus* e *T. infestans*) são provenientes da colônia de Triatomíneos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas da Universidade de Brasília (LMPDC). Os insetos eram mantidos em câmara climatizada, com temperatura entre 28 e 30 °C, umidade relativa de 65% e ciclo dia/noite de 12 h. Ovos, ninfas de 1^o ao 5^o estádios e adultos eram mantidos em frascos de polietileno para desenvolvimento e acasalamento (Silva, 1985). A alimentação dos triatomíneos era feita em aves (*Gallus domesticus*) por 30 min, exceto *Rhodnius pictipes* que se alimentava em camundongos.

2. Obtenção da Saliva

A saliva de *T. infestans* foi obtida por ejeção espontânea e colhida com o auxílio de uma micropipeta automática de 20 µL, utilizando uma ponteira plástica. Cada inseto ejetava aproximadamente 1 µL de saliva, que era mantida em banho de gelo, utilizada imediatamente ou então estocada a -80 °C. O conteúdo salivar de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes*, *R. robustus* e também do *T. infestans* foi obtido por perfuração das suas glândulas salivares. Os triatomíneos eram inicialmente imobilizados por resfriamento durante 5 min a -20 °C e, então, colocados sobre uma lâmina de vidro com a face ventral para cima utilizando uma pinça cirúrgica. Com o auxílio de uma outra pinça, era feito o deslocamento da cabeça para expor as três unidades do par de glândulas salivares de *T. infestans* e o par dos *Rhodnius* (Lozzi, 1999). As glândulas salivares eram visualizadas utilizando-se uma lupa com aumento de 1,5X e, imediatamente, recolhidas em um microtubo. Com o auxílio de uma agulha de calibre 0,38X13, as glândulas eram perfuradas e centrifugadas a 5000 g por 2

min. O sobrenadante era então recolhido e armazenado a -80 °C para posterior utilização.

3. Determinação da Concentração de Proteínas

As concentrações de proteína nas amostras foram determinadas pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina (Sigma®) como padrão.

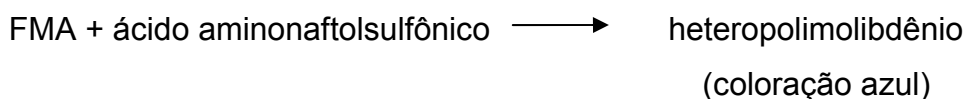
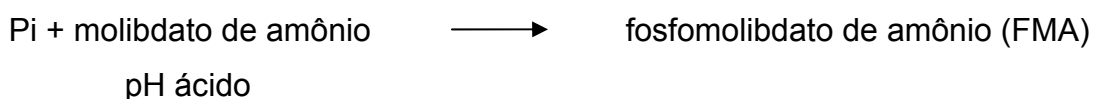
4. Purificação Parcial dos Extratos de Glândulas Salivares em Coluna de Oligo (dT)

A etapa de purificação parcial da atividade apirásica dos extratos das glândulas salivares foi feita em coluna de Oligo (dT) 12-18 Celulose (Pharmacia Biotech; 2,0 X 0,5 cm) conforme descrito por Faudry *et alii* (2004a) O conteúdo das glândulas salivares (800 µg) previamente diluído em 5 mL de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, era aplicado à coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão sob fluxo de 0,5 ml/ min. As proteínas ligadas à matriz eram eluídas com 5 mL de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 contendo NaCl 0,5 M e, então, com outros 5 mL do tampão na presença de 1,0 M do sal. As frações, 5 mL cada, coletadas em banho de gelo, eram concentradas e dessalinizadas em Centricon 30 (AMICON) e a atividade apirásica de cada uma delas era testada conforme descrito acima.

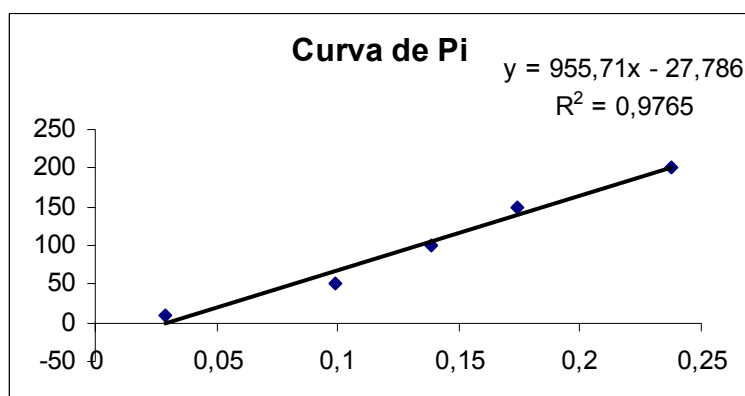
5. Atividade Apirásica

Os ensaios para a determinação da atividade apirásica foram feitos em microplacas de 96 poços, usando o método colorimétrico que mede a liberação de fosfato inorgânico (Pi) a partir dos substratos ATP, ADP e AMP (Fiske e Subbarow, 1925; Ribeiro *et alii*, 1989). Em resumo, a solução de reação continha Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; NaCl 150 mM; CaCl₂ 5 mM e ATP, ADP ou AMP 2 mM. A reação era iniciada com a adição da amostra de saliva (1,0 µg ou 3 µl das frações provenientes da coluna de oligo dT) em um

volume final de 100 μL , seguindo-se de incubação por 20 min a 37 °C. O controle da reação consistia em solução de reação na ausência de amostra nas mesmas condições. A reação enzimática era terminada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) até a concentração final de 5% (v/v). A seguir, adicionavam-se 15 μL de molibdato de amônio 2,5% (m/v) diluído em HCl 5 N e, então, 6 μL do ácido aminonaftolsulfônico (Sigma). Após 10 min de incubação, a absorbância a 630 nm era medida em leitor de microplacas Sigma Diagnostics, modelo EIA Multi-well Reader II. O método pode ser sintetizado da seguinte maneira:



A quantidade de Pi liberada nas reações era quantificada a partir da comparação de absorbância na curva de calibração feita com Pi. Uma unidade de atividade apirásica corresponde a 1,0 μmol de Pi liberado/min a 37 °C.



Os ensaios também foram realizados na presença de MgCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 ou CoSO_4 na concentração final de 5 mM para avaliar a dependência das enzimas em relação ao Mg^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} e Co^{++} .

6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As proteínas das salivas (5 µg) e das etapas de purificação parcial (5 µg) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições desnaturantes e redutoras, conforme método descrito originalmente por Laemmli (1970). Utilizou-se o sistema de eletroforese vertical e os géis foram preparados com concentrações de 12,5, 10 e 7% para o gel separador e 3,9% para o gel concentrador (Current Protocols in Molecular Biology). As amostras eram diluídas em tampão 5x (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; β-mercaptoetanol (2-Me) 15 mM e glicerol 10%) e fervidas por 5 min antes de serem aplicadas no gel. A eletroforese era realizada em tampão de corrida contendo Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; glicina 250 mM e SDS 0,1%. As amostras eram submetidas a uma voltagem constante de 70 V e de 130 V durante passagem pelo gel concentrador e separador, respectivamente. Como padrões de massas moleculares para os experimentos de eletroforese, foram utilizados marcadores comerciais da Sigma: Dalton Mark VII-L for SDS Gel Electrophoresis (MW: 14,000-70,000) e High Range (M.W.36,000-205,000). Para visualização das proteínas, os géis foram corados com *Coomassie blue* ou nitrato de prata.

6.1. Coloração por Azul de Coomassie

Após a corrida, o gel era imerso em solução de coloração (metanol 45%, *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,1% e ácido acético 10% em água MilliQ), e incubado por 1 h sob agitação à temperatura ambiente. Depois, este era transferido para a solução descorante (ácido acético 10%, metanol 10% em água MilliQ), onde era deixado sob agitação à temperatura ambiente até que as proteínas fossem visualizadas (Bollag *et alii*, 1996).

6.2. Coloração por Prata

O gel era fixado por 30 min em água adicionada de 40% de metanol e 10% de ácido acético, sob agitação. Logo após a fixação, o gel era mantido

durante outros 30 min em 25 mL de solução de incubação que consistia de 30% de etanol, 6,8% de acetato de sódio, 0,2% de tiosulfato de sódio pentahidratado e 25% de glutaraldeído adicionado no momento do uso. Seguindo-se a incubação, o gel era lavado três vezes por 5 min em água MilliQ sob agitação e submetido à coloração pela prata durante 40 min (nitrate de prata 0,1%, formaldeído 0,02%), preparada no momento do uso. A revelação das bandas do gel era feita com solução de carbonato de sódio 2,5%, formaldeído 0,01%, também preparada no momento do uso. Após a visualização das bandas, a reação era interrompida com solução de EDTA 40 mM, conforme metodologia estabelecida por Heukeshoven & Dernick, 1998.

7. Atividade ATPásica e ADPásica em Gel SDS-PAGE

As proteínas da glândula salivar e suas frações proveniente da purificação da coluna de oligo dT foram tratadas com Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%. Aproximadamente 30 µg de proteína por poço, sem prévia fervura, eram submetidos à eletroforese. A corrida no gel era procedida da maneira descrita anteriormente, porém a 4 °C. O gel era lavado duas vezes, 20 min cada, com 2,5% de Triton X-100, seguindo-se de outras duas vezes com água MilliQ. Todas as lavagens foram feitas sob agitação constante. A seguir o gel foi incubado na presença de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; CaCl₂ 20 mM; NaCl 100 mM e ATP ou ADP 5 mM por 30 min. Parava-se a reação com a mesma mistura citada acima, sem o nucleotídeo. As atividades apirásicas eram determinadas pela precipitação do fosfato de cálcio, mais facilmente visualizadas colocando-se o gel contra um fundo escuro. Esse protocolo é uma adaptação daquele publicado por Valenzuela *et alii* (2001). As fotografias foram realizadas em máquina FUJIFILM F-7000.

8. Imunização de coelhos e Obtenção de Anticorpos Policlonais

Anticorpos policlonais contra as apirases de 88, 82 e 79 KDa de *T. infestans* foram produzidos por imunização de coelhos. Foram selecionados animais com 3 meses de idade que eram mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Antes das imunizações,

o sangue dos coelhos foi retirado por punção cardíaca e os soros pré-ímenes foram testados por *Western blot*. Aqueles soros que possuíam anticorpos capazes de reconhecer proteínas da saliva foram descartados. Após SDS-PAGE, cada banda de apirase corada com azul de Coomassie foi excisada do gel contendo, contendo aproximadamente 5 µg de proteína, e o pedaço de gel foi macerado e homogeneizado em 200 µL de tampão PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 5,4 mM, KH₂PO₄ 57,6 mM). Cada animal recebeu três injeções com a mesma quantidade de proteína em intervalos de 15 dias. A primeira dose foi realizada na presença de adjuvante completo de Freund, a segunda com adjuvante incompleto de Freund e a terceira foi realizada sem o adjuvante. Após 15 dias da última injeção, foram coletadas amostras de sangue dos animais, os soros foram separados e estocados a -20 °C em glicerol 50%.

9. Immunoblotting

As proteínas (30 µg) da glândula salivar foram inicialmente separadas em gel SDS-PAGE 12,5%. O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco de transferência horizontal (MultiphorII, Pharmacia-LKB) conforme as recomendações do fabricante. A transferência era realizada por 80 min a uma corrente constante de 0,8 mA/cm², em tampão de transferência (Tris-HCl 48,4 mM; Glicina 39 mM; SDS 0,037% e Metanol 20%). Após a transferência, as proteínas adsorvidas à membrana foram visualizadas após coloração com Ponceau S e, a seguir, bloqueadas com tampão PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 5,4 mM, KH₂PO₄ 57,6 mM) contendo 5 % de leite em pó desnatado por 2 h à temperatura ambiente sob agitação constante.

Os soros pré-ímenes ou ímenes diluídos 1:200 em tampão PBS 1X contendo 2% de leite em pó desnatado (PBS-leite) foram incubados com as membranas durante 12 h a 4 °C. Após três lavagens de 5 min cada com tampão PBS, as membranas eram incubadas com o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina; BioRad) na diluição de 1:2000 em tampão PBS-leite por 2 h à temperatura ambiente. Após três lavagens em

PBS, foi adicionada à membrana solução reveladora contendo 66 μL de p-nitro azul tetrazólico (NBT) e 33 μL de 5-bromo-4cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) (Gigco-BRL) em 10 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl_2 5 mM. A reação de revelação era interrompida com lavagens sucessivas com água destilada. As massas relativas das proteínas eram estimadas a partir das massas dos marcadores padrões utilizados nos géis.

10. Inibição da Agregação Plaquetária

Para esse experimento foi coletado sangue de voluntário sadio, em jejum de pelo menos 6 h e que não tivesse feito o uso de qualquer medicamento que pudesse interferir na agregação plaquetária há pelo menos 10 dias. A coleta era realizada com pouco tempo de garroteamento e com punção venosa limpa, que permitia um fluxo rápido para a seringa. O sangue era então recolhido em um tubo plástico contendo citrato de sódio 0,109 M (3,8%). Os testes eram realizados em, no máximo, 4 h após a coleta. O plasma rico em plaquetas (PRP) e o pobre em plaquetas (PPP) foram obtidos pela centrifugação do sangue a 100 g por 10 min ou 1500 g por 15 min, respectivamente, a 4°C. A transmitância máxima e mínima a 600 nm eram determinadas após incubação de 400 μL de PRP ou PPP, respectivamente, a 37°C durante 10 min (Wang *et alii*, 1996). Para indução da agregação plaquetária, eram utilizados ADP 5,0 μM e adrenalina 0,05 μg (0,273 mM), na concentração final. O valor final da absorbância após 5 min era considerado o valor máximo de agregação plaquetária para o teste. O método baseia-se na medida de formação de agregados de plaquetas após sua exposição a um agente agregante. Em cada teste de inibição eram utilizadas diversas concentrações e diluições das secreções glândulas salivares. Assim, as amostras (5 μL) eram incubadas com o PRP por 5 min a 37 °C. Terminado esse período, eram adicionados 10 μL da substância indutora da agregação e era traçada a curva de transmitância durante 5 min. As reações de agregação foram realizadas em agregômetro QUALITERM e suas instruções seguidas de acordo com o fabricante.

