



Universidade de Brasília

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

DISSERTAÇÃO

ANÁLISE PROTEÔMICA DAS SALIVAS DOS TRIATOMÍNEOS
RHODNIUS BRETHESI, *RHODNIUS ROBUSTUS* E *PANSTRONGYLUS*
MEGISTUS, VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS

CAMILA MIRANDA COSTA

BRASÍLIA

2009

CAMILA MIRANDA COSTA

ANÁLISE PROTEÔMICA DAS SALIVAS DOS TRIATOMÍNEOS *RHODNIUS BRETHESI*, *RHODNIUS ROBUSTUS* E *PANSTRONGYLUS MEGISTUS*, VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre ao Curso de Mestrado em Biologia Molecular da Universidade de Brasília - UnB.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa

Co-orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

BRASÍLIA

2009

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília, com apoio da CAPES, FAPDF e FINEP, e no Protein Research Group da Southern Denmark University.

Aos meus pais, Adalberto e Bernadete, a base
de quem sou hoje.

Agradecimentos

Ao **Prof. Marcelo Valle de Sousa**, pelo apoio e confiança no desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Prof. Sébastien Olivier Charneau**, pela atenção, amizade, incentivo e exemplo no desenvolvimento do trabalho científico.

Ao **Prof. Peter Roepstorff**, pela oportunidade, suporte acadêmico e disposição em dividir sua experiência científica.

Ao **Prof. Carlos André O. Ricart**, pelos aconselhamentos e sugestões.

Aos **Prof. Fernando A. Torres** e **Prof. Antonio R. L. Teixeira**, pela disponibilização de recursos para o desenvolvimento desse trabalho.

À **Andrea Maria Lorentzen**, pela prontidão em ensinar e cooperar para o desenvolvimento de parte desse trabalho.

À querida **Angela Pereira da Rocha**, por todo suporte durante meu período em Odense, Dinamarca.

Aos **colegas** de laboratório, sempre dispostos a ajudar e manter uma ótima atmosfera de trabalho.

Aos meus **pais, irmão, primos, tios, avó** e **agregados**, pelas orações e apoio.

Aos **irmãos em Cristo** da IPP que estiveram sempre presentes.

Às amigas **Nanda, Bel, Julia, Lídia, Lili, Lu Guima, Lu Tex, Maria, Nina, Raquel** e **Nessa**, por fazerem parte da minha vida.

Às amadas **Fê** e **Ju**, pelos momentos de compartilhamento.

Ao meu querido **Diogo**, pela companhia, paciência e carinho.

E, acima de todos, a **Deus**, pelo cuidado, amor, e por me permitir viver essa experiência e aprender com ela.

“Courage is not simply one of the virtues, but
the form of every virtue at the testing point.”

(C.S. Lewis)

Resumo

Triatomíneos vetores da doença de Chagas são organismos hematófagos durante todas as fases de seu desenvolvimento. O sucesso de seu repasto se deve, em grande parte, ao conteúdo de suas glândulas salivares. Especialmente o conjunto de proteínas secretadas lhes proporciona ter acesso ao seu alimento contrapondo mecanismos hemostáticos do organismo alvo, como a agregação plaquetária, coagulação sanguínea e vasoconstrição, como também processos inflamatórios. Tendo em vista a relevância desses componentes no controle da transmissão do *Trypanosoma cruzi*, as salivas de espécies de triatomíneos importantes na epidemiologia dessa enfermidade no Brasil, *Panstrongylus megistus* no Cerrado e Mata Atlântica, e *Rhodnius brethesi* e *Rhodnius robustus* na Amazônia, foram coletadas e submetidas a estudos de caracterização proteômica. Inicialmente foram otimizadas as condições experimentais de separação por eletroforese bidimensional (2DE) em faixas amplas de pH. O número de *spots* nas salivas analisadas variou entre 129 e 320. As análises comparativas dos mapas bidimensionais de cada saliva revelam perfis de expressão diferentes entre gêneros. A identificação de *spots* proteicos obtidos a partir desses mapas foi feita por *peptide mass fingerprinting*, fragmentação de peptídeos e sequenciamento *de novo* utilizando espectrômetros de massas do tipo MALDI-TOF/TOF. Perfis predominantemente anti-hemostáticos foram observados nas salivas do gênero *Rhodnius*, mostrando principalmente proteínas com potencial anti-agregação plaquetária como as lipocalinas. A análise proteômica da saliva de *Panstrongylus megistus* está em andamento, e os primeiros resultados sugerem a presença de proteínas potencialmente anti-agregadoras plaquetária. Os proteomas salivares desses vetores triatomíneos mostraram-se ricos em inibidores da agregação plaquetária que promovem o repasto sanguíneo desses insetos. Análises posteriores destes e novos *spots* poderão proporcionar melhor compreensão da interação vetor-hospedeiro, além de possibilitar a descoberta de novas moléculas de importância farmacológica para uso terapêutico contra hemopatias.

Palavras-chave: Triatomíneo. Saliva. Proteoma.

Abstract

Triatomine bugs acting as vectors of Chagas' disease are haematophagous organisms in all of its evolvment phases. Their feeding success is greatly related to their salivary glands content. The presence of a pool of specific proteins allows this insect to access its food by counteracting host haemostatic mechanisms, such as platelet aggregation, clotting and vasoconstriction, as well as host inflammatory reactions. Since these components are relevant in controlling the *Trypanosoma cruzi* transmission process, the salivas of epidemiologically significant triatomine bugs in Brazil, *Panstrongylus megistus* at Cerrado and Atlantic Rainforest Biomas, and *Rhodnius brethesi* and *Rhodnius robustus* at Amazon region, were harvested and submitted to proteomic research. Initially, the experimental conditions for wide-pH-ranged separation by two-dimensional electrophoresis (2DE) separation at wide pH range were optimized. The average number of spots of each salivary profile varied from 129 to 320. Comparative analysis of all two-dimensional maps revealed divergence among genera. The identification of the obtained protein spots from such maps was made by peptide mass fingerprinting, peptide fragmentation and *de novo* sequencing using MALDI-TOF/TOF mass spectrometers. The data revealed largely anti-haemostatic profiles for *Rhodnius* salivas, which presented mainly lipocalins, potential anti-platelet aggregation proteins. Proteomic analysis of *Panstrongylus megistus* saliva is still in progress and the first results imply the presence of potentially anti-platelet aggregation proteins too. Salivary proteomes of these triatominae vectors appear to be rich in platelet aggregation inhibitors which promote the blood feeding of these insects. Future analysis of these and other salivary spots will permit better understanding of vector-host interaction and lead to the possibility of new findings on pharmacologically active molecules useful for haemopathy treatments.

Keywords: Triatomíne. Saliva. Proteome.

Lista de Abreviaturas e Siglas

2D – bidimensional

2DE – eletroforese bidimensional

ABP – proteína ligadora de aminas biogênicas

ACN – acetonitrila

ADP – adenosina difosfato

AI = RPAI – inibidor de agregação plaquetária em *Rhodnius*

BLAST – busca por alinhamento de sequência

DTT – ditioneitol

HCCA – ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

IEF –focalização isoeletrica

IPG strip – tira de gel com gradiente de pH imobilizado

LP – lipocalina

MALDI-TOF – espectrometria de massas por tempo de vôo com ionização por desorção a *laser* auxiliada por matriz

MSMS – análise por espectrometria de massas em série

NO* – óxido nítrico

NP – nitroforina

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

pI – ponto isoeletrico

PMF – impressão digital do mapa peptídico

RPAI = AI – inibidor de agregação plaquetária em *Rhodnius*

SDS – dodecilsulfato de sódio

SPITC – isotiocianato de 4-sulfopenila

TBS – solução salina tamponada por Tris

TFA – ácido trifluoroacético

Tris – tris-hidroximetil-aminometano

Sumário

1	Introdução	12
1.1	Doença de Chagas	12
1.2	Vetores.....	15
1.2.1	<i>Triatomíneos</i>	15
1.2.2	<i>Hematofagia versus Hemostasia</i>	18
1.3	Análise Proteômica.....	23
2	Justificativa	31
3	Objetivos	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	Metodologia	33
4.1	Reagentes.....	33
4.2	Obtenção das salivas.....	33
4.3	Quantificação das amostras	34
4.4	Eletroforese bidimensional	34
4.5	Digitalização de géis e membranas para análise de imagens	35
4.6	Produção de antissoro contra apirases de <i>T. infestans</i>	35
4.7	Eletrotransferência e imunodeteção.....	35
4.8	Revelação de proteínas fosforiladas	36
4.9	Digestão em gel	36
4.10	Derivatização com isotiocianato de 4-sulfofenila (SPITC) para análises de sequenciamento <i>de novo</i>	37
4.11	Espectrometria de massas	38
5	Resultados	39

5.1	Análise proteômica das salivas do gênero <i>Rhodnius</i>	39
5.2	Análise proteômica da saliva de <i>Panstrongylus megistus</i>	52
6	Discussão	55
7	Conclusões e Perspectivas	60
8	Referências Bibliográficas	62
9	ANEXOS	69
	ANEXO A – Participação em publicação.....	69

1 Introdução

1.1 Doença de Chagas

Conhecida desde 1909, a doença de Chagas, nomeada em referência a seu descobridor, o médico Carlos Chagas (CHAGAS, 1911), ainda hoje representa uma enfermidade de grandes proporções. A também chamada tripanossomíase americana é um problema de saúde pública que assola a América Latina acometendo por volta de 15 milhões de pessoas (WHO, 2007). Outras 28 milhões vivem em áreas de risco de contaminação, de maneira geral representadas por locais em condições precárias de higiene, onde o sistema público de saúde é pouco eficiente e as populações são socialmente excluídas e pouco instruídas, seja em regiões rurais ou urbanas. Em 2006, aproximadamente 41 mil novos casos foram registrados e o índice de mortalidade de chagásicos daquele ano foi de 12,5 mil (DIAS, 2007; WHO, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a Doença de Chagas como negligenciada pelas opções de tratamento serem consideradas inadequadas, pelo não reconhecimento governamental do real impacto dessa doença sobre a população e esforços insuficientes na erradicação dessa enfermidade. Há disponibilidade de apenas dois medicamentos no mercado para o tratamento dessa doença (nifurtimox e benznidazol) e ambos são de elevada toxicidade e pouco eficientes na fase crônica da doença (DIAS, 2006). Quanto ao posicionamento do governo brasileiro, a doença de Chagas é categorizada como uma enfermidade com tendência declinante (BRASIL, 2004) e, mesmo estando distribuída por todo o país (Figura 1), estatísticas do Ministério da Saúde mostram que, nos últimos quatro anos, foi baixo o número de novos casos agudos registrados relativo a toda a população nacional (Tabela 1). A maior parte dos casos agudos, entretanto, são assintomáticos o que dificulta a sua detecção, logo, a construção de estatísticas fidedignas fica comprometida.

Contudo, a mobilização de autoridades governamentais em toda América Latina buscando a eliminação da doença já teve grande impacto (DIAS, 2002b). O foco da ação da Iniciativa do Cone Sul (1991) de controle dessa enfermidade foi pela eliminação do processo natural de transmissão da doença. O agente etiológico da doença de Chagas, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, possui um ciclo de vida dixênico, ou seja, necessita de dois diferentes

hospedeiros para completar-se (Figura 2). Dessa forma, com o proposto extermínio de um desses hospedeiros, o triatomíneo *Triatoma infestans*, principal hospedeiro intermediário do ciclo na ocasião (SILVEIRA, 1999; MASSAD, 2008), não ocorreria o fechamento das fases do desenvolvimento do parasito dentro do seu hospedeiro intermediário, a forma infectante do protozoário não se formaria e, assim, não haveria novas transmissões por esse processo.

Como resultado dessa mobilização, foi conferida ao Brasil a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) em 2006. Contudo, ao contrário de conduzir a um relaxamento nas medidas de controle desse vetor e monitoramento da doença no país, esse fato deveria incentivar as autoridade a manter a vigilância, tendo em vista não tratar-se efetivamente da erradicação dessa enfermidade no território nacional, apenas de uma interrupção momentânea do ciclo da doença envolvendo um dentre vários possíveis vetores (FERREIRA, 2006).



Figura 1. Distribuição geográfica da doença de Chagas no Brasil. Região enzoótica com casos isolados ou pequenos surtos no norte do país e área endêmica no restante do país com casos constantes de contaminação. Ilustração adaptada do trabalho de Coura e colaboradores (COURA, 2002).

Tabela 1. Casos de Doença de Chagas Aguda no Brasil de 2005 a 2008 (BRASIL, 2009).

Região e UF	2005	2006	2007	2008
Região Norte	10	88	129	107
Rondônia	0	0	0	
Acre	0	0	0	
Amazonas	0	0	26	
Roraima	0	0	0	
Pará	10	83	87	88
Amapá	0	5	15	14
Tocantins	0	0	1	5
Região Nordeste	2	24	1	7
Maranhão	2	1	1	5
Piauí	0	2	0	1
Ceará	0	8	0	1
Rio Grande do Norte	0	0	0	
Paraíba	0	0	0	
Pernambuco	0	0	0	
Alagoas	0	0	0	
Sergipe	0	0	0	
Bahia	0	13	0	
Região Sudeste	0	3	0	0
Minas Gerais	0	0	0	
Espírito Santo	0	0	0	
Rio de Janeiro	0	0	0	
São Paulo	0	3	0	
Região Sul	24	0	0	0
Paraná	0	0	0	
Santa Catarina	24	0	0	
Rio Grande do Sul	0	0	0	
Região Centro-Oeste	0	1	1	0
Mato Grosso do Sul	0	0	0	
Mato Grosso	0	1	1	
Goiás	0	0	0	
Distrito Federal	0	0	0	
Brasil	36	166	131	114

Fonte: PNCDCh/SVS/MS

*Dados preliminares sujeito a revisão

Dados atualizados em: 22/01/2009

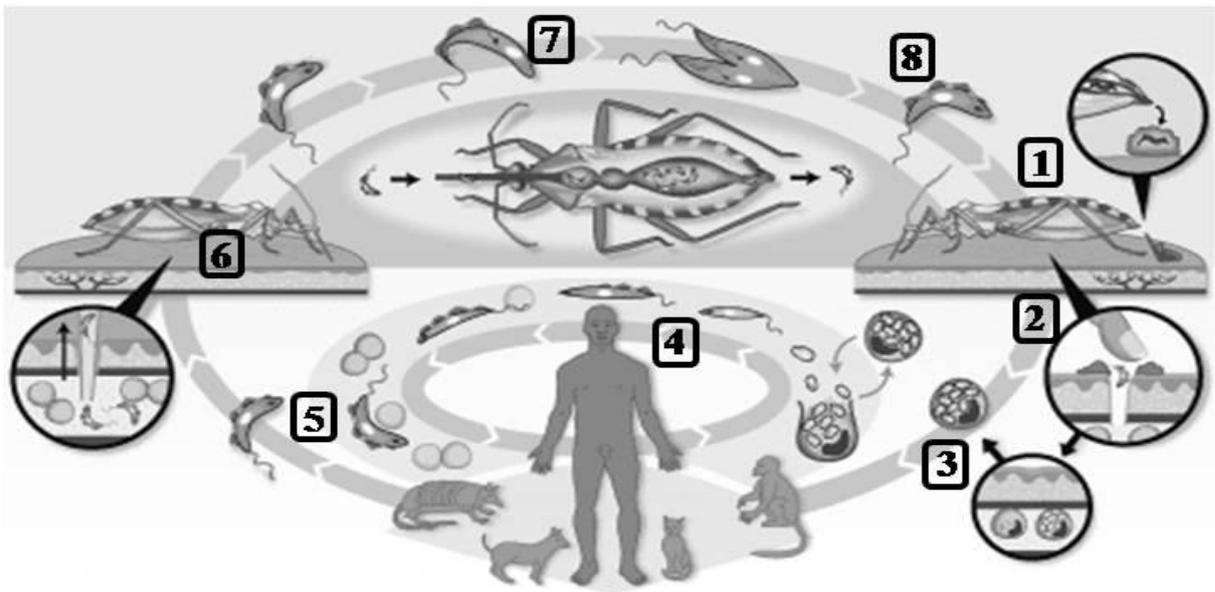


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. O triatomíneo vetor, popularmente conhecido como barbeiro, alimenta-se do sangue do animal e defeca sobre sua pele (1). A presença da forma infestante tripomastigota metacíclica do *T. cruzi* nas fezes possibilita a contaminação do indivíduo pela entrada do protozoário em sua corrente sanguínea por meio de fissuras na pele (2). Uma vez no sangue, este invade células e passa a diferenciar-se e multiplicar em formas intermediárias arredondadas aflageladas replicativas chamadas de amastigotas (3). De amastigota, o protozoário se diferencia na forma flagelada infectante tripomastigota (4) que, ainda na corrente sanguínea (5), possibilita a invasão de outras células e a contaminação de outro triatomíneo que se alimente deste mamífero infectado (6). Dentro do trato digestório do triatomíneo, o *T. cruzi* passa por transformações tornando-se a forma epimastigota (7) e voltando a ser infectante na forma tripomastigota metacíclica no intestino do animal (8). Ilustração adaptada de WHO.

Há outras formas de adquirir a doença que não por meio do contato direto da pele fissurada com as fezes de um triatomíneo contaminado, como por transfusão sanguínea, transmissão vertical, manuseio laboratorial inadequado do protozoário e ainda por ingestão de alimentos contaminados. Convém registrar, como foi amplamente divulgado pela mídia nos anos de 2005, 2006 e 2007, que pessoas que consumiram caldo de cana, bacaba e especialmente açaí *in natura* que continham o protozoário ainda vivo desenvolveram quadros severamente agudos e algumas delas vieram a falecer em poucos dias (ANVISA, 2007).

1.2 Vetores

1.2.1 Triatomíneos

De acordo com o que mostrado nos trabalhos de De Paula e colaboradores (2005), e Cleber Galvão (2003a), a classificação filogenética dos vetores da doença de Chagas é a seguinte: Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hemiptera, Família Reduviidae, Subfamília Triatominae. Essa subfamília é dividida em seis tribos das quais as duas maiores e epidemiologicamente mais importantes são Rhodniini e Triatomini.

Dentro da tribo Rhodniini, duas espécies do gênero *Rhodnius*, *R. brethesi* e *R. robustus*, já foram avaliadas como relevantes na transmissão do *T. cruzi* predominantemente na região amazônica do Brasil (COURA, 2002; GALVÃO, 2003b). Apesar de ausente no território brasileiro, a espécie *R. prolixus*, pertencente a essa mesma tribo, é uma das mais estudadas pela sua importância no restante da América Latina (DIAS, 2002b; RIBEIRO, 2004), predominantemente presente em regiões de savana do norte da América do Sul, mas também encontrado em área de florestas tropical (ABAD-FRANCH, 2007). Já na tribo Triatomini, a espécie *Panstrongylus megistus* representa um vetor eficiente tanto na área de Cerrado como também em regiões de Mata Atlântica remanescente, não sendo encontrado em região amazônica (BARBOSA, 2006; OLIVEIRA, 2007; PATTERSON, 2008). Na região sul do Brasil, apesar da espécie ocorre mais comumente em ecótopos silvestres, gera um risco em potencial de contaminação da população local devido à sua facilidade em desenvolver-se em ambientes artificiais (JUNIOR, 2009). *Triatoma infestans*, outra espécie pertencente à tribo Triatomini e de distribuição ubíqua à de *P.*

megistus (FORATTINI, 1980; PEREIRA, 2006), foi durante muitos anos o vetor da doença de Chagas epidemiologicamente mais relevante no Brasil (MASSAD, 2008) e, por isso, é uma das espécies mais bem descritas (DIAS, 2002b).

A Figura 3 representa as espécies que compõem essas duas tribos em uma árvore filogenética. Por tratar-se do mesmo gênero, é natural que as três espécies *R. brethesi*, *R. prolixus* e *R. robustus* tivessem uma relação de parentesco mais próxima, como de fato têm. *P. megistus* e *T. infestans*, espécies com habitats semelhantes, encontram-se relativamente próximos, ambos dentro da região relativa a membros da tribo Triatomini.

De maneira geral, os barbeiros, como são conhecidos popularmente, têm hábitos noturnos e buscam suas vítimas por meio de parâmetros como a alta concentração de CO₂, o amônia e moléculas voláteis presentes em dejetos que possibilitariam determinar a presença de um organismo de sangue quente, como dimetilamina e etilamina (WIGGLESWORTH, 1934; BARROZO, 2004; OTÁLORA-LUNA, 2006). Contudo, algumas características da biologia e comportamento desses animais podem variar, uma vez que se tratam de 137 espécies descritas para a subfamília Triatominae distribuídas pelos mais diversos biomas das Américas. *R. brethesi* (ROCHA, 2004), por exemplo, ao contrário do que foi dito acima, apresenta hábito diurno e, como forma de adaptação, alimenta-se e desenvolve-se rápida e eficientemente possibilitando a ascensão de ninfa 1 a 5 com um número médio de um repasto por estágio, o que os torna artrópodes adaptados frente à disponibilidade de alimento e aproveitamento de nutrientes no seu desenvolvimento. Parâmetros como o tempo de repasto, a quantidade de sangue ingerido e agressividade do triatomíneo podem variar muito não só entre espécies, mas também dependem do estágio de desenvolvimento (ZELEDÓN, 1981). Já segundo o estudo de Pereira e colaboradores (1998) feito com *Triatoma infestans* e *R. prolixus*, de acordo com a espécie - contendo suas variações de morfologia do aparelho bucal e composição salivar - e sua densidade demográfica, a picada pode ser mais ou menos perceptível à vítima, mostrando mais aspectos relevantes para a sobrevivência e continuação do ciclo biológico desse animal.

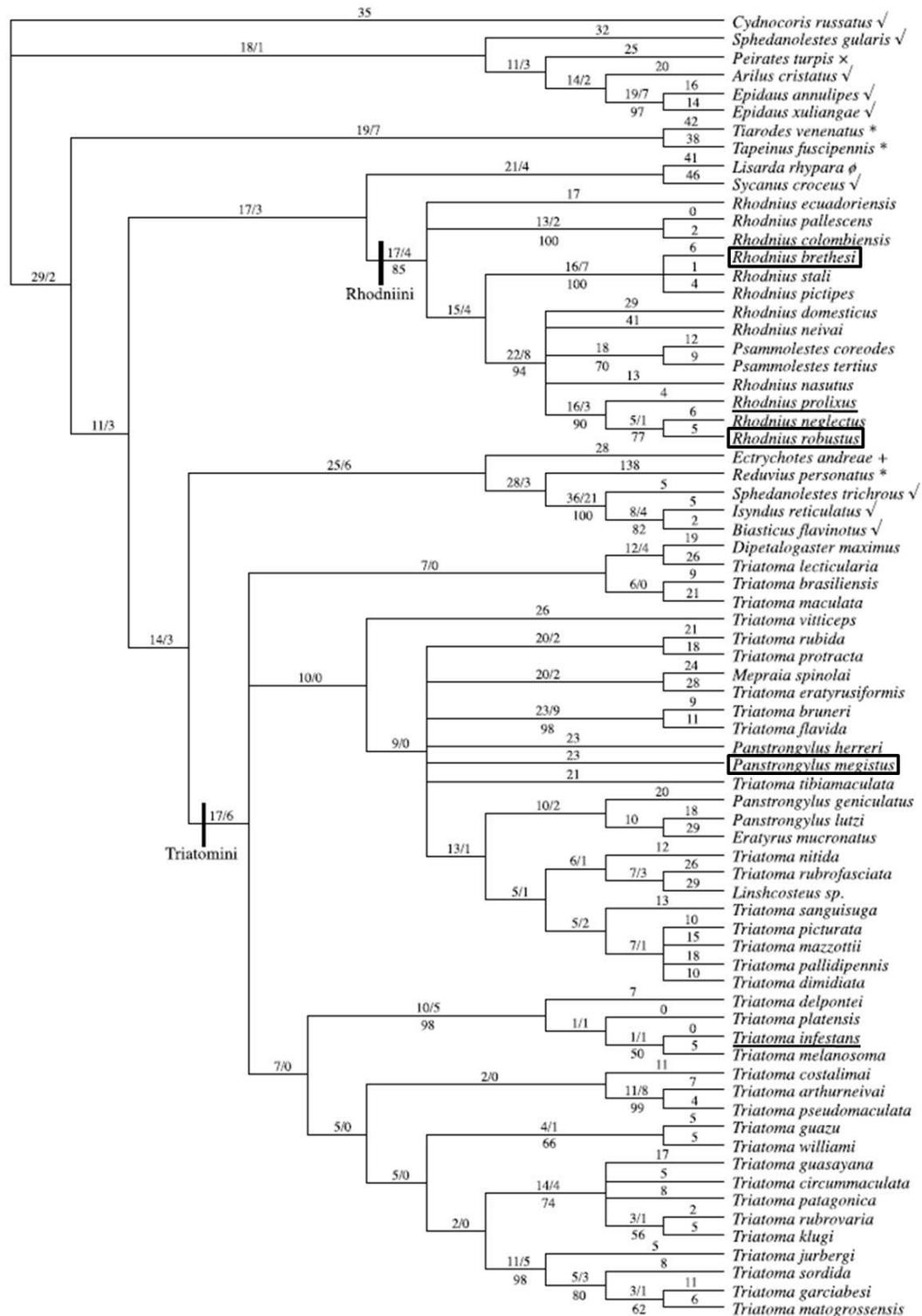


Figura 3. Árvore filogenética das tribos Rhodniini e Triatomini da Subfamília Triatominae. Foi construída com base em seqüências de gene ribossomal (16S) e com máxima parcimônia. Acima de cada chave estão representados valores da distância evolutiva (length/decay taxes) de Bremer e abaixo, valores da análise de “bootstrap”. As espécies marcadas (+, √, ×, *, ∅) são representantes de outras tribos desta subfamília, as enquadradas são as de interesse de nosso trabalho. Ilustração adaptada do trabalho de De Paula e colaboradores (2005). Grifos representam espécies de interesse do grupo: representadas dentro dos retângulos – espécies estudadas nesse trabalho; sublinhadas – espécies já bem descritas na literatura.

Apesar de mais comum, nem todos os triatomíneos alimentar-se exclusivamente do sangue de mamíferos ou aves, podendo optar ocasionalmente por animais de sangue frio como é o caso do barbeiro *Dipetalogaster maximus*, que habita em regiões desérticas do México e alimentar-se também do sangue de lagartos (COSTA, 1986). Há espécies consideradas silvestres que podem entrar em processo de domiciliação devido ao desmatamento e atividade humana dentro de florestas, como é o caso do *R. brethesi* nos piaçabais no Alto Rio Negro (DIAS, 2002a), e outras ubíquas que se adaptam facilmente ao meio domiciliar tendo sucesso na obtenção e aproveitamento nutricional de sangue humano, como *R. prolixus* e *T. infestans* (ZELEDÓN, 1981). Estas são vetores mais prováveis da doença de Chagas.

1.2.2 Hematofagia versus Hemostasia

Segundo Tartarotti e colaboradores (TARTAROTTI, 2006), uma possível explicação para o surgimento da hematofagia em triatomíneos se deve à abertura de novos nichos ecológicos em decorrência do surgimento dos primeiros mamíferos terrestres e aves no período Jurássico. Isso resultou na seleção evolutiva de animais da família Reduviidae que sofreram, com o decorrer da evolução, adaptações de seus aparelhos bucais e da saliva, anteriormente voltados para predação. Por não ser um hábito exclusivo desse grupo de organismos, é possível que a hematofagia tenha surgido várias vezes durante o processo evolutivo.

É clara a oposição existente na relação entre a hematofagia de alguns artrópodes e o conjunto extenso de mecanismos fisiológicos exercidos em mamíferos para evitar a perda de sangue. Havendo uma lesão em um vaso sanguíneo, componentes da matriz extracelular, como colágeno e fibrinectina, são expostos à luz do vaso sanguíneo entrando em contato com as plaquetas circulantes por meio de receptores. Nesse momento, por vias de transdução de sinal, as plaquetas tornam-se amebóides, formando projeções em sua superfície. Grânulos ricos em serotonina, epinefrina, ADP, dentre outros componentes são por elas formados e liberados, tendo os dois primeiros fatores ação vasoconstritora e o ADP uma ação de recrutamento e ativação plaquetária e leucocitária (BOON, 1993).

