



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular  
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

# **Diversidade molecular no proteoma e peptidoma da saliva de *Triatoma infestans***

**Siliana Martins Moraes**

Brasília-DF 2012



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular  
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

## **Diversidade molecular no proteoma e peptidoma da saliva de *Triatoma infestans***

**Siliana Martins Morais**

**Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau**

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Nunes de Araújo**

Laboratório de Interação Patógeno - Hospedeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção ao Grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília-DF 2012

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	5
APOIO FINANCEIRO .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
Doenças Tropicais Negligenciadas .....	12
Doença de Chagas.....	13
Triatomíneos vetores da doença de Chagas.....	16
Saliva e suas propriedades anti-hemostáticas .....	19
Vasodilatadores .....	19
Inibidores da coagulação sanguínea.....	20
Inibidores da agregação plaquetária .....	21
Proteômica .....	23
Estudos proteômicos de salivas de triatomíneos .....	24
Peptidômica da saliva de artrópodes .....	25
Justificativa.....	29
Objetivos .....	30
METODOLOGIA.....	31
Triatomíneos e obtenção da saliva.....	32
Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) .....	32
Quantificação proteica.....	33
Dessalinização em microcoluna Zip-Tip C18 para análise em MALDI-TOF/TOF .....	33
Fracionamento da saliva – microconcentradores .....	33
Eletroforese bidimensional – 2DE .....	34
Identificação das proteínas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) .....	34
Digestão tríplica em solução .....	34
Dessalinização em Ultra-Micro SpinColumn (C18) .....	35

Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS)....	35
Identificação das proteínas.....	36
Abordagem computacional de análise dos dados proteômicos gerados “bottom-up”:	37
Análise de sequências por bioinformática .....	37
Atividade ADPásica .....	38
RESULTADOS .....	40
Perfil eletroforético da saliva de <i>T. infestans</i> em gel unidimensional .....	41
Análise da saliva de <i>T. infestans</i> em MALDI-TOF/TOF.....	41
Fracionamento da saliva por ultrafiltração com base no tamanho molecular ...	43
Perfil eletroforético da saliva de <i>T. infestans</i> em gel bidimensional .....	43
Análise das frações proteicas salivares retidas e filtradas de <i>T. infestans</i> por espectrometria de massas de alto desempenho (do tipo nanoLC-MS/MS) .....	44
Fração filtrada de proteínas de massas moleculares $\leq 10$ kDa sem digestão por tripsina .....	44
Fração retida e filtrada de proteínas de massas moleculares $\leq 10$ kDa com digestão por tripsina.....	47
Análise de bioinformática .....	56
Atividade ADPásica.....	60
DISCUSSÃO .....	61
CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores **Prof. Sébastien Olivier Charneau e Prof<sup>a</sup> Carla Nunes de Araújo**, pelo apoio, incentivo e dedicação durante a realização desta pesquisa. Por acreditarem na minha capacidade, pelos ensinamentos, exemplo e orientação profissional, pela compreensão e carinho incondicionais! Por se tornarem ao longo do tempo mais que professores, meus amigos.

A todos os **professores do LBQP** pelo apoio e suporte sempre que necessário.

Ao **Prof. Magno Junqueira** pela colaboração e esclarecimentos.

Ao **Prof. Jaime Martins de Santana**, líder do grupo de pesquisa da saliva de triatomíneos, que disponibilizou a colônia de barbeiros para nossos estudos.

Aos **colegas e amigos** do laboratório, por todo esse tempo de convivência, pelas experiências que vivemos juntos, pelo ótimo ambiente de trabalho, pelas conversas e brincadeiras. Por sempre estarem dispostos a ajudar. Sei que alguns ficam por aqui, porém, outros vão comigo para a vida! Em especial, agradeço ao Rayner e ao Jaques por tudo que me ensinaram e ajuda que dispensaram a mim.

Aos **meus familiares**, Bete, Iro, Elisângela, Rodrigo e Davi, pelo suporte, incentivo, e principalmente pela paciência nos momentos de maior estresse. Vocês são o que há de mais importante e verdadeiro em minha vida! Minhas conquistas são todas para vocês e por vocês!

Aos **amigos externos** a UNB, por compreenderem minha ausência em momentos que precisaram de mim e por me incentivarem, pois, mesmo sem saber direito o que eu precisava fazer não faltaram palavras de apoio “você vai conseguir”.

A Deus, acima de tudo, minha fé me trouxe até aqui! “em Você eu sei me sinto forte, com Você não temo a minha sorte, e eu sei que isso veio de Você!” (Rosa de Saron)

## **APOIO FINANCEIRO**

Esta dissertação foi desenvolvida com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que concedeu a bolsa de estudos, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e do Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da UnB (DPP/UnB).

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-DE –	Eletroforese bidimensional
ABPs –	Proteínas Ligadoras de Aminas
ACN -	Acetonitrila
ADP –	Adenosina Difosfato
Als –	Inibidores de Agregação Plaquetária
AMP –	Adenosina Monofosfato
ATP –	Adenosina Trifosfato
DC –	Doença de Chagas
DHB –	ácido 2,5-diidroxibenzóico
DNDi –	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
DTN –	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT -	Ditiotreitol
IAA -	Iodoacetamida
IEF –	Focalização isoeétrica
IGP –	Gradiente de pH imobilizado
LPs –	Lipocalinas
MALDI-TOF/TOF –	<i>Matrix assisted laser desorption Ionization time of flight mass spectrometry</i>
MS –	Espectrometria de Massa
MS/MS -	Espectrometria de Massa em tandem
NO –	Óxido Nítrico
NPs –	Nitroforinas
OMS –	Organização Mundial de Saúde
ONG –	Organização Não Governamental
PAF –	Fator de Agregação Plaquetária
PMF -	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
RPAIs –	Inibidoras de Agregação Plaquetária em <i>Rhodnius prolixus</i>
SD –	Saliva Diluída
SDS-PAGE -	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
TFA -	Ácido trifluoroacético

## LISTA DE FIGURAS

CICLO DE TRANSMISSÃO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> (SIMPLIFICADO) .....	14
CICLO DE VIDA DE UM BARBEIRO.....	17
ANATOMIA E HISTOLOGIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES .....	18
A CASCATA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	20
FLUXOGRAMA .....	39
PERFIL ELETROFORÉTICO DA SALIVA.....	41
A E B. ESPECTROS DE MASSA PMF OBTIDOS EM MALDI-TOF/TOF.....	42
MAPA 2-DE DAS PROTEÍNAS SALIVARES SECRETADAS .....	44
ESPECTROS DE MASSAS .....	46
IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEO SINAL. ....	56
IDENTIFICAÇÃO POR MEIO DE SECRETOME P .....	57
ANÁLISE FEITA POR TARGETP.....	58
ANÁLISE POR TMHMM I.....	59
ATIVIDADE ADPÁSICA DA SALIVA DE <i>T. INFESTANS</i> . ....	60



## RESUMO

A doença de Chagas, doença tropical negligenciada, tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* e como um dos principais vetores o triatomíneo hematófago *Triatoma infestans*. Em sua saliva é possível encontrar moléculas biologicamente ativas que viabilizam o repasto sanguíneo. Nesse trabalho, caracterizamos o peptidoma salivar do *T. infestans*, conjunto de peptídeos secretados na saliva com massa molecular menor que 10 kDa.

A saliva secretada por *T. infestans* adultos foi coletada na ausência de inibidores de proteases. Após a quantificação, a integridade proteica das moléculas foi conferida por eletroforese unidimensional. Em seguida, por *peptide mass fingerprinting*, peptídeos com massa molecular de até 7.000 Da foram detectados na saliva. A saliva foi fracionada por centrifugação em microconcentradores com membrana de exclusão molecular de 10 kDa na presença de inibidores de proteases, gerando duas frações: 1) retida, contendo os polipeptídeos de massa molecular superior a 10 kDa; e 2) filtrada, contendo os peptídeos. A primeira foi analisada por gel eletroforético bidimensional e a segunda por nanoLC-MS/MS usando LTQ XL-Orbitrap (ThermoFisher Scientific), sem digestão trípica *in vitro*. A análise por nanoLC-MS/MS foi repetida após digestão trípica em solução e dessalinização em micro-coluna de C18. Ferramentas de bioinformática foram usadas para análise das sequências.

No total, foram identificadas 234 proteínas. 164 foram encontradas na fração retida, sendo 130 com função já conhecida na alimentação sanguínea. Na fração filtrada, das 70 sequências identificadas, oito têm uma massa molecular predita < 10 kDa e as outras 62 são fragmentos da proteólise de proteínas maiores. Por análises de bioinformática, observamos que 171 das proteínas apresentam peptídeo sinal de via clássica de secreção, e as demais, com exceção de três, são preditas como secretadas por vias não clássicas.

Para concluir, a primeira análise peptidômica da saliva de triatomíneo mostrou que a saliva de *T. infestans* é rica em peptídeos.

**Palavras-chave:** triatomíneos, saliva, peptidoma, eletroforese 2D, cromatografia líquida de alta desempenho, espectrometria de massa.

## ABSTRACT

Chagas disease, a Neglected Tropical Disease, is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted by insect vectors. *Triatoma infestans* is one of the main vectors of the disease. As other disease vectors, it is a hematophagous insect. Feeding behavior implies the production of biologically active molecules in saliva capable of inhibiting hemostasis, inflammatory and immune responses. At the present study, we conducted a broad analysis of the proteome and peptidome, the latter comprises the set of peptides with a molecular weight under 10 kDa, of the saliva of *T. infestans*.

Saliva was collected from insect adults in the absence of protease inhibitors. After protein quantification, the integrity of the proteins were analyzed by polyacrylamide-SDS gel electrophoresis. After that, by peptide mass fingerprinting, we detected peptides with molecular weight up to 7.000 Da. The saliva was then fractionated in the presence of a cocktail of protease inhibitors using a 10 kDa cut-off membrane. Two fractions were obtained: the retained (>10 kDa) and the filtrate (<10 kDa) fractions. The first was submitted to 2-DE electrophoresis, and the latter to nanoLC-MS/MS with reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled with a high throughput LTQ XL-Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher Scientific), in the absence of tryptic digestion *in vitro*. The nanoLC-MS/MS analysis was repeated after in-solution tryptic digestion and desalinization in C18 microcolumn.

A total of 234 proteins were identified. 164 proteins were found in the retained fraction, among which 130 have known functions. In the filtrate fraction, among 70 sequences identified, eight have predicted molecular weight lower than 10 kDa, and the other 62 were proteolytic fragments of higher molecular weight proteins. Bioinformatic analysis revealed that 171 proteins present signal peptides, three were not predicted to be secreted, and the other are secreted through non-classical pathways.

In conclusion, the first peptidomic analysis of a triatomine bug saliva showed that *T. infestans* saliva is plenty of peptides.

**Keywords:** triatomines, saliva, peptidome, 2D electrophoresis, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry.

# **INTRODUÇÃO**

## Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são doenças para as quais não há investimentos importantes em pesquisa e desenvolvimento de novas drogas e vacinas (Lindoso, *et al.* 2009). Esse grupo de doenças afeta principalmente pessoas da classe econômica baixa nas áreas rurais e urbanas, tendo impacto importante na diminuição da qualidade de vida e produtividade de indivíduos, famílias e comunidades nos países em desenvolvimento. A presença das DTNs entre indivíduos politicamente marginalizados, que não conseguem influenciar as decisões administrativas e governamentais que afetam sua saúde, resulta no agravamento da pobreza e cria grandes obstáculos ao desenvolvimento econômico (Lindoso, *et al.* 2009; WHO, 2010).

A maioria das DTNs são doenças de fácil prevenção e monitoramento. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou essas doenças em três categorias baseando-se na emergência, controle e disponibilidade de drogas para o tratamento. A primeira categoria inclui as DTNs emergentes e cujas transmissões não estão controladas (dengue, doença do sono e leishmanioses). A segunda inclui doenças para as quais há estratégias de controle, mas mesmo assim elas persistem (malária e esquistossomose); e a terceira inclui doenças para as quais as estratégias de controle tem se mostrado efectoras. A Doença de Chagas (DC) está inserida nesta última categoria, além da hanseníase, filariose linfática e oncocercose (Lindoso, *et al.* 2009). Entretanto, a prevenção e controle das DTNs e seus fatores de risco não tem recebido incentivo e alocação de recursos significativos, o que leva ao aumento das taxas de contaminação e de óbitos (WHO, 2010).

As DTNs afetam aproximadamente 2,6 bilhões de indivíduos no mundo (Hotez, *et al.* 2007). Os casos de co-infecção são um problema preocupante, pois favorece manifestações clínicas graves, falência terapêutica e o desfecho é frequentemente fatal (Lindoso, *et al.* 2009).

No Brasil, as DTNs que apresentam as maiores taxas de prevalência são a DC, malária, leishmanioses, esquistossomose, dengue, hanseníase,

oncocercose e filariose linfática. A prevalência de DTNs no país é elevada nas regiões norte e nordeste, onde há os menores índices de desenvolvimento humano (IDH) (Hotez, *et al.* 2008).

Em seu primeiro relatório sobre as DTNs, a OMS ressaltou a importância de incluir as DTNs nas prioridades em saúde por se tratarem de problemas de saúde pública mundiais. É necessário desenvolver novos métodos diagnósticos, novas drogas e intervenções estratégicas para controlar, prevenir e/ou eliminar as DTNs, como tratamento profilático, controle dos vetores e dos reservatórios, saneamento básico e fornecimento de água potável para a população. Os custos de algumas dessas ações são relativamente baixos se comparados aos de tratamentos caros como cuidados intensivos, cirurgias, internações sucessivas e prolongadas, necessários, por exemplo, para indivíduos acometidos pela DC (WHO, 2010).

## **Doença de Chagas**

As características clínicas, anatomopatológicas, epidemiológicas, o agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, e o inseto vetor da DC foram descritos em 1909 por Carlos Chagas (Brener *et al.*, 2000). No final dos anos 70, alta incidência da doença foi observada no Brasil, com aproximadamente 100.000 novos casos notificados por ano (Secretaria de vigilância em saúde – Consenso brasileiro de Doença de Chagas, 2005)

A DC é a doença parasitária mais importante da América Latina no que se refere ao impacto na economia regional, já que afeta os indivíduos em sua fase de vida mais produtiva e leva a óbito um número maior de pessoas que qualquer outra doença parasitária, incluindo a malária (Miles, *et al.* 2003). É transmitida através do contato do homem com as fezes do triatomíneo contaminadas com *T. cruzi*. Esse processo de transmissão ocorre logo após o repasto sanguíneo (Figura 1), quando o vetor se sacia e defeca. Consecutivamente essas fezes penetram na mucosa do indivíduo por meio de micro-lesões, até mesmo a causada pela picada do triatomíneo, ou por contato direto com a mucosa oral, nasal ou ocular, veiculada pela própria vítima (Prata, 2001).

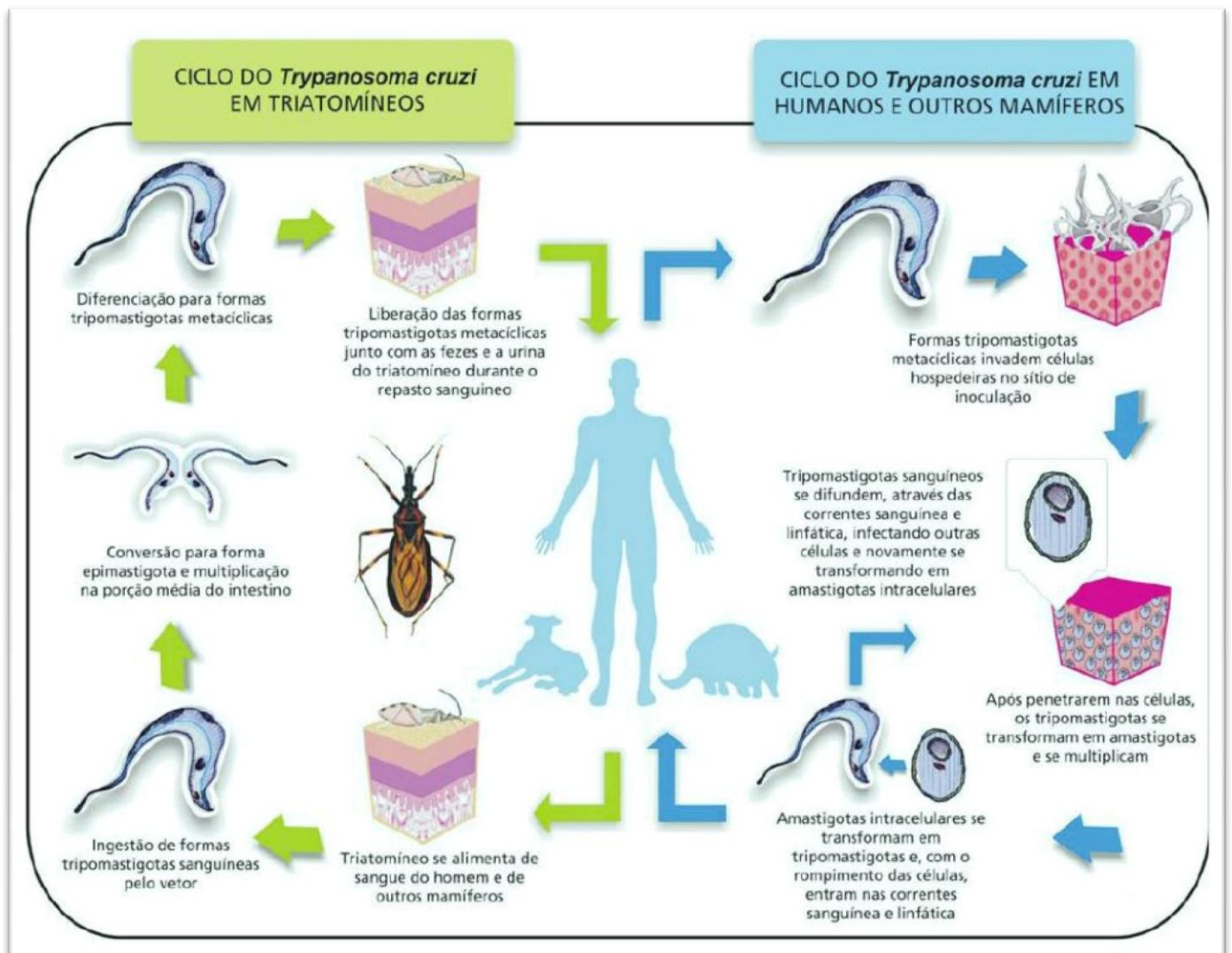


Figura 1 Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Fonte: infográfico: Nevício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

Embora essa seja a via clássica de transmissão existem outras de menor incidência, tais como: transfusão sanguínea, transmissão vertical, transmissão oral e acidentes laboratoriais (Dias, 2009). Atualmente ocorre uma maior disseminação desta doença na região amazônica devido a mudanças nas paisagens amazônicas, migração de populações vindas de áreas endêmicas, diversidade de reservatórios silvestres do *T. cruzi*, de espécies do vetor e transmissão oral por meio de frutas contaminadas com material infectante advindo de triatomíneos silvestres (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - Vigilância em Saúde. 2009. Available at: [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs) (acessado em julho 2012).

Os sintomas da DC na fase aguda incluem febre, mal-estar, edema facial, linfadenopatia generalizada e hepatoesplenomegalia, que podem levar ao óbito 5% das crianças acometidas. A fase indeterminada ocorre em geral de forma assintomática e pode durar anos, nos quais o paciente é transmissor do parasita. Na fase crônica ocorrem danos principalmente ao coração e ao trato gastrointestinal, sendo os problemas cardíacos os maiores responsáveis pelos casos de óbitos.(Tarleton, *et al.* 2007).

Um século após a sua descoberta, essa patologia ainda é considerada uma DTN pela OMS com cerca de 10 milhões de pessoas infectadas no mundo. Em 2008 causou cerca de 11.000 mortes na América Central e América do Sul. A estimativa do Ministério da Saúde é de que 2 a 3 milhões dos casos estejam localizados no Brasil (WHO, 2008).

