



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular  
Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas

## **Identificação, clonagem e seqüenciamento de proteína-quinases na saliva de *Triatoma infestans***

Aluno: **Ciro Davi Cordeiro**  
Orientador: **Prof. Antônio R. L. C. Teixeira**  
Co-orientadora: **Dra. Mariana M. Hecht**

Brasília – DF

2011

**Ciro Davi Cordeiro**

**Identificação, clonagem e seqüenciamento de proteína-  
quinases na saliva de *Triatoma infestans***

Dissertação apresentada como requisito à  
obtenção do grau Mestre em Patologia  
Molecular, Programa de Pós-graduação  
em Patologia Molecular, Universidade de  
Brasília.

Orientador: Prof. Antônio R. L. C. Teixeira  
Co-orientadora: Dra. Mariana M. Hecht

Brasília – DF

2011

Trabalho realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas pelo programa de pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Financiamento: CNPq e Capes

Dedico este trabalho aos meus pais, Davi e Olímpia, pelo apoio em todos os momentos, pelo estímulo à carreira acadêmica, por terem me ensinado o valor do conhecimento e pela dedicação à família.

## Agradecimentos

Ao professor **Antônio Teixeira** por ter me aceitado como aluno, ter acreditado no meu potencial e por instigar a busca pelo conhecimento.

À Dra **Mariana Hecht** pela orientação, trocas de idéias e ajuda na elaboração e execução de experimentos ao longo destes dois anos.

À Professora **Nadjar Nitz** pela presença e disposição em ajudar em questões teóricas e metodológicas.

A todos os colegas do LMPDC pela ajuda nos experimentos, amizade e apoio que ajudaram nos momentos difíceis e me estimularam a continuar. Vocês tornaram a pesquisa mais agradável e sou muito grato por terem feito parte da minha vida: **Adriana Benevides, Adriano Reis, Ana Cláudia, Ana de Cásssia, Bruno Lacerda, Eduardo Leonardecz, Ester Rose, Perla Fabíola, Rozeneide Alves**. Em especial agradeço **Alessandro Sousa, Fernando Pimentel, Luciana Hagström** e **Maria Carolina** pelas piadas, conselhos e críticas.

Aos nossos ex-colegas de laboratório **Geraldo da Silva** e **Miguel Santos** pelo apoio técnico com os equipamentos e pela ajuda prestada em inúmeras situações do cotidiano da pesquisa.

Aos membros do Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro por terem me recebido de braços abertos e colaborado com a pesquisa. Em especial ao professor **Jaime Santana**, professora **Isabela Bastos, Keyla Almeida** e **Flávia Motta**, que estiveram sempre dispostos a tirar dúvidas e elaborar experimentos.

Às veterinárias **Gabriela** e **Raquel** pela dedicação e ajuda no cuidado com os animais.

Ao prof. **Rodrigo Gurgel** pela doação de barbeiros utilizados na pesquisa.

Aos meus irmãos pelos conselhos e pelo apoio aos meus estudos.

## Lista de Abreviaturas

A	Adenina
ABP	<i>Amine Binding Protein</i>
ADP	Adenosina Difosfato
AK	Arginina quinase
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
G	Guanina
IPTG	Isopropil-11-tio- $\beta$ -D-galactpiranosídeo
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NDK	Nucleosídeo difosfato quinase
PB	Pares de base
Pi	Fosfato inorgânico
RNA	Ácido ribonucléico
RPAI	<i>Rhodnius prolixus aggregation inhibitor</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
T	Timina
U	Uracila
X-gal	5-bromo-4-cloro-4-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## Abreviatura dos Aminoácidos

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histamina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

# Índice

<b>1- INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 A evolução dos seres vivos e os artrópodes	1
1.2 O Mundo dos insetos	2
1.3 Características e evolução dos insetos	2
1.4 O desenvolvimento dos insetos	3
1.5 Ordem Hemiptera e a família Reduviidae	4
1.5.1 Interesse científico na saliva dos reduvídeos	5
1.6 Triatomíneos	5
1.7 Parasitismo e a hematofagia	7
1.8 Evolução dos triatomíneos	8
1.9 Importância epidemiológica dos triatomíneos	9
1.10 Os triatomíneos e o ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.11 Interação parasito-hospedeiro e a transferência gênica	12
1.12 Aplicações na pesquisa científica	12
1.13 <i>Triatoma infestans</i>	13
1.14 Composição da saliva de triatomíneos e respostas do hospedeiro	13
1.14.1 Lipocalinas	15
1.14.2 Apirases	16
1.14.3 Peptídeos com domínios Kazal	16
1.14.4 Proteínas da família antígeno-5	17
1.14.5 OBPs	18
1.14.6 Trialisina e Triapsina	18
1.14.7 Serpinas	18
1.14.8 Família Inositol fosfatase	19
1.14.9 Defensinas	19
1.14.10 Proteínas com domínios de hemolisina	19
1.14.11 Triatox	20
1.14.12 Quinases	20
1.15 Arginina Quinase	21
<b>2- OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
3.1 Colônia de barbeiros	24
3.2 Extração de glândulas salivares e mRNA	24
3.3 Coleta de saliva	26
3.4 Síntese de DNA complementar	27
3.5 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	27
3.6 Eletroforese em Agarose	28
3.7 Clonagem e transformação	29
3.8 Extração plasmidial	29
3.9 Seqüenciamento	29
3.10 Expressão	30
3.11 Digestão enzimática	30



3.12 Clonagem em Vetor de expressão	31
3.13 PCR de colônia	31
3.14 Expressão de proteína recombinante	32
3.15 Purificação por cromatografia de afinidade	32
3.16 Digestão peptídica com a trombina	32
3.17 Quantificação de proteínas	33
3.18 Imunização de coelhos	33
3.19 Eletroforese Vertical e Western blot	33
<b>4- RESULTADOS</b>	<b>35</b>
4.1 Identificação de genes de quinases na glândula salivar de <i>T. infestans</i>	35
4.2 Clonagem em vetor de expressão e seqüenciamento	39
4.3 Expressão e purificação de arginina quinase	39
4.4 Identificação de arginina quinase na saliva de <i>T. infestans</i>	41
<b>5- DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
5.1 Arginina quinase	45
5.1.1 Papel Alergênico da arginina quinase	48
5.2 Nucleosídeo difosfato quinase	49
<b>6- CONCLUSÃO</b>	<b>52</b>
<b>7- PERSPECTIVAS</b>	<b>53</b>
<b>8- REFERÊNCIAS</b>	<b>54</b>

## Resumo

Os triatomíneos são insetos hematófagos transmissores da doença de Chagas ao homem. Durante a picada, injetam saliva que contém moléculas com ações fisiológicas diversas. O estudo destas moléculas tem ajudado a elucidar como os insetos inibem mecanismos de defesa do hospedeiro em seu favor. Além disso, a caracterização dos componentes salivares pode produzir conhecimento útil para produção de novas drogas. Encontrou-se recentemente evidências de que existem quinases na saliva de Triatomíneos. Neste estudo, foram identificadas e seqüenciadas regiões codificadoras de arginina quinase (AK) e nucleosídeo difosfato quinase da glândula salivar de *Triatoma infestans*. A AK foi clonada, expressa em bactéria e utilizada em imunização para produção de anticorpos específicos. Ensaio de *Western blot* permitiram confirmar a presença de AK na saliva de *T. infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus*, na forma de dímeros. Em contrapartida, identificou-se AK monomérica na glândula salivar. A enzima tem potencial alergênico que pode contribuir para reações de hipersensibilidade causada pela picada de triatomíneos. Ainda não se sabe se a AK exerce papel funcional na hematofagia, mas a diferença entre a proteína citosólica e secretada indica que pode haver valor adaptativo para os dímeros de AK salivar.

## Abstract

Triatomines are haematophagous insects that transmit Chagas' disease to human populations. During blood feeding, they inject saliva composed of physiologically active molecules. The research of saliva's molecules provided better understanding of insect's adaptations to inhibit host's defenses mechanisms. Besides, molecular characterization may provide useful knowledge to new drugs development. Recent evidences indicated the possibility that kinases could be secreted by triatomine's salivary glands. This research identified and sequenced coding regions of arginine kinase (AK) and nucleoside diphosphate kinase from salivary glands of *Triatoma infestans*. AK was cloned, expressed on bacteria and used in immunizations to specific antibody production. Through western blot assays we confirmed dimeric AK secretion in saliva of *T. infestans*, *Panstrongylus megistus* and *Rhodnius neglectus*. However, monomeric AK was identified on the salivary glands. The enzyme is a potential allergenic that could contribute to hypersensitivity reactions associated to triatomines' bites. Although the role of AK in haematophagy is still unknown, the difference observed between the cytosolic and secreted AKs indicates that the dimeric AK in saliva may have an adaptive value to the bug.

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1 A evolução dos seres vivos e os artrópodes

A teoria da evolução das espécies é unificadora da biologia moderna. A evolução é aqui definida como alteração nas frequências gênicas de uma população. Dois princípios básicos regem a evolução: seleção natural e deriva genética. A primeira é a tendência de sobrevivência dos organismos mais adaptados às condições a que estão expostos. O aumento da complexidade da vida é produto da seleção natural. Já a segunda consiste na alteração da frequência gênica por eventos estocásticos que selecionam genes independentemente do seu valor adaptativo. Por exemplo, catástrofes naturais como erupção vulcânica ou queda de um meteorito podem eliminar parte considerável de uma população resultando em eventos de deriva genética (Futuyma, 2005).

Nos últimos 3,8 bilhões de anos a Terra tem acumulado matéria organizada em formas autorreplicantes (Chang, 1999). Inicialmente, havia apenas moléculas replicadoras. Elas foram selecionadas pela capacidade de perpetuação e evoluíram para estruturas mais complexas que ao longo de milhões de anos deram origem aos seres vivos (Dawkins, 1976).

Provavelmente, os primeiros replicadores foram pequenos RNAs que interagem com proteínas primitivas. Com o passar do tempo, o DNA assumiu o papel de armazenar informação genética e os fosfolipídios deram origem às membranas envoltórias. Destas interações entre diferentes moléculas orgânicas surgiram as primeiras células procarióticas, há aproximadamente 3,5 bilhões de anos. Cerca de 1,5 bilhões de anos foram necessários para evolução das células eucarióticas com núcleo, citoesqueleto e organelas. Então, passaram-se cerca de um bilhão de anos até que surgissem os primeiros organismos multicelulares que deram origem aos fungos, animais e plantas (Futuyma, 2005).

Animais são organismos multicelulares heterotróficos que existem há pelo menos 650 milhões de anos (Futuyma, 2005). Deste reino, foram diferenciados os artrópodes por volta de 550 milhões de anos atrás, durante a explosão cambriana. Os artrópodes diversificaram-se e hoje formam o maior grupo de animais. Duas características marcantes dos artrópodes são exoesqueleto rígido de quitina e apêndices articulados, que asseguram mobilidade e capacidade de sobrevivência.

Registros indicam que estes artrópodes primitivos apresentavam corpo com mais segmentos e apêndices repetitivos pouco diferenciados. A história evolutiva do grupo mostra uma tendência à diminuição da quantidade de apêndices e especialização dos mesmos (Ruppert & Barnes, 2005a).

## **1.2 O Mundo dos insetos**

O ecólogo Robert May uma vez disse: “Em uma boa aproximação, todas as espécies são insetos” (Dawkins, 1976). Estima-se que já foram descritas 1,9 milhão de espécies vivas, das quais, quase um milhão são insetos (Chapman, 2009). Os insetos são encontrados em praticamente todos os ambientes terrestres. Biólogos se perguntam há muito tempo por que existem tantos insetos. O que eles têm de especial que os tornou tão bem-sucedidos? Existem evidências que nos permitem inferir sobre o que os levou ao sucesso atual? As possíveis respostas para esta questão serão discutidas a seguir.

## **1.3 Características e evolução dos insetos**

Espécies da classe Insecta apresentam três pares de patas, dois pares de asas, um par de antenas e um par de olhos compostos. Nenhum outro grupo de invertebrados desenvolveu asas, fazendo desta uma autapomorfia do grupo. Não obstante as grandes variações morfológicas, o plano corporal dos insetos é o mesmo: possuem corpo dividido anatomicamente em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça estão as antenas, os olhos, e geralmente possuem três ocelos, que têm função exclusiva de detecção de intensidade luminosa (Ruppert & Barnes, 2005b). A cabeça tem órgãos sensoriais e estruturas ligadas à alimentação. O tórax está relacionado à locomoção: asas e patas articuladas ligam-se ao tórax. O abdome participa da respiração, digestão, excreção, gametogênese, e cópula. Não possui apêndices, com exceção de cercos sensoriais (Grimaldi & Engel, 2005a).

Algumas características da maioria dos insetos ajudam explicar seu enorme sucesso. A cutícula composta de quitina forma o exoesqueleto, importante para sustentação, proteção e locomoção. Além disso, a cutícula protege contra raios ultravioleta e ajuda a evitar dessecação, facilitando assim a sobrevivência em

ambientes inóspitos (Grimaldi & Engel, 2005a). Os ovos também são resistentes a condições adversas. As trocas gasosas são feitas por sistema de traquéias bastante eficiente, que eliminam a necessidade de pigmentos respiratórios. Existe o estágio larval possibilitando, na fase jovem, a exploração de nichos distintos da fase adulta. O dobramento das asas sobre o corpo também contribuiu para que pudessem explorar diferentes ambientes quando não estivessem voando (Ruppert & Barnes, 2005b). O tamanho reduzido dos insetos também traz vantagens: possibilita aproveitar pequenas fontes alimentares e um alto potencial reprodutivo. A aquisição de asas foi decisiva para o sucesso dos insetos, facilitando a dispersão e colonização de novos habitats, além de facilitar a fuga quando ameaçados por predadores. Ciclos de vida curtos e elevada produção de ovos ajudam na adaptabilidade ou plasticidade evolutiva crucial para o sucesso dos insetos (Gillot, 2005a).

Angiospermas formam a divisão mais diversificada de plantas terrestres. Durante o período Cretáceo, as angiospermas espalharam-se e começaram a predominar em relação às gimnospermas, alterando o panorama global de vegetais superiores e, conseqüentemente, toda a cadeia trófica. O imenso sucesso obtido foi possível devido à associação com animais, a qual trouxe enormes vantagens evolutivas para ambos (Axelrod, 1952). Os insetos tiveram papel crucial para evolução das angiospermas. Surgiram várias formas de mutualismo entre os dois grupos que contribuíram para que os insetos se tornassem tão numerosos e diversos (Bronstein e cols, 2006). Existem evidências de que as ordens da classe Insecta originaram-se durante o período Carbonífero, há 300 milhões de anos, quando ocorreu uma diversificação dos insetos primitivos. Contudo, as ordens predominantes tiveram radiação adaptativa concomitante à evolução de angiospermas (Gillot, 2005b).

#### **1.4 O desenvolvimento dos insetos**

Após a eclosão do ovo, existem três tipos principais de desenvolvimento nos insetos. Os estágios do desenvolvimento (instares) terminam com mudas ou ecdises, quando o inseto troca o exoesqueleto podendo crescer em tamanho. O desenvolvimento ametábolo ocorre em grupos mais primitivos que não realizam

metamorfose, ou seja, há poucas mudanças morfológicas entre a fase jovem e adulta. Eles apenas crescem em tamanho com possibilidade de variação no número de ínstaes. Na hemimetabolia ocorre uma metamorfose gradual ou incompleta com número fixo de ínstaes. As formas juvenis, chamadas ninfas, podem ser distinguidas dos adultos pela ausência de asas funcionais. Já na holometabolia o inseto apresenta forma larval e realiza uma metamorfose completa, com estágio de pupa. As larvas são completamente diferentes dos adultos, sem nenhum sinal externo da estrutura em que se desenvolverão as asas. Algumas espécies têm mais de uma forma larval, fazem a hipermetamorfose (Gillot, 2005c).

### **1.5 Ordem Hemiptera e a família Reduviidae**

Hemiptera foi umas das ordens de insetos que se diversificou concomitantemente às angiospermas. É o grupo mais diverso de insetos hemimetábolos. Hemípteros são opistognatos, isto é, apresentam o aparato bucal em posição ventral orientado em direção à traseira do inseto. Uma autapomorfia do táxon é o aparato bucal em que o rostro forma um bico sugador (probóscide), de onde saem dois pares de estiletes longos e finos que se movimentam para frente e para trás perfurando o alimento. A saliva é injetada por um canal enquanto o alimento líquido é sugado por outro, por meio de pressão exercida por músculos localizados na cabeça (Grimaldi & Engel, 2005b).

A família Reduviidae é formada por mais de 6.600 espécies catalogadas. Estão distribuídos por todo globo, principalmente nos trópicos. Possuem hábitos de vida variados e a grande maioria das espécies é predadora de outros invertebrados. Frequentemente apresentam especialização alimentar. Problemas de cladística mostram que ainda há muito a estudar sobre estes insetos: os autores divergem na classificação das subfamílias, cujo número varia entre 21 e 32 (Weirauch, 2008). Existem alguns poucos reduvídeos fitófagos que usam sua probóscide (aparato sugador) para sugar líquidos de origem vegetal. Enquanto dieta carnívora é ancestral nos reduvídeos, a herbivoria é uma característica derivada (Bérenger & Pluot-Sigwalt, 1997), assim como a hematofagia (Patterson & Gaunt, 2010).

### 1.5.1 Interesse científico na saliva dos reduvídeos

Os reduvídeos sugam o alimento através da sua probóscide, ao mesmo tempo em que injetam saliva na presa ou hospedeiro. Como possuem especialização alimentar que evoluiu durante milhões de anos, a composição da saliva varia de acordo com o tipo de alimentação. Entre mais de 19.000 espécies de artrópodes hematófagos, apenas poucas tiveram a saliva estudada. Em geral, todas apresentam pelo menos um anticoagulante, um vasodilatador e um anti-agregador de plaquetas. Estima-se que pelo menos metade das proteínas secretadas pelas glândulas salivares não possuem função conhecida (Ribeiro & Francischetti, 2003). Na saliva, são encontradas moléculas que têm propriedades bioquímicas com potencial para diversas aplicações biotecnológicas. Por exemplo, reduvídeos predadores usam toxinas salivares para paralisar suas presas. Concomitantemente, injetam agentes difusores e enzimas digestivas para facilitar ingestão e absorção de alimentos (Edwards, 1961). Além disso, moléculas bactericidas também foram encontradas em saliva de diferentes espécies (Sahayaraj e cols, 2006). O potencial destas moléculas pode ser grande e interessa tanto para compreensão da biologia do animal quanto para uso em pesquisa e desenvolvimento de novas drogas.