No sistema intrínseco da cascata de coagulação, o fator XII é ativado tornando-se o fator XIIa por ter entrado em contato com o colágeno da matriz extracelular exposta após a

lesão. Sua atividade enzimática gera o fator XIa que permite a clivagem do fator IX em IXa. Associada à membrana de plaquetas ativadas o fator IXa (enzima e fator da cascata de coagulação) se junta ao fator VIII e cliva o seu substrato presente no sangue, fator X, tornando-o ativo como fator Xa. Este, associado ao fator V, possibilita, então, a transformação de protrombina em trombina. A trombina tanto possibilita a formação do fator XIIIa que fará parte do coágulo como converte o fibrinogênio sanguíneo em fibrina, a qual também, juntamente com as plaquetas ativadas, forma o trombo no local lesionado (BOON, 1993; ANDRADE, 2005) (Figura 4).

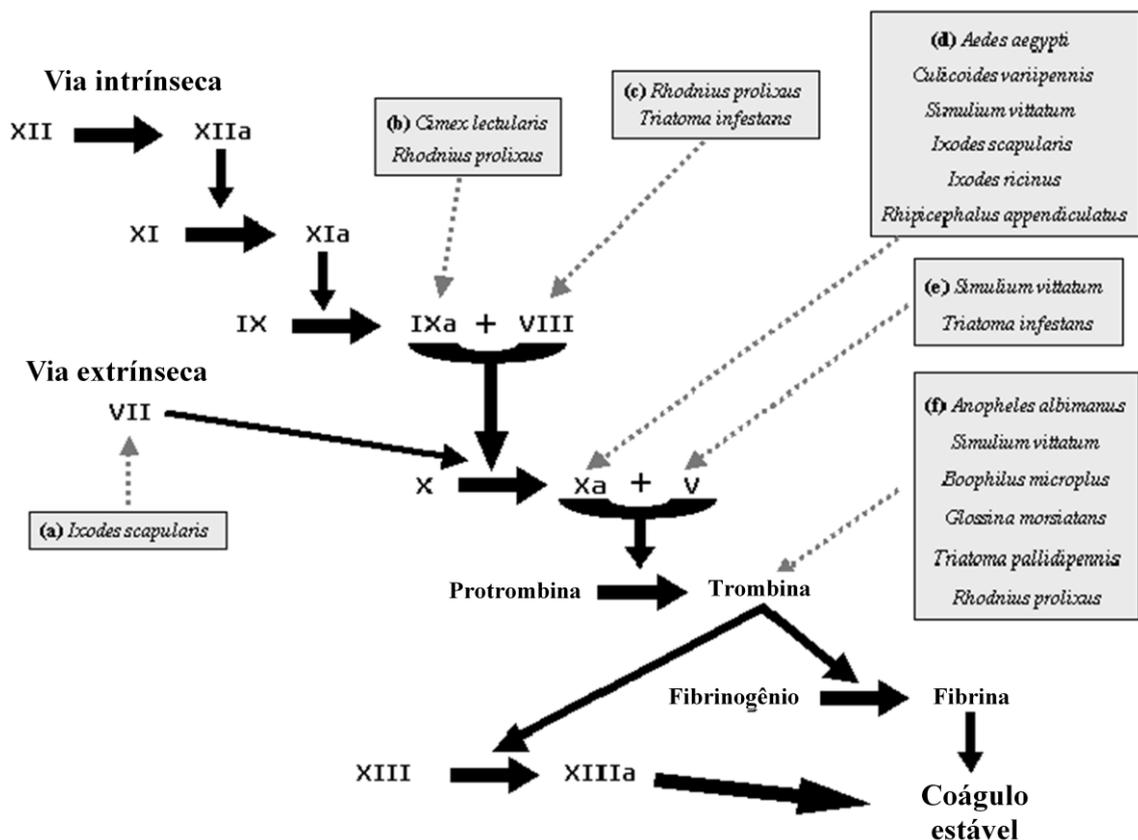


Figura 4. Cascata de coagulação sanguínea (vias intrínseca e extrínseca) ativada em resposta a lesão tecidual é bloqueada por moléculas salivares de diversos organismos hematófagos. Os fatores de coagulação se organizam em uma série de reações enzimáticas concatenadas levando à formação de um coágulo estável que evita a perda de sangue. Componentes nas salivas de diversos organismos hematófagos contrapõem pontos específicos desse processo desarticulando essa atividade hemostática. Figura adaptada do trabalho de Andrade (2005).

O sistema extrínseco da coagulação sanguínea coopera para a aceleração da via intrínseca. No momento que o vaso é lesionado, o fator II, também chamado de fator tecidual, passa a ser exposto na superfície das células endoteliais, permitindo sua associação com o

fator VIIa, ativado a partir do fator VII pela tromboplastina liberada pelo tecido lesionado. O fator VIIa então converge para a via de formação de Xa (BEVERS, 1993; JENNY, 2002) (Figura 4).

Contudo, mecanismos hemostáticos existentes em mamíferos, por mais que sejam complexos, são contrapostos eficientemente por um conjunto de proteínas expressas em suas glândulas salivares tornando-se componentes essenciais para a obtenção de sangue pelos mais diversos artrópodes hematófagos (RIBEIRO, 2004; ARCÀ, 2007; CALVO, 2007; ASSUMPCÃO, 2008; FRANCISCHETTI, 2008) (Figura 4). Um parâmetro que pode ser considerado inicialmente relevante no sucesso da obtenção do alimento é sua estrutura anatômica das glândulas salivares. O número de pares de glândulas pode variar entre gêneros dentro da subfamília Triatominae. *P. megistus* possui 3 pares dessas glândulas e seu conteúdo é incolor. Da mesma maneira acontece com *T. infestans*. Já os *Rhodnius* apresentam apenas 2 pares com secreção de cor avermelhada, devido à presença de proteínas chamadas nitroforinas que contém o grupo prostético heme. Segundo a nomenclatura dada por Barth (1954), os pares de glândulas são D1 (principal – secreção merócrina), D2 (suplementar – secreção apócrina) e D3 (acessória), sendo o último par ausente no gênero *Rhodnius*. Acreditava-se que o par D3 contribuísse apenas como reservatório da saliva produzida nos outros pares de glândulas ou tivesse função apenas de diluir os componentes de D1 e D2 a concentrações ideais para o repasto. Contudo, já foi mostrada a presença de estruturas próximas a esse par de glândulas que provavelmente intensificam sua oxigenação sugerindo uma alta taxa metabólica, a presença de uma válvula nessa estrutura que controla a liberação de seu conteúdo também traz um indício de relevância do seu produto (LACOMBE, 1999; REIS, 2003). Além disso, sua participação na formação do conteúdo proteico salivar de *T. infestans* foi evidenciada por eletroforese unidimensional de proteínas extraídas individualmente de cada par de glândulas (CHARNEAU, 2007).

As famílias de proteínas salivares presentes em triatomíneos são, em sua maioria, sabidamente anti-hemostáticas e algumas destas podem também apresentar características de moléculas anti-inflamatórias. Um exemplo disso é a família das lipocalinas (LPs), presente em alta proporção nas salivas de *R. prolixus* e *T. brasiliensis* - 83,8% (RIBEIRO, 2004) e 93,8% (SANTOS, 2007), respectivamente -, relativa ao número de proteínas salivares secretadas. Como exposto por Andersen e colaboradores (2005), as LPs têm função de, através do seu acoplamento a certas moléculas em sua região central da estrutura de barril de

folhas β antiparalelas (dobramento típico de LPs), suprimir os principais eventos que impediriam a obtenção do sangue pelo triatomíneo. Foram descritos os seguintes subtipos proteicos nessa família: RPAIs (inibidoras de agregação plaquetária em *Rhodnius*) ou simplesmente AIs, ABPs (proteínas ligadoras de aminas), LPs homólogas de triabina (serino-proteases de *T. pallidipennis*) e NPs (nitroforinas). O primeiro grupo teve a função descrita apenas para uma de suas isoformas (RPAI1) como sendo a iniciação da agregação plaquetária por meio da sua ligação a ADP (adenosina difosfato), molécula conhecidamente ativadora de plaquetas. Também com atividade anti-agregadora, ABP liga-se à serotonina e à epinefrina secretadas de grânulos plaquetários que teriam o papel de ativação e recrutamento de outras plaquetas para a formação do trombo. Pode também ligar-se a norepinefrina liberada pelo sistema nervoso simpático no local da lesão, impedindo sua ação vasoconstritora. As LPs homólogas de triabina provavelmente, como a própria triabina, devem inibir agregação plaquetária induzida por trombina associando-se a ela por ligação não-covalente.

Já as nitroforinas, como já foi dito, são proteínas que possuem um grupo prostético heme contendo um íon de Fe^{III} no centro de uma estrutura de barril de folhas β antiparalelas (dobramento comum na família das lipocalinas). NPs representam 50% das proteínas salivares de *R. prolixus* (CHAMPAGNE, 1995) e podem ser separadas em isoformas com funções diferenciadas. De maneira geral, por meio de uma interação de intensidade moderada com o íon de Fe^{III} da estrutura heme, carregam óxido nítrico (NO^*) desde a glândula salivar do triatomíneo até a luz do vaso da vítima. Pela mudança de pH (saliva do inseto, pH 6; sangue humano, pH 7.4), as interações moleculares com o grupo heme da NP enfraquecem e o óxido nítrico é liberado permitindo que essa molécula, agora livre na corrente sanguínea, contribua para a dilatação do vaso aumentando, assim, o influxo de sangue e o acesso desse artrópode ao seu alimento, além de agir simultaneamente como inibidor da agregação plaquetária pela supressão das propriedades de adesão do endotélio vascular (GRAAF, 1992). Liga-se também à histamina liberada por mastócitos no local da picada, impedindo, assim, o início de um processo inflamatório com vasodilatação, formação de edema gerando um desconforto, o que possivelmente levaria à remoção do triatomíneo e ao fim do repasto (ANDERSEN, 2005).

As isoformas de NPs geralmente diferenciam-se funcionalmente pelas constantes de dissociação de NO^* e seu local de liberação dentro do vaso. A NP2, além de sua função carreadora, previne a coagulação sanguínea ligando-se ao fator IXa da cascata de coagulação impedindo sua associação ao fator VIIIa para ativação do fator X. NP7, além de ligar-se a

NO* e a histamina como as outras nitroforinas, tem sua porção N-terminal positivamente carregada permitindo seu acoplamento a fosfolípídeos aniônicos evitando a formação de trombina pelo complexo protrombinase (ANDERSEN, 2004). Todas essas isoformas têm uma alta similaridade de sequência, contudo, simultaneamente apresentam grande diversidade de funções. Isso pode significar que a evolução das sequências oriundas de duplicações de um gene ancestral resultaram diretamente numa diversificação funcional desse grupo de isoformas (ANDERSEN, 2005; ANDRADE, 2005).

Outras LPs também foram encontradas na saliva de *T. pallidipennis*. Uma delas é a palidipina, que bloqueia a via de transdução de sinal para liberação de ATP por plaquetas parcialmente ativadas por colágeno, suprimindo a ativação de novas plaquetas (NOESKE-JUNGBLUT, 1994). A triabina também foi descrita para essa espécie e sua função é impedir a agregação plaquetária induzida por trombina ao associar-se a ela, além de prolongar o tempo de coagulação pela diminuição da atividade de tromboplastina (NOESKE-JUNGBLUT, 1995).

As apirases são proteínas da família 5'-nucleotidase que foram isoladas da salivas de *T. infestans* (FAUDRY, 2004). Atividade apirásica já foi descrita para *R. prolixus* (RIBEIRO, 1981), contudo, como essas proteínas nunca foram isoladas dessa saliva, essa atividade foi sugerida como sendo das RPAIs, proteínas também anti-agregadoras plaquetárias. São conhecidas por atuarem no processo de agregação plaquetária (ANDERSEN, 2005). A apirase transforma moléculas de ATP e ADP em AMP pela hidrólise de fosfatos. Dessa maneira, são eliminados efetores de ativação plaquetária, ADPs, e produzidas moléculas vasodilatadoras, AMPs (RIBEIRO, 1999), ambas atividades contribuindo para o repasto do triatomíneo. Em princípio, foram isoladas cinco diferentes formas denominadas segundo suas massas moleculares relativas em eletroforese unidimensional (67 kDa, 68 kDa, 79 kDa, 82 kDa e 88 kDa). A descrição mais recente dessas enzimas salivares mostra, contudo, a existência de isoformas de cada forma. Um total de quinze isoformas apirásicas foram encontradas na saliva de *T. infestans*, talvez produtos de poucos loci com modificações pós-traducionais (CHARNEAU, 2007), considerando que essas proteínas foram inicialmente descritas como glicosiladas (FAUDRY, 2004). Essa abundância pode representar um resultado evolutivo de sucesso para o repasto, uma estratégia de contraposição precoce à atividade de coagulação plaquetária da presa para garantir o acesso rápido à fonte de alimento.

Triafestinas são moléculas também encontradas em *T. infestans*, e cooperam para o repasto com uma atividade anti-inflamatória, impedindo a liberação de bradicinina suprimindo, assim, um possível incômodo da presa com um possível edema e dor local (ISAWA, 2006). As triplatinas, presentes no mesmo triatomíneo, têm função anti-agregadora plaquetária bloqueando a ativação das plaquetas que ocorreria por meio do contato entre receptor plaquetário glico proteína VI (GPVI) e o colágeno da matriz extracelular exposto pela lesão do vaso (MORITA, 2006). Outras moléculas como trialisina (provavelmente relacionada à defesa inata do inseto por ser formadora de poros), procalina (principal alérgeno da saliva de *T. protracta* sem função anti-hemostática descrita) e triapsina (associada à desarticulação da cascata de coagulação e do sistema complemento por proteólise), associadas à defesa inata do invertebrado, ao controle da hemostasia do vertebrado, dentre outros processos, são também encontradas nas salivas de triatomíneos (RIBEIRO, 2004; ASSUMPCÃO, 2008). Contudo, ainda há ainda moléculas a serem identificadas, suas funções descritas e sua relevância compreendida em um processo tão complexo quanto o de repasto sanguíneo.

1.3 Análise Proteômica

Proteoma é definido como o conjunto de proteínas expressas em uma determinada célula, tecido ou fluido biológico em um dado momento. Um exemplo que mostra a importância dessa definição é o ciclo biológicos de insetos holometábolos. Um organismo com esse tipo de desenvolvimento (ovo – larva – pupa – adulto), apesar de apresentar modificações morfológicas e fisiológicas drásticas até chegar à fase adulta, não tem o seu genoma modificado durante esse período. O que de fato muda é a expressão de conjuntos diferenciados de proteínas em quantidades também variadas.

Um maior interesse da comunidade científica em aprofundar os conhecimentos a respeito dos mais diversos proteomas surgiu logo após a era genômica, quando uma série de organismos tiveram seus genomas sequenciados sem contudo esclarecer por completo uma série de questões relativas à expressão quantitativa e qualitativa dos genes encontrados. Tendo em vista a centralidade das proteínas no funcionamento dos organismos e a possibilidade real de sua utilização em novos medicamentos, a proteômica se estabeleceu como ciência.

Nos últimos anos, a proteômica tornou-se uma área do conhecimento extremamente dinâmica apresentando um crescimento exponencial, que vem motivando o surgimento de diversas revistas de literatura científica específicas da área (LÓPEZ, 2007). Isso se deve ao grande número de trabalhos publicados nessa área, que foram, em grande parte, impulsionados pelos avanços metodológicos relativos à eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida, ferramentas de bio informática e, principalmente, à espectrometria de massas de proteínas.

A eletroforese bidimensional consiste na separação de um conjunto de proteínas utilizando dos diferentes parâmetros: a carga residual e a massa molecular desse conjunto de aminoácidos. Num primeiro momento (primeira dimensão ou focalização isoeletrica - IEF) as proteínas são desnaturadas¹ de forma a exporem todas as cadeias laterais dos aminoácidos de suas sequências ao solvente. Isso feito, são então introduzidas em um gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado e submetidas a uma corrente elétrica. De acordo com suas cargas residuais, elas se movimentam nesse gel em direção a um dos pólos da corrente e, chegando a uma região de pH que neutralize a sua carga residual, dizemos que foi alcançado o ponto isoeletrico (pI) dessas proteínas. Depois disso, as proteínas separadas na primeira dimensão são submetidas a um processo de redução e alquilação para que não haja riscos de formação de novas estruturas secundárias ou terciárias por interação intracadeira. Em seguida, são todas carregadas negativamente com a adição de um detergente e submetidas a uma ‘peneira molecular’ (segunda dimensão ou SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida) feita por um polímero de acrilamida e bis-acrilamida. Sob efeito de uma corrente elétrica, migram em direção ao pólo positivo da corrente passando por dentro desse polímero. As proteínas menores migram mais rapidamente e, ao fim do experimento, se encontram na porção mais próxima do pólo positivo, enquanto as maiores na região mais apical do polímero. Para visualização das proteínas, esse polímero é submetido a um processo de coloração de maneira que o corante interage com a cadeia principal dos polipeptídeos presos na malha do polímero e manchas (*spots*) surgem de maneira que, inicialmente, cada uma é considerada uma proteína (BERKELMAN, 1998) (Figura 5).

Técnicas cromatográficas também podem ser utilizadas na separação de uma mistura de proteínas. Na técnica cromatografia líquida, a mais comumente utilizada, colunas contendo matrizes interagem com a amostra inserida e, de acordo com a relação proteína/coluna e

¹ Essa técnica também pode ser utilizada com proteínas não-desnaturadas para teste de atividade no gel (eletroforese nativa).

proteína/solvente, cada proteína é eluída segundo um parâmetro específico (tamanho, hidrofobicidade e interações iônicas) e coletada num microtubo. Uma vantagem apresentada pela eletroforese em relação a essa técnica é a possibilidade de visualização de um perfil proteômico na malha do polímero, dando um maior número de informações gerais a respeito do conteúdo da amostra em questão. A cromatografia líquida, contudo, pode ser feita em menos tempo e a análise por espectrometria de massas pode ser feita *online* (acoplamento automático de um aparelho com o outro), o que não pode ser feito com sistemas de eletroforese.

Espectrometria de massas tem sido uma técnica central nas ciências proteômicas. Sendo as informações obtidas por eletroforese ou cromatografia insuficientes para assegurar uma identidade proteica de um determinado *spot*, análises posteriores são imprescindíveis. Assim, o desenvolvimento de uma metodologia que avalia com alta precisão outras propriedades do analito abriu a possibilidades de crescimento da proteômica. Por meio da ionização e análise de fragmentos proteicos originados por digestão das proteínas separadas por eletroforese ou por cromatografia, a comparação dos dados obtidos com informações de sequências disponíveis em bancos de dados foi possível, viabilizando identificação dessas proteínas.

Os métodos de ionização mais comuns em trabalhos de proteômica são ESI (eletropulverização) e MALDI (desorção a *laser* auxiliada por matriz) (Figura 6) (AEBERSOLD, 2003; CUNHA, 2003). No primeiro caso, o analito é preparado em solução e introduzido numa agulha pulverizadora mantida sob alta voltagem, gerando um aerossol de gotículas altamente carregadas que serão levadas para dentro do espectrômetro de massas para serem analisadas. A segunda técnica consiste na mistura da amostra a uma matriz, que geralmente se trata de um composto que absorve luz no mesmo comprimento de onda do feixe de *laser* que será utilizado. Essa mistura ainda no estado aquoso é aplicada sobre uma anteparo onde é deixada até que o solvente evapore por completo e a matriz e a amostra cristalizem conjuntamente. O anteparo é então irradiado com um feixe de laser de maneira, pelo aquecimento do cristal, amostra e analito entram em fase gasosa e são direcionados para serem analisados dentro do espectrômetro de massas.

Após a ionização do analito, ele é encaminhado para o analisador molecular onde cada fragmento peptídico será separado de acordo com a razão massa/carga (m/z). Os analisadores podem ser de vários tipos: tempo de voo (*time-of-flight*, TOF), triplo-quadrupolo (TQ),

armadilha iônica (*ion trap*, IT), quadrupolo-TOF (Q-TOF), ressonância cíclotron por transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR). Com exceção do último, todos podem ser associados a ESI ou MALDI como método de ionização e podem ser associados em cadeia entre si como é o caso do Q-TOF, TOF/TOF, IT/TOF, dentre outros (Figura 6) (AEBERSOLD, 2003).

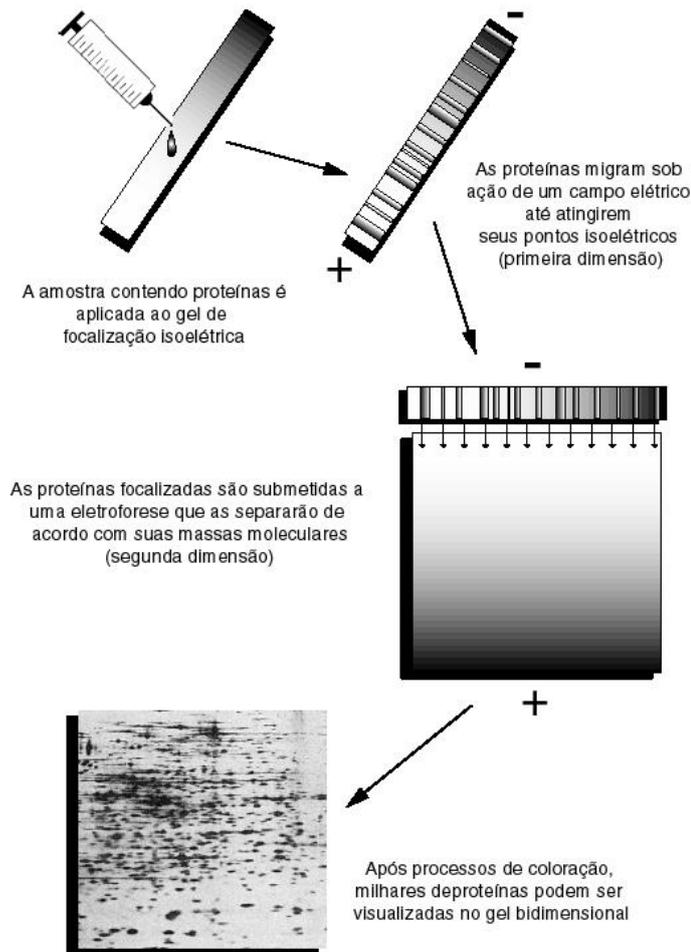


Figura 5. Esquema representando as etapas da eletroforese bidimensional. Ilustração do trabalho de Souza e colaboradores (1999).

O analisador de interesse para melhor compreensão desse trabalho é do tipo TOF. Uma vez que o analito e a matriz ionizados e desorvidos entram no tubo de vácuo do aparelho, são acelerados por um campo elétrico até que cheguem a um detector que calculará a razão m/z de cada partícula de acordo com o tempo de voo dela. Tendo essa informação, uma lista de massas das partículas detectadas e um espectro contendo essas massas são formados.

Em seguida, utilizando os dados obtidos, algumas estratégias de identificação de proteínas são aplicadas. Se tratando de um organismo de genoma sequenciado, a técnica de *peptide mass fingerprinting* (PMF) se mostra muito eficaz (GÖRG, 2004). As massas encontradas são correspondentes a peptídeos gerados a partir da proteólise de um *spot* ou de uma fração cromatográfica. Sendo assim, em busca da identidade proteica da amostra escolhida, a lista de massas obtida pode ser comparada a listas de massas gerada por digestões ‘*in silico*’ das proteínas de um banco de dados. Dessa maneira, a partir de cálculos algorítmicos, uma pontuação é dada a cada comparação de forma que quanto mais semelhante for a lista de massas experimentais de uma das listas de massas teóricas, maior a pontuação dessa lista teórica. Sendo assim, é provável que a proteína analisada seja igual à proteína que originou a lista mais semelhante ou tenha alguma relação com ela (Figura 7).

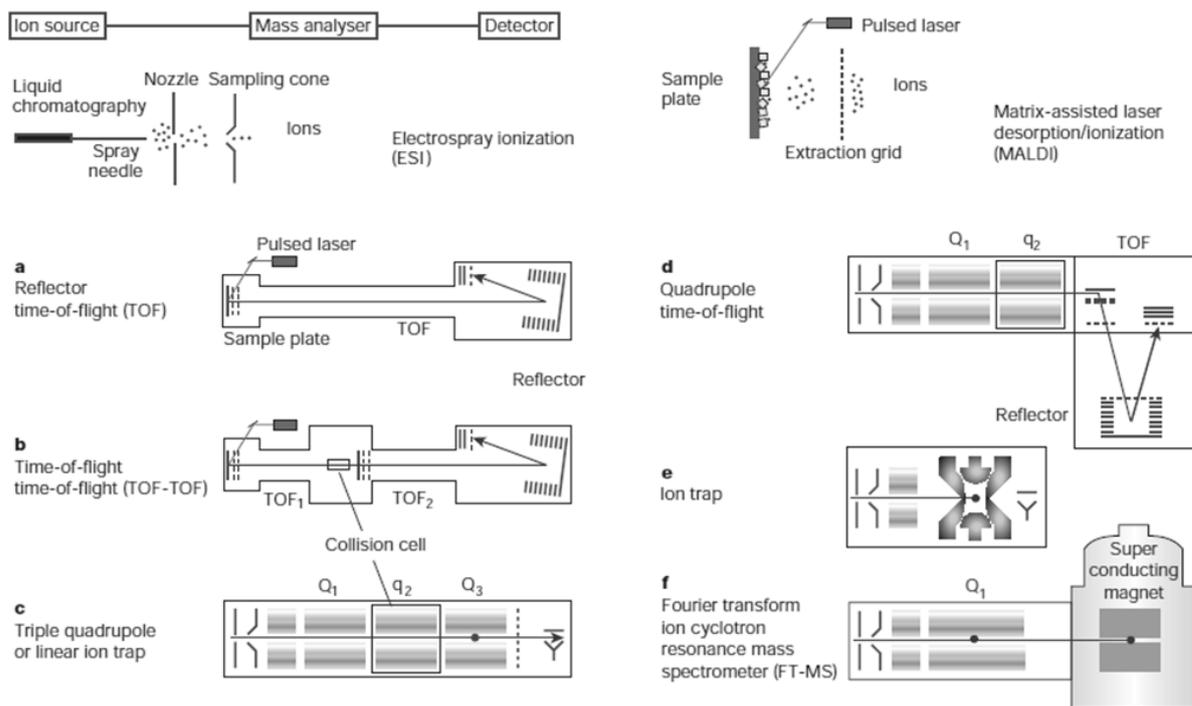


Figura 6. Configurações de diferentes formas de ionização e possíveis analisadores moleculares utilizados em espectrômetros de massas utilizados em experimentos proteômicos. Ilustração do trabalho de Aebersold e Mann (2003).

A técnica de espectrometria de massas em série (*tandem mass spectrometry*, MS/MS) traz dados adicionais em relação a estratégia de PMF. A partir de um perfil geral de todos os peptídeos originados a partir da digestão da proteína inicial, peptídeos são selecionados. Separadamente cada um sofrerá fragmentação – por colisão com um gás (*collision-induced*

dissociation, CID) ou por decaimento por excesso de energia na molécula após ionização/desorção por MALDI (*post source decay*, PSD) – e nova detecção. Os espectros de fragmentação gerados para uma mesma proteína são unidos ao espectro que os deu origem e uma busca pode ser realizada no banco de dados, como foi feito anteriormente com PMF, contudo adicionada de novos dados de cada peptídeo fragmentado (Figura 8).