Até o momento não existem tratamentos eficientes para a doença de Chagas. O repertório de fármacos disponíveis é limitado e inadequado. Dentre quimioterápicos utilizados de 1936 a 1970, a violeta de genciana é o antisséptico utilizado como agente profilático em bancos de sangue atualmente. Embora no início dos anos 70 tenham surgido dois compostos promissores devido à eficácia de cura na fase aguda (50-70%) e à tolerância dos pacientes aos medicamentos, o nifurtimox (Lampit®, da Bayer; 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) e o benzonidazol (Rochagan®, da Roche; N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida), na fase crônica da doença esses fármacos apresentaram menos que 20% de cura (Dias, 2009).

A DC é considerada prioritária entre as doenças infecto-parasitárias que recebem atenção da OMS por meio do Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR - *Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases*), isso se deve a ausência de vacinas e ao fato de o controle desta doença permanecer centrado em tratamentos farmacológicos (Nwaka, *et al.* 2006). Por isso, o desenvolvimento de novos fármacos é iminente agora e continuará a ser no futuro, considerando que os parasitos desenvolvem resistência aos quimioterápicos mais usados através de mecanismos diversos (Andricopulo, *et al.* 1998; Sealey-Cardona, *et al.* 2007; Kola, 2008; McKerrow, *et al.* 2008; Moreira, *et al.* 2009; Soeiro, *et al.* 2009).

Outra estratégia de tratamento tem sido o uso de células-tronco de várias origens em modelos animais e humanos de doenças do coração, com melhora da neovascularização, regeneração do músculo cardíaco, aumento da fração de ejeção e melhora na qualidade de vida dos indivíduos tratados (Campos, *et al.* 2009).

Diante da inexistência de vacinas para essa patologia, a principal estratégia de controle encontra-se na prevenção da transmissão do seu agente etiológico, principalmente por meio da eliminação dos insetos vetores domésticos (Schofield, *et al.* 2006; Dias, *et al.* 2002), estratégia implantada de 1975 a 1983 com a implementação do programa de controle da doença de Chagas no Brasil (Silveira, *et al.* 1984).

## **Triatomíneos vetores da doença de Chagas**

Os vetores da doença de Chagas são triatomíneos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. *Triatoma infestans* é uma das principais espécies transmissoras do *T. cruzi*. e sua localização estende-se do sul da Argentina à região nordeste do Brasil (Brener, *et al.* 2000).

A partir da eclosão dos ovos, os triatomíneos passam por cinco fases de desenvolvimento, chamadas de ninfa (Figura 2). Todos os estágios de crescimento da espécie alimentam-se exclusivamente de sangue, processo que se denomina hematofagia, obtendo assim sua refeição diretamente dos vasos sanguíneos de animais vertebrados (Lavoipierre, *et al.* 1959).



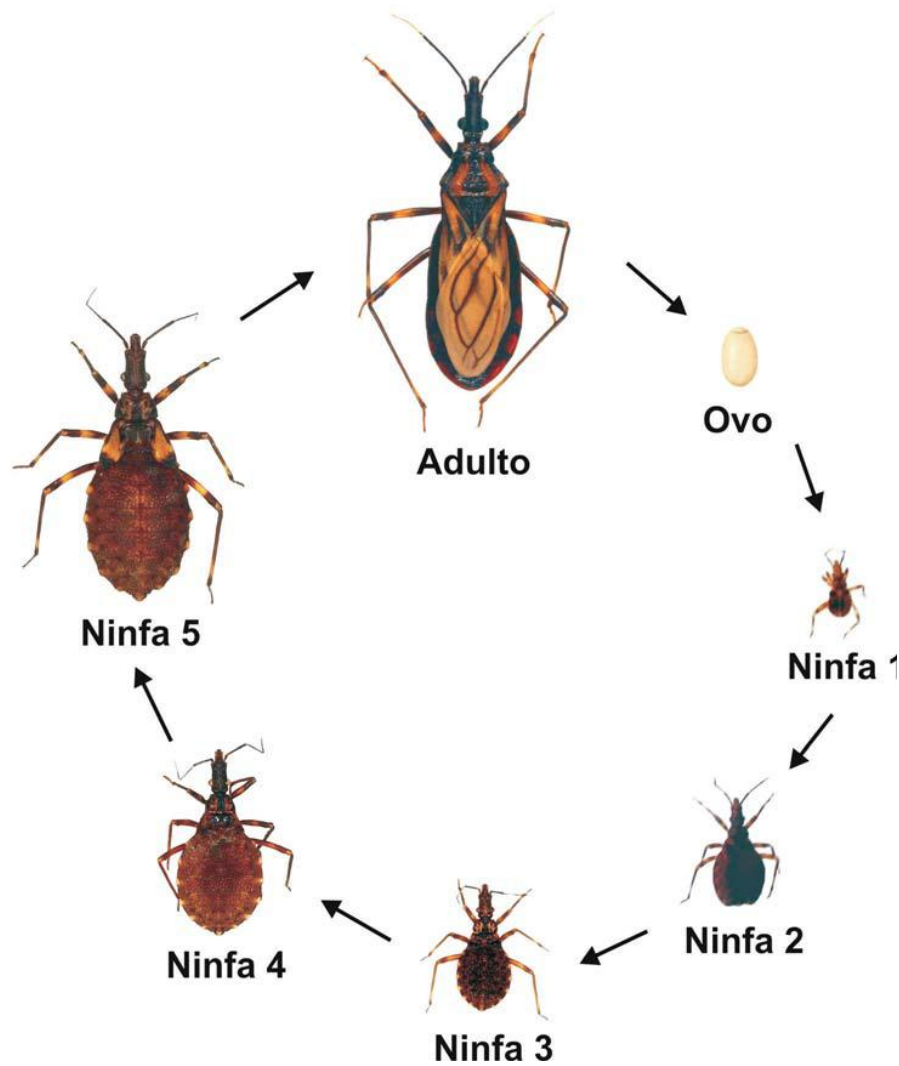


Figura 2. Ciclo de vida de um barbeiro (*Triatoma brasiliensis brasiliensis*). Fotos: Rodrigo Méxas, IOC/Fiocruz. (ARGOLO, 2008).

Esses insetos são conhecidos popularmente como barbeiros. Apresentam a cabeça fusiforme alongada; pescoço nítido, unindo a cabeça ao tórax; e aparelho bucal contendo probóscida, com origem anterior aos olhos, adaptado à picada e sucção (Neves, *et al.* 2005). Possuem, ainda, três pares de glândulas salivares bem diferenciadas: D1 – anterior ou principal, D2 – média ou acessória, e D3 – posterior ou suplementar (Lacombe, 1999). O par D1 apresenta aspecto leitoso, D2 amarelado e D3 apresenta-se de forma translúcida, colorações resultantes da composição da secreção no lúmen (Figura 3) (Lacombe, 1999).

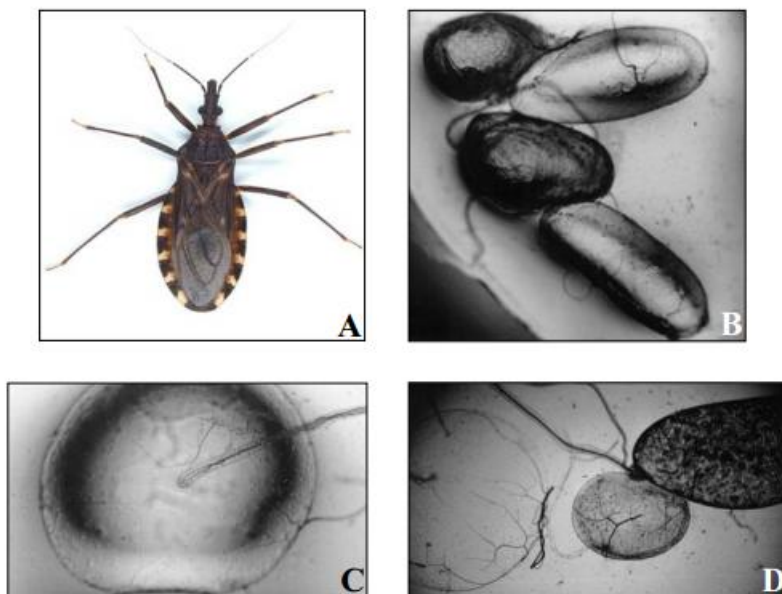


Figura 3. Anatomia e histologia das glândulas salivares nos triatomíneos. (A) *T. infestans* adulto. Microscopia, contraste de fase 250X, de glândulas salivares de *T. infestans* adultos: (B) pares D1 e D2, (C) glândulas D3, (D) pares D1, D2, e D3. (Fonte: Assumpção, et al. 2007).

A análise do conteúdo proteico de cada par de glândulas individualmente, por meio de eletroforese unidimensional, mostrou a presença de proteínas na composição do fluido do par D3 dos *T. infestans* (Charneau, et al. 2007). Em seus estudos, Lacombe (1999) e (Reis, et al. 2003) identificaram estruturas próximas ao par D3 envolvidas no aumento de sua oxigenação, sugerindo alta taxa metabólica, e presença de válvula de controle de saída de seu conteúdo.

Os barbeiros apresentam, em sua maioria, hábitos de vida noturnos, e detectam suas vítimas pela presença de altas concentrações de CO<sub>2</sub>, amônia e outras moléculas voláteis, que indicam a presença de organismos com sangue quente (Otálora-Luna, 2006).

O processo de alimentação se dá através da probóscida do triatomíneo, haste longa e flexível que transpassa a pele do hospedeiro e atinge o vaso sanguíneo. O repasto dura de 20 a 30 minutos, dependendo de seu estágio de desenvolvimento bem como da fisiologia do hospedeiro vertebrado (Sant'Anna et al., 2001). Para facilitá-lo, na saliva desses insetos é possível encontrar moléculas com atividades que auxiliam na obtenção de alimentação sanguínea (Araujo, et al. 2007).

## Saliva e suas propriedades anti-hemostáticas

Durante a hematofagia, a saliva produzida e armazenada nas glândulas salivares do triatomíneo é injetada no tecido e vaso sanguíneo local. O contato da saliva com a mucosa do hospedeiro induz a reação do sistema imune (Isawa, *et al.* 2007). Assim, o sucesso do processo de alimentação depende das propriedades farmacológicas da saliva, que visam se contrapor à hemostasia, processo fisiológico que minimiza os danos ao organismo do hospedeiro e que compreende a vasoconstrição (redução do fluxo sanguíneo), a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea (Francischetti, *et al.* 2009); às reações inflamatórias e ao sistema imune (Ribeiro, 1995). Portanto, entre as atividades anti-hemostáticas encontradas na saliva dos triatomíneos se destacam a vasodilatadora, a de anti-agregação plaquetária e a de anticoagulação.

### Vasodilatadores

As células endoteliais liberam substâncias constritoras ou dilatadoras para modular a resposta dos vasos sanguíneos a vários estímulos. O principal fator vasodilatador é o óxido nítrico, produzido pela óxido nítrico sintase em resposta a hormônios, produtos liberados por plaquetas, trombina, autacóides e danos aos vasos. Ele se difunde para o interior das células da musculatura lisa vascular e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, desfosforilando guanosina trifosfato em guanosina monofosfato cíclica (GMPc), segundo mensageiro que contribui para o relaxamento da musculatura (Sudano, *et al.* 2006).

Sob condições fisiológicas, a vasoconstrição é induzida durante a picada dos insetos para restringir a perda de sangue. Entretanto, a saliva dos insetos hematófagos possui moléculas capazes de ativar a resposta vasodilatadora. O triatomíneo *Rhodnius prolixus* produz quatro tipos de nitroforinas, hemeoproteínas carreadoras de óxido nítrico. Essas proteínas podem ainda se ligar a histamina liberada pelos mastócitos, prevenindo a resposta inflamatória (Montfort, Weichsel *et al.* 2000). Outros exemplos de proteínas salivares identificadas com atividade vasodilatadora são o peptídeo sialocinina isolado

da saliva de *Aedes aegypti*, que atua junto ao endotélio induzindo produção de óxido nítrico (NO) (Champagne, *et al.* 1994); e a proteína maxadilan, responsável pelo eritema no local da picada, descrita na saliva do flebotomíneo *Lutzomia longipalpis*, transmissor da leishmaniose (Moro, *et al.* 1997).

## Inibidores da coagulação sanguínea

Para garantir o sucesso do repasto é necessário que o sangue mantenha-se fluído durante todo o processo de sucção, bem como, no interior do inseto vetor, caso contrário poderá levá-lo a morte. Tal fluidez é garantida por moléculas anticoagulantes encontradas na saliva. O processo de coagulação pode ter início pela via intrínseca ou extrínseca, sendo que ambas convergem para uma via comum iniciada pela formação do fator Xa, responsável pela ativação da protrombina em trombina. Esta cliva o fibrinogênio em fibrina. Tem-se então o principal componente do coágulo sanguíneo, formado também por plaquetas e eritrócitos (Figura 4) (Davie, *et al.* 1991).

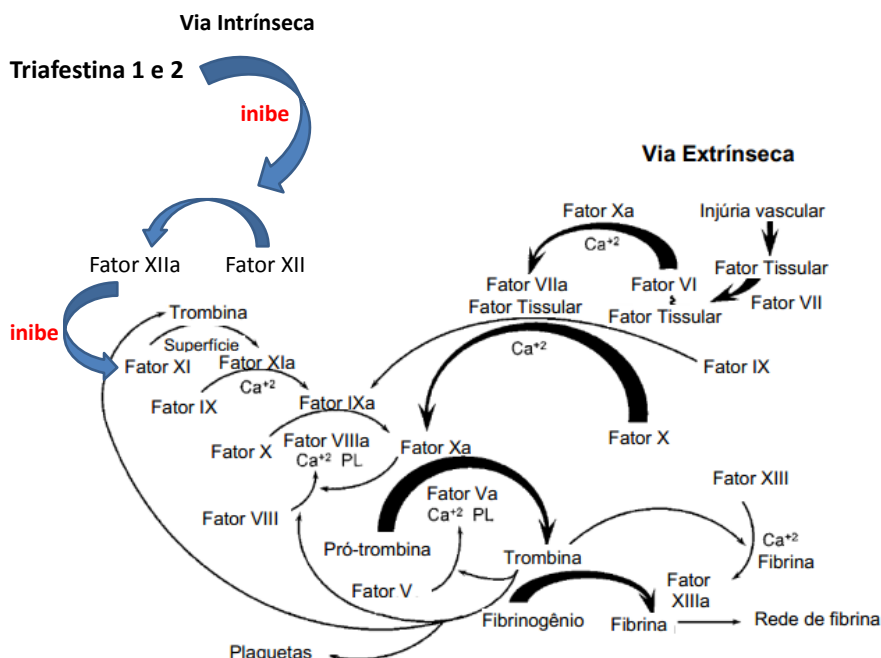


Figura 4. A cascata da coagulação sanguínea é um sistema complexo com muitos pontos de regulação. Por meio de duas vias de ativação da coagulação (intrínseca e extrínseca) pode ocorrer a formação da trombina, que converterá fibrinogênio em fibrina, induzindo a adesão das plaquetas, necessárias para que ocorra a retração do coágulo no local da picada. Adaptado de Davie, 2003.

Substâncias inibidoras da coagulação sanguínea têm sido isoladas da saliva de várias espécies de triatomíneos. As triafestinas 1 e 2 de *T. infestans* inibem a via intrínseca, impedindo a conversão do fator XII em XIIa (Isawa, *et al.* 2007). Essas proteínas apresentam também atividade anti-inflamatória, inibindo a bradicinina, e evitam o surgimento de edema, eritema e dor no local da picada (Isawa, *et al.* 2007). *R. prolixus* produz rodniina, um inibidor da trombina presente nas glândulas salivares e no intestino (Friedrich, *et al.* 1993; Noeske-Jungblut, *et al.* 1995). A nitroforina 2, uma proteína de 20 kDa da família das lipocalinas, é um potente inibidor da via intrínseca ao se ligar ao fator IX ou ao IXa (Moreira, *et al.* 2003). Ortólogos inibidores da trombina foram descritos também no intestino das espécies de triatomíneos *Dipetalogaster maxima*, *T. infestans* e *T. brasiliensis*: dipetalogastina (Mende, *et al.* 1999), infestina (Campos, *et al.* 2002) e brasiliensina (Araujo, *et al.* 2007), respectivamente.

Na saliva de outros insetos hematófagos também foram descritas proteínas com atividade anticoagulante. A anofelina é um peptídeo com atividade anti-trombina do mosquito *Anopheles albimanus*. Em *Cimex lectularius*, uma proteína de 17 kDa inibe a ativação do fator X em Xa (Valenzuela, *et al.* 1996), este último importante para formação da trombina.

### **Inibidores da agregação plaquetária**

Após a lesão nas paredes dos vasos sanguíneos, moléculas como ADP, colágeno, trombina, tromboxano A<sub>2</sub>, adrenalina e fator ativador de plaquetas (PAF) ativam as plaquetas, que inicialmente se aglomeram no local lesionado visando diminuir a hemorragia (Davie, *et al.* 1991). Em sua forma inativada as plaquetas apresentam forma discóide e superfície lisa. Após ativação, emitem pseudópodes e secretam o conteúdo de seus grânulos para recrutar e ativar outras plaquetas (Jamaludinn, *et al.* 1991), amplificando sua resposta. Alguns insetos hematófagos evitam esse processo inibindo a ação da trombina e do colágeno, no entanto o mecanismo mais utilizado para impedir a agregação das plaquetas é a hidrólise de ADP em AMP, por meio da remoção de fosfato

inorgânico, reação catalisada por proteínas da família das apirases (Valenzuela, 2002).

Três famílias de apirases têm sido descritas: proteínas da família GTPase de levedura/CD39 (Smith, *et al.* 1999), da família Cimex (Valenzuela, *et al.* 1998) e pertencentes à família das 5'-nucleotidasas (Faudry, *et al.* 2004; Ribeiro, *et al.* 2004; Santos, *et al.* 2007; Assumpção, *et al.* 2008; Bussacos, *et al.* 2011). Uma enzima com atividade apirásica e características da família de apirases Cimex foi descrita em *R. prolixus* (Sarkis, *et al.* 1986). Posteriormente, cinco apirases salivares glicosiladas com massas moleculares de 67 kDa, 68 kDa, 79 kDa, 82 kDa, e 88 kDa foram purificadas da espécie *T. infestans* (Faudry, *et al.* 2004). Atualmente se sabe que existem pelo menos quinze isoformas apirásicas na saliva desta espécie, possivelmente produtos de modificações pós-traducionais (Charneau, *et al.* 2007), o que pode representar um processo evolutivo, a fim de garantir o sucesso do repasto. A apirase de 79 kDa também está presente nas secreções salivares de *T. brasiliensis* (Santos, *et al.* 2007), *T. dimidiata* (Kato, *et al.* 2010), *R. prolixus* (Ribeiro, *et al.* 2004), *P. megistus* (Bussacos, *et al.* 2011) e *D. maxima* (Bussacos, *et al.* 2011). As apirases também foram descritas em mosquitos *Ae. aegypti* (Champagne, *et al.* 1995), *A. gambiae* (Arcá, *et al.* 1999) e no percevejo de cama *C. lectularius* (Valenzuela, *et al.* 1998).

Outra grande família de proteínas atuantes na inibição da agregação plaquetária são as lipocalinas (LPs). As LPs são agrupadas em subtipos: a) RPAIs (inibidoras de agregação plaquetária em *Rhodnius*) ou somente AIs; b) ABPs (proteínas ligadoras de aminas); c) LPs homólogas de triabina (serino-proteases de *T. pallidipennis*); d) palidipina; e e) NPs, citadas anteriormente (Assumpção, *et al.* 2007).

O primeiro subtipo de inibidores atua por meio de ligação ao ADP, o segundo liga-se a serotonina e à epinefrina liberadas dos grânulos plaquetários, o terceiro inibe a agregação plaquetária por ligar-se de forma não-covalente à trombina (Ribeiro, *et al.* 2004). O quarto bloqueia a via de transdução de sinal para liberação de ATP por plaquetas, suprimindo a ativação de novas células e o quinto tipo de LPs impede a agregação plaquetária por ligar-se a trombina e prolongar o tempo de coagulação, já que

diminui a atividade de tromboplastina (Noeske-Jungblut, *et al.* 1994, Noeske-Jungblut, *et al.* 1995).

As atividades anti-hemostáticas que auxiliam na obtenção de alimentação sanguínea não inibem o recrutamento de células fagocíticas mononucleares para o local da picada. Estas são recrutadas rapidamente ao local da lesão e, portanto, aumentam a probabilidade de infecção do hospedeiro pelo *T. cruzi* (Mesquita, *et al.* 2008).