### 1.6 Triatomíneos

Conhecidos popularmente como barbeiros, o nome científico do grupo veio de um engano cometido por Laporte durante a primeira descrição feita do gênero *Triatoma* em 1832, na qual o autor utilizou como modelo um espécime cujas antenas estavam quebradas, não exibindo todos os segmentos. *Triatoma* significa três segmentos. Posteriormente o próprio autor tentou mudar o nome para corrigir o erro, mas o primeiro teve prioridade e tornou-se o padrão. À medida que novas espécies eram descritas, o grupo aumentou e, em 1939, Usinger deu nome de *Triatominae* à subfamília de reduvídeos, em referência ao primeiro gênero descrito. Atualmente são conhecidas 140 espécies classificadas em cinco tribos e 15 gêneros (Schofield & Galvao, 2009).

Características morfológicas que distinguem triatomíneos de outros reduvídeos não são evidentes. Ainda não há regra geral para identificação da



subfamília. Até mesmo especialistas já se confundiram e classificaram espécies erroneamente. Vários autores definem triatomíneos como reduvídeos hematófagos, embora existam algumas exceções a essa regra: alguns reduvídeos são hematófagos facultativos, mas não praticam a hematofagia com tanta eficiência quanto os triatomíneos. Por outro lado, certos triatomíneos podem ter comportamento predatório, se alimentando de hemolinfa de invertebrados. Curiosamente, eles podem também sugar sangue do intestino de outros insetos hematófagos, hábito chamado de cleptohematofagia (Schofield & Galvao, 2009). Sandoval e cols (2010) sugerem que triatomíneos são predadores que adaptaram formas mais eficientes de sugar hemolinfa ou sangue com mínimo dano ao hospedeiro.

Triatomíneos são bastante resistentes às variações de temperatura, condição que permitiu colonizarem tanto regiões quentes, como a caatinga, quanto locais frios nos Andes e na Argentina (Figura 1). O repasto é demorado em relação a outros insetos hematófagos e ocorre, com maior frequência, no período noturno. Podem sugar até 10 vezes o próprio peso em sangue, gerando uma pressão interna que força o inseto a defecar durante ou logo após a alimentação. São atraídos para a presa por detecção de CO<sub>2</sub> e, por isso, preferem picar o rosto, principalmente de crianças cuja pele lisa e delicada facilita a localização de vasos. Quando bem alimentados, mostram seu potencial reprodutivo podendo colocar centenas de ovos, que levam entre 15 e 30 dias para eclodir (Marcondes, 2001).

A maior diversidade de triatomíneos é observada no continente americano (14 gêneros), mas eles também são encontrados do oeste asiático ao norte da Austrália (Lent & Wygodzinsky, 1979). As espécies mais difundidas e importantes do ponto de vista epidemiológico são *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, *Triatoma pseudomaculata*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Marcondes, 2001).



**Figura 1.** Distribuição geográfica original de *Triatoma infestans* na América do Sul. Esta espécie estende-se por ampla área do continente, o que mostra que pode sobreviver sob diferentes condições climáticas. Fonte: Schofield e cols, 2006.

### **1.7 Parasitismo e a hematofagia**

Parasitismo é uma estratégia comum e bem-sucedida. Essa afirmação é sugerida pela enorme convergência evolutiva descrita em diferentes grupos e pela diversidade de parasitos existentes nos ecossistemas (mais de 100.000 espécies descritas). Parasitos são encontrados em todos os ecossistemas conhecidos (Marcogliese, 2005). O conceito clássico de parasitismo implica em uma relação íntima entre duas espécies onde uma é prejudicada e a outra beneficiada. Burnet e White (1972) definem como parasitas organismos menores e menos diferenciados que os hospedeiros, e que vivem na pele, tecidos ou cavidades e obtêm sua nutrição à custa das substâncias vitais do hospedeiro. Contudo, eles admitem que há dificuldades de classificação de vários casos. A definição clássica é incompleta.

O entendimento dos fenômenos naturais tem sido dificultado pela visão ecológica imediatista ou por conceitos antropocêntricos. Diante de aparente relação desarmônica pode-se encontrar aspectos vantajosos para ambos. Então, sob perspectiva evolutiva, é difícil dizer que tipo de relação pode ou não ser prejudicial. Existe a possibilidade do parasita prejudicar e beneficiar o hospedeiro, e, numa relação desse tipo, o custo/benefício pode ficar indeterminado. Araújo e colaboradores (2003) definem o parasitismo como um fenômeno ecológico em que um ser vivo tem seu nicho ecológico em outro organismo. Comensalismo, mutualismo e simbiose são diferentes formas de parasitismo.

A hematofagia consiste em nutrir-se de sangue. É uma forma de parasitismo presente em invertebrados e vertebrados. Acredita-se que o contato íntimo entre ectoparasitos e hospedeiros propiciou aos primeiros desenvolver peças bucais aperfeiçoadas para perfuração de vasos e sucção do sangue. A hematofagia tem sido estudada, particularmente, porque está associada a microorganismos que produzem doenças de interesse médico e veterinário. O difícil combate às doenças transmitidas por insetos hematófagos depende da aquisição de conhecimentos sobre os mecanismos que sustentam o ciclo de vida desses animais (Marcondes, 2001).

Os artrópodes sugam sangue de duas maneiras. A solenofagia é a sucção diretamente de um capilar, como no caso dos triatomíneos. A telmofagia consiste em sugar de uma poça de sangue extravasado no tecido subcutâneo depois que o inseto rompe vasos sanguíneos, como fazem os tabanídeos (Marcondes, 2001).

Triatomíneos localizam vasos sanguíneos avaliando descontinuidades na temperatura epitelial (Ferreira e cols, 2007). Fazem sondagem intradérmica com seus afiados estiletes, enquanto começam a liberar saliva no local. Ao perfurar o vaso, sugam o sangue. O processo completo pode levar alguns minutos, mas um lauto repasto pode demorar até uma hora (Ribeiro, 1987).

## **1.8 Evolução dos triatomíneos**

Apesar da maioria dos autores concordarem que triatomíneos evoluíram de reduvídeos predadores, ainda há controvérsia a respeito do parentesco entre os

membros do grupo. Os entomólogos se dividem entre a hipótese da monofilia (Weirauch & Munro, 2009; Patterson & Gaunt, 2010; Hypsa e cols, 2002) e da polifilia (De Paula e cols, 2005). Grupos monofiléticos incluem todos os descendentes vivos originários de um mesmo ancestral comum. Já os grupos chamados polifiléticos têm origem de vários ancestrais comuns diferentes. Solucionar essa questão é importante para entender a evolução dos barbeiros. A sistemática atual agrupa os organismos em *taxa* monofiléticos, logo, dependendo das relações evolutivas que serão descobertas, a classificação pode ser alterada. Caso o grupo seja monofilético, será possível fazer previsões a respeito de certas características de uma espécie pouco estudada com base no que se sabe a respeito de outras espécies (Schaefer, 2005). Os seqüenciamentos de genomas poderão ajudar a trazer respostas para estas questões.

### **1.9 Importância epidemiológica dos triatomíneos**

Uma atenção especial da comunidade científica foi dada ao estudo de triatomíneos após Carlos Chagas (1909) descobrir que esses insetos transmitem o protozoário *Trypanosoma cruzi* para populações humanas. A pesquisa envolvendo triatomíneos tem grande relevância para a compreensão e combate à doença de Chagas. Ainda hoje, a transmissão vetorial da doença é a principal responsável pela maioria dos casos nas Américas (Teixeira, 2007). O estudo dos triatomíneos é de elevada importância e poderá ser decisivo para o futuro da epidemiologia da doença.

A disseminação da doença de Chagas por triatomíneos foi diminuída no Brasil, e em outras localidades, devido às políticas de combate ao vetor e monitoramento de doadores de sangue (Schofield e cols, 2006). Ainda que triatomíneos em contato com populações humanas tenham diminuído, eles são animais silvestres que fazem parte do ecossistema e permanecem na natureza como ameaça constante de recolonizar áreas com condições inadequadas de moradia (Noireau, 2009). Somado a este problema de controle, algumas espécies tidas exclusivamente como silvestres têm ganhado destaque epidemiológico devido à domesticação recente (Dujardin e cols, 1999). Schofield (1999) acredita que essa domesticação de triatomíneos seja uma tendência generalizada do grupo. Além disso, o combate a espécies já domesticadas abre espaço a ser preenchido pelas

espécies silvestres. Talvez a atividade antrópica com predação de ecossistemas esteja criando uma pressão seletiva que favorece a adaptação dos triatomíneos ao ambiente domiciliar. Os efeitos devastadores dessa atividade geraram problemas relacionados ao combate a grandes endemias, como parece ser o caso dos triatomíneos em vastas regiões do continente Americano.

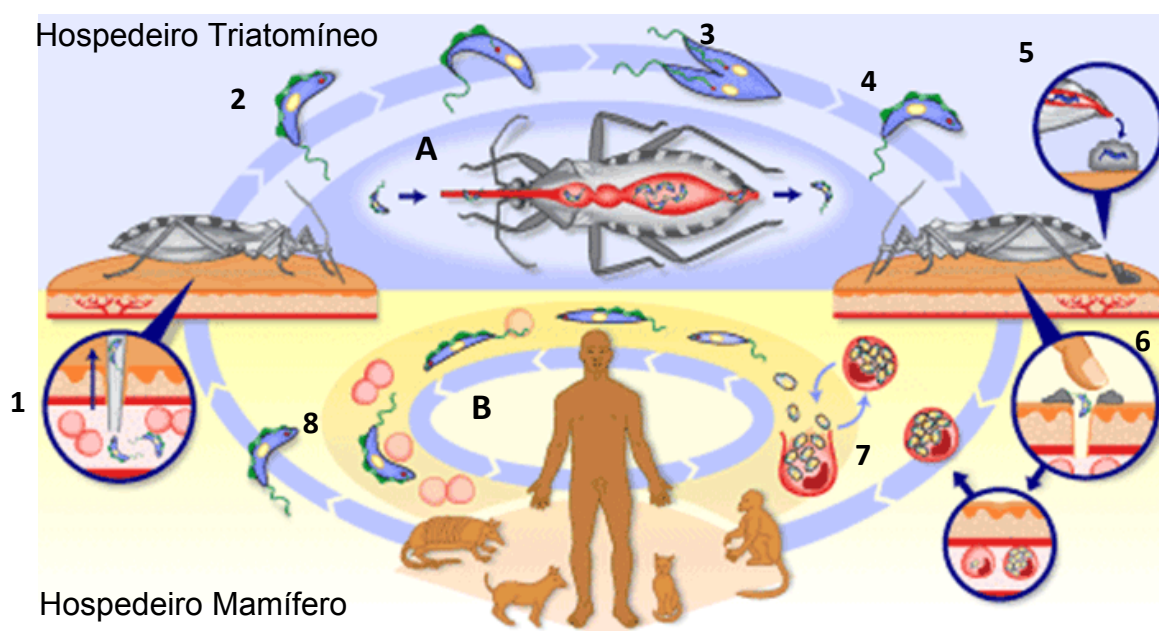
Existe também o risco de que os triatomíneos se adaptem cada vez mais ao ambiente urbano, aumentando o problema da doença de Chagas nos bolsões de pobreza das metrópoles sul-americanas. A transmissão vetorial foi documentada em áreas periféricas de cidades da América Latina (Mott e cols, 1990). A doença de Chagas já é um problema de muitas cidades brasileiras. Por exemplo, 97 das 417 cidades da Bahia são consideradas de alto risco para transmissão da doença de Chagas. Esta estatística não exclui grandes centros como a capital, Salvador, que registrou aumento de casos da doença associada provavelmente aos triatomíneos encontrados na área metropolitana (de Souza e cols, 2011). Em Cochabamba, Bolívia, a transmissão da doença pelo *Triatoma infestans* também ocorre em áreas urbanas, principalmente nas periferias com más qualidades de habitação. A vigilância entomológica deve ser realizada para conter qualquer ameaça à saúde pública (Medrano-Mercado e cols, 2008). Recentemente, foram encontrados triatomíneos infectados com *T. cruzi* em área urbana do Distrito Federal (Maeda, 2011).

O uso sistemático de inseticidas pode trazer problemas no controle da transmissão vetorial futuramente por selecionar animais resistentes. Comparações entre *T. infestans* domiciliares e silvestres mostraram que os insetos em contato com o homem vêm adquirindo resistência a inseticidas domésticos (Germano e cols, 2010; Picollo, e cols, 2005; Lardeux e cols, 2010; Vassena e cols, 2000).

### **1.10 Os triatomíneos e o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***

O *Trypanosoma cruzi* tem ciclo de vida com vários estágios que se distinguem morfologicamente (Figura 2). O protozoário infecta o hospedeiro mamífero na sua forma tripomastigota metacíclica. Ao invadir a célula hospedeira se diferencia em amastigota replicativo e se transforma em tripomastigotas, que não se divide e circula no sangue. Amastigota intracelular e tripomastigota extracelular são

as formas do protozoário encontradas no hospedeiro mamífero. Quando o triatomíneo suga o sangue do mamífero infectado, ele ingere as formas tripomastigotas do sangue. Ao entrar em contato com o lúmen do sistema digestório do triatomíneo, as tripomastigotas transformam-se em amastigotas não replicantes e epimastigotas replicantes. A replicação de epimastigotas no trato digestivo do inseto aumenta progressivamente e, após a quarta semana de infecção, as formas metacíclicas diferenciam-se no reto e podem ser eliminadas com as fezes. Os indivíduos infectam-se quando as fezes do inseto contaminam a pele no local da picada, em escoriações, ou quando são ingeridas ou levadas a mucosa dos olhos (Kollien & Schaub, 2000).



**Figura 2.** Ciclo da transmissão da doença de Chagas. Nos triatomíneos passam apenas pelo lúmen do trato digestório (A). Hematofagia (1) leva à ingestão de tripomastigotas (2) que se diferenciam em epimastigotas replicantes (3) e posteriormente diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (4). Eles são eliminados com as fezes durante o repasto (5). Quando o hospedeiro coça o local da picada, facilita a entrada de *T. cruzi* pelo ferimento deixado (6). O *T. cruzi* transforma-se em amastigota, que é intracelular (7). Nos mamíferos ocorre por lise celular e infecção de novas células (B) até que algum triatomíneo se alimente de tripomastigotas circulantes (8). Fonte: modificado de WHO, 2011.

### **1.11 Interação parasito-hospedeiro e a transferência gênica**

A reprodução sexuada aumenta a variabilidade genética das espécies. Maior variabilidade significa mais chances de sobrevivência frente novas pressões seletivas. A transferência lateral de genes pode ter sido importante para a evolução dos animais e plantas. Triatomíneos mantêm um contato íntimo com seus hospedeiros, com os quais trocam moléculas e transmitem microorganismos como *T. cruzi* e *T. rangeli*. Trocas de DNA entre insetos e hospedeiros foram identificadas por análises de genomas de *Rhodnius prolixus*, que tem quatro famílias de transposons, seqüências móveis do genoma, obtidos de seus hospedeiros vertebrados (Gilbert e cols, 2010). Apesar de evoluírem em lados aparentemente opostos pela luta da sobrevivência, ainda assim é possível haver troca de genes. Isso mostra que a relação parasito-hospedeiro é mais íntima do que se pensava e as conseqüências evolutivas podem estar sendo subestimadas.

### **1.12 Aplicações na pesquisa científica**

Além do interesse na fisiologia dos insetos, a saliva de triatomíneos desperta interesse especial por conter moléculas farmacologicamente ativas e de grande interesse biotecnológico. Novas classes de moléculas com aplicações medicinais foram descobertas estudando-se a saliva desses animais. As propriedades químicas e fisiológicas da saliva serão anunciadas posteriormente. Outra propriedade relevante da saliva reside na interação com o *T. cruzi*, ainda no local da picada usado como porta de entrada no hospedeiro vertebrado. Moléculas chamadas LPC (lysophosphatidylcholine), bem como outras secretadas na saliva de *Rhodnius prolixus*, facilitam a instauração da infecção (Mesquita e cols, 2008).

Veterinários descobriram aplicação interessante para os triatomíneos: o uso na coleta de pequenas amostras de sangue destinadas à análise. É uma maneira menos invasiva e mais prática de coletar sangue de animais domésticos que traz menos stress ao animal. O sangue ingerido pelo barbeiro pode ser extraído e usado em testes posteriores sem significativa alteração na composição (Voigt e cols, 2004). O método pode também ser aplicado em estudos de animais silvestres nos quais a coleta de sangue é difícil. Os barbeiros encontram vasos e obtêm o

sangue sem desconforto ou risco para o animal, além de conseguirem tirar sangue de animais pequenos como morcegos e roedores. Alguns dos transmissores de raiva são animais com importante papel ecológico. O uso do triatomíneo permite a coleta de sangue mais facilmente para os testes de diagnóstico de raiva, permitindo aumentar a amostragem sem gerar danos à população estudada (Vos e cols, 2010).

### **1.13 *Triatoma infestans***

Em um mundo em constante modificação, animais que fizeram associação com os humanos podem ser favorecidos. O *T. infestans* adaptou-se muito bem às condições peridomiciliares e domiciliares e, por isso, teve destaque na epidemiologia da doença de Chagas. Alimenta-se de sangue humano, de cães, gatos, coelhos, galinhas e outros animais domésticos. As populações dessa espécie colonizam predominantemente o intra e o peridomicílio. No ambiente silvestre, a espécie é encontrada em espaços entre rochas, troncos ocos ou cascas de árvore, ninhos ou tocas de aves e mamíferos (Lent & Wygodzinsky, 1979). Esta plasticidade comportamental ajudou no sucesso da espécie em relação aos outros triatomíneos que, geralmente, têm maior preferência por certos tipos específicos de habitats silvestres (Noireau, 2009). Por exemplo, *Panstrongylus sp.* tem preferência por tocas de animais, enquanto que *Rhodnius sp.*, em geral, busca abrigos em palmeiras (Marcondes, 2001).