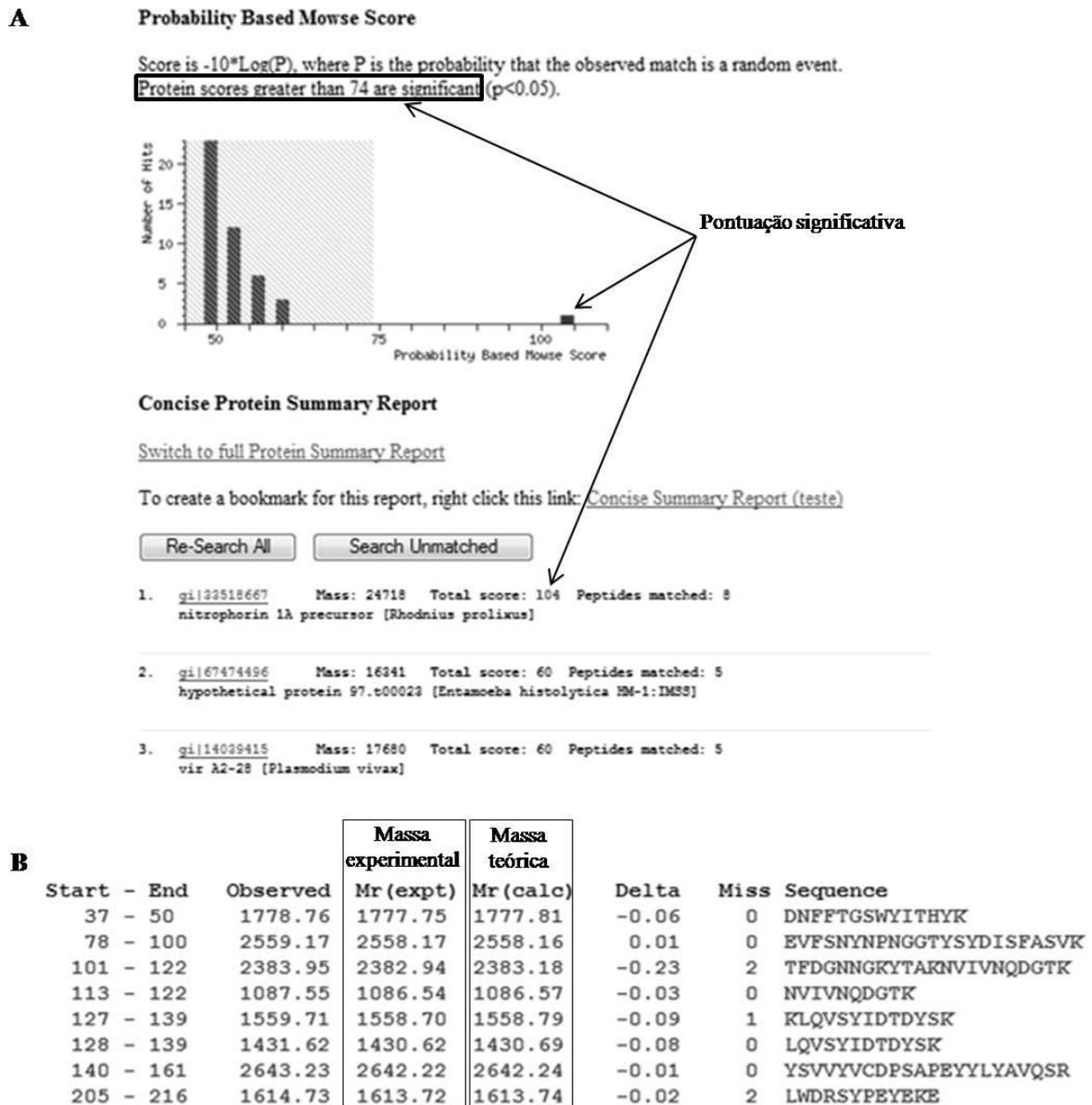


Figura 7. Resultado obtido em busca por PMF. Estão mostradas na parte superior da figura (A) três setas indicando que foi obtida uma pontuação significativa na busca e a proteína com uma lista de massas mais semelhante à da proteína do experimento realizado é a primeira da lista, a nitroforina 1A, com uma pontuação de 104, valor acima de 74 (mínimo significativo determinado pelo algoritmo). Em (B) está evidenciada a similaridade entre a lista de massas obtidas no experimento e a lista de massas teóricas gerada pela digestão *in silico* da nitroforina 1A. Busca realizada com a ferramenta Mascot (PERKINS, 1999).

Havendo insucesso nessa busca, é possível utilizar cada espectro de fragmentação como mapa da sequência do peptídeo fragmentado. De maneira geral a fragmentação peptídica ocorre na cadeia principal da molécula gerando séries de íons complementares (parte N-terminal complementar à C-terminal - série **a** complementar à série **x**, série **b** complementar à série **y** e série **c** complementar à série **z**). Selecionando uma série de íons (as séries **b** e **y** são mais comumente utilizadas por serem originadas pela quebra da ligação peptídica, o que facilita a interpretação do espectro), é possível interpretar ‘*de novo*’ o espectro obtendo a sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo fragmentado pela diferença de massa entre um pico e outro, que representando a massa de um aminoácido presente na sequência. Tendo a estrutura primária parcial ou total da proteína, uma busca por alinhamento de sequências (BLAST) pode ser feita em bancos de dados buscando semelhanças com outras proteínas já descritas (Figura 8).

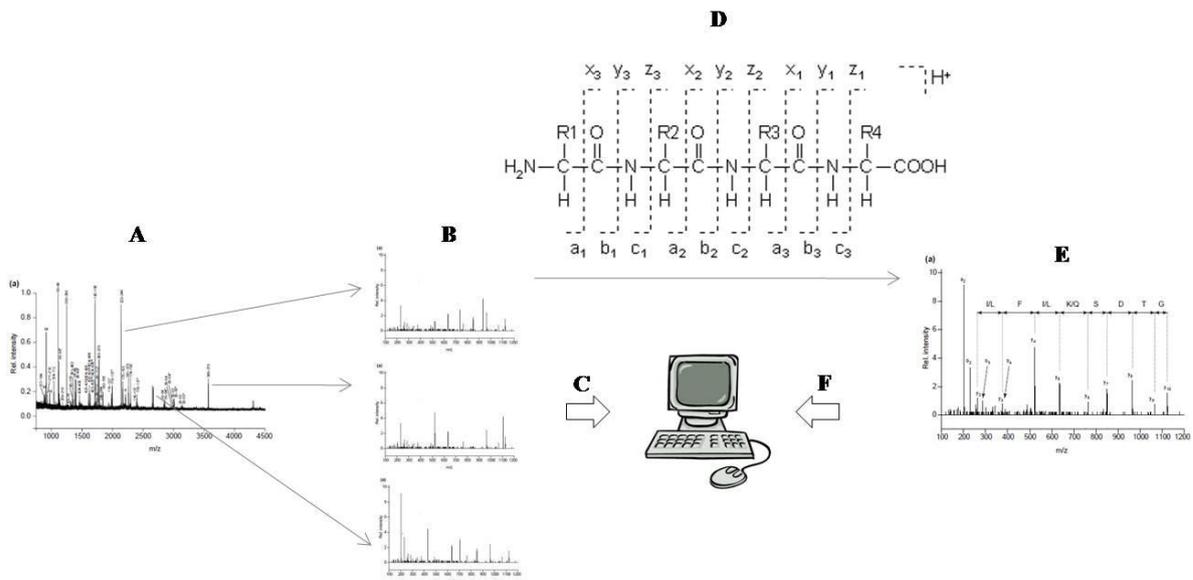


Figura 8. Esquema de estratégias de análise de dados proteômicos por espectrometria de massas. (A) é a representação de um espectro geral de peptídeos tripsínicos de uma amostra; (B) mostra três espectros de fragmentação, cada um de um peptídeo diferente presente em (A); (C) representa buscas em bancos de dados buscando identificar a proteína que gerou os espectros de (A) e (B); (D) mostra como se espera que os peptídeos fragmentem em séries de íons complementares e, em um possível insucesso nas buscas de (C), a fragmentação pode ser interpretada ‘*de novo*’, originando uma sequência (E) que pode também ser submetida a busca em bancos de dados por BLAST (F).

As ferramentas de bioinformática utilizadas hoje a favor das pesquisas proteômicas são absolutamente indispensáveis para um desfecho bem sucedido dos experimentos. De maneira geral, são plataformas de interface que geram, a partir de dados brutos, uma

interpretação do que foi obtido. Tanto fazem parte de circuitos de transformação de dados matemáticos em dados visuais, como espectros de massa por exemplo, como também são importante para facilitar a comparação entre informações diversas – géis onde se buscam proteínas com expressões diferenciadas, espectros de massa de uma mesma amostra obtidos a partir de metodologias de preparação distintas, sequências proteicas correspondentes de um mesmo gene de diferentes organismos, interpretação de sequências de aminoácidos a partir de espectros de massa, dentre outros.

O arsenal de técnicas e estratégias proteômicas continua se expandindo podendo ter uma abordagem estrutural, funcional ou de expressão comparativa (LAU, 2003). Novas metodologias tais como *isotope-coded affinity tagging*, *protein arrays* e cromatografia multidimensional acoplada à espectrometria de massas têm permitido um aumento ainda maior na velocidade da identificação de proteínas, no estudo das modificações pós-traducionais e na determinação de interações moleculares que ocorrem nos sistemas biológicos.

2 Justificativa

Na literatura já foram descritas, em diversos casos, proteínas salivares relevantes no ciclo evolutivo de artrópodes hematófagos veiculadores de doenças humanas e animais (VALENZUELA, 2002; CALVO, 2004; ARCÀ, 2007; ALJAMALI, 2009). A descoberta de novas proteínas salivares que facilitam o repasto sanguíneo de triatomíneos graças a suas atividades de contraposição da agregação plaquetária, vasoconstrição e coagulação sanguínea da presa permitirá aprofundar o conhecimento sobre esse processo imediatamente anterior e fortemente relacionado à transmissão do *Trypanosoma cruzi* pelos vetores, além de melhorar a compreensão das relações interespecíficas (vetor/hospedeiro definitivo, vetor/patógeno) dadas durante a alimentação.

A hipótese a ser testada neste trabalho é a existência de proteínas salivares com função anti-hemostática que contribuam para o repasto bem sucedido dos triatomíneos em questão. Questões que também podem ser trazidas são: a possível existência de proteínas exclusivas dessas salivas e anteriormente não descritas, o grau de semelhança das salivas de espécies do mesmo gênero ou da mesma tribo, a presença de isoformas como já observados em outra salivas (RIBEIRO, 2004; CHARNEAU, 2007), além da existência de modificações pós-traducionais já descritas em proteínas salivares (FAUDRY, 2004).

Novas moléculas peptídicas e proteicas farmacologicamente ativas descritas nas salivas de triatomíneos poderão tornar-se medicamentos para combater distúrbios na hemostasia humana. Dessa maneira, pessoas acometida de hipercoagulabilidade (trombose), por exemplo, poderiam dispor de medicamentos anti-hemostáticos de uso contínuo a base de proteínas salivares, inibindo eficientemente as vias de ativação da cascata de coagulação e diminuindo os riscos do paciente sofrer uma embolia.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

A presente proposta visa dar prosseguimento ao estudo proteômico de salivas de triatomíneos desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

Nosso objetivo é investigar e caracterizar a diversidade proteica das salivas dos triatomíneos *R. brethesi*, *R. robustus* e *P. megistus*. Espera-se identificar novas moléculas anti-hemostáticas que contribuem para o repasto sanguíneo e, indiretamente, para a transmissão vetorial do parasita ao homem.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma análise comparativa de mapas proteômicos de salivas de espécies de triatomíneos intra- e inter-gêneros, em uma faixa ampla de gradiente de pH (3-10);
- Identificar as proteínas salivares de cada espécie por espectrometria de massas e demonstrar proteínas diferenciais entre as salivas.

4 Metodologia

4.1 Reagentes

Água Milli-Q produzida no laboratório foi utilizada na preparação de todas as soluções. Adjuvante de Freund, glicerol, óleo mineral, azul de Coomassie, cloreto de sódio, bicarbonato de amônio, bicarbonato de sódio, cloreto de magnésio, acetonitrila, isopropanil, ácido trifluoracético (TFA), metanol e isotiocianato de 4-sulfofenila (SPITC) apresentam grau analítico e foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Uréia, tiuréia, Triton X100, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, anfólitos pH 3-10 (Pharmalyte), tris-hidroximetil-aminometano (Tris), dodecilsulfato de sódio (SDS), glicina, iodacetamida, acrilamida, bis-acrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), Immobiline DryStrip 3-10L (IPG strips), Protease Inhibitor Mix, Plus One 2D Quant Kit e membranas de nitrocelulose Hybond-C Extra foram obtidos juntamente à GE Healthcare. A tripsina porcina modificada utilizada nas digestões é comercializada pela Promega. N,N-dimetilformamina, nitroblue tetrazolium (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) forma fornecidos pela BioRad. Pro-Q Diamond foi adquirido da Invitrogen. A matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) foi fornecida pela Bruker Daltonics. A resina Poros 20 R2 foi obtida junamente à PerSeptive Biosystems.

4.2 Obtenção das salivas

Os triatomíneos utilizados (não infecção por *T. cruzi*) foram obtidos a partir de colônias mantidas pelo Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC) da UnB. O insetário foi mantido a 28 °C, 70% de umidade relativa e com fotoperíodos de 12h. Após um período de sete a nove dias da última refeição, os animais adultos, ainda vivos, tiveram suas glândulas salivares retiradas pela remoção da cabeça por alongação. Uma vez removidas manualmente em solução salina (NaCl a 0,9%) e depositadas em um microtubo, as glândulas de todos os animais foram unidas e delicadamente puncionadas permitindo o extravasamento do seu conteúdo luminal. Para evitar contaminação com o conteúdo das células glandulares e proteólise, a amostra foi centrifugada a 1000 x g durante 5 min a 5 °C, e o sobrenadante foi adicionado de um coquetel de inibidores de

proteases de cisteína (dependente e independente de Ca^+) e de serina (Protease Inhibitor Mix sem ácido etilenodiamino tetra-acético, GE Healthcare) e armazenado a -80°C .

4.3 Quantificação das amostras

A quantidade de proteínas de cada amostra foi estimada por método colorimétrico (Plus One 2D Quant Kit, GE-Healthcare) e averiguada posteriormente por análise de aminoácidos em um analisador Hitachi L8500 utilizando derivatização pós-coluna com ninhidrina. Foram utilizados $80\ \mu\text{g}$ de proteínas nos experimentos realizados.

4.4 Eletroforese bidimensional

As amostras foram solubilizadas em tampão 2D – 7 M Uréia, 2 M tiouréia, 65 mmol/L DTT, 2% Triton X100 (v/v), 0,5% anfólitos (v/v) pH 3-10 (Pharmalyte) e 10% isopropanol (v/v) – durante 1h sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugadas por 5 min a $14000 \times g$ e os sobrenadantes foram submetidos à primeira dimensão de separação, também chamada de IEF relativa à separação por *pI*. Tiras de gel (IPG strips, GE Healthcare) de 18cm com gradientes de pH 3-10 foram reidratadas por 6h com $350\ \mu\text{L}$ desse sobrenadante. Nas próximas 6 h, 30 V foram aplicados sobre as tiras de gel, seguidas de mais 1 h sob 500 V, outra 1 h sob 1000 V e, por último, mais 4 h sob 8000 V. No total o processo foi desenvolvido em 18h, a 20°C , sendo cada tira de gel submetida a uma corrente de $50\ \mu\text{A}$. A primeira dimensão foi feita em uma unidade Ettan IPGphor3 (GE Healthcare) com esse protocolo elaborado a partir do padrão do fabricante.

Antes da segunda dimensão, as tiras de gel foram incubadas durante 40 min em solução de equilíbrio – composta por 50 mmol/L Tris, 6 M uréia, 30% glicerol (v/v) e 4% SDS (p/v) – adicionado de DTT a 125 mmol/L para redução de possíveis pontes dissulfeto presentes na amostra. E, num segundo momento, foram alquiladas em solução de equilíbrio adicionada de acrilamida 300 mmol/L. A segunda dimensão foi realizada em géis desnaturantes SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) utilizando um sistema Protean II (BioRad, Richmond, CA, USA). A eletroforese foi mantida sob corrente de 15 mA por gel a

20 °C e Azul de Bromofenol foi utilizado como linha de frente para verificação do andamento do experimento.

Os géis foram corados com nitrato de prata (BLUM, 1987). A estocagem e secagem de géis foram feitas em solução contendo ácido acético: glicerol:metanol (1:5:30, v:v:v).

4.5 Digitalização de géis e membranas para análise de imagens

Foi utilizado o ImageScanner da GE Healthcare, modelo PowerLook 1120, na digitalização das imagens dos géis 2D. Os softwares usados no tratamento de imagens (melhoria do contraste, brilho e saturação) foram MagicScan V4.6 e Adobe Photoshop CS 2003. Para numeração dos *spots* presentes em cada gel foi utilizado o software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare)

4.6 Produção de antissoro contra apirases de *T. infestans*

As proteínas salivares de *T. infestans* foram separadas em géis unidimensionais de SDS-PAGE 10% e visualizadas por coloração com azul de Coomassie. As bandas correspondentes às apirases de massas moleculares 88, 82 e 79 kDa foram excisadas separadamente, maceradas, e solubilizadas em 200µL de TBS (solução salina tamponada por Tris). Antissoros policlonais contra essas proteínas foram produzidos pela imunização de coelhos utilizando 5µg de cada uma por injeção (inicialmente acompanhada por adjuvante de Freund completo, na segunda dosagem com adjuvante incompleto e na terceira sem o adjuvante). Os soros foram coletados, diluídos em solução aquosa de glicerol (1:1, v:v) e estocados a -20 °C. Antisoro cedido por Danielle Lacerda Pires (2006).

4.7 Eletrotransferência e imunodeteção

O gel 2D foi eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) em tampão contendo 48 mmol/L Tris base, 39 mmol/L Glicina, 0,037% SDS e 20% MeOH em pH 9,2 utilizando a Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) a 15 °C durante 5h, com voltagem e amperagem segundo as instruções do

fabricante. A membrana foi bloqueada em solução de TBS contendo 5% (m/v) de leite desnatado durante 1 h em temperatura ambiente. Logo depois, foi incubada em uma solução de TBS-leite 1% (m/v), contendo os soros anti-apirases (79 kDa, 82 kDa e 88 kDa) em diluição de 1:400, durante 2 h em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com TBS, a membrana foi incubada durante 1 h com o anticorpo secundário anti-IgG de cabra acoplado a fosfatase alcalina (1:5000), lavada mais 3 vezes com TBS, e equilibrada em tampão para fosfatase alcalina (100mmol/L NaCl, 100mmol/L Tris pH 9,5 e 5mmol/L MgCl₂). As proteínas foram reveladas por uma mistura de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP; 1,5% m/v em 100% N,N-dimetilformamina, BioRad) e nitroblue tetrazolium (NBT; 3% m/v em 70% N,N- dimetilformamina, Bio-Rad) como substrato em tampão para fosfatase alcalina (0,33% BCIP e 0,66% NBT - v/v).

4.8 Revelação de proteínas fosforiladas

O reagente Pro-Q Diamond (Invitrogen) foi utilizado na detecção de proteínas fosforiladas em géis 2DE de saliva, segundo as instruções do produto. Esse produto reage diretamente com os aminoácidos treonina, tirosina e serina que contenham o grupamento fosfato acoplado formando complexos fluorescentes com essas fosfoproteínas. Um *scanner* 9410 Typhoon PhosphorImager (Amersham Biosciences) foi utilizado na revelação de proteínas fosforiladas e digitalização de imagens dos géis corados com esse reagente fluorescente. Esse produto exibe sua máxima fluorescência (emissão de ondas de 580 nm) sob excitação de ondas de 555 nm. Sendo assim, a fonte de excitação e o filtro de emissão do *scanner* foram programados para trabalhar a 532 nm e 560 nm, respectivamente, valores próximos do ideal para produção de sinal máximo. Para análises posteriores dos *spots* revelados em relação à totalidade de proteínas das amostras, os géis foram corados com prata, como descrito acima. A utilização desse produto não gera interferentes para análises por espectrometria de massas.

4.9 Digestão em gel

Spots proteicos obtidos na separação por eletroforese 2D foram excisados dos géis e submetidos à digestão no gel (SHEVCHENKO, 1996; GHARAH DAGHI, 1999; ZHANG, 2008).

O protocolo utilizado foi desenvolvido pelo Protein Research Group (Southern Denmark University). Os *spots* foram lavados com 50 μL de água, em seguida com 90 μL de 100% ACN. Os *spots* secos foram então reduzidos em 40 μL de solução de 10 mmol/L DTT em 100mmol/L NH_4HCO_3 , a 56 °C por 30 min. Nos próximos 30 min foram alquilados com 40 μL de 10,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ iodacetamida em 100mmol/L NH_4HCO_3 no escuro. Logo após, foram lavados brevemente com 100 μL de solução aquosa de ACN a 50% (v/v), incubados por 15 min em ACN. Novamente secos, foram então reidratados com 20 μL de tampão 50 mmol/L NH_4HCO_3 contendo 7 ng/ μL de tripsina (Promega) por 20 min no gelo. O volume de solução que não foi absorvido foi substituído por tampão sem tripsina e os tubos permaneceram ao longo da noite a 37 °C. As amostras foram dessalinizadas e concentradas utilizando colunas cromatográficas de fase reversa de resina Poros R2, de comprimento aproximado de 0,5 cm. As lavagens foram feitas com de TFA a 0,1% (v/v) e para eluição do analito na placa de MALDI foram utilizados 3 μL de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ HCCA em solução aquosa de ACN a 70% (v/v) e TFA a 0,1% (v/v).

4.10 Derivatização com isotiocianato de 4-sulfofenila (SPITC) para análises de sequenciamento *de novo*

A derivatização com SPITC facilita a interpretação de sequências proteicas a partir de espectros de massa. Após o acoplamento dessa molécula à porção N-terminal do peptídeo, na fragmentação é favorecida a quebra da ligação peptídica e o sinal de íons da série b é suprimido, de maneira que os picos mostrados no espectro sejam apenas o da série y, tornando mais simples a busca por uma sequência de resíduos de aminoácidos.

As soluções de SPITC foram preparadas logo antes da utilização na concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em tampão NaHCO_3 a 50 mmol/L (pH 8.6). Foram adicionados 7,5 μL dessa solução ao digesto que foi mantido a 55 °C por 30 min. A parada da reação foi feita com a adição de 1 μL de solução aquosa de TFA a 5% (v/v). Dessalinização e concentração com colunas Poros R2 (como descrito acima) também se seguiram após esse procedimento para aplicação em placa de MALDI.

4.11 Espectrometria de massas

Os peptídeos tripsínicos obtidos foram analisados em espectrômetros de massas do tipo MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF (Reflex IV e Autoflex II da Bruker Daltonics, e AB4800 da Applied Biosystems). As identificações foram feitas utilizando três diferentes estratégias: PMF, MS/MS e sequenciamento *de novo*.

Por meio da ferramenta de busca MASCOT (PERKINS, 1999), as massas obtidas a partir da digestão dos *spots*, tanto por PMF como por MS/MS, foram confrontadas com as sequências de proteínas acessíveis no bancos de dados NCBI (The National Center for Biotechnology Information) não redundante. Parâmetros importantes utilizados nas buscas foram: propionamida ou carbamidometil como modificações fixas (em consequência da alquilação com acrilamida durante a 2DE e iodacetamida durante a digestão em gel); ocasional oxidação do aminoácido metionina como modificação variável; tolerância de até 0,5 Da ou 70 ppm² da massa teórica dos peptídeos; até um sítio de clivagem perdido durante a digestão enzimática; íons monoisotópicos e monocarregados positivamente; e classificação da taxonomia do organismo em questão dentro das categorias “metazoário” ou “outros metazoários”.

No sequenciamento *de novo*, os espectros gerados pela fragmentação de peptídeos tripsínicos (e ocasionalmente derivatizados com SPITC) foram analisados individual e manualmente buscando um padrão de fragmentação de maneira que as massas correspondessem a massas de aminoácidos individuais formando uma sequência. Após essa predição, buscas por similaridade foram feitas utilizando a ferramenta MS BLAST (SHEVCHENKO, 2001). Os parâmetros originais do site não foram alterados para as buscas.

² Apenas para buscas dos dados obtidos com AB4800, aparelho que gera resultados com maior precisão de massa.

5 Resultados

5.1 Análise proteômica das salivas do gênero *Rhodnius*

Os perfis de eletroforese bidimensional obtidos a partir das salivas de *R. brethesi* e *R. robustus* contendo a mesma quantidade de proteínas mostraram-se extensamente semelhantes (foram feitas diversas repetições para confirmação desses dados). Na distribuição, há uma concentração de *spots* mais intensos posicionados na faixa neutra do gel entre 20 e 30 kDa. Quanto ao número total médio de *spots* visualizados nos géis de cada saliva, 129 foram revelados em géis da primeira espécie e 135 da segunda. Apesar de haver exclusividade de alguns *spots* em cada um dos perfis, a maioria foi comum às duas espécies. A Figura 9 mostra as imagens desses mapas Tendo em vista a alta probabilidade de homologia entre as proteínas dessas espécies, foram priorizadas as análises da saliva de *R. brethesi*, espécie mais largamente descrita na sua biologia (ROCHA, 2004). Na Figura 10 estão mostrados os 56 *spots* aleatórios que foram analisados a partir de um perfil representativo da saliva de *R. brethesi* e os 36 *spots* identificados.

A identificação por espectrometria de massas de alguns *spots* proteicos foi feita utilizando o modo PMF (Tabela 2). Contudo, esse método apresenta limitações tornando-se, nesse caso, insuficiente, especialmente devido à ausência de dados de sequências disponíveis da espécie em questão. Sendo assim, para *spots* não identificados, optamos por fragmentar os peptídeos tripsínicos mais abundantes em cada espectro. Os fragmentos obtidos nos deram acesso a novas identificações, tanto por buscas baseadas na lista de massas peptídicas obtida (MS/MS) (Tabela 3) como por sequenciamento ‘de novo’ e busca por similaridade (Tabela 4). Os resultados obtidos foram significativos apenas para proteínas de alto grau de similaridade com sequências peptídicas de *R. prolixus*.

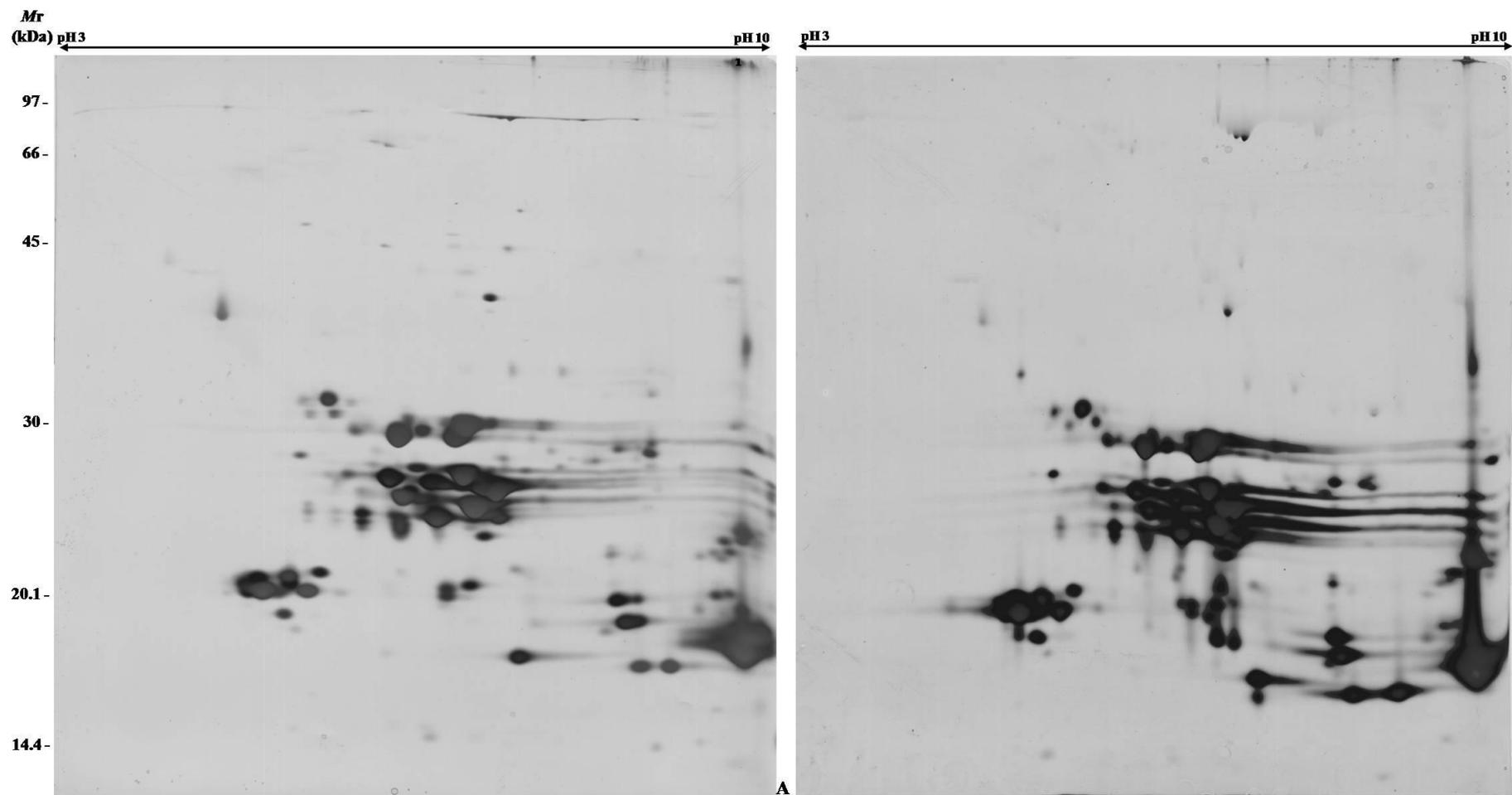


Figura 9. Mapas bidimensionais da região de *pI* 3-10 das salivas de triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Géis de *R. brethesi* (A) e *R. robustus* (B), contendo 80 μ g de proteína salivar (cada), foram submetidos a um SDS-PAGE 12% e corados com nitrato de prata. Mr = massa molecular relativa em kDa.