Em adição aos vasodilatadores, anticoagulantes e anti-agregadores de plaquetas, a saliva dos insetos hematófagos contém outras proteínas que potencializam a hematofagia, que conferem resistência a inseticidas, a patógenos, formam poros, entre outras. Essas moléculas poderiam vir a ser alvos para o desenvolvimento de fármacos, por exemplo, para prevenção da picada dos insetos e/ou para tratamentos de patologias humanas específicas (Assumpção, *et al.* 2011).

## **Proteômica**

Um estudo proteômico é definido como a identificação do conjunto de proteínas expressas em determinado material biológico, seja em células, tecidos ou fluído, em um momento delimitado. Essa modalidade de estudo tornou-se mais atraente às pesquisas científicas após o sequenciamento gênico de várias espécies e, diferentemente do estudo do genoma, apresenta dinamismo, podendo variar seus resultados se as condições do meio ou da própria fisiopatologia do organismo sofrerem alterações. Trata-se portanto de uma abordagem dinâmica e em significativo crescimento (López, 2007).

A proteômica utiliza técnicas que incluem a eletroforese unidimensional e bidimensional (2-DE), ambas realizadas em géis de poliacrilamida, SDS-PAGE, para separação das proteínas de acordo com sua massa molecular. A eletroforese bidimensional possui uma etapa anterior a esta, denominada focalização isoeletrica (IEF), na qual as proteínas são pré-separadas de acordo com seu ponto isoeletrico. Esta etapa é realizada em gel de poliacrilamida com pH imobilizado e submetido a corrente elétrica. Ao término da eletroforese, as

proteínas com maior massa molecular podem ser observadas na parte superior do gel, próximas ao polo negativo, enquanto as de menor massa molecular encontram-se na parte inferior, próximas ao polo positivo.

Outra técnica utilizada em estudos proteômicos é a cromatografia líquida. A amostra é submetida à interação com as matrizes das colunas e juntas são submetidas a um solvente, no qual a proteína é eluída e coletada em um microtubo. A eluição depende das relações estabelecidas entre a amostra, a matriz da coluna e o solvente (tamanho, hidrofobicidade e interações iônicas).

Eletroforese e cromatografia por si só são insuficientes para garantir a identidade das proteínas analisadas. Por esse motivo seus resultados são posteriormente analisados por espectrometria de massa, técnica considerada central nos estudos proteômicos. As proteínas separadas por eletroforese ou cromatografia passam por processo de digestão e posterior ionização, podendo esta ser feita por ESI (eletropulverização) ou MALDI (ionização e dessorção a laser auxiliada por matriz) (Aebersold, *et al.* 2003). Os dados obtidos são comparados aos encontrados em bancos de dados, viabilizando a identificação das proteínas.

### **Estudos proteômicos de salivas de triatomíneos**

Já se tem conhecimento de diversos estudos transcriptômicos e proteômicos em amostras salivares de artrópodes inclusive de triatomíneos. Os estudos realizados com triatomíneos incluem as espécies *T. infestans* (Charneau, *et al.* 2007), *T. brasiliensis* (Santos, *et al.* 2007), *T. dimidiata* (Kato, *et al.* 2010), *R. brethesi*, *R. robustus* (Bussacos, *et al.* 2011), *R. prolixus* (Ribeiro, *et al.* 2004), *P. megistus* (Bussacos, *et al.* 2011) e *Dipetalogaster maxima* (Assumpção, *et al.* 2008). O objetivo desses estudos é a caracterização das salivas desses insetos.

Em 2004, a primeira análise transcriptômica e proteômica extensa de glândulas salivares de triatomíneos foi realizada para a espécie *R. prolixus*. Essa análise permitiu um avanço no conhecimento a respeito da família das lipocalinas, principalmente no que se refere às RPs (Ribeiro, *et al.* 2004).



Charneau e colaboradores (2007), realizaram a primeira análise do proteoma da saliva secretada de *T. infestans* e detectaram mais de 200 proteínas separadas por eletroforese em 2-DE. Foram identificados 58 spots do gel, por busca por homologia com sequências disponíveis no banco de dados NCBI, a maioria das quais com funções associadas à hematofagia, principalmente proteínas com função anti-agregação plaquetária pertencentes às famílias das apirases e das lipocalinas.

Em seguida, Assumpção e colaboradores (2007), sequenciaram aleatoriamente uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares de *T. infestans* (Santos, *et al.* 2007; Assumpção, *et al.* 2008; Kato, *et al.* 2010; Assumpção, *et al.* 2011). A maioria das proteínas salivares também foi descrita como lipocalinas. Além disso, análises transcritômicas consideráveis de glândulas salivares foram realizadas para as espécies de *T. brasiliensis* (Santos, *et al.* 2007; Bussacos, *et al.* 2011), *T. dimidiata* (Kato, *et al.* 2010), *D. máxima* (Assumpção, Charneau *et al.* 2011), *R. brethesi* e *R. robustus* (Bussacos, *et al.* 2011; Costa, *et al.* 2011), *Panstrongylus megistus* (Bussacos, *et al.* 2011), *T. rubida* (Assumpção, *et al.* 2012). Os transcritos que codificam para proteínas de secreção putativos correspondeu a lipocalinas como confirmado por análises proteômicas.

Charneau e colaboradores em 2011, além de demonstrar que os proteomas salivares dos *R. brethesi* e *R. robustus* da Amazônia são homólogos ao proteoma salivar de *R. prolixus* de acordo com suas semelhanças biológicas e ricos em lipocalinas, apresentaram a primeira evidência experimental de proteínas da saliva de triatomíneos fosforiladas. Investigações futuras das modificações pós-traducionais de proteínas da saliva de triatomíneos levará a uma melhor compreensão da sua diversidade funcional.

Então, os estudos proteômicos permitem validar as anotações dos transcritos previamente identificados nos estudos transcriptômicos, e também descobrir novas proteínas e isoformas. Isso ilustra a complementaridade das diferentes estratégias para a identificação de produtos de genes.

## **Peptidômica da saliva de artrópodes**

Até o momento, foram descritas na saliva de artrópodes hematófagos proteínas com atividades anti-hemostáticas, antiinflamatórias e componentes imunomoduladores que auxiliam na obtenção de alimentação sanguínea, inibem a resposta imunológica, e aumentam a possibilidade de contaminação do hospedeiro por micróbios patógenos. Entretanto, pouca informação está disponível a respeito dos peptídeos salivares e suas funções. O termo peptídeo é tipicamente utilizado para cadeias de resíduos de aminoácidos com massas moleculares de até 10 kDa (Hu, *et al.* 2009).

A peptidômica é uma abordagem interessante para o estudo dos peptídeos salivares. Ela é definida como uma análise sistemática, holística, qualitativa e quantitativa dos peptídeos endógenos e pequenas proteínas em uma amostra biológica em um momento definido (Hu, *et al.* 2009). Como resultado, obtém-se o peptidoma, fração proteica de baixa massa molecular das amostras biológicas complexas estudadas, por exemplo, fluídos, lisado celular e extrato de tecido (Schulz-Knappe, *et al.* 2001). Nos últimos anos, foi mostrado que o peptidoma é um banco rico para a descoberta de novos biomarcadores de doenças humanas (Schulte, *et al.* 2005). O peptidoma pode fornecer informações sobre duas classes de peptídeos: a) os peptídeos bioativos que exercem funções vitais em processos biológicos; e b) fragmentos degradados oriundos de proteínas que refletem atividade proteolítica de enzimas.

Recentemente alguns peptídeos da saliva de espécies de carrapatos, *Ixodes sinensis* e *Ixodes scapularis*, foram descritos como peptídeos antimicrobianos (Yu, *et al.* 2006; Pichu, *et al.* 2009). Um estudo peptidômico da saliva do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* foi realizado e vários peptídeos com atividade foram identificados. Dois membros relacionados à família das disintegrinas, peptídeos descritos originalmente em veneno de cobra, foram descritos na saliva desse carrapato (Anatriello, *et al.* 2010). Esses peptídeos de aproximadamente 4,7 kDa interagem com as integrinas na superfície das plaquetas, impedindo sua ligação com o fibrinogênio para prevenir a agregação plaquetária (Huang, *et al.* 2010; Da Silva, *et al.* 2009). Peptídeos putativos secretados das famílias de 8,9 kDa e de 5,3 kDa sem função caracterizada foram descritos (Anatriello, *et al.* 2010).

Nos dípteros *Tabanus yao* e *Simulium guianense* foram descritos peptídeos antimicrobianos e vasodilatadores (Xu, *et al.* 2008). Em *S. guianense*, ou mosca negra, por uma abordagem transcritômica e proteômica foram encontradas sequências completas codificadoras de dois peptídeos antimicrobianos: lisozima e cecropina (Xu, *et al.* 2008). Essas famílias são comumente encontrados em artrópodes hematófagos.

Para várias espécies de artrópodes têm sido identificados peptídeos imunoregulatórios em suas salivas. Yan e colaboradores (2008) (Yan, *et al.* 2008) identificaram e caracterizaram a imunoregulina HA da mosca *Hybomitra atriperoides* (Diptera, Tabanidae), peptídeo capaz de inibir a secreção de IFN- $\gamma$  e de MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos) e aumenta a secreção de IL-10 induzida por LPS em esplenócitos de ratos. A IL-10 é uma citocina supressora da proliferação de células T e pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Das glândulas salivares de outra espécie da mesma família de moscas, *T. pleskei*, três peptídeos imunoregulatórios denominados imunoregulinas TP1-3 foram identificados e caracterizados (Zhao, *et al.* 2009). É provável que esses peptídeos facilitem a hematofagia dessas espécies. Do extrato das glândulas salivares de *T. yao* foram purificados três peptídeos antimicrobianos denominados defensina TY1, cecropina TY1 e atactina TY3. Devido ao comportamento hematofágico dessas moscas, a possibilidade de infecções com micro-organismos é elevada. Esses peptídeos podem contribuir significativamente para a defesa dessas moscas, mantendo o sangue ingerido estéril e inibindo o crescimento de micro-organismos invasores. Em termos de co-evolução, talvez as moscas tenham desenvolvido múltiplos fatores antimicrobianos para proteger seus hospedeiros de infecções durante a hematofagia. Um inibidor de serino-protease denominado tabkunina com massa molecular predita de 6 kDa foi purificado do mesmo extrato. A tabkunina apresenta similaridade com outros inibidores de serino-proteases, por exemplo com boofilina, ixolaris-2 e scapularis-S. Esse peptídeo inibe as atividades hidrolíticas da tripsina, trombina, elastase e quimiotripsina sobre substratos cromogênicos (Xu, *et al.* 2008).

No que concerne aos triatomíneos, Ons e colaboradores (2009) realizaram o estudo do neuropeptidoma de *R. prolixus*, uma análise do

conjunto de proteínas encontradas em amostras neuronais . O grupo identificou 42 neuropeptídeos novos da espécie, por exemplo peptídeos relacionados com FMRFamida (Phe-Met-Arg-Phe amida), sulfacininas, miosupressinas, neuropeptídeo F, taquicininas, orcocininas, alatostatinas, alatotropinas, hormônios diuréticos tipo calcitonina, pirocininas, entre outros. Alguns deles foram detectados em várias isoformas.

Na saliva de *T. infestans*, peptídeos chamados triatox foram identificados (Charneau *et al.* 2007; Assunção *et al.* 2007). As análises de sequências nucleotídicas de triatox sugerem que eles são semelhantes aos peptídeos antimicrobianos associados a imunidade inata do inseto (Charneau, *et al.* 2007; Assumpção, *et al.* 2008). No entanto, nenhum estudo peptidômico abrangente do conteúdo peptídico da saliva de triatomíneos foi realizado.

## Justificativa

A saliva dos insetos hematófagos certamente assegura o elo estabelecido pelo hábito hematofágico, acoplando os três principais elementos de uma cadeia epidemiológica: o vetor, o parasito e o hospedeiro (Da Silva, *et al.* 2009). O conhecimento dos mecanismos moleculares que possibilitam a interação ectoparasito-hospedeiro é de grande relevância para o entendimento da transmissão das doenças viabilizada pela hematofagia.

Na saliva do *T. infestans* encontram-se moléculas com atividades antihemostáticas, antiinflamatórias e componentes imunomoduladores que auxiliam no repasto, inibem a resposta imunológica e aumentam a possibilidade de contaminação do hospedeiro pelo *T. cruzi*. Entretanto, pouca informação está disponível a respeito dos peptídeos salivares de *T. infestans* e suas funções, conhecimentos que permitirão uma compreensão mais profunda das interações moleculares entre o triatomíneo e sua vítima e ao mesmo tempo permitirá a descoberta de novos compostos capazes de afetar a homeostasia e a imunidade desta.

O estudo do peptidoma é de grande interesse biotecnológico, pois as moléculas que atuam no antagonismo da homeostase do hospedeiro poderão vir a ser utilizadas no tratamento de enfermidades como coagulopatias, bem como, pode-se encontrar novos alvos farmacológicos e, até mesmo, substâncias capazes de compor vacinas.

## Objetivos

O objetivo central deste projeto, que deu seguimento à linha de pesquisa acerca da saliva de *T. infestans*, foi caracterizar o peptidoma salivar do *T. infestans* por meio do uso de ferramentas proteômicas, complementando, desta forma, os dados já publicados do proteoma do extrato salivar da espécie em questão.

Para alcançar tais objetivos, as seguintes atividades foram desenvolvidas:

1. Manutenção da colônia de *T. infestans*, visando o aumento do número de indivíduos;
2. Obtenção do extrato salivar secretado de *T. infestans*;
3. Realização do fracionamento da saliva por meio de centrifugação em microconcentradores com membrana de exclusão molecular (*cut-off*) de 10 kDa;
4. Verificação da integridade da fração salivar contendo os polipeptídeos de massa molecular superior a 10 kDa por géis eletroforéticos bidimensionais;
5. Identificação e análise por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF e LC-MS/MS dos peptídeos encontrados na fração salivar de massa molecular inferior a 10 kDa;
6. Início da avaliação das atividades anti-hemostáticas dos peptídeos.

# **METODOLOGIA**

## **Triatomíneos e obtenção da saliva**

*T. infestans* foram mantidos em câmara climatizada sob temperatura de 28-30°C e umidade relativa de 70% ± 5 em um ciclo claro/escuro de 12/12 h. Os barbeiros eram mantidos em frascos de polietileno para desenvolvimento e acasalamento (Silveira, 1984) e alimentados mensalmente em aves (*Gallus domesticus*) durante aproximadamente 30 min. Os exemplares desta espécie foram separados de acordo com seu nível de desenvolvimento e somente as ninfas de quinto estágio e os indivíduos adultos foram utilizados para coleta da saliva.

As ninfas de quinto estágio e os adultos de *T. infestans* secretam saliva espontaneamente quando são imobilizados. Portanto, não foi necessário sacrificá-los para coletar sua saliva. A coleta foi realizada uma semana após a alimentação aproximando uma ponteira com capacidade para até 200 µL de volume acoplada a uma micropipeta à probóscida dos insetos. Aproximadamente 1 µL de saliva contendo as proteínas secretadas era coletado de cada triatomíneo. O conteúdo salivar obtido foi transferido imediatamente para um microtubo plástico de 1,5 mL mantido em baixa temperatura e estocado a -20°C até o momento do uso.

## **Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE)**

A saliva bruta foi diluída em tampão de amostra (SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), Tris HCl 0,125 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,004% (p/v) e fervida por cinco minutos. O conteúdo foi aplicado nos poços. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12% e 0,75 mm de espessura à temperatura ambiente e voltagem constante de 30 mA no sistema Hoefer®. Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com protocolo estabelecido por Blum,1987.



## Quantificação proteica

A determinação da quantidade de proteínas foi realizada utilizando-se o Kit MicroBCA (PIERCE). A proteína albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada na preparação da curva padrão.

## Dessalinização em microcoluna Zip-Tip C18 para análise em MALDI-TOF/TOF

Dois microlitros de saliva bruta foram diluídos em 10  $\mu$ L de água. Essa amostra foi dessalinizada em microcoluna C18 Zip-Tip<sup>®</sup> Pipette Tips (Millipore) seguindo as instruções do fabricante. TFA foi utilizado para as lavagens e ACN para a eluição. 1  $\mu$ L desta amostra acidificada foi aplicada numa placa de 600 nm AnchorChip (Bruker Daltonics, Karlsruhe, Alemanha). Após sua secagem completa, adicionou-se 0,5 mL de 5  $\mu$ g/ $\mu$ L DHB (2,5-di-hidroxibenzóico) de matriz em ACN 30% e 0,1% TFA, e se esperou secar completamente. A análise PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*) foi realizada em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (Autoflex II; Bruker Daltonics), com programa Flex Control versão 2.2 (Bruker Daltonics), conforme as instruções do fabricante.

## Fracionamento da saliva – microconcentradores

A saliva secretada (19  $\mu$ L) foi diluída em água (180  $\mu$ L) contendo um coquetel de inibidores de proteases sem EDTA (cOmplete Mini<sup>®</sup>, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) e posteriormente centrifugada a 4°C em membrana de ultrafiltração com poro de exclusão molecular de 10 kDa (Microcon - Millipore, Billerica, MA, EUA). A amostra filtrada, peptídeos < 10 kDa, foi reservada e armazenada a -20°C. A amostra retida, polipeptídios > 10 kDa, foi diluída em 200  $\mu$ L de tampão 2D contendo uréia 7 M e tiouréia 2 M. Os efluentes das duas filtrações foram utilizados nos experimentos subsequentes.

## **Eletroforese bidimensional – 2DE**

Eletroforeses bidimensionais foram realizadas usando sistemas IPGphor III (GE Healthcare) e Protean II xi Cell (Biorad). Aproximadamente 50 µg de amostra retida foram solubilizados em 350 µl de tampão 2D [uréia 7M, tiouréia 2M, Triton X-100 2,5%, DTT 85 mM, anfólitos pH 3-10 0,5%, isopropanol 10% (v/v)] e submetidos a focalização isoeletrica em tiras de 18 cm com gradiente de pH imobilizado linear de 3-10 (IPGs, GE Lifesciences), sob as seguintes condições: reidratação de 6 h, seguido de 30 V durante 6 h, 500 V (gradiente) durante 1 h, 1000V por 1 h e 8000 V por 4 h e 30 minutos, totalizando 33680 Vh, com corrente constante de 50 µA/strip.

Antes da segunda dimensão, as tiras de gel foram submetidas à redução das pontes dissulfeto. Esse processo foi realizado por incubação em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM pH 8,8, uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2%) contendo DTT 125 mM por 20 minutos, seguida pela propionamidação dos radicais sulfidrilas em tampão de equilíbrio com acrilamida 300 mM, por 20 minutos. As proteínas foram separadas de acordo com a sua massa molecular em géis desnaturantes de poli-acrilamida 12%, contendo SDS (Laemmli, 1970), em tampão de corrida [Tris 25 mM pH 8,5, glicina 0,192 M, SDS 0,1% (w/v)] durante a realização da segunda dimensão, a 30 mA e voltagem constante.

Como marcador de massa molecular, foi usado *Low Molecular Weight Calibration Kit* (GE Healthcare), composto por: fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa). A temperatura foi mantida a 20°C por circulação de água proveniente de um banho termostático. Os géis analíticos foram corados com nitrato de prata segundo Blum e colaboradores (1987).

## **Identificação das proteínas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS)**

### **Digestão trípica em solução**

Alíquotas de 100 µg de proteínas retidas e de 100 µg de proteínas filtradas provenientes do fracionamento da saliva de *T. infestans* foram submetidas à redução dos grupos tióis dos resíduos de cisteínas em tampão  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  200 mM pH 8,3, tampão 2D uréia 7M, tiouréia 2M e DTT 5 mM, a 56°C por 1 h. Subsequentemente, foi realizado o bloqueio desses grupos pela adição e incubação em solução de IAA 20 mM, no escuro por 1 h a temperatura ambiente. Depois da alquilação da amostra foram adicionados 3,3 µL de tripsina (Promega, Madison, WI) e 8 µL de ACN 100% (concentração final de 10 % v/v). Seguiu-se uma incubação a 40 °C durante 14 h.