Resultados

Resultados

1. As apirases de *T. infestans* são antígenicamente distintas

Em trabalho prévio, Faudry *et alii* (2004a) detectaram e caracterizaram 5 apirases na saliva de *T. infestans* com massas de 88, 82, 79, 68 e 67 kDa. Com o objetivo de obter anticorpos monoespecíficos contra as apirases de 88, 82 e 79 kDa de *T. infestans*, as bandas correspondentes (Fig. 6A) foram excisadas de gel e utilizadas para imunização de coelhos. Os soros obtidos foram utilizados em *immunoblotting* (Fig. 6B). Nas condições em que este experimento foi realizado, os coelhos produziram anticorpos específicos para cada uma das apirases

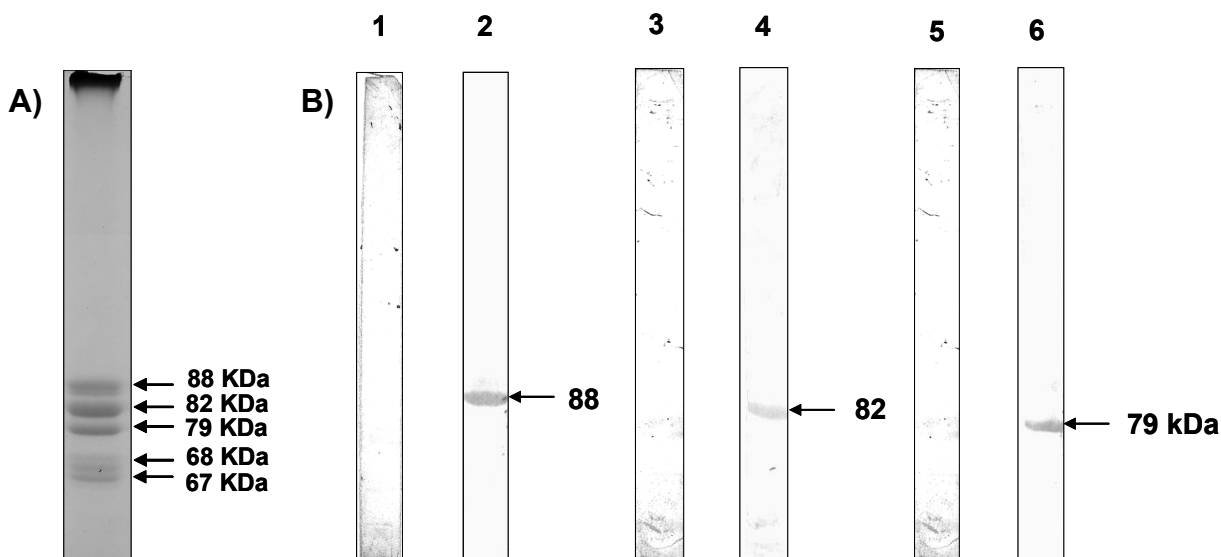


Figura 6. **Imunogenicidade e antigenicidade das apirases de *T. infestans*.** A saliva do *T. infestans* foi submetida à SDS-PAGE 10% e o gel corado com Coomassie (A). As bandas correspondentes às apirases de 88, 82 e 79 kDa foram excisadas do gel e cada uma usada para imunizar coelhos, na presença de adjuvante. Os soros obtidos foram utilizados em *immunoblotting* (B). Réplicas do gel (A) foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com os referidos anticorpos diluídos 1:100. Após incubação com anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:2000), o complexo antígeno-anticorpo foi revelado com NBT/BCIP: 1, 3 e 5, soros pré-ímmunes; 2, 4 e 6, soros de coelhos imunizados com as apirases de 88, 82 e 79 kDa, respectivamente.

2. As apirases localizam-se na unidade D2 da glândula salivar do *T. infestans*

Para saber a distribuição dessas enzimas nas diferentes unidades do par de glândula salivar do inseto, o conteúdo de cada unidade foi isolado e submetido à análise em SDS-PAGE. Como pode ser observado na figura 7 (A), o conteúdo

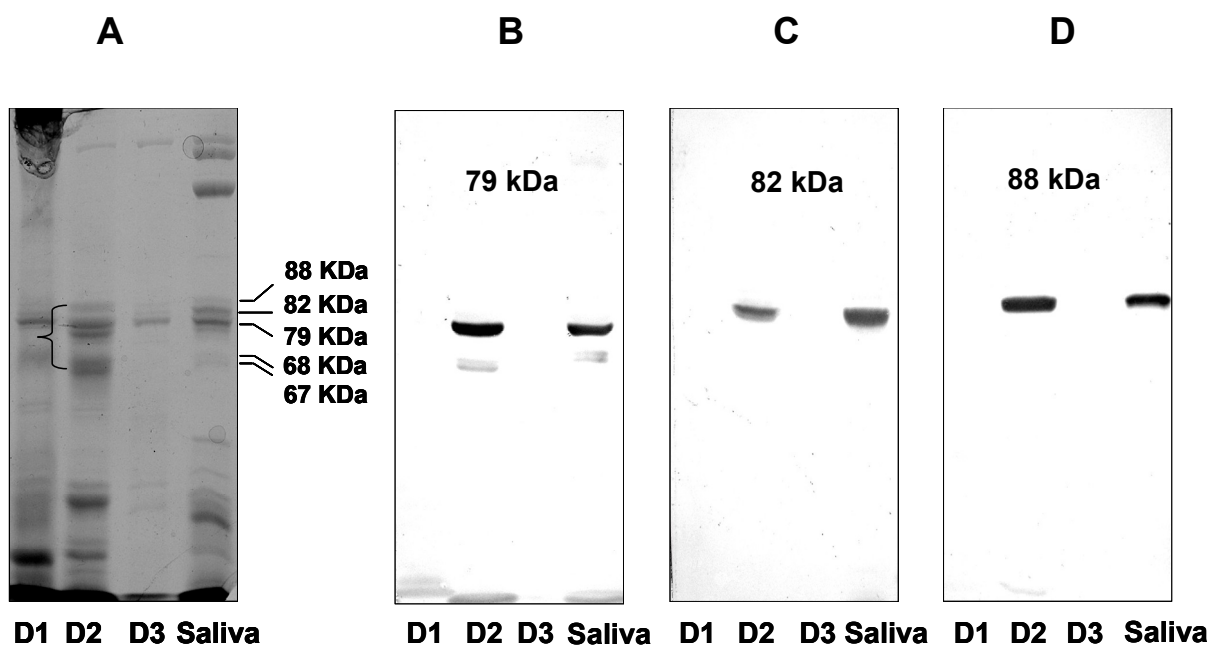


Figura 7. **Apirases localizam-se na unidade D2 da glândula salivar de *T. infestans*.** O conteúdo de duas de cada das unidades D1, D2 e D3 da glândula salivar e saliva total foi submetido à análise por SDS-PAGE-10% em condições redutoras. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie (A). Proteínas de réplicas do gel, após transferência para membrana nitrocelulose, foram submetidas *immunoblotting* com soros mono-específicos contra as apirases de 88 (D), 82 (C) e 79 kDa (B), diluídos 1:200. Os complexos imunes foram detectados com anti-IgG de coelho-fosfatase alcalina, 1:2000, e a revelação realizada com NBT/BCIP.

protéico é diferente em cada unidade. A unidade D2 apresenta o típico padrão de migração das apirases (Faudry *et alii*, 2004b). Anticorpos específicos reconheceram as apirases presentes em D2 de forma específica (Fig. 7B, C e D).

Esses dados indicam que as apirases de *T. infestans* são provenientes essencialmente da unidade D2 da glândula salivar

3. Atividade Apirásica

Com o objetivo de estudar a especificidade pelo substrato e a dependência iônica da apirase salivar, as proteínas presentes nas glândulas salivares *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus* e as frações eluídas da coluna de

Atividade de hidrólise de ATP/ADP na presença de Ca ⁺⁺			
	ATP	ADP	AMP
	Atividade Específica (μM de Pi liberado/ μg de proteína/min)		
<i>R. brethesi</i>	47.76	46.97	N.D.
<i>R. milesi</i>	46.06	45.24	N.D.
<i>R. pictipes</i>	52.54	51.24	N.D.
<i>R. robustus</i>	54.01	41.21	N.D.

N.D.: não detectado. Desvio padrão menor que 8%.

Tabela 1: **Especificidade e dependência iônica de apirases dos triatomíneos.** As amostras (1,0 μg) das salivas de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus* eram incubadas com a solução de reação que continha Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; NaCl 150 mM; CaCl₂ 5 mM e ATP, ADP ou AMP 2 mM, seguindo-se de incubação por 20 min a 37 °C. O controle da reação consistia de solução de reação na ausência de amostra nas mesmas condições. A reação enzimática era interrompida com ácido tricloroacético (TCA). Seguida da adição de 15 μL de molibdato de amônia 2,5% (m/v) diluído em HCl 5 N e 6 μL do ácido aminonaftolsulfônico (Sigma). Após 10 min de incubação, a absorbância era lida a 630 nm.

oligo (dT) de *R. brethesi* e *R. pictipes* foram incubadas com ATP, ADP ou AMP, na presença de Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Mn⁺⁺ ou Co⁺⁺. Nas condições experimentais

empregadas, as atividades apirásicas ocorreram somente na presença de Ca^{+2} , mostrando uma especificidade por esse íon, e na presença de ATP ou ADP, como mostra a tabela 1 e a figura 7. A hidrólise de AMP não ocorreu, o que mostra que essas apirases não têm atividade enzimática sobre esse substrato nas condições empregadas.

O fracionamento da saliva de *R. brethesi* em oligo (dT) Celulose resultou em três frações com diferentes atividades. Uma fração de atividade de proteínas que não se ligaram à coluna, outra que foi eluída com 0,5 M de NaCl e outra com 1 M de NaCl. Já a saliva do *R. pictipes* resultou em três frações com atividades quantitativamente semelhantes.

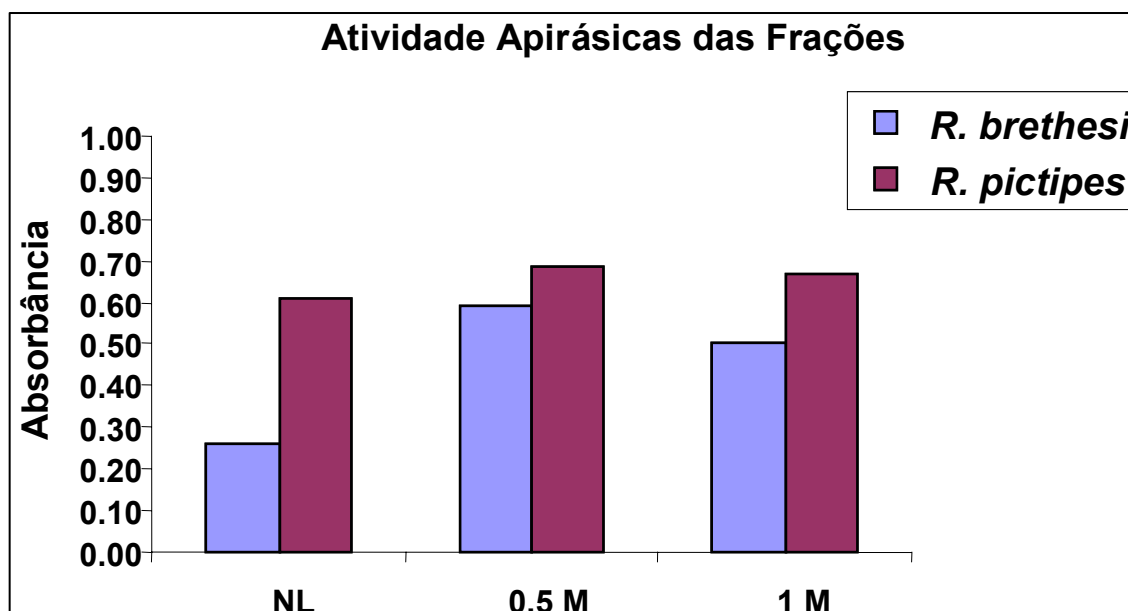


Figura 8: **Atividades enzimáticas das frações de saliva *R. brethesi* e *R. pictipes* eluídas da coluna de oligo (dT) de *R. brethesi* e *R. pictipes***. 3 μL das frações não ligadas (NL), 0,5 M de NaCl e 1 M de NaCl foram incubadas com Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; NaCl 150 mM; CaCl_2 5 mM ADP 2 mM, seguindo-se de incubação por 20 min a 37 °C. O controle da reação consistia de solução de reação na ausência de amostra nas mesmas condições. A reação enzimática era parada com ácido tricloroacético (TCA), seguida da adição de 15 μL de molibdato de amônia 2,5% (m/v) diluído em HCl 5N e 6 μL do ácido aminonaftolsulfônico (Sigma). Após 10 min de incubação, a absorbância era lida a 630 nm.