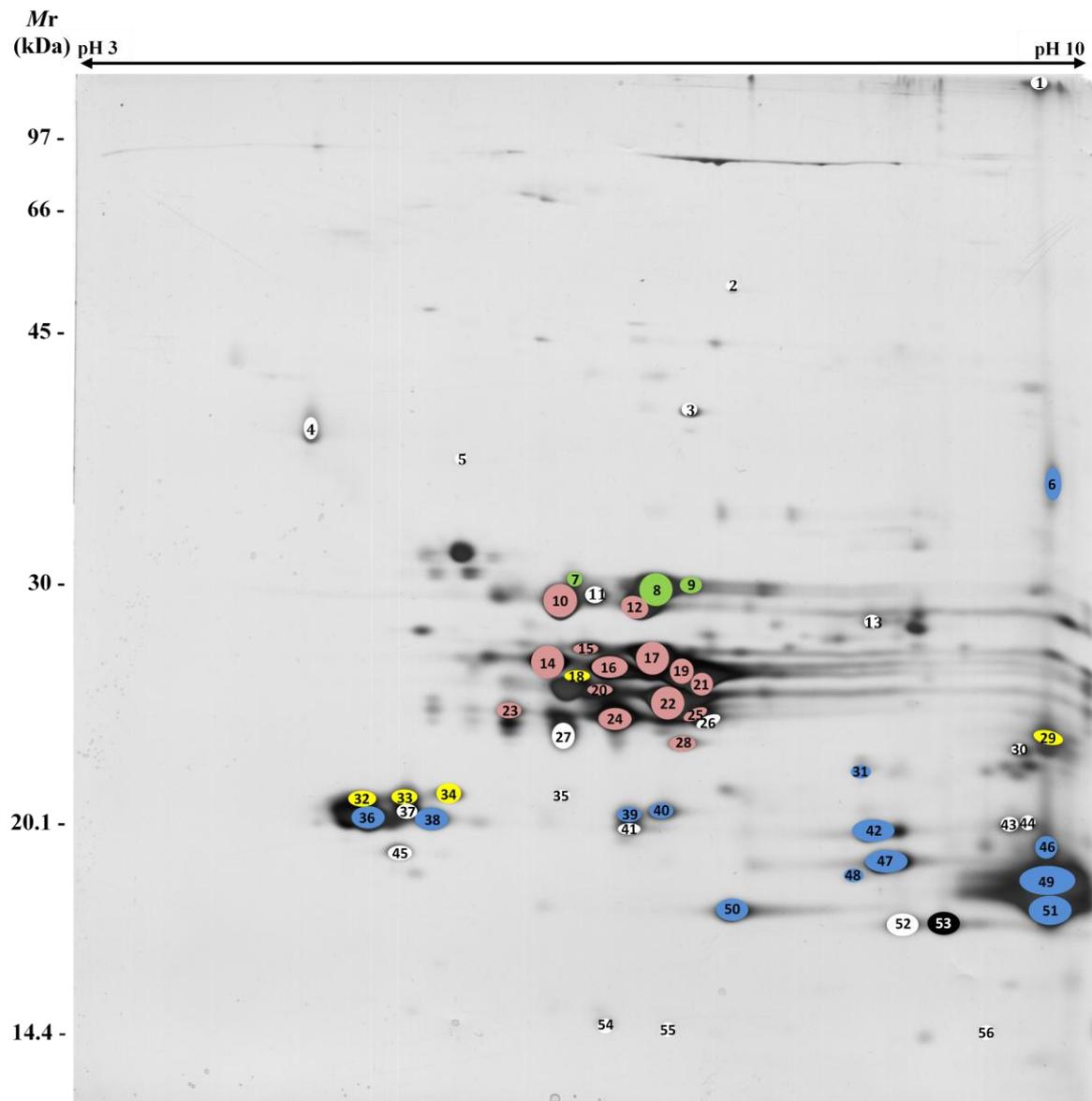


Figura 10. Mapa bidimensional da saliva de *R. brethesi* com 56 spots analisados. Gel contendo 80 μ g de proteína salivar confeccionado por IEF na faixa ampla pH 3-10 seguida de SDS-PAGE 12%, corado com prata. As cores mostradas têm as seguintes representações: ○ proteínas não identificadas, ● RPAIs, ● NPs, ● LPs homólogas a triabina, ● ABPs e ● MYS1. Mr = massa relativa em kDa. As identificações, com seus códigos de cores, estão detalhadas nas Tabela 2, 3 e 4.

Tabela 2. Identificação das proteínas da saliva de *R. brethesi* por peptide mass fingerprinting (PMF).

Número do Spot ^a	Identidade, <i>Rhodnius prolixus</i> ^b	Número de acesso (NCBI) ^c	Pontuação ^d	Cobertura (%) ^e	Massa experimental e teórica (kDa) ^f		pI experimental e teórico ^g	
8	ABP	gi 27968047	112 > 72	49	30	24,7	6,9	6,0
12	Precursor de NP 1A	gi 33518667	104 > 73	49	29	24,7	6,8	6,2
17	Complexo NP1 com Histamina	gi 3212578	84 > 73	30	27	20,7	6,9	6,4
22	Precursor de NP 4	gi 3219833	94 > 74	34	24	22,4	7,0	6,8
24	NP 2 (Prolixina-S)	gi 8569632	169 > 77	68	24	20,3	6,6	6,1
36	Precursor de AI-5	gi 33518673	75 > 74	34	20	20,8	4,7	6,0

● RPAIs, ● NPs e ● ABPs;

^a Números dos spots segundo as Figuras 5 e 6;

^b Resultados obtidos com buscas no banco de dados NCBI^{nr} utilizando a ferramenta MASCOT (Matrix Science);

^c Números de acesso a informações sobre as proteínas no banco de dados NCBI;

^d Do inglês 'score', resultado da análise com o algoritmo da ferramenta MASCOT que avalia a possibilidade do conjunto de peptídeos submetidos à busca serem os mesmos encontrados no banco de dados originados de uma digestão *in silico* de uma proteína conhecida. Os números apresentados após o símbolo de ">" representam a pontuação mínima necessária, segundo o algoritmo utilizado, para que a correspondência da proteína da busca com a proteína encontrada seja estatisticamente significativa (p<0,05);

^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativo ao tamanho total da proteína encontrada;

^f Massas moleculares, em kDa, encontradas nos géis 2D (experimental) e presentes na descrição da proteína no banco de dados (teórica) representadas respectivamente;

^g Pontos isoelétricos das proteínas encontradas nos géis 2D (experimental) e presentes na descrição da proteína no banco de dados (teórico) representados respectivamente.

Tabela 3. Identificação das proteínas da saliva de *R. brethesi* por fragmentação (MS/MS).

Número do Spot ^a	Identidade, <i>Rhodnius prolixus</i> ^b	Número de acesso (NCBI) ^c	Pontuação ^d	Cobertura (%) ^e	Massa experimental e teórica (kDa) ^f		pI experimental e teórico ^g		Peptídeos ^h
6	Precursor de AI-7	gi 33518711	257>39	38	35	17,3	9,7	9,0	1077.5 Da - GQWHLTHAK 1464.7 Da - AVSDFNFDKFFK 1931.9 Da - CGSHEGPTKDNLYLVGQR 2388.2 Da - FTSYVSVLATDYDNYVLVYR
7	ABP	gi 27968047	136>38	10	30	24,7	6,3	6,0	1194.6 Da - TYSYDISFAK 1336.7 Da - LSGLFDATTLGNK
9	ABP	gi 27968047	110 > 39	10	30	24,7	7,2	6,0	1523.8 Da - IKEVFSNYPNAK
14	NP 3	gi 3319210	49 > 40	6	26	22,1	6,2	6,1	1488.8 Da - DLGDLYTVLSHQK

15	Precursor de NP 1 Precursor de NP 4	gi 3219825 gi 3219833	285 > 39	12	27	23,0 22,7	6,4	6,8	1135.5 Da - EALYHYDPK 1248.6 Da - DLGDLYAVLNR 1376.7 Da - LKEALYHYDPK 1547.8 Da - GNKDLGDLYAVLNR
16	Precursor de NP 3	gi 3219827	$\frac{71 > 36}{42 > 35}$	$\frac{10}{6}$	27	22,1	9,8	6,1	2492.0 Da - DSYTLTVLEADDSSALVHICLR 1488.7 Da - DLGDLYTVLSHQK
18	Precursor de LP 4 homóloga de triabina	gi 33518683	110 > 38	14	26	18,9	6,4	9,4	1085.5 Da - SVVQYGYNR 1565.8 Da - TILETDGNSALLYR
19	Precursor de NP 3	gi 3219827	79 > 32	6	26	22,1	7,1	6,1	1488.9 Da - DLGDLYTVLSHQK
25	Precursor de NP 2 (Prolixina-S)	gi 3219826	546 > 38	32	24	22,6	7,2	5,8	1115.5 Da - TSFYNIGEGK 1502.7 Da - DLGDLYTVLTHQK 1734.9 Da - SAVTQAGLQLSQFVGTK 1903.9 Da - EGSKDLGDLYTVLTHQK 2491.2 Da - NSYTLTVLEADDSSALVHICLR
28	Precursor de NP 2 (Prolixina-S)	gi 3219826	126 > 39	8	23	22,6	7,1	5,8	1734.9 Da - SAVTQAGLQLSQFVGTK
33	Precursor de LP 2 homóloga de triabina	gi 33518679	57 > 37	5	21	19,9	5,2	5,9	1213.6 Da - SADDYFILNR
34	Precursor de LP 2 homóloga de triabina	gi 33518679	36 > 32	5	21	19,9	5,5	5,9	1213.8 Da - SADDYFILNR
38	Precursor de AI-5	gi 33518673	129 > 38	10	20	20,8	5,3	6,0	1056.5 Da - GNWQVTHSK 1107.6 Da - IGAMFPICGK 1123.6 Da - IGAMFPICGK
46	Precursor de AI-7	gi 33518711	51 > 37	$\frac{7}{31^*}$	19	17,2	9,7	9,0	1464.7 Da - AVSDFNFDKFFK *1492.7 Da - AVSDFNFDKFFK (+ 28 Da, K9) *1932.8 Da - GSHEGPTKDNLYLVGQR (+ 175 Da, G N- term) *2392.1 Da - FTSYVSVLATDYDNYVLVYR (+ 2 Da, S3 e S6)
47	RPAI-2	gi 1572727	87 > 39	8	19	19,4	8,6	8,2	1717.7 Da - YGSSAVEDNFLVFNR
48	RPAI-2	gi 1572727	82 > 38	8	18	19,4	8,3	8,2	1717.8 Da - YGSSAVEDNFLVFNR
49	Precursor de AI-7	gi 33518711	67 = 67	7	18	16,8	9,7	9,0	1491.6 Da - ATDYDNYVLVYR
50	Precursor de AI-4	gi 33518671	243 > 34	17	17	18,7	7,5	6,7	1038.5 Da - DNFLLFNR 1272.7 Da - LNQLELTSLNK

1529.7 Da - FFTGDWYLTHSR									
51	Precursor de AI-7	gi 33518711	53 > 48	13	17	16,8	9,7	9,0	2388.0 Da - FTSYVSVLATDYDNYVLVYR
53	Precursor de MYS1	gi 33518705	61 > 50	10	17	16,4	9,0	8,5	1924.7 Da - LDEEIDNCEDGPGYR

● RPAIs, ● NPs, ● LPs homólogas à triabina, ● ABPs e ● MYS1;

^a Números dos *spots* segundo as Figuras 5 e 6;

^b Resultados obtidos com buscas no banco de dados NCBI^{nr} utilizando a ferramenta MASCOT (Matrix Science);

^c Números de acesso a informações sobre as proteínas no banco de dados NCBI;

^d Do inglês ‘score’, resultado da análise com o algoritmo da ferramenta MASCOT que avalia a possibilidade do conjunto de peptídeos submetidos à busca serem os mesmos encontrados no banco de dados originados de uma digestão *in silico* de uma proteína conhecida. Os números apresentados após o símbolo de “>” representam a pontuação mínima necessária, segundo o algoritmo utilizado, para que a correspondência da proteína da busca com a proteína encontrada seja estatisticamente significativa ($p < 0,05$);

^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativo ao tamanho total da proteína encontrada;

^f Massas moleculares, em kDa, encontradas nos géis 2D (experimental) e presentes na descrição da proteína no banco de dados (teórica) representadas respectivamente;

^g Pontos isoeletricos das proteínas encontradas nos géis 2D (experimental) e presentes na descrição da proteína no banco de dados (teórico) representados respectivamente;

^h De acordo com as massas peptídicas obtidas experimentalmente e os parâmetros escolhidos, a ferramenta de busca mostra possíveis peptídeos correspondentes a essas massa que sejam originados da proteína encontrada.

* Busca tolerante a erro. Nesse tipo de busca, peptídeos que não haviam sido validados na identificação inicial são reavaliados considerando parâmetros mais amplos. Todas as possíveis modificações são testadas e substituições de aminoácidos (conservativas ou não) também são avaliadas.

Tabela 4. Identificação das proteínas da saliva de *R. brethesi* por sequenciamento *de novo* e MSBLAST.

Número do <i>Spot</i> ^a	Identidade, <i>Rhodnius prolixus</i> ^b	Número de acesso (NCBI) ^c	Pontuação Total ^d	Caracteres similares/ submetidos ^e	Peptídeos ^f	
					Similares ^g	Não similares ^h
10	Precursor de NP 1A	gi 74841091	197	31/55	1472 Da - VSGFEGNDGQYSGR 1600 Da - NVLVNQDGTKLDER 1823 Da - S...(1426)LSGLFDATLSSSK	1335 Da - LLAQQFSEYTR
20	Precursor de NP 1	gi 3219825	146	21/36	1533 Da - GNNDLGDLYAVLNR 944 Da - FSDFLSTK	1543 Da - TPHVWNLFNFR
21	Precursor de NP 1	gi 3219825	148	19/19	1258Da - DLGDLYAVLNR 954 Da - FSDFLSTK	
23	AI-6	gi 74841087	68	10/13	1559 Da - SQDHEDNVFLLSR	
29	Precursor de LP 1 homóloga de triabina	gi 74841086	153	21/25	1427 Da - FFSGTWFVTHAK 1832 Da - S...QAELQSENLNTR	
31	AI-6	gi 74841087	69	10/11	1460 Da - S...HEENVFVLSR	

32	Precursor de LP 2 homóloga de triabina	gi 74841085	163	24/29	1583 Da - FTVASADNNAAVLYK 1635 Da - SATFSTDDYFVLNR	
39	RPAI-2	gi 74844443	204	28/66	1826 Da - ANQFFTGDWYLTHAR 2219 Da - SSVAYGTSTTPEDNLLFNR 1332 Da - LSQLDLNTSWR	2347 Da - SSFVGTSTTPEDNLLFNQR
40	Precursor de AI-4	gi 74841089	120	17/52	798 Da - YALLYR 2216 Da - SSAVYGQSTTPLDNFLVFNRR	1433 Da - YQVSPDLHD...R 1826 Da - AMTSTTLPDNFLVFNRR
42	Precursor de AI-4	gi 74841089	140	20/34	1026 Da - LFSGFDANR 1987 Da - SSGLYGSALQDNFLVFNRR	897 Da - HPTLHHR

● RPAIs, ● NPs e ● LPs homólogas à triabina;

^a Números dos *spots* segundo as Figuras 5 e 6;

^b Resultados obtidos com buscas no banco de dados nrdb95 utilizando a ferramenta MS BLAST (SHEVCHENKO, 2001);

^c Números de acesso a informações sobre as proteínas no banco de dados NCBI;

^d Do inglês 'score', a pontuação mostrada é resultado da análise do algoritmo que avalia a similaridade entre a sequência submetida e aquelas presentes no banco de dados;

^e Mostra a relação entre o número de caracteres das sequências obtidas similares às sequências encontradas no banco de dados e o número total de caracteres submetidos na busca;

^f Sequências peptídicas submetidas nas buscas;

^g Peptídeos sequenciados que se mostraram inteira ou parcialmente similares a sequências proteicas encontradas. Os caracteres em vermelho representam os aminoácidos similares, e os em preto não-similares;

^h Peptídeos sequenciados que se mostraram totalmente não-similares a sequências proteicas encontradas.

Foram escolhidos 7 *spots* da saliva de *R. robustus* (Figura 11) que se mostraram expressos exclusivamente nessa espécie. Destes, 3 foram identificados como semelhantes a proteínas salivares de *R. prolixus* (Tabela 5). Sendo assim, no panorama geral, é possível que o perfil proteico salivar de *R. robustus* siga um padrão de identidade similar ao de *R. brethesi*, ou seja, também semelhante ao perfil proteico salivar de *R. prolixus*.

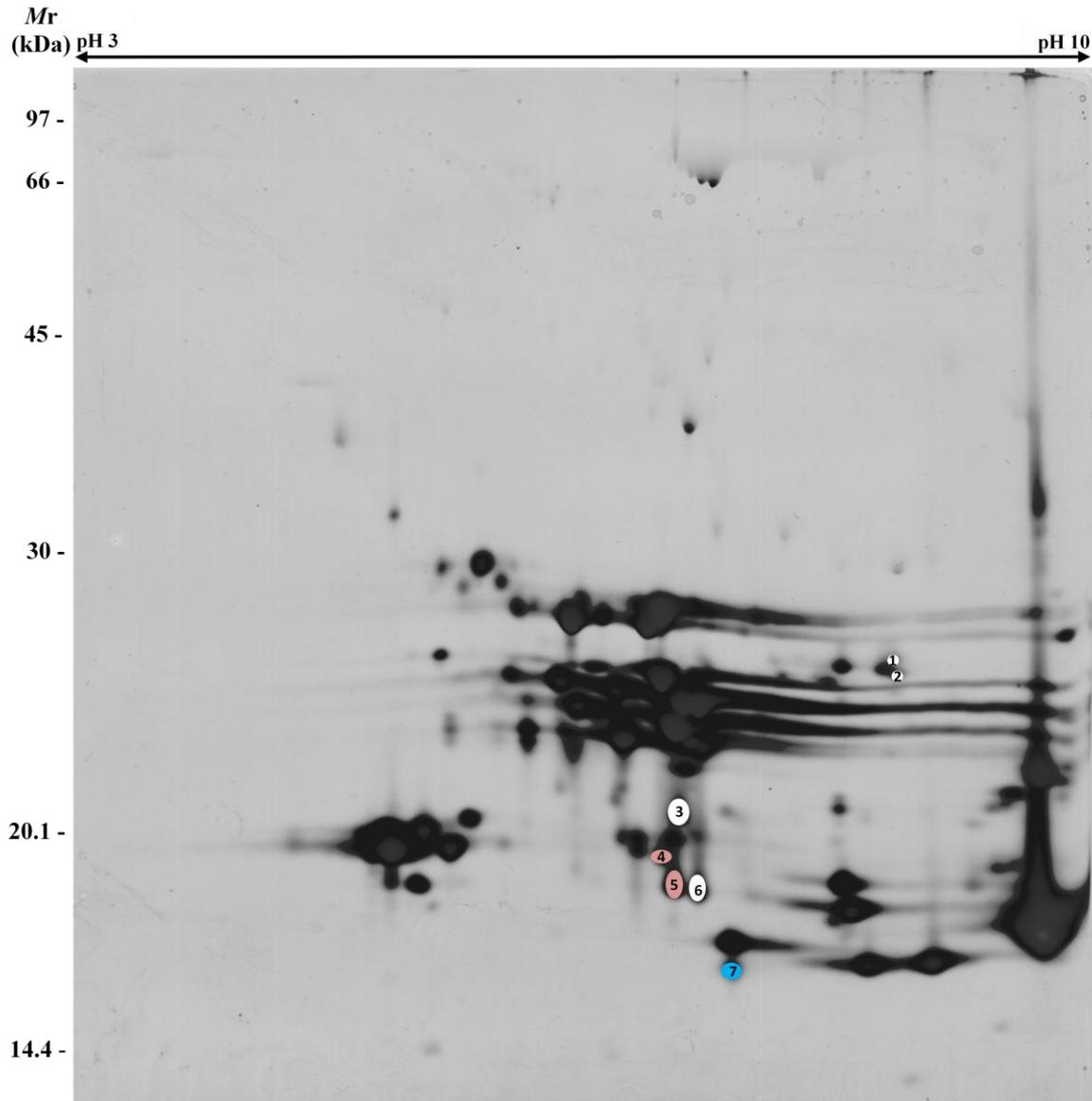


Figura 11. Gel 2D de *R. robustus* com os 7 spots analisados. Gel contendo 80 µg de proteína salivar, confeccionado por IEF na faixa ampla pH 3-10 seguido de SDS-PAGE 12%, corado com nitrato de prata. As cores mostradas são representações de: ○ proteínas não identificadas, ● RPAIs e ● NPs. As identificações estão detalhadas na Tabela 5. Mr = massa relativa em kDa.

Tabela 5. Identificação das proteínas da saliva de *R. robustus* por espectrometria de massas (MS/MS).

Número do Spot ^a	Identidade, <i>Rhodnius prolixus</i> ^b	Número de acesso (NCBI) ^c	Pontuação ^d	Cobertura (%) ^e	Massa experimental e teórica (kDa) ^f	pI experimental e teórico ^g	Peptídeos ^h	
4	Precursor de NP1	gi 3219825	107 > 35	9	19	23,0	7,0 6,8	1135.5 Da - EALYHYDPK
	Precursor de NP4	gi 3219833			22,7	1248.6 Da - DLGDLYAVLNR		
5	Complexo de mutante L133v* de NP4 com NO	gi 114793424	187 > 39	23	18	20,4	7,1 6,3	1376.7 Da - LKEALYHYDPK 1533.7 Da - GNKDLGDVYAVLNR 2059.0 Da - TQDTFYDVSELQVESLGK
7	Precursor de AI-4	gi 33518671	240 > 36	18	16	18,7	7,5 6,7	1010.5 Da - IMSGFDANR 1272.7 Da - LNQLELTSLNK 1529.7 Da - FFTGDWYLTHSR

● RPAIs e ● NPs;

^a Número dos spots segundo as Figuras 7 e 8;

^b Resultados obtidos com buscas no banco de dados NCBI^{nr} utilizando a ferramenta MASCOT (Matrix Science);

^c Números de acesso a informações sobre as proteínas encontradas no banco de dados NCBI;

^d Resultado da análise com o algoritmo da ferramenta MASCOT que avalia a possibilidade do conjunto de peptídeos submetidos à busca serem os mesmos encontrados no banco de dados originados de uma digestão *in silico* de uma proteína conhecida. Os números apresentados após o símbolo de ">" representam a pontuação mínima necessária, segundo o algoritmo utilizado, para que a correspondência da proteína da busca com a proteína encontrada seja estatisticamente significativa ($p < 0,05$);

^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativo ao tamanho total da proteína encontrada;

^f Massas, em kDa, encontradas nos géis 2D (experimental) e presentes na descrição da proteína no banco de dados (teórica) representadas respectivamente;

^g Pontos isoelétricos das proteínas encontradas nos géis 2D (experimental) e presentes na descrição da proteína no banco de dados (teórico) representados respectivamente;

^h De acordo com as massas peptídicas obtidas experimentalmente e os parâmetros escolhidos, a ferramenta de busca mostra possíveis peptídeos correspondentes a essas massas que sejam originados da proteína encontrada.

* Mutante de NP4 com o resíduo do aminoácido leucina (L) na posição 133 da cadeia primária substituído por uma valina (V).

Foi possível até o momento identificar de 61% de todos os *spots* protéicos analisados nas duas salivas do gênero *Rhodnius*. Contudo, obtivemos dados que não resultaram em pontuações significativas na comparação com proteínas disponíveis nos bancos de dados. Um exemplo disso está mostrado na Figura 12. Apesar de duas sequências terem sido determinadas *de novo* e submetidas a buscas via BLAST, nada significativo foi encontrado.

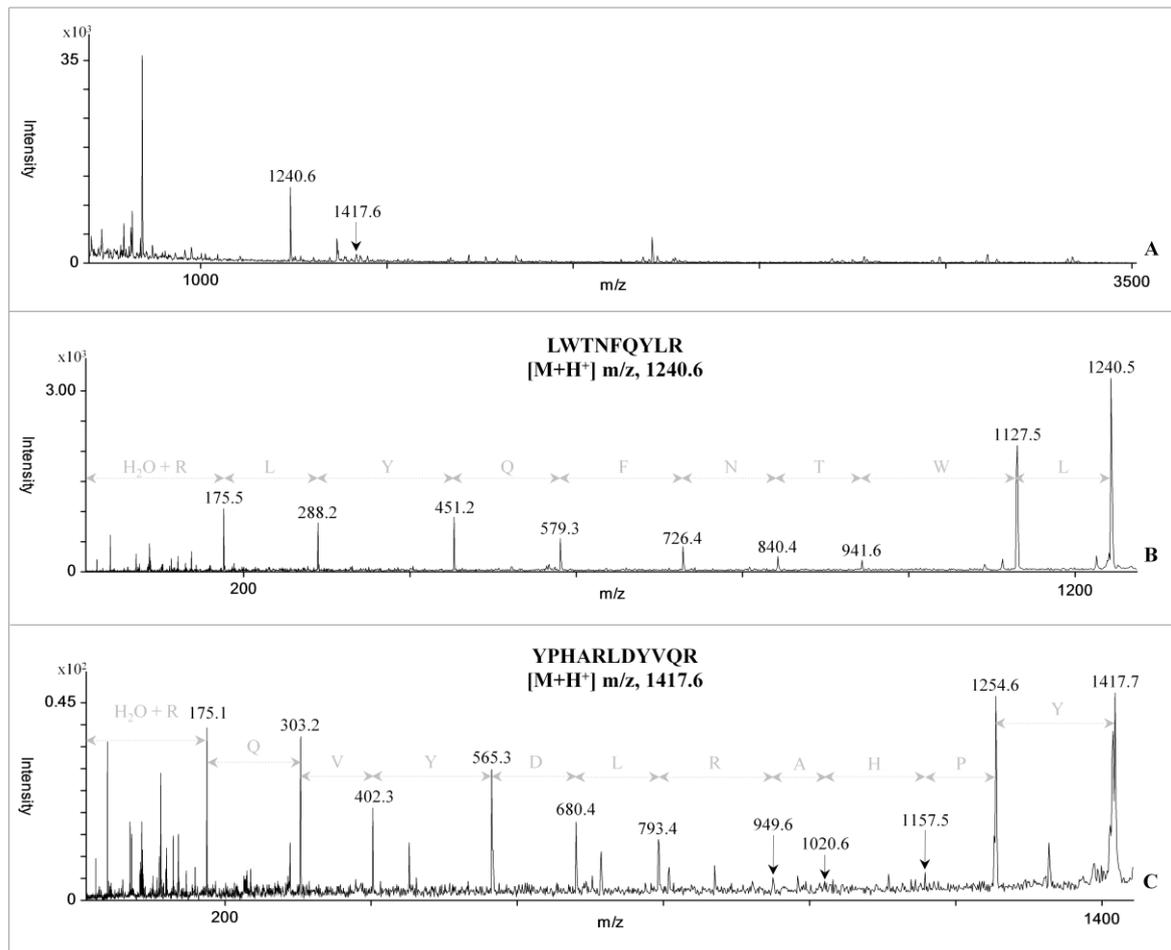


Figura 12. Espectros de massa obtidos a partir do processamento do *spot 2* do mapa proteômico salivar de *R. robustus*, representado na Figura 8. Espectro de PMF (A), espectro de fragmentação do peptídeo de m/z 1240.6 derivatizado com SPITC e sequência obtida pela série y (B) e espectro de fragmentação do peptídeo de m/z 1417.6 derivatizado com SPITC e sequência obtida pela série y (C). Obtidos em um MALDI-TOF/TOF, AB4800 (Applied Biosystems).