### **Dessalinização em Ultra-Micro SpinColumn (C18)**

Após a digestão, as amostras foram dessalinizadas por meio da utilização de uma coluna *Ultra Micro SpinColumn C18* (Harvard Apparatus, Holliston, USA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a coluna foi lavada 3 vezes com 200 µL de ACN 100% e TFA 0,1% por centrifugação a  $100 \times g$ , por 1 min; e três vezes com 200 µL de TFA 0,1%, sob as mesmas condições. 100 µg da amostra foram adicionados à coluna. Seguiu-se uma centrifugação a  $50 \times g$  por 2 min. Foram realizadas três lavagens com 200 µL de  $\text{H}_2\text{O}$ /TFA 0,1%, por centrifugação a 100g, 1 min e os peptídeos tripticos eluídos após 2 ciclos de lavagem com 70 µL de ACN 80%. As amostras foram submetidos à secagem em Speed-vac (Savant).

### **Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS)**

As frações filtradas foram dissolvidas em 10 µL de TCA 0,1%, dos quais 4 µL foram aplicados no sistema nano-LC-Ultra system (Eksigent), equipado com uma coluna do tipo trap (150 µm x 200 mm), cujo empacotamento foi realizado com partículas C18 Reprosil de 3 µm (Dr. Maich) a um fluxo de 4 µL/min.

Em seguida, os peptídeos foram eluídos em uma nano-coluna (15cm x 50 µm empacotada com partículas C18 Reprosil de 3µm, Dr. Maich). As soluções tampão utilizadas foram: tampão A (ACN 5% contendo ácido fórmico

0,1%) e o tampão B (ACN 80% contendo ácido fórmico 0,1 %) O gradiente para análise direta em solução foi: 5-20% de solvente B em 73 min, 20-50% de solvente B em 71 min, 50-100% de solvente B em 5 min, 100% de solvente B por 10 min e de volta a 5% de solvente B em 10 min. A interface entre nanoLC e o espectrômetro de massa híbrido LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) foi feita através do controle automático do equipamento. Os espectros de MS/MS foram adquiridos em modo Data Dependent Acquisition (DDA) sobre o controle do software Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific). O ciclo de DDA consistiu em um *survey scan* compreendendo a faixa de m/z 300-1600 realizada sob resolução de 60.000 FWHM (*Full Width at Half-Maximum*) e com valor alvo de 1E06 íons. O *survey scan* foi seguido por fragmentação MS/MS dos dez íons precursores com cargas múltiplas mais abundantes de cada tempo.

Os espectros foram adquiridos sob energia de colisão de 35% e valor alvo de íons igual a 1E04 no íon trap linear (limiar de seleção de íons de 400 contagens). Foram aplicados parâmetro de ativação  $q = 0,25$  e tempo de ativação de 30ms. Íons precursores anteriormente fragmentados foram excluídos de forma dinâmica por 90s.

## Identificação das proteínas

Os arquivos .raw foram convertidos a formato .mgf, (formato genérico do MASCOT) usando BioWorks 3,2 software (Thermo Electron Corporation), os quais foram submetidos à busca contra o banco de dados de triatomíneo no NCBI que agrupa *Triatoma*, *Rohdnius*, *Dipetalogaster* e *Panstrongylus*. Como parâmetros de busca foram usados carbamidometilação de cisteína, oxidação de metioninas e acetilação da porção N-terminal, definidos como modificações variáveis, máximo de um sítio de clivagem perdido pela tripsina e tolerância de erro de massa dos íons precursores e dos fragmentos de 10 ppm e 0,8 Da. Os critérios de confiança para a identificação de proteína por SEQUEST foram fixados condicionalmente sobre o número de peptídeos encontrados e também dezenas de íons de peptídeos de cada indivíduo, considerada identificação

positiva se o score total for acima de 50, considerando peptídeos com score individual acima de 20.

## **Abordagem computacional de análise dos dados proteômicos gerados “bottom-up”:**

A metodologia adotada foi *peptide spectrum matching* (PSM) utilizando o software SEQUEST. Sua principal característica é a comparação de espectros experimentais para aqueles teoricamente gerados a partir de uma base de dados de sequências de proteínas (Junqueira, *et al.* 2012). O banco de dados utilizado foi o de cDNA dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius Panstrongylus* e *Dipetalogaster* mais o banco de gDNA do *R. prolixus*. Para as buscas, foi considerada uma taxa de detecção falsa aceitável de 1% *cut off* (*False Discovery Rate - FDR*) baseado no banco *decoy* como descrito (Elias, *et al.* 2007; Barboza, *et al.* 2011; Junqueira, *et al.* 2012).

## **Análise de sequências por bioinformática**

As proteínas identificadas foram submetidas a análises de bioinformática pelo SignalP 4.0 (Nielsen, *et al.* 1997; Petersen, *et al.* 2011) que identifica a presença de peptídeo sinal e sítios de clivagem, busca feita para eucariotos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); pelo SecretomeP 2.0 Server (Bendtsen, *et al.* 2004) que identifica se a proteína em questão foi secretada por via não clássica, caso tenha score > 0,50 (NN-score), busca feita para mamíferos, bactérias Gram + e Gram - (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>); TargetP 1.1 Server (Nielsen, *et al.* 1997) que identifica a localização subcelular da proteínas eucarióticas, busca em *non-plants* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) e TMHMM 2.0 (Krogh, *et al.* 2001) que identifica a presença de domínio de  $\alpha$ -hélice transmembranar na proteína analisada (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

## Atividade ADPásica

A caracterização da atividade enzimática baseou-se no método colorimétrico que mede a liberação de fosfato inorgânico (Pi) a partir do substrato, ADP (Fiske & Subbarow, 1925). O teste foi realizado em microplaca com 96 poços e iniciado com a incubação de 10  $\mu$ L das frações retida ou filtrada com o tampão de atividade (Tris-HCL 50 mM, pH 8,3; NaCl 150 mM; CaCl<sub>2</sub> ou MgCl<sub>2</sub> 5 mM; 0,1 mM EDTA) e ADP 2 mM, por 20 min a 37 °C.

A reação foi interrompida por meio de adição de TCA 75%, em concentração correspondente a 5% do volume final. Em seguida, foram adicionados 30  $\mu$ L de molibdato de amônio 2,5% (m/v) diluído em HCl 2N e 12  $\mu$ L de ácido aminonaftolsulfônico (Fiske e Subbarow, Sigma), para um volume final de 200  $\mu$ L. O resultado foi observado mediante a alteração da coloração da solução. Após 10 min de incubação, fez-se a leitura da absorbância a 630 nm em leitora de microplaca Tp reader (Thermoplate). Usou-se como controle a incubação de tampão de atividade e ADP na ausência de saliva. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

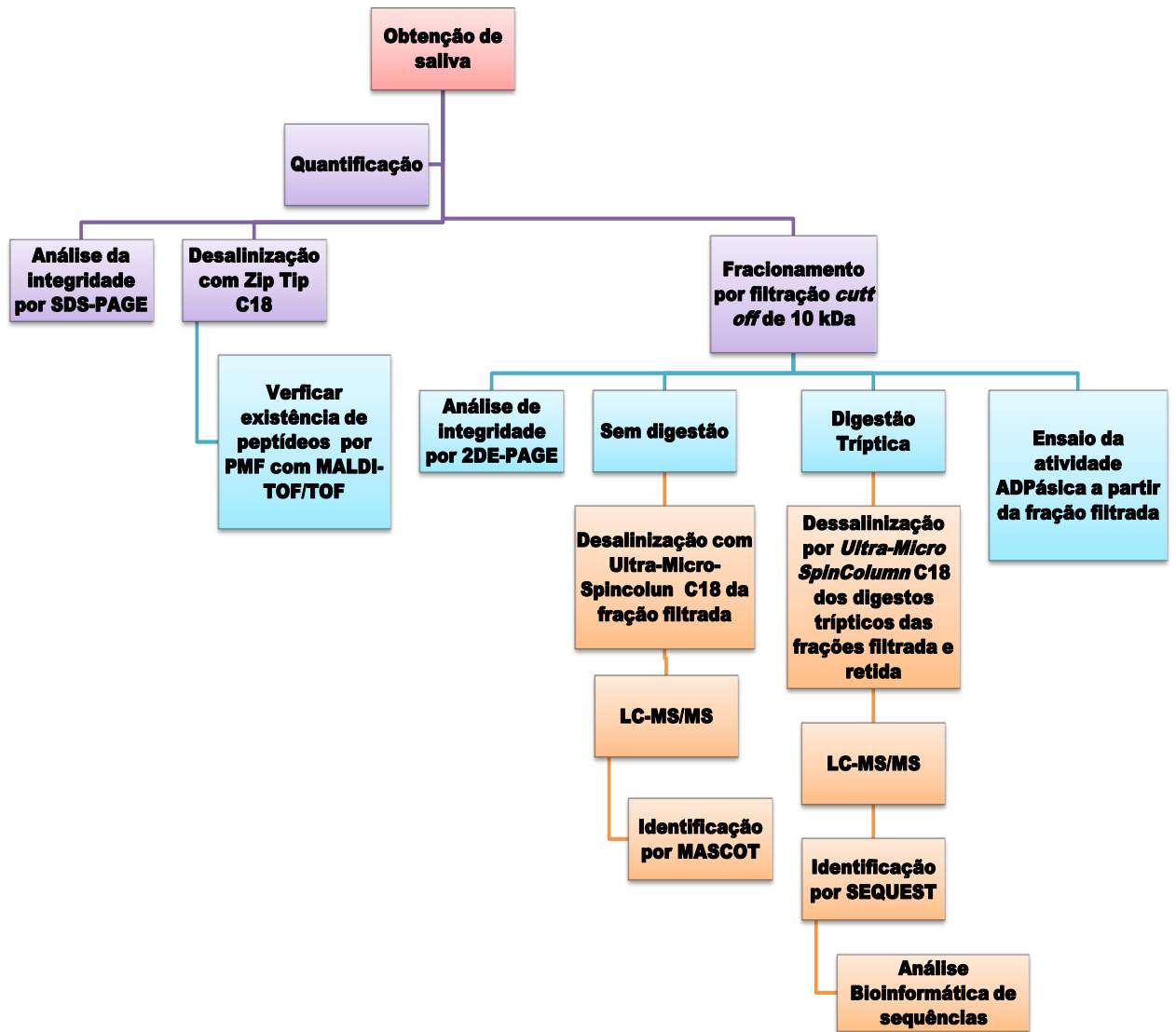


Figura 5. Fluxograma das etapas realizadas neste estudo da saliva de *T. infestans*

# **RESULTADOS**



## Perfil eletroforético da saliva de *T. infestans* em gel unidimensional

A saliva bruta, após a adição de um coquetel de inibidores de proteases sem EDTA, foi submetida à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida-SDS, a fim de verificar a integridade das proteínas contidas nesta. Nota-se na figura 6 um perfil eletroforético típico desta saliva, com maior prevalência de proteínas distribuídas na faixa de 14 – 45 kDa, que são principalmente lipocalinas e proteínas da família das apirases, de 67 kDa e 88 kDa (Charneau, *et al.* 2007). Quanto maior a quantidade de proteínas aplicadas no gel (Figura 6, coluna C) mais nítidas se tornam as bandas das proteínas de massas moleculares inferiores a 10 kDa, ou seja, dos peptídeos.

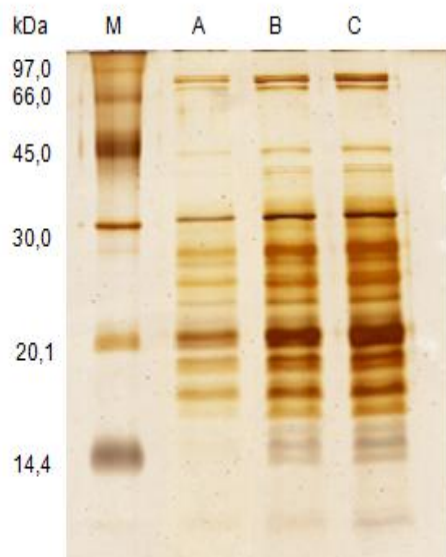


Figura 6. Perfil eletroforético da saliva bruta de *T. infestans* em SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata. M - Marcador molecular (LMW-SDS Marker, GE Healthcare). A – 2,5 µg de proteínas, B - 5 µg, e C - 7,5 µg.

## Análise da saliva de *T. infestans* em MALDI-TOF/TOF

A fim de nos certificar da existência de peptídeos na saliva de *T. infestans*, foi realizado PMF com a saliva bruta utilizando-se um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (Autoflex II — Bruker Daltonics). Na figura 7 podemos observar que proteínas até 7 kDa ionizaram.

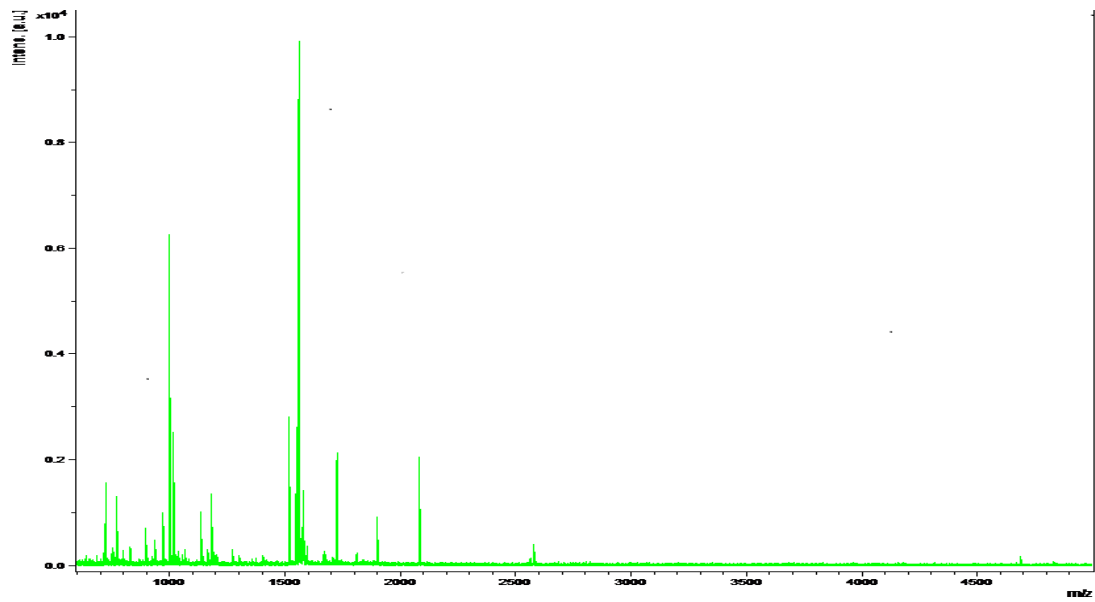
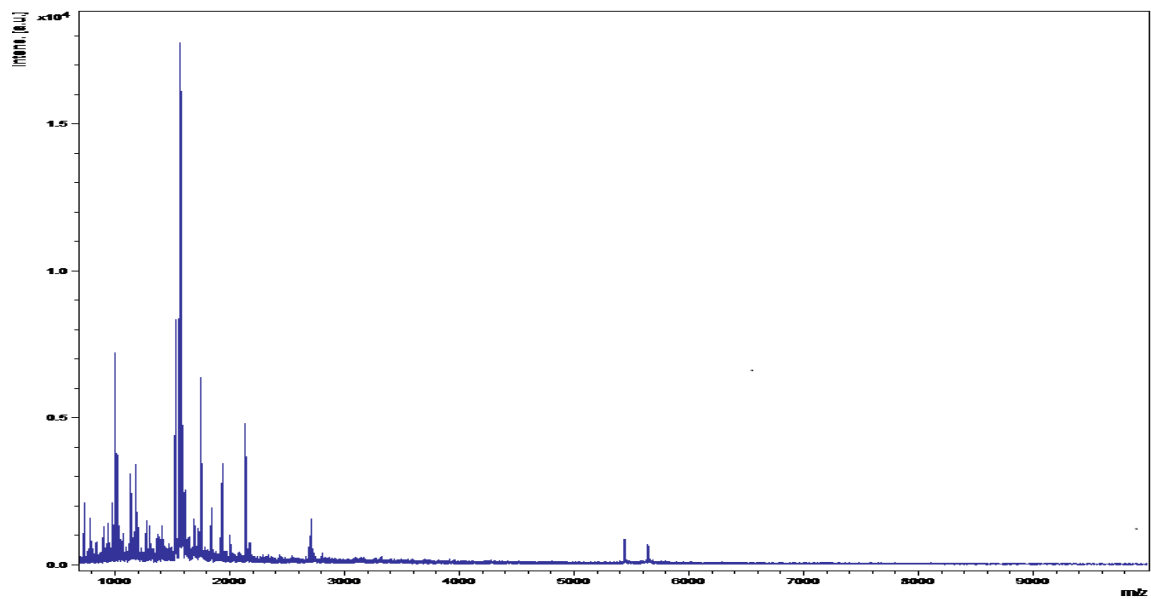
**A****B**

Figura 7. A e B. Espectros de massa PMF obtidos em MALDI-TOF/TOF. 2  $\mu$ L de saliva bruta dessalinizada em microcoluna de fase reversa C18 (ZipTip® Pipette Tips - Millipore) foram aplicados na placa do MALDI em mistura com a matriz DHB (AnchorChip™ targets - Bruker Daltonics) (A) modo refletido, (B) modo linear.

## **Fracionamento da saliva por ultrafiltração com base no tamanho molecular**

Após ultrafiltração da amostra de saliva de *T. infestans* em membrana com poro de exclusão molecular de 10 kDa, foram obtidas duas frações: 1) fração filtrada, de peptídeos (proteínas de baixa massa molecular ou  $\leq 10$  kDa); e 2) fração retida, contendo proteínas de massa molecular superior a 10 kDa.

## **Perfil eletroforético da saliva de *T. infestans* em gel bidimensional**

Com o intuito de verificar o perfil eletroforético 2-DE da saliva de *T. infestans* e comprovar a integridade das proteínas após ultrafiltração, a fração retida foi ressuspenida em tampão 2-DE e submetida a eletroforese bidimensional. A primeira dimensão foi realizada em tira de gel imobilizado, com gradiente de pH de 3 a 10, segundo técnica otimizada por Charneau e colaboradores (2007). O mapa 2-DE abrangente foi obtido (Figura 8). Embora as proteínas alcalinas não tenham sido bem resolvidas, o perfil obtido foi semelhante ao já publicado. Dessa forma foi possível continuar a investigação proteômica das frações retida e filtrada.

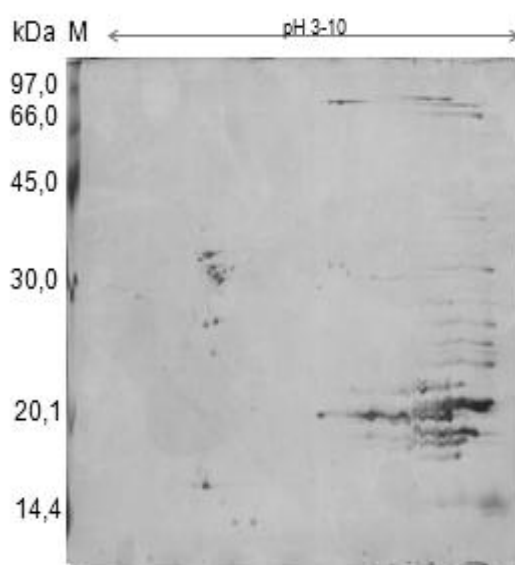


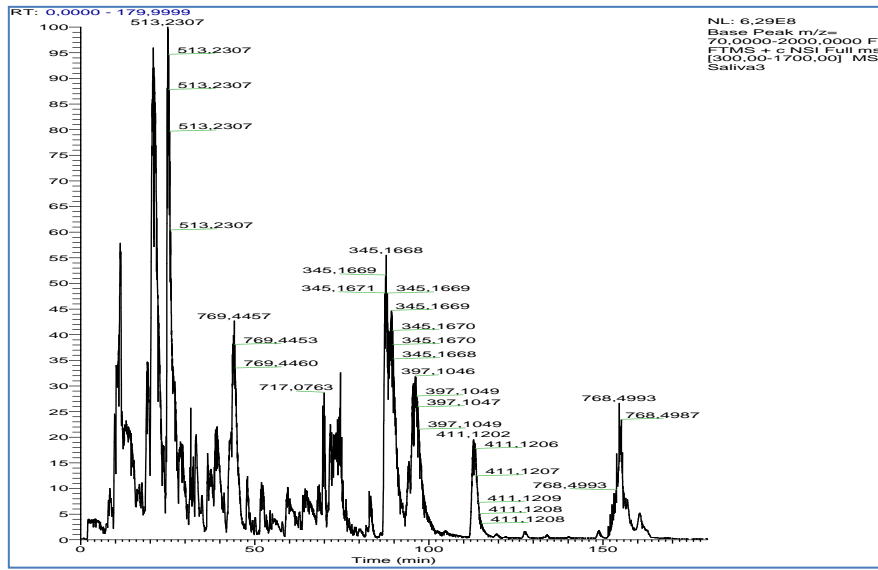
Figura 8. Mapa 2-DE das proteínas salivares secretadas de *T. infestans* em ampla faixa de pH. O gel 2-DE foi realizado em condição de desnaturação utilizando tiras de IPG de pH 3-10 linear para a IEF, seguida de eletroforese em SDS-PAGE 12% na segunda dimensão. Foram utilizados 50 µg de proteínas da saliva. O gel foi corado com nitrato de prata.