4. As apirases da saliva de *R. brethesi* e *R. pictipes* têm afinidade por coluna de Oligo (dT) Celulose.

Diante do conhecimento de que as apirases da saliva de *T. infestans* têm afinidade para coluna de oligo (dT) celulose, a mesma foi utilizada para purificação parcial das atividades apirásicas de *R. brethesi* e *R. pictipes* (Fig. 9). Após a aplicação da amostra, a coluna era lavada com 5 mL de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 para recolher as proteínas que não se ligavam à coluna (Fração não ligante). As proteínas retidas na coluna eram eluídas com 5 mL de Tris-HCl 25 mM pH 7,5, contendo NaCl 0,5 M (Fração 0,5 M) e, então com o mesmo tampão com 1,0 M do sal (Fração 1 M)

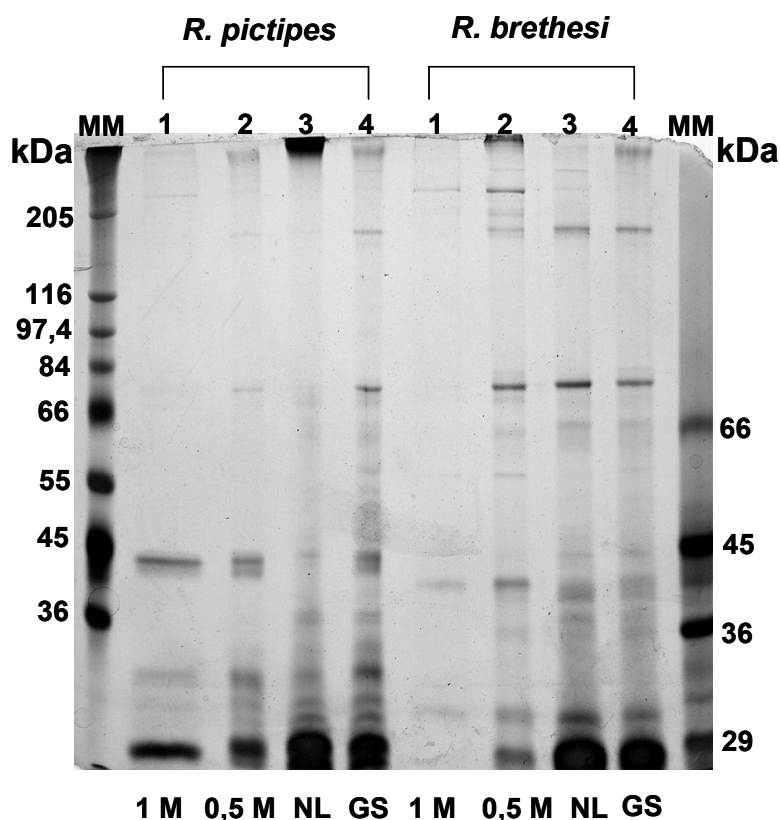


Figura 9. Perfil eletroforético da purificação parcial de apirases das salivas de *R. brethesi* e *R. pictipes*. Os conteúdos das glândulas salivares (4; 5 µg), Fração não ligada (2; 5 µg), Fração 0,5 M NaCl (3; 5 µg) ou 30 µL da Fração 1 M NaCl (1) foram submetidas à SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras e o gel corado com nitrato de prata. **MM**, marcadores de massas moleculares.

5. Salivas de Triatomíneos inibem diferencialmente a agregação plaquetária induzida por ADP

A inibição da agregação plaquetária induzida por ADP também foi avaliada em função de diferentes concentrações de proteínas da glândula salivar de *R. brethesi* e *R. robustus*. Os resultados podem ser conferidos na Figura 10.

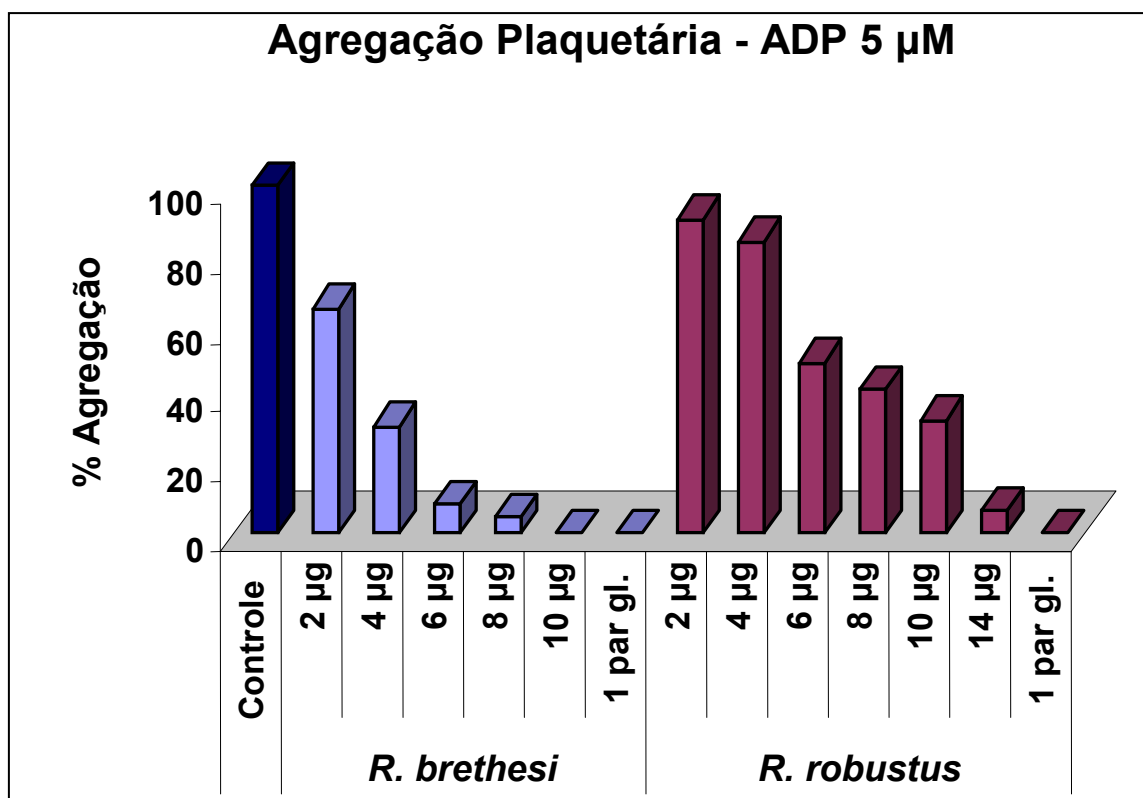


Figura 10. Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes quantidades de saliva de *R. brethesi* e *R. robustus*. Diferentes quantidades de proteínas (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 µg) eram incubadas com 400 µL de plasma rico em plaquetas (PRP) a 37 °C por 5 min antes da adição de ADP 5 µM, concentração final. A absorbância a 600 nm era medida durante 5 min. O controle consistiu de incubação de PRP na ausência de saliva antes da indução com ADP. O agregômetro era calibrado com plasma pobre em plaquetas (PPP).

O aumento da inibição foi proporcional à concentração de proteínas utilizada, sendo que 8 µg de saliva de *R. brethesi* foram suficientes para inibir completamente a agregação plaquetária, enquanto que para *R. robustus*, foram

necessários 14 µg. Cerca de 60% de inibição da agregação foi atingida quando do emprego de 4 e 10 µg de saliva de *R. brethesi* e *R. robustus*, respectivamente.

Os conteúdos dos pares de glândulas salivares de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes*, *R. robustus*, e também as unidades do par de glândulas salivares do *T. infestans* foram testadas quanto à sua capacidade de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP ou adrenalina. Observa-se completa inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP quando o conteúdo de 1 ou 0,5 par de cada glândula foi previamente incubado com 400 µL de PRP (Fig. 11).

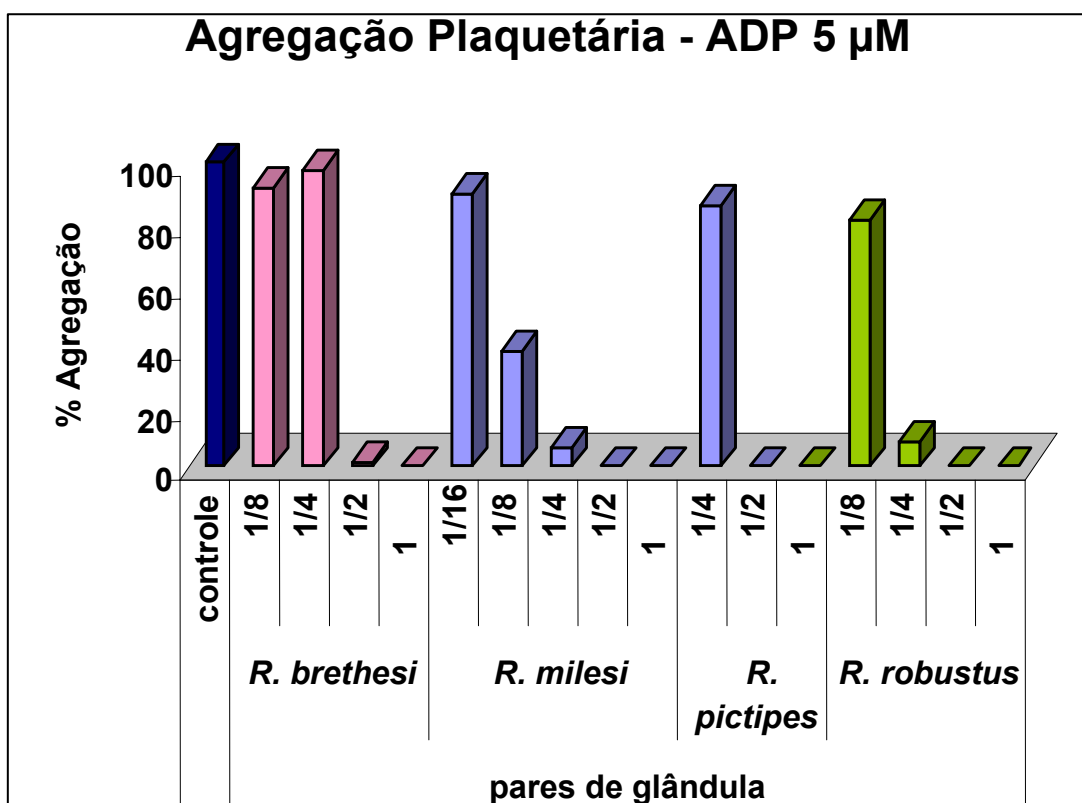


Figura 11. Comparação da inibição da agregação plaquetária induzida por ADP, na presença da saliva de triatomíneos. O conteúdo de cada par de glândulas, ou de suas diluições, foi incubado com 400 µL de plasma rico em plaquetas (PRP) a 37 °C por 5 min. Após a adição de ADP 5 µM, concentração final, a absorbância a 600 nM era medida durante 5 min. O controle consistiu de incubação de PRP na ausência de saliva antes da indução com ADP. A cada experimento, o agregômetro era calibrado com plasma pobre em plaquetas (PPP).

Na diluição 1:4, observou-se que as salivas de *R. milesi* e de *R. robustus* inibiram cerca de 90%, enquanto que, nas mesmas condições, as salivas de *R. brethesi* e *R. pictipes* não tiveram efeito observável sobre a agregação plaquetária induzida por ADP. A saliva de *R. milesi*, diferentemente daquelas dos outros triatomíneos, ainda foi capaz de inibir cerca de 50% da agregação na diluição 1:8 (Fig. 11).

A figura 12 mostra o perfil de inibição de agregação plaquetária induzida por ADP de cada unidade do par de glândulas de *T. infestans*.