Tendo em vista a não identificação de 39% das amostras analisadas, apesar da disponibilidade de dados de sequências transcriptômicas da saliva de *R. prolixus*, e a obtenção de identificações proteicas redundantes revelando a presença de uma mesma proteína em diferentes *spots* nos géis (proteínas RPAI2 nos spots 40, 48 e 49, por exemplo), uma análise para verificação de possíveis modificações pós-traducionais foi iniciada, uma vez que estas

poderiam ser fonte de insucesso nas identificações por espectrometria de massas (já que aumentariam a massa de peptídeos onde estivessem presentes e, numa comparação com uma proteína semelhante porém não fosforilada do banco de dados, os valores de massa seriam muito divergentes, a pontuação da comparação cairia para um valor não significativo e o *spot* permaneceria não-identificado). Foi feita uma detecção direta nos géis 2D de proteínas fosforiladas, que mostrou, para ambas espécies, um número considerável de *spots* contendo prováveis sítios de fosforilação (Figuras 13 e 14).

Foram revelados 43 e 31 *spots* nos géis 2D de *R. brethesi* e *R. robustus*, respectivamente, distribuídos por todo o gel. Das proteínas fosforiladas de *R. brethesi*, 26 estão entre as proteínas que foram analisadas, cujas 22 foram identificadas. São estas correspondentes aos *spots* 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 42, 47, 49, 50, 51, 52 e 53, dos quais apenas os sublinhados não tiveram suas identidades encontradas. Destes 26, apenas 9 (15, 19, 20, 33, 42, 47, 49, 52 e 53) são fosforilados somente na saliva de *R. brethesi*, sendo todos os outros 17 igualmente fosforilados em *R. robustus*. Um *spot* de 18 kDa e pI 4,5 parece ter fosforilação exclusiva em *R. robustus*. Alguns artefatos na coloração com Pro-Q Diamond foram desconsiderados pela comparação com a coloração com nitrato de prata.

Um conjunto de isoformas na parte superior e central dos géis de ambas espécies (100 kDa e pI 7, aproximadamente) aparenta estar completamente fosforilado na saliva de *R. brethesi*, enquanto na de *R. robustus*, apenas as 3 isoformas mais ácidas foram relevadas como fosforiladas. Em *R. brethesi* outros 2 *spots* (21 kDa e pI 5; 22 kDa e pI 6.5) parecem ter fosforilação exclusiva em relação a *R. robustus*, onde não foi encontrado um *spot* de aparente fosforilação exclusiva (17 kDa e pI 4,5).

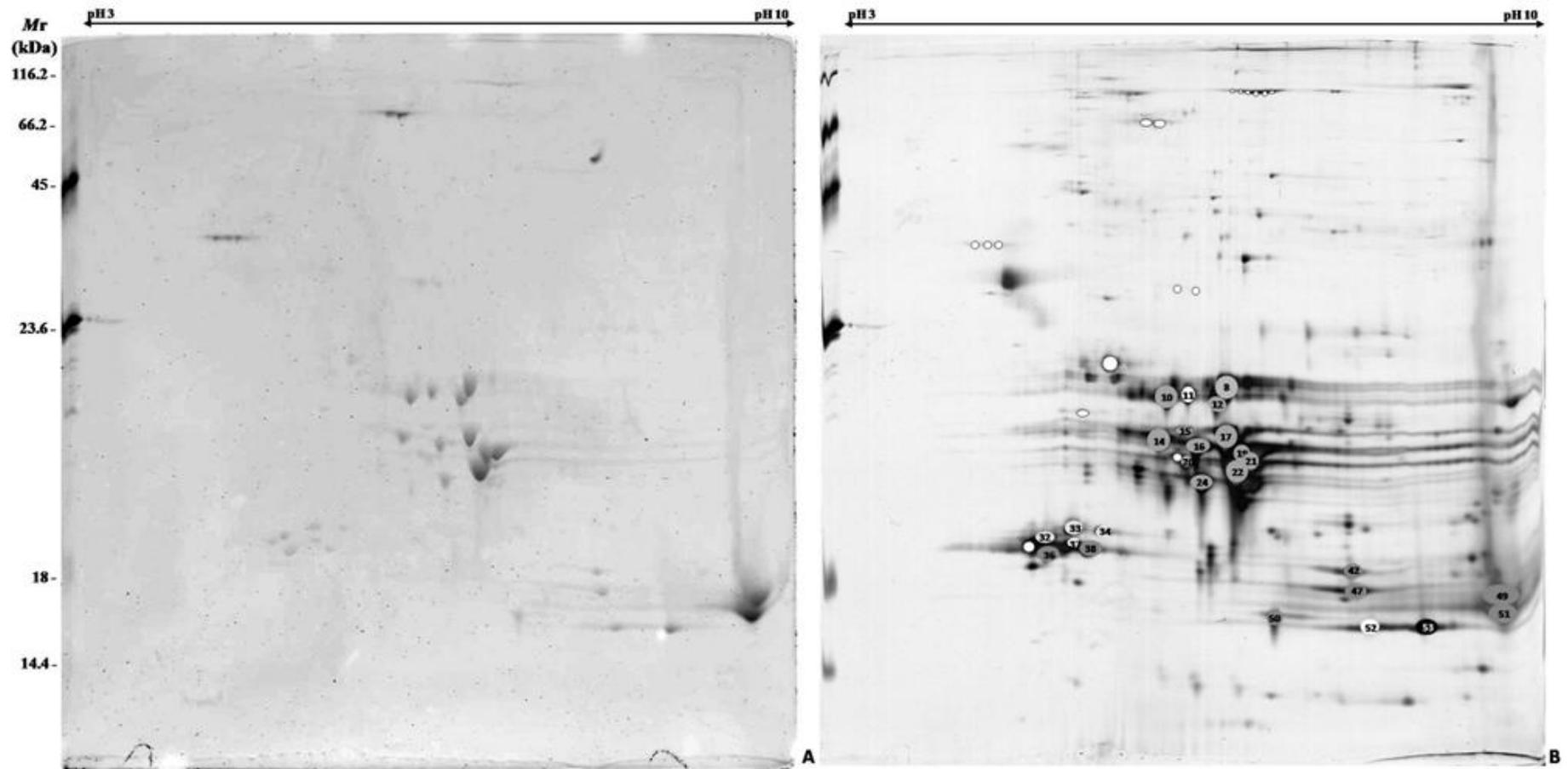


Figura 13. Detecção de proteínas fosforiladas salivares de *R. brethesi*. O gel tratado com Pro-Q Diamond (A) foi posteriormente corados com prata (B) para análises de imagem subsequentes. Estão marcados em (B) os spots encontrados em (A). M_r = massa molecular relativa em kDa.

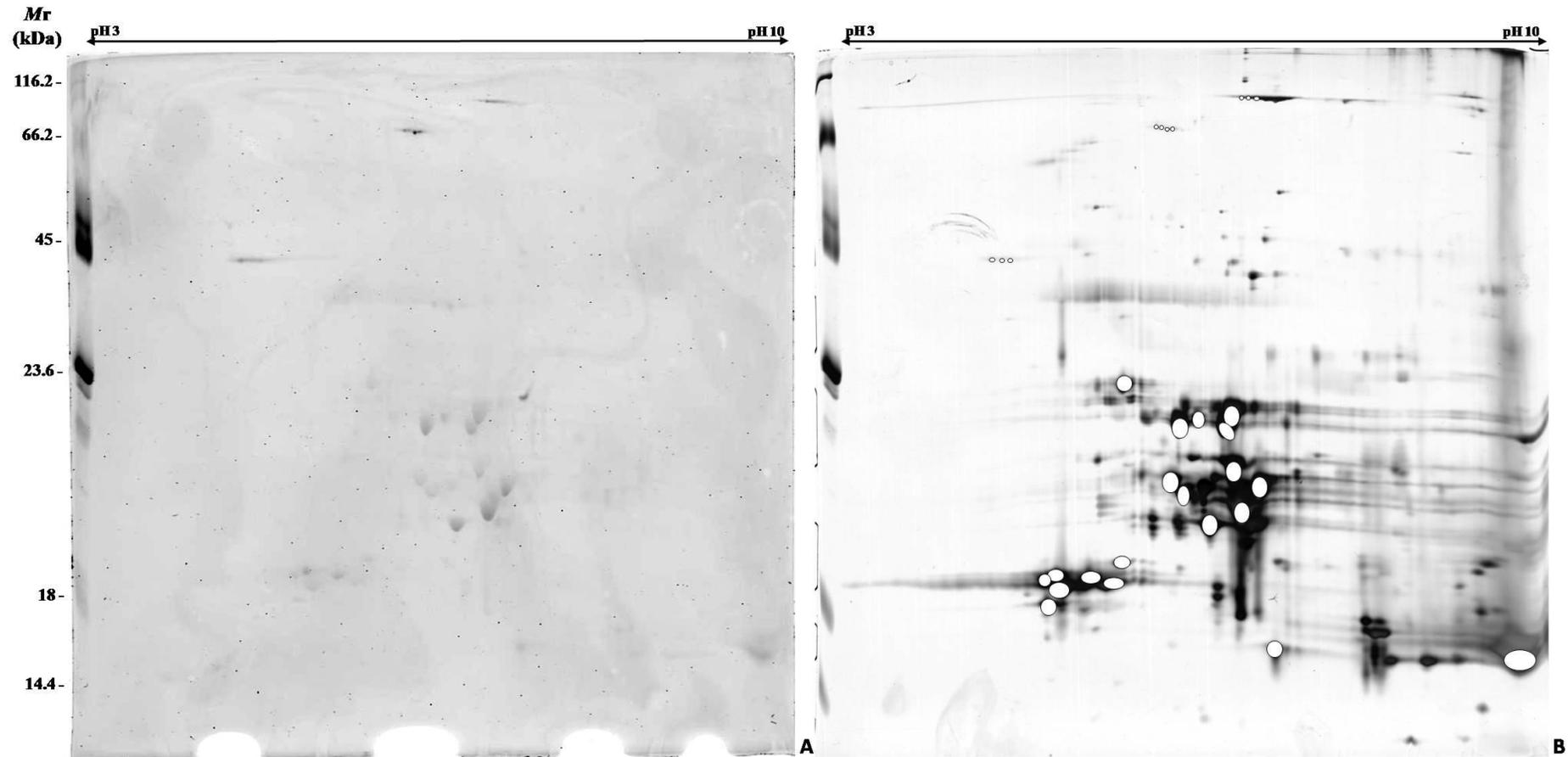


Figura 14. Detecção de proteínas fosforiladas salivares de *R. robustus*. O gel contendo 80 μ g de proteínas salivares foi tratado com Pro-Q Diamond (A) e, posteriormente, corados com nitrato de prata (B) para análises de imagem subsequentes. Estão marcados em (B) os *spots* revelados como proteínas fosforiladas em (A). Mr = massa molecular relativa em kDa.

5.2 Análise proteômica da saliva de *Panstrongylus megistus*

Analizamos também a saliva de *P. megistus* por meio de géis 2D em faixa ampla de pH, 3-10. Preservamos as condições analíticas otimizadas para as salivas de *Rhodnius* e obtivemos um perfil com boa definição (Figura 15). Um total de 320 *spots* pode ser visualizados nesse gel, muitos deles posicionados na região básica.

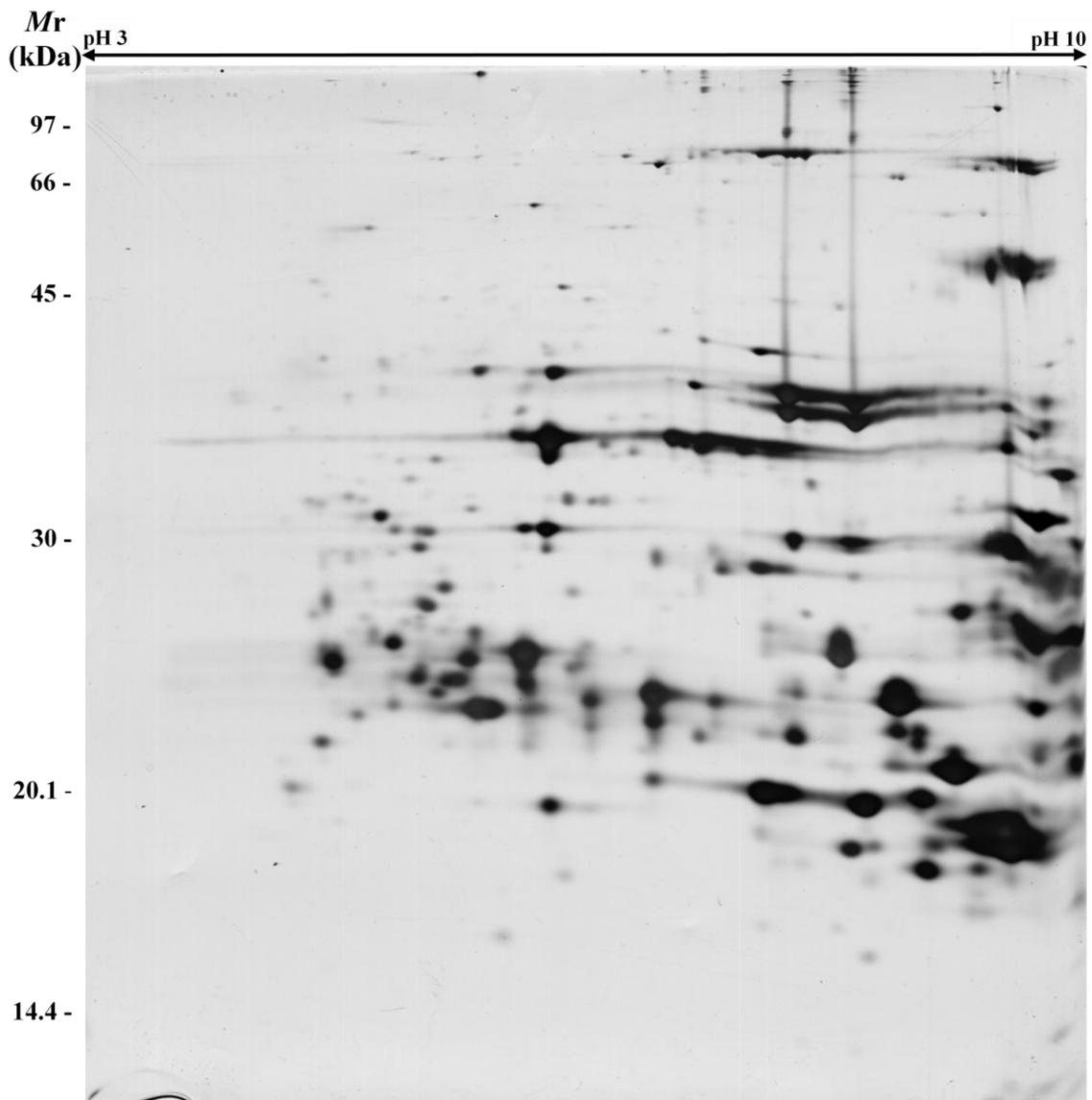


Figura 15. Perfil 2DE de faixa ampla da saliva extraída de *P. megistus*. 2DE foi realizada com IPG *strips* linear de pI 3-10, de 18 cm para a IEF, e seguido de SDS-PAGE 12% e corado com prata. 80 μ g de proteínas foram aplicados. Mr = massa molecular relativa em kDa.

Tendo em vista um certo grau de semelhança na região de proteínas básicas entre esse perfil e o da saliva de *T. infestans* (Figura 16), que apresentou isoformas de apirases

(CHARNEAU, 2007), foi investigada a presença dessas proteínas na saliva de *P. megistus* por imunodeteccção com uma mistura de anticorpos anti-apirases de *T. Infestans* a partir de um gel 2D da saliva do *P. megistus*. Foram revelados *spots* com massas moleculares e *pI* semelhantes aos das apirases de *T. infestans* – massas moleculares próximas de 90 kDa e *pI* entre 7 e 9 (Figura 17).

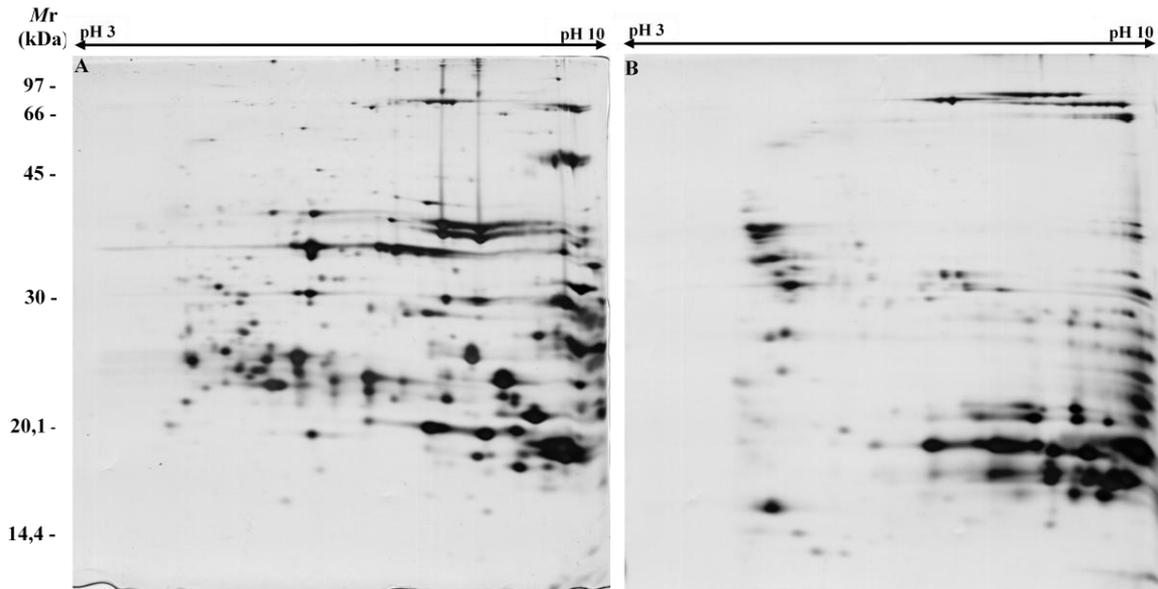


Figura 16. Comparação entre perfis 2D das salivas de *P. megistus* (A) e *T. infestans* (B). Tiras de gel de pH 3-10 e de 18 cm para a IEF seguida de SDS-PAGE 12% e coloração com . 80 µg de proteínas foram aplicados em cada gel. Escala de massa molecular relativa (*Mr*) em kDa representada é válida para ambos os gel. A imagem (B) foi adaptada do trabalho de Charneau e colaboradores (CHARNEAU, 2007).

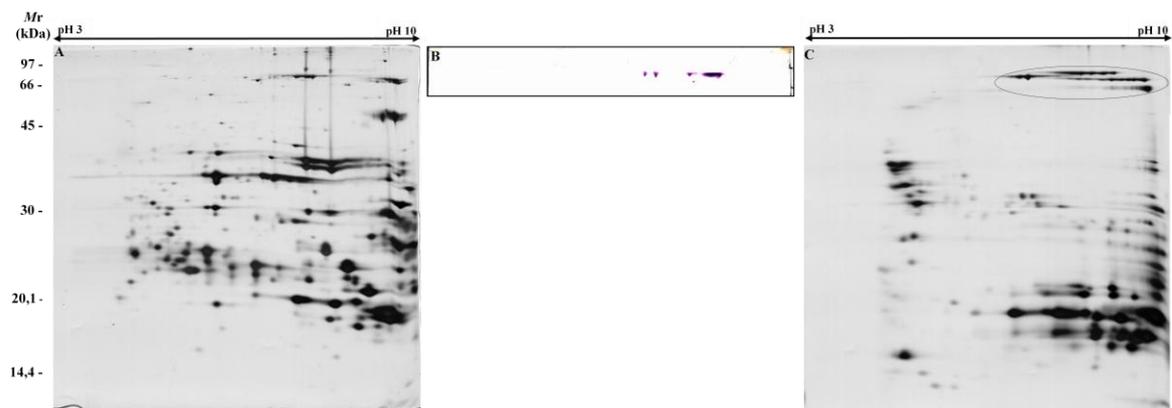


Figura 17. Potenciais apirases de *P. megistus* em mapa 2D, reveladas por imunodeteccção utilizando os soros anti-apirases de *T. infestans*. Géis 2D de saliva de *P. megistus* (A) e *T. infestans* (C) - tiras de gel de 18 cm, 80 µg de proteína por gel, SDS-PAGE 12% - corados com prata, membrana de nitrocelulose resultante da imunodeteccção com anti-apirases de *T. infestans* (B). Para essa análise os três anti-soro (anti-79 kDa, anti-82 kDa e anti-88 kDa) foram utilizados em conjunto. Escala de massa molecular relativa (*Mr*) em kDa é válida para os géis e a membrana. A imagem (C) foi adaptada do trabalho de Charneau e colaboradores (CHARNEAU, 2007).

As tentativas de obter mais informações sobre as proteínas imunodetectadas por degradação de Edman e por espectrometria de massas não foram bem sucedidas devido à insuficiência de material. Sendo restrita a probabilidade de adquirir mais amostras, não foi possível acumular material para novas análises. Apesar disso, outros indícios da presença de apirases nessa saliva já foram encontrados (MARANHÃO, 2008).

6 Discussão

Para explorar a bioatividade de moléculas presentes em cada uma das três salivas de triatomíneos separamos seu conteúdo proteico por eletroforese bidimensional, o que nos proporcionou visualizar mapas proteômicos ricos e complexos em todas as salivas analisadas, resultado que não seria possível utilizando apenas ferramentas cromatográficas líquidas, muito comumente utilizadas em estudos transcriptômicos. A partir desses perfis foi possível comparar a distribuição de *spots* de cada gel e perceber claramente padrões 2D quase idênticos nas duas espécies do gênero *Rhodnius*. O fato de serem do mesmo gênero infere certas semelhanças entre elas, como de fato ocorre. O princípio da parcimônia, em estudos filogenéticos, corrobora isso sugerindo que a topologia correta da árvore filogenética é aquela com o menor número de passos, de maneira que, durante o surgimento das espécies a partir de seu ancestral, é mais provável que um menor número de eventos evolutivos tenha ocorrido na geração e não um grande número de mudanças. Ou seja, é de se esperar que um organismo seja biologicamente muito semelhante a seu ancestral e a organismos gerados a partir de um mesmo ancestral.

Algo semelhante foi também visto com *T. infestans* e *P. megistus*. Mesmo pertencentes a clados filogenéticos menos próximos (MARCILLA, 2002) – contudo ainda dentro da tribo Triatominae –, há certa semelhança entre seus perfis eletroforéticos salivares. Outro ponto que pode ter influência na semelhança entre perfis é o fato desses animais serem encontrados mais comumente nos mesmos biomas e conseqüentemente estarem expostos às mesmas pressões seletivas, como habitat, presas e fatores abióticos, influenciando a expressão de proteínas salivares.

A composição salivar de artrópodes hematófagos é direcionada para contrapor eventos da homeostasia de vertebrados predados, permitindo um repasto bem sucedido. Confirmamos essa afirmativa para a saliva de *R. brethesi* utilizando espectrometria de massas, e da saliva de *P. megistus* por imunodeteção. Os resultados obtidos demonstram uma predominância de proteínas da família das lipocalinas na primeira espécie, e confirmaram a presença de apirases na segunda.

Lipocalinas similares às de *R. prolixus* (ANDERSEN, 2005) estão presentes na saliva de *R. brethesi*. Identificamos RPAIs (ou AIs), NPs, ABPs, LPs homólogas de triabina e um precursor da proteína MYS1, todas mostradas na descrição do sialoma (conjunto do

transcriptoma e proteoma das glândulas salivares) de *R. prolixus* (RIBEIRO, 2004). Com excessão da MYS1 que não tem sua função descrita, prevê que a atividade de todas as outras proteínas encontradas (que tiveram pelo menos uma representante de sua classe com função descrita) esteja relacionada ao transporte de determinadas moléculas e/ou desarticulação de uma via por associação direta e/ou desativação de certas moléculas, processos esses relacionados à contraposição da homeostasia da presa.

A presença de tantas moléculas visando a desarticulação das vias hemostáticas pode ser uma forma evolutivamente desenvolvida para proteger o animal de possíveis mutações em genes que expressam proteínas salivares importantes. Possuindo uma variedade de moléculas ativas que atuem em pontos diferentes das vias de coagulação sanguínea, agregação plaquetária, vasoconstrição e até vias inflamatórias, o triatomíneo garante que a possível perda de uma ou outra proteína não interfira drasticamente em sua alimentação e, conseqüentemente, em sua sobrevivência.

Em diferentes *spots* por vezes foram encontradas as mesmas proteínas. Alguns exemplos disso são os *spots* identificados como RPAI 2 (40, 48 e 49), NP 2 (25, 26 e 29), LP 2 homóloga de triabina (33, 34 e 35) e ABP (7, 8 e 9). Uma hipótese que pode explicar esse resultado é classificação dessas proteínas como isoformas, tendo em vista que há diferença entre *pI* e massa experimentais e teóricos. Isso pode ser originado pela duplicação gênica e modificação genética posterior desses genes, ou seja, pode ter ocorrido mutação, deleção ou entrecortamento nos genes duplicados. Além disso, a modificação do produto desses genes (duplicados ou não) também pode explicar essas variações, seja por *splicing* alternativo ou adição de modificações pós-traducionais. Essas alterações poderiam causar uma alta expressão de proteínas muito semelhantes no proteoma em questão contudo claramente distinguíveis num perfil 2D e, possivelmente, de funções complementares ou redundantes porém relevantes em um contexto fisiológico e evolutivo.

O caso do *spot* 15, que resultou na identificação de duas proteínas (NP 1 e 4) simultaneamente, pode ser justificado devido à extensa semelhança sequencial e funcional entre as proteínas dessa categoria (RIBEIRO, 2004; ANDERSEN, 2005). Os peptídeos detectados por espectrometria de massas nessa amostra não foram representantes de porções que permitissem a diferenciação entre as duas proteínas encontradas, de maneira que a pontuação dada pelo algoritmo para a validação dos dois resultados é a mesma.

Os resultados obtidos por espectrometria de massas da saliva de *R. robustus* foram semelhantes aos de *R. brethesi*, mostrando que ambas espécies expressam conteúdo salivar

semelhante ao de *R. prolixus*. O caso do *spot* 4 é o mesmo do #15 de *R. brethesi*, justificado no parágrafo anterior. O *spot* 5 mostra-se mais semelhante a uma variante mutante artificialmente produzida que às formas naturais da NP 4, já que essas últimas sequer aparecem na lista de identificações resultante da busca no banco de dados. Como anteriormente sugerido e agora confirmado, as espécies são de fato semelhantes, mas se diferenciam, no aspecto proteico salivar, por leves distinções entre proteínas que têm uma composição geral comum.