### **1.14 Composição da saliva de triatomíneos e respostas do hospedeiro**

Ao longo de milhões de anos de evolução, os mamíferos desenvolveram mecanismos de resistência aos parasitos hematófagos, tentando diminuir a frequência dos repastos, enquanto eles desenvolviam estratégias evasivas para assegurar sua sobrevivência. Esta batalha evolutiva foi chamada de efeito da Rainha Vermelha por Leigh Van Valen, autor que tentou explicar fenômenos co-evolutivos de disputa entre espécies. Por esta teoria, a disputa entre parasitos e hospedeiros pode ser comparada a corridas armamentistas em que o poderio de fogo permanece similar apesar dos esforços de ambos os lados (Valen, 1973). Disputas adaptativas entre os hematófagos e seus hospedeiros acontecem há milhões de anos. Análises



dos sialomas e proteomas mostram o quanto os insetos se “armaram” com arsenais químicos e mecânicos poderosos que asseguram o sucesso destes animais.

Mamíferos têm mecanismos de manutenção da hemostase, inflamação e sistema imune que, em conjunto, criam fortes barreiras aos insetos hematófagos. A hemostase do sangue impede hemorragias: quando ocorre lesão em um vaso, plaquetas liberam vasoconstrictores e iniciam o processo de agregação plaquetária em que se forma uma rede para estancar o sangramento e reparar a injúria. Posteriormente, ocorre a coagulação sanguínea, uma cascata química que resulta na formação do coágulo, ajudando as plaquetas a conterem a hemorragia. Tais processos diminuem a fluidez e inviabilizam a sucção de sangue (Ribeiro, 1987).

A resposta inflamatória acontece quando há algum dano tecidual. O local fica dolorido, vermelho e quente. Apesar da vasodilatação desta resposta favorecer a perda de sangue, a dor aumenta a sensibilidade do hospedeiro aumentando também a chance de perceber os ectoparasitos. Neutrófilos são recrutados para o local, bem como outras células de defesa. A imunidade adaptativa pode reconhecer antígenos salivares e induzir reações de hipersensibilidade (Hecht, 2006). Adicionalmente, o sistema complemento tem potencial para causar danos aos tecidos dos insetos sugadores de sangue. Tais respostas podem danificar o trato digestivo de insetos após o repasto (Ribeiro & Francischetti, 2003).

Todas essas barreiras dificultam, mas não impedem a hematofagia praticada pelos triatomíneos. Na sua saliva, existem proteínas que facilitam a aquisição do sangue e os protegem contra respostas imunes do hospedeiro. Da mesma forma que os hospedeiros mamíferos desenvolveram mecanismos fisiológicos redundantes para manutenção da homeostase, os triatomíneos evoluíram formas de inibição dessas vias e dos mecanismos alternativos de defesa, assegurando assim a obtenção do sangue (Ribeiro & Francischetti, 2003). Por exemplo, a saliva de *T. infestans* tem a capacidade de inibir a agregação plaquetária induzida por vias diferentes: colágeno ou ADP (Charneau e cols, 2007).

As duas tribos da sub-família Triatominae mais conhecidas por sua importância epidemiológica são Rhodniini e Triatomini, cujos gêneros mais estudados são *Rhodnius* e *Triatoma*, respectivamente. Existem diferenças na composição da saliva de espécies pertencentes aos dois gêneros que sugerem a possibilidade de estratégias evolutivas distintas. Os principais componentes da

saliva de triatomíneos são apresentados a seguir, com enfoque no *T. infestans* que é a espécie modelo neste estudo.

#### 1.14.1 Lipocalinas

A família das Lipocalinas é formada por pequenas proteínas bastante diversas, mas que possuem motivos e padrões de dobramento altamente conservados. Lipocalinas são conhecidas por se ligarem a moléculas pequenas (principalmente hidrofóbicas) e a receptores celulares, formando complexos macromoleculares. Os padrões de ligação diferem entre as lipocalinas: algumas podem ter alvos específicos enquanto outras podem ser bastante promíscuas (Flower, 1996). Lipocalinas apresentam funções variadas e são as proteínas mais abundantes na saliva de triatomíneos (Ribeiro e cols, 2004; Assumpção e cols, 2008; Kato e cols, 2010; Assumpção e cols 2011; Bussacos e cols, 2011). Schlehber & Skerra (2005) acreditam que as lipocalinas de insetos têm potencial farmacológico e poderiam ser usadas como drogas terapêuticas em decorrência de propriedades que evoluíram para execução de um papel fisiológico.

Picadas de insetos podem levar a reações adversas de hipersensibilidade. A maior parte dos casos de choque anafilático causado por picada de insetos está relacionada aos triatomíneos (Hoffman, 1987). A lipocalina chamada Procalina é considerada o principal alérgeno da saliva dos triatomíneos (Paddock e cols, 2001).

RPAI (*Rhodnius prolixus aggregation inhibitor*) é uma lipocalina antiagregadora de plaquetas de *Rhodnius prolixus* cujo mecanismo de ação consiste em ligar-se aos derivados de adenosina e inibir agregação plaquetária mediada por ADP. RPAI compartilha homologias com a Triabina e Pallidipina, ambas encontradas em *Triatoma pallidipennis* (Francischetti e cols, 2000). Triabina interage de forma específica com a serino-protease trombina para inibir a agregação plaquetária (Noeske-Jungblut e cols, 1995). Pallidipina tem capacidade de inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno (Noeske-Jungblut e cols, 1994). *T. infestans* secreta a triplatina, que possui semelhanças com pallidipina e tem a mesma função (Morita e cols, 2006).

Nitroforinas, secretadas por *Rhodnius prolixus*, inibem a coagulação sanguínea, estimulam a vasodilatação (Andersen e cols, 2005) e foram associadas à inibição da resposta imune por ligação à histamina (Francischetti e cols, 2000; Ribeiro e cols, 1995). De interesse, *T. infestans* não possui nitroforinas, o que sugere diferenças nas estratégias evolutivas entre as duas tribos da sub-família Triatominae (Rhodniini e Triatomiini). Esta diferença é uma das críticas à hipótese da monofilia do grupo.

A ABP (*Amine Binding Protein*) é uma lipocalina cujos alvos são serotonina, epinefrina e norepinefrina, resultando em inibição da contração dos vasos e agregação plaquetária (Andersen e cols, 2003).

#### 1.14.2 Apirases

As enzimas conhecidas como Apirases são nucleotidases que degradam ATP e ADP gerando AMP e Pi. Tais proteínas aparecem em uma grande variedade de organismos, desde plantas a animais invertebrados e vertebrados. Os triatomíneos possuem apirases secretadas na saliva assim como carrapatos e mosquitos, o que sugere convergência evolutiva para a mesma função. A elevada atividade apirásica da saliva resulta na inibição da agregação plaquetária induzida por ADP de forma a manter a fluidez do sangue e permitir a alimentação (Sarkis e cols, 1986). A análise do proteoma salivar de *T. infestans* mostrou predominância de inibidores plaquetários das famílias das lipocalinas e apirases (Charneau e cols, 2007), sugerindo que a inibição plaquetária tem papel fundamental para alimentação bem-sucedida.

#### 1.14.3 Peptídeos com domínios Kazal

Proteínas que possuem os domínios *kazal-like* estão relacionadas à inibição de serina proteases como tripsina. Triatomíneos usam estas proteínas em sua saliva para a inibição específica de fatores de coagulação, principalmente a trombina, a qual desempenha papel central na coagulação sanguínea e possui ação estimulante da agregação plaquetária. Proteínas que possuem estes domínios são secretadas também no trato digestivo (intestino médio) de *T. infestans* e *P. megistus*

(Campos e cols, 2002; Meiser e cols, 2010). Rhodniina foi a primeira proteína com domínios *kazal-like* a ser identificada, na saliva de *R. prolixus* (Friedrich e cols, 1993). Proteínas homólogas contendo esses domínios foram identificadas em outras espécies de triatomíneos, como *Dipetalogaster maxima* (Mende e cols, 1999), *T. infestans* (Campos e cols, 2002) e *T. brasiliensis* (Santos e cols, 2007).

Algumas proteínas contendo os domínios *kazal-like* têm similaridade com um vasodilatador chamado Vasotab, secretado por dípteros da família Tabanidae. Sugeriu-se que essas proteínas também estejam relacionadas à vasodilatação durante a picada de barbeiros pertencentes ao gênero *Triatoma*, os quais não secretam nitroforinas (Santos e cols, 2007). No entanto, esta hipótese ainda precisa ser testada.

#### 1.14.4 Proteínas da família antígeno-5

Proteínas semelhantes aos antígenos-5 são encontradas na saliva da maioria dos insetos hematófagos. Estão presentes também no veneno de vespas. Estas proteínas pertencem a uma família chamada CAP, que é considerada ubíqua em animais e plantas e é reconhecida pela alta quantidade de resíduos de cisteína nas seqüências. Não se sabe ao certo qual função desempenham quando secretadas na saliva de hematófagos (Anderson e cols, 2006). Apenas em tabanídeos, descreveu-se a função anticoagulante por atividade fibrinolítica (Ma e cols, 2009) e função anti-agregadora de plaquetas (Xu e cols, 2008). Foi sugerida também atividade inibitória do sistema complemento na saliva da mosca *Stomoxys calcitrans* (Wang e cols, 2009), mas não foi feito teste experimental para comprovar tal hipótese.

Vários trabalhos mostram a presença de proteínas com domínios característicos dos antígenos-5 na saliva de triatomíneos. Encontraram-se transcritos no sialoma de *T. infestans* (Assumpção e cols, 2008), *T. dimidiata* (Kato e cols, 2010), *T. brasiliensis* (Santos e cols, 2007), *D. maxima* (Assumpção e cols, 2011), *R. prolixus* (Ribeiro e cols, 2004).

#### 1.14.5 OBPs

OBPs (Odorant Binding Proteins) de insetos são pequenas proteínas globulares que ligam e solubilizam moléculas relacionadas a odores, como feromônios. Acredita-se que ajam como transportadores que liberam odores aos quimiorreceptores de neurônios dos órgãos olfativos. Análises de expressão gênica mostram que estas moléculas não são restritas aos órgãos sensoriais e devem desempenhar outras funções fisiológicas (Sanchez-Gracia, 2009). Têm a capacidade de se ligarem a lipocalinas (Flower, 2000), logo podem ter alguma função relacionada com proteínas secretadas na saliva. Foram encontradas em sialomas de vários insetos hematófagos como o mosquito *Aedes aegypti* (Thangamani & Wikel, 2009) e os triatomíneos *T. dimidiata* (Kato e cols, 2010), *T. infestans* (Assumpção e cols, 2008) e *R. prolixus* (Ribeiro e cols, 2004).

#### 1.14.6 Trialisina e Triapsina

Trialisina é uma proteína altamente expressa e secretada pela glândula salivar de *T. infestans* com atividade lítica por formação de poros em membranas. Atua mais eficientemente sobre microorganismos e sua atividade tóxica a células eucarióticas poderia ser usada para combater parasitos. Seu efeito sobre células sangüíneas pode impedir a agregação de plaquetas e proteger o trato digestivo de células imunes do hospedeiro (Amino e cols, 2002).

A triapsina é uma serino-protease também secretada por *T. infestans*, cuja função ainda não está elucidada, porém sabe-se que não está ligada à digestão de nutrientes. Torna-se ativa apenas quando a saliva é liberada no momento da picada (Amino e cols, 2001). Uma função proposta para triapsina é clivagem e ativação da trialisina durante a alimentação do inseto (Amino e cols, 2002).

#### 1.14.7 Serpinas

Serpinas são inibidores de serino-proteases identificadas no gênero *Triatoma*. Atuam como reguladores de processos inflamatórios, coagulação sanguínea e ativação do sistema complemento (Assumpção e cols, 2008).

#### 1.14.8 Família Inositol Fosfatase

Família de proteínas citosólicas que participam de processos celulares diversos, como transdução de sinais e secreção. Acreditava-se que, por serem fosfatases, teriam função salivar semelhante à apirase, hipótese que foi refutada posteriormente. Existem indícios sugestivos de que, na saliva de triatomíneos, atuam sobre fosfolipídios de superfície celular levando a alterações que poderiam prejudicar a ação de plaquetas (Andersen & Ribeiro, 2006). Foram encontradas proteínas desta família em *R. prolixus* (Ribeiro e cols, 2004), *T. infestans* (Charneau e cols, 2007), *T. dimidiata* (Kato e cols, 2010) e *T. brasiliensis* (Santos e cols, 2007).

#### 1.14.9 Defensinas

Defensinas são moléculas microbidas, de pequena massa molecular, úteis para defesa de plantas e animais contra patógenos. Fazem parte do sistema de imunidade inata de insetos e normalmente são encontradas na hemolinfa. Defensinas circulantes de *R. prolixus* foram seqüenciadas e identificadas (Lopez e cols, 2003). Posteriormente, encontrou-se transcritos correspondentes a defensinas na glândula salivar de *T. infestans* (Assumpção e cols, 2008) e *R. prolixus* (Ribeiro e cols, 2004). Provavelmente, estão atuando como barreira para impedir proliferação de microorganismos ingeridos durante o repasto.

#### 1.14.10 Proteínas com domínios de hemolisina

Hemolisinas são toxinas (família RTX) formadoras de poros que foram descritas inicialmente em microorganismos. Estas moléculas apresentam domínios anfipáticos e hidrofóbicos que conferem as propriedades de agregação e interação com a membrana. Acredita-se que, na saliva de triatomíneos, possuem atuação citolítica, a qual seria vantajosa tanto para proteção, destruindo microorganismos e células imunes, quanto para iniciar a digestão, provocando hemólise (Assumpção e cols, 2008). Foram encontrados transcritos com estes domínios em *T. infestans* (Assumpção e cols, 2008) e *D. maxima* (Assumpção e cols, 2011).

#### 1.14.11 Triatox

A Triatox é uma proteína identificada, até o momento, somente na saliva de *T. infestans*. Secretada em pequena quantidade, é provável que participe na defesa contra microorganismos. Sua estrutura forma uma hélice anfipática que em contato com membranas biológicas pode desestabilizá-las (Assumpção e cols, 2008).

#### 1.14.12 Quinases

Proteínas quinases são enzimas que catalisam a transferência de fosfato, geralmente fornecido pela hidrólise do ATP, para um determinado substrato (fosforilação). A fosforilação de proteínas nos locais corretos pode alterar suas estruturas conformacionais, resultando em modificação das propriedades bioquímicas. Várias proteínas têm atividade desencadeada ou inibida por fosforilação. Quinases são proteínas regulatórias essenciais para todas as células, participam de inúmeras vias celulares de sinalização, regulação e controle (Taylor & Kornev, 2011). Bussacos (2008) identificou algumas quinases em análises de proteoma de glândula salivar de *R. brethesi* e *P. megistus*.

O perfil geral de composição salivar de triatomíneos foi caracterizado em algumas espécies. No entanto, proteínas pouco expressas têm menor chance de serem detectadas. As bibliotecas de cDNA feitas a partir dos transcritos provêm informações a respeito do perfil de transcrição em determinado momento, mas não necessariamente mostram todos os genes que são transcritos. Por exemplo, mRNAs sem cauda poli(A) são desconsiderados em muitas análises, assim como RNAs não codificadores. A análise de proteoma também privilegia genes traduzidos em maior quantidade. Proteínas importantes podem ter sido omitidas das análises por limitações técnicas. As proteína-quinases poderiam participar da regulação e sinalização envolvendo proteínas salivares, bem como desempenhar alguma função na hematofagia, e, por isso, é interessante o estudo destas proteínas.

## 1.15 Arginina Quinase

Arginina Quinase (AK) pertence a uma classe de quinases que catalisam a adição de fosfato (fosforilação) a substâncias intracelulares, chamadas guanidinos, formando fosfagênios. Fosfagênios são compostos que armazenam energia e liberam quando há uma demanda celular. Células animais usam fosfagênios para rápida recomposição de ATP agindo como um tampão de ATP no ambiente intracelular. O envolvimento de guanidino quinases na regulação energética é vital e por isso são altamente conservadas no reino animal. Guanidino quinases formam duas grandes linhas evolutivas: creatina quinases que evoluíram em vertebrados e arginina quinases, que evoluíram em invertebrados (Suzuki e cols, 1997).

Arginina quinases gastam energia proveniente do ATP livre para fosforilar de forma reversível a L-arginina formando fosfoarginina e ADP. A enzima é a guanidino quinase mais abundante entre os invertebrados, mas existem outras com a mesma função. Geralmente a AK é expressa em células com alto gasto energético e que precisam de rápida reposição energética. Os olhos compostos de *Apis mellifera* produzem grande quantidade de AK porque têm elevada demanda energética (Kucharski & Maleszka, 1998).

Arginina quinase também é expressa em altas quantidades no bulbo de veneno de gastrópodes do gênero *Conus*. O bulbo injeta e rapidamente abastece com veneno os “dentes” situados na rádula. Esses dentes funcionam como dardos venenosos que penetram a vítima em alta velocidade, envenenam e a matam em poucos segundos. Neste caso, a AK desempenha a função energética muscular como ocorre em outros invertebrados (Safavi-Hemami e cols, 2010).