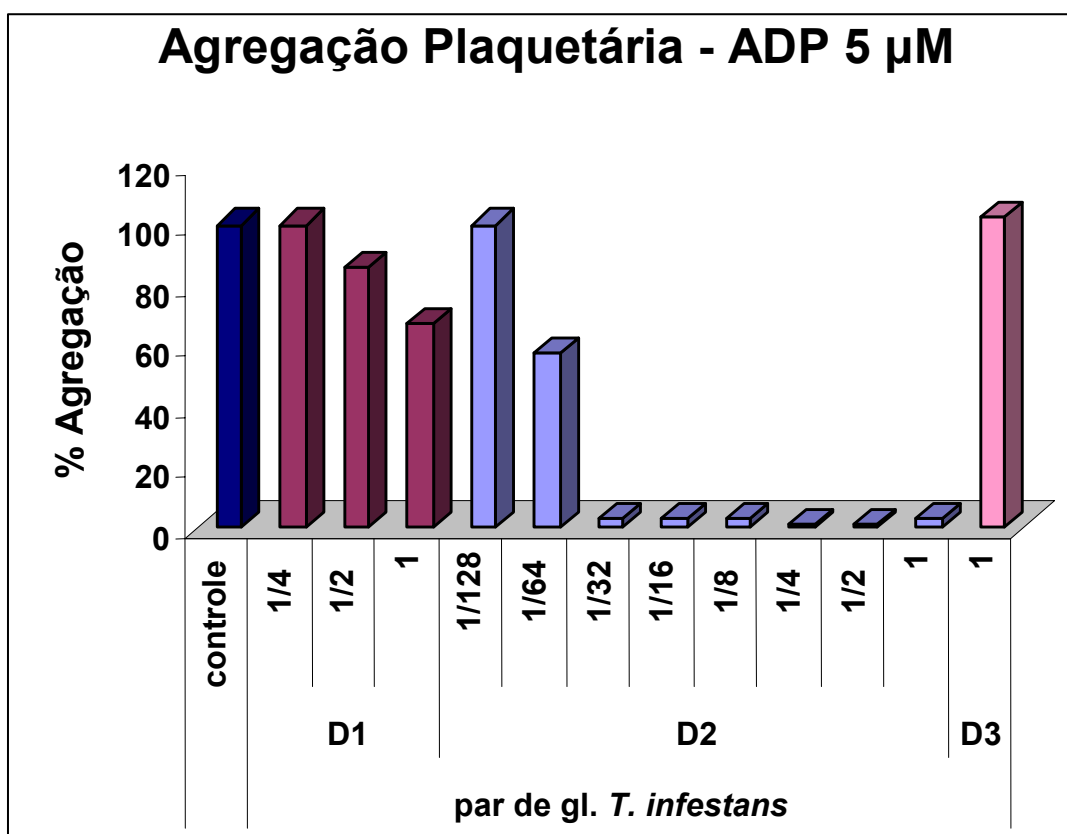


Figura 12. A unidade D2 do *T. infestans* é responsável pela inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP. O conteúdo de cada unidade do par de glândulas do *T. infestans*, ou de suas diluições, foi incubado com 400 µL de plasma rico em plaquetas (PRP) a 37 °C por 5 min. Após a adição de ADP 5 µM, na concentração final, a absorbância a 600 nM era medida durante 5 min. O controle consistiu de incubação de PRP na ausência de saliva antes da indução com ADP. A cada experimento, o agregômetro era calibrado com plasma pobre em plaquetas (PPP).

A inibição total da agregação foi observada quando se utilizava o conteúdo salivar de uma unidade D2 e diluições da mesma até 1:32. Uma unidade D1 inibiu em torno de 22% da agregação, enquanto que meia unidade praticamente não induziu inibição (Fig. 12). A unidade D3 não inibiu a agregação. Esses resultados mostram que praticamente toda a atividade anti-agregadora de plaquetas, induzida pelo ADP, do inseto está na unidade D2 de sua glândula salivar.

A inibição da agregação plaquetária induzida por ADP foi comparada com aquela induzida por adrenalina. Para isto, o PRP foi incubado com saliva de *R. brethesi*, de *R. milesi* ou de *R. pictipes* antes da adição de adrenalina (Fig 13).

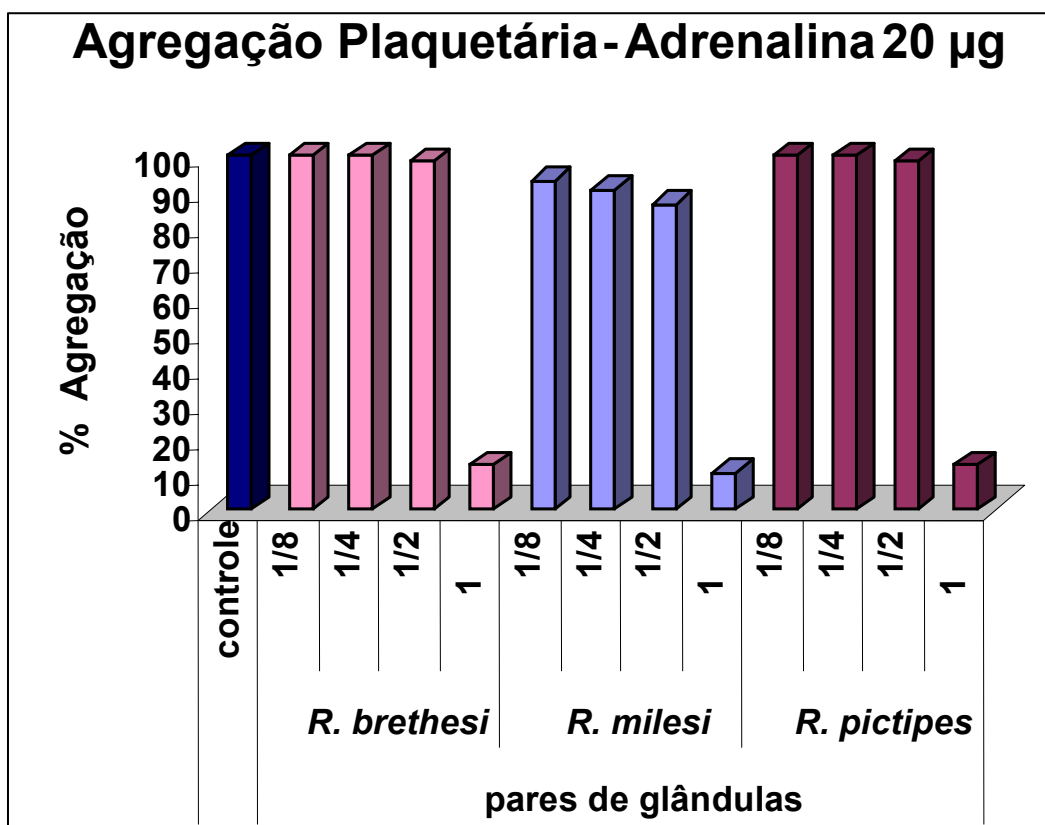


Figura 13. Comparação de inibição da agregação plaquetária induzida por adrenalina na presença da saliva de triatomíneos. O conteúdo de cada par de glândulas, ou de suas diluições, foi incubado com 400 µL de plasma rico em plaquetas (PRP) a 37 °C por 5 min. Após a adição de adrenalina, 0,05 µg/mL, concentração final, a absorbância a 600 nM era medida durante 5 min. O controle consistiu de incubação de PRP na ausência de saliva antes da indução com a

adrenalina. A cada experimento, o agregômetro era calibrado com plasma pobre em plaquetas (PPP).

Nas condições experimentais empregadas neste trabalho, verificou-se que 1 par de glândulas era suficiente para inibir a agregação plaquetária na presença da adrenalina, mas que as diluições seguintes dos conteúdos dos pares de glândula não apresentavam nenhum efeito na inibição da agregação. Esse achado mostra a existência de um outro fator inibidor da agregação plaquetária presente nas glândulas salivares de *Rhodnius* spp. estudados aqui (Fig. 13).

6. Atividade apirásica de *Rhodnius* spp. é mediada majoritariamente por proteínas de 40- 45 kDa

Para se ter idéia de quantidade e de massa molecular de proteínas com atividade apirásica na saliva dos triatomíneos, o conteúdo das glândulas salivares de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* ou *R. robustus* foram submetidos à SDS-PAGE 12,5%, assim como as frações não ligada e 50% eluídas da coluna de Oligo (dT) de *R. brethesi* e *R. pictipes*. Após a corrida, o gel era renaturado com Triton X-100 e lavado com água antes da adição do tampão de atividade contendo ATP ou ADP 5 mM. O princípio do método baseia-se no fato de que o íon fosfato, liberado pela clivagem enzimática, se associa ao íon cálcio formando um precipitado de fosfato de cálcio, insolúvel e de cor branca, originando um enzimograma (Fig. 14A; B). Uma forte atividade ATPásica associada à proteína de 45 kDa para *R. pictipes* e de 44 kDa para as outras espécies estudadas foi identificado (Fig. 14B). O mesmo enzimograma foi observado quando se utilizou ADP como substrato (Fig. 14A). Em adição a essa atividade enzimática principal, observaram-se também outras duas atividades sobre ATP e ADP associadas a proteínas de massas moleculares altas (*). Essas atividades enzimáticas mais fracas só foram visualizadas após fotografia. A coloração do gel após enzimografia mostra a existência de várias bandas de proteínas possivelmente responsáveis pelas atividades ATPásica e ADPásica (Fig 14C).

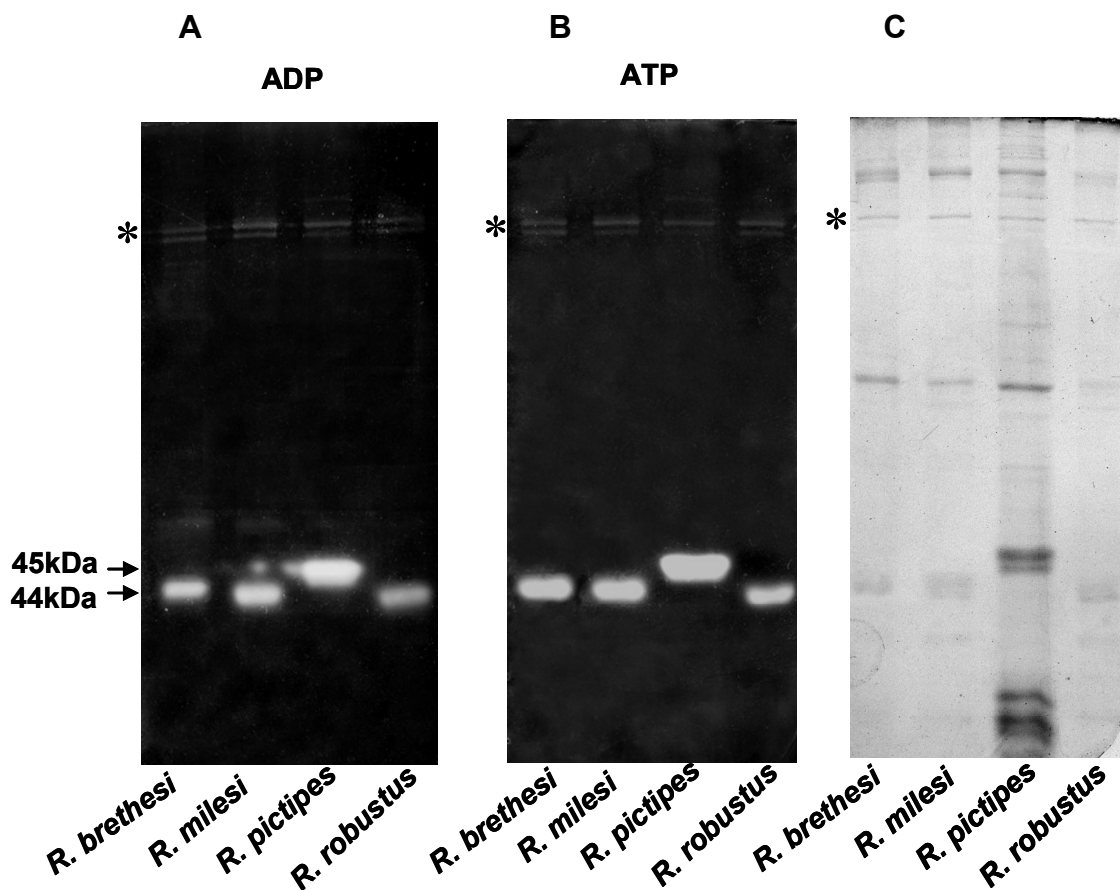


Figura 14. Enzimografia em SDS-PAGE revela atividade apirásica na saliva de triatomíneos. O conteúdo, 30 μ g, das glândulas salivares de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* ou de *R. robustus* foi submetido à SDS-PAGE 12,5%, em condições não redutoras e sem fervura prévia das amostras, a 4 °C. Após a corrida, o gel foi lavado com Triton X-100 e incubado com tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; CaCl_2 20 mM; NaCl 100 mM) contendo ADP (A) ou ATP (B) 5 mM, concentração final. A formação do precipitado de fosfato de cálcio pode ser visualizada colocando-se o gel contra um fundo escuro; C) gel A corado com azul de Coomassie.

A enzimografia da fração da saliva de *R. brethesi* retida na coluna oligo dT e eluída com 50% de NaCl coincidiu com aquela da saliva total, como pode ser observado na figura 14. Neste experimento, apenas uma banda de atividade enzimática de 44 kDa foi observada. O mesmo padrão foi observado para *R. pictipes* (Fig. 15), exceto que um pouco de atividade apirásica foi observado na fração não ligada à coluna de oligo (dT). O gel corado mostra pelo menos duas

bandas de proteínas co-migrando com a atividade ATPásica e ADPásica (Fig. 16A,C) que são pouco visíveis na fração não ligada à coluna (Fig. 16B).