## **Análise das frações proteicas salivares retidas e filtradas de *T. infestans* por espectrometria de massas de alto desempenho (do tipo nanoLC-MS/MS)**

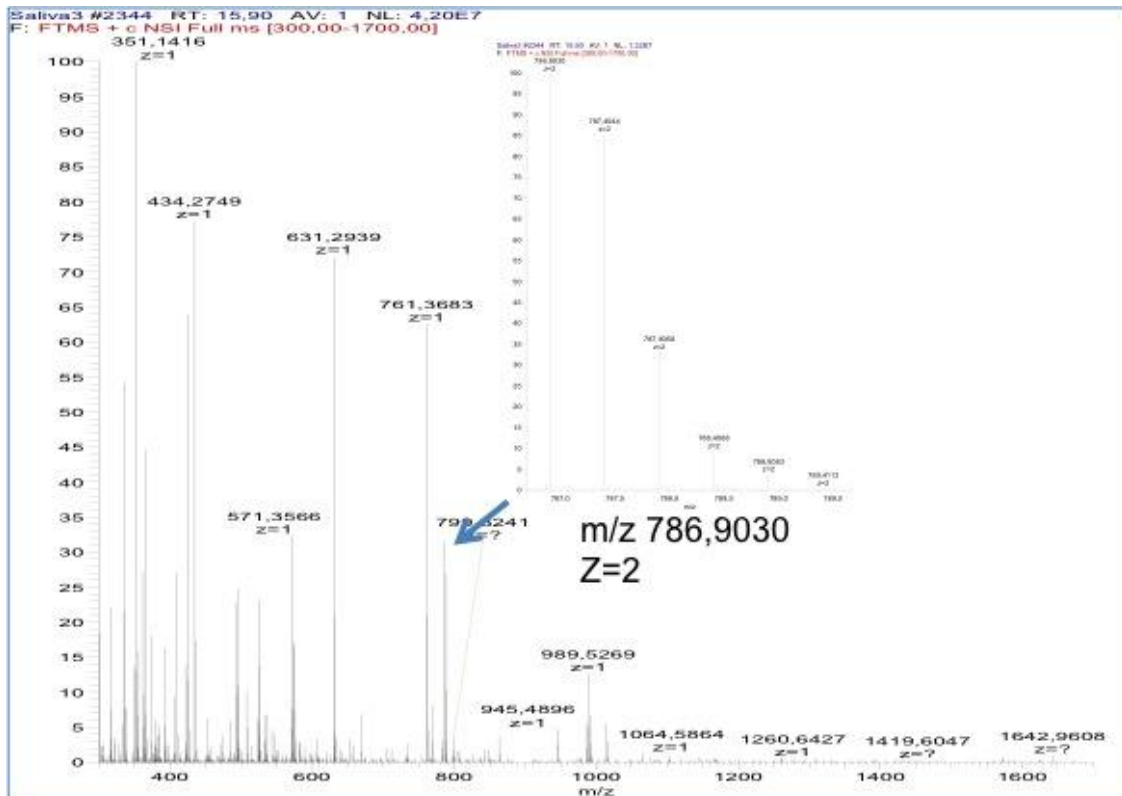
### **Fração filtrada de proteínas de massas moleculares $\leq 10$ kDa sem digestão por tripsina**

O ultrafiltrado foi dessalinizado e concentrado utilizando microcoluna C18. Os peptídeos ultrafiltrados foram analisados por nanoLC-MS/MS usando a cromatografia líquida de fase reversa de elevado desempenho acoplado ao espectrômetro de massas LTQ XL-Orbitrap (ThermoFisher Scientific). Assim confirmou-se a presença nesta fração de peptídeos e pequenas proteínas com massa molecular abaixo de 10 kDa na fração filtrada (Figura 9).

A



B



C

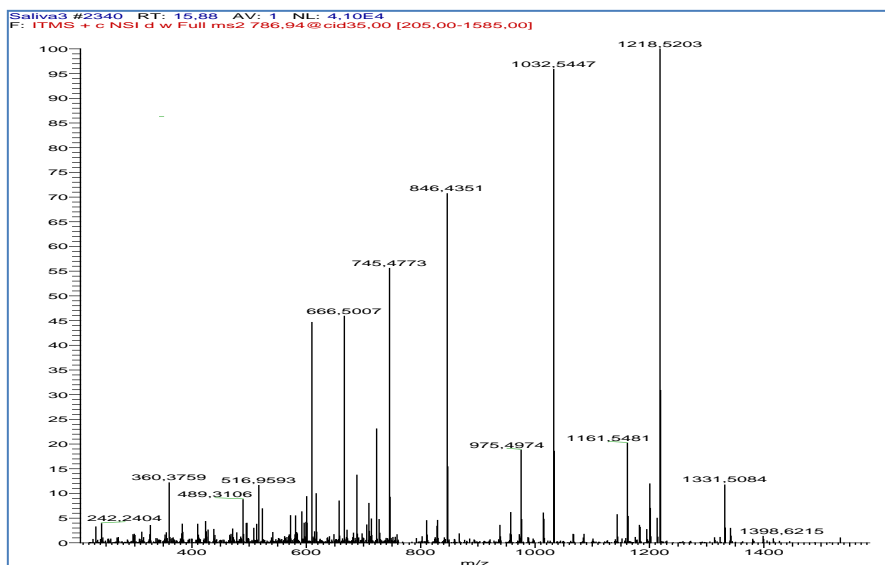


Figura 9. Espectros de massas gerados a partir da fração da saliva filtrada por Microcon. (A) Cromatograma dos picos iônicos dos peptídeos da fração retida da saliva de *T. infestans* adquirido por nano-LC-MS/MS em um LTQ Orbitrap XL durante um gradiente de 180 min. Os peptídeos foram separados por nano-LC (taxa de fluxo de 200 nL/min) antes de serem pulverizados para o espectrômetro de massas. (B) Espectro MS1 adquirido em 60,000 resolução a 15,9 min de tempo de retenção. A seta mostra a distribuição isotópica do precursor de massa de 786,9030 fragmentado em (11). (C) O espectro de MSMS de  $m/z$  de 786,9030 adquirida em LTQ a 35% de colisão normalizada em uma aquisição de dados dependente.

Nesta primeira análise peptidômica por nanoLC-MS/MS da fração filtrada sem digestão trípica, uma grande lista de peptídios trípticos com R ou K na extremidade C-terminal foi identificada (anexo 1). Esses peptídeos são resultado de uma provável digestão tríptica na saliva no momento da salivação imediatamente antes de ser adicionado ao microtubo contendo um coquetel de inibidores de proteases sem EDTA. Uma tripsina-*like* foi caracterizada na saliva de *T. infestans*, denominada de triapsina (Paddock, *et al.* 2001). A partir dos peptídeos desta fração foram identificadas, pelo programa Sequest, sequências de proteínas conhecidas, cujas massas moleculares são maiores que 10 kDa, pertencentes às famílias das lipocalinas, trialisinas, apirases, entre outras

Em decorrência de não ter confirmado a presença de peptídeos trípticos oriundos da digestão pela tripsina endógena da saliva de *T. infestans*, a fim de obter mais identificações, realizou-se uma digestão tríptica das frações filtrada

e retida após o fracionamento e antes de submeter ao nanoLC-MSMS para analisar os peptídeos contendo R ou K na posição C-terminal presentes nestas frações.

### **Fração retida e filtrada de proteínas de massas moleculares $\leq 10$ kDa com digestão por tripsina**

No total, foram identificadas 234 proteínas, sendo 164 na fração retida (tabela 1), ou seja, proteínas com massa molecular acima de 10 kDa, e 70 na fração filtrada (tabela 2), correspondentes aos peptídeos, ou seja, com massa molecular abaixo de 10 kDa. De fato na fração filtrada, 8 sequências identificadas têm uma massa molecular predita  $< 10$  kDa e as outras 62 são fragmentos de proteínas. Esse dado mostra que essas proteínas foram processadas na saliva por proteólise e que os peptídeos encontrados são resultantes dessa digestão proteolítica. Na fração retida foram encontrados peptídeos com massa molecular predita menor que 10 kDa. Provavelmente essas proteínas sofreram modificações pós-traducionais que levaram ao aumento da massa acima de 10 kDa, impedindo que as mesmas passassem através da membrana de exclusão molecular.

Notavelmente, 130 proteínas salivares identificadas correspondem a proteínas com função já conhecida na alimentação sanguínea. A maioria pertence à família das lipocalinas (83), além de trialisinas (16), citocromo b (11), triplatinas (4), triatox (2), infestilinas (2), nitroforinas (3), triabinas (3), apirases (3) e triafestinas (3).

Tabela 1: Fração retida

Ctrl <sup>a</sup>	Accession <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Score <sup>d</sup>	Coverage <sup>e</sup>	Prot. <sup>f</sup>	Pep <sup>g</sup>	PSMs <sup>h</sup>	MW i [kDa]	calc. pi <sup>j</sup>	SignalP <sup>k</sup>	SecretomeP <sup>l</sup>	TargetP <sup>m</sup>	TMHMM <sup>n</sup>
1	18920642	trialysin [Triatoma infestans]	1799,03	80,49	4	23	551	22,2	9,45	No	No	-	
2	149898863	trialysin precursor allele [Triatoma infestans]	1714,91	63,46	2	22	520	28,5	8,22	Yes	No	S	
3	109240371	platelet inhibitor triplatin-1 [Triatoma infestans]	1052,85	85,16	1	15	299	19,8	8,24	yes	No	S	
4	146199197	r-trialysin [Triatoma infestans]	908,28	49,62	2	20	313	28,6	8,22	yes	No	S	
5	149689050	lipocalin-like TiLipo39 allele [Triatoma infestans]	696,76	61,45	1	12	213	19,8	8,24	yes	No	S	
6	71725070	triatox [Triatoma infestans]	691,45	70,59	1	9	200	14,8	5,50	yes	No	S	
7	34421654	lipocalin-like TiLipo33 [Triatoma infestans]	675,81	64,09	1	10	150	19,6	8,00	Yes	No	S	
8	149689124	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	654,62	80,40	1	17	182	22,3	9,09	Yes	No	S	
9	34421656	lipocalin-like TiLipo39 [Triatoma infestans]	515,79	34,08	1	7	130	19,8	8,81	Yes	No	S	
10	149689090	truncated pallidipin-like lipocalin precursor [T. infestans]	501,72	27,85	3	6	139	25,5	4,45	No	Yes G+/-	-	
11	149689208	truncated pallidipin-like lipocalin precursor [T. infestans]	379,20	32,02	3	5	101	26,2	4,36	No	Yes G+/-	-	
12	307094974	trialysin [Triatoma matogrossensis]	328,05	36,96	2	11	95	28,2	8,51	Yes	No	S	
13	149689060	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	282,76	30,73	5	8	127	20,0	8,43	Yes	No	S	
14	149898816	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	276,50	69,11	2	9	93	21,4	7,24	Yes	No	S	
15	149689054	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	230,77	36,31	5	8	75	20,0	7,97	Yes	No	S	
16	71725072	infestilin [Triatoma infestans]	228,10	67,55	1	9	81	17,0	8,43	Yes	No	S	
17	149689036	short trialysin 1 [Triatoma infestans]	207,20	48,68	1	1	71	8,5	4,28	Yes	No	S	
18	149689148	salivary secreted protein [Triatoma infestans]	188,44	39,90	1	4	82	19,6	8,40	Yes	No	S	
19	109240373	platelet inhibitor triplatin-2 [Triatoma infestans]	177,53	66,29	1	10	54	19,5	7,64	Yes	No	S	
20	149689044	short trialysin 3 [Triatoma infestans]	170,10	48,68	2	3	49	8,4	4,50	Yes	No	S	
21	149898801	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	155,57	35,16	1	7	77	20,4	8,75	Yes	No	S	
22	149898787	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	151,75	34,07	1	5	44	20,5	9,03	Yes	No	S	
23	149689094	salivary secreted protein [Triatoma infestans]	136,36	51,94	1	7	42	14,6	9,86	Yes	No	S	1
24	149689058	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	116,35	22,91	6	6	47	19,9	7,97	Yes	No	S	
25	34481604	79 kDa salivary apyrase precursor [Triatoma infestans]	103,24	41,47	1	20	33	62,5	8,76	No	No	S	1
26	149898852	hemolysin-like secreted salivary protein 1 [T. infestans]	101,95	71,08	1	11	27	25,1	8,07	Yes	No	S	
27	71725068	triatin [Triatoma infestans]	97,54	63,55	2	12	35	24,3	8,38	Yes	No	S	
28	149689052	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	95,69	31,28	5	6	32	19,9	7,14	Yes	No	S	
29	149689070	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	76,92	62,98	2	11	26	24,3	9,31	Yes	No	S	
30	307094846	salivary lipocalin 4 [Triatoma matogrossensis]	71,60	29,61	6	3	39	19,8	5,50	Yes	No	S	
31	307094998	salivary secreted kazaltype proteinase inhibitor [T.mat.]	68,96	24,10	1	1	33	9,5	4,63	Yes	No	S	



32	149689068	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	56,04	53,37	1	11	20	24,0	9,10	Yes	No	S	
33	149898884	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	50,81	18,13	1	4	13	22,3	8,95	Yes	No	S	
34	149689178	hemolysin-like secreted salivary protein 3 [T. infestans]	43,88	34,93	1	5	11	28,1	4,96	Yes	No	S	
35	307094984	salivary protein MYS precursor [Triatoma matogrossensis]	43,55	10,70	1	1	55	20,4	4,82	Yes	No	S	
36	149898811	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	43,15	31,19	1	6	15	22,7	9,20	Yes	No	S	
37	307095036	salivary apyrase precursor [Triatoma matogrossensis]	42,95	22,77	1	8	17	64,1	8,00	No	Yes G+	S	1
38	149689138	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	42,14	42,78	2	7	13	22,2	8,85	Yes	No	S	
39	149689120	hemolysin-like secreted salivary protein 2 [T. infestans]	42,10	38,96	2	7	12	25,4	8,56	Yes	No	S	
40	149689170	salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [T. infestans]	38,12	27,85	2	7	11	36,0	9,42	Yes	No	S	
41	149898911	pallidipin-like lipocalin precursor [Triatoma infestans]	36,79	18,22	4	5	13	30,6	4,51	Yes	No	S	
42	149689040	short trialysin 2 [Triatoma infestans]	36,09	59,21	1	3	16	8,6	4,72	Yes	No	S	
43	307094906	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	33,14	12,02	2	4	12	24,0	9,00	Yes	No	S	
44	149898926	truncated pallidipin-like lipocalin precursor [T. infestans]	29,44	8,20	3	3	10	29,5	4,49	No	Yes G+	-	
45	149689062	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	29,06	28,73	1	5	9	20,0	7,99	Yes	No	S	
46	149898795	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	27,38	14,84	1	2	12	20,5	8,91	Yes	No	S	
47	149689042	salivary secreted protein [Triatoma infestans]	26,82	30,65	1	4	8	33,8	6,58	Yes	No	S	
48	149689196	lipocalin-like TiLipo33 allele [Triatoma infestans]	26,17	18,68	1	4	10	20,0	8,44	Yes	No	S	
49	307095158	pol-like protein [Triatoma matogrossensis]	24,83	5,92	1	1	20	32,3	6,54	No	No	-	
50	149689106	heme-binding protein [Triatoma infestans]	23,53	40,85	2	6	11	16,2	5,95	Yes	No	S	
51	149898782	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	23,04	26,37	1	5	8	20,4	9,04	Yes	No	S	
52	307094828	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	22,43	6,09	2	1	8	22,6	8,38	Yes	No	S	
53	149689164	triatin-like salivary lipocalin [Triatoma infestans]	16,46	19,80	1	3	5	22,7	5,73	Yes	No	S	
54	155029176	triafestin-1 [Triatoma infestans]	16,04	9,71	1	3	5	23,7	9,16	Yes	No	S	
55	149689188	lipocalin-like Ti65 [Triatoma infestans]	13,49	24,87	4	5	8	21,6	9,25	Yes	No	S	
56	307094860	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	12,55	10,99	1	1	12	20,0	4,88	Yes	No	S	
57	307095022	secreted salivary trypsin [Triatoma matogrossensis]	12,19	16,17	1	3	4	33,2	8,79	Yes	No	S	
58	149898809	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	12,11	10,81	1	2	4	20,5	8,91	Yes	No	S	
59	149898822	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	11,66	15,98	2	3	4	21,9	8,87	Yes	No	S	
60	111379889	salivary lipocalin 3 [Triatoma brasiliensis]	11,65	23,41	1	4	6	23,5	7,34	No	Yes G-	-	
61	307095198	salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [T. mat.]	11,40	6,65	1	1	9	37,4	7,81	Yes	No	S	
62	307095038	salivary apyrase precursor [Triatoma matogrossensis]	11,14	5,78	1	3	5	64,1	7,30	No	Yes G+	S	1
63	149689142	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	10,09	21,83	2	4	9	21,9	9,09	Yes	No	S	
64	111379925	secreted salivary trypsin [Triatoma brasiliensis]	9,33	18,78	1	2	3	21,8	8,79	Yes	No	S	
65	307094844	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	9,10	11,68	1	3	3	24,8	9,11	Yes	No	S	1
66	149689116	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	8,93	13,85	1	2	3	22,5	9,32	Yes	No	S	
67	307095102	putative elongation factor 1-alpha [Triatoma matogrossensis]	8,79	14,94	1	2	14	50,5	8,95	No	No	-	
68	111379915	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	8,69	11,39	5	2	4	17,4	6,99	No	Yes G-	-	