As vespas da família Pompilidae são conhecidas pela forma que alimentam sua prole: depositam seus ovos em aranhas vivas. A peculiaridade deste comportamento se deve ao fato de aranhas serem predadoras, principalmente de insetos. Claro que nenhuma aranha colabora voluntariamente com a perpetuação dos Pompilídeos. Estes usam seu veneno, que não é letal, para paralisá-las antes que possam levá-las para seu ninho e depositar seus ovos. Yamamoto e cols (2007) investigaram as propriedades do veneno das vespas e descobriram que a atividade paralisante nas aranhas é desempenhada por uma arginina quinase. O seqüenciamento da proteína revelou que é bastante parecida com a AK de abelhas



(*Apis mellifera*), apesar de a seqüência estar truncada. A AK da vespa tem massa molecular de 27.9 kDa enquanto a AK normalmente tem 40 kDa. Curiosamente, os autores seqüenciaram o mRNA e encontraram a seqüência completa de nucleotídeos que deveria expressar uma AK de 40 kDa. Provavelmente, essa AK sofre alguma modificação pós-transcricional que resulta na proteína com atividade paralisante. Tal efeito é independente da atividade enzimática original da proteína. Yamamoto e cols (2007) também realizaram teste de paralisação nas espécies de aranhas que normalmente são as presas preferidas das vespas. Foi observado que a AK truncada tem atividade paralisante por relaxamento muscular, enquanto que a AK de 40 kDa não possui esta atividade. Outro achado interessante é que a paralisação foi efetiva nas aranhas, mas não em grilos (Yamamoto e cols, 2007). Tal descoberta sugere uma especificidade do veneno para as aranhas, mas não se deve descartar a possibilidade de a AK ter efeito paralisante sobre tecido muscular de outros organismos. Sabe-se que a AK pode interagir com F-actina muscular de moluscos e de coelho (Reddy e cols, 1992). Talvez esta interação esteja relacionada com a paralisação muscular, e o fato de ter afinidade à actina de um mamífero leva à dúvida se o efeito paralisante ocorreria em sua musculatura.

## 2- OBJETIVOS

Algumas quinases foram identificadas previamente no proteoma de glândula salivar de triatomíneos. O objetivo geral deste trabalho foi investigar a presença destas quinases na secreção salivar de *T. infestans*.

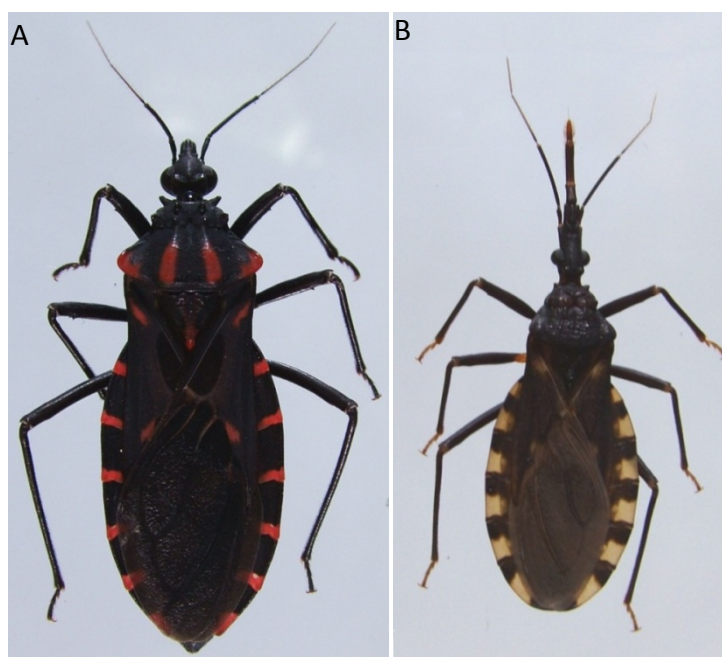
Os objetivos específicos são:

- Verificar a transcrição dos RNAs mensageiros (mRNAs) das quinases nas glândulas salivares;
- Seqüenciar mRNAs correspondentes às quinases;
- Expressar proteína recombinante a partir de seqüência codificadora obtida;
- Produzir anticorpo específico para a quinase;
- Avaliar presença de proteína-quinase na secreção salivar.

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Colônia de barbeiros

As colônias de *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* (Figura 3) foram mantidas a fotoperíodos de 12 h e temperatura de 28°C sob umidade relativa de 70%. Os barbeiros foram alimentados em *Gallus gallus* quinzenalmente.



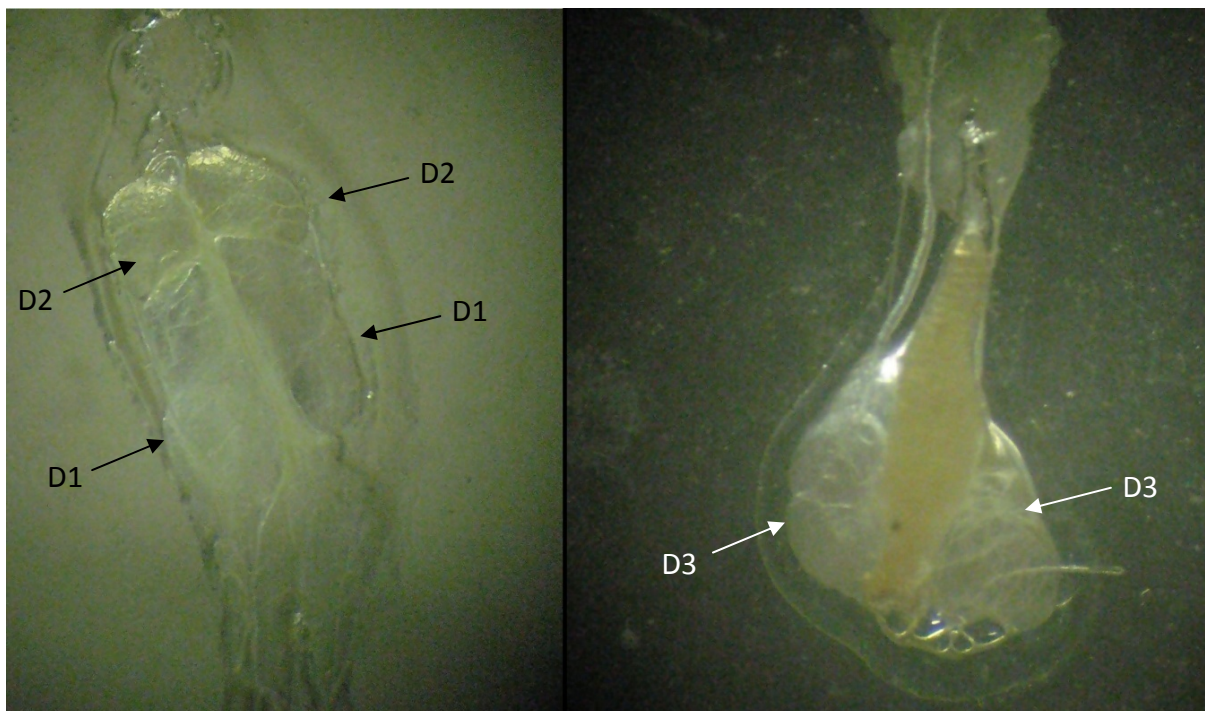
**Figura 3.** Triatomíneos adultos criados no insetário do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas. *Panstrongylus megistus* (A) e *Triatoma infestans* (B). Foto: Paulo H. B. Leite.

#### 3.2 Extração de glândulas salivares e mRNA

Todo o procedimento foi realizado em condições de ausência de RNase. Para inibição das RNases, todas as pinças e lâminas utilizadas foram tratadas com solução DEPC 0,1% por 12 h e autoclavadas posteriormente.

Trinta barbeiros adultos da espécie *T. infestans*, machos e fêmeas, foram sacrificados por deslocamento da cabeça. Separou-se cuidadosamente a cabeça do tórax posicionados sobre uma lâmina de vidro, onde as glândulas foram depositadas. Por meio de lupa estereoscópica, observou-se as glândulas (Figura 4)

sendo possível distinguir as glândulas dos tecidos adjacentes, os quais foram retirados. Os três pares de glândulas foram misturados e imediatamente congelados em microtubo plástico de 1,5 mL e mantidos em freezer a -80°C.

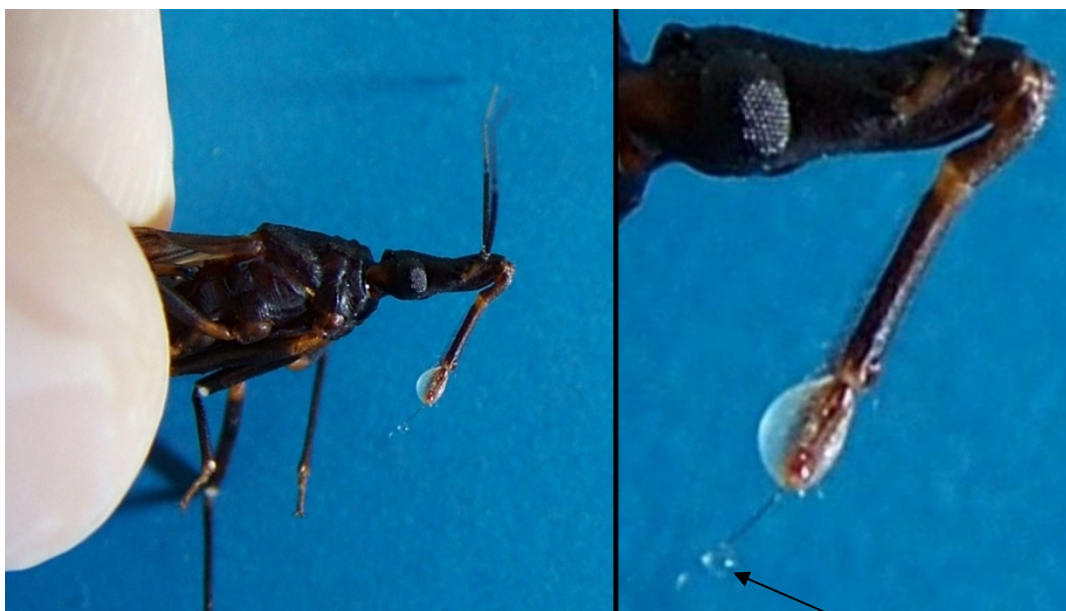


**Figura 4.** Pares de glândulas salivares de *T. infestans*. D1 é conhecida como glândula principal. Tem forma alongada e acumula maior volume de secreção em seu lúmen. D2 é chamada glândula suplementar. É levemente amarelada e apresenta forma arredondada. D3 é a glândula acessória. Localiza-se afastada das demais. Tem coloração clara, com maior tamanho e menos secreção (Lacombe, 1999; Reis e cols, 2003). Foto: Ciro Davi Cordeiro.

A extração de mRNA de pequenas amostras de tecido foi feita utilizando o kit Micro-FastTrack™2.0 (INVITROGEN), de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, o tecido glandular sofreu lise a 45 °C com tampão do kit e o mRNA foi separado por Oligo (dT) celulose, a qual se liga à cauda poli-A de mRNAs. Este foi separado com tampão de eluição e precipitado com glicogênio, acetato de sódio, e etanol 100% a -80°C. Centrifugou-se o material extraído a 16.000 G e o sobrenadante foi descartado. Ressuspendeu-se o mRNA em 10µL de tampão de eluição e conservou-o a -80 °C até o momento do uso.

### 3.3 Coleta de saliva

A coleta de saliva de *T. infestans* e *P. megistus* foi feita uma semana após a alimentação, sem necessidade de sacrifício dos espécimes. Quando imobilizados, esses insetos secretam saliva espontaneamente. Coletou-se, com auxílio de micropipeta, uma gotícula de aproximadamente 1 $\mu$ L de saliva da extremidade da probóscide (Figura 5). Esta técnica de coleta garante obtenção das proteínas secretadas na saliva. A saliva foi preservada a 0°C durante o procedimento de coleta e congelada a -80 °C.



**Figura 5.** Ejeção espontânea de saliva por *T. infestans*. Seta indica estilete utilizado para perfurar vaso sangüíneo com gotícula de saliva na extremidade. Foto: Paulo H. B. Leite.

Alguns exemplares da espécie *Rhodnius neglectus* foram cedidos pelo professor Rodrigo Gurgel Gonçalves do Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. *R. neglectus* não saliva espontaneamente, sendo necessária a extração da glândula salivar como descrito anteriormente. Neste caso, não é necessário o uso de condições inibidoras de RNase. As glândulas foram depositadas em microtubo, mantido a 0°C, onde foram perfuradas e centrifugadas a 16.000 G. Coletou-se a saliva sobrenadante que foi congelada imediatamente a -80°C. Este método de coleta não exclui a

possibilidade de pequena contaminação de proteínas citosólicas liberadas por rompimento celular das glândulas.

### 3.4 Síntese de DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) ao mRNA foi sintetizado com a enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase fabricada pela INVITROGEN. Foram usados iniciadores (*primers*) Oligo (dT) para gerar cDNA de todas seqüências de mRNA transcritas na glândula salivar. As condições usadas de reação foram: 6 µL de H<sub>2</sub>O; 1 µL de dNTP (25mM); 1 µL de mRNA (50 ng); 5 µL de *primers* oligo (dT). A reação foi mantida a 65°C por cinco min e em gelo por um min. Em seguida, adicionou-se 4 µL de tampão FS 5x, 1 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL (200 unidades) da enzima Transcriptase Reversa. A reação enzimática ocorreu a 55 °C durante 45 min, e o término da reação feito a 70 °C por 15 min.

### 3.5 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

A verificação da transcrição de genes na glândula salivar foi feita com uso da técnica Reação da Polimerase em Cadeia (PCR, Polymerase Chain Reaction) com *primers* específicos (Tabela 1) para cada quinase previamente identificada por espectrometria LC-MS/MS (Bussacos, 2008). As seqüências de cDNA sintetizadas serviram de molde para amplificação. Bussacos (2008) identificou seqüências de aminoácidos da proteína, e como nenhum genoma de triatomíneo foi seqüenciado, usaram-se genes homólogos de organismos o mais aparentado possível ao *T. infestans*. As seqüências nucleotídicas foram obtidas no banco de dados do NCBI (Endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para desenho de *primers* usando o programa DNAMAN. Estas seqüências poderiam não corresponder à seqüência exata encontrada em *T. infestans*, por isso os *primers* foram desenhados tendo como alvo regiões conservadas para aumentar a chance de pareamento correto e amplificação. Tal estratégia tem, contudo, a desvantagem de aumentar a chance de pareamento e amplificação de outros genes que possuam as mesmas regiões conservadas e, por isso, o sucesso da análise não é garantido, podendo apresentar múltiplas bandas ou rastros dos produtos de PCR separados por eletroforese em gel

de agarose. Para resolver esse problema e aumentar a especificidade, realizou-se *nested* PCR com *primers* específicos de regiões mais internas das seqüências possibilitando reamplificação dos produtos obtidos na primeira PCR.

Tabela 1. *Primers* utilizados nas reações de PCR.

<i>Primer</i>	Nucleotídeos	Seqüência alvo	Organismo
AD 1 senso	CAAGAAGTTGGCCGAGTCG	Arginina Quinase	<i>Drosophila melanogaster</i>
AD 2 senso	GATCCGGAGGCATATAAGGTG		
AD 1 reverso	CTTGATGTGCACCGAGGC		
AD 2 reverso	CCTCCTCGTTGCACCAGAC		
AT 1 senso	CCATGACTCCGGTGTAGGTATC	Arginina Quinase Putativa	<i>Triatoma vitticeps</i>
AT 2 senso	CACTAGAGTACGTTGCGGTCG		
AT 1 reverso	GCTTCGTATTCAGTAAGGCC		
AT 2 reverso	CAAGTTGGTTGGGCAGAATG		
PG 1 senso	GTCACATTTGGGACGTCCAG	Fosfoglicerato Quinase	<i>Apis mellifera</i>
PG 2 senso	CGCCTTTGGTACAGCTCATC		
PG 1 reverso	CCATTTAGCAGCGCAAGTAGC		
PG 2 reverso	GGTCCAACATCAAGTCCCATC		
ND 1 senso	GCCTTAATTGGAGGATCGTTTC	Nucleosídeo Difosfato Quinase	<i>Rhodnius prolixus</i>
ND 2 senso	ATGGTTAAGCCTGATGGTGTTTC		
ND 1 reverso	GGTTGGTTTCCAGTCCACAA		
ND 2 reverso	CCTTCTTGCTGACTCGACAG		

As concentrações dos reagentes de PCR por reação foram: 2,5 µL de tampão de reação [10x] disponível no kit *Platinum®Taq DNA Polymerase* (INVITROGEN); MgCl<sub>2</sub> [1,5 mM]; *Primers* [0,2 mM]; dNTP [0,02 mM]; Platinum Taq DNA Polymerase 1,5 unidades por reação. Reação com volume final de 25 µL.

Os produtos da primeira reação foram diluídos numa proporção de 1/20 e reamplificados usando os *primers* internos (Tabela 1) nas mesmas condições.

### 3.6 Eletroforese em Agarose

A eletroforese em agarose 1% foi realizada de acordo com Ausubel e colaboradores (2000), e utilizado o marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (INVITROGEN).

### 3.7 Clonagem e transformação

Produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T easy (PROMEGA) de acordo com instruções do fabricante: 3  $\mu$ L do produto da reação de PCR foram adicionados a 5  $\mu$ L de Tampão 2X, 1  $\mu$ L de pGEM T-easy e 1  $\mu$ L de T4 DNA ligase. O mix de reação foi deixado uma hora a temperatura ambiente para atuação da DNA ligase. Após a ligação do produto de PCR ao plasmídeo, realizou-se a transformação, que consiste na incorporação da molécula de DNA recombinante por uma bactéria competente nas seguintes condições: 100  $\mu$ L de *Escherichia coli* XL10-Gold (Stratagene) foi descongelada a 0 °C e incubada na mesma temperatura com 3  $\mu$ L de produto de ligação por 30 min. Realizou-se um choque térmico por 2 min a 42 °C. Em seguida, as bactérias foram mantidas a 0 °C por mais 5 min antes que fosse acrescentado 1 mL de meio LB líquido (USB). As bactérias transformadas cresceram sob agitação a 37 °C por 1 h e então foram centrifugadas a 4.000 G por 2 min. As bactérias precipitadas foram plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina (0,1 mg/ml) e X-gal (80  $\mu$ g/ml). Após crescimento de 12 h a 37°C, selecionou-se as colônias brancas para realização da extração plasmidial (miniprep).

Foi utilizada também a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) para expressão de quinase, como será descrito posteriormente. Células competentes são conservadas a -80°C e descongeladas em gelo. A transformação foi feita conforme já descrito, mas em vez de ampicilina usou-se meios LB com kanamicina (30 mg/mL) como antibiótico.