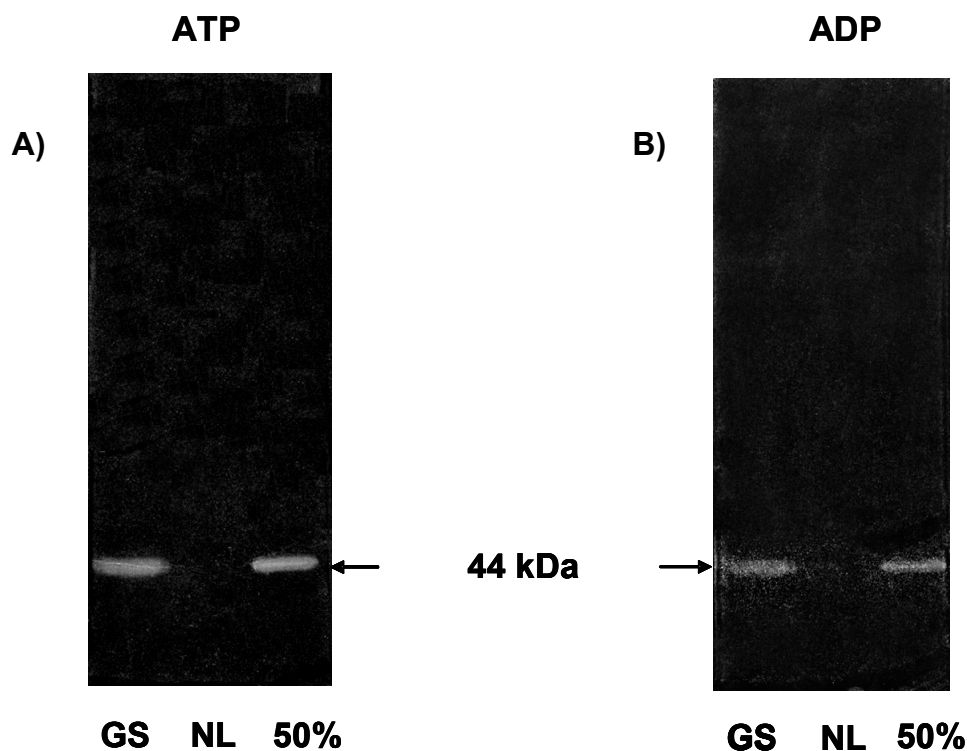


Figura 15. **Análise das atividades ATPásicas e ADPásicas de saliva de *R. brethesi* após SDS-PAGE.** 30 µg do conteúdo da glândula salivar (GS), fração não ligada à coluna (NL) e fração 50% (50%) de *R. brethesi* foram submetidos à SDS-PAGE 10%, em condições não redutoras, a 4 °C. Após a corrida, o gel foi lavado com Triton X-100 e incubado com tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; CaCl₂ 20 mM; NaCl 100 mM) contendo ATP (A) ou ADP (B) 5 mM, (concentração final) por 30 min. A formação do precipitado de fosfato de cálcio pode ser visualizada colocando-se o gel contra um fundo escuro.

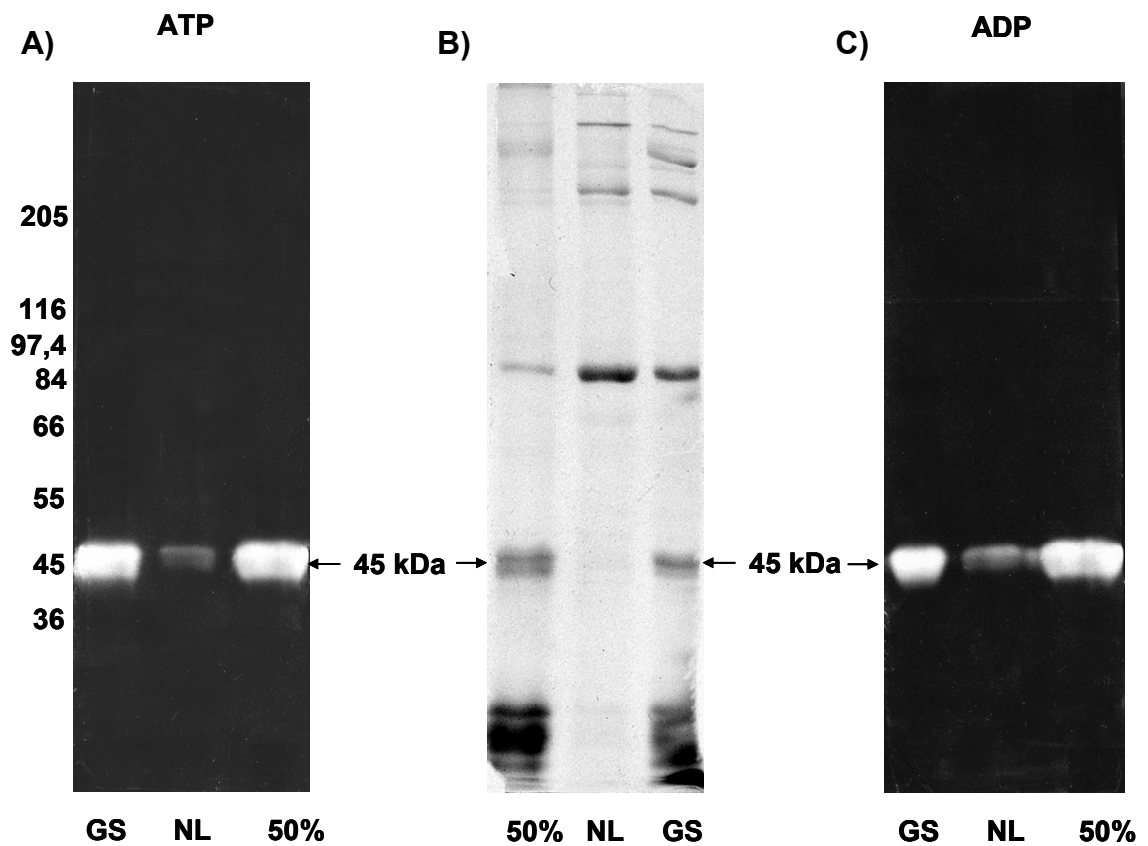


Figura 16. **Análise de atividade ATPásica e ADPásica de *R. pictipes* em gel SDS-PAGE.** O conteúdo salivar (**GS**) de *R. pictipes* (30 μ g); fração não ligada (NL) de *R. pictipes* (30 μ g); fração 50% de *R. pictipes* (30 μ g) foram submetidos à SDS-PAGE 12,5% e incubado com tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; CaCl₂ 20 mM; NaCl 100 mM) contendo ATP (**A**) ou ADP (**C**) 5 mM, concentração final, formando um precipitado de fosfato de cálcio (iluminação de campo escuro). **B**) gel corado com Coomassie após atividade realizada com ATP.

Discussão

Discussão

Muitos patógenos são transmitidos pelos vetores artrópodes ao hospedeiro vertebrado por meio de suas secreções salivares liberadas durante alimentação (Smartt *et alii*, 1995). As glândulas salivares dos artrópodes hematófagos contêm uma grande diversidade de componentes capazes de neutralizar as defesas do hospedeiro contra perda de sangue, ou seja, essas moléculas afetam a homeostasia, inflamação e a imunidade do hospedeiro (Ribeiro *et alii*, 1995b). Os primeiros estudos realizados em artrópodes hematófagos para identificar atividade apirásica foram feitos com o triatomíneo *Rhodnius prolixus* (Ribeiro & Garcia, 1980).

Posteriormente, atividades similares já foram descritas em mais de 11 espécies de insetos, entre os quais o *T. infestans* (Faudry *et alii*, 2004a), o percevejo, *C. lectularius* (Valenzuela *et alii*, 1998) e também o mosquito *Ae. aegypti* (Champagne *et alii*, 1995).

Neste trabalho apresentamos resultados da identificação de atividades apirásicas nas salivas de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus* e das suas propriedades de inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP. As apirases são enzimas que hidrolisam tanto ADP quanto ATP liberando fosfato inorgânico e são inibidoras da agregação plaquetária encontradas em muitos dos organismos hematófagos estudados (Andrade *et alii* 2005). A primeira parte do nosso trabalho consistiu-se na produção de anticorpos contra 3 das 5 apirases de *T. infestans*. A existência dessas apirases na saliva do triatomíneo foi mostrada por Faudry *et alii* (2004a) que as purificou por meio de cromatografia em coluna de oligo (dT) e de filtração em gel. Essas apirases mostraram ser imunogênicas, pois os soros dos coelhos imunizados com as mesmas foram capazes de reconhecê-las na membrana de nitrocelulose. Entretanto, não se observou reatividade entre anticorpos contra apirases de *T. infestans* e apirases de *Rhodnius* spp. estudados nesse trabalho (dados não mostrados). Esse resultado indica que as apirases de *Rhodnius* spp. não possuem epítomos semelhantes àqueles presentes nas apirases de *T. infestans*. Esses insetos pertencem a gêneros diferentes e, por não terem

evoluído de maneira semelhante, suas apirases, mesmo que possuam as mesmas funções, apresentam estruturas moleculares distintas. É necessário conhecer as seqüências de resíduos de aminoácidos das apirases de *Rhodnius* spp. e de *T. infestans* para, então, realizar estudos comparativos. No entanto, suas massas moleculares e propriedades antigênicas diferentes fornecem uma idéia clara de suas diversidades. As próprias apirases de *T. infestans* divergem entre si, pois os anticorpos contra uma delas não reagem contra as outras, sugerindo monoespecificidade antigênica. No entanto, alguma similaridade estrutural parece existir entre essas moléculas, pois longo período de incubação com o anticorpo permite visualização de reatividade cruzada (dados não mostrados). Essas observações corroboram dados prévios, obtidos por meio de espectrometria de massa, que mostram que as apirases de 88, 82 e de 79 kDa de *T. infestans* possuem seqüências primárias diferentes (Faudry *et alii*, 2004a).

Os anticorpos produzidos contra as apirases de 88, 82 e 79 kDa reconheceram as respectivas proteínas na altura esperada na unidade D2 e não na unidade D1, contrário ao que foi mostrado no trabalho de Faudry *et alii* (2004b). Em adição, o perfil eletroforético das apirases desse inseto aparece quando apenas o conteúdo da unidade D2 é submetido à SDS-PAGE. Para confirmar essa observação, o conteúdo de cada unidade foi empregado em testes de inibição de agregação plaquetária induzida por ADP. Esse experimento confirmou a presença das apirases na unidade D2, pois apenas seu conteúdo foi capaz de inibir a agregação plaquetária. O conteúdo da unidade D2 diluído até 32 vezes foi capaz de inibir completamente a agregação de plaquetas correspondentes a 1 mL de sangue, confirmando sua importância no processo de nutrição do *T. infestans*.

A purificação parcial de atividades apirásicas nas salivas de *R. brethesi* e *R. pictipes* foi realizada em coluna de oligo (dT). Esta coluna é indicada para o isolamento de mRNA e, também, para a purificação de proteínas e enzimas que tenham afinidade por nucleotídeos como a deoxinucleotídeo transferase terminal (Okamura *et alii*, 1978). A composição da matriz consiste de celulose (Whatman CF-1) ligada com oligo (dT) mediante N, N'-dicitclohexilcarbodiimida. Essa matriz confere especificidade de ligação com proteínas que se ligam a

seqüências (dT) e DNA com seqüências poli (A). Faudry *et alii* (2004a) empregaram pela primeira vez essa coluna para a purificação de apirases.

As atividades apirásicas variam com o pH e um exemplo típico desta variação foi mostrado por Cupp *et alii* (1994), onde as 5 espécies de anofelinos analisadas apresentam valores de pH ótimo diferentes para suas atividades apirásicas. Entre os triatomíneos, as apirases de *T. infestans* e *R. prolixus* apresentam pH ótimo de 7,5 e 7,0-9,0, respectivamente (Smith *et alii*, 1980; Faudry *et alii*, 2004a), enquanto que aquela de *C. lectularis* possui pH ótimo em torno de 8,0 (Valenzuela *et alii*, 1996). Em nosso trabalho a escolha do pH 8,3 foi baseada nos dados observados acima. Os testes de atividade enzimática foram realizados a 37 °C em decorrência de dados prévios relativos a outros artrópodes hematófagos e também por refletir melhor as condições fisiológicas do hospedeiro, fonte de seu alimento.

Há uma impressionante conservação de atividade específica entre as apirases das salivas de *Rhodnius* spp., pois quase não há variação. Esta observação pode não ter significado biológico, mas chama à atenção o fato de que a quantidade e identidade de proteínas (massas moleculares e pontos isoelétricos) das salivas desses insetos serem conservadas (nossos dados não publicados). Neste contexto, seria interessante fazer um estudo comparativo das propriedades cinéticas dessas apirases. As salivas de *Rhodnius* spp. clivam ATP e ADP, mas não AMP, com atividades específicas semelhantes. Atividade específica semelhante sobre substratos diferentes poderia sugerir apenas um sítio de ligação da enzima ao substrato, propriedade que parece ser comum entre as apirases de triatomíneos (Faudry *et alii*, 2004a). No entanto, estudos cinéticos detalhados ainda precisam ser realizados, como, por exemplo, a afinidade enzimática para cada um dos substratos. Seria também um bom modelo para estudo de mecanismo de catálise: será que após remoção do fosfato do ATP, o ADP resultante continua no sítio da enzima? A apirase de *R. prolixus* parece hidrolisar ATP diretamente a AMP sem acúmulo de ADP, sugerindo que o ADP continua no sítio ativo da enzima durante todo o processo catalítico (Sarkis *et alii*, 1986). A não remoção de fosfato do AMP não significa que o mesmo não seja substrato para outra enzima da saliva desses insetos. As salivas de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* possuem adenosina deaminase que converte AMP e adenosina em inosina (Ribeiro *et alii*, 2001).