Apesar da obtenção de identificações e perspectivas para futuras análises, a complexidade das salivas foram evidenciadas. Dos 56 *spots* de *R. brethesi* e 7 *spots* de *R. robustus* analisados, 20 e 4, respectivamente, não trouxeram resultados significativos, mesmo havendo disponibilidade de informações no banco de dados relacionadas à saliva de uma espécie do mesmo gênero. Em casos de *spots* muito fracos e pequenos isso pode ser devido à falta de material para gerar dados suficientes para análise. Outros, contudo, apesar de o volume de material ser considerável, não geraram peptídeos significativamente similares àqueles encontrados nos bancos de dados. Sendo assim, apesar de toda semelhança evidenciada entre essas salivas, é provável que haja expressão de proteínas exclusivas em cada secreção, possivelmente em consequência de se tratarem de espécies que habitam diferentes biomas.

Quanto ao conjunto de proteínas fosforiladas de cada saliva, encontramos certa diversidade de *spots* revelados nos géis de *Rhodnius* que, em geral, são correspondentes nas duas salivas. Com base nas identificações obtidas até o momento (Tabelas 2 e 3), todos os grupos funcionais encontrados até então nessas salivas (RPAI, NP, LP homóloga de triabina e ABP) tiveram *spots* representantes no perfil de fosforilação encontrado. As sequências das proteínas encontradas nas buscas são ricas em resíduos de serina, tirosina e treonina, típicos aceptores de fosforilação em eucariotos (HANKS, 1991). Apesar de não confirmar os sítios de fosforilação, mostra a possibilidade real da ocorrência dessa modificação.

Por tratar-se de um método de coloração de grupamentos fosfato também quantitativo, e baseado no controle positivo da reação no marcador molecular, podemos sugerir que as proteínas em comum encontradas nas salivas possuem mais sítios de fosforilação em *R. brethesi* que em *R. robustus*. Contudo, como não há evidências de consideráveis mudanças de *pI* que se esperariam pela adição de grupamentos fosfato, seria necessário repetir o experimento e prosseguir com análises por espectrometria de massas para confirmação do número de sítios de fosforilação de cada proteína nas diferentes salivas.

No caso de *spots* ainda não identificados, foram observados no gel de *R. robustus* *spots* de alta massa que parecem ser isoformas de uma mesma proteína, contudo não apresentam uniformidade de fosforilação, sendo evidentes as fosforilações apenas dos três mais ácidos. Outros, que apresentaram fosforilações na saliva de *R. brethesi*, mesmo estando presentes também no perfil geral de *R. robustus*, não revelaram essa modificação no segundo caso. Os *spots* 42 e 47 são exemplos disso. Isso evidencia outro parâmetro para distinção entre as duas espécies analisadas.

A fosforilação de proteínas constitui o mais comum tipo de modificação pós-traducional que mobiliza um grande número de genes nos eucariotas. Esse tipo de modificação implica várias funções celulares cruciais e participa muito na complexidade do proteoma. É bem conhecida por ter um papel-chave de regulação de vários processos celulares como o ciclo celular e a transdução de sinal. Por consequência, o fenômeno de fosforilação/defosforilação em ativação/desativação de proteínas é implicado na proliferação e na diferenciação celulares nos metazoários (COHEN, 1992; LECHWARD K., 2001). No caso das proteínas salivares, é possível que se trate de uma modificação reguladora de atividade enzimática ou carreadora, influenciando o grau de afinidade com a molécula à qual se associará.

A saliva de *P. megistus* continua pouco explorada. Saber apenas que o perfil 2D da sua saliva partilha semelhanças com o de *T. infestans* não garante uma similaridade ou correspondência de proteínas salivares de uma espécie em relação à outra. Contudo, os indícios da presença de apirases na saliva de *P. megistus* são fortes e o fato de partilharem biomas na sua distribuição, estarem submetidos a pressões seletivas semelhantes e terem certa proximidade filogenética são questões que podem inferir uma convergência de informações em nível salivar. Com a recente disponibilização de dados do transcriptoma das glândulas salivares de *T. infestans* (ASSUMPÇÃO, 2008) e identificações de proteínas dessa mesma saliva que não haviam sido descritas ainda (CHARNEAU, 2007), possivelmente a obtenção de informações sobre a saliva de *P. megistus* será facilitada.

Resumidamente, nesse trabalho foi obtido o seguinte saldo: as identificações proteicas revelaram funções relativas à contraposição de mecanismos hemostáticos e inflamatórios em *Rhodnius*; diversas proteínas mostraram redundantemente funções anti-agregadoras plaquetárias e, em vários casos, mais de uma função foi atribuída a uma mesma molécula; os perfis entre as duas espécies desse mesmo gênero são de fato muito semelhantes; o perfil 2D de *P. megistus* compartilha semelhanças com o de *T. infestans* sendo isso demonstrado pela

presença de proteínas semelhantes às apirases de *T. infestans* em sua composição e mostra um conjunto proteico salivar rico. Além disso, apesar da hematofagia ter provavelmente surgido evolutivamente várias vezes – não só dentro da família Reduviidae, mas na ordem Hemiptera como um todo (TARTAROTTI, 2006) – certa convergência de estratégias evolutivas para este hábito alimentar pode ser vislumbrada demonstrando a expressão de proteínas salivares anti-hemostáticas, por tratar-se de contrapor eficientemente e de forma mais imediata reações da vítima às mudanças na hemostasia. A redundância e complementaridade de funções, resultantes de um longo processo evolutivo, possibilitam o sucesso alimentar desses triatomíneos.

7 Conclusões e Perspectivas

Os trabalhos desenvolvidos até o momento nos proporcionaram verificar que:

- A diversidade proteica das secreções salivares analisadas foi evidenciada pelo número de *spots* em cada perfil, de maneira que o menor número encontrado foi em *R. brethesi*, com uma média de 129 *spots*;
- A saliva de *R. brethesi* mostrou-se rica em lipocalinas sendo estas homólogas às de *R. prolixus*;
- Há similaridade entre os perfis de géis 2D das salivas de espécies do gênero *Rhodnius*, sendo poucos os *spots* aparentemente exclusivos de cada saliva e os *spots* três identificados de *R. robustus* foram similares a proteínas de *R. prolixus*, também presentes em *R. brethesi*;
- Apesar das semelhanças dentro do gênero *Rhodnius*, várias proteínas não foram identificadas mesmo havendo a disponibilidade do transcriptoma das glândulas salivares de *R. prolixus*, o que mostra uma provável divergência evolutiva entre essas espécies;
- O padrão de sítios de fosforilação é diferencial entre as salivas de *R. brethesi* e *R. robustus* quanto à qualidade dos *spots* fosforilados e à quantidade de fosforilações existentes em cada um deles;
- A saliva de *P. megistus* tem um número de *spots* substancialmente maior que as do gênero *Rhodnius* e o mapa 2D tem certa semelhança com o perfil 2D de *T. infestans*. Em adição, *P. megistus* possui apirases já descritas para *T. infestans* que ainda não foram isoladas de saliva de *Rhodnius*.

Tendo em vista o que foi alcançado até então, a continuidade dessa linha de pesquisa pode se dar de diversas formas:

- a. Pela continuação da identificação por similaridade das proteínas salivares de *Rhodnius*;
- b. Com o sequenciamento completo e a descrição funcional das moléculas não identificadas das salivas de *Rhodnius*;

- c. Esclarecimento da presença e função de possíveis modificações pós-traducionais em proteínas salivares, notadamente glicosilações que são modificações frequentemente encontradas em proteínas secretadas;
- d. Descrição do perfil proteico de *P. megistus* pela identificação por espectrometria de massas;
- e. Expressar e caracterizar isoformas de proteínas salivares (apirases ou lipocalinas, por exemplo) a fim de comparar suas afinidades com determinados ligantes em diferentes condições fisiológicas (pH, temperatura, etc) objetivando esclarecer a razão da redundâncias proteicas.

8 Referências Bibliográficas

- ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F.A. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 102, p. 57-69. 2007.
- AEBERSOLD, R.; MANN, MATTHIAS. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature** v. 422, p. 198-207. 2003.
- ALJAMALI, M.N.; HERN, L.; KUPFER, D.; DOWNARD, S.; SO, S.; ROE, B.A.; SAUER, J.R.; ESSENBERG, R.C. Transcriptome analysis of the salivary glands of the female tick *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Insect Mol Biol** v. 18, p. 129-154. 2009.
- ANDERSEN, J.F.; GUDDERRA, N.P.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; RIBEIRO, J.M.C. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. **Arch Insect Biochem Physio** v. 58, p. 97-105. 2005.
- ANDERSEN, J.F.; GUDDERRA, N.P.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; VALENZUELA, J.G.; RIBEIRO, J.M.C. Recognition of Anionic Phospholipid Membranes by an Antihemostatic Protein from a Blood-Feeding Insect. **Biochemistry** v. 43, p. 6987-6994. 2004.
- ANDRADE, B.B.; TEIXEIRA, C.R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **An Acad Bras Cienc** v. 77, p. 665-693. 2005.
- ANVISA. Nota Técnica: Doença de Chagas Aguda por transmissão oral. 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2308.pdf>. Acesso em: 18 de janeiro de 2008.
- ARCÀ, B.; LOMBARDO, F.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; PHAM, V.M.; MESTRES-SIMON, M.; ANDERSEN, J.F.; RIBEIRO, J.M.C. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. **Insect Biochem Mol Biol** v. 37, p. 107-127. 2007.
- ASSUMPCÃO, T.C.F.; FRANCISCHETTIC, I.M.B.; ANDERSEN, J.F.; SCHWARZB, A.; SANTANA, J.M.; RIBEIRO, J.M.C. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. **Insect Biochem Mol Biol** v. 38, p. 213-232. 2008.
- BARBOSA, S.E.; BELISÁRIO, C.J.; SOUZA, R.C.M.; PAULA, A.S.; LINARDI, P.M.; ROMANHA, A.J.; DIOTAIUTI, L. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. **Acta Tropica** v. 99, p. 144-154. 2006.
- BARROZO, R.B.; LAZZARI, C.R. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. **Chem. Senses** v. 29, p. 319-329. 2004.

- BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera-Reduviidae). IV Parte: O complexo das glândulas salivares de *Triatoma infestans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 53, p. 517-585. 1954.
- BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. 1998. *2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients: Principles and Methods*. Amersham Pharmacia Biotech, pp. 50.
- BEVERS, E.M.; COMFURIUS, P.; ZWAAL, R.F. Mechanisms involved in platelet procoagulant response. **Adv Exp Med Biol** v. 344, p. 195-207. 1993.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** v. 8, p. 93-99. 1987.
- BOON, G.D. An overview of hemostasis. **Toxicol Pathol** v. 21, p. 170-179. 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Casos da Doença de Chagas no Brasil. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=27880>. Acesso em: 11 abr. 2009.
- CALVO, E.; ANDERSEN, J.; FRANCISCHETTI, I.M.; DEL CAPURRO, M.; DE BIANCHI, A.G.; JAMES, A.A.; RIBEIRO, J.M.C.; MARINOTTI, O. The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. **Insect Mol. Biol.** v. 13, p. 73-88. 2004.
- CALVO, E.; DAO, A.; PHAM, V.M.; RIBEIRO, J.M.C. An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. **Insect Biochem Mol Biol** v. 37, p. 164-175. 2007.
- CHAGAS, C. Le cycle de “Schizotrypanum cruzi” chez l’homme et les animaux de laboratoire. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** v. 4, p. 467-471. 1911.
- CHAMPAGNE, D.E.; NUSSENZVEIG, R.H.; RIBEIRO, J.M. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying haem proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 8691–8695. 1995.
- CHARNEAU, S.; JUNQUEIRA, M.; COSTA, C.M.; PIRES, D.L.; FERNANDES, E.S.; BUSSACOS, A.C.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; SHEVCHENKO, A.; TEIXEIRA, A.R.L. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. **IJMS** v. 268, p. 265–276. 2007.
- COHEN, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. **Trends Biochem Sci.** v. 17, p. 408-413. 1992.
- COSTA, J.M.; JURBERG, J.; ALMEIDA, J.R. Estudos bionômicos de *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Hemiptera, Triatominae) I. Influência da dieta sobre o ritmo da postura, viabilidade dos ovos, curva de fertilidade e mortalidade das fêmeas. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 81, p. 365-380. 1986.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S.A.S.; MILES, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **TRENDS Parasitol** v. 18, p. 171-176. 2002.

CUNHA, R. B. “**Caracterização e sequenciamento de peptídios e proteínas por espectrometria de massa**”. 2003. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.

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

DIAS, J.C.P. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). **Ann Intern Med** v. 144, p. 772-774. 2006.

DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas (Globalization, inequity and Chagas disease). **Cad Saúde Pública (FIOCRUZ)** v. 23, p. S13-S22. 2007.

DIAS, J.C.P.; PRATA, A.; SCHOFIELD, C.J. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. **Rev Soc Bras Med Trop** v. 35, p. 669-678. 2002a.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 97, p. 603-612. 2002b.

FAUDRY, E.; LOZZI, S.P.; SANTANA, J.M.; D’SOUZA-AULT, M.; KIEFFER, S.; FELIX, C.R.; RICART, C.A.O.; SOUSA, M.V.; VERNET, T.; TEIXEIRA, A.R.L. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 19607-19613. 2004.

FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 39, p. 507-509. 2006.

FORATTINI, O.P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Rev Saúde Públ** v. 14, p. 265-299. 1980.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; MANS, B.J.; MENG, Z.; GUDDERRA, N.; VEENSTRA, T.D.; PHAM, V.M.; RIBEIRO, J.M.C. An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. **Insect Biochem Mol Biol** v. 38, p. 1-21. 2008.

GALVÃO, C. A sistemática de Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae). **Entomol. Vect.** v. 10, p. 511-530. 2003a.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.U.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa** v. 202, p. 1-36. 2003b.

GHARAH DAGHI, F.; WEINBERG, C.R.; MEAGHER, D.A.; IMAI, B.S.; MISCHE, S.M. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A

method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. **Electrophoresis** v. 20, p. 601-605. 1999.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics** v. 4, p. 3665 - 3685. 2004.

GRAAF, J.C.; BANGA, J.D.; MONCADA, S.; PALMER, R.M.; GROOT, P.G.; SIXMA, J.J. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. **Circulation** v. 85, p. 2284-2290. 1992.

HANKS, S.K.; QUINN, A.M. Protein kinase catalytic domain sequence database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. **Methods Enzymol** v. 200, p. 38-62. 1991.

ISAWA, H.; ORITO, Y.; JINGUSHI, N.; IWANAGA, S.; MORITA, A.; CHINZEI, Y.; YUDA, M. Identification and characterization of plasma kallikrein-kinin system inhibitors from salivary glands of the blood-sucking insect *Triatoma infestans*. **FEBS J** v. 274, p. 4271-4286. 2006.

JENNY, N.S.; MANN, K.G. 2002. Coagulation Cascade: An Overview. In: **Thrombosis and Hemorrhage**. 3. ed. Williams & Wilkins, 2002. p. 1-21.

JUNIOR, J.E.S. **Avaliação da Preferência Alimentar de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e Infecção por *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), Num Fragmento de Floresta em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**. 2009. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LACOMBE, D. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 94, p. 557-564. 1999.

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

LAU, A.T.Y.; HE, Q.Y.; CHIU, J.F. Proteomic Technology and Its Biomedical Application. **Acta Biochim Biophys Sin** v. 35, p. 965-975. 2003.

LECHWARD K., AWOTUNDE, O.S., SWIATEK, W., MUSZYŃSKA, G. Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. **Acta Biochim Pol** v. 48, p. 2001.

LÓPEZ, J.L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **J. Chrom. B** v. 849, p. 190-202. 2007.

MARANHÃO, A.C.B. . **Proteoma e Transcriptoma comparativo das glândulas salivares de barbeiros das espécies de *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius robustus* e *Panstrongylus megistus***. 2008. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

MARCILLA, A.; BARGUES, M.D.; ABAD-FRANCH, F.; PANZERA, F.; CARCAVALLO, R.U.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C.; JURBERG, J.; MILES, M.A.; DUJARDIN, J.P.; MAS-COMA, S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infec. Gen. Evol.** v. 1, p. 225–235. 2002.

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiol. Infect.** v. 136, p. 1153–1164. 2008.

MORITA, A., ISAWA, H., ORITO, Y., IWANAGA, S., CHINZEI, Y., YUDA, M. Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. **FEBS J** v. 273, p. 2955-2962. 2006.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; HAENDLER, B.; DONNER, P.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; SCHLEUNING, W.D. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **J Biol Chem** v. 270, p. 28629-28634. 1995.

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

OLIVEIRA, A.W.S.; SILVA, I.G. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 40, p. 204-208. 2007.

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.

PATTERSON, J.S.; BARBOSA, S.E.; FELICIANGELI, M.D. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. **Acta Trop** v. 110, p. 187-199. 2008.

PEREIRA, M.H.; GONTIJO, N.F.; GUARNERI, A.A.; SANT'ANNA, M.R.V.; DIOTAIUTI, L. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. **TRENDS Parasitol** v. 22, p. 516-520. 2006.

PEREIRA, M.H.; PENIDO, M.; MARTINS, M.S.; DIOTAIUTI, L. Comparative kinetics of bloodmeal intake by *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*, the two principal vectors of Chagas disease. **Med Vet Entomol** v. 12, p. 84-88. 1998.

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.C.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis** v. 20, p. 3551-3567. 1999.

PIRES, D.L. **Identificação e caracterização funcional de atividade apirásica nas salivas de triatomíneos vetores da doença de chagas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

- REIS, M.M.; MEIRELLES, R.M.S.; SOARES, M.J. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Tissue Cell** v. 35, p. 393-400. 2003.
- RIBEIRO, J.M.C.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M.A.C.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; VALENZUELA, J.G. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochem Mol Biol** v. 34, p. 61-79. 2004.
- RIBEIRO, J.M.C.; GARCIA, E.S. The role of the salivary glands in feeding in *Rhodnius prolixus*. **J Exp Biol** v. 94, p. 219-230. 1981.
- RIBEIRO, J.M.C.; KATZ, O.; PANNELL, L.K.; WAITUMBI, J.; WARBURG, A. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. **J Exp Biol** v. 2002, p. 1551-1559. 1999.
- ROCHA, D.S.; SANTOS, C.M.; CUNHA, V.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. Ciclo Biológico em Laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), Potencial Vetor Silvestre da Doença de Chagas na Amazônia. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 99, p. 591-595. 2004.
- SANTOS, A.; RIBEIRO, J.M.C.; LEHANE, M.J.; GONTIJO, N.F.; VELOSO, A.B.; SANT'ANNA, M.R.V.; ARAUJO, R.N.; GRISARD, E.C.; PEREIRA, M.H. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). **Insect Biochem Mol Biol** v. 37, p. 702-712. 2007.
- SHEVCHENKO, A.; SUNYAEV, S.; LOBODA, A.; SHEVCHENKO, A.; BORK, P.; ENS, W.; STANDING, K.G. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. **Anal. Chem.** v. 73, p. 1917-1926. 2001.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.** v. 68, p. 850-858. 1996.
- SILVEIRA, A.C.; VINHAES, M.C. Elimination of Vector-borne Transmission of Chagas Disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 94, p. 405-411. 1999.
- SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; FONTES, W. Análise de Proteomas: O Despertar da Era Pós-Genômica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** v. 7, p. 12-24. 1999.
- TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERONERON, C. R. Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Braz. J. Biol.** v. 66, p. 703-708. 2006.
- VALENZUELA, J.G.; FRANCISCHETTI, I.M.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. **J. Exp. Biol** v. 205, p. 2843-2864. 2002.
- WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>>. Acesso em: 13 dez. 2007.
- WHO. TDR/GTC/06. **Reporte sobre la enfermedad de Chagas**. Buenos Aires, 2007.

WIGGLESWORTH, V. B.; GILLETT, J. D. The function of the antennae in *Rhodnius Prolixus* (HEMIPTERA) and the mechanism of orientation to the host. **J Exp Biol** v. 11, p. 120-139 1934.

ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J.E. Chagas' Disease: An Ecological Appraisal With Special Emphasis on its Insect Vectors. **Ann. Rev. Entomol** v. 26, p. 101-133. 1981.

ZHANG, X.; ROGOWSKAS-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, P. On-target sample preparation of 4-sulfophenyl isothiocyanate-derivatized peptides using AnchorChip Targets. **J. Mass Spectrom.** v. 43, p. 346–359. 2008.

9 ANEXOS

ANEXO A – Participação em publicação

The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors

Sébastien Charneau^{a,1}, Magno Junqueira^{b,1}, Camila M. Costa^a, Daniele L. Pires^c, Ellen S. Fernandes^c, Ana C. Bussacos^c, Marcelo V. Sousa^{a,*}, Carlos André O. Ricart^a, Andrej Shevchenko^b, Antonio R.L. Teixeira^c

^a Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília 70910-900-DF, Brazil

^b Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Pfotenhauerstrasse 108, 01307 Dresden, Germany

^c Chagas Disease Multidisciplinary Research Laboratory, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília 70910-900-DF, Brazil

Received 1 March 2007; received in revised form 3 May 2007; accepted 8 May 2007

Available online 16 May 2007

Abstract

The saliva of the bloodsucking bug *Triatoma infestans* vector of Chagas disease contains an anti-hemostatic molecular cocktail that prevents coagulation, vasoconstriction and platelet aggregation in a vertebrate prey. In order to characterize *T. infestans* saliva proteome, we separated the secreted saliva by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). More than 200 salivary proteins were detected on the 2-DE map, mainly in the alkaline region. By nanoLC–MS/MS analysis using a LTQ–Orbitrap equipment followed by a combination of conventional and sequence-similarity searches, we identified 58 main protein spots. Most of such proteins possess potential blood-feeding associated functions, particularly anti-platelet aggregation proteins belonging to lipocalin and apyrase families. The saliva protein composition indicates a highly specific molecular mechanism of early response to platelet aggregation. This first proteome analysis of the *T. infestans* secreted saliva provides a basis for a better understanding of this fluid protein composition highly directed to counterpart hemostasis of the prey, thus promoting the bug's blood-feeding.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Triatoma infestans*; Saliva proteomic; Chagas disease; Tandem mass spectrometry; Sequence-similarity search

1. Introduction

Chagas disease, one of the most devastating parasitic human infections, is wide spread in South America. It was estimated at 16–18 million people infected by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, with an annual death rate of 50,000 cases [1,2]. The disease is transmitted during blood-feeding of triatomine bug (Hemiptera: Reduviidae; Triatominae) vectors, which release the parasite in the feces, infecting human through skin lesions.

The first line of vertebrate defense against blood loss is platelet aggregation that forms a hemostatic plug. Platelet aggregation is accomplished through a biochemical cascade triggered

by collagen, thrombin, thromboxane A₂ and ADP [3,4]. To preserve host blood flow during feeding, saliva of hematophagous insects contain platelet-aggregation inhibitors.

Triatoma infestans is considered a main vector in the epidemiology of Chagas disease in some ecosystems of South America, because it feeds more efficiently than its *Triatominae* competitors [5,6]. Several salivary proteins of triatomine bugs have been characterized so far, the majority consisting of platelet inhibitors. Two *T. infestans* salivary proteins, triplatin-1 and -2, inhibit platelet aggregation induced by collagen, but not by ADP or thrombin [7]. *Triatoma pallidipennis* saliva contains two inhibitors of platelet aggregation, pallidipin, which shares function and sequence similarities with triplatins [8] and triabin, a thrombin-induced platelet-aggregation inhibitor [9,10]. Another platelet-aggregation inhibitor from triatomine bugs is the *Rhodnius prolixus* ADP-binding protein *Rhodnius* Platelet Aggregation Inhibitor 1 (RPAI1) [11] that inhibits ADP-induced platelet aggregation [12]. Triplatin, pallidipin, triabin and RPAI, all belong to the family of lipocalins that are extracellular

Abbreviations: IEF, isoelectric focusing; IPG, immobilized pH gradient; 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis; MS BLAST, mass spectrometry driven BLAST; TiAPY, *Triatoma infestans* apyrase; DTT, dithiothreitol

* Corresponding author. Tel.: +55 61 3307 2142; fax: +55 61 3273 4608.

E-mail address: mvsousa@unb.br (M.V. Sousa).

¹ These authors contributed equally for this work.

transport proteins [13]. In *R. prolixus* saliva, the strongest anti-platelet aggregation activity triggered by ADP is attributed to apyrase, a nucleoside triphosphate-diphosphohydrolase that hydrolyses ATP or ADP to AMP [14,15]. This *R. prolixus* enzyme has not been isolated yet and, like other apyrases, does not belong to the lipocalin family.

T. infestans saliva also manifests salivary apyrase activity [16]. It appears that *T. infestans* salivary apyrases play an important role in the insect feeding habit, and half of its storage is used during single blood meal [17]. It has been shown that the apyrase activity of *T. infestans* saliva should be related to five glycosylated proteins with apparent molecular masses of 88, 82, 79, 68 and 67 kDa, that can not be distinguished by non-denaturing one-dimensional gel electrophoresis due to homo-oligomerization [18]. Only the full sequence of the *Tiapy79* gene encoding the 79 kDa apyrase was reported, confirming that it belongs to the 5'-nucleotidase family [16].

Despite of the medical importance of *T. infestans* vectoring, relatively little is known about its genome. Currently, sequences of 35 *T. infestans* proteins are available in NCBI database. Therefore, proteomics efforts utilizing conventional database searching approaches that rely on exact correlations of masses of intact peptides (in peptide mass fingerprinting) or masses of precursors and fragments (in tandem mass spectrometry) to corresponding database entries were expected to deliver limited identification efficiency (reviewed in [19]). The identification could rely on cross-species matching of spectra from *Triatoma* peptides to identical peptide sequences in known homologous proteins. Alternatively, unmatched peptide spectra could be completely or partially interpreted de novo (reviewed in [20]) and obtained sequence candidates used in error-tolerant searches (reviewed in [21]). Both stringent and error-tolerant approaches can be combined in a layered fashion such that, first, the known and highly homologous proteins are identified in stringent cross-species searches, and then the rest of spectra is interpreted de novo and complete or partial peptide sequences are applied for similarity driven identifications [22,23]. The former approach is considerably faster since it utilizes uninterpreted tandem mass spectra, however it typically produces hits with only a few matched peptides and therefore their statistical confidence could be compromised. The sequence similarity approach is more challenging technically, however, by tolerating multiple mismatches in aligned peptide sequences, it almost doubles the number of identified proteins [23–26].

Mass spectrometry-based strategy has been used for characterizing the proteome of salivary gland from *Anopheles gambiae*, the major malaria vector. That study provided validation for the existing genome annotation, and also discovered novel proteins, which had been represented only as predicted transcripts in the databases and not previously identified as cDNAs [27]. This illustrates the complementary nature of different strategies for identification of gene products.

Herein, we present the first proteomic study of the *T. infestans* saliva. 2-DE maps revealed more than 200 salivary protein spots, most of them in the alkaline pH range. The majority of proteins identified by mass spectrometry is potentially engaged in platelet-aggregation inhibition and belongs to triabin subfamily

and apyrase family. The results also revealed that several proteins were present in multiple isoforms having partial sequence redundancy.

2. Materials and methods

2.1. Harvest of triatomine saliva

T. infestans colony was reared in the insectarium of the Chagas Disease Multidisciplinary Research Laboratory, University of Brasília, maintained at 28 °C, 70% relative humidity, with photoperiods of 12 h. Secreted *T. infestans* saliva was collected by using pipette tips placed in contact with the insect mouthparts at 7–9 days following the blood meal. Protease Inhibitor Mix without EDTA (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was added to the saliva and samples stored at –80 °C. For tissue localization experiments, saliva samples were extracted from the salivary glands D1, D2 and D3. Glands in 0.9% saline solution were carefully punctured with a needle, and extracted intra-luminal saliva was harvested by centrifugation.

2.2. Quantification of sample

Samples of pooled saliva obtained from several adult insects, were quantified using the Plus One 2D Quant Kit (GE Healthcare) and, in parallel, by amino acid analysis on a Hitachi L8500 amino acid analyzer using ninhydrin post-column derivatization.