### 3.8 Extração Plasmidial

As culturas celulares selecionadas cresceram por 12 h em meio líquido LB (USB) com ampicilina (0,1 mg/ml) a 37°C. Extração do DNA plasmidial bacteriano foi feita usando o kit ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.9 Seqüenciamento

O DNA purificado obtido pela *miniprep* foi digerido com a enzima de restrição EcoRI (Invitrogen), que cliva o pGEM T-easy de forma a permitir a liberação



do inserto e avaliação do tamanho por eletroforese em gel de agarose. Desta forma, selecionou-se insertos com tamanho esperado para seqüenciamento comercial feito pela empresa Genomic Engenharia Molecular, São Paulo. O aparelho utilizado foi o seqüenciador 3130xl (Applied Biosystems) que utiliza o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

### 3.10 Expressão

Para expressar um gene em bactéria é necessário inserir sua região codificadora em plasmídeo específico para essa função. Inicialmente, foram desenhados primers cujas seqüências-alvo correspondem ao início e fim da região codificadora da proteína dentro do mRNA (Tabela 2). A temperatura média de anelamento dos *primers* era cerca de 60°C. A cada *primer* foram adicionadas bases correspondentes ao sítio de restrição de uma enzima diferente. Tomou-se o cuidado de verificar se as enzimas de restrição clivam o gene usando-se o programa uber Geneious 3.6.1.

A PCR foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente. O produto da PCR foi clonado em pGEM-T easy e transformado em XL10-Gold (Stratagene) conforme já descrito.

Tabela 2. *Primers* usados para amplificar seqüências codantes das quinases.

<i>Primer</i>	Nucleotídeos*
AK cds senso	TATTGGATCCATGGATTACACAGAACGTACATTT
AK cds reverso	AAAAGCGGCCGCTTAATCTTCATATACCCATTCTCTAATGG
NDK cds senso	TATTGGATCCATGGTTGATGCAGCTGTACTTGAG
NDK cds reverso	AAAAGCGGCCGCTTACATTTCTTTCTCAATCTTAATGATTTTCAG

\*Sublinhado corresponde às regiões de reconhecimento pelas enzimas de restrição.

### 3.11 Digestão enzimática

Após extração do DNA plasmidial, os produtos das *minipreps* (pGEM T-easy ou pET-28a ligados aos amplicons) foram digeridos pelas enzimas de restrição

BamH1 e Not1 (Fermentas). A digestão foi feita de acordo com instruções do fabricante e com uma enzima de cada vez, para se obter melhor rendimento da reação. Entre as digestões com diferentes enzimas, isolou-se o produto da primeira reação para se eliminar a interferência dos reagentes utilizados com o kit illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O produto da digestão de cada plasmídeo foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e as bandas foram excisadas. O conteúdo de DNA das bandas isoladas foi eluído com o kit illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante.

### 3.12 Clonagem em vetor de expressão

A ligação do produto de digestão em plasmídeo foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (INVITROGEN) nas condições recomendadas pelo fabricante: 4µL de Tampão 5X, 1µL de T4 DNA Ligase, 30 fmol de amplicon, 90 fmol de pET 28a e água destilada completando volume para 20 µL. A reação foi mantida a 4°C por 12 h e depois armazenada a -20 °C.

### 3.13 PCR de colônia

Para verificar se as células BL21 (DE3) transformadas haviam incorporado os plasmídeos com inserção, usou-se a PCR com *primer* de AK e *primer* do vetor (T7 terminator). As colônias de bactérias foram depositadas sobre o mix de reação para amplificação. A condição de PCR usada para cada reação (25 µL de volume final) foi: 2,5 µL de tampão de reação [10x]; MgCl<sub>2</sub> [1,5 mM]; Primers [0,2 mM]; dNTP [0,02 mM]; Platinum Taq DNA Polymerase 1,0 unidade/reação. Também foi feita *nested* PCR para aumentar quantidade e especificidade dos produtos. As condições desta *nested* PCR foram as mesmas utilizadas anteriormente para reamplificação de produtos.

Foi feita a extração plasmidial e seqüenciamento das colônias selecionadas conforme já descrito, e foi possível verificar se as seqüências estavam da fase de leitura correta para expressão da AK.

### 3.14 Expressão de proteína recombinante

As colônias transformadas cresceram em 400 mL de meio LB líquido com kanamicina (30 mg/mL), sob agitação até atingir uma OD de 0,6 a 600 nm. Foi usado como controle uma colônia transformada com pET-28a sem inserto. Fez-se indução por IPTG em concentração final de 1 mM e 0,5mM durante 3 h. Centrifugou-se a cultura a 7000 G por 5 min e foi desprezado o sobrenadante. As bactérias foram re-suspensas em 16 mL de Bugbuster (Novagen) com 30 µL de DNase I (Gibco). A centrifugação a 16.000 G após a lise das bactérias permite separar a fração solúvel de proteínas (em suspensão) da fração insolúvel (precipitado). A fração insolúvel foi suspensa em tampão de amostra para futura aplicação em eletroforese. Como avaliação da eficácia da indução, realizou-se a eletroforese SDS-PAGE em acrilamida 12,5% para comparação dos conteúdos protéicos celulares do controle e da bactéria expressando a proteína.

### 3.15 Purificação por cromatografia de afinidade

A proteína recombinante codifica uma cauda de histidina adicionada à extremidade N-terminal, que confere afinidade aos íons de níquel da coluna de cromatografia. Usou-se o kit His •Bind Columns (Novagen), que permite purificação de até 10 mg de proteína por coluna, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a resina da coluna foi equilibrada com 10 mL de *Binding Buffer* e aplicou-se o extrato celular solúvel obtido pela expressão. Duas lavagens foram realizadas, primeiramente com 10 mL de *Binding Buffer* e depois com 10 mL de *Wash Buffer* 1x. Em seguida, eluiu-se a proteína em 5 mL de *Elute Buffer*. A fração de proteína a ser usada em testes de atividade foi mantida a 4 °C e o restante foi estocado a -20 °C.

### 3.16 Digestão peptídica com a trombina

O vetor de expressão pET-28a codifica o sítio de clivagem da enzima trombina entre a cauda de histidina e a seqüência de interesse. Dessa forma, a digestão com a trombina remove a cauda de histidina. Com este intuito, usou-se o kit

Thrombin Cleavage Capture Kit (Novagen) que, além da proteólise, permite remoção da trombina após a reação. Foram seguidas as recomendações do fabricante.

### **3.17 Quantificação de proteínas**

Usou-se o reagente de Bradford (Sigma) para quantificação da concentração de proteínas de acordo com instruções do fabricante. Foi feita curva de concentração de albumina bovina com oito pontos, utilizada como padrão.

### **3.18 Imunização de coelhos**

Arginina quinase, sem cauda de histidina, foi utilizada para produção de anticorpos específicos em coelhos. Os animais, de três meses de idade, foram imunizados quatro vezes, com intervalos de 15 dias entre cada imunização. A cada imunização, aplicou-se 100 µg de proteína recombinante, um adjuvante (apenas nas duas primeiras) e completou-se o volume para 0,5 mL com solução salina 0,9%. Aplicou-se usando seringa estéril descartável de 1 mL. Na primeira imunização, foram injetados 100 µL de adjuvante de Freund (Calbiochem-Behring) e, na segunda imunização, usou-se 100 µL de adjuvante incompleto de Freund (Calbiochem-Behring). Na última imunização não foi utilizado o adjuvante porque o animal já está sensibilizado. Coletou-se sangue antes das imunizações (soro pré-imune) e 15 dias após a última imunização (soro imune). O sangue foi centrifugado a 4.000 G e o soro sobrenadante guardado a -20 °C com 50% de glicerol.

### **3.19 Eletroforese vertical e *Western blot***

Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) unidimensional foi realizada de acordo com Ausubel e cols (2000). As amostras com tampão desnaturante foram fervidas por 5 min antes da eletroforese. A marcação das proteínas no gel foi feita com o reagente *Brilliant Blue R Staining Solution* (Sigma). Os marcadores usados foram: SDS7 (Sigma), *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (INVITROGEN), *Kaleidoscope Prestained Standards* (BIO-RAD).

Ensaio de *Western Blot* foram realizados de acordo com Ausubel e colaboradores (2000). A transferência foi feita em sistema semi-seco LKB 2117 *Multiphor II Electrophoresis Unit* (Pharmacia - LKB) com membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Após a transferência a membrana foi bloqueada com PBS leite 5% por 12 h a 4 °C e mantida na mesma solução a -20 °C. Após lavagem de 5 minutos com PBS 1X a membrana foi incubada com soro diluído em PBS leite 2% (1:200) por 2 h. Foram realizadas cinco lavagens em PBS 1X por 5 min, antes que fosse incubada por 2 h no segundo anticorpo, *Anti-Rabbit IgG (whole molecule) – Alkaline phosphatase antibody* (Sigma), diluído em PBS leite 2% (1:10.000). Mais cinco lavagens com PBS foram feitas e, por último, a membrana foi revelada em BCIP/NBT (Sigma), na concentração indicada pelo fabricante (cada tablete dissolvido em 10 mL de água deionizada). A revelação foi interrompida com água destilada.

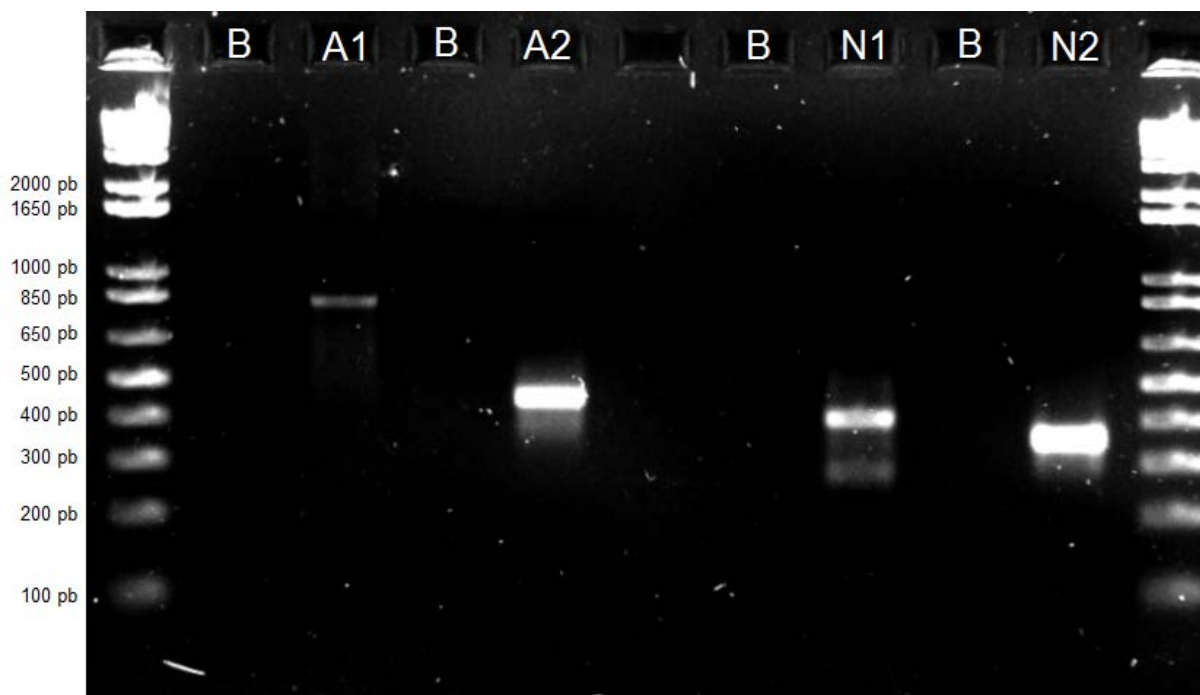
## 4- RESULTADOS

### 4.1 Identificação de genes de quinases na glândula salivar de *T. infestans*

A análise do proteoma e do transcriptoma de glândula salivar de *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius brethesi* revelou a existência de quinases desses insetos que poderiam ser secretadas (Bussacos 2008, 2011). Esses achados levaram-nos a investigar a presença de proteínas quinases na saliva de *T. infestans*. As reações de PCR amplificaram as seqüências homólogas aos genes arginina quinase putativa de *T. vitticeps* e nucleosídeo difosfato quinase, indicando a existência destes transcritos na glândula salivar. Mesmo utilizando *primers* direcionados para regiões conservadas dos genes, existe a possibilidade de não haver anelamento específico. Inicialmente, no caso das PCRs que não amplificaram, testaram-se todas as combinações possíveis de *primers* para aumentar a chance de amplificação. Esta estratégia permitiu amplificação do gene da NDK. Não se observou produto na PCR com os *primers* ND1 senso e reverso, mas quando foi usado ND2 senso e ND1 reverso houve amplificação esperada. A *nested* PCR para este gene foi realizada com apenas um *primer* interno, ND2 reverso (Figura 6).

A identidade das bandas foi confirmada por eletroforese dos produtos da *nested* PCR (Figura 6) e pelo seqüenciamento automático. As seqüências nucleotídicas obtidas estão representadas nas figuras 7 e 8. Realizou-se a busca de identidade da seqüência usando o algoritmo Blastn (disponível no site: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). O resultado da busca com seqüência de AK mostrou identidade de 97% com a AK de *T. vitticeps*, cobertura de 100% da seqüência e *e-value* igual a 0,0. A busca realizada com a seqüência de NDK mostrou identidade de 72% com o gene homólogo de *Apis mellifera*, cobertura de 98% da seqüência e *e-value* igual a  $3 \times 10^{-54}$ . Isto significa que se amplificaram os trechos esperados e que eles possuem alta conservação de nucleotídeos.

Foram feitas PCRs cujos alvos de amplificação eram as regiões codificadoras completas dos genes que tiveram expressão confirmada. Os produtos obtidos apresentavam tamanho esperado similar às seqüências homólogas (Figuras 9 e 10).



**Figura 6.** Eletroforese dos produtos amplificados por PCR. Ausência de produtos no controle sem DNA molde (B) mostra que não houve contaminação das reações nem dimerização dos *primers*. Produtos de PCR com os primers AD1 senso e reverso (A1), AD2 senso e reverso (A2), ND2 senso e ND1 reverso (N1), ND2 senso e reverso (N2). Amplicons apresentaram tamanho esperado: A1 = 830 pb; A2 = 460 pb; N1 = 400 pb; N2 = 350.



**Figura 7. A)** Seqüência nucleotídica de arginina quinase presente na glândula salivar de *Triatoma infestans*. Regiões reconhecidas pelos respectivos *primers* estão sublinhadas. **B)** Seqüência protéica de arginina quinase predita a partir da região codificadora obtida. Destacou-se em amarelo os resíduos que interaçõem com arginina e em azul resíduos que interagem com ADP. O resíduo glicina, em verde, interage com arginina e ADP. A região sublinhada corresponde a um domínio de especificidade ao substrato.

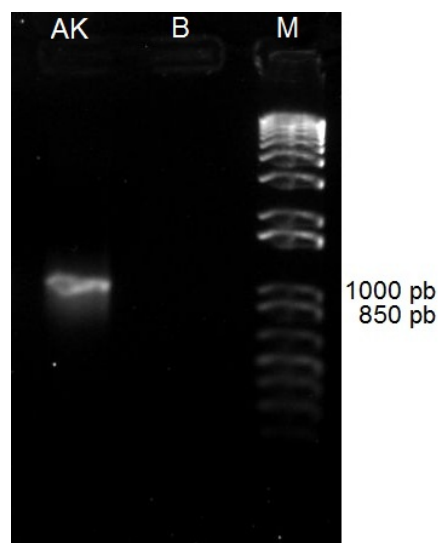


```

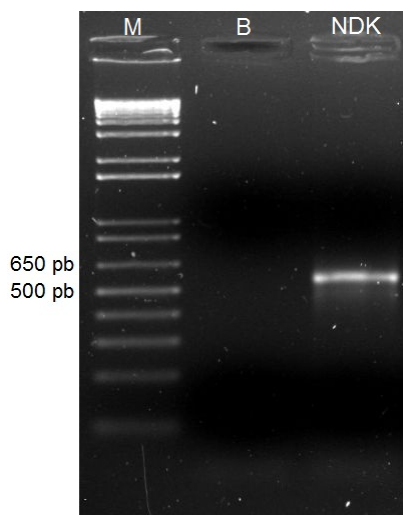
      10      20      30      40      50      60      70      80
1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   ATGGTTAAGCCTGATGGTGTTCAGAGAGGTTTGGTAAACAAAATTATAAAAACGTTTGAACAAAAGGTTTTAAGCTAGT
   ND2 senso
      90     100     110     120     130     140     150     160
81 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   TGCAATGAAATTCATGTGGGCTTGCACGATCTTCTACAGAAACACTACGAAGATTGGCTGAAAGACCATTTTTTCCTA
      170     180     190     200     210     220     230     240
161 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   AGTTAATTAATATATGAGCTCTGGCCCTGTTGTTCTATGGTTTGGGAAGGACTCAATGTAGTTAAAACAGGCCGCCAG
      250     260     270     280     290     300     310     320
241 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   ATACTTGGTGCTACAGATCCGCAAGCTTCAGAGAGAGGTTCAATTCGAGGTGACCTTTGTATCCAAGTTGGAAGAAATAT
      330     340     350     360     370     380     390     400
321 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   TGCCCATGGTTCTGATCTGTTGAATCCGCGAAGAAGGAAATTAATCTTTGGTTTGACCCAAAAGAAGTGTGGACTGGA
   ND 2 reverso
   ND 1 reverso
      .....|.....
401 AACCAACC

```

**Figura 8.** Seqüência obtida de nucleosídeo difosfato quinase presente na glândula salivar de *Triatoma infestans*. Regiões reconhecidas pelos *primers* estão sublinhadas.



**Figura 9.** Eletroforese do produto de PCR correspondente à região codificadora da arginina quinase. Marcador molecular (M) indicou tamanho esperado de aproximadamente 1080 pares de base. (B) controle sem DNA molde.



**Figura 10.** Eletroforese em agarose do produto de PCR correspondente à região codificadora da nucleosídeo difosfato quinase (NDK) confirmou tamanho de aproximadamente 500 pares de base.