A influência da presença de cátions divalentes na atividade apirásica tem sido intensamente estudada, sendo que há apirases que são ativadas por Ca^{++} ou Mg^{++} , enquanto outras são dependentes apenas de Ca^{++} . As apirases ativadas tanto por Ca^{++} quanto por Mg^{++} podem ser encontradas em mamíferos (Yagi *et alii*, 1991; Christoforidis *et alii*, 1995) e em artrópodes como, por exemplo, *A. aegypti* e *Anopheles* spp. (Champagne *et alii*, 1995; Arca *et alii*, 1999); estas enzimas são membros da família das 5' nucleotidases. As apirases de *T. infestans* pertencem a essa família de enzimas da classe das hidrolases que catalisam a hidrólise do fosfato esterificado no carbono 5' das porções ribose e desoxiribose. A dependência estrita da atividade apirásica pelo Ca^{++} , em relação aos insetos hematófagos, foi descrita para *P. papatasi* (Valenzuela *et alii*, 2001), *C. lectularius* (Valenzuela *et alii*, 1998), *R. prolixus* (Ribeiro & Garcia, 1980) e para o *Simulium vittatum*, popularmente conhecido como borrachudo (Cupp & Cupp, 1997). Esta seria uma propriedade das verdadeiras ATP difosfohidrolases (Sarkis *et alii*, 1986). Nossos resultados conduzem a hipótese de que as apirases de *Rhodnius* spp. não pertencem à família das 5' nucleotidases porque as apirases de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus* são Ca^{++} -dependentes.

Comparando as frações proteicas das salivas eluídas da coluna de oligo dT, verificou-se que a atividade apirásica da fração de 0,5 M de NaCl da saliva de *R. brethesi* é maior do que aquelas medidas nas frações não ligada e de 1 M de NaCl. Já as frações da saliva de *R. pictipes* eluídas da coluna quase não mostraram diferença entre si quanto à atividade. O fato de que boa parte das apirases não ter se ligado à coluna poderia refletir saturação dos sítios de ligação ou pouca afinidade destas enzimas por oligo dT nas condições experimentais utilizadas. Diferentemente das apirases de *T. infestans*, cerca de 0,5 M da atividade retida na coluna foram eluídas com 1 M de NaCl, o que pode significar interação das apirases com outros sítios que oligo dT. É possível que parte da apirase ainda tenha ficado retida na coluna; seria necessário lavar a mesma com tampão contendo NaCl em concentrações superiores a que foi usada, 1,0 M. Não é possível fazer correlação de bandas no gel com atividade enzimática. Seria importante alterar as condições da cromatografia para verificar possibilidade de maior rendimento no processo de purificação por essa metodologia. No entanto, para uma purificação qualitativa

dessas enzimas das salivas, o emprego dessa coluna pode ser útil desde que associado a outro processo cromatográfico como filtração em gel ou troca iônica.

Enzimografia após eletroforese tem sido, ao longo das últimas décadas, uma ferramenta importante para identificação de diversas enzimas como as proteases (Santana *et alii*, 1992; Bertin *et alii*, 2005). Este procedimento também foi empregado para estudo das apirases de *T. infestans* e *P. papatasi* (Faudry, 2003; Valenzuela *et alii*, 2001). As apirases de *T. infestans* foram ativas apenas após focalização isoeletrica, enquanto que a de *P. papatasi* também se mostrou ativa após SDS-PAGE. Enzimografia após SDS-PAGE revelou uma forte atividade apirásica, tanto sobre ADP como ATP, nas salivas de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus* e nas frações de saliva de *R. brethesi* e *R. pictipes* não ligadas e de 50% de NaCl. Estes resultados mostram que apirases de *Rhodnius* spp. recuperam a atividade após eletroforese e possuem massas moleculares conservadas, em torno de 44-45 kDa. Em adição, outras duas atividades menores observadas estão associadas a proteínas de altas massas moleculares. Outros estudos serão conduzidos para verificar se estas atividades menores são mesmo devido à atividade apirásica ou à hidrólise inespecífica de ATP e ADP. A atividade em gel da apirase de *R. pictipes*, após cromatografia de afinidade em oligo dT, co-migrou com duas proteínas de 45 kDa reveladas após coloração do gel. Outros estudos são necessários para determinar qual dessas proteínas, ou ambas, medeiam atividade apirásica. Espectrometria de massa e transcriptoma serão importantes ferramentas para responder essa pergunta. A enzimografia não descarta a possibilidade de existência de outra (s) apirase (s) salivar (es) desses insetos porque poderiam ter sofrido desnaturação irreversível.

A inibição da agregação plaquetária causada pela salivas dos insetos hematófagos durante o repasto sangüíneo impede a coagulação do sangue no seu aparelho sugador, contribuindo para uma alimentação sangüínea bem sucedida. A demonstração de inibidores da agregação plaquetária já foi realizada na saliva de carrapatos (Waxman & Connolly, 1993), mosquitos (Valenzuela *et alii*, 1999) e também de triatomíneos (Noeske-Jungblutt *et alii*, 1994; Francischetti *et alii*, 2000; Faudry *et alii*, 2004). As plaquetas têm um papel muito importante na hemostasia como um componente integral na

formação de um coágulo no sítio da injúria tecidual (Karczewski *et alii* 1994). O estudo da agregação plaquetária induzida por uma variedade de agonistas que atuam em vias diferentes pode ser realizado em agregômetro (Wang *et alii* 1996). A utilização de ADP na concentração final de 5 μ M foi escolhida por facilitar a visualização da resposta bifásica, ou seja, primeiro ocorre uma agregação primária, seguida de uma desagregação e finalmente a agregação secundária, pois sob baixas concentrações do ADP (<1 μ M), a mudança na forma da plaqueta para discóide é seguida pela agregação primária e desagregação (Taylor *et alii*, 1992). O ADP é um agonista que estimula a adesão e aderência entre as plaquetas.

Neste trabalho a avaliação da inibição da agregação plaquetária, induzida por ADP ou adrenalina *in vitro*, foi mostrada utilizando 1 par de glândula salivar ou diluições subseqüentes das mesmas dos triatomíneos *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus*. A utilização de 1 par ou 0,5 par de glândula inibiu completamente a agregação plaquetária induzida pelo ADP em todas as espécies estudadas. Na diluição 1:4 as salivas de *R. milesi* e de *R. robustus* inibiram cerca de 90% da agregação plaquetária induzida pelo ADP, enquanto que, nas mesmas condições, as salivas de *R. brethesi* e *R. pictipes* não tiveram efeito observável sobre a agregação plaquetária. A saliva de *R. milesi*, diferentemente daquelas dos outros triatomíneos, ainda foi capaz de inibir cerca de 50% da agregação na diluição 1:8. Estes dados demonstram que a saliva de *R. milesi* possui maior poder de inibição de agregação plaquetária induzida por ADP que outras espécies, sugerindo maior concentração da enzima na saliva e/ou maior afinidade da apirase por ADP. Não podemos deixar de considerar a possibilidade de que a saliva dessa espécie tenha algum outro fator que funcione sinergicamente com a apirase como a RPAI-1 de *R. prolixus* (Francischetti *et alii*, 2002). A utilização do par de glândula nos experimentos de agregação plaquetária justifica-se por ser uma situação fisiológica, embora testes tenham sido realizados por quantidade de proteína com os conteúdos salivares de *R. brethesi* e *R. robustus*. Levando-se em consideração que cada ninfa de 5º estágio de *R. prolixus* e *T. infestans* é capaz de aumentar de 6-12 vezes o seu peso corpóreo a cada alimentação no hospedeiro e que cada inseto adulto aumenta cerca de 3 vezes o seu peso corpóreo, sendo capaz de ingerir aproximadamente 50 μ L de sangue a cada

repasto (Friend & Smith, 1977; Kollien & Schaub, 2000), a utilização de 400 µL do plasma rico em plaquetas, que corresponde a aproximadamente 1 mL do sangue total, em nossos experimentos de agregação, mostrou que o conteúdo de 1 par foi mais do que suficiente para inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP. Esses dados mostram, inequivocamente, que esses insetos são altamente especializados em inibir a agregação plaquetária durante repasto, indicando excelente adaptação biológica. É importante ressaltar que o teste de inibição *in vitro* mimetiza o que ocorre *in vivo*, no momento do repasto: o ADP liberado após a injúria tecidual, um dos principais agonistas de agregação plaquetária (Davey & Lander, 1964) precisa ser imediatamente hidrolisado pela apirase. Portanto, há uma competição entre apirase e plaquetas pelo ADP, significando que a atividade apirásica precisa ser muito rápida para ser eficiente e resultar em inibição da agregação plaquetária.

A adrenalina, outro agonista da agregação plaquetária, também foi utilizado nos testes. A adrenalina potencializa a agregação de plaquetas por um mecanismo de sinalização, ligando-se a receptores adrenérgicos e inibindo a adenilato ciclase (Andersen *et alii*, 2003). Foi mostrado que 1 par de glândula salivar de cada espécie de *Rhodnius* spp. aqui estudado foi capaz de inibir a agregação plaquetária na presença da adrenalina. Esse achado mostra a existência de um ou mais fatores responsáveis por inibir a agregação plaquetária nas glândulas salivares dessas espécies aqui estudadas.

Há necessidade de ampliação do conhecimento das funções fisiológicas de substâncias existentes na saliva de insetos vetores de doenças ainda incuráveis como Malária, Leishmaniose e Chagas. Muitas dessas moléculas poderiam ser utilizadas como alvos para a produção de vacinas. O conhecimento dos constituintes salivares dos insetos hematófagos poderia ser útil não só por trazer informações sobre a fisiologia da hematofagia, mas também por significar alternativa de tratamento de outras doenças de origem vascular (Ribeiro & Francischetti, 2003), ou seja, poderiam ser utilizados na obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

A consequência da resposta do hospedeiro às proteínas salivares ou à picada do vetor, em termos de transmissão do patógeno, já foi reportada em carrapatos (Bell *et alii*, 1979; Tsuda *et alii*, 2001; Trimnell *et alii*, 2002) e também no mosquito-palha (Morris *et alii* 2001). Esses estudos revelaram o

efeito dos componentes salivares no curso e na severidade das infecções por *L. major* na derme da orelha de camundongos, associado a um rápido aumento da produção de citocinas do tipo 2. Reversão completa desses efeitos foram observados, quando da presença de anticorpos anti-saliva em camundongos pré-expostos aos conteúdos das glândulas salivares (Belkaid *et alii*, 1998). Morris *et alii* (2001) mostrou que a proteína Maxadilan exacerba a infecção por *L. major* e que vacinação contra o mesmo protege o camundongo da infecção. Os autores desse trabalho observaram forte resposta celular (tipo Th1) e humoral contra a Maxadilan injetada no camundongo; anticorpos específicos neutralizam os efeitos imunossupressores da Maxadilan, bloqueando a infecção. Esses estudos revelam a viabilidade do emprego de proteínas salivares na produção de vacinas para controlar doenças causadas por vetores.

O desenvolvimento de técnicas que isolam e seqüenciam todas as proteínas das glândulas salivares dos vetores, e mais especificamente aquelas que são secretadas, tornou o estudo da complexidade destas proteínas, assim como a identificação de suas famílias, mais fácil e rápido. A melhora significativa da sensibilidade dos seqüenciadores de proteínas e nucleotídeos tornou este tipo de abordagem acessível, mesmo utilizando pequenas quantidades de material. Como exemplo dessas técnicas, tem-se a eletroforese bi-dimensional, seguida de seqüenciamento das proteínas isoladas, com a desvantagem de que parte do material é perdida. Outra técnica muito utilizada é o seqüenciamento amino terminal a partir da eletroforese uni e bi-dimensional, que pode ser comparada com os produtos transcritos preditos a partir do cDNA de suas glândulas salivares. A construção de bibliotecas de cDNA permite não somente o isolamento dos fatores salivares envolvidos na hemostasia e inflamação, mas também a identificação de novas proteínas, com funções biológicas ainda desconhecidas (Valenzuela, 2002).

Vasodilatadores, anticoagulantes e antiinflamatórios já descritos, ou ainda por serem identificados, nas salivas da maioria dos insetos hematófagos, poderiam tornar-se alvos para o desenvolvimento de imunoprolaxia para interromper a transmissão de parasitas para as células do hospedeiro, além de serem empregados na indústria farmacêutica.

Conclusões

Conclusões

Os experimentos realizados nesse trabalho permitem-nos concluir que:

- As apirases de *T. infestans* são antigenicamente distintas e localizam-se na unidade D2 do seu par de glândula salivar. A unidade D2 foi capaz de inibir completamente agregação plaquetária mostrando que praticamente toda a atividade anti-agregadora de plaquetas, induzida por ADP, do inseto está localizada nesta unidade de sua glândula salivar;
- Os conteúdos salivares de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus* e as frações eluídas da coluna de oligo dT de *R. brethesi* e *R. pictipes* apresentam atividade apirásica estritamente dependentes do íon Ca^{++} , tanto na presença de ATP quanto de ADP;
- Proteínas de 44-45 kDa medeiam as principais atividades apirásicas das salivas de *Rhodnius* spp.;
- Os conteúdos de um par de glândulas salivares de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus* inibiram a agregação de plaquetas, induzida por ADP ou adrenalina, correspondentes a 1,0 mL de sangue. Esta observação evidencia a grande importância de apirases para a hematofagia.

Perspectivas

Perspectivas

As perspectivas deste trabalho são as caracterizações moleculares e funcionais das apirases de *R. brethesi*, *R. milesi*, *R. pictipes* e *R. robustus*. Para isso, as proteínas salivares desses insetos serão separadas em gel bi-dimensional e identificadas por espectrometria de massa. Os resultados serão comparados com transcritos preditos a partir de bibliotecas de cDNA das glândulas salivares. Assim, os genes das apirases poderão ser clonados e expressos em células de insetos e os recombinantes empregados em testes funcionais, como a agregação plaquetária, na presença de diferentes agonistas. Em adição, comparações de características bioquímicas e biofísicas das apirases serão realizadas.