69	149689048	short trialysin 5 [Triatoma infestans]	8,63	30,26	1	2	4	8,5	4,61	Yes	No	S	
70	149689032	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	8,25	13,85	2	2	3	22,7	9,00	Yes	No	S	
71	307094914	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	7,04	7,26	2	1	3	19,9	5,64	Yes	No	S	
72	149689080	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	6,87	13,47	2	3	3	21,5	8,43	Yes	No	S	
73	149689100	putative salivary secreted peptide [Triatoma infestans]	6,55	18,38	3	2	2	15,3	9,76	Yes	No	S	1
74	149689066	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	6,34	6,80	1	2	3	23,7	8,72	Yes	No	S	
75	149689176	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	5,46	18,78	2	2	5	23,0	6,04	Yes	No	S	
76	291621795	NADH dehydrogenase subunit I [Triatoma mexicana]	5,44	19,87	1	2	11	35,7	6,51	No	Yes G+	S	8
77	20451029	nonstructural protein precursor [Triatoma virus]	4,64	1,62	1	1	4	203,9	6,51	Yes	No	S	2
78	11182466	NADH dehydrogenase subunit 3 [Triatoma dimidiata]	4,58	21,19	1	1	7	13,5	7,12	No	Yes G+	S	3
79	116267191	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	4,48	8,57	2	2	2	19,5	8,98	No	Yes G-	-	
80	149689194	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	4,41	18,27	2	3	3	23,8	9,64	Yes	No	S	
81	270381631	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	4,37	9,70	2	1	1	14,4	5,01	Yes	No	S	
82	307094940	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	4,29	15,96	3	2	2	21,8	5,29	Yes	No	S	
83	307095170	acetylcholinesterase [Triatoma matogrossensis]	3,99	11,11	1	2	5	27,6	7,01	No	YesMM/G-	-	
84	149898844	antigen-5-like protein precursor [Triatoma infestans]	3,96	6,97	1	2	2	28,1	9,06	Yes	No	S	
85	307095148	lysosomal membrane glycoprotein [Triatoma matogrossensis]	3,76	5,03	1	1	2	32,4	7,01	Yes	No	S	1
86	168830377	cytochrome b [Triatoma brasiliensis]	3,36	20,33	3	1	2	13,9	7,50	No	Yes MM/G+	S	2
87	307094868	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	3,30	5,58	1	1	1	22,6	8,63	Yes	No	S	
88	116267181	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	3,12	5,36	1	1	1	18,5	7,99	No	Yes G+/-	-	
89	149689220	putative salivary secreted protein [Triatoma infestans]	3,07	8,00	1	1	1	19,9	5,96	Yes	No	S	1
90	307095172	hsp70 family member [Triatoma matogrossensis]	2,68	7,86	1	1	4	45,1	5,90	No	No	-	
91	116267189	salivary lipocalin 6 [Triatoma brasiliensis]	2,63	26,06	1	2	4	21,2	9,14	Yes	No	S	1
92	5051609	cytochrome b [Rhodnius pictipes]	2,56	23,31	2	1	1	15,3	6,35	No	Yes MM/G+	S	2
93	149689022	salivary secreted protein [Triatoma infestans]	2,55	10,98	1	1	1	17,7	9,22	Yes	No	S	
94	111379897	salivary triabin 2 [Triatoma brasiliensis]	2,55	12,71	1	1	3	20,9	4,92	Yes	No	S	
95	111379913	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	2,50	3,91	1	1	1	19,6	5,57	Yes	No	S	
96	255766901	cytochrome b [Rhodnius robustus]	2,49	13,55	1	1	3	24,2	9,00	No	Yes G+	S	5
97	307094894	salivary triabin 2 [Triatoma matogrossensis]	2,46	20,88	1	1	1	20,9	5,06	Yes	No	S	1
98	149689082	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 12-like protein [T.inf.]	2,46	14,42	1	1	5	24,8	6,38	No	No	-	
99	33518675	lipocalin AI-6 precursor [Rhodnius prolixus]	2,44	12,65	1	1	1	18,8	9,26	Yes	No	S	
100	291621799	NADH dehydrogenase subunit I [Triatoma rubrovaria]	2,36	9,12	1	1	1	35,7	7,43	No	Yes G+	S	8
101	307094910	triabin-like lipocalin precursor [Triatoma matogrossensis]	2,32	11,48	1	1	1	24,4	9,50	Yes	No	S	
102	307095016	salivary kazaltype serine protease inhibitor [T. mat.]	2,30	37,88	1	1	8	7,6	4,83	Yes	No	S	1
103	270046176	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	2,29	16,24	1	1	9	22,1	6,74	Yes	No	S	
104	307095008	salivary kazaltype proteinase inhibitor [T. matogrossensis]	2,23	31,03	1	1	4	9,8	5,36	Yes	No	S	
105	116267195	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	2,20	8,42	1	1	1	21,2	8,87	No	Yes G-	-	

106	149689174	pallidipin-like salivary lipocalin [Triatoma infestans]	2,20	6,40	1	1	1	28,7	5,76	Yes	No	S	
107	307095128	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2 [T. mat.]	2,19	17,71	1	1	6	21,8	5,57	Yes	No	S	1
108	295684932	CAPA receptor variant B [Rhodnius prolixus]	2,12	6,78	2	1	2	40,4	9,25	No	Yes G+	S	6
109	149689206	salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [T. infestans]	2,11	5,35	1	1	1	36,8	9,07	No	Yes G+/-	S	
110	149689078	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	2,08	19,43	1	2	2	19,2	8,62	Yes	No	S	
111	307094980	hypothetical secreted salivary protein [T. matogrossensis]	2,05	10,12	1	1	1	29,0	6,47	Yes	No	S	
112	33518705	salivary protein MYS1 precursor [Rhodnius prolixus]	2,03	13,70	1	1	2	16,0	8,22	Yes	No	S	
113	116267203	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	2,01	22,84	1	2	2	17,9	9,29	No	Yes G+/-	-	
114	270046230	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	1,87	6,15	1	1	1	22,6	8,53	Yes	No	S	
115	270046238	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	1,81	7,84	1	1	1	28,9	8,70	Yes	No	S	
116	74837325	RecName: Full=Nitrophorin-7; Short=NP7; Flags: Precursor	1,78	3,41	1	1	1	22,9	8,69	Yes	No	S	
117	270046234	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	1,76	7,04	1	1	1	22,8	4,89	Yes	No	S	
118	163869630	actin [Rhodnius prolixus]	1,75	13,86	1	1	2	11,5	8,44	No	Yes MM	-	
119	33518669	lipocalin AI-3 precursor [Rhodnius prolixus]	1,75	8,09	1	1	1	19,5	8,91	Yes	No	S	
120	71841605	serine carboxypeptidase 1 [Triatoma infestans]	1,74	4,64	1	1	1	53,9	5,34	No	Yes G+	S	1
121	111379929	pallidipin precursor [Triatoma brasiliensis]	1,73	8,21	1	1	1	22,2	8,51	Yes	No	S	
122	161019599	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [Triatoma infestans]	1,71	10,42	2	2	3	39,0	6,19	No	No	-	
123	38147395	cathepsin L-like proteinase [Triatoma infestans]	1,71	6,10	1	1	2	36,5	6,54	Yes	No	S	
124	116267199	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	1,70	12,90	1	1	1	21,3	8,87	Yes	No	S	
125	156891047	dorsal 1C [Rhodnius prolixus]	1,70	1,90	3	1	1	64,6	6,21	No	Yes G+/-	-	
126	307094888	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	1,70	6,40	1	1	3	22,6	9,04	Yes	No	S	
127	307094858	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	1,68	3,50	3	1	1	22,8	8,59	Yes	No	S	
128	307094934	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	1,68	7,41	1	1	1	21,4	8,56	Yes	No	S	
129	307094856	salivary lipocalin 4 [Triatoma matogrossensis]	1,68	7,22	2	1	2	19,8	7,65	Yes	No	S	
130	8473626	RecName: Full=Nitric oxide synthase, salivary gland; Short=NOS	1,67	1,45	1	1	2	132,3	6,98	Yes	No	S	
131	156891041	beta-GRP [Rhodnius prolixus]	1,65	2,95	1	1	1	53,9	6,18	Yes	No	S	1
132	33518719	nitrophorin 3B [Rhodnius prolixus]	1,63	11,70	1	1	1	20,9	8,06	Yes	No	S	
133	307095202	hypothetical conserved secreted protein [T. matogrossensis]	1,62	8,47	1	1	2	27,9	5,49	Yes	No	S	1
134	307095150	hypothetical conserved protein [Triatoma matogrossensis]	1,61	4,90	1	1	1	28,0	5,43	No	No	-	
135	307095196	tubulin polymerization promoting protein [T. matogrossensis]	1,61	7,23	1	1	1	18,3	9,44	No	YesMM/G+/-	-	
136	307095048	methylaccepting chemotaxis sensory transducer-like protein [T.mat.]	1,61	2,50	2	1	1	30,1	5,00	Yes	No	S	
137	307095152	hypothetical conserved protein [Triatoma matogrossensis]	1,60	7,47	1	1	1	19,1	5,36	No	Yes MM	-	
138	111379917	lipocalin [Triatoma brasiliensis]	0,00	10,67	1	1	1	20,0	8,31	No	YesMM/G+/-	-	
139	11182469	NADH dehydrogenase subunit 5 [Triatoma dimidiata]	0,00	5,79	1	1	1	65,0	5,35	No	Yes G+	S	16
140	11182472	NADH dehydrogenase subunit 6 [Triatoma dimidiata]	0,00	21,56	1	1	4	19,1	9,06	No	YesG+	S	3
141	116267205	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	0,00	10,33	1	1	1	20,9	8,84	No	YesMM/G+/-	-	
142	149689074	DJ-1 [Triatoma infestans]	0,00	20,62	1	2	2	20,4	6,02	No	No	-	

143	149689200	DNA-directed RNA polymerase II 13.3 kDa polypeptide [T. infestans]	0,00	25,64	1	1	1	13,5	6,33	No	No	-	
144	149898939	actin-related protein Arp2/3 complex subunit ARPC3 [T. infestans]	0,00	19,66	1	1	2	20,4	8,35	No	Yes G+	-	
145	269969616	RecName: Full=40S ribosomal protein S3a	0,00	13,36	3	2	2	29,6	9,79	No	YesMM/G+/-	-	
146	270046168	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	0,00	18,08	1	1	1	20,0	8,76	Yes	No	S	
147	270046172	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	0,00	20,20	1	1	1	22,5	5,60	Yes	No	S	
148	307094850	pallidipin-like lipocalin precursor [Triatoma matogrossensis]	0,00	11,54	1	1	1	29,3	4,53	Yes	No	S	
149	307094976	short trialysin [Triatoma matogrossensis]	0,00	48,68	1	1	1	8,4	4,28	Yes	No	S	
150	307094986	salivary secreted protein [Triatoma matogrossensis]	0,00	15,42	1	1	1	23,5	4,55	Yes	No	S	1
151	307095030	salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [T. matogrossensis]	0,00	7,62	2	1	1	35,8	9,23	Yes	No	S	
152	307095082	hypothetical secreted protein [Triatoma matogrossensis]	0,00	24,10	1	1	1	18,4	7,03	Yes	No	S	
153	307095156	hypothetical viral protein [Triatoma matogrossensis]	0,00	17,34	1	1	2	18,9	8,91	No	Yes G+	-	4
154	307095166	2-phosphodiesterase [Triatoma matogrossensis]	0,00	5,99	1	1	1	37,7	6,18	No	No	-	
155	307095176	B-box zinc finger family protein [Triatoma matogrossensis]	0,00	10,18	1	1	1	33,0	4,89	No	Yes G+/-	S	2
156	307095194	cytochrome oxidase subunit 2 [Triatoma matogrossensis]	0,00	13,57	1	1	1	25,1	4,92	No	Yes G+	S	2
157	307095204	ATPase H+ transporting lysosomal accessory protein 2 [T. mat.]	0,00	10,99	1	1	2	30,0	4,73	Yes	No	S	
158	3831510	cytochrome oxidase subunit I [Triatoma guasayana]	0,00	5,81	1	1	1	53,2	6,28	No	Yes MM/G+	-	11
159	3831525	cytochrome oxidase subunit I [Triatoma rubrovaria]	0,00	5,81	2	1	1	53,2	6,28	No	Yes MM/G+	S	
160	48256362	cytochrome oxidase subunit I [Triatoma sp. WCW-2003]	0,00	6,07	1	1	3	37,4	6,18	No	Yes G+	S	9
161	3219825	RecName: Full=Nitrophorin-1; Short=NP1; Flags: Precursor	0,00	10,63	1	1	1	22,7	7,25	Yes	No	S	1
162	1572727	salivary platelet aggregation inhibitor 2 [Rhodnius prolixus]	0,00	19,55	1	1	2	19,4	7,99	Yes	No	S	
163	20385886	cytochrome b [Rhodnius robustus]	0,00	15,84	1	1	1	25,0	8,69	No	Yes G+	S	5
164	122720924	RP30 [Rhodnius prolixus]	0,00	8,18	1	1	1	24,6	7,58	No	YesMM/G+/-	-	

<sup>a</sup> Número de controle das proteínas

<sup>b</sup> Número de acesso da proteína no NCBI

<sup>c</sup> Nome da proteína

<sup>d</sup> score de identificação

<sup>e</sup> percentual de sequência de proteína prevista cobertos por consulta combinadas de sequências com um contagem de alinhamento superior a 55% através de MASCOT

<sup>f</sup> número de vezes que a proteína foi identificada

<sup>g</sup> número de peptídeos identificados para determinada proteína

<sup>h</sup> peptide sequence matches

<sup>i</sup> massa molecular da proteína em kDa

<sup>j</sup> ponto isoelétrico calculado

<sup>k</sup> busca de peptídeo sinal

<sup>l</sup> avalia a via de secreção não-clássica, sem peptídeo sinal, busca feita para Gram positivos (G+), Gram negativos (G-) e mamíferos (MM)

<sup>m</sup> identifica a localização subcelular da proteínas, sendo C ( cloroplasto), M (mitocôndria) e S (secretada)

<sup>n</sup> Busca de  $\alpha$ -hélice, mostrando a posição de entrada e saída de cada  $\alpha$ -hélic

Tabela 2: Fração filtrada

Ctrl <sup>a</sup>	Accession <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Score <sup>d</sup>	Coverage <sup>e</sup>	Prot. <sup>f</sup>	Pep <sup>g</sup>	PSMs <sup>h</sup>	MW <sup>i</sup> [kDa]	calc. pI <sup>j</sup>	SignalP <sup>k</sup>	Secretome P <sup>l</sup>	TargetP <sup>m</sup>	TMHMM <sup>n</sup>
1	34421654	lipocalin-like TiLipo33 [Triatoma infestans]	424,69	28,18	1	2	102	19,6	8,00	Yes	No	S	
2	18920642	trialysin [Triatoma infestans]	381,13	64,39	3	11	113	22,2	9,45	No	No	-	
3	149898863	trialysin precursor allele [Triatoma infestans]	336,81	44,23	1	12	94	28,5	8,22	Yes	No	S	
4	149689050	lipocalin-like TiLipo39 allele [Triatoma infestans]	320,54	31,28	2	4	91	19,8	8,24	Yes	No	S	
5	149689124	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	315,42	43,22	1	6	75	22,3	9,09	Yes	No	S	
6	71725070	triatox [Triatoma infestans]	267,30	38,24	1	3	67	14,8	5,50	Yes	No	S	
7	149689090	truncated pallidipin-like lipocalin precursor [Triatoma infestans]	262,27	21,00	2	3	69	25,5	4,45	No	Yes G+/-	-	
8	149898852	hemolysin-like secreted salivary protein 1 [Triatoma infestans]	242,69	47,39	1	9	77	25,1	8,07	Yes	No	S	
9	149689040	short trialysin 2 [Triatoma infestans]	166,01	59,21	1	3	83	8,6	4,72	Yes	No	S	
10	109240371	platelet inhibitor triplatin-1 [Triatoma infestans]	158,53	62,64	1	7	39	19,8	8,24	Yes	No	S	
11	149689120	hemolysin-like secreted salivary protein 2 [Triatoma infestans]	136,68	27,31	1	5	31	25,4	8,56	Yes	No	S	
12	149689178	hemolysin-like secreted salivary protein 3 [Triatoma infestans]	97,71	19,12	2	4	41	28,1	4,96	Yes	No	S	
13	146199197	r-trialysin [Triatoma infestans]	68,38	32,31	1	9	22	28,6	8,22	Yes	No	S	
14	149689148	salivary secreted protein [Triatoma infestans]	63,66	47,98	1	5	16	19,6	8,40	Yes	No	S	
15	149689068	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	45,32	18,27	1	2	14	24,0	9,10	Yes	No	S	
16	149689048	short trialysin 5 [Triatoma infestans]	32,90	48,68	1	4	11	8,5	4,61	Yes	No	S	
17	149689044	short trialysin 3 [Triatoma infestans]	30,20	14,47	2	1	15	8,4	4,50	Yes	No	S	
18	149689060	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	29,97	17,32	1	3	14	20,0	8,43	Yes	No	S	
19	149898787	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	29,39	12,64	1	1	7	20,5	9,03	Yes	No	S	
20	34481604	79 kDa salivary apyrase precursor [Triatoma infestans]	23,90	12,03	2	4	8	62,5	8,76	No	No	S	1
21	307095036	salivary apyrase precursor [Triatoma matogrossensis]	22,16	7,18	2	3	7	64,1	8,00	No	Yes G+	S	1
22	149689170	salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma infestans]	16,61	15,82	4	3	5	36,0	9,42	Yes	No	S	
23	109240373	platelet inhibitor triplatin-2 [Triatoma infestans]	12,15	24,72	1	3	3	19,5	7,64	Yes	No	S	
24	149689138	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	11,08	29,90	1	2	3	22,2	8,85	Yes	No	S	
25	149689094	salivary secreted protein [Triatoma infestans]	10,39	19,38	1	1	2	14,6	9,86	Yes	No	S	1
26	155029176	triafestin-1 [Triatoma infestans]	9,53	10,68	1	2	3	23,7	9,16	yes	No	S	
27	155029178	triafestin-2 [Triatoma infestans]	8,71	4,85	2	1	3	23,7	8,72	Yes	No	S	
28	149689106	heme-binding protein [Triatoma infestans]	7,77	13,38	2	1	2	16,2	5,95	Yes	No	S	
29	149898816	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	6,51	23,04	1	2	2	21,4	7,24	Yes	No	S	
30	307094992	hemolysin-like secreted salivary protein 1 [Triatoma matogrossensis]	6,18	14,34	1	2	2	26,0	9,09	Yes	No	S	
31	5051623	cytochrome b [Triatoma protracta]	5,87	15,79	1	1	6	15,2	6,35	No	Yes MM/ G+	S	2
32	20451029	nonstructural protein precursor [Triatoma virus]	5,83	2,23	1	2	3	203,9	6,51	Yes	No	S	2
33	149898801	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	4,56	8,79	1	1	2	20,4	8,75	Yes	No	S	

34	149689054	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	4,45	18,44	1	1	1	20,0	7,97	Yes	No	S	
35	307095034	salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma matogrossensis]	4,10	11,39	4	2	3	35,9	9,19	Yes	No	S	
36	149689036	short trialysin 1 [Triatoma infestans]	3,87	48,68	1	1	1	8,5	4,28	Yes	No	S	
37	307095172	hsp70 family member [Triatoma matogrossensis]	3,82	12,04	1	2	2	45,1	5,90	No	No	-	
38	57635246	cytochrome b [Triatoma rubida]	3,14	20,19	5	1	3	11,7	6,67	No	Yes G+	S	2
39	307094828	salivary lipocalin [Triatoma matogrossensis]	2,64	6,09	2	1	1	22,6	8,38	No	Yes G+	S	
40	307095074	hypothetical insect conserved secreted peptide precursor [T. matogrossensis]	2,60	33,33	1	1	5	8,0	5,94	Yes	No	S	1
41	270381633	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	2,53	25,19	1	1	5	15,0	7,09	Yes	No	S	
42	149898795	salivary lipocalin [Triatoma infestans]	2,46	4,95	1	1	1	20,5	8,91	Yes	No	S	
43	149898841	salivary kazal-type proteinase inhibitor [Triatoma infestans]	2,40	25,93	1	1	1	8,9	7,96	Yes	No	S	1
44	111379905	pallidipin 2 [Triatoma brasiliensis]	2,35	17,22	2	1	2	19,7	8,09	Yes	No	S	
45	116267185	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	2,30	20,48	1	1	1	18,5	6,11	No	Yes G+/-	-	
46	111379891	salivary triabin 1 [Triatoma brasiliensis]	2,26	19,63	1	1	4	18,8	5,59	Yes	No	S	
47	149689114	cytochrome c oxidase [Triatoma infestans]	2,25	28,95	1	1	2	8,6	9,92	No	Yes G+	M	1
48	149689174	pallidipin-like salivary lipocalin [Triatoma infestans]	2,23	6,40	1	1	1	28,7	5,76	Yes	No	S	
49	33518681	triabin-like lipocalin 3 precursor [Rhodnius prolixus]	2,22	13,33	1	1	3	18,7	9,64	Yes	No	S	
50	90101342	salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Rhodnius prolixus]	2,22	8,10	1	1	1	36,5	8,84	Yes	No	S	
51	307095212	protein disulfide isomerase [Triatoma matogrossensis]	2,20	10,88	1	1	1	33,2	5,38	Yes	No	S	
52	262071926	adipokinetic hormone precursor [Rhodnius prolixus]	2,17	15,63	1	1	1	11,0	8,91	Yes	No	S	1
53	11182463	NADH dehydrogenase subunit 2 [Triatoma dimidiata]	2,15	6,02	1	1	3	37,7	8,84	Yes	No	S	9
54	270046246	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	2,15	7,18	1	1	1	21,2	4,91	Yes	No	S	
55	207083709	calreticulin [Rhodnius prolixus]	2,13	7,67	1	1	1	46,6	4,55	Yes	No	-	
56	307094996	hemolysin-like secreted salivary protein 1 [Triatoma matogrossensis]	2,10	20,30	1	1	1	19,4	6,79	Yes	No	S	1
57	307095202	hypothetical conserved secreted protein [Triatoma matogrossensis]	2,09	8,47	1	1	1	27,9	5,49	Yes	No	S	1
58	156891049	transferrin [Rhodnius prolixus]	2,09	2,74	1	1	1	72,8	7,46	Yes	No	S	
59	34421652	lipocalin-like TiLipo37 [Triatoma infestans]	2,08	12,36	1	1	1	19,8	7,97	Yes	No	S	
60	270381627	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	2,08	11,95	1	1	1	25,6	8,10	Yes	No	S	
61	307094984	salivary protein MYS precursor [Triatoma matogrossensis]	1,99	10,70	1	1	2	20,4	4,82	Yes	No	S	
62	307094982	31 salivary protein MYS precursor [Triatoma matogrossensis]	1,95	10,75	1	1	2	20,3	4,60	Yes	No	S	
63	240247221	odorant-binding protein RproOBP4 precursor [Rhodnius prolixus]	1,93	14,09	1	1	9	16,7	8,25	Yes	No	S	1
64	116267191	salivary lipocalin [Triatoma brasiliensis]	1,91	5,71	1	1	2	19,5	8,98	No	YesMM/G+/-	-	
65	270046214	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	1,87	11,82	1	1	1	23,7	5,44	Yes	No	S	
66	149689084	60S ribosomal protein L8 [Triatoma infestans]	1,86	7,36	1	1	1	28,1	10,98	No	Yes MM/G-	M	
67	149689206	salivary inositol polyphosphate 5-phosphatase [Triatoma infestans]	1,81	3,46	4	2	2	36,8	9,07	Yes	No	S	
68	149689200	DNA-directed RNA polymerase II 13.3 kda polypeptide [Triatoma infestans]	1,77	15,38	1	1	1	13,5	6,33	No	No	-	
69	71725072	infestilin [Triatoma infestans]	1,75	8,61	1	1	1	17,0	8,43	Yes	No	S	
70	270046222	unnamed protein product [Triatoma dimidiata]	1,72	7,95	1	1	1	19,6	8,73	Yes	No	S	