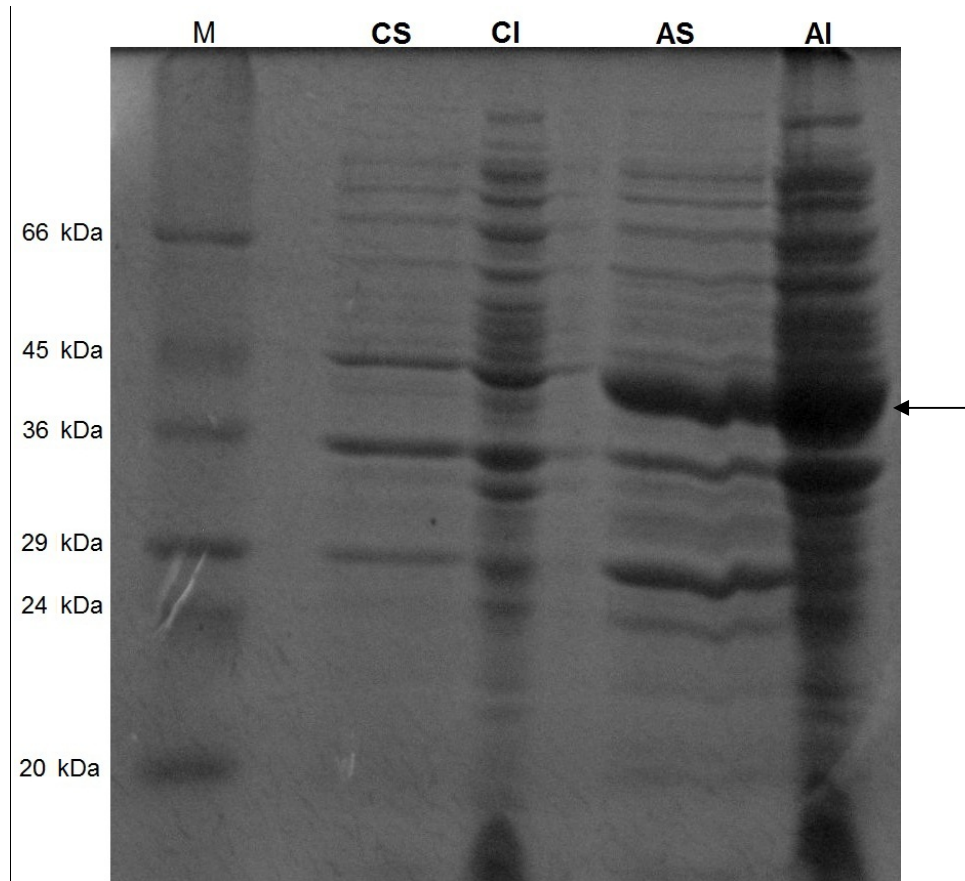
#### **4.2 Clonagem em vetor de expressão e seqüenciamento**

A clonagem em vetor de expressão foi realizada apenas para o gene da arginina quinase. Tentativas de clonagem do gene NDK em vetor de expressão não foram bem-sucedidas. Colônias foram selecionadas por PCR para confirmar se tinham o plasmídeo integrado. Enviou-se vetor de expressão pET-28a ligado à seqüência de AK para seqüenciamento automático (Figura 7). O seqüenciamento confirmou o sucesso da clonagem e permitiu verificar se a proteína recombinante estaria na fase de leitura correta. Os resultados mostraram que há transcrição do gene NDK na glândula salivar. Porém, a clonagem no vetor de expressão ainda não foi obtida.

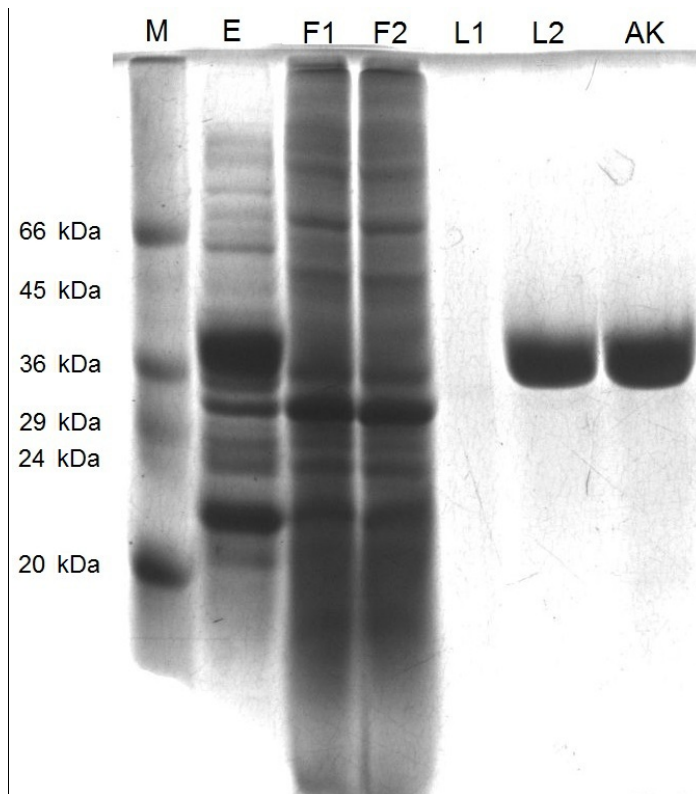
#### **4.3 Expressão e purificação de arginina quinase**

Após clonagem do gene arginina quinase em vetor de expressão, foi possível obter uma proteína de tamanho esperado nas frações solúvel e insolúvel (Figura 11). A cromatografia de afinidade foi bem-sucedida (Figura 12), permitindo purificação de até 5 mg de AK purificada. Observa-se na figura 12 uma perda de

proteína na segunda lavagem, o que resultou em diminuição do rendimento total na eluição final.



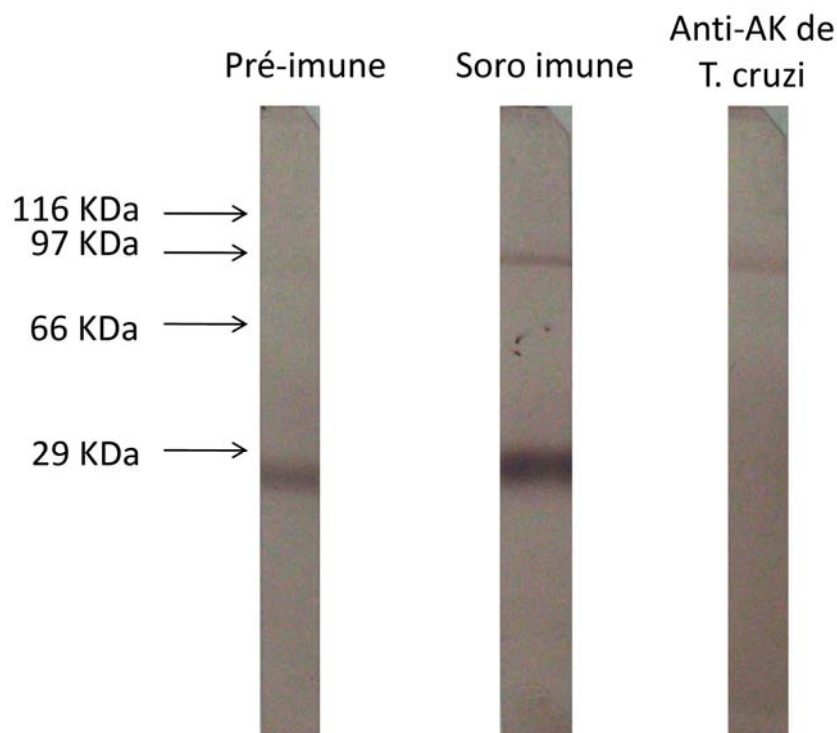
**Figura 11.** SDS-PAGE 12% de extratos das culturas de *Escherichia coli* usadas para teste de expressão de AK recombinante. Extrato bacteriano foi dividido em fração solúvel e insolúvel. Usou-se uma bactéria da mesma linhagem transformada com o pET-28a sem inserto como controle. Culturas celulares foram induzidas com 1 mM de IPTG. A bactéria transformada com o pET-28a+AK expressou grande quantidade de proteína com peso molecular entre 36 e 45 kDa (Seta). CS, fração solúvel do controle. CI, fração insolúvel do controle. AS, fração solúvel da cultura experimental. AI, fração insolúvel da cultura experimental.



**Figura 12.** SDS-PAGE 12% das etapas de isolamento de AK recombinante por coluna de afinidade. M, marcador. E, extrato celular. F1, primeira passagem de extrato pela coluna. F2, segunda passagem de extrato. L1, primeira lavagem. L2, segunda lavagem. AK, eluição da proteína purificada.

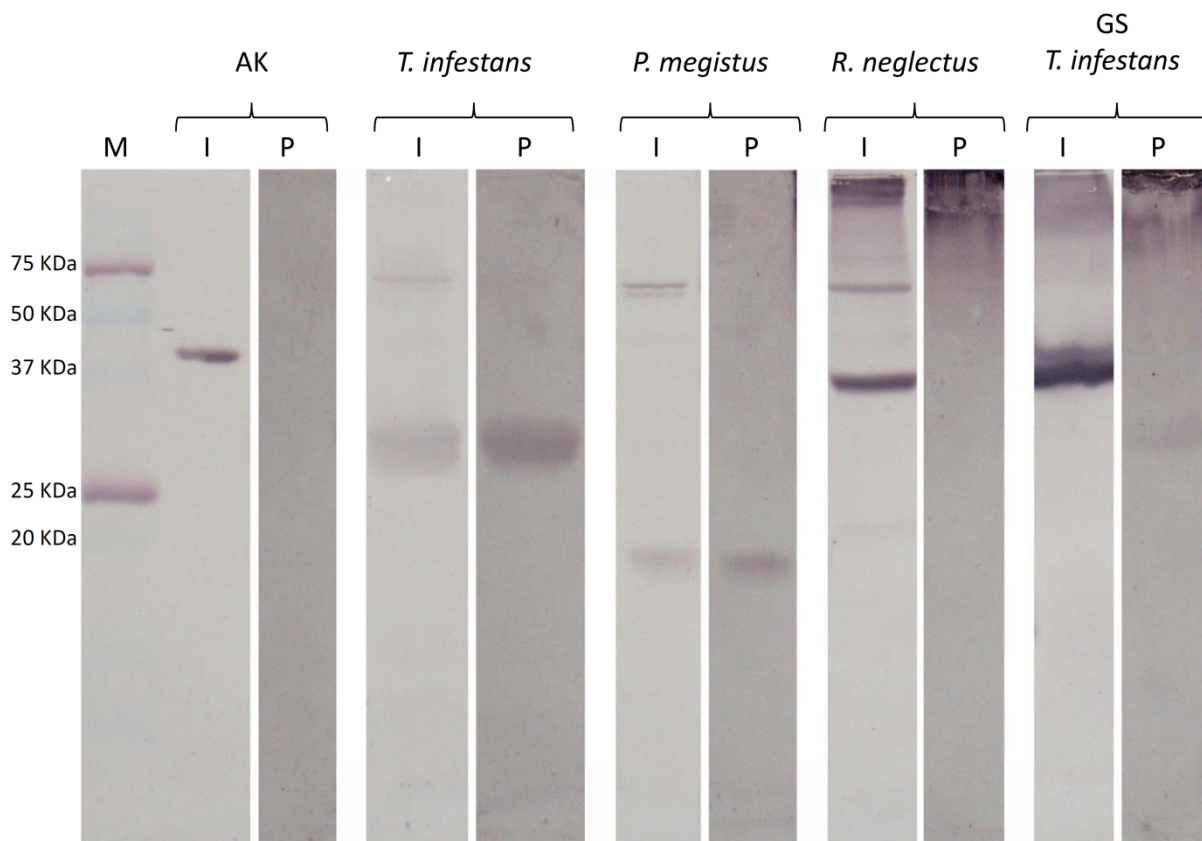
#### 4.4 Identificação de arginina quinase na saliva de *T. infestans*

O ensaio de *Western blot* permitiu verificar a presença de AK na saliva ejetada espontaneamente e coletada de *T. infestans*. O tamanho observado da proteína nativa na saliva foi maior que o esperado (Figura 13), indicando possíveis alterações pós-traducionais ou formação de dímeros.



**Figura 13.** *Western blot* de saliva total de *Triatoma infestans*. Proteínas separadas em SDS-PAGE 12,5%. Usou-se soro pré-imune, imune anti-AK e soro anti-AK de *Trypanosoma cruzi*. Observou-se tamanho de aproximadamente 75 kDa para a proteína nativa. O soro anti-AK de *T. cruzi* reconheceu os epítomos conservados, corroborando a alta conservação das seqüências de AK de diferentes organismos.

Foi realizado um segundo ensaio de *Western blot* para verificar expressão de AK na saliva de outras espécies de Triatomíneos (Figura 14). O resultado mostrou que o gene também é expresso em outros triatomíneos. Os anticorpos específicos identificaram bandas em torno de 75 kDa na saliva de *T. infestans* e *P. megistus*, enquanto que na glândula salivar de *T. infestans* foi observada banda de aproximadamente 37 kDa. Na saliva de *R. neglectus* observou-se duas bandas com aproximadamente 37 e 75 kDa.



**Figura 14.** *Western blot* de saliva de vários triatomíneos. Proteínas separadas em SDS-PAGE 12,5%. Comprovou-se a especificidade do soro imune, pois a proteína reconhecida não é identificada pelo soro pré-imune. Observa-se a presença de uma proteína de peso molecular próximo a 75 kDa na saliva de *T. infestans*, *P. megistus* e *R. neglectus*. Em *R. neglectus* e na glândula salivar de *T. infestans* foi reconhecida um banda próxima a 37 kDa. AK, arginina quinase recombinante. GS, proteínas citosólicas da glândula salivar. I, soro imune. P, soro pré-imune.

## 5- DISCUSSÃO

O estudo da saliva de triatomíneos tem ajudado a compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo biológico da hematofagia. Nas últimas décadas, foram descritas diversas proteínas salivares com características e funções variadas. Os transcriptomas de glândulas salivares tradicionalmente dividem transcritos em duas classes: constitutivos e secretados (Santos e cols, 2007; Assumpção, 2008; Kato e cols, 2010). Esses trabalhos desconsideraram a possibilidade genes constitutivos serem secretados e desempenharem alguma função diferente do esperado. Charneau e colaboradores (2008) encontraram proteínas constitutivas secretadas na saliva *T. infestans*. No entanto, eles também não consideraram a hipótese de tais proteínas desempenharem alguma função no processo alimentar do inseto. O presente trabalho se baseou em achados provindos de trabalhos anteriores (Oliveira, 2005; Bussacos, 2008) para confirmar a presença de quinases na saliva de *T. infestans*.

Utilizamos diferentes combinações de *primers*, deduzidos a partir de seqüências obtidas por Bussacos (2008), para amplificar os genes NDK e AK, confirmando a existência destas quinases na glândula salivar. Os outros alvos, arginina quinase de *D. melanogaster* e fosfoglicerato quinase, não foram amplificados por PCR, o que sugere que estes genes poderiam não estar sendo expressos no momento da coleta de glândulas salivares, ou são substancialmente diferentes. No entanto, não se pode afirmar que eles não são transcritos nas glândulas salivares de *T. infestans* em algum momento. A transcrição gênica é um processo dependente de muitos fatores reguladores, fazendo que o transcriptoma de uma célula seja variável de acordo com as condições às quais está exposta. No caso de triatomíneos, o tempo após a alimentação pode alterar a expressão gênica da glândula salivar (Faudry e cols, 2004). Bussacos (2008) identificou peptídeos que corresponderam a duas isoformas diferentes de AK. Encontrou-se apenas uma delas nesta análise de *T. infestans*, que é semelhante à AK putativa de *T. vitticeps*.

## 5.1 Arginine Quinase

A arginina quinase encontrada na saliva de *T. infestans* apresenta uma alta identidade com as AKs de outros organismos (Figura 15), o que corrobora o surgimento ancestral da enzima na evolução dos insetos. Até o presente momento, não existem relatos da existência dessa proteína na saliva de outros insetos. Neste trabalho, confirmou-se pela primeira vez a secreção de uma quinase, tida como constitutiva na saliva de um inseto hematófago.



**Figura 15.** Alinhamento de seqüências de AKs de vários organismos com a AK de *T. infestans*. Em preto, destacou-se resíduos com identidade em todos os organismos e, em cinza, sítios conservados.



A banda identificada por *Western blot* com soro anti-AK possui tamanho maior (75 KDa) que o esperado (Figuras 13 e 14). O método permite identificação dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos policlonais, mas existe a chance de haver reconhecimento de epítomos comuns a outras proteínas. Apesar de existir a possibilidade de haver reconhecimento de alguma proteína salivar de maior peso molecular pelos anticorpos, este não parece ser o caso. Primeiramente, porque se identificou AK com soro purificado anti-AK de *T. cruzi*. Quando a proteína foi isolada da glândula salivar de *T. infestans* observou-se apenas uma banda com cerca de 37 KDa, tamanho esperado para AKs de invertebrados. Sabe-se que AK tem a capacidade de formar dímeros, e o tamanho observado na saliva corresponde ao dobro do tamanho da proteína nativa, pouco menos de 75 KDa. Se o soro estivesse reconhecendo alguma proteína salivar de maior peso, ele poderia reconhecer também a mesma entre as proteínas citosólicas, o que não ocorreu. Uma possível explicação é que as interações do dímero podem não ter sido quebradas pela fervura em tampão de amostra com  $\beta$ -mercaptoethanol. Além disso, o dímero pode ter se restabelecido após a fervura devido a uma possível baixa atividade do  $\beta$ -mercaptoethanol, agente redutor que rompe pontes dissulfeto. Assim, se a estrutura original for mantida, pode ocorrer a redimerização (Wright-Weber e cols, 2006).

Neste cenário, surge a dúvida de porquê se encontrou os dímeros apenas na saliva secretada e não na glândula salivar. Pode ser que exista maior tendência à formação de dímeros apenas nas condições salivares. Esta hipótese parece ser confrontada pela análise da saliva de *R. neglectus*, onde foram identificadas duas bandas de aproximadamente 35 e 70 KDa no extrato salivar (Figura 14). Entretanto, não se pode afirmar que as proteínas de *R. neglectus* são todas exclusivas da secreção salivar, visto que o método usado pode incorrer no rompimento de células glandulares e liberação do seu conteúdo.