Bibliografia

Bibliografia

Adams, T. S., 1999. Hematophagy and Hormone Release. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.92 (1), p.1-13.

Andersen, J. F., Francischetti, I. M. B., Valenzuela, J. G., Schuck, P. & Ribeiro, J. M. C., 2003. Inhibition of Hemostasis by a High Affinity Biogenic Amine-binding Protein from Saliva of a Blood-feeding Insect. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 4611-4617.

Andrade, B. B., Teixeira, C. R., Baral, A. & Barral, M. N., 2005. Haematophagous Arthropod Saliva and Host Defense System: a Tale of Tear and Blood. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77(4), p. 665-693.

Arca, B., Lombardo, F., Capurro, M. L., Torre, A. D., Dimopoulos, G., James, A. A. & Coluzzi, M., 1999. Trapping cDNAs Encoding Secreted Proteins from the Salivary Glands of the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 1516-1521.

Assumpção, T. C. F., 2003. Identificação e Purificação de PAF-Acetil Hidrolase da Saliva de *Triatoma infestans*. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Barbosa, S. E., Diotaiuti, L., Braga, E. M. & Pereira, M. H., 2004. Variability of the Salivary Proteins of 20 Brazilian Populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Acta Tropica**, v. 92, p. 25-33.

Barreto, A.H., 1920. Notas Entomológicas II: Estudo sobre a Anatomia do Gênero *Triatoma*. Aparelho Salivar. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 15, p. 127-130.

Barth, R. 1954. Estudos Anatômicos e Histológicos sobre a família Triatominae (Heteroptera-Reduviidae). IV parte: Complexo das Glândulas Salivares de *Triatoma infestans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 53, p. 517-585.

Basanova, A. V., Baskova, I. P. & Zavalova, L. L., 2002. Vascular-Platelet and Plasma Hemostasis Regulators from Bloodsucking Animals. **Biochemistry**, v. 67, p.167-176.

Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J, Trauth, N. N., Rowton, E., Ribeiro, J. M. C. & Sacks, D. L., 1998. Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of *Leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 1941-1953.

Bell, J.F., Stewart, S.J & Wikel, S.K., 1979. Resistance to tick-borne Francisella tularensis by tick-sensitized rabbits: allergic klendusity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, p. 876-880.

Bernard, J., Pinet, J. M. & Boistel, J., 1970. Électrophysiologie des Récepteurs des Stylets Maxillaires de *Triatoma infestans* Action de la Température et de la Teneur en Eau de L' air. **J. Insect Physiol.**, v. 16, p. 2157-2180.

Bertin, P. B., Lozzi, S. P., Howell, J. K., Cadavid, G. R., Neves, D., Teixeira, A.R. L., Souza, M. V., Norris, S. J. & Santana. J. M., 2005. The Thermophilic, Hoxohexameric Aminopeptidase of *Borrelia burgdorferi* Is a Member of the M29 Family of Metallopeptidases. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 2253-2261.

Bollag, D.M., Rozycki, M.D. & Edelstein, S.J. 1996. **Protein Methods**. Wiley-Liss, Inc., Second Edition, p.126-128.

Bowman, A. S., Dillwith, J. W. & Sauer, J. R., 1996. Tick Salivary Prostaglandins Presence, Origin and Significance. **Parasitology Today**, v. 12, p. 388-396.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-54.

Brener, Z., 1973. A new aspect f *Trypanosoma cruzi* life-cycle in the invertebrate host. **J. Protozool.**, v.19, p.23-27.

Brener, Z., Andrade, Z. A. & Barral, M. N., 2000. **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara.

Brito, A. C., Williams, P., Fontes, G. & Rocha, E. M., 1997. A comparison of two Brazilian populations of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) from endemic and non-endemic areas to infection with *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92 (1), p. 33-36.

Burmeister, H., 1835. **Handbuch der Entomologie**, Berlin (*Conorhius megistus*) v. 2 (1), p. 400.

Carvalho, R. U., Girón, I. G., Jurberg, J. & Lent, H. 1998. **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.

Chagas, C.,1909. Nova Tripanosomíase Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen.,n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p. 159-218.

Champagne, D. E., Smartt, C. T., Ribeiro, J. M. C & James, A. A., 1995. The Salivary Gland-Specific Apyrase of the Mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5' nucleotidase family. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p. 694-698.

Champagne, D. E., 2004. Antihemostatic Strategies of Blood-Feeding Arthropods. **Current Drug Target-Cardiovascular & Hematological Disorders**, v. 4, p. 375-396.

Charlab, R., Valenzuela, J. G., Rowton, E. D. & Ribeiro, J. M. C., 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **PNAS**, v. 96, p. 15155-15160.

Chen, W. & Guidotti, G., 2001. Soluble Apyrases Release ADP during ATP Hydrolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 90-95.

Coura, J. R., 2005. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara.

Cupp, E.W., Cupp, M.S. & Ramberg, F.B., 1994. Salivary apyrase in African and New World vectors of Plasmodium species and its relationship to malaria transmission. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 50, p. 235-240.

Cupp, E. W. & Cupp, M. S., 1997. Black fly (Díptera:Simuliidae) salivary secretions: importance in vector competence and disease. **J. Med. Entomol.**, v. 34, p. 87-94.

Current Protocols in Molecular Biology 2000. John Wiley & Sons Inc., v.2. p.10.2A.4 - 10.2A.9, New York.

Davey, M. G. & Lander, H., 1964. Effect of adenosine diphosphate on circulating platelets in man. **Nature**, v. 197, p. 1037-1039.

Deghaide, N. H. S., Dantas, R. O. & Donaide, E. A., 1998. HLA Class I and II Profiles of Patients Presenting with Chagas Disease. **Digestive Disease and Science**, v. 43(2), p. 246-252.

De Geer, C., 1773. **Memories pour server a l'histoire des Insectes**. Stokholm (*Cimex rubro-fasciatus*) v. 3, p. 696.

EIMunzer, B. J., Sallach, S. M. & McGuire, D. K., 2004. Cardiac Chagas Disease Masquerading as an Acute Myocardial Infarction. **Cardioly in Review**, v. 12, p.69-72.

Faudry, E., 2003. Polimorfismo das Apirase Salivares de *Triatoma infestans*. **Dissertação de Doutorado**. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Faudry, E., Lozzi, S. P., Santana, J. M., D'Souza-Ault, M., Kieffer, S., Felix, C. R., Ricart, C.A., Sousa, M. V., Vernet, T., Teixeira, A. R. L., 2004a. *Triatoma infestans* apyrase Belong to the 5' nucleotidase Family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 19607-19613.

Faudry, E., Rocha, P. S., Vernet, T., Lozzi, S. P. & Teixeira, A. R. L., 2004b. Kinetics of Expression of the Salivary Apirases in *Triatoma infestans*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 1051-1058.

Feijó, G. C., 2001. Proteínas recombinantes da saliva de *Triatoma infestans*. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Fiske, C. H. & Subbarow, Y. 1925. The Colorimetric Determination of Phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**, v.66, p. 375-400.

Flores, G. & Lazzari, C. R., 1995. The Role of the Antennae in *Triatoma infestans*: Orientation Towards Thermal Sources. **J. Insect Physiol.**, v. 42, p. 433-440.

Flores, G. & Lazzari, C. R., 1996. Thermoreceptive Inputs and Behaviour in *Triatoma infestans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, suplemento.

Francischetti, I. M. B., Ribeiro, J. M. C. & Andersen, J., 2000. Purification, Cloning, Expression and Mechanism of Action of a Novel Platelet Aggregation Inhibitor from the Salivary Gland of the Blood-sucking Bug, *Rhodnius prolixus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 12639-12650

Francischetti, I. M. B., Andersen, J. F. & Ribeiro, J. M. C., 2002. Biochemical and Funcional Characterization of Recombinant *Rhodnius prolixus* Platelet Aggregation Inhibitor 1 is a Novel Lipocalin with High Affinity for Adenosine Diphosphate and Other Adenine Nucleotides. **Biochemistry**, v. 41, p. 3810-3818.

Friend, W. G. & Smith, J. J. B., 1971. Feeding in *Rhodnius prolixus*: Mounthpart Activity and Salivation, and their Correlation with Changes of Electrical Resistance. **J. Insect Physiol.**, v. 17, p. 233-243.

Friend, W. G. & Smith, J. J. B., 1975. Feeding in *Rhodnius prolixus*: Increase Sensitivity to ATP During Prolonged Food Deprivation. **J. Insect Physiol.**, v.21 (5): 1081-1084.

Friend, W. G. & Smith, J. J. B., 1977. Factors Affecting Feeding by Bloodsucking Insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 22, p. 309-31.

Fuentes-Prior, P., Noeske-Jungblut, C., Donner, P., Schleuning, W. D., Huber, R. & Bode, W., 1997. Structure of the Thrombin Complex with Triabin, a Lipocalin-like Exosite-Binding Inhibitor Derived from a Triatomine Bug. **Biochemistry**, v. 94, p. 11845-11850.

Gaunt, M & Miles, M., 2000. The Ecotopes and Evolution Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95(4), p. 557-565.

Gracco, M. & Catalá, S., 2000. Inter-specific and Developmental Differences on the Array of Antennal Chemoreceptors in Four Species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95 (1), p. 67-74.

Guarneri, A. A.; Carvalho, M. G.; Pereira, M. H. & Diotaiuti, L., 2000. Potencial Biológico do *Triatoma brasiliensis*. **Caderno de Saúde Pública**, v.16 (2), p. 101-104.

Harry, M., 1994. Morphometric Variability in the Chagas' Disease Vector *Rhodnius prolixus*. **Jpn. J. Genet.**, v. 69, p. 233-250.

Hellmann, K. & Hawkins, R., 1964. Anticoagulant and Fibrinolytic Activities from *Rhodnius prolixus* STAL. **Nature**, v. 201, p. 1008-1009.

Hellmann, K. & Hawkins, R., 1965. Prolixin-S and Prolixin-G; Two Anticoagulant from *Rhodnius prolixus* STAL. **Nature**, v. 207, p. 265-267.

Heukeshoven, J. & Dernick, R. 1998. Improved Silver Staining Procedure for Fast Staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of Sodium Dodecyl Sulfate Gels. **Electrophoresis**, v. 9 (1), p.28-32.

Kalckar, M. H., 1945. Adenylpyrophosphatase and Myokinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 355-373.

Karczewski, J., Endris, R. & Connolly, T. M., 1994. Disagregin Is a Fibrinogen Receptor Antagonist Lacking the Arg-Gly-Asp Sequence from the Tick, *Ornithodoros moubata*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 6702-6708.

Klug, F., 1834. **Reise um die, in den Jahren 1830, 1831 und 1832 ausgeführt von F. J. F. Meyen**. Teil 1, Berlin, C. W. Eichhoff. (*Reduvius infestans*).

Kollien, A. H. & Schaub, G. A., 2000. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, p. 381-387.

Lacombe, D., 1999. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. **Mem. Int. Oswaldo Cruz**, v. 94 (4), p. 557-564.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227(259), p. 680-685.

Larrousse, F., 1927. Etude biologique et sytematique do genere *Rhodnius* Stal. (Hemiptera Reduviidae). **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 5 (1), p. 63-88.

Law, J. H., Ribeiro, J. M. C. & Wells, M. A., 1992. Biochemical Insights Derived from Insect Diversity. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 81-111.

Lerner, E. A., Ribeiro, J. M. C., Nelson, R. J. & Lerner, M. R., 1991. Isolation of Maxadilan, a Potent Vasodilatory Peptide from the Salivary Glands of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 11234-11236.

Lozzi, S.P. 1999. Caracterização molecular e funcional de proteínas com atividade apirásica da saliva de *Triatoma infestans*. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Macedo, T. C., 1980. Forma indeterminada da Doença de Chagas. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 38, p. 34-40.

Mans, B. J. & Neitz, A. W. H., 2004. Adaptation of Ticks to a Blood-Feeding Environment: Evolution from a Functional Perspective. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 1-17.

Matta, A., 1919. Um novo Redúvido do Amazonas, *Rhodnius brethesi* n. sp.. **Amazonas Médico**, v. 2, p. 93-94.

McManus, L. M. & Pinckard, R. N., 2000. PAF, A Putative Mediator of Oral Inflammation. **Crit. Ver. Oral Biol. Med.**, v. 11(2), p. 240-258.

Meyerhof, O., 1945. The Origin of the Reaction of Harden and Young in Cell-Free Alcoholic Fermentation. **The Journal of Biological Chemistry** , v. 157, p. 105-120.

Molez, J. F., Desenfant, P. & Jacques, J. R., 1998. Bioecology in Haiti of *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 (Diptera: Culicidae). **Bull Soc Pathol Exot.** V. 91(4), p. 334-339.

Montfort, W. R., Weichsel, A. & Andersen, J. F., 2000. Nitrophorins and Related Antihemostatic Lipocalins from *Rhodnius prolixus* and Other Blood-sucking Arthropods. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1482, p. 110-118.

Morris, R. V., Shoemaker, C. B., David, J. R., Lanzaro, G. C. & Titus, R. G., 2001. Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with *Leishmania major* and Vaccinating Against It Protects Against *L. major* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 5226–5230.

Neiva, A., 1911. Contribuição ao estudo dos hematofagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de *Triatoma*. **Brasil Med.**, v. 25, p. 461-462.