- <sup>a</sup> Número de controle das proteínas
- <sup>b</sup> Número de acesso da proteína no NCBI
- <sup>c</sup> Nome da proteína
- <sup>d</sup> score de identificação
- <sup>e</sup> percentual de sequência de proteína prevista cobertos por consulta combinadas de sequências com um contagem de alinhamento superior a 55% através de MASCOT
- <sup>f</sup> número de vezes que a proteína foi identificada
- <sup>g</sup> número de peptídeos identificados para determinada proteína
- <sup>h</sup> peptide sequence matches
- <sup>i</sup> massa molecular da proteína em kDa
- <sup>j</sup> ponto isoelétrico calculado
- <sup>k</sup> busca de peptídeo sinal
- <sup>l</sup> avalia a via de secreção não-clássica, sem peptídeo sinal, busca feita para Gram positivos (G+), Gram negativos (G-) e mamíferos (MM)
- <sup>m</sup> identifica a localização subcelular da proteínas, sendo C ( cloroplasto), M (mitocôndria) e S (secretada)
- <sup>n</sup> Busca de  $\alpha$ -hélice, mostrando a posição de entrada e saída de cada  $\alpha$ -hélic

## Análise de bioinformática

Os dados obtidos foram submetidos a análises *in silico* de sequências em *softwares* disponíveis *online*. A análise por SignalP visou identificar a presença de peptídeo sinal em cada uma das proteínas analisadas. Quando presente, indica que as proteínas são secretadas pela via clássica de secreção. A busca foi realizada em banco de dados para eucariotos.

Como as glândulas de triatomíneos utilizam a via de secreção clássica, a maioria das proteínas secretadas deve possuir uma extensão N-terminal (peptídeo de trânsito). SignalP é atualmente o *software* mais popular para prever a presença de um peptídeo sinal de trânsito em N-terminal e o local de clivagem associado (Dyrlov, 2004). Dentre as proteínas identificadas, utilizando o SignalP, observamos que 171 proteínas apresentam peptídeo sinal, sendo 114 na fração retida e 57 na fração filtrada, o que corresponde a 73% das proteínas identificadas (Figura 10).

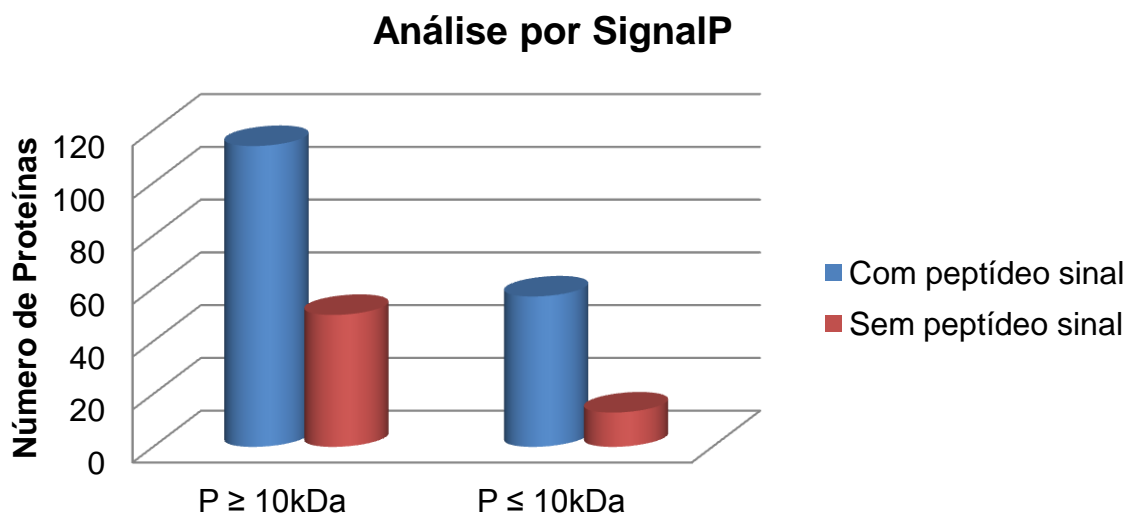


Figura 10. Identificação de peptídeo sinal em cada uma das proteínas. Gráfico apresenta o número de proteínas das tabelas 1, massa molecular  $\geq 10\text{kDa}$ , e tabela 2, massa molecular  $\leq 10\text{kDa}$ , que apresentam ou não peptídeo sinal.



Apesar de não serem secretadas pela via de secreção clássica, as proteínas desprovidas de peptídeo sinal na porção N-terminal também podem ser secretadas. Utilizou-se o *software* SecretomeP (Dyrlov, 2004) para prever tais proteínas nas frações  $>$  e  $\leq$  a 10 kDa, a fim de determinar quais eram secretadas por vias de secreção não clássicas. As buscas foram feitas nos bancos de dados para mamíferos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

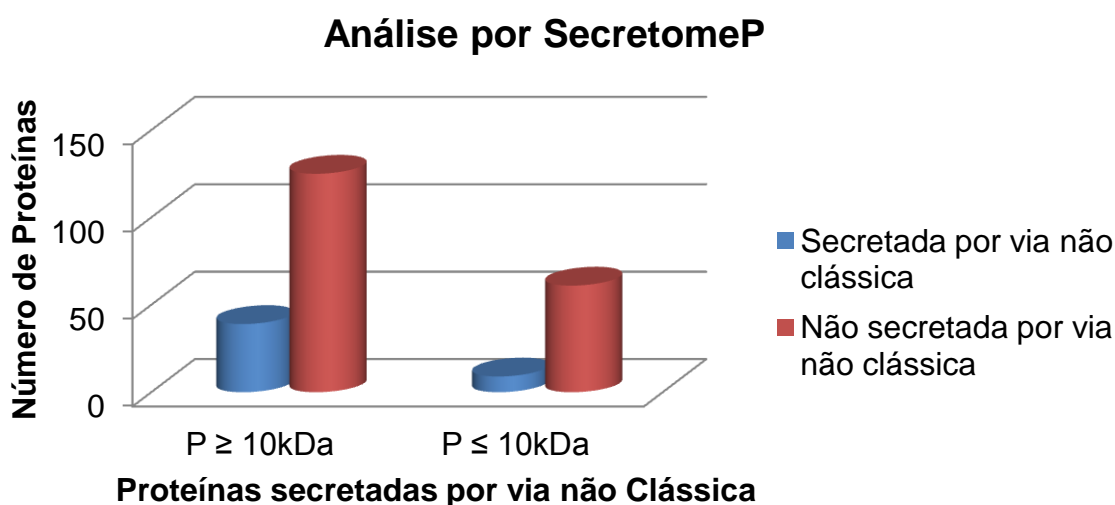


Figura 11: Identificou-se por meio de Secretome P as proteínas secretadas na ausência de peptídeo sinal, por via não-clássica. Gráfico apresenta o número de proteínas das tabelas 1, massa molecular  $>$  10kDa, e tabela 2, massa molecular  $\leq$  10kDa, que são secretadas por via não-clássica, sendo o resultado considerado afirmativo para score  $\geq 0.5$ .

Para prever a localização subcelular de cada proteína, foi utilizado o *software* TargetP, empregado para proteínas de organismos eucariotos não vegetais. Essa análise feita foi para todas as sequências identificadas. Todas as sequências previstas como secretadas pela via clássica por signalP e por vias não clássicas pelo secretomeP, foram confirmadas como secretadas pelo TargetP, à exceção das apirases que são previstas secretadas somente por TargetP. De fato, as apirases de *T. infestans* foram bastante estudadas e é conhecido que elas são secretadas (Faudry, *et al.* 2004). A sequência do fator de alongação 1 $\alpha$  putativo (*putative elongation factor 1-alpha*; *T. matogrossensis*) (Tabela 1, n. 67) não permitiu prever se ele é secretado. Somente 2 proteínas identificadas como proteína ribossomal L8 60S (*ribosomal protein L8, T. infestans*) (n. 47 da tabela 2) e citocromo c oxidase (*T. infestans*)

(Tabela 2 n. 66) foram preditas como mitocondriais. Essas proteínas foram encontradas na fração filtrada e não na fração retida.

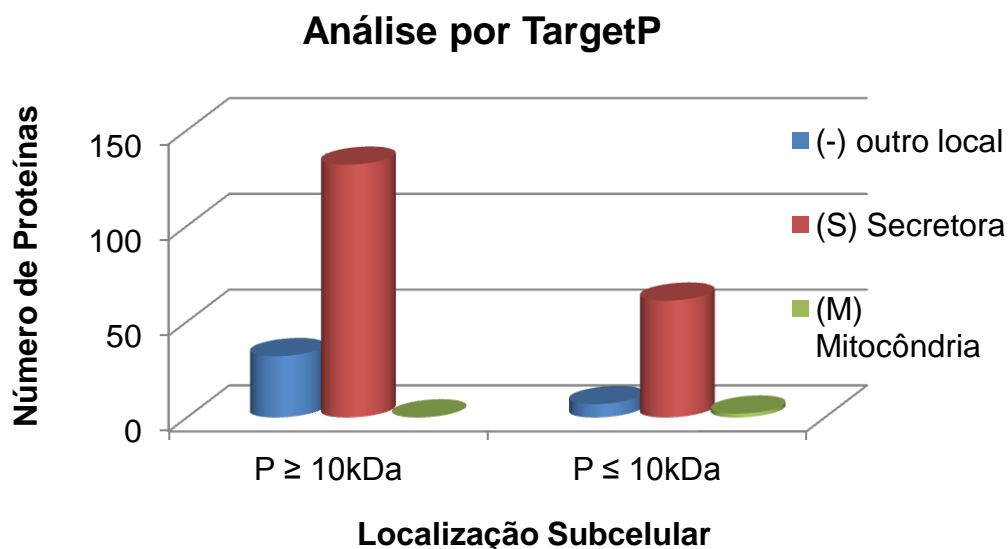


Figura 12: Análise feita por TargetP identificou a localização subcelular de cada proteína, confirmando a origem secretória da grande maioria. Gráfico apresenta a localização subcelular em eucariotos das proteínas das tabelas 1, massa molecular  $\geq 10\text{kDa}$ , e tabela 2, massa molecular  $\leq 10\text{kDa}$ , onde (S) refere-se a secretora, (M) mitocôndria, (-) outro local. Resultado afirmativo para score  $\geq 0.5$  em uma das opções disponíveis.

Para se concentrar especificamente sobre as proteínas secretadas, ou seja, ainda avaliamos a ocorrência de domínios transmembranares usando o preditor de domínio transmembranar TMHMM (topologia transmembrana proteína com um modelo oculto de Markov) (Krogh, *et al.* 2001). A análise por TMHMM destinou-se a identificação de  $\alpha$ -hélices em cada uma das sequências proteicas salivares (Figura 13). Evidentemente, a grande maioria das proteínas identificadas nas duas frações da saliva não possuem domínios preditos de  $\alpha$ -hélice, já que estes não são comuns em proteínas secretadas. Somente 20% de sequências das respectivas frações retida e filtrada possuem domínios de  $\alpha$ -hélice preditos, podendo tratar-se de moléculas anfipáticas, possuindo uma face hidrofóbica e outra hidrofílica .

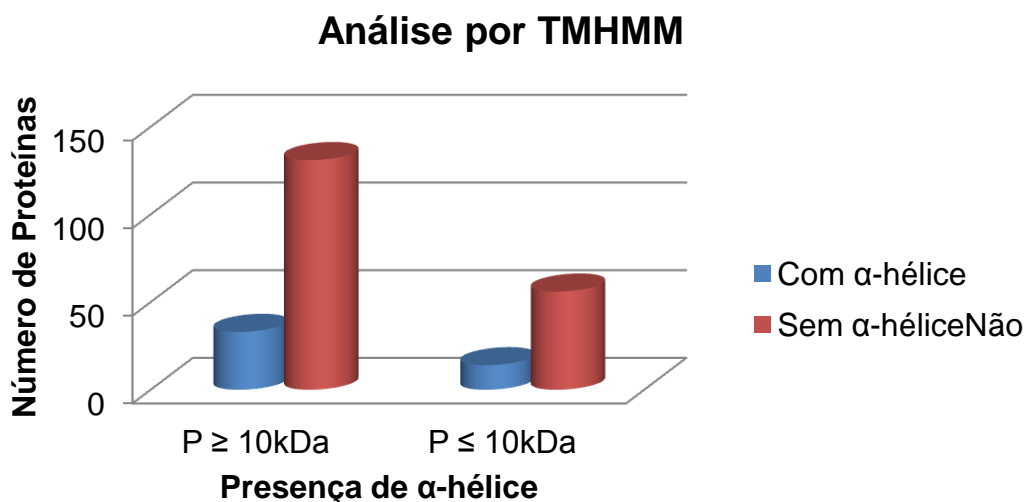


Figura 13. Análise por TMHMM identificou e localizou α-hélice em diversas proteínas. Gráfico apresenta o número de proteínas das tabelas 1, massa molecular > 10kDa, e tabela 2, massa molecular ≤ 10kDa, que apresentam ou não α-hélice.

Diante das análises realizadas pode-se constatar a natureza secretória das proteínas identificadas. Apenas 2 das proteínas identificadas foram descritas como mitocôndrias, todas as outras de uma forma ou de outra apresentaram-se como secretórias. Do total de 234 identificações, 73% foram consideradas secretórias por apresentarem pepetídeo sinal, sendo portanto secretadas por via clássica de secreção, 20,5% por serem secretadas por via não clássicas, 82,5% por terem localização subcelular definida como secretória e ainda 80% pela ausência de domínios trans-membrana (Tabela 3). Nota-se, pelos resultados, que algumas proteínas obtiveram análise positiva com relação a natureza secretória em mais de uma análise *in silico* por meio de softwares.

Tabela 3: Proteínas secretadas

Descrição	Nº de proteínas	%
Total de proteínas	234	100%
Secretadas por via clássica (signalP)	171	73%
Secretadas por via não clássica (SecretomeP)	48	20,50%
Secretadas (TargetP)	193	82,50%
Secretadas, sem α-hélice (TMHMM)	187	80%

## Atividade ADPásica

Com o objetivo de determinar se a fração peptídica apresentava atividade anti-hemostática, ensaios de atividade ADPásica foram realizados (Figura 14) a partir da saliva total, fração retida ( $P > 10\text{kDa}$ ) com concentração de 1/10, fração retida com concentração de 1/20 ( $P > 20\text{kDa}$ ) e fração filtrada ( $P \leq 10\text{kDa}$ ). Após a leitura das absorbâncias, pôde-se constatar a existência de atividade enzimática para as amostras contendo a porção retida de proteínas, e a não existência da mesma na fração filtrada.

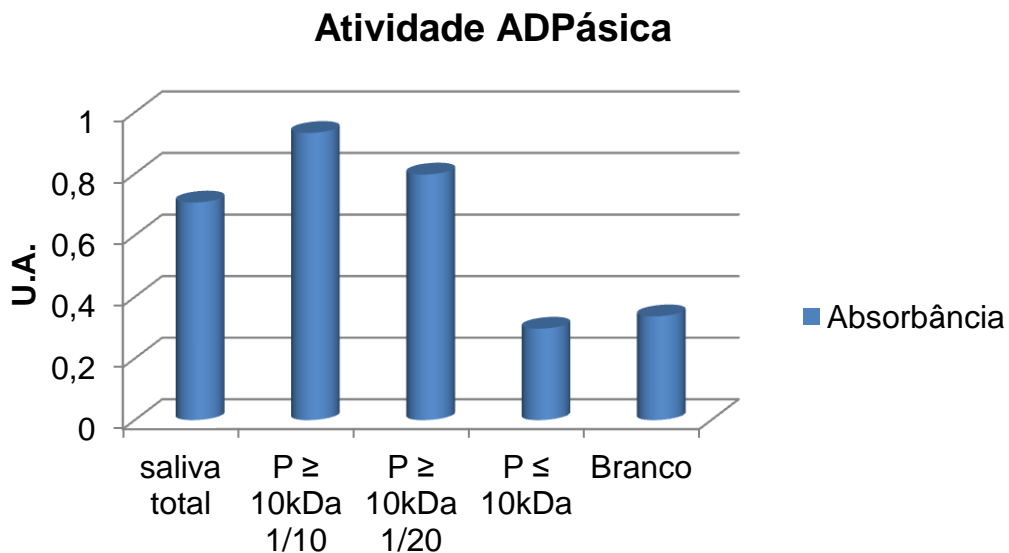


Figura 14: Atividade ADPásica da saliva de *T. infestans*. Realizado conforme material e métodos.

# **DISCUSSÃO**

Os barbeiros domésticos *T. infestans*, da tribo Triatomini, eram considerados, até recentemente, os vetores mais relevantes na epidemiologia da doença de Chagas em alguns ecossistemas da América do Sul, notadamente no Brasil (Pereira, *et al.* 2006). Por conseguinte, é uma das espécies mais bem estudadas (Dias, *et al.* 2002). Em 2007, a primeira investigação proteômica de saliva de barbeiro foi realizada a partir da espécie *T. infestans* relatando mais de 200 proteínas salivares secretadas por 2-DE, com uma presença significativa de isoformas (Charneau, *et al.* 2007). Além disso, a maioria das proteínas identificadas está potencialmente envolvida na inibição da agregação de plaquetas e pertencem às famílias das lipocalinas ou das apirases. No mesmo ano, uma análise transcriptômica considerável das glândulas salivares foi realizada e observou-se que 55% do banco de cDNA era constituído de proteínas salivares preditas variantes da família lipocalina (Assumpção, *et al.* 2008).

Apesar das vantagens de se ter um mapa proteômico abrangente e de detectar isoformas, na segunda dimensão o SDS-PAGE tipicamente exclui o proteoma de baixa massa molecular, ou seja, os peptídeos. Essa denominação é tipicamente utilizada para polipeptídeos de massa molecular até aproximadamente 10 kDa (Hu, *et al.* 2009). O termo peptídeo tem como raiz grega 'peptos' que significa digestível, indicando que os peptídeos são geralmente os produtos de proteínas que sofreram clivagem proteolítica (Hu, *et al.* 2009).