Glândulas salivares de triatomíneos têm dois tipos de secreção: merócrina (glândulas D1) e apócrina (glândulas D2). A primeira consiste na exocitose apenas dos produtos específicos com sinal para secreção. A segunda é feita por fluxo contínuo de secreção do citoplasma para o lúmen da glândula (Lacombe, 1999). AK de *T. infestans* não possui peptídeo-sinal e, possivelmente, ela seria secretada pela glândula D2 por via apócrina. Experimentos de citolocalização deverão ser conduzidos para confirmar essa hipótese.

Na maioria dos casos, AK é monomérica, mas tem a propriedade de formar dímeros dependendo das condições, assim como outras guanidino quinases. Nossos resultados sugerem que a AK da saliva de triatomíneos é dimérica, diferindo da AK da glândula salivar, cujo tamanho é compatível com a forma monomérica. As creatina quinases, presentes principalmente em vertebrados, são encontradas majoritariamente na forma de homodímeros. Neste caso, a dimerização é cooperativa aumentando a eficiência da enzima. Mas no caso da AK, não se sabe qual repercussão da formação de dímeros (Held e cols, 2007).

O papel fisiológico que esta proteína apresenta varia de acordo com o organismo em que ela é encontrada. Na saliva de triatomíneos, é possível que tenha alguma importância para o processo de hematofagia. Experimentos adicionais deverão ser realizados para confirmar essa hipótese.

Os estudos atuais de saliva de triatomíneos estão focados nas proteínas tradicionalmente secretadas, deixando de lado genes que, por comparação, são considerados constitutivos. Não há razão para excluir a possibilidade destes genes, quando secretados, terem alguma função diferente. Seria a AK encontrada uma proteína que convergiu evolutivamente para função semelhante à observada nos venenos de pompilídeos? Apesar de Yamamoto e colaboradores (2007) não terem verificado a mesma paralisação muscular em invertebrados quando usaram a proteína de 40 kDa, os testes não foram feitos em mamíferos. Pode haver alguma interação de AK da saliva de *T. infestans* com musculatura lisa dos vasos sangüíneos. Esta possibilidade deve ser investigada em trabalhos posteriores. Caso seja confirmada a função de relaxamento muscular, a AK provavelmente terá ação vasodilatadora. Nenhuma substância com tal papel foi confirmada empiricamente em espécies da tribo Triatomini, contrastando com barbeiros da tribo Rhodniini, que possuem as nitroforinas como poderosos vasodilatadores.

Além disso, encontrar AK na saliva de barbeiros leva a perguntar se outros reduvídeos também poderiam usar a mesma substância em sua saliva para facilitar a captura de suas presas. Eles alimentam-se de artrópodes relativamente grandes, e, para sugar sua presa, o uso de paralisantes é uma ótima estratégia. Gillott (2005d) cita como característica de grande parte dos reduvídeos predadores o uso de substâncias paralisantes de tecidos. Alguns autores se referem à saliva destes predadores como veneno, que não tem ação no seu próprio organismo.

Existem reduvídeos que se alimentam preferencialmente de aranhas (Wignall & Taylor, 2010), trazendo a possibilidade de AK desempenhar função paralisante nas mesmas e ser usada para imobilização, como fazem as vespas. A AK teria ganho função vasodilatadora quando triatomíneos começaram a se alimentar de sangue vertebrado. Testes de *Western blot* com anticorpos específicos poderão ser realizados com saliva de outros reduvídeos a fim de esclarecer estas questões.

Foi encontrada AK na glândula salivar de outro inseto (Konishi e cols, 2009), mas ainda não há registros de AK na saliva de outro organismo. Ao se analisar uma característica com expectativa de encontrar uma função, pode-se incorrer no erro da análise superficial chamada “adaptacionista”, criticada por Gould e Lewontin, e esquecer-se dos “spandrels”. Spandrel é um termo usado para se referir às características que evoluíram para uma função, mas não sofreram pressão seletiva para desempenharem a mesma, podendo ser considerada como subproduto da evolução de outra característica (Gould & Lewontin, 1979). É vasta a literatura científica que caracteriza as informações ligadas à função energética da AK, contudo outras possíveis funções não devem ser descartadas. A AK no veneno de pompilídeos é um exemplo em que a proteína adquiriu papel completamente diferente da função que tinha evoluído anteriormente. A remoção de parte da seqüência original da proteína permite interações que a levam ao efeito paralisante. Desta forma, várias outras possibilidades devem ser examinadas, incluindo a chance de não haver função alguma. A AK pode ter função energética na glândula e ser secretada com parte do citoplasma em um evento evolutivo fortuito.

### 5.1.1 Papel Alergênico da Arginina Quinase

Existem registros de reações alérgicas causadas por AK oriunda de vários invertebrados. A alergia a certos crustáceos é um problema alimentar que atinge boa parte da população mundial. A tropomiosina é o mais conhecido alérgeno proveniente desta fonte alimentar. A AK foi identificada como outro importante alérgeno de crustáceos, que pode desencadear reações de hipersensibilidade tipo I em indivíduos sensibilizados. Testes sorológicos mostram que pessoas com alergia a camarão produzem anticorpos anti-AK. Estes soros podem também reconhecer AK de outros crustáceos, devido à alta conservação evolutiva desta proteína (Yu e

cols, 2003). Pacientes com alergia ao caranguejo (*Chionoecetes opilio*) também apresentam reatividade à AK (Abdel Rahman e cols, 2011).

Mariposas da espécie *Plodia interpunctella*, conhecidas como traça dos cereais, têm importância econômica por serem pragas bem distribuídas de grãos usados na alimentação humana. Durante o estágio larval, há maior produção de AK, provavelmente relacionada ao consumo elevado de energia nesta etapa do desenvolvimento. As larvas se nutrem de grãos e outros alimentos secos, inclusive o chocolate. Estes lepidópteros também podem causar prejuízos à saúde de quem consome alimentos contaminados, devido ao desencadeamento de reações alérgicas e asma (Binder e cols, 2001). Como a AK é bastante conservada entre os invertebrados (Safavi-Hemami e cols, 2010; Suzuki e cols, 1997; Kucharski & Maleszka, 1998), exposição aos alimentos contaminados poderia ser um primeiro contato que explicaria alergia (supostamente sem prévio contato) a outros alimentos que possuem alta quantidade de AK, como o camarão.

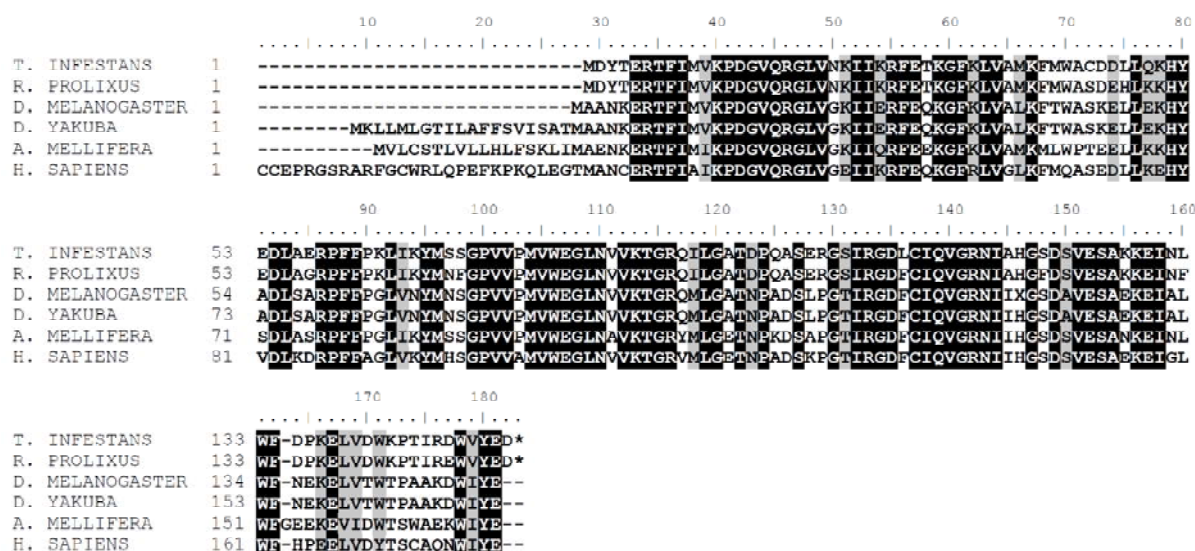
Baratas são artrópodos muito bem adaptados às condições criadas pelo homem e têm importância na saúde pública em todos continentes. Em adição às doenças que esses insetos transmitem, as baratas também são mais uma fonte potencial de AK no intra-domicílio e em contato com alimentos. Na Tailândia, alergia a baratas, causada principalmente pela AK, é um problema de saúde pública. Acredita-se que a exposição prolongada a AK desses insetos seja causa principal de ataques de asma no país (Sookrung e cols, 2006). Na Espanha, foi confirmado caso de asma desencadeada por AK de aranha doméstica comum (Bobolea e cols, 2010).

Picadas de triatomíneos podem levar a reações de hipersensibilidade tardia nos hospedeiros vertebrados (Hecht, 2006). A procalina é o principal alérgeno conhecido da saliva. Como a AK de *T. infestans* é homóloga a outras AKs de outras espécies, ela poderia também causar reações adversas no hospedeiro, como ocorre com AKs de outros organismos. Estudos posteriores poderão elucidar o papel da AK em reações de hipersensibilidade humanas e contato com triatomíneos.

## **5.2 Nucleosídeo difosfato quinase**

A Nucleosídeo Difosfato Quinase (NDK) é uma proteína com seqüência conservada entre diferentes grupos de animais (Figura 16). Tem atividade crucial no

desenvolvimento embrionário dos insetos holometábolos. Participam da formação dos discos que darão origem às asas. Inatividade desta enzima resulta em discos anormais e morte, por isso o gene é chamado também de AWD (*Abnormal Wing Discs*) nos insetos. É conhecida também pela relação com alguns tipos de tumores em insetos e outros animais (Timmons & Shearn, 2000). O gene humano homólogo é chamado mn23 e é um reconhecido supressor de metástase tumoral. Nos insetos, a NDK participa de vários processos celulares apresentando a capacidade de transferir fosfato do ATP para nucleotídeos 5'-difosfato, com exceção do ADP (Inoue e cols, 1996).



**Figura 16.** Alinhamento de seqüências de NDKs de vários organismos com a NDK de *T. infestans*. Em preto destacou-se resíduos com identidade em todos os organismos e em cinza sítios conservados.

Transcritos de NDK provenientes de glândulas salivares de *T. infestans* foram encontrados por Assumpção e cols (2008) e classificados como “gene constitutivo não secretado”. No entanto, Bussacos (2008) identificou seqüências peptídicas que correspondiam a este gene por análises de LC-MS/MS da glândula salivar de *P. megistus* e *R. brethesi*. Proteínas constitutivas já foram encontradas na saliva de *T. infestans*, provavelmente secretadas junto com parte do citoplasma (Charneau e cols, 2007). Ainda são necessários mais experimentos que confirmem a secreção da NDK na saliva. Desta forma, fica a dúvida se a NDK encontrada é mesmo uma proteína secretada e se teria participação na hematofagia.

Caso seja confirmada a secreção da NDK, quais seriam suas prováveis funções? A NDK participa de processos variados em diferentes organismos, tornando-se difícil inferir qual seria seu papel na saliva de um inseto hematófago. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de a NDK ter uma nova função na fisiologia do repasto sangüíneo. Assim como a AK adquiriu função paralisante muscular em veneno de vespas, a NDK poderia atuar em vias relacionadas à hematofagia.

Uma sugestão para possível ação da NDK na saliva seria relação com restauração dos mecanismos de reparo local da picada. Ao fim do repasto, o barbeiro deixa saliva no local, assim como um pequeno ferimento em um vaso (Soares e cols, 2006). A presença dos inibidores de agregação plaquetária, vasodilatadores e anticoagulantes no sítio da picada deveria provocar um pequeno sangramento, que não é observado. O paradoxo pode ser explicado por alguma forma de restauração da agregação plaquetária induzida pelo inseto. Esta hipótese merece investigação. Caso exista tal mecanismo na saliva do triatomíneo, a NDK é uma enzima candidata a participar desta via, pois fosforila nucleosídeos e poderia ajudar na produção de ADP que estimula a agregação plaquetária.

## 6- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo presente trabalho permitem concluir que:

- Tanto a AK quanto a NDK são transcritas na glândula salivar de *T. infestans*;
- A similaridade das seqüências obtidas de AK e NDK com homólogos de outros organismos mostra que são enzimas altamente conservadas evolutivamente;
- Foi possível expressar AK solúvel em *E. coli* (BL21);
- Os testes de *Western blot* permitem concluir que AK é secretada na saliva de *T. infestans*, provavelmente na forma de homodímeros.

## 7- PERSPECTIVAS

A perspectiva do trabalho requer conclusão das análises restantes das quinases expressas nas glândulas salivares de *T. infestans*.

Espera-se clonar a NDK em vetor apropriado para expressão em bactéria ou outras células competentes. Serão feitas imunizações com a proteína purificada para produção de anticorpos e realização de testes de *Western blot*. Assim poderá se verificar se NDK também é secretada na saliva de *T. infestans*.

É necessário realizar testes de atividade enzimática das proteínas recombinantes e comparar com atividades das enzimas nativas, isoladas da saliva de triatomíneos. A atividade da proteína recombinante confirmará seu dobramento correto, permitindo a realização de testes de relaxamento muscular de vasos sanguíneos de coelhos. Este experimento ajudará a responder a questão da função proposta para AK na hematofagia.

Será realizado também isolamento com *immunobeads* magnéticas acopladas aos anticorpos específicos. A partir das proteínas nativas isoladas, poderão ser realizadas comparações de atividade entre proteína nativa e proteína recombinante.

Adicionalmente, também poderão ser realizados testes de coagulação sanguínea e agregação plaquetária para verificar se quinases podem interferir nestas vias. Todas estas respostas ajudarão elucidar a questão das quinases na saliva.



## 8- REFERÊNCIAS

ABDEL RAHMAN, A. M.; KAMATH, S. D.; LOPATA, A. L.; ROBINSON, J. J.; HELLEUR, R. J. Biomolecular characterization of allergenic proteins in snow crab (*Chionoecetes opilio*) and de novo sequencing of the second allergen arginine kinase using tandem mass spectrometry. **J Proteomics**, v. 74, n. 2, p. 231-41, 2011.

AMINO, R.; MARTINS, R. M.; PROCOPIO, J.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, M. A.; SCHENKMAN, S. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. **J Biol Chem**, v. 277, n. 8, p. 6207-13, 2002.

AMINO, R.; TANAKA, A. S.; SCHENKMAN, S. Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 31, n. 4-5, p. 465-72, 2001.

ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J. G.; SCHUCK, P.; RIBEIRO, J. M. Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. **J Biol Chem**, v. 278, n. 7, p. 4611-7, 2003.

ANDERSEN, J. F.; GUDDERRA, N. P.; FRANCISCHETTI, I. M.; RIBEIRO, J. M. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 58, n. 2, p. 97-105, 2005.

ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. A secreted salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase from a blood-feeding insect: allosteric activation by soluble phosphoinositides and phosphatidylserine. **Biochemistry**, v. 45, n. 17, p. 5450-7, 2006.

ANDERSON, J. M.; OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S.; MANS, B. J.; REYNOSO, D.; SEITZ, A. E.; LAWYER, P.; GARFIELD, M.; PHAM, M.; VALENZUELA, J. G. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. **BMC Genomics**, v. 7, p. 52, 2006.

ARAUJO, A.; JANSEN, A. M.; BOUCHET, F.; REINHARD, K.; FERREIRA, L. F. Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98 Suppl 1, p. 5-11, 2003.

ASSUMPCÃO, T. C.; FRANCISCHETTI, I. M.; ANDERSEN, J. F.; SCHWARZ, A.; SANTANA, J. M.; RIBEIRO, J. M. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 38, n. 2, p. 213-32, 2008.

ASSUMPCÃO, T. C. F.; CHARNEAU, S.; SANTIAGO, P. B. M.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; MENG, Z. J.; ARAUJO, C. N.; PHAM, V.; QUEIROZ, R. M. L.; DE CASTRO, C. N.; RICART, C. A.; SANTANA, J. M.; RIBEIRO, J. M. C. Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of *Dipetalogaster maxima*. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 2, p. 669-679, 2011.

AUSUBEL, F. M.; KINGSTON, R. E.; SEIDMAN, J. G.; STRUHL, K.; MOORE, D. D.; BRENT, R.; SMITH, J. A. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York, NY: John Wiley & Sons Inc, 2000.

AXELROD, D. I. A Theory of Angiosperm Evolution. **Evolution**, v. 6, n. 1, p. 29-60, 1952.

BÉRENGER, J. M.; PLUOT-SIGWALT, D. Special relationships of certain predatory Heteroptera Reduviidae with plants. First known case of a phytophagous Harpactorinae. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, v. 320, n. 12, p. 1007-1012, 1997.

BINDER, M.; MAHLER, V.; HAYEK, B.; SPERR, W. R.; SCHOLLER, M.; PROZELL, S.; WIEDERMANN, G.; VALENT, P.; VALENTA, R.; DUCHENE, M. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. **J Immunol**, v. 167, n. 9, p. 5470-7, 2001.

BOBOLEA, I.; BARRANCO, P.; PASTOR-VARGAS, C.; IRAOLA, V.; VIVANCO, F.; QUIRCE, S. Arginine Kinase from the Cellar Spider (*Holocnemus pluchei*): A New Asthma-Causing Allergen. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 155, n. 2, p. 180-186, 2010.

BRONSTEIN, J. L.; ALARCON, R.; GEBER, M. The evolution of plant-insect mutualisms. **New Phytol**, v. 172, n. 3, p. 412-28, 2006.

BURNET, M. **Natural history of infectious disease** 4<sup>a</sup> Ed. Cambridge: Cambridge Univ Press, 1972. 278 p.