Noeske-Jungblut, C., Kratzschmar, J., Haendler, B., Alagon, A., Possani, L., Verhallen, P., Donner, P. & Schleuning, W. D., 1994. An Inhibitor of Collagen-induced Platelet Aggregation from the Saliva of *Triatoma pallidipennis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269 (7), p. 5050-5053.

Noeske-Jungblut, C., Haendler, B., Donner, P., Alagon, A., Possani, L. & Schleuning, W. D., 1995. Triabin, a Highly Potent Exosite Inhibitor of Thrombin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 28629-28634.

Nussenzveig, R. H., Bentley, D. L. & Ribeiro, J.M., 1995. Nitric Oxide Loading of the Salivary Nitric-Oxide-Carrying Hemoproteins (Nitrophorins) in the Blood-Sucking Bug *Rhodnius prolixus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1093-1098.

Oliveira, A. G., Falcão A., L. & Brazil, R. P., 2000. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.34, p. 654-655.

Okamura, S., Crane, F. Messner, H. A. & Mak, T. W., 1978. Purification of Terminal Deoxynucleotidyltransferase by Oligonucleotide Affinity Chromatography. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 3765-3767.

Pereira, H. H., Souza, M. E. L., Vargas, A. P., Martins, M. S., Penido, C.M. & Diotaiuti, L., 1996. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva. **Acta Tropica**, v. 61, p. 255-261.

Prata, A., 2001. Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 92-100.

Qureshi, A. A., Asahina, A., Ohnuma, M. T., Granstein, R. D. & Lerner, E. A., 1996. Immunomodulatory Properties of Maxidilan, The Vasodilator Peptide From Sand Fly Salivary Gland Extracts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54 (6), p. 665-671.

Rebêlo, J. M. M., Barros, V. L. P. & Mendes, W. A., 1998. Espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) do Estado do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 14 (1), p. 187-192.

Reis, M. M., Meirelles, R. M. S. & Soares, M. J., 2003. Fine Structure of the Salivary Glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Tissue & Cell**, v. 35, p. 393-400.

Ribeiro, J. M. C. & Garcia, E. S., 1980. The salivary and Crop Apyrase Activity of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 26, p. 303-307.

Ribeiro, J. M. C. & Garcia, E. S., 1981. The role of the Salivary Glands in Feeding in *Rhodnius prolixus*. **J. Exp. Biol.**, v. 94, p. 219-230.

Ribeiro, J. M. C., Sarkis, J. J. F., Rossignol, P. A. & Spielman, A., 1984. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: Characterization and Secretory fate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 79 (1), p. 81-86.

Ribeiro, J. M. C., 1987. Role of Saliva in Blood- Feeding by Arthropods. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 32, p. 463-478.

Ribeiro, J.M., Modi, G. B. & Tesh, R. B., 1989. Salivary apyrase Activity of Some Old World Phlebotomine Sand Flies. **Insect Biochemistry**, v. 19 (4), p. 409-412.

Ribeiro, J. M. C., 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?. **Infect. Agents Disease**, v. 4 (3), p. 143-152.

Ribeiro, J. M. C., Schneider, M. & Guimarães, J. A., 1995. Purification and Characterization of Prolixin S (Nitrophorin 2), the Salivary Anticoagulant of the Blood-sucking Bug *Rhodnius prolixus*. **Biochemical Journal**, v. 308, p. 243-249.

Ribeiro, J. M. C., 1996. Salivary Thiol Oxidase Activity of *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem. Molecular Biol.**, v. 26, p. 899-905.

Ribeiro, J. M. C., Schneider, M., Isaias, T., Jurberg, J., Galvão, C. & Guimarães, J. A., 1998. Role of Salivary Antihemostatic Components in Blood Feeding by Triatomine Bugs (Heteroptera). **J. Med. Entomol.**, v. 35 (4), p. 599-610.

Ribeiro, J. M. C., Rowton, E. D. & Charlab, R., 2000. The salivary 5-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagous sand lutzomyia fly, *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 279–285.

Ribeiro, J. M. C. & Francisschetti, I. M. B., 2001. Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 3887-3894.

Ribeiro, J. M. C. & Francisschetti, M. B., 2003. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 48, p. 73-88.

Rocha, D. S., Santos, C. M., Cunha, V., Jurberg, J. & Galvão, C., 2004. Ciclo Biológico em Laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), Potencial Vetor Silvestre da Doença de Chagas na Amazônia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99 (6), p. 591-595.

Santana, J. M., Grellier, P., Rodier, M-H., Schrevel, J. & Teixeira, A. R. L., 1992. Purification and Characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.187, p. 1466-1473.

Sant Anna, M. R. V., Araújo, J. G. V. C., Pereira, M. H., Pesquero, J. L., Diotaiuti, L., Lehane, S. M. & Lehane, M. J., 2002. Molecular cloning and sequencing of salivary gland-specific cDNAs of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Molecular Biology** , v. 11, p. 585-593.

Sarkis, J. J. F., Guimarães, J. A. & Ribeiro, J. M. C., 1986. Salivary Apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and Purification. **Biochem. J.**, v. 233, p. 885-891.

Serrão, M. L., Labarthe, N. & Oliveira, R. L., 2001. Vectorial Competence of *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) Rio de Janeiro Strain, to *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96 (5), p. 593-598.

Sevigny, J., Picher, M., Grondin, G. & Beaudoin, A. R., 1997. Purification and Immunohistochemical localization of the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 272, p. 939-950.

Silva, I.G., 1985. A influência da temperatura na biologia dos triatomíneos. I- *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1943) (Hemíptera Reduviidae). **Rev. Goiana Méd.**

Silva, M. B. A., Jurberg, J., Barbosa, H. S., Rocha, D. S., Carvalho, R. U. & Galvão, C., 2005. Morfologia comparada dos ovos e ninfas de *Triatoma vandae* Carvalho, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau & Lent, 2002 e *Triatoma williami* Galvão, Souza & Lima, 1965 (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100 (5), p. 649-661.

Smartt, C. T., Kim, A. P., Grossman, G. L. & James, A. A., 1995. The Apyrase Gene of the Vector Mosquito, *Aedes aegypti*, Is Expressed Specifically in the Adult Female Salivary Glands. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 239-248.

Smith, J. J. B., Cornish, R. A. & Wilkes, J., 1980. Properties of calcium-dependent apyrase in the saliva of blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. **Experientia**, v. 36, p. 898-900.

Soares, R. P. P., Santana, M. R. V., Gontijo, N. F., Romanha, A. J., Diotaiuti, L & Pereira, M. H., 2000. Identification of Morphologically Similar *Rhodnius* Species

(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by Electrophoresis of Salivary Heme Proteins. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62(1), p. 157-161.

Stal, C., 1859. Monographie der Gattung Conorhius and Verwandten. **Berliner Ent. Zeitschr**, v. 3, p. 99-117.

Stal, C., 1872. Enumeratio Hemipterorum, II. K. **Svenska Vetensk. Akad. Handl.**, v.10, p. 110-112.

Stark, K. R. & James, A. A., 1995. A Factor Xa-Directed Anticoagulant from the Salivary Glands of the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 321-331.

Stark, K. R. & James, A. A., 1996. Anticoagulants in Vector Arthropods. **Parasitology Today**, v. 12, p. 430-437.

Stark, K. R. & James, A. A., 1998. Isolation and Characterization of the Gene Encoding a Novel Factor Xa-directed Anticoagulant from the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 20802-20809.

Tanowitz, H. B., Kicrhoff, L. V., Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M. & Wittner, M., 1992. Chagas' Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 400-419.

Taylor, M.L., Misso, N.L., Stewart, G.A. & Thompson, P. J., 1992. . The Effects of Varying Doses of Aspirin on Human Platelet Activation Induced by PAF, Collagen and Arachidonic acid. **Br. Journal Clinical Pharmacol.**, v. 33 (1), p. 25-31.

Teixeira, A. R. L., Monteiro, P. S., Rebelo, J. M., Argañaraz, E. R., Vieira, D., Pires, L. L., Nascimento, R., Vexenat, C. A., Silva, A. R., Ault, S. K. & Costa, J. M., 2001. Emerging Chagas Disease: Trophic Network and Cycle of Transmission of

Trypanosoma cruzi from Palm Trees in the Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 100-112.

Traverso-Cori, A., Chaimovich, H. and Cori, O., 1965. Kinetic studies and properties of potato apyrase. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 109, p. 173–184.

Trimnell, A. R., Hails, R.S. & Nuttall, P.A., 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. **Vaccine**, v. 20, p. 3560-3568.

Tsuda, A., Mulenga, A., Sugimoto, C., Nakajima, M., Ohashi, K. & Onuma, M., 2001. cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. **Vaccine**, v. 19, p. 4287-4296.

Valente, V. C., 2005. Ciclo evolutivo experimental e perfil epidemiológico do *Rhodnius milesi*, uma nova espécie de triatomíneo escrita no estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**, v. 38, p. 85-86.

Valenzuela, J. G., Guimarães, J. A. & Ribeiro, J. M. C., 1996a. A novel Inhibitor of Factor X Activation from the Salivary Glands of the Bed Bug *Cimex lectularius*. **Experimental Parasitology**, v. 83, p. 184-190.

Valenzuela, J. G., Chuffe, O. M. & Ribeiro, J. M. C., 1996b. Apyrase and Anti-Platelet Activities from the Salivary Glands of the Bed Bug *Cimex lectularius*. **Insect Biochem. Molec.**, v. 21, p. 557-562.

Valenzuela, J. G. & Ribeiro, J. M. C., 1998. Purification and cloning of the Salivary Nitrophorin from the Hemipteran *Cimex lectularius*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 2659-2664.

Valenzuela, J. G., Charlab, R., Galperin, M. Y. & Ribeiro, J. M. C., 1998. Purification, Cloning, and Expression of an Apyrase from the Bed Bug *Cimex*

lectularius. A New Type of Nucleotide-Binding Enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 30583-30590.

Valenzuela, J. G., Francischetti, I. M. B. & Ribeiro, J. M. C., 1999. Purification, Cloning, and Synthesis of a Novel Salivary Anti-thrombin from the Mosquito *Anopheles albimanus*. **Biochemistry**, v. 38, p. 11209-11215.

Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Rowton, E. & Ribeiro, J.M., 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 229-237.

Valenzuela, J. G., 2002. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1199-1209

Valenzuela, J. G., Garfield, M., Rowton, E. D. & Pham, V. M., 2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. **The Journal Experimental Biology**, v. 207, p. 3717-3729.

Vasconcelos, E. G., Ferreira, S. T., Carvalho, T. M.U., Souza, W, Kettluni, A. M., Mancillai, M., Valenzuelai, M. A. & Verjovski, S. A., 1996. Partial Purification and Immunohistochemical Localization of ATP Diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 22139-22145.

Walker, F. A. & Montfort, W. R., 2001. The nitric Oxide-Releasing Heme Proteins from the Saliva of the Blood-Sucking Insect *Rhodnius Prolixus*. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 295-358.

Walker, F. A., 2005. Nitric Oxide Interaction With Insect Nitrophorins and Thoughts on The Electron Configuration of the {FeNO}⁶ Complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 216-236.

Wang, X., Coons, L. B., Taylor, D. B., Stevens, S. E. J. & Gartner, T. K., 1996. Variabilin, a Novel RGD-Containing Antagonist of Glycoprotein IIb-IIIa and Platelet Aggregation Inhibitor from the Hard Tick *Dermacentor variabilis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271 (30), p. 17785–17790.

Waxman, L. & Connolly, T. M., 1993. Isolation of an Inhibitor Selective for Collagen-stimulated Platelet Aggregation from the Soft Tick *Ornithodoros moubata*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 5445-5449.

Wigglesworth, V. B. & Gillet., J. D., 1934. The function of the Antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the Mechanism of Orientation to the host. **J. Exp. Biol.**, p. 120-139.

World Bank, 1993. World Development Report. Investing in Health. **Oxford University Press**, New York, p. 1-344.

World Health Organization, 1997. Chagas disease. Interruption of transmission. **Weekly Epidemiological Record**, v.72, p.1-8.

World Health Organization, 2000. Chagas disease, Brazil. Interruption of transmission. **Weekly Epidemiological Record**, v. 75, p. 153-160.

World Health Organization, 2002. Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva. **WHO Technical Report Series**, v. 905, p. 1-120.

Yagi, K., Shinbo, M., Hashizume, M., Shimba, L. S., Kurimura, S. & Miura, Y., 1991 ATP Diphosphohydrolase is Responsible for Ecto-ATPase and Ecto-ADPase

Activities in Bovine Aorta Endothelial and Smooth Muscle Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 180 (3), p. 1200-1206.

Yagi, K., Kato, N., Shinbo, M., Shimba, L. S. & Miura, Y., 1992. Purification and Characterization of Adenosine Diphosphatase from Human Umbilical Vessels. **Chem. Pharm. Bull**, v. 40, p. 2143-2146.

Yuda, M., Higuchi, K., Sun, J., Kureishi, Y., Ito, M. & Chinzei, Y., 1997. Expression, Reconstitution and Characterization of Prolixin-S as a Vasodilator. A Salivary Gland Nitric-Oxide-Binding Hemoprotein of *Rhodnius prolixus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 249, p. 337-342.

Zhang, Y., Ribeiro, J. M. C., Guimarães, J. A. & Walsh, P. N., 1998. Nitrophorin-2: A Novel Mixed-Type Reversible Specific Inhibitor of the Intrinsic Factor-X Activating Complex. **Biochemistry**, v. 37, p. 10681-10690.