O peptidoma se refere ao conjunto de peptídeos endógenos e de pequenas proteínas de amostra biológica como fluído, lisado de células, extratos de tecidos ou micro-organismos (Hu, *et al.* 2009). Assim o peptidoma era considerado o lixo biológico resultado do alto nível de proteases ativas. Hoje é considerado reflexo de eventos biológicos (Hu, *et al.* 2009).

Os peptídeos no peptidoma podem ser divididos em 2 classes: 1) peptídeos bioativos que exercem funções vitais em processos biológicos, como hormônios, citocinas, fatores de crescimento, peptídeos do MHC de classe 1; e 2) fragmentos da degradação de proteínas, o que reflete a atividade enzimática proteolítica.

Neste trabalho, usando abordagens convencionais de separação pela massa molecular por ultrafiltração em membrana de exclusão molecular de 10 kDa, em conjunto com a identificação por nanoLC-MSMS dos produtos das frações filtrada e retida, complementamos a análise proteômica mais bem caracterizada da saliva de triatomíneos vetores da doença de Chagas, a de *T. infestans*.

No geral, nas frações salivares retida e filtrada foram encontradas 164 e 70 proteínas, respectivamente, após digestão triptica. Quase todas foram confirmadas como secretadas por vias clássica ou não clássicas de secreção (signalP + secretomeP + targetP). Todas as identificações correspondem a proteínas, ou seja, todos os peptídeos e pequenas proteínas filtradas são produtos da proteólise fisiológica no lúmen da glândula ou na hora da picada. De fato achamos uma catepsina-I *like* na saliva de *T. infestans* que até hoje não foi caracterizada. Também existe uma tripsina-*like* chamada de triapsina que foi caracterizada por Amino e colaboradores em 2001. Esta triapsina é uma serino-protease que é estocada na forma de zimogênio no lúmen da glândula D2 e que é ativada durante a picada. Ela é provavelmente inativa no lúmen pela presença de diversos inibidores de serino-proteases endógenos presentes e identificados na saliva. Amino e colaboradores sugeriram que a triapsina tem um papel no repasto sanguíneo por ser liberada na sua forma ativa no momento da picada. Como todos os peptídeos enriquecidos aqui permitiram identificar somente proteínas acima de 8 kDa, podemos supor que a função desta triapsina seria a de produzir peptídeos ativos importantes para o repasto. Por isso tentamos demonstrar uma atividade anti-hemostática na fração que continha os peptídeos. Entretanto, nas condições experimentais usadas, o teste de atividade ADPásica, não foi positivo. Novos testes deverão ser realizados para avaliar a atividade anti-hemostática nessa fração.

Algumas proteínas identificadas na saliva não foram preditas como secretadas por via clássica ou não clássica de secreção. Estas são potencialmente intracelulares. Embora todas as três glândulas salivares de *T. infestans* apresentem secreção merócrina (exocitose dos componentes da saliva para o lúmen), como descrito anteriormente, em algumas ocasiões as vesículas que brotam das células glandulares contendo grande volume de

componentes intracelulares são libertadas no lúmen, o que corresponde a secreção apócrina (Reis, *et al.* 2003). Portanto, a presença de proteínas intracelulares no proteoma salivar é o resultado do processo fisiológico da secreção como já discutido por Charneau e colaboradores, 2007.

Entre as proteínas identificadas, as mais bem estudadas pertencem às famílias das lipocalinas ou das apirases. Das 234 proteínas identificadas, 83 pertencem à primeira família, que desempenham várias funções, por exemplo, ligação a histamina e serotonina (Paensen, *et al.* 2000). Essas proteínas têm sido amplamente encontradas em triatomíneos, por exemplo, a triabina (Noeske-Jungblut, *et al.* 1994; Noeske-Jungblut, *et al.* 1995) palidipina (Noeske-Jungblut, *et al.* 1994) e procalina (Paddock, *et al.* 2001) nas glândulas salivares de *R. prolixus* (Ribeiro, *et al.* 2004), *T. brasiliensis* (Santos, *et al.* 2007) e *T. infestans*.

Identificamos também proteínas da família das apirases, responsáveis pela hidrólise de ATP e ADP, agentes agregadores, em AMP. Logo, a diminuição de suas concentrações no tecido afetado gera inibição da agregação plaquetária (de Araújo, *et al.* 2012). Neste estudo identificamos três exemplares de proteínas com atividade apirásica, embora estudos anteriores citem a presença de cinco proteínas com esse tipo de atividade na saliva de *T. infestans*, sendo que somente uma possui sequência armazenada nos bancos de dados, a apirase de 79 kDa (Faudry, *et al.* 2004).

Os estudos do sialoma de triatomíneos mostram que essa família de proteínas é encontrada em praticamente todas as espécies analisadas, com exceção de *R. prolixus*. Embora na saliva dessa espécie se observe atividade apirásica, não há transcritos de apirases identificados. Sequências de inositol fosfatase similares a apirase foram identificadas (Ribeiro, *et al.* 2004).

As apirases foram inicialmente identificadas na saliva de *T. infestans* (Ribeiro, *et al.* 1998). Sua caracterização mostrou estarem associadas em oligômeros e que, no caso desta espécie, pertencem a família 5'-nucleotidase das apirases (Faudry, *et al.* 2004). As proteínas salivares são produzidas por uma camada de células epiteliais e secretadas para o lúmen das glândulas, cujos conteúdos misturam-se antes da salivação. Portanto, para cada par de glândulas há um conjunto diferente de apirases, sendo D1 semelhante ao



padrão da saliva total, com apirases de 88, 82, 79, 68, e 67 kDa; e D2 e D3 apresentam as espécies de 82 e 79 kDa (Faudry, *et al.* 2004). É provável que as várias apirases encontradas não representem modificações pós-traducionais de uma única proteína, já que apresentam alguns aminoácidos diferentes nas sequências de peptídeos analisados (Faudry, *et al.* 2004) como foi confirmado depois por sequenciamento de novo de cada spots de isoformas de apirases em gel 2-DE (Charneau, *et al.* 2007). Das cinco apirases encontradas na saliva de *T. infestans*, aproximadamente 50% são utilizadas durante uma refeição de sangue, sendo reestabelecido este nível após repasto, por aumento da taxa de transcrição (Faudry, *et al.* 2004). Essa redução do nível de apirases após a alimentação também é observada em *Aedes aegypti* (46%) (Marinotti, *et al.* 1990), *Anopheles* (varia de 24% a 56%) (Valenzuela, *et al.* 1996), e *Phlebotomus papatasi*, reduzidas em 75 a 80% (Ribeiro, *et al.* 1999).

Proteases, sialidases e atividades de proteínas formadoras de poros já haviam sido descritas na saliva de *T. infestans* (Amino, *et al.* 1998; Amino, *et al.* 2001; Amino, *et al.* 2002), mas a sua relevância para a alimentação hematófaga não era clara. Além disso a presença de proteínas membranares reforça a ideia da presença de vesículas de secreção apócrina. No entanto as funções dessas proteínas ainda precisam ser estudadas, para que além de identificá-las seja possível estabelecer seu papel no repasto sanguíneo, caso exista.

Por fim, os peptídeos encontrados nas glândulas salivares do *T. infestans* poderão ser avaliados quanto às suas funções na hemostasia, inflamação e na resposta imune do hospedeiro, poderão ser úteis para identificar fatores-chaves para o sucesso da hematofagia e para facilitar o processo de transmissão do *T. cruzi*, bem como quanto às suas atividades antimicrobianas contra organismos invasores nesse inseto. Esse conhecimento científico pode ajudar, por exemplo, a identificar alvos para intensificar as barreiras à alimentação sanguínea, e desta forma, impedir a transmissão do *T. cruzi*, entre outras aplicações.

## **CONCLUSÃO**

As técnicas proteômicas são ferramentas importantes para a produção de dados sobre a saliva dos insetos hematófagos, principalmente vetores de DTNs, como a doença de Chagas. Esse estudo contribuiu para a caracterização da saliva de *T. infestans*, um dos principais vetores desta doença, em dois aspectos principais: primeiro, por ser a primeira análise proteômica tão abrangente da saliva de um triatomíneo, já que fez uso de nanoLC-MS/MS sem separação por SDS-PAGE ou 2D-PAGE, que podem resultar em perda do material proteico na malha dos géis; segundo, por ser a primeira análise peptidômica de saliva de uma espécie de triatomíneo.

A saliva de *T. infestans* é rica em peptídeos, conforme foi demonstrado. A interação desses peptídeos com substratos específicos no hospedeiro contrapõe sua hemostasia, processo importante para o sucesso do repasto sanguíneo e indiretamente para a transmissão da doença de Chagas. Esse acúmulo de conhecimento sobre a saliva do *T. infestans* é importante para preencher as lacunas sobre a fisiopatologia da picada desses insetos. Ainda, a presença de peptídeos farmacologicamente ativos na saliva poderá contribuir para o desenvolvimento de novas drogas e facilitar futuros estudos peptidômicos das salivas de triatomíneos de outras espécies.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature **422**(6928): 198-207.

Amino, R., et al. (2002). "Trialsin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis." J Biol Chem **277**(8): 6207-6213.

Amino, R., et al. (1998). "Identification and characterization of a sialidase released by the salivary gland of the hematophagous insect *Triatoma infestans*." J Biol Chem **273**(38): 24575-24582.

Amino, R., et al. (2001). "Triapsin, an unusual activatable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)." Insect Biochem Mol Biol **31**(4-5): 465-472.

Anatriello, E., et al. (2010). "An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*." BMC Genomics **11**: 450.

Andricopulo, A. D., et al. (1998). "Analgesic activity of 3,4-dichloromaleimides: structure-activity relationships." Pharmazie **53**(7): 493-494.

Araujo, R. N., et al. (2007). "Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake." Int J Parasitol **37**(12): 1351-1358.

Arcá, B., et al. (1999). "Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of the malaria vector *Anopheles gambiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1516-1521.

Argolo, Ana Maria et al. **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008. 19 p.

Assumpção, T. C., et al. (2011). "Insight into the salivary transcriptome and proteome of *Dipetalogaster maxima*." J Proteome Res **10**(2): 669-679.

Assumpção, T. C., et al. (2012). "An insight into the sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a kissing bug associated with fogo selvagem in South America." Am J Trop Med Hyg **86**(6): 1005-1014.

Assumpção, T. C., et al. (2008). "An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease." Insect Biochem Mol Biol **38**(2): 213-232.

Barboza, R., et al. (2011). "Can the false-discovery rate be misleading?" Proteomics **11**(20): 4105-4108.

Bendtsen, J. D., et al. (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." J Mol Biol **340**(4): 783-795.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** v. 8, p. 93-99. 1987.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - Vigilância em Saúde. 2009. Available at: [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs) (accessed July 2012).

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas***. Ed. Guanabara Koogan, 2ªed., Rio de Janeiro. 2000.

Bussacos, A. C., et al. (2011). "Redundancy of proteins in the salivary glands of *Panstrongylus megistus* secures prolonged procurement for blood meals." J Proteomics **74**(9): 1693-1700.

Campos de Carvalho, A. C., et al. (2009). "Cell Therapy in Chagas Disease." Interdiscip Perspect Infect Dis **2009**: 484358.

Campos, I. T., et al. (2002). "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 **32**(9): 991-997.

Champagne, D. E. and J. M. Ribeiro (1994). "Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 138-142.

Champagne, D. E., et al. (1995). "The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 694-698.

CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA, M. et al. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. **International Journal of Mass Spectrometry**. 2007. 268(2-3): p. 265-76.

Costa, C. M., et al. (2011). "2-DE-based proteomic investigation of the saliva of the Amazonian triatomine vectors of Chagas disease: *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus*." J Proteomics **74**(9): 1652-1663.

Da Silva, M., et al. (2009). "Anti-platelet effect of cumanastatin 1, a disintegrin isolated from venom of South American *Crotalus rattlesnake*." Thromb Res **123**(5): 731-739.

Davie, E. W., et al. (1991). "The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation." Biochemistry **30**(43): 10363-10370.

de Araújo, C. N., et al. (2012). "Interactome: Smart hematophagous triatomine salivary gland molecules counteract human hemostasis during meal acquisition." J Proteomics **75**(13): 3829-3841.

Dias, J. C. (2009). "Elimination of Chagas disease transmission: perspectives." Mem Inst Oswaldo Cruz **104 Suppl 1**: 41-45.

Dias, J. C., et al. (2002). "The impact of Chagas disease control in Latin America: a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(5): 603-612.

- Elias, J. E. and S. P. Gygi (2007). "Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry." Nat Methods **4**(3): 207-214.
- Faudry, E., et al. (2004). "Triatoma infestans apyrases belong to the 5'-nucleotidase family." J Biol Chem **279**(19): 19607-19613.
- Francischetti, I. M., et al. (2009). "The role of saliva in tick feeding." Front Biosci **14**: 2051-2088.
- Friedrich, T., et al. (1993). "A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*." J Biol Chem **268**(22): 16216-16222.
- Hotez, P. J. (2008). "The giant anteater in the room: Brazil's neglected tropical diseases problem." PLoS Negl Trop Dis **2**(1): e177.
- Hotez, P. J., et al. (2008). "The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination." PLoS Negl Trop Dis **2**(9): e300.
- Hotez, P. J., et al. (2007). "Control of neglected tropical diseases." N Engl J Med **357**(10): 1018-1027.
- Hu, L., et al. (2009). "Recent advances in mass spectrometry-based peptidome analysis." Expert Rev Proteomics **6**(4): 433-447.
- Isawa, H., et al. (2007). "Identification and characterization of plasma kallikrein-kinin system inhibitors from salivary glands of the blood-sucking insect *Triatoma infestans*." FEBS J **274**(16): 4271-4286.
- Junqueira, M. and P. C. Carvalho (2012). "Tools and challenges for diversity-driven proteomics in Brazil." Proteomics **12**(17): 2601-2606.
- JAMALUDDIN, M. 1991. New perspectives in blood platelet aggregation. **Current Science** 61, 526-533.
- Kato, H., et al. (2010). "A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease." Infect Genet Evol **10**(2): 184-191.
- Kola, I. (2008). "The state of innovation in drug development." Clin Pharmacol Ther **83**(2): 227-230.
- Krogh, A., et al. (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." J Mol Biol **305**(3): 567-580.
- LAMCOBE, D. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. 1999. 94(4), p. 557-564.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v. 227, p. 680-685. 1970

LAVOPIERRE, M. M., et al. (1959). "Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers." Ann Trop Med Parasitol **53**: 235-250.

Lindoso, J. A. and A. A. Lindoso (2009). "Neglected tropical diseases in Brazil." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **51**(5): 247-253.

López, J. L. (2007). "Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **849**(1-2): 190-202.

McKerrow, J. H., et al. (2008). "Development of protease inhibitors for protozoan infections." Curr Opin Infect Dis **21**(6): 668-672.

Mende, K., et al. (1999). "Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. Dipetalogaster maximus cDNA cloning, expression and characterization." Eur J Biochem **266**(2): 583-590.

Mesquita, R. D., et al. (2008). "Trypanosoma cruzi infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine." Infect Immun **76**(12): 5543-5552.

Miles, M. A., et al. (2003). "American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies." BMJ **326**(7404): 1444-1448.

Montfort, W. R., et al. (2000). "Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from Rhodnius prolixus and other blood-sucking arthropods." Biochim Biophys Acta **1482**(1-2): 110-118.

Moreira, D. R., et al. (2009). "Approaches for the development of new anti-Trypanosoma cruzi agents." Curr Drug Targets **10**(3): 212-231.

Moreira, M. F., et al. (2003). "Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug Rhodnius prolixus." Insect Biochem Mol Biol **33**(1): 23-28.

Moro, O. and E. A. Lerner (1997). "Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist." J Biol Chem **272**(2): 966-970.

NEVES, D. **Parasitologia Humana**. Ed. Atheneu, 11<sup>a</sup> Ed., São Paulo. 2005

Nielsen, H., et al. (1997). "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." Protein Eng **10**(1): 1-6.

Noeske-Jungblut, C., et al. (1995). "Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin." J Biol Chem **270**(48): 28629-28634.



Noeske-Jungblut, C., et al. (1994). "An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*." J Biol Chem **269**(7): 5050-5053.

Nwaka, S. and A. Hudson (2006). "Innovative lead discovery strategies for tropical diseases." Nat Rev Drug Discov **5**(11): 941-955.

Otálora-Luna, F. **Chemosensory and behavioural adaptations for haematophagy in triatomine bugs (Heteroptera:Reduviidae)**. 2006. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Zoologia, Universidade de Neuchâtel, Neuchâtel.

Paddock, C. D., et al. (2001). "Identification, cloning, and recombinant expression of procalin, a major triatomine allergen." J Immunol **167**(5): 2694-2699.

Pereira, M. H., et al. (2006). "Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success." Trends Parasitol **22**(11): 516-520.

Petersen, T. N., et al. (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." Nat Methods **8**(10): 785-786.

Pichu, S., et al. (2009). "Purification and characterization of a novel salivary antimicrobial peptide from the tick, *Ixodes scapularis*." Biochem Biophys Res Commun **390**(3): 511-515.

Prata, A. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease." Lancet Infect Dis **1**(2): 92-100.

Reis, M. M., et al. (2003). "Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)." Tissue Cell **35**(5): 393-400.

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

Ribeiro, J. M., et al. (2004). "Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*." Insect Biochem Mol Biol **34**(1): 61-79.

Ribeiro, J. M., et al. (1999). "Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP." J Exp Biol **202**(Pt 11): 1551-1559.

Ribeiro, J. M., et al. (1998). "Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera)." J Med Entomol **35**(4): 599-610.

SANT'ANNA, M.R., et al., Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. J Insect Physiol. 2001. 47(12): p. 1459-1465.

Santos, A., et al. (2007). "The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae)." *Insect Biochem Mol Biol* **37**(7): 702-712.

Sarkis, J. J., et al. (1986). "Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification." *Biochem J* **233**(3): 885-891.

Schofield, C. J., et al. (2006). "The future of Chagas disease control." *Trends Parasitol* **22**(12): 583-588.

Schulte, I., et al. (2005). "Peptides in body fluids and tissues as markers of disease." *Expert Rev Mol Diagn* **5**(2): 145-157.

Schulz-Knappe, P., et al. (2001). "Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures." *Comb Chem High Throughput Screen* **4**(2): 207-217.

Sealey-Cardona, M., et al. (2007). "Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(6): 2123-2129.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE - Consenso Brasileiro de Doença de Chagas. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 38 (supl. 3): 1-29, 2005).

Silveira, A. C., et al. (1984). "[Distribution of Triatominae captured in a domestic environment, 1975/83, Brazil]." *Rev Bras Malariol Doencas Trop* **36**: 15-312.

Smith, T. M. and T. L. Kirley (1999). "Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily." *Biochemistry* **38**(1): 321-328.

Soeiro, M. N. and S. L. de Castro (2009). "*Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches." *Expert Opin Ther Targets* **13**(1): 105-121.

Sudano, I., et al. (2006). "Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions." *J Cardiovasc Pharmacol* **47 Suppl 2**: S136-150; discussion S172-136.

Tarleton, R. L., et al. (2007). "The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope." *PLoS Med* **4**(12): e332.

Valenzuela, J. G. (2002). "High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease." *Insect Biochem Mol Biol* **32**(10): 1199-1209.

Valenzuela, J. G., et al. (1998). "Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme." *J Biol Chem* **273**(46): 30583-30590.

Valenzuela, J. G., et al. (1996). "A novel inhibitor of factor X activation from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*." Exp Parasitol **83**(2): 184-190.

Xu, X., et al. (2008). "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 **7**(3): 582-590.

Yan, X., et al. (2008). "An immunoregulatory peptide from salivary glands of the horsefly, *Hybomitra atriperoides*." Dev Comp Immunol **32**(10): 1242-1247.

Yu, D., et al. (2006). "A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*." Peptides **27**(1): 31-35.

WHO. Chagas disease: control and elimination. **Executive Board**, 2008.

WHO (2010), **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva, Switzerland, World Health Organization.

Zhao, R., et al. (2009). "Immunoregulatory peptides from salivary glands of the horsefly, *Tabanus pleskei*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **154**(1): 1-5.