2.3. Two-dimensional gel electrophoresis

2.3.1. Wide pH range

T. infestans saliva samples containing 80 or 300 µg protein were diluted and incubated for 1 h at room temperature in 350 µL final volume of denaturing sample buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 66 mM DTT, 2% Triton X-100, 0.5% Pharylate 3–10, and 10% isopropanol. Samples were centrifuged (12,000 × g, 10 min) prior to IEF.

The supernatants were applied to 18 cm IPG gel-strips with linear separation pH range of 3–10 (GE Healthcare) by in-gel rehydration [28] for 6 h without current followed by 6 h at 30 V. IEF was carried out at 20 °C using an Ettan IPGphor3 unit (GE Healthcare) with the following conditions, 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h and 8000 V for 4 h with a maximum current of 50 µA per strip. Prior to SDS-PAGE, the IPG strips were subjected to reduction with equilibration buffer (50 mM Tris, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 4% SDS) supplemented with 125 mM DTT for 40 min and alkylation with 300 mM acrylamide in equilibration buffer for additional 40 min. SDS-PAGE was performed on 12% T polyacrylamide gels run on a Protean II system (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) at 20 °C. Proteins were visualized by silver staining [29] and the gels were stored in 1% acetic acid before protein digestion. Alternatively, the 2-DE gels were submitted to Western blotting.

2.3.2. Basic pH range

IPG gel-strips of 11 cm with a linear separation alkaline pH window of 6–11 were rehydrated in 200 µL of denaturing sam-

ple buffer containing 10% isopropanol for 10 h. *T. infestans* saliva (240 µg proteins) was diluted and incubated for 1 h at room temperature in 200 µL final volume of denaturing sample buffer containing 10% isopropanol. The samples were centrifuged (12,000 × *g*, 10 min) and applied to a paper bridge, a small piece of CleanGel electrode strip paper (Amersham 18-1035-33), according to Ref. [30] positioned at the anode of the Multiphor II apparatus (Amersham Biosciences) and an electrode pad embedded in DTT solution was positioned near the cathode. IEF was carried out at 20 °C with the following conditions: 150 V for 1 h, 300 V for 1 h, 600 V for 1 h and 3500 V for 5 h, under a current of 2 mA. For the second dimension, reduction and alkylation of the IPG strips were carried out as described above. SDS-PAGE was performed on 10% T polyacrylamide gels run on a SE 600 Electrophoresis Unit (Hoefer) at 20 °C. Gels were then either silver-stained and stored in 1% acetic acid before protein digestion or submitted to Western blotting.

2.4. Raising antisera against *T. infestans* apyrases

T. infestans salivary proteins were separated by 10% SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue staining. The gel bands corresponding to 88, 82 and 79 kDa apyrases were excised independently, macerated and solubilized in 200 µL of Tris-buffered saline (TBS).

Polyclonal antisera against such apyrases were raised by immunizing rabbits with 5 µg of each form per injection (first injection with complete Freund's adjuvant, second injection with incomplete Freund's adjuvant and third injection without adjuvant). Sera were collected, diluted with one volume of glycerol and stored at –20 °C.

2.5. Immunoblotting

Saliva proteins, separated by SDS-PAGE or 2-DE were electroblotted onto nitrocellulose membrane (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) using a Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). The membrane was blocked with 5% non-fat milk and 0.1% Tween 20 in TBS for 1 h at room temperature followed by incubation for 2 h with anti-apyrase rabbit serum, diluted to 1:200 in 1% non-fat milk in TBS. After three washes in TBS, the membrane was incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG for 1 h, washed extensively in TBS and revealed using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate and nitro blue tetrazolium (Bio-Rad) as substrates.

2.6. Image analysis

Silver-stained gels were scanned with a Sharp JX-330 scanner at 300 dpi resolution. Digitized images were analyzed with Image Master 2D Elite software (Amersham Biosciences) to match and quantify protein spots.

2.7. Protein identification by nanoLC–MS/MS

Protein spots were excised from silver-stained gels, and in-gel digested with trypsin as described in Ref. [31]. Recovered pep-

tides were analyzed by nanoLC–MS/MS on an Ultimate 3000 system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) interfaced online with a LTQ–Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher Scientific., San Jose, CA). To this end, peptides were redissolved in 0.05% TFA and loaded onto 5 mm × 300 µm i.d. trapping microcolumn packed with C18 PepMAP100 5 µm particles (Dionex) in 0.05% TFA at the flow rate of 20 µL/min. Upon loading and washing, peptides were back-flush eluted onto a 15 cm × 75 µm i.d. nanocolumn, packed with C18 PepMAP100 3 µm particles (Dionex). The following mobile phase gradient was delivered at the flow rate of 200 nL/min: 5–20% of solvent B in 20 min; 20–50% B in 16 min; 50–100% B in 5 min; 100% B during 10 min, and back to 5% B in 5 min. Solvent A was 95:5 H₂O/acetonitrile (v/v) with 0.1% formic acid and solvent B was 20:80 H₂O/acetonitrile (v/v) with 0.1% formic acid. Peptides were infused into the mass spectrometer via dynamic nanospray probe (ThermoElectron Corp.) with 10 µm i.d. SilicaTip uncoated needle (New Objective, Woburn, MA). The spray voltage was set to 1.8 kV with no sheath and auxiliary gas flow; ion transfer tube temperature was 180 °C. Mass spectrometer was operated in data-dependent mode. The automated gain control (AGC) was set to 5 × 10⁵ charges and 5 × 10⁴ charges for MS/MS at the linear ion trap analyzer. DDA cycle consisted of the survey scan within *m/z* 300–1600 at the Orbitrap analyzer with target mass resolution of 60,000 (FWHM, full width at half maximum) followed by MS/MS fragmentation of the four most intense precursor ions under the relative collision energy of 35% in the linear trap. Singly charged ions were excluded from MS/MS experiments, and *m/z* of fragmented precursor ions were dynamically excluded for further 90 s. Ion selection threshold for triggering MS/MS experiments set to 500 counts. An activation parameter *q* 0.25 and activation time of 30 ms were applied. The entire pool of dta files was converted into a single mgf (MASCOT generic format) file using BioWorks 3.2 software (Thermo Electron Corp.) and searched against MSDB database by MASCOT v. 2.1 software (Matrix Science Ltd., London, U.K.) installed on a local 2 CPU server. Database searching settings were mass tolerance of precursor ions of 10 ppm and an fragment ions of 0.8 Da; up to two missed cleavages were allowed; carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionines and *N*-protein acetylation were set as variable modifications. The confidence criteria for protein identification by MASCOT were set conditionally on the number of matched peptides and also peptide ion scores of each individual match. First, no matched spectra with peptide ions scores below 20 were considered and, at least, three spectra should be matched. For hits identified with less than three matched spectra it was required that at least one spectrum was matched with the score of 50 or higher. Upon MASCOT searches, dta files corresponding to MASCOT hits (including keratin and trypsin peptides) were removed and the rest submitted to de novo interpretation by a modified version of PepNovo software in batch mode [32].

While interpreting each dta file, PepNovo produced up to seven redundant, degenerate and partially inaccurate sequence candidates. PepNovo assigned a quality score for each top candidate, which stands for the expected number of correctly

determined amino acid residues in the full peptide sequences. For subsequent sequence-similarity database searches, we only considered the candidates whose PepNovo quality score exceeded 6. All selected candidates were merged into MS BLAST query string as described in Refs. [23,33] and then submitted to MS BLAST searches against nr database at <http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>. Statistical confidence of database searching hits was estimated according to MS BLAST scoring scheme [34], whoever hits related to trypsin and keratins were excluded and only high scoring segment pairs (HSP) with scores above 55 were considered.

2.8. Sequence and phylogenetic analysis

The unrooted tree was generated using the CLUSTALW multiple alignment program at <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> using neighbor-joining method. Eight triabin-related proteins from lipocalin family of *T. infestans* were considered in building the alignments. The phylogenetic tree was formatted with TreeView software.

3. Results and discussion

3.1. Proteomic map of *T. infestans* saliva

Two-dimensional electrophoresis analysis of *T. infestans* saliva was initially performed using isoelectric focusing within a wide pH range (3–10). Since most protein spots were found in the alkaline region of the gel, we optimized IEF conditions to improve the detection of basic polypeptides. Adding isopropanol

to the sample buffer as well as gel rehydration under low voltage minimized protein precipitation and aggregation, which are more frequently observed in the alkaline region. In our conditions of insect rearing and saliva harvest, one bug produced about 1 μ L of saliva, which corresponds to approximately 50 μ g protein. Amounts equivalent to 80 and 300 μ g saliva protein were loaded on separate gels. Upon 80 μ g loading, we observed 204 silver-stained spots (Fig. 1A) versus 269 spots observed upon loading of 300 μ g protein (Fig. 1B). The spots at molecular masses above 45 kDa were mostly detected in the basic region, and were not well resolved due to horizontal streaking (Fig. 1). The resolution of these high molecular mass spots was subsequently improved by using 6–11 pH gradient in the IEF step (see below).

Forty-three protein spots below 45 kDa were chosen for the identification as they were fairly well focused and represented all protein spot clusters scattered over the 2-DE gels (Fig. 1A and B). To this end, we applied tandem mass spectrometry, which is the most adequate strategy for protein identification when working with organisms lacking extensive genomic data as the *Triatoma* genus.

Thus, recovered peptides of in-gel tryptic digests from excised protein spots were subjected to analysis by nanoLC-MS/MS on a LTQ-Orbitrap mass spectrometer. Database mining was performed in a layered approach, first starting with stringent MASCOT database searches and followed by de novo interpretation of unassigned spectra and MS BLAST sequence-similarity searches with deduced sequence candidates. To this end, the entire pool of produced tandem mass spectra (typically, >4000 per run) was converted into a single mgf file

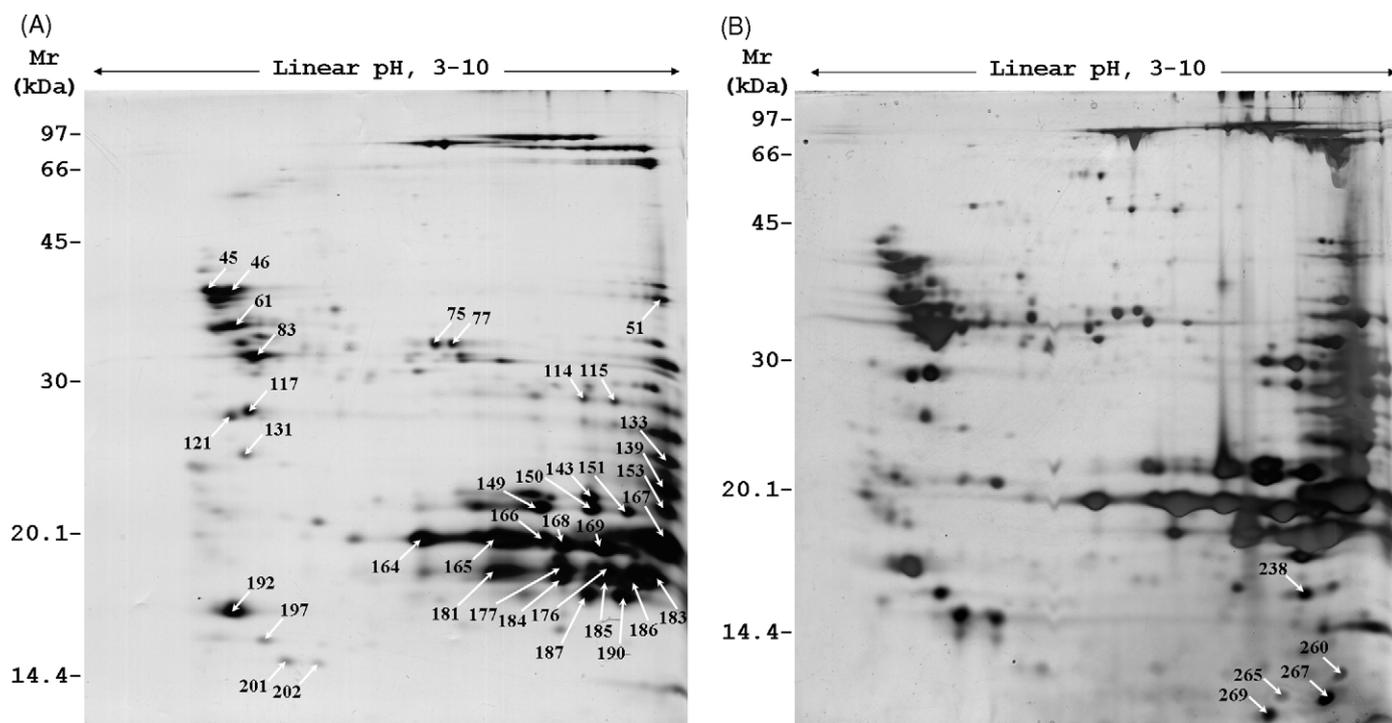


Fig. 1. Wide pH range 2-DE map of *T. infestans* salivary secreted proteins. 2-DE was performed under denaturing conditions using 3–10 linear IPG strip in IEF and 12% SDS-PAGE in second dimension. Sample amounts were 80 μ g (A) and 300 μ g (B). The gels were silver-stained. Spot numbers correspond to MS/MS identified proteins shown in Table 1.

and searched by MASCOT. Dta files corresponding to confident proteins hits were removed from the query and the rest was interpreted de novo by PepNovo software and obtained sequences used for MS BLAST searches. Altogether, among 43 attempted samples, MASCOT confidently identified 34 individual proteins. Applying sequence-similarity searches to the complete nanoLC–MS/MS dataset enabled us to identify another 11 proteins and to support previous cross-species identifications by MASCOT by error-tolerant matching of several new peptides in 23 cases. Whenever MASCOT and MS BLAST matched apparently different proteins, BLAST-P searches with full-length sequences of the corresponding database entries validated that these proteins were not homologous. Interestingly, in 10 spots we identified more than one unique protein, which is not uncommon considering the high dynamic range of nanoLC–MS/MS technique [35].

We grouped the identified salivary protein into three categories according to their assumed salivary function: (i) proteins with unknown function or non-identified, (ii) proteins with putative blood-feeding function and (iii) proteins with blood-feeding known function (Table 1 and Supplementary Table 1).

3.1.1. *T. infestans* salivary proteins with unknown function and non-identified proteins

The sequences from three saliva proteins matched the translated sequence of a triatox gene from *T. infestans* (SwissProt/TrEMBL accession number Q45KX2) using stringent MASCOT search. In this particular case, MS BLAST searches did not provide any positive hit. Triatox shows no sequence similarity to proteins from other organisms and its function is still unknown. It is the first time that the product of the triatox gene was detected. The triatox-like proteins identified in the 2-DE maps may comprise a new class of *Triatoma* secreted salivary proteins.

Four spots (83, 201, 260 and 269) of *T. infestans* saliva could not be identified by nanoLC–MS/MS.

These seven protein spots found in the secreted saliva correspond to molecules probably implicated in blood-feeding.

3.1.2. *T. infestans* salivary proteins with blood-feeding putative functions

Among all protein spots identified, seven can be considered as novel *T. infestans* salivary proteins having sequence homologies with proteins from other organisms available in databases.

Six spots of *T. infestans* crude saliva share sequence similarities with ATPases and phosphate binding proteins. ATPases have many different cellular functions, but in salivary gland cDNA library studies from *R. prolixus* bug and *An. gambiae* and *Aedes aegypti* mosquitoes, both ATPase and phosphate binding protein genes are classified as possible housekeeping function genes involved in energy metabolism and transport [27,36,37].

Three protein spots matched to both alpha and beta subunits from the F₁ portion of the F₀/F₁ ATP synthase complex from bacteria and yeasts. These subunits were previously detected in 2-DE maps of female *A. aegypti* mosquito salivary glands [37]. When the F₁ portion is physically separated from the membrane F₀ portion, F₁ is only capable of catalyzing ATP hydrolysis.

ATP hydrolysis may play a role in blood-feeding mechanisms since recent studies have shown that ATP may synergize with ADP as a platelet-aggregating agent [38]. It is also possible that these salivary proteins could be involved in energy metabolism associated with protein synthesis and secretion (as proposed by [37]) promoting the blood-feeding or could act as inhibitors of immune-response since ATP is known to be a signal for neutrophil activation.

Moreover, three other protein spots matched preferentially with periplasmic phosphate binding proteins from bacteria. In the future, we intend to take a special attention to these putative transport proteins for inorganic phosphate to understand their presence and role in the secreted saliva.

One protein spot (51) identified only by MS BLAST search, but not by MASCOT, is a hydrolase similar to secreted alkaline phosphatase L from *Pseudomonas aeruginosa*. A secreted salivary alkaline phosphatase containing a signal peptide was previously found in the mosquito *A. aegypti*, but its blood-feeding function is not yet established [37]. Recently, it was proposed that an inositol polyphosphate 5-phosphatase from *R. prolixus* secreted saliva facilitates the ingestion of blood by reducing the concentration of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate at the surface of platelets and inactivating these particles [39].

All proteins mentioned above are potentially intracellular. It was previously described that although all three *T. infestans* salivary glands present merocrine secretion (exocytosis of the saliva components into the lumen), occasionally, budding vesicles containing large volume of intracellular components are released in the lumen, corresponding to apocrine secretion [40]. Therefore, the presence of intracellular proteins in saliva proteome results from the physiological process of secretion.

3.1.3. *T. infestans* salivary proteins with known blood-feeding functions

Remarkably, 34 *T. infestans* salivary spots were related to bug proteins with already established blood-feeding function. Thirty-one spots with different pIs and apparent molecular masses, matched to just six *T. infestans* protein sequences belonging to lipocalin family, indicating the presence of polymorphic variants due to either sequence divergence or post-translation modifications. All these six lipocalin sequences contain a putative triabin domain, so that we classified them as members of the triabin subfamily. Lipocalins from arthropods bind low molecular mass ligands and inhibit platelet activity, vasoconstriction, inflammation and coagulation in vertebrates [41,42].

Phylogenetic analysis with all available sequences of *T. infestans* lipocalin-like proteins, including TiLipo33, TiLipo37, TiLipo39, TiLipo77, infestilin and triatin identified in our work and the two recently characterized *T. infestans* triplatin-1 and -2 [7] are shown in Fig. 2. Both triplatins are collagen-induced platelet-aggregation inhibitors that target the major collagen-signaling receptor glycoprotein VI and, consequently, inhibit platelet activation by collagen [7]. TiLipo33 clustered with triplatin-1 (84/90% identity/similarity), which is homolo-

Table 1
T. infestans salivary proteins identification by tandem mass spectrometry using MASCOT and MS BLAST methods

Spots ^a	Protein family members	Proposed functions	MASCOT identification					Identification by de novo sequencing and MS BLAST searches				pI ^j	Mr (kDa) ^k
			Significant hits ^b	Accession number ^c	Score ^d	Unique peptide no. ^e	Coverage (%) ^f	Significant hits ^g	Accession number ^c	Matched queries no. ^h	Coverage (%) ⁱ		
<i>T. infestans</i> salivary proteins with unknown function and non-identified proteins													
75 ^l	Unknown	Unknown	Ti_Triatox	Q45KX2	65	1	19	NI				7.3	31.5
165 ^l	Unknown	Unknown	Ti_Triatox	Q45KX2	80	1	19	NI				8.0	19.4
192 ^l	Unknown	Unknown	Ti_Triatox	Q45KX2	328	8	38	NI				5.0	16.2
83	Unknown	Unknown	NI					NI				5.3	30.9
201	Unknown	Unknown	NI					NI				5.6	14.4
260	Unknown	Unknown	NI					NI				9.4	11.7
269	Unknown	Unknown	NI					NI				8.5	9.9
<i>T. infestans</i> salivary proteins with blood-feeding putative functions													
45	ATPase	ATP binding and hydrolysis	Mitochondrial F1 ATP synthase α -chain [<i>A. fumigatus</i>]	Q4WC88	67	4	7	Mitochondrial ATPase α -s/u [<i>N. crassa</i>]	P37211	2	4.2	4.8	35.1
46	ATPase	ATP binding and hydrolysis	ADP, ATP carrier protein [<i>S. kluyveri</i>]	Q875Q6	105	2	6	Putative ATP synthase α -chain [<i>R. palustris</i>]	Q6NDD0	1	2.6	5.0	34.9
143	ATPase	ATP binding and hydrolysis	Mitochondrial ATP synthase β -chain [<i>G. zeae</i>]	Q4IEP6	289	4	10	Mitochondrial F1 ATP synthase β -s/u [<i>S. cerevisiae</i>]	P00830	4	8.4	9.0	21.9
51	Alkaline phosphatase	Phosphate hydrolysis	NI					Alkaline phosphatase L [<i>P. aeruginosa</i>]	P35482	1	3.5	9.7	34.4
167 ^l	PBP	Phosphate transport	Periplasmic PBP [<i>R. palustris</i>]	Q6N0I2	138	2	10	ABC transporter PBP [<i>B. japonicum</i>]	Q89VF5	4	11.4	9.8	19.2
181 ^l	PBP	Phosphate transport	Periplasmic PBP [<i>R. palustris</i>]	Q6N0I2	149	2	10	ABC transporter PBP [<i>B. japonicum</i>]	Q89VF5	6		8.0	17.8
192 ^l	PBP	Phosphate transport	Periplasmic PBP [<i>R. palustris</i>]	Q6N0I2	98	1	5	Periplasmic PBP [<i>R. palustris</i>]	Q6N0I2	1	3.9	5.0	16.2
<i>T. infestans</i> salivary proteins with functions known to promote the blood-feeding													
77	Apyrase	ADP-induced platelet inhibitor	Ti_APY79	Q70GK8	141	3	6	Ti_APY79	Q70GK8	2	5.2	7.5	31.5
61	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	85	1	10	TiLipo39	Q6UN99	2	10.1	5.1	32.6
75 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	NI					TiLipo33	Q6UNA0	2	14.9	7.3	31.5
114	Triabin	Platelet inhibitor	Ti_triatin	Q45KX3	772	14	37					8.9	28.5
115	Triabin	Platelet inhibitor	Ti_triatin	Q45KX3	920	16	38	TiLipo39	Q6UN99	3	19.6	9.2	28.3
117 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	97	1	10	TiLipo39	Q6UN99	2	14.5	5.2	27.7
131	Triabin	Platelet inhibitor	Ni					TiLipo37	Q6UNA1	2	9.0	5.2	24.8
133 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	79	1	10	TiLipo39	Q6UN99	2	11.7	9.8	24.3
149	Triabin	Platelet inhibitor	NI					TiLipo37	Q6UNA1	3	15.7	8.4	21.3
150	Triabin	Platelet inhibitor	NI					TiLipo77	Q6UN98	3	14.0	9.0	21.1
151	Triabin	Platelet inhibitor	NI					TiLipo33	Q6UNA0	5	30.9	9.4	20.1
153 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo33	Q6UNA0	91	1	9	TiLipo33	Q6UNA0	3	19.3	9.8	20.9
	Triabin	Platelet inhibitor	Ti_infestilin	Q45KX1	88	1	13						
164	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo33	Q6UNA0	87	1	9	TiLipo33	Q6UNA0	12	76.2	7.1	19.4
165 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	NI					TiLipo33	Q6UNA0	8	56.4	8.0	19.4
166 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	102	1	10					8.4	19.4
	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo33	Q6UNA0	88	1	9	TiLipo33	Q6UNA0	8	54.1		
167 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo33	Q6UNA0	99	1	9	TiLipo33	Q6UNA0	7	45.9	9.8	19.2
168	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo33	Q6UNA0	247	2	20	TiLipo33	Q6UNA0	9	58.6	8.7	19.1

169	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	115	1	10	NI					9.1	18.9
176 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	Ti_infestilin	Q45KX1	241	5	27						9.2	17.9
	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	185	4	18	TiLipo39	Q6UN99	5	33.0			
	Triabin	Platelet inhibitor	Ti.triatin	Q45KX3	135	3	14							
177 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	177	4	18	TiLipo39	Q6UN99	6	40.2	8.6	17.9	
	Triabin	Platelet inhibitor	Ti_infestilin	Q45KX1	108	2	16							
	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo33	Q6UNA0	104	1	11							
181 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo33	Q6UNA0	128	1	11	TiLipo33	Q6UNA0	6	40.3	8.0	17.8	
183 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	Ti_infestilin	Q45KX1	371/26	6	29	NI					9.6	17.5
	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	181	4	18							
184	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	281	6	25	TiLipo39	Q6UN99	9	59.8	8.6	17.5	
185	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	259	6	25	TiLipo39	Q6UN99	9	61.5	9.1	17.4	
186 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	369	7	25	TiLipo39	Q6UN99	13	86.6	9.4	17.3	
	Triabin	Platelet inhibitor	Ti_infestilin	Q45KX1	226	4	27							
187	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	107	3	18	TiLipo39	Q6UN99	5	31.8	9.0	16.8	
190	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	174	4	22	TiLipo39	Q6UN99	4	29.6	9.4	16.7	
197	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	76	1	10	TiLipo39	Q6UN99	1	6.2	5.4	15.1	
202 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	81	1	10						6.0	14.3
	Triabin	Platelet inhibitor						TiLipo33	Q6UNA0	2	13.3			
238 ^l	Triabin	Platelet inhibitor	Ti.triatin	Q45KX3	351	7	18						9	15.1
	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo39	Q6UN99	133	3	18	TiLipo39	Q6UN99	5	30.7			
265	Triabin	Platelet inhibitor	TiLipo33	Q6UNA0	113	1	9	TiLipo33	Q6UNA0	3	18.8	8.7	10.8	
267	Triabin	Platelet inhibitor	Ti.triatin	Q45KX3	513	11	45	NI					9.2	10.6
117 ^l	Trialyisin	Cell lysis	Ti.trialysin	Q8T0Z3	94	3	7	NI					5.2	27.7
121	Trialyisin	Cell lysis	Ti.trialysin	Q8T0Z4	222	6	26	NI					5.0	27.4
133 ^l	Trialyisin	Cell lysis	Ti.trialysin	Q8T0Z3	76	3	5	NI					9.8	24.3
139	Trialyisin	Cell lysis	Ti.trialysin	Q8T0Z3	360	7	19	NI					9.8	22.4

NI, non-identified protein; PBP, phosphate binding protein; Ti, *Triatoma infestans*; A., *Aspergillus*; B., *Bradyrhizobium*; G., *Gibberella*; N., *Neurospora*; P., *Pseudomonas*; R., *Rhodopseudomonas*; S., *Saccharomyces*.

^a Spot numbers correspond to the numbers indicated in Fig. 1.

^b and (g) Protein identified with significant hits, respectively, via MASCOT and via MS BLAST.

^c Accession number in SwissProt/TREMBL.

^d Probability Based Mowse Score of MASCOT software: $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

^e Number of unique peptide sequences identified via MASCOT.

^f Coverage (%): percentage of predicted protein sequence covered by matched peptides via MASCOT.

^g Protein identified with significant hits, respectively, via MASCOT and via MS BLAST.

^h Number of unique peptide sequences identified via MS BLAST that had a significant sequence-alignment score superior or equal to 55.

ⁱ Coverage (%): percentage of predicted protein sequence covered by matched query sequences with an alignment score superior to 55% via MS BLAST according to $[\sum \text{positive queries (aa)} \times 100] / \text{predicted protein (aa)}$.

^j Experimental isoelectric point of protein on gel.

^k Experimental relative molecular mass of protein on gel.

^l Spots probably containing more than one identified protein and could be present in two categories of *T. infestans* salivary proteins.