BUSSACOS, A. C. **Proteoma e Transcriptoma comparativo das glândulas salivares de barbeiros das espécies de *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius robustus*, e *Panstrongylus megistus***. 2008. 95 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

BUSSACOS, A. C.; NAKAYASU, E. S.; HECHT, M. M.; ASSUMPCAO, T. C.; PARENTE, J. A.; SOARES, C. M.; SANTANA, J. M.; ALMEIDA, I. C.; TEIXEIRA, A. R. Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals. **J Proteomics**, 2011.

CAMPOS, I. T.; AMINO, R.; SAMPAIO, C. A.; AUERSWALD, E. A.; FRIEDRICH, T.; LEMAIRE, H. G.; SCHENKMAN, S.; TANAKA, A. S. Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 32, n. 9, p. 991-7, 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. inst. Oswaldo Cruz** v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHANG, S. Planetary environments and the origin of life. **Biol Bull**, v. 196, n. 3, p. 308-9; discussion 309-10, 1999.

CHAPMAN, A. D. **Number of Living Species in Australia and the World**. Canberra, Australia, 2009. Disponível em: <<http://www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/publications/other/species-numbers/2009/pubs/nlsaw-2nd-complete.pdf>>. Acesso em: 11/03/2011.

CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA, M.; COSTA, C. M.; PIRES, D. L.; FERNANDES, E. S.; BUSSACOS, A. C.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O.; SHEVCHENKO, A.; TEIXEIRA, A. R. L. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 268, n. 2-3, p. 265-276, 2007.

DAWKINS, R. **The Selfish Gene**. New York: Oxford University Press, 1976.

DE PAULA, A. S.; DIOTAIUTI, L.; SCHOFIELD, C. J. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta : Hemiptera : Reduviidae : Triatominae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, n. 3, p. 712-718, 2005.

DE SOUZA, O. S. K.; BAVIA, M. E.; DIAS LIMA, A.; GUIMARAES, I. C.; SOARES, E. S.; NASCIMENTO SILVA, M. M.; MENDONCA, J.; DE SANTANA MARTIN, M. Spatial distribution of triatomines (Reduviidae: Triatominae) in urban areas of the city of Salvador, Bahia, Brazil. **Geospat Health**, v. 5, n. 2, p. 199-203, May 2011.

DUJARDIN, J. P.; PANZERA, P.; SCHOFIELD, C. J. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 223-8, 1999.

EDWARDS, J. S. Action and Composition of Saliva of an Assassin Bug *Platymesis Rhadamanthus* Gaerst (Hemiptera, Reduviidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 38, n. 1, p. 61-8, 1961.

FAUDRY, E.; ROCHA, P. S.; VERNET, T.; LOZZI, S. P.; TEIXEIRA, A. R. Kinetics of expression of the salivary apyrases in *Triatoma infestans*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, n. 10, p. 1051-8, 2004.

FERREIRA, R. A.; LAZZARI, C. R.; LORENZO, M. G.; PEREIRA, M. H. Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? **PLoS One**, v. 2, n. 9, p. e932, 2007.

FLOWER, D. R. The lipocalin protein family: structure and function. **Biochem J**, v. 318 ( Pt 1), p. 1-14, 1996.

FLOWER, D. R. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1482, n. 1-2, p. 327-36, 2000.

FRANCISCHETTI, I. M.; RIBEIRO, J. M.; CHAMPAGNE, D.; ANDERSEN, J. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 17, p. 12639-50, 2000.

FRIEDRICH, T.; KROGER, B.; BIALOJAN, S.; LEMAIRE, H. G.; HOFFKEN, H. W.; REUSCHENBACH, P.; OTTE, M.; DODT, J. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. **J Biol Chem**, v. 268, n. 22, p. 16216-22, 1993.

GERMANO, M. D.; VASSENA, C. V.; PICOLLO, M. I. Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina. **Pest Manag Sci**, v. 66, n. 7, p. 705-8, 2010.

GILBERT, C.; SCHAACK, S.; PACE, J. K., 2ND; BRINDLEY, P. J.; FESCHOTTE, C. A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1347-50, 2010.

GILLOT, C. Insect Diversity. In: **Entomology**. 3. ed. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2005a. p.25-56.

- GILLOT, C. Evolution and Diversity. In: **Entomology**. 3. ed. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2005b. p.3-24.
- GILLOT, C. Postembryonic Development. In: **Entomology**. 3. ed. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2005c. p.623-654.
- GILLOTT, C. The Hemipteroid Orders. In: **Entomology**. 3. ed. Dordrecht, Netherlands: 2005d.
- GOULD, S. J.; LEWONTIN, R. C. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 205, n. 1161, p. 581-98, 1979.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. The insects. In: **Evolution of the Insects**. New York, NY: Cambridge University Press, 2005a. p.119-147.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. The Paraneopteran Orders. In: **Evolution of the Insects**. New York, NY: Cambridge University Press, 2005b. p.261-330.
- HECHT, M. M.; BUSSACOS, A. C.; LOZZI, S. P.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. *Triatoma infestans* chooses to feed upon immune prey. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 5, p. 893-900, 2006.
- HELD, B. C.; WRIGHT-WEBER, B.; GROSSMAN, S. H. Kinetic analysis of two purified forms of arginine kinase: absence of cooperativity in substrate binding of dimeric phosphagen kinase. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 148, n. 1, p. 6-13, 2007.
- HOFFMAN, D. R. Allergy to biting insects. **Clin Rev Allergy**, v. 5, n. 2, p. 177-90, 1987.
- HYPISA, V.; TIETZ, D. F.; ZRZAVY, J.; REGO, R. O.; GALVAO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Mol Phylogenet Evol**, v. 23, n. 3, p. 447-57, 2002.
- INOUE, H.; TAKAHASHI, M.; OOMORI, A.; SEKIGUCHI, M.; YOSHIOKA, T. A novel function for nucleoside diphosphate kinase in *Drosophila*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 218, n. 3, p. 887-92, 1996.
- KATO, H.; JOCHIM, R. C.; GOMEZ, E. A.; SAKODA, R.; IWATA, H.; VALENZUELA, J. G.; HASHIGUCHI, Y. A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 2, p. 184-91, 2010.
- KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol Today**, v. 16, n. 9, p. 381-7, 2000.
- KONISHI, H.; NODA H.; TAMURA, Y.; HATTORI, M. Proteomic analysis of the salivary glands of the rice brown planthopper, *Nilaparva lugens* (Stal) (Homoptera: Delphacidae). **Appl Entomol Zool**, v. 44, n. 4, p. 525-534, 2009.
- KUCHARSKI, R.; MALESZKA, R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. **Gene**, v. 211, n. 2, p. 343-9, 1998.
- LACOMBE, D. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 (4), p. 557-564, 1999.

LARDEUX, F.; DEPICKERE, S.; DUCHON, S.; CHAVEZ, T. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. **Trop Med Int Health**, Jun 9 2010.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. **Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas Disease**. New York, NY, p.123-520, 1979.

LOPEZ, L.; MORALES, G.; URSIC, R.; WOLFF, M.; LOWENBERGER, C. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 33, n. 4, p. 439-47, 2003.

MA, D.; WANG, Y.; YANG, H.; WU, J.; AN, S.; GAO, L.; XU, X.; LAI, R. Anti-thrombosis repertoire of blood-feeding horsefly salivary glands. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 9, p. 2071-9, 2009.

MAEDA, M. H. **Ocorrência e Infecção Natural de Triatomíneos Sinantrópicos (Hemiptera: Reduviidae) no Distrito Federal, Brasil, entre 2002 E 2010**. . XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Natal: Resumos do XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2011.

MARCOGLIESE, D. J. Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? **Int J Parasitol**, v. 35, n. 7, p. 705-16, 2005.

MARCONDES, C. B. **Entomologia**. São Paulo, SP: Atheneu, 2001. 432 p.

MEDRANO-MERCADO, N.; UGARTE-FERNANDEZ, R.; BUTRON, V.; UBER-BUSEK, S.; GUERRA, H. L.; ARAUJO-JORGE, T. C.; CORREA-OLIVEIRA, R. Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 423-30, 2008.

MEISER, C. K.; PIECHURA, H.; WERNER, T.; DITTMAYER-SCHAFFER, S.; MEYER, H. E.; WARSCHEID, B.; SCHAUB, G. A.; BALCZUN, C. Kazal-type inhibitors in the stomach of *Panstrongylus megistus* (Triatominae, Reduviidae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 40, n. 4, p. 345-53, 2010.

MENDE, K.; PETOUKHOVA, O.; KOULITCHKOVA, V.; SCHAUB, G. A.; LANGE, U.; KAUFMANN, R.; NOWAK, G. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. *Dipetalogaster maxima* cDNA cloning, expression and characterization. **Eur J Biochem**, v. 266, n. 2, p. 583-90, 1999.

MESQUITA, R. D.; CARNEIRO, A. B.; BAFICA, A.; GAZOS-LOPES, F.; TAKIYA, C. M.; SOUTO-PADRON, T.; VIEIRA, D. P.; FERREIRA-PEREIRA, A.; ALMEIDA, I. C.; FIGUEIREDO, R. T.; PORTO, B. N.; BOZZA, M. T.; GRACA-SOUZA, A. V.; LOPES, A. H.; ATELLA, G. C.; SILVA-NETO, M. A. Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infect Immun**, v. 76, n. 12, p. 5543-52, 2008.

MORITA, A.; ISAWA, H.; ORITO, Y.; IWANAGA, S.; CHINZEI, Y.; YUDA, M. Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. **FEBS J**, v. 273, n. 13, p. 2955-62, 2006.

MOTT, K. E.; DESJEUX, P.; MONCAYO, A.; RANQUE, P.; DE RAADT, P. Parasitic diseases and urban development. **Bull World Health Organ**, v. 68, n. 6, p. 691-8, 1990.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; HAENDLER, B.; DONNER, P.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; SCHLEUNING, W. D. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **J Biol Chem**, v. 270, n. 48, p. 28629-34, 1995.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; KRATZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; VERHALLEN, P.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W. D. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. **J Biol Chem**, v. 269, n. 7, p. 5050-3, 1994.

NOIREAU, F. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 60-4, 2009.

OLIVEIRA, E. S. F. **Aspectos funcionais das 5'-Nucleotidases na saliva de *Triatoma infestans***. 2005. 103 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

PADDOCK, C. D.; MCKERROW, J. H.; HANSELL, E.; FOREMAN, K. W.; HSIEH, I.; MARSHALL, N. Identification, cloning, and recombinant expression of procalin, a major triatomine allergen. **J Immunol**, v. 167, n. 5, p. 2694-9, 2001.

PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W. Phylogenetic multi-locus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 608-621, 2010.

PICOLLO, M. I.; VASSENA, C.; SANTO ORIHUELA, P.; BARRIOS, S.; ZAIDEMBERG, M.; ZERBA, E. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. **J Med Entomol**, v. 42, n. 4, p. 637-42, 2005.

REDDY, S. R.; HOUMEIDA, A.; BENYAMIN, Y.; ROUSTAN, C. Interaction in vitro of scallop muscle arginine kinase with filamentous actin. **Eur J Biochem**, v. 206, n. 1, p. 251-7, 1992.

REIS, M. M.; MEIRELLES, R. M.; SOARES, M. J. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Tissue Cell**, v. 35, n. 5, p. 393-400, 2003.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu Rev Entomol**, v. 32, p. 463-78, 1987.

RIBEIRO, J. M.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M. A.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M. K.; VALENZUELA, J. G. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 34, n. 1, p. 61-79, 2004.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol**, v. 48, p. 73-88, 2003.

RIBEIRO, J. M.; SCHNEIDER, M.; GUIMARAES, J. A. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochem J**, v. 308 ( Pt 1), p. 243-9, 1995.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. 12 Introdução aos Artrópodos. In: **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo, SP: Editora Roca LTDA, 2005a. p. 577-598.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. 16 Insetos. In: **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo, SP: Editora Roca LTDA, 2005b. p. 803-840.

SAFAVI-HEMAMI, H.; YOUNG, N. D.; WILLIAMSON, N. A.; PURCELL, A. W. Proteomic interrogation of venom delivery in marine cone snails: novel insights into the role of the venom bulb. **J Proteome Res**, v. 9, n. 11, p. 5610-9, 2010.

SAHAYARAJ, K.; BORGIO, J. F.; MUTHUKUMAR, S.; ANANDH, G. P. Antibacterial activity of *Rhynocoris marginatus* (Fab.) and *Catamirus brevipennis* (Servile) (Hemiptera : Reduviidae) venoms against human pathogens. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 487-496, 2006.

SANCHEZ-GRACIA, A.; VIEIRA, F. G.; ROZAS, J. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. **Heredity**, v. 103, n. 3, p. 208-16, Sep 2009.

SANDOVAL, C. M.; ORTIZ, N.; JAIMES, D.; LOROSA, E.; GALVAO, C.; RODRIGUEZ, O.; SCORZA, J. V.; GUTIERREZ, R. Feeding behaviour of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colombia. **Med Vet Entomol**, v. 24, n. 2, p. 124-31, 2010.

SANTOS, A.; RIBEIRO, J. M.; LEHANE, M. J.; GONTIJO, N. F.; VELOSO, A. B.; SANT'ANNA, M. R.; NASCIMENTO ARAUJO, R.; GRISARD, E. C.; PEREIRA, M. H. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). **Insect Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 7, p. 702-12, 2007.

SARKIS, J. J.; GUIMARAES, J. A.; RIBEIRO, J. M. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. **Biochem J**, v. 233, n. 3, p. 885-91, 1986.

SCHAEFER, C. W. WHY ARE THE SUBFAMILY RELATIONSHIPS OF TRIATOMINAE (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) IMPORTANT? **Entomol. Vect.** , v. 12 (1), p. 19-35, 2005.

SCHLEHUBER, S.; SKERRA, A. Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins". **Drug Discov Today**, v. 10, n. 1, p. 23-33, 2005.

SCHOFIELD, C. J.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J. P. The process of domestication in Triatominae. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 375-8, 1999.

SCHOFIELD, C. J.; GALVAO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Trop**, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 12, p. 583-8, 2006.

SOARES, A. C. et al. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. **J Insect Physiol**, v. 52, n. 5, p. 468-72, 2006.

SOOKRUNG, N.; CHAICUMPA, W.; TUNGTRONGCHITR, A.; VICHYANOND, P.; BUNNAG, C.; RAMASOOTA, P.; TONGTAWEE, P.; SAKOLVAREE, Y.; TAPCHASRI, P. *Periplaneta americana* arginine kinase as a major cockroach allergen among Thai patients with major cockroach allergies. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 6, p. 875-80, 2006.

- SUZUKI, T.; KAWASAKI, Y.; FURUKOHRI, T. Evolution of phosphagen kinase. **Biochem J**, v. 328, p. 301-306, 1997.
- TAYLOR, S. S.; KORNEV, A. P. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. **Trends Biochem Sci**, v. 36, n. 2, p. 65-77, 2011.
- TEIXEIRA, A. R. L. **Doença de Chagas e Evolução**. Brasília, DF: Editora UnB, 2007. 304 p.
- THANGAMANI, S.; WIKEL, S. K. Differential expression of *Aedes aegypti* salivary transcriptome upon blood feeding. **Parasit Vectors**, v. 2, n. 1, p. 34, 2009.
- TIMMONS, L.; SHEARN, A. Role of AWD/nucleoside diphosphate kinase in *Drosophila* development. **J Bioenerg Biomembr**, v. 32, n. 3, p. 293-300, 2000.
- VALEN, L. V. A new evolutionary law. **Evolutionary Theory**, v. 1, n. 1, p. 1-30, 1973.
- VASSENA, C. V.; PICOLLO, M. I.; ZERBA, E. N. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. **Med Vet Entomol**, v. 14, n. 1, p. 51-5, 2000.
- VOIGT, C. C.; FASSBENDER, M.; DEHNHARD, M.; WIBBELT, G.; JEWGENOW, K.; HOFER, H.; SCHAUB, G. A. Validation of a minimally invasive blood-sampling technique for the analysis of hormones in domestic rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha). **Gen Comp Endocrinol**, v. 135, n. 1, p. 100-7, 2004.
- VOS, A. C.; MULLER, T.; NEUBERT, L.; VOIGT, C. C. Validation of a less invasive blood sampling technique in rabies serology using reduviid bugs (Triatominae, Hemiptera). **J Zoo Wildl Med**, v. 41, n. 1, p. 63-8, Mar 2010.
- WANG, X.; RIBEIRO, J. M.; BROCE, A. B.; WILKERSON, M. J.; KANOST, M. R. An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 39, n. 9, p. 607-14, 2009.
- WEIRAUCH, C. Cladistic analysis of Reduviidae (Heteroptera : Cimicomorpha) based on morphological characters. **Systematic Entomology**, v. 33, n. 2, p. 229-274, 2008.
- WEIRAUCH, C.; MUNRO, J. B. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. **Mol Phylogenet Evol**, v. 53, n. 1, p. 287-99, 2009.
- WHO. **Chagas Disease**. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas>>. Acesso em: 27/05/2011.
- WIGNALL, A. E.; TAYLOR, P. W. Predatory behaviour of an araneophagic assassin bug. **Journal of Ethology**, v. 28, n. 3, p. 437-445, 2010.
- WRIGHT-WEBER, B.; HELD, B. C.; BROWN, A.; GROSSMAN, S. H. Immunological and physical comparison of monomeric and dimeric phosphagen kinases: Some evolutionary implications. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 3, p. 364-71, 2006.
- XU, X.; YANG, H.; MA, D.; WU, J.; WANG, Y.; SONG, Y.; WANG, X.; LU, Y.; YANG, J.; LAI, R. Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by



coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 3, p. 582-90, 2008.

YAMAMOTO, T.; ARIMOTO, H.; KINUMI, T.; OBA, Y.; UEMURA, D. Identification of proteins from venom of the paralytic spider wasp, *Cyphononyx dorsalis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 3, p. 278-86, 2007.

YU, C. J.; LIN, Y. F.; CHIANG, B. L.; CHOW, L. P. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. **J Immunol**, v. 170, n. 1, p. 445-53, 2003.