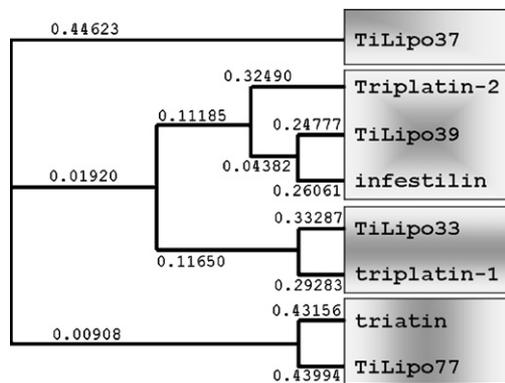


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the *T. infestans* salivary triabin subfamily. Unrooted tree showing the sequence distance relationships between deposited members of the triabin subfamily. Numbers are branch lengths. Presumed clusters were boxed. Protein accession numbers used in this analysis are in Table 1.

gous to *T. pallidipennis* pallidin-2 (52/70% identity/similarity), another collagen-induced platelet-aggregation inhibitor [8]. On the other hand, both Tilipo39 and infestilin (68/78% identity/similarity) clustered with triplatin-2 (respectively, 71/81 and 73/80% identity/similarity). Finally, TiLipo77 and triatin formed another group (31/45% identity/similarity), while TiLipo37 was included in a separate branch. All of them are probably implicated in platelet-aggregation inhibition.

The data indicates that *T. infestans* saliva presents a diversity of lipocalin-like proteins that possibly act as anti-hemostatic factors during blood meal uptake as already reported for other triatomine bugs [36,42] and ticks [43,44]. Nevertheless, sequence variation within each major group of *R. prolixus* lipocalins was demonstrated to have important anti-hemostatic functional consequences and provides an excellent example of adaptive diversification of a single protein family in a specialized tissue [42].

The two *T. infestans* trialysin sequences were identified in four different spots. Trialysin is a pore-forming protein that lyses protozoan and bacterial cells indicating a role in the control of microorganism growth in the salivary glands as well as in the promotion of the blood-feeding process since it is able to permeabilize mammalian cells [45].

In addition, the protein spot 77 at 31.5 kDa matched *T. infestans* 79 kDa salivary apyrase precursor, an ADP collagen-induced platelet-aggregation inhibitor [16]. It could be a new apyrase form or just a proteolysis product. As a matter of fact, previous reports showed that *T. infestans* saliva apyrases are present in five different forms, namely TiAPY88, TiAPY82, TiAPY79, TiAPY68 and TiAPY67, with Mr of 88, 82, 79, 68 and 67 kDa, respectively [16]. The spots detected between 67 and 88 kDa on pH 3–10 2-DE gels (Fig. 1) could correspond to *T. infestans* salivary apyrases [16]. However, since they were in the basic *pI* region, their resolution was compromised by horizontal streaking. In order to obtain better resolution for such spots, we carried out 2-DE using a pH gradient from 6 to 11. In addition, immunoblotting using specific anti-apyrase antibodies was employed in order to locate apyrases in 2-DE gels as shown below.

3.2. Immunodetection analysis of TiAPY isoforms on alkaline 2-DE maps

The separation of basic proteins at good resolution by 2-DE is always a challenge due to intrinsic difficulties of isoelectric focusing in alkaline pH [46,47]. Here, to improve the separation of basic proteins over 45 kDa in 2-DE gels (Fig. 1), including all TiAPYs, we performed 2-DE in restricted pH range in alkaline conditions (pH 6–11). Different IEF conditions of basic salivary proteins were tested (data not shown). We found that the best separation of basic salivary proteins was achieved using the Multiphor II apparatus, rehydration of alkaline IPG strips with rehydration buffer without sample prior to IEF and anodic sample application using the paper-bridge method [30] plus an electrode pad embedded in DTT solution near the cathode. Thus, the horizontal streaking in the region of high apparent molecular masses observed in Fig. 1 disappeared in the alkaline 2-DE gels (Fig. 4A and B). To determine if the spots between 67 and 88 kDa were isoforms of the five apyrases previously described [16], we employed Western blotting, since specific antisera against TiAPY88, TiAPY82 and TiAPY79 are readily available.

Proteins from secreted saliva and proteins extracted from gland pairs that are named according to Barth [48] as D1 (principal), D2 (Supplementary) and D3 (accessory). Such nomenclature is still in use [40]. The gland contents were subjected to SDS-PAGE (Fig. 3A) followed by immunoblotting using specific anti-apyrase sera (Fig. 3B–D). It was observed that each anti-apyrase serum specifically labeled one protein band at the expected molecular mass in secreted saliva as well in the lumen of the salivary gland pair D2 (Fig. 3). No labeling was detected in gland pairs D1 and D3. Previous work found apyrases mainly in the lumen of pair D1 [17]. Further experiments should be done to explain such apparently contradictory results. When the developing time of the immunodetection was increased, the bands of the other apyrases became visible, including TiAPY68 and TiAPY67 for which we did not produce antibody (Fig. 3), presumably because conserved sequence domains are shared between different TiAPY forms [16].

In the alkaline 2-DE gel conditions, each antiserum specifically labeled some spots at the expected relative molecular masses corresponding to apyrase bands in SDS-PAGE (Fig. 4). TiAPY88, TiAPY79, TiAPY68 and TiAPY67 showed at least two isoforms each, always detectable both on silver-stained and Western-blotted gels. Interestingly, TiAPY82 and their potential isoforms visualized in Fig. 4B were not always present in alkaline 2-DE gels (Fig. 4A) depending on the pool of *T. infestans* saliva used. Although both silver-stained gels and immunoblots suggested the existence of isoenzymes of each apyrase member, we employed the same MS/MS peptide sequencing technique described above to confirm the identity of such isoforms.

3.3. Validation of TiAPY isoforms by MS/MS

Fifteen anti-apyrase cross-reacting spots were characterized by nanoLC–MS/MS, as described above. Altogether, de novo sequencing identified more apyrase isoforms than conventional MASCOT searching. From a total of 15 analyzed spots, 13

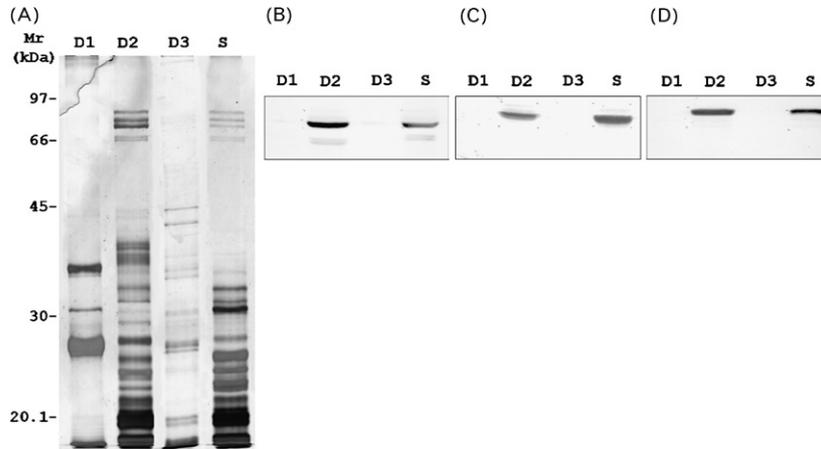


Fig. 3. Glandular localization of TiAPY. Proteins from gland pair D1 (lanes D1) and gland pair D2 (lanes D2) and gland pair D3 (lanes D3) and crude secreted saliva (lanes S) were separated by 10% SDS-PAGE and silver-stained (A). TiAPY localization analyses were performed by Western blotting using anti-TiAPY79 serum (B), anti-TiAPY82 serum (C) and anti-TiAPY88 serum (D).

were positively identified by MASCOT including one borderline identification that was confirmed by MS BLAST validation procedure as described in Ref. [49]. Sequence-similarity searches allowed us to identify all 15 isoforms including the two spots that could not be identified by MASCOT. The number of unique peptides matched by sequence-similarity searches was, in most

of the cases, higher than in MASCOT searches (Table 2 and Supplementary Table 2).

Alignments between all sequence proposals obtained by de novo MS/MS against the only available sequence of *T. infestans* 79 kDa salivary apyrase (EMBL accession number AJ581749) confirmed high sequence similarity (Fig. 5). As expected, the

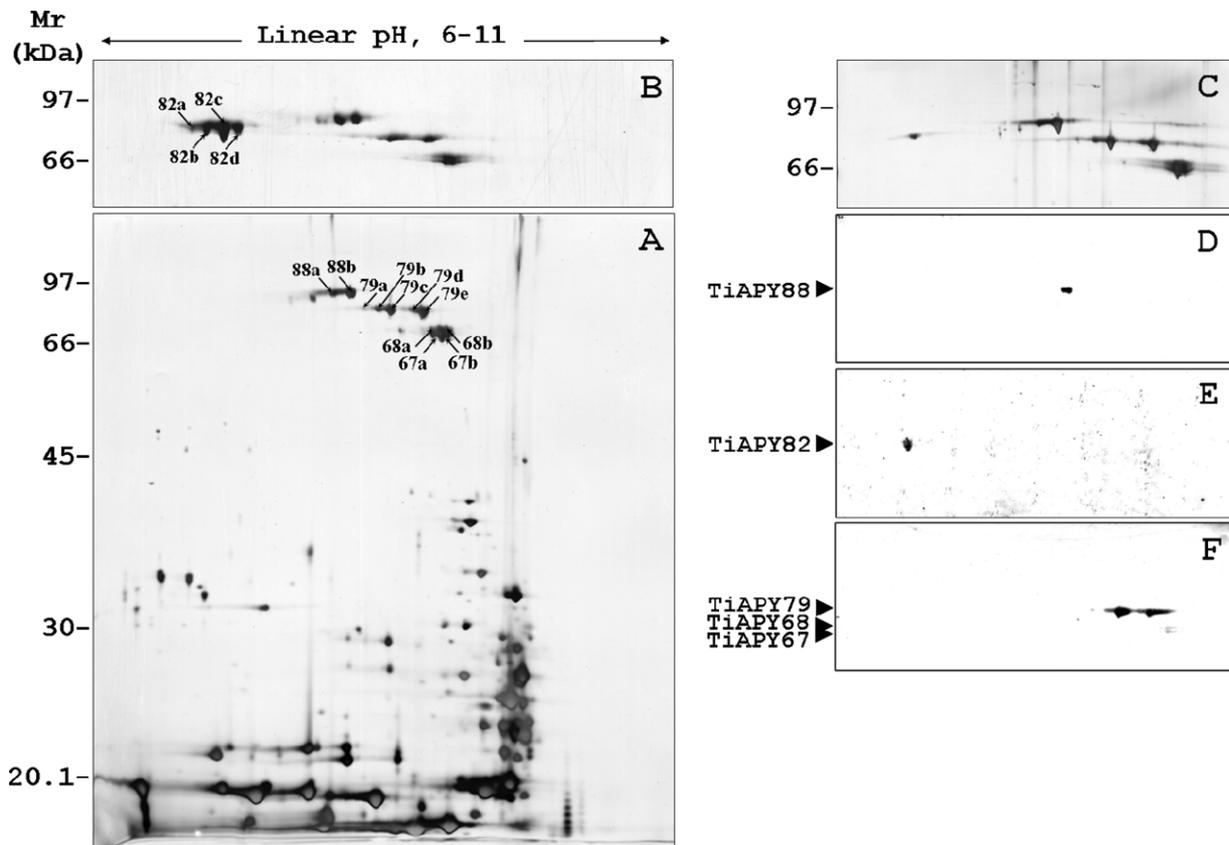


Fig. 4. TiAPY localization and immunodetection of *T. infestans* secreted saliva on alkaline 2-DE map. 2-DE gels were performed under denaturing conditions using 6–11 linear IPG strips in IEF and 10% SDS-PAGE in second dimension. The sample amount was 240 μ g of salivary proteins. The gels were silver-stained, entire 2-DE gel (A), and (B and C) restricted up-region gels containing TiAPY spots, or Western blotted on nitrocellulose membrane using anti-TiAPY88 serum (D), anti-TiAPY82 serum (E) and anti-TiAPY79 serum (F). TiAPY68 and TiAPY67 were faintly revealed with anti-TiAPY79 serum (F). Spot numbers on (A and B) correspond to MS/MS identified TiAPY isoforms shown in Table 2.

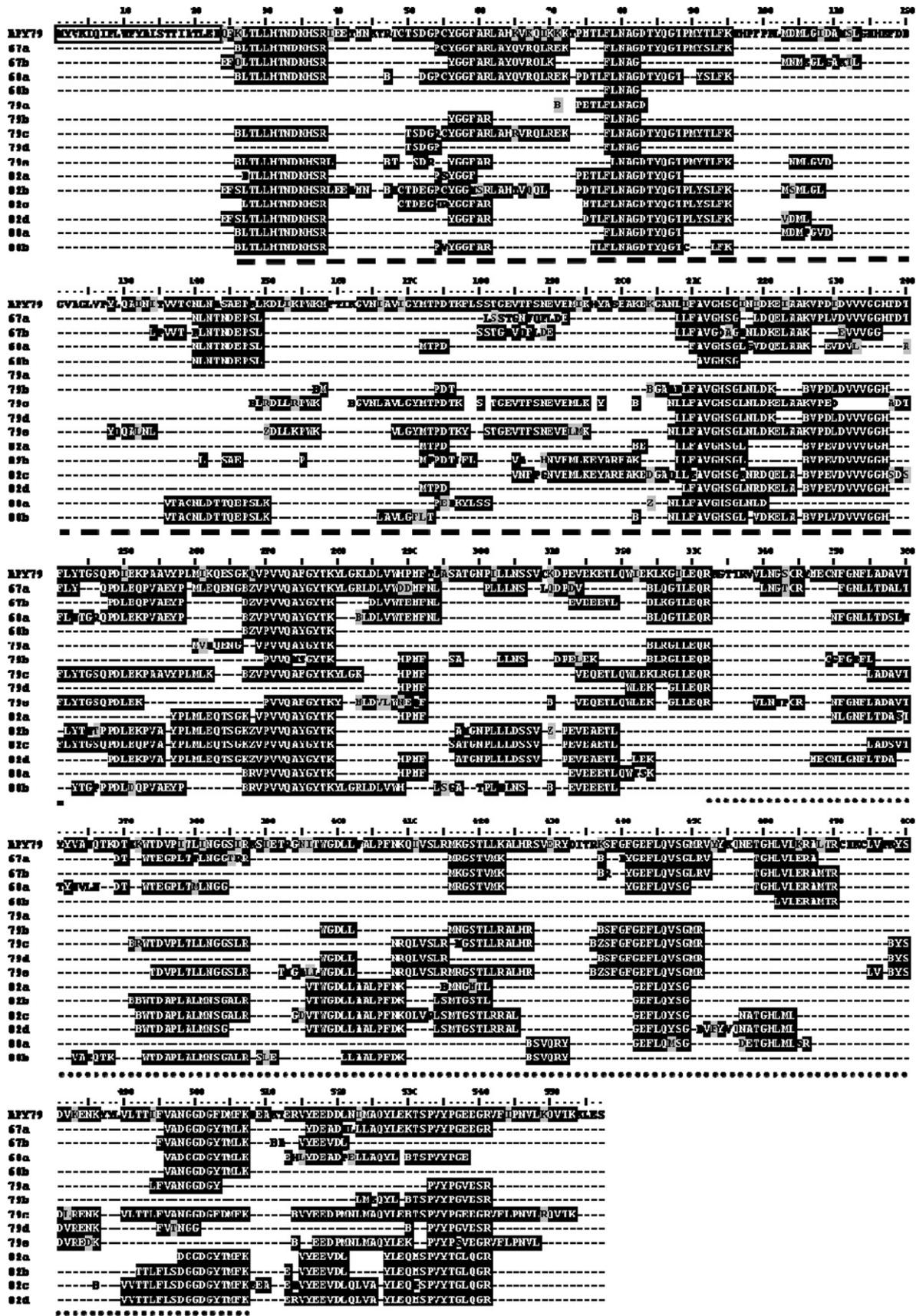


Fig. 5. Amino acid sequence alignment of sequenced peptides from all apyrase isoforms with APY79 precursor. The alignment was performed by ClustalW. Conserved residues are shaded in black, conserved substitutions are shaded in grey. The predicted signal peptide of 23 aa is boxed. The two conserved domains are indicated by a dashed line (Calcineurin-like phosphoesterase), and a dotted line (5'-nucleotidase).

Table 2

T. infestans apyrase isoforms identified by tandem mass spectrometry using MASCOT and MS BLAST methods

Apyrase form	Apyrase isoform ^a	MASCOT identification			Identification by de novo sequencing and MS BLAST searches		pI ^g	Mr (kDa) ^h
		MOWSE score ^b	Unique peptide number ^c	Coverage (%) ^d	Matched queries number (score ≥55) ^e	Coverage (%) ^f		
67	67a	105	2	4	14	26.8	8.9	67.3
	67b	105	3	5	4	8.4	8.9	67.9
68	68a	105	2	4	8	16.0	8.8	70.6
	68b	84	2	4	2	4.1	8.9	71.1
79	79a	NI	NI	NI	2	3.8	8.2	80.4
	79b	451	12	21	6	12.6	8.4	80.4
	79c	1427	27	45	21	47.2	8.5	79.9
	79d	389	11	18	4	8.8	8.7	79.9
	79e	1438	32	44	18	38.1	8.7	78.6
82	82a	NI	NI	NI	9	17.6	6.6	83.7
	82b	80	2	3	14	27.7	6.8	83.3
	82c	92	4	3	15	31.8	6.9	82.4
	82d	38 ⁱ	2	1	15	30.7	7.1	83.1
88	88a	87	1	2	5	10.2	8.1	89.0
	88b	70	1	2	9	18.1	8.0	88.8

NI, non-identified protein.

^a Apyrase isoform names correspond to the spots numbers indicated in Fig. 4.^b Probability Based Mowse Score of MASCOT software: $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.^c Number of unique tryptic peptide sequences identified via MASCOT.^d Coverage (%): percentage of predicted protein sequence covered by matched peptides via MASCOT.^e Number of unique peptide sequences identified via MS BLAST that had a significant sequence-alignment score superior to 55%.^f Coverage (%): percentage of deposited TiAPY79 sequence covered by matched query sequences with a alignment score superior to 55% via MS BLAST according to $[\sum \text{positive queries (aa)} \times 100] / \text{predicted protein (aa)}$.^g Experimental isoelectric point of protein on gel.^h Experimental relative molecular mass of protein on gel.ⁱ Indicates that the score reported is not statistically significant.

N-terminal region (amino acid residues 1–23), corresponding to the predicted signal peptide, was not found in MS/MS analyses (Fig. 5).

Peptide sequences from the apyrase isoforms differed in few amino acid residues, indicating that such isoforms may have been originated from sequence polymorphism as reported for other proteins of insect and spider species [24,50]. In fact, *T. infestans* was proposed to have a multi-gene apyrase family with, at least, three to five loci since 88 and 82 kDa apyrases are absent in some individuals [16]. Moreover 2-DE saliva proteome profiles are similar regarding the apyrase isoforms patterns if they come from an insect saliva pool or a single individual (data not shown). It is possible, however, that post-translational modifications might also be a source of apyrase heterogeneity, since the five isoforms were shown to be *N*-glycosylated in Ref. [16].

To test if all isoforms were associated with apyrase activity, we tried to perform in-gel activity assay, as previously described for 1-DE or IEF separately [18], but modified for entirely native 2-DE. Diffuse 2-DE apyrase activity was found (data not shown), but no conclusive results were possible to be drawn so far, probably due to apyrase oligomerization that occurs under native conditions [18]. However, it seems to corroborate oligomerization-dependent 5'-nucleotidase activity in vitro.

4. Conclusions

As bloodsucking arthropods, haematophagous *Triatomine* bugs produce a diversity of compounds of biotechnological or medical perspective. Pharmacological substances in their saliva counteract vertebrate host hemostatic events, such as coagulation, vasoconstriction and platelet aggregation, and modulate vertebrate immune-response [41].

Here we report that *T. infestans* saliva proteome contain mainly platelet-aggregation inhibitors that belong to lipocalin and apyrase families. The apparent redundancy of proteins with predicted and known anti-platelet function belonging to same families should represent enhanced highly specific mechanism activated as an early response to reduce the platelet aggregation of the prey blood in order to facilitate feeding. On the other hand, the existence of various proteins and isoforms related to anti-hemostatic activity in bug saliva could reside in an evolutionary adaptation for the insect to drive a great success in the bloodsucking. The *T. infestans* crude saliva seems to differ from other insect and tick saliva by apyrase diversity and abundance. It would be interesting to characterize apyrase isoforms separately, in order to compare their affinity to the ligands ATP and ADP in different environmental conditions (e.g. pH and temperature), to clarify the reason for protein redundancy. In addition, the new identified proteins with unknown or putative

functions may play important roles in blood meal and deserve future functional characterization studies. These proteins found in *T. infestans* saliva have potential biotechnological applications and can eventually be tested as anti-thrombotic agents and even as targets of a cocktail-vaccine to prevent *Trypanosoma cruzi* transmission.

Acknowledgments

We thank Dr. Jaime Paba for relevant technical advices and Nuno Domingues for technical assistance on amino acid analyses. We wish to thank Prof. Jaime M. Santana for the kind gift of the anti-TiAPY antibodies, his advices and extremely helpful position for the accomplishment of this work. This work was supported by a post-doctoral fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, attributed to Dr Sébastien Charneau, and by Grants from Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC), Brazil and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, PRONEX Program), Brazil.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijms.2007.05.004.

References

- [1] WHO, World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 905, 2002, i–vi, p. 1 (back cover).
- [2] M.P. Barrett, R.J. Burchmore, A. Stich, J.O. Lazzari, A.C. Frasch, J.J. Cazzulo, S. Krishna, *Lancet* 362 (2003) 1469.
- [3] B.B. Andrade, C.R. Teixeira, A. Barral, M. Barral-Netto, *An. Acad. Bras. Cienc.* 77 (2005) 665.
- [4] R.C. Jin, B. Voetsch, J. Loscalzo, *Microcirculation* 12 (2005) 247.
- [5] C.J. Schofield, *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 65 (Suppl. 1) (1985) 149.
- [6] M.H. Pereira, N.F. Gontijo, A.A. Guarneri, M.R. Sant'anna, L. Diotaiuti, *Trends Parasitol.* 22 (2006) 516.
- [7] A. Morita, H. Isawa, Y. Orito, S. Iwanaga, Y. Chinzei, M. Yuda, *Febs J.* 273 (2006) 2955.
- [8] C. Noeske-Jungblut, J. Kratzschmar, B. Haendler, A. Alagon, L. Possani, P. Verhallen, P. Donner, W.D. Schleuning, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5050.
- [9] C. Noeske-Jungblut, B. Haendler, P. Donner, A. Alagon, L. Possani, W.D. Schleuning, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 28629.
- [10] P. Fuentes-Prior, C. Noeske-Jungblut, P. Donner, W.D. Schleuning, R. Huber, W. Bode, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 11845.
- [11] I.M. Francischetti, J.M. Ribeiro, D. Champagne, J. Andersen, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 12639.
- [12] I.M. Francischetti, J.F. Andersen, J.M. Ribeiro, *Biochemistry* 41 (2002) 3810.
- [13] D.R. Flower, *Biochem. J.* 318 (Pt 1) (1996) 1.
- [14] J.J. Sarkis, J.A. Guimaraes, J.M. Ribeiro, *Biochem. J.* 233 (1986) 885.
- [15] J.M. Ribeiro, E.S. Garcia, *Experientia* 37 (1981) 384.
- [16] E. Faudry, S.P. Lozzi, J.M. Santana, M. D'Souza-Ault, S. Kieffer, C.R. Felix, C.A. Ricart, M.V. Sousa, T. Vernet, A.R. Teixeira, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 19607.
- [17] E. Faudry, P.S. Rocha, T. Vernet, S.P. Lozzi, A.R. Teixeira, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34 (2004) 1051.
- [18] E. Faudry, J.M. Santana, C. Ebel, T. Vernet, A.R. Teixeira, *Biochem. J.* 396 (2006) 509.
- [19] A.J. Liska, A. Shevchenko, *Proteomics* 3 (2003) 19.
- [20] K.G. Standing, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 (2003) 595.
- [21] R.S. Johnson, M.T. Davis, J.A. Taylor, S.D. Patterson, *Methods* 35 (2005) 223.
- [22] A.J. Liska, A. Shevchenko, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 291.
- [23] A.J. Liska, A.V. Popov, S. Sunyaev, P. Coughlin, B. Habermann, A. Shevchenko, P. Bork, E. Karsenti, *Proteomics* 4 (2004) 2707.
- [24] A. Shevchenko, M.M. de Sousa, P. Waridel, S.T. Bittencourt, M.V. de Sousa, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 862.
- [25] A.J. Liska, A. Shevchenko, U. Pick, A. Katz, *Plant Physiol.* 136 (2004) 2806.
- [26] R.A. Guercio, A. Shevchenko, J.L. Lopez-Lozano, J. Paba, M.V. Sousa, C.A. Ricart, *Proteome Sci.* 4 (2006) 11.
- [27] D.E. Kalume, M. Okulate, J. Zhong, R. Reddy, S. Suresh, N. Deshpande, N. Kumar, A. Pandey, *Proteomics* 5 (2005) 3765.
- [28] J.C. Sanchez, V. Rouge, M. Pisteur, F. Ravier, L. Tonella, M. Moosmayer, M.R. Wilkins, D.F. Hochstrasser, *Electrophoresis* 18 (1997) 324.
- [29] J. Paba, J.M. Santana, A.R. Teixeira, W. Fontes, M.V. Sousa, C.A. Ricart, *Proteomics* 4 (2004) 1052.
- [30] F. Sabounchi-Schutt, J. Astrom, I. Olsson, A. Eklund, J. Grunewald, B. Bjellqvist, *Electrophoresis* 21 (2000) 3649.
- [31] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850.
- [32] A. Frank, P. Pevzner, *Anal. Chem.* 77 (2005) 964.
- [33] A. Shevchenko, S. Sunyaev, A. Liska, P. Bork, A. Shevchenko, *Methods Mol. Biol.* 211 (2003) 221.
- [34] B. Habermann, J. Oegema, S. Sunyaev, A. Shevchenko, *Mol. Cell. Proteomics* 3 (2004) 238.
- [35] N. Camprostrini, L.B. Areces, J. Rappsilber, M.C. Pietrogrande, F. Dondi, F. Pastorino, M. Ponzoni, P.G. Righetti, *Proteomics* 5 (2005) 2385.
- [36] J.M. Ribeiro, J. Andersen, M.A. Silva-Neto, V.M. Pham, M.K. Garfield, J.G. Valenzuela, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34 (2004) 61.
- [37] J.M. Ribeiro, B. Arca, F. Lombardo, E. Calvo, V.M. Phan, P.K. Chandra, S.K. Wikel, *BMC Genomics* 8 (2007) 6.
- [38] M.A. Packham, J.F. Mustard, *Semin. Thromb. Hemost.* 31 (2005) 129.
- [39] J.F. Andersen, J.M. Ribeiro, *Biochemistry* 45 (2006) 5450.
- [40] M.M. Reis, R.M. Meirelles, M.J. Soares, *Tissue Cell* 35 (2003) 393.
- [41] J.M. Ribeiro, I.M. Francischetti, *Annu. Rev. Entomol.* 48 (2003) 73.
- [42] J.F. Andersen, N.P. Gudderra, I.M. Francischetti, J.M. Ribeiro, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58 (2005) 97.
- [43] G.C. Paesen, P.L. Adams, P.A. Nuttall, D.L. Stuart, *Biochim. Biophys. Acta* 1482 (2000) 92.
- [44] S. Sangamnatdej, G.C. Paesen, M. Slovak, P.A. Nuttall, *Insect Mol. Biol.* 11 (2002) 79.
- [45] R. Amino, R.M. Martins, J. Procopio, I.Y. Hirata, M.A. Juliano, S. Schenkman, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6207.
- [46] K. Pennington, E. McGregor, C.L. Beasley, I. Everall, D. Cotter, M.J. Dunn, *Proteomics* 4 (2004) 27.
- [47] G. Chinnasamy, C. Rampitsch, *Biochim. Biophys. Acta* 1764 (2006) 641.
- [48] R. Barth, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (1954) 517.
- [49] N. Wielsch, H. Thomas, V. Surendranath, P. Waridel, A. Frank, P. Pevzner, A. Shevchenko, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 2448.
- [50] L.F. Machado, S. Laugesen, E.D. Botelho, C.A. Ricart, W. Fontes, K.C. Barbaro, P. Roepstorff, M.V. Sousa, *Proteomics* 5 (2005) 